

Analytické zhodnocení a modifikace stanovení vazebné kapacity albuminu pro kobalt (ACB) pro jeho rutinní využití – technická zpráva

Juráková R., Adamovská S., Lačňák B., Stejskal D.

Oddělení laboratorní medicíny a interní oddělení Nemocnice Šternberk

SOUHRN

Autoři popisují metodu stanovení ACB a její modifikaci pro rutinní využití na automatickém analyzátoru (COBAS MIRA+).
Klíčová slova: ACB, IMA, ICHS, myokardiální ischemie, analytické zhodnocení.

SUMMARY

Juráková R., Adamovská S., Lačňák B., Stejskal D.: Analytic Evaluation and Modification in Determination of Albumin Cobalt Binding (ACB) Assessment for its Routine Utilisation Technical Report

Authors comment method for the ACB assessment and its modification for routine analysis on the automatic analyser (COBAS MIRA+).

Key words: ACB, IMA, CAD, myocardial ischemia analytic evaluation.

Úvod

V posledním desetiletí se opakovaně v literatuře objevují zmínky o nutnosti hledání nových, citlivých a především časných testů myokardiální ischemie, které by umožnily včasnou a účinnou terapeutickou či diagnostickou intervenci. Důvodem hledání dalších diagnostických testů v problematice myokardiální ischemie jsou především běžně známé nevýhody rutinně využívaných laboratorních ukazatelů myokardiálního poškození – např. srdečních troponinů, které dokáží sice spolehlivě detekovat přítomnost myokardiální nekrózy, ale nelze jimi zjistit přítomnost myokardiální ischemie bez nekrózy (1) – a nutnost provádění zátěžových vyšetření (např. ergometrie, perfuzní scintigrafie myokardu atp.), které jsou časově i technicky náročné.

V roce 2003 uznal FDA stanovení ACB jako časný ukazatel myokardiální ischemie (16). Analytické i klinické zhodnocení tohoto markeru bylo v témže roce publikováno v časopise *Clinical Chemistry* (1).

Jde o test velice potřebný, který slouží k odhadu myokardiální ischemie ještě před vznikem nekrózy a má především význam jako statimové vyšetření, proto jsme si v této práci položili následující otázky:

1. Liší se námi změřené hodnoty ACB u jedinců bez známek ischemické choroby srdeční od údajů publikovaných v rámci citovaného zhodnocení (1)?
2. Lze modifikovat stanovení ACB pro každodenní rutinní praxi běžného laboratorního oddělení pro statimové vyšetření?

Materiál a metody

Vyšetření skupiny zdravých jedinců

Vyšetření ACB bylo provedeno u 50 jedinců bez známek přítomnosti ischemické choroby velkých cév v anamnéze nebo bez kombinace rizikových faktorů

předčasné aterosklerózy, kteří nebyli v posledních měsících nemocni a nedostávali žádné léky. Šlo o osoby vyšetřené v rámci preventivních prohlídek v ordinacích praktických lékařů ve Šternberku.

Odběr vzorku a separace séra

K vyšetření ACB byly použity vzorky séra. Vzorky srážlivé krve byly po odběru na 60 minut uloženy při pokojové teplotě, poté byla provedena 10minutová centrifugace při 1100 g. Vlastní měření ACB následovalo do 120 minut od centrifugace při uložení vzorku při 4 °C. Pět minut před analýzou byl vzorek séra temperován na pokojovou teplotu (25 °C).

Pro odhad stability vzorku bylo odděleno ze dvou náhodně vybraných vzorků poměrné podíly, z nichž část byla ponechána při pokojové teplotě a měřena každou hodinu, část při teplotě 4 °C a měřena každý den a část byla zamrazena a uskladněna při -80 °C a měřena také každý den.

Analýza ACB

K ověření výsledků prezentovaného zhodnocení (1) byl použit vertikální fotometr MAX 002 (Dynex Corporation). Výsledky ACB byly vydávány v jednotkách absorbance (OD) (1).

Postup měření:

1. Do dvou mikrozkupek (1 ml) se pipetuje 200 µl čerstvě separovaného nebo rozmraženého a temperovaného séra (vzorek i slepá zkouška).
2. Ihned poté se do obou mikrozkupek přidá 50 µl 0,0034 mol/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1 g/l, $n = 0,0042 \text{ mol}$), prudce se po dobu 10 s míchá (třepačka Vibromix 2600 otáček/min) a 10 minut se inkubuje při pokojové teplotě.
3. Potom se do mikrozkupek se vzorkem přidá 50 µl DL-dithiotreitolu (DTT) (1,5g/l, $n = 0,0097 \text{ mol}$) a do mikrozkupek se slepou zkouškou 50 µl 0,9% NaCl. Oba vzorky se po dobu 10 s míchají (třepačka

Vibromix, 2600 otáček/min) a 2 minuty se inkubují při pokojové teplotě.

- Po dvouminutové inkubaci se do obou mikrozku-
mavek (vzorek i slepá zkouška) přidá 1,0 ml 0,9%
NaCl (minimalizace precipitace proteinu a snížení
turbidity).
- 300 μ l z každé mikrozku-
mavky (vzorek a slepá
zkouška) se pipetuje do dvou jamek mikrotitrační des-
tičky (1. jamka vzorek, 2. jamka slepá zkouška).
- Změří se absorbance při 490 nm.
- Výsledek ACB se vydává jako rozdíl mezi absor-
bancí vzorku a blanku, zaokrouhlený na dvě deseti-
tinná místa.

Pro možnost využití stanovení ACB v režimu STATIM (automatický analyzátor COBAS MIRA+) byla použita tato modifikace:

- Do jednoho segmentu pro analyzátor COBAS MIRA+ se pipetou dodá 230 l čerstvě separovaného nebo rozmraženého a temperovaného séra.
 - Pro stanovení ACB jsou programovány dvě metody, pro slepou zkoušku a pro vzorek.
- a) Popis programu a nastavení v režimu VZOREK:
- Reakční mód: R-S-SR1-SR2 (pro metody se 3 reagenty. Primární reagent: CoCl_2 -R; Vzorek: S, dva následující startovací reagenty – DTT:SR1 a 0,9% NaCl:SR2).
 - Reagent blank: No blank.
 - Vlnová délka: 500 nm.
 - Objem vzorku i slepé zkoušky: 95 μ l, přidává se v 1. cyklu.
 - Objem a koncentrace $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (R1): 50 μ l 0,0034 mol/l. (0,45g/l; $n = 0,0019$ mol), přidává se v 1. cyklu.
 - Doba inkubace vzorku a R1: 10 minut při teplotě 37 °C.
 - Objem a koncentrace DTT pro vzorek: 50 μ l 1,04 g/l ($n = 0,0044$ mol), přidává se v 25. cyklu.
 - Doba inkubace vzorku a slepé zkoušky: 2 minuty při teplotě 37 °C.
 - Po inkubaci je přidáno do vzorku i blanku 95 μ l 0,9% NaCl, přidává se ve 30. cyklu.
 - Výpočet: end point.
 - Čtecí body: první CB (absorbance kyvetového blanku) – poslední ve 30. cyklu.
- b) Popis programu a nastavení v režimu BLANK: analogicky se zadává metoda pro měření blanku, kdy se namísto DTT přidá ve stejném cyklu (25. cyklus) 50 μ l 0,9% NaCl.
- c) Výsledek ACB se vydává jako rozdíl mezi absor-
bancí vzorku a blanku, zaokrouhlený na dvě deseti-
tinná místa.

Na registračním spektrofotometru HELIOS byly pro-
věřeny difference absorbancí při různých vlnových dél-
kách (450–500 nm) pro CoCl_2 a DL-DTT.

Výsledky měření ACB od 50 jedinců, zjištěné obě-
ma uvedenými metodami, byly poté srovnány.

Statistické zpracování

Všechna data byla zpracována softwarem Medcalc a GraphPadPrism4. Rozložení měřených dat ACB bylo

hodnoceno Komolgorovým-Smirným testem. Rozložení dat ACB se blížilo gaussovskému, proto byly hodnoty ACB na obou analyzáto-
rech srovnávány para-
metrickým párovým Studentovým t-testem i F-testem a jejich vztah byl popsán Pearsonovým korelačním ko-
eficientem a Passing-Bablokovou regresní analýzou. Po-
rovnatelnost obou měřících postupů byla hodnocena Blandovým-Altmanovým diferenčním diagramem.

Výsledky

Hodnoty ACB činily u 50 jedinců $0,36 \pm 0,15$ ($\bar{x} \pm 2s$),
vykazovaly normální rozdělení a nevykazovaly závis-
lost na věku ani pohlaví. Naše nálezy odpovídaly dříve
prezentovaným výsledkům a nelišily se od hodnot pub-
likovaných v rámci citovaného zhodnocení – viz tab. 2
(1, 2, 3, 4, 5, 6).

Analytické charakteristiky při měření na přístroji
MAX 002

- CV % v sérii:
 - 3,4 % ($n = 10$, OD = 0,61),
 - 4,1 % ($n = 10$, OD = 0,61).
- Celková nepřesnost (CV % mezi sériemi při zamra-
žení vzorku séra na -80 °C):
 - 5,0 % ($n = 10$, OD = 0,42),
 - 4,1 % ($n = 10$, OD = 0,60).

Analytické charakteristiky při měření na přístroji
COBAS MIRA+

- CV % v sérii:
 - 2,4 % ($n = 10$, OD = 0,37),
 - 3,9 % ($n = 10$, OD = 0,33).
- Celková nepřesnost (CV % mezi sériemi při zamra-
žení vzorku séra na -80 °C):
 - 8,9 % ($n = 8$, OD = 0,58),
 - 3,6 % ($n = 8$, OD = 0,34).

Při analýze ACB na přístroji COBAS MIRA+ jsme
použili jinou koncentraci CoCl_2 a DTT a jiné množství
0,9% NaCl; tyto změny byly optimalizovány na sniže-
ný objem vzorku (poměry mezi CoCl_2 a DTT zůstaly
zachovány podle jejich molárních koncentrací). Při uve-
dené modifikaci jsme také zachovali poměr hmotností
vzorku a CoCl_2 .

Na registračním spektrofotometru HELIOS jsme si
také ověřili, že absorbance 450–500 nm pro CoCl_2
a DL-DTT se významně nemění (odchylka na výsle-
dek měření je zanedbatelná) (tab. 1).

Table 1. Optical Density: CoCl_2 and DTT in the Different Wave-
lengths, HELIOS Device

Wavelength	CoCl_2	DTT
450 nm	0.008	1.778
470 nm	0.007	1.806
490 nm	0.008	1.829
500 nm	0.009	1.817

Stabilita vzorků

Vzorky séra byly stabilní 4 hodiny při pokojové tep-
lotě, 3 dny při 4 °C a 14 dnů při zamražení na -80 °C,
poté hodnoty OD významně klesaly.

Srovnání s dříve publikovanou metodou (1)

Byla provedena analýza 50 vzorků od jedinců bez myokardiální ischemie a nemoci. Naměřené hodnoty ACB se na obou výše jmenovaných analyzátoch (MAX 002, COBAS MIRA+) významně nelišily (t-test: $t = -1,378$, $DF = 49$, $p = 0,18$; F-test: variance ratio 1,01, $p = 0,97$) a vykazovaly normální rozdělení (tab. 2).

Table 2. ACB values, MAX 002 and COBAS MIRA + analysers (N = 50)

Analyser	X	Median	SD	Minimum	Maximum
COBAS MIRA+	0.37	0.38	0.09	0.14	0.53
MAX 002	0.37	0.37	0.08	0.18	0.56

X – average, SD – standard deviation

Hodnoty ACB naměřené na obou přístrojích navzájem úzce korelovaly (Pearsonův korelační koeficient 0,92; 95% interval spolehlivosti 0,8675–0,9574).

Rovnice lineární regrese byla $Y = -0,02 + 1,02 \cdot X$ (Y = hodnota na COBAS MIRA+; X = hodnota na MAX 002). Významné odchylky od linearity nebyly zaznamenány (obr. 1). Na základě výsledků Blandova-Altmanova diferenčního histogramu lze konstatovat, že obě metody poskytují v oblasti blízké hodnotě cut-off srovnatelný výsledek (obr. 2).

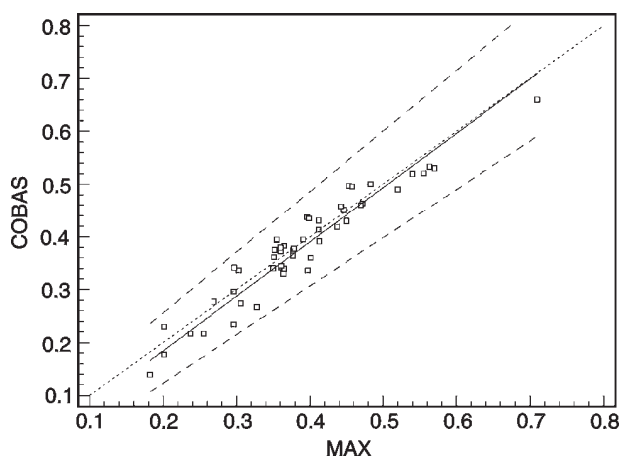


Fig. 1. Passing-Bablok regression of ACB; MAX002 and COBAS MIRA+ analysers (N = 50)

$Y = -0.020 + 1.020 \cdot X$ (Y = OD on COBAS MIRA + analyser; X = OD on MAX 002+ analyser; F-ratio 517, $P < 0.001$)

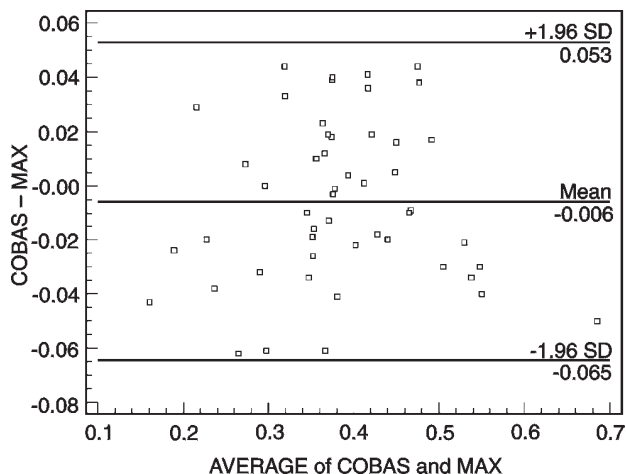


Fig. 2. Bland-Altman plot of ACB; MAX002 and COBAS MIRA+ analysers, N = 50

Diskuse

Do současnosti bylo provedeno pouze malé množství klinických studií, které využívaly stanovení ACB. Jednou z možných příčin je nedostatek odborných informací, které se věnují této problematice (v červenci 2003 např. pouze 2 odkazy v databázi PubMed) a především skutečnost, že souprