

POREĐENJE IMUNOHEMIJSKIH METODA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SRČANOG TROPONINA I KOD DVA ANALIZATORA

Katarina Ille

Kliničko-bolnički centar „Zvezdara“, Beograd

COMPARISON OF IMMUNOCHEMISTRY METHODS FOR DETERMINATION OF CARDIAC TROPONIN I CONCENTRATION WITH THE TWO ANALYZERS

Katarina Ille

Clinical Hospital Center “Zvezdara“, Belgrade, Serbia

SAŽETAK

Cilj. Srčani troponin I je biohemijski pokazatelj oštećenja miokarda koji se godinama koristi u Kliničko-bolničkom centru „Zvezdara“ u Beogradu. Za određivanje koncentracije troponina I u serumu pacijenata koristi se hemiluminiscentni imunoesej (Siemens Immulite 1000). S ciljem ubrzanja dobijanja rezultata razmatrano je uvođenje nove metode za određivanje kardijalnog troponina I, elektrohemijskog imunoeseja, korišćenjem analizatora tipa Roche Cobas e411.

Metode. Ispitana je nova, kandidat metoda za određivanje koncentracije troponina I pre eventualnog uvođenja u kliničku praksu i upoređena je sa metodom koja se već koristi. Poređenje koncentracija srčanog troponina I dobijenih upotrebom metoda Roche Cobas e411 analizatora (x) sa Siemens Immulite 1000 analizatora (y) izvedeno je kod uzoraka seruma 94 odrasla pacijenta, oba pola, sa znacima i simptomima akutnog infarkta miokarda.

Rezultati. Analizom rezultata ustanovljena je jednačina regresije $y = 1,91x + 4,67$; koeficijent korelacije iznosio je 0,92. U 15 od 94 pacijenta (16%) rezultati istog uzorka dobijeni dvema metodama nisu se slagali. Kod takvih osoba rezultat troponina I dobijen jednom metodom ukazivao je na prisustvo akutnog infarkta miokarda ali kod druge, on je bio ispod dijagnostičke pragovne vrednosti.

Zaključak. Između vrednosti koncentracija troponina I izmerenih poređenim metodama ne postoji dobra saglasnost, izraženo kroz koeficijent korelacije i jednačinu regresije. Interpretacija rezultata bar kod svakog šestog pacijenta upućivala bi na suprotne zaključke u dijagnozi akutnog koronarnog događaja.

Ključne reči: troponin I; imunoesej; luminiscencija.

UVOD

Troponin I (TnI) je regulatorni protein koji ima ključnu ulogu u procesu relaksacije mišićnih vlakana u poprečnoprugastim mišićima. Troponin I koji potiče iz miokarda (srčani TnI, cardiac TnI, cTnI) razlikuje se od troponina I iz ostalih poprečnoprugastih mišića po svojoj jedinstvenoj N-terminalnoj sekvenci. Zbog svoje tkivne specifičnosti srčani troponin I se koristi kao veoma osetljiv biomarker oštećenja miokarda (1–5). U slučajevima akutnog infarkta miokarda (AMI) koncentracija

ABSTRACT

Objective. Cardiac troponin I is a biochemical marker that reflects damage to myocardial cells, which has been used for years in Clinical Hospital Center “Zvezdara”, Belgrade. Chemiluminescence immunoassay (Siemens Immulite 1000) was regularly used for determination of cardiac troponin I in sera of the patients. Aiming to improve the turnaround time for troponin I determination, it was considered to introduce a new method, electrochemiluminescence assay, by using Roche Cobas e411 analyzer.

Methods. We investigated a novel, candidate method for determination of serum cardiac troponin I before its eventual adoption in clinical routine and it was compared with the one already applied in our laboratory. Comparison of cardiac troponin I concentrations essayed with the use of Roche Cobas e411 analyzer (x) and of Siemens Immulite 1000 analyzer (y) was performed on serum samples of 94 adult patients, both genders, with signs and symptoms of acute myocardial infarction.

Results. Analysis of results revealed regression equation of $y = 1.91x + 4.67$; correlation coefficient was 0.92. In 15 out of 94 patients (16%) results obtained by two methods in the same sample disagreed. In such subjects, the result of troponin I determined with one method indicated presence of acute myocardial infarction, but with the other it was below the diagnostic cut-off value.

Conclusion. Between the concentrations of troponin I determined with compared methods there was no proper agreement, expressed by the correlation coefficient and regression equation. Interpretation of results in about every sixth patient would point to conflicting conclusion in diagnosis of acute coronary event.

Key words: troponin I; immunoassay; luminescence.

cTnI raste 3–6 časova posle pojave simptoma, dostiže vrhunac 12–16 časova po početku simptoma i može da ostane povišena 4–9 dana (6, 7).

U poslednjoj deceniji, merenje koncentracije srčanog troponina postalo je jedan od nezaobilaznih dijagnostičkih kriterijuma pri postavljanju dijagnoze akutnog infarkta miokarda. Naime, prema univerzalnoj definiciji infarkta miokarda za dijagnozu AMI neophodno je da bar jedna izmerena vrednost srčanog troponina bude iznad

definisano nivoa odlučivanja kod pacijenta u odgovarajućoj kliničkoj situaciji (8). Smatra se da povećanje koncentracije cTnI u krvi reflektuje oslobađanje cTnI iz ćelija miokarda, i da je čak i minimalno povećanje koncentracije cTnI povezano sa nepovoljnim ishodom po pacijenta izraženim kroz povećan rizik od nastupanja akutnog infarkta miokarda i povećan rizik kardiovaskularnog mortaliteta u narednih 12 meseci (9–12).

Za merenje koncentracije cTnI u laboratorijama se koristi veliki broj različitih metoda i imunoeseja koji među sobom nisu usaglašeni, i studije su pokazale velike razlike prilikom merenja koncentracije cTnI različitim metodama (13). Usled neusaglašenosti metoda za određivanje cTnI nije bilo moguće odrediti vrednost nivoa odlučivanja (decision limit, cut-off) koja bi bila zajednička za različite metode što dovodi do velike konfuzije prilikom upoređivanja rezultata cTnI iz različitih laboratorija. Da bi se harmonizovala metoda za određivanje cTnI, stručna i naučna javnost pokrenula je inicijativu da se preduzmu mere koje obuhvataju i upotrebu jedinstvenog referentnog materijala (SRM 2921) u svim imunoesejima za cTnI. Preporučeno je da svi proizvođači imunoeseja za cTnI (14) kao master kalibrator koriste referentni materijal SRM 2921.

S obzirom na brojnost i raznovrsnost metoda za određivanje koncentracije cTnI, Internacionalna federacija za kliničku hemiju (IFCC) objavila je i stalno dopunjava spisak raspoloživih imunoeseja zajedno sa njihovim analitičkim karakteristikama (15). U Službi laboratorijske dijagnostike KBC „Zvezdara“ u Beogradu se već godinama koristi hemiluminiscentna metoda za određivanje koncentracije srčanog troponina I (analizator: Siemens Immulite 1000, SAD) (16). Veliki nedostatak ovog načina određivanja koncentracije cTnI jeste sporost jer samo izvođenje analize zahteva 45 minuta. S druge strane, transport i priprema uzorka za izvođenje analize kao i kontrola rezultata zahtevaju dodatno vreme, pa se rezultati određivanja koncentracije troponina I za pacijente izdaju tek za 60–75 minuta od dospevanja uzorka u laboratoriju.

S ciljem da se pacijentima omogući kvalitetnija dijagnostika AMI, odnosno, da se prvenstveno skрати vreme izdavanja rezultata cTnI, razmatrano je ispitivanje (evaluacija) i eventualna primena alternativnog imunoeseja. Pri tome, alternativni analizator za izvođenje imunoeseja u laboratoriji je Roche Cobas e411 (Roche, Japan). Pregledom literature utvrđeno je da izvođenje imunoeseja za cTnI na analizatoru Cobas e411 traje samo devet minuta u kombinaciji sa produženom stabilnošću kalibracije i reagenasa (15, 17).

S kliničke tačke gledišta, važno je da imunoesej koji se koristi za određivanje koncentracije cTnI ima mali detekcioni limit (veliku analitičku senzitivnost) i visoku

preciznost čak i pri merenju niskih koncentracija cTnI. Imunoesej Roche Cobas e411 ima skoro istovetan limit detekcije za cTnI (0,16 ng/mL) kao i imunoesej Siemens Immulite 1000. Međutim, Roche Cobas e411 imunoesej analitički preciznije meri cTnI pri nižim koncentracijama (koeficijent varijacije od 10% ima pri koncentraciji od 0,3 ng/mL, za razliku od Siemens Immulite 1000 koji 10 CV% ima pri koncentraciji cTnI od 0,64 ng/mL). Važno je istaći da postoji preklapanje sastava reagenasa u pogledu prisutnih monoklonskih antitela, odnosno, oba proizvođača (Siemens i Roche) u reagensima za određivanje cTnI sadrže antitela čiji su epitopi u regiji 87–91 i regiji 27–40 molekula troponina I (15, 17).

O uporednoj analizi imunoeseja za određivanje koncentracije cTnI na analizatorima Roche Cobas e411 i Siemens Immulite 1000 nisu pronađeni podaci u literaturi, ali je sličnost sastava reagenasa u pogledu upotrebljenih vezujućih i detekcionih antitela govorila u prilog moguće saglasnosti između rezultata dobijenih poređenim imunoesejima. Posle sagledavanja analitičkih karakteristika, a s ciljem evaluacije Roche Cobas e411 metode za određivanje cTnI, pristupljeno je njenom poređenju sa metodom koja je već u upotrebi: Siemens Immulite 1000.

MATERIJAL I METODE

U radu su ispitivani serumski uzorci 94 pacijenta koji su hitno primljeni u decembru 2011. godine u KBC „Zvezdara“ pod sumnjom na akutni infarkt miokarda. Za analizu troponina I uzet je uzorak krvi venepunkcijom koristeći vakuum-eprovete sa aktivatorom koagulacije i separatorskim gelom. Serumski uzorci sa izraženom hemolizom, lipemijom ili ikteričnošću nisu uzimani u rad. U ispitivanje su uključeni pacijenti kod kojih je u trenutku prijema prošlo između 6 i 24 časa od početka tegoba (bol u prekidijumu koji traje duže od 20 minuta). Za poređenje dve metode kojima se određuje koncentracija cTnI odvojeni su alikvoti seruma pacijenata, a potom je uporedo izvedena analiza cTnI već korišćenom metodom, Siemens Immulite 1000 i kandidat metodom, Roche Cobas e411.

U sastavu reagensa Siemens Immulite 1000 imunoeseja se nalaze vezujuća i detekciona antitela koja sa srčanim troponinom I formiraju „sendvič kompleks“. Detekciono antitelo obeleženo je alkalnom fosfatazom koja deluje na hemiluminiscentni supstrat. Koncentracija cTnI u uzorku proporcionalna je količini vezane alkalne fosfataze od čega dalje zavisi jačina izmerenog hemiluminiscentnog signala (16). U sastavu Roche Cobas e411 imunoeseja se nalaze vezujuća i detekciona antitela koja sa srčanim troponinom I formiraju „sendvič kompleks“. Detekciono antitelo obeleženo je rutenijum kompleksom. Koncentracija cTnI u uzorku proporcionalna je količini vezanog rutenijum kompleksa od koje dalje zavisi jačina izmerenog elektrohemiluminiscentnog signala (17).

Prilikom razvrstavanja rezultata cTnI korišćeni su podaci o karakteristikama imunoeseja koje je objavila IFCC (15). Kao nivoi odlučivanja (cut-off vrednosti) primenjene su one koncentracije cTnI za koje koeficijent varijacije iznosi 10%. Ovi nivoi odlučivanja iznose 0,3 ng/mL za analizator Roche Cobas e411, a 0,64 ng/mL za analizator Siemens Immulite 1000.

Metode za određivanje koncentracije cTnI međusobno su upoređene kao što je opisano u literaturi, a koji podrazumeva otkrivanje oblika, jačine i smera povezanosti dve metode i izračunavanje regresione jednačine koja najbolje opisuje međuzavisnost ispitivanih metoda (18). U tu svrhu u radu je korišćen kompjuterski program Excel.

REZULTATI

Poređenje rezultata cTnI dobijenih elektrohemiluminiscentnom metodom Roche Cobas e411 (x) sa rezultatima dobijenim hemiluminiscentnom metodom Simens Immulite 1000 (y) izvedeno je kod 94 pacijenta. Poređenje Roche Cobas i Siemens Immulite metoda za određivanje koncentracije cTnI pokazalo je da su rezultati dobijeni dvema metodama pozitivno i linearno povezani, pri čemu je koeficijent linearne korelacije (r) iznosio 0,92. Međuodnos rezultata koncentracije cTnI u serumu izmerenih dvema poređenim metodama opisuje jednačina linearne regresije $y=1,91x + 4,67$. Kao što se vidi iz

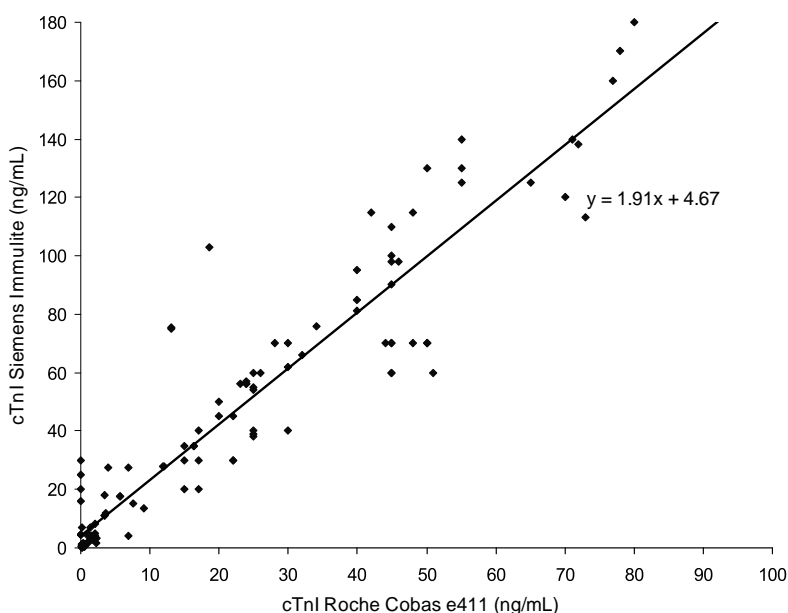
jednačine, postoji velika razlika između apsolutnih vrednosti koncentracija cTnI koje su dobijene poređenim metodama pri čemu metoda Siemens Immulite 1000 daje mnogo više rezultate za koncentraciju cTnI.

Kada su dobijeni rezultati za koncentraciju cTnI razvrstani prema položaju u odnosu na nivo odlučivanja (cut-off vrednost) pokazano je da se kod 15 od 94 pacijenta (16%) rezultati za istog pacijenta dobijeni dvema poređenim metodama uopšte ne slažu. Drugim rečima, dok bi rezultat jedne metode upućivao na dijagnozu akutnog infarkta miokarda, sa drugom to ne bi bio slučaj. Kod 6 od 94 pacijenta (6,4%) rezultat cTnI je bio pozitivan metodom Siemens Immulite1000, ali negativan metodom Roche Cobas e411. U nešto većem broju slučajeva, kod 9 od 94 pacijenta (9,6%), rezultat cTnI je bio negativan metodom Siemens Immulite 1000, ali pozitivan metodom Roche Cobas e411. U najvećem broju slučajeva, kod 79 od 94 pacijenta (84%) rezultati dve metode koje se porede razvrstani prema položaju u odnosu na nivo odlučivanja bili su saglasni. Najveći broj pacijenata, 45 od 94 (47,8%) imao je pozitivan rezultat i jednom i drugom metodom, dok su 34 od 94 (36,2%) pacijenta imala negativan rezultat korišćenjem i jednom i drugom metodom.

Rezultati su bliže prikazani u tabeli 1. Slika 1 prikazuje korelaciju dve ispitivane metode za određivanje koncentracije cTnI sa jednačinom prave koja oslikava poređenje metoda.

Tabela 1. Uporedni prikaz slaganja rezultata pri određivanju koncentracije cTnI na analizatorima Siemens Immulite 1000 i Roche Cobas e411.

Učestalost (%)	Siemens Immulite 1000	Roche Cobas e411
47,8	Pozitivan u odnosu na cut off	Pozitivan u odnosu na cut off
36,2	Negativan u odnosu na cut off	Negativan u odnosu na cut off
6,4	Pozitivan u odnosu na cut off	Negativan u odnosu na cut off
9,6	Negativan u odnosu na cut off	Pozitivan u odnosu na cut off



Slika 1. Korelacije Roche Cobas e411 i Siemens Immulite 1000 metoda za određivanje koncentracije cTnI.

DISKUSIJA

Kao što je već navedeno, pregledom literature ustanovljeno je da nema podataka koji se odnose na poređenje rezultata određivanja koncentracije cTnI metodama Roche Cobas e411 i Siemens Immulite 1000. Stoga je sproveden prvi korak u validaciji elektrohemitoluminiscentne Roche Cobas e411 metode pre eventualnog uvođenja u kliničku praksu KBC „Zvezdara“ kroz poređenje kandidat metode (Roche Cobas e411) sa onom koja se već koristi u laboratoriji (Siemens Immulite 1000). Unapred je bilo poznato da je sastav ispitivanih imunoeseja u pogledu imunoreaktivnosti monoklonskih antitela donekle sličan, pa je pretpostavljeno da će i rezultati određivanja cTnI dobijeni poređenim metodama biti saglasni među sobom. S druge strane, poznata je i činjenica da je veoma teško porediti rezultate koncentracije cTnI dobijene različitim imunoesejima, pre svega, usled različitih monoklonskih antitela u različitim imunoesejima sa različitom imunoreaktivnošću prema molekulu cTnI (19). Osim toga, molekul cTnI podleže različitim modifikacijama pa se u cirkulaciji nalazi u više različitih formi koje se različito dugo zadržavaju u krvotoku. Različita monoklonska antitela u reagensima sasvim različito reaguju i sa ovim raznim cirkulišućim formama cTnI. Situaciju dodatno komplikuje i to što različiti reagensi mogu da se potpuno različito ponašaju u situacijama kada se u uzorku nalaze heparin, heterofilna antitela ili autoantitela na cTnI što može da dovede i do potpune nereaktivnosti reagensa sa cTnI pacijenta i posledično do lažno negativnog rezultata (20–22).

U poslednjoj deceniji suštinski je izmenjen način dijagnostikovanja AMI tako što je određivanje koncentracije srčanog troponina postalo deo dijagnostičkog algoritma kod pacijenata pod sumnjom na AMI. Da bi se postavila dijagnoza AMI, potrebno je i da bar jedna izmerena vrednost srčanog troponina bude iznad nivoa odlučivanja u odgovarajućoj kliničkoj situaciji (8). Ovakav način dijagnostikovanja AMI postavlja pred kliničare neophodnost dobrog poznavanja metode koja se koristi u laboratoriji za određivanje koncentracije srčanog troponina, njenih ograničenja i mogućih interferirajućih faktora (23).

Rezultati poređenja dobijeni u ovom radu govore u prilog tome koliko je teško porediti rezultate sa različitim analizatora i koliko je potreban oprez prilikom interpretacije rezultata cTnI sa različitim analizatora ili prilikom prelaska sa jednog načina određivanja na drugi. Prilikom poređenja dva imunoeseja za određivanje cTnI u ovom radu koeficijent linearne korelacije je iznosio 0,92 ($r=0,92$). Drugi istraživači koji su upoređivali različite metode za određivanje koncentracije cTnI su utvrdili da su se koeficijenti korelacije kretali između 0,953 i 0,982 (24, 26). Moguće objašnjenje za niži koeficijent korelacije dobijen prilikom poređenja u laboratoriji KBC Zvezdara

je što je u radu korišćen analizator Siemens Immulite 1000 starije generacije dok su u literaturi nađeni podaci za slične analizatore novije generacije, Siemens Immulite 2000 i 2500. U našem istraživanju nagib regresione prave iznosio je 1,91, što je zajedno sa iznosom odsečka od 4,67 odražavalo mnogo više apsolutne vrednosti koncentracija cTnI izmerene analizatorom Siemens Immulite 1000 (y) poređeno sa vrednostima izmerenim analizatorom Roche Cobas e411 (x).

Još su istraživanja Wua i saradnika iz 1998. godine pokazala da različiti imunoeseji imaju potpuno različitu imunoreaktivnost prema cTnI i od tada postoji pritisak naučne i stručne javnosti da se eseji različitih proizvođača usklade ne bi li se došlo do prihvatljivog nivoa harmonizacije između metoda kojima se određuje cTnI (24). Ovi napori su upravljani u dva pravca, s jedne strane, u pravcu korišćenja istog referentnog materijala od strane svih proizvođača, a s druge strane, u pravcu unifikacije sastava reagenasa u smislu korišćenja istih monoklonskih antitela kako bi se obezbedila slična imunoreaktivnost reagensa u odnosu na pacijentov cTnI (25). Proizvođačima reagenasa za određivanje cTnI je na raspolaganju referentni materijal SRM 2921, ali još uvek ne postoji mehanizam da njegova upotreba postane obavezna za sve proizvođače (27). S obzirom na to da oba ispitivana imunoeseja korišćena u ovom radu u svom sastavu imaju vezujuća monoklonska antitela za epitop u regionu 87–91 molekula cTnI i detekciona monoklonska antitela za epitop u regionu 27–40 molekula cTnI, očekivana je veća saglasnost rezultata između poređenih metoda. Pokazalo se, međutim, da bi u znatnom broju slučajeva (15 od 94 pacijenta, 16%) rezultati cTnI sa različitih analizatora kliničara uputili na sasvim suprotne zaključke. Moguće objašnjenje za ovu nesaglasnost rezultata jeste da poređeni imunoeseji nisu jednako klinički senzitivni. Takođe, moguće objašnjenje za nesaglasnost rezultata cTnI je i eventualno prisustvo interferirajućih faktora u vidu heterofilnih antitela, autoantitela ili heparina koji su imali različit uticaj u dva poređena imunoeseja.

S obzirom na navedene rezultate, nije bilo moguće doneti definitivni zaključak o tome koji od dva imunoeseja ima prednost nad drugim pri određivanju koncentracije cTnI. Apsolutan broj pacijenata (15 pacijenata) kod kojih se rezultati cTnI nisu slagali je mali za bilo kakav definitivni zaključak čak i kada bi se rezultati cTnI dobijeni različitim metodama uporedili prema nekoj definisanoj krajnjoj tački (clinical end point), na primer prema kardiovaskularnom mortalitetu. Zbog svega navedenog, nesaglasnost rezultata navodi na potrebu za dodatnim ispitivanjem imunoeseja koje bi na većem broju pacijenata pokazalo koji od ispitivanih imunoeseja ima veću kliničku senzitivnost pri čemu se najčešće kao kriterijum (klinička krajnja tačka) koristi kardiovaskularni mortalitet 12 meseci posle primarnog

određivanja koncentracije cTnI (23). Istovremeno, takva studija bi bila prilika da se bolje sagleda uticaj interferirajućih faktora prilikom određivanja koncentracije srčanog troponina I.

U zaključku, rezultati na ispitivanom uzorku pokazuju da između vrednosti koncentracija cTnI izmerenih dvema poređenim metodama (Roche Cobas e411 i Siemens Immulite 1000) ne postoji dobra saglasnost što je izraženo kroz koeficijent korelacije i jednačinu linearne regresije, a naročito kroz činjenicu da bi rezultati cTnI znatnog broja pacijenata dobijeni poređenim metodama prilikom kliničke interpretacije upućivali na suprotne zaključke.

ZAHVALNOST

Zahvaljujem na pomoći Roche Diagnostics PO Srbija koji su donacijom reagenasa omogućili da se uradi istraživanje prikazano u ovom radu. Dizajn i sprovođenje istraživanja kao i stavovi navedeni u rukopisu doprinos su autora koji je nezavisan od navedene donacije.

SKRAĆENICE

AMI – Akutni infarkt miokarda

IFCC– Internacionalna federacija za kliničku hemiju

CV– Koeficijent varijacije

cTnI – Srčani troponin I

TnI – Troponin I

LITERATURA

- Perry SV. The regulation of contractile activity in muscle. *Biochem Soc Trans* 1979; 7: 593–617.
- Wilkinson JM, Grand RJA. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature* 1978; 271: 31–5.
- Wade R, Eddy R, Shows TB, Kedes L. cDNA sequence, tissue-specific expression and chromosomal mapping of the human slow-twitch skeletal muscle isoform of troponin I. *Genomics* 1990; 7: 346–57.
- Cummins P, Perry V. Troponin I from human skeletal and cardiac muscles. *Biochem J* 1978; 171: 251–9.
- Vallins JW, Brand NJ, Dabhaden N, et al. Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction. *FEBS Lett* 1990; 270: 57–61.
- Mair J, Morandell D, Genser N, et al. Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1995; 41: 1266–72.
- Mair J, Genser N, Morandell D, et al. Cardiac troponin I in the diagnosis of myocardial injury and infarction. *Clin Chem Acta* 1996; 245: 19–38.
- Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28: 2525–38.
- Missov ED, De Marco T. Clinical insights on the use of highly sensitive cardiac troponin assays. *Clin Chem Acta* 1999; 284: 175–85.
- Lindahl B, Venge P, Wallentin L. Relation between troponin T and the risk of subsequent cardiac events in unstable coronary artery disease. The FRISC study group. *Circulation* 1996; 93: 1651–7.
- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, et al. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. The FRISC study group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1139–47.
- Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, et al. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clin Chem* 1997; 43: 1379–85.
- Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Towards standardization of cardiac troponin I measurements Part II: assessing commutability of candidate reference materials and harmonisation of cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2006; 52: 1685–92.
- Bunk DM, Welch MJ. Characterisation of a new certified material for human cardiac troponin I. *Clin Chem* 2006; 52: 212–9.
- Apple FS, Murakami MM, Ler R, Walker D, York M; HESI Technical Committee of Biomarkers Working Group on Cardiac Troponins. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clin Chem* 2008; 54: 1982–9.
- Troponin I for use on Siemens Immulite 1000 systems. Los Angeles: Siemens Medical Solutions Diagnostics, 2007, (http://www.medical.siemens.com/siemens/en_GLOBAL/gg_diag_FBAs/files/package_inserts/immulite/Cardiac_Biomarkers_n/pilkti-7_siemens.pdf).
- Troponin I STAT (short turn around time) for use on Cobas systems. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 2011. (http://www.rochecanada.com/fmfiles/re7234008/package_inserts/TROPONINISTAT-05094798190-ENGLISH-V3-CAN.pdf).
- Passing H, Bablok W. A general regression procedure for method transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 783–90.
- James S, Flodin M, Johnston N, et al. The antibody configurations of cardiac troponin I assays may determine their clinical performance. *Clin Chem* 2006; 52: 832–7.

20. Steigler H, Fischer Y, Vasquez-Jimenez JF, et al. Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin Chem* 2000; 46: 1338–44.
21. Kim WJ, Laterza OF, Hock KG, et al. Performance of a revised cardiac troponin method that minimizes interferences from heterophilic antibodies. *Clin Chem* 2002; 48: 1028–34.
22. Eiksson S, Halenius H, Pulkki K, et al. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies. *Clin Chem* 2005; 51: 839–47.
23. Thygesen K, Mair J, Mueller C, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010; 31: 2197–206.
24. Wu AHB, Feng YJ, Moore R, et al. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998; 44: 1198–208.
25. Tate JR, Bunk DM, Christenson RH, et al. Standardisation of cardiac troponin I measurement: past and present. *Pathology* 2010; 42: 402–8.
26. Peetz D, Schweigert R, Jachmann N, et al. Method comparison of cardiac marker assays on PATHFAST, Stratus CS, AxSYM, Immulite 2000, triage, elecsys and cardiac reader. *Clin Lab* 2006; 52: 605–14.
27. Apple FS. Standardization of cardiac troponin I assays will not occur in my lifetime. *Clin Chem* 2012; 58: 169–71.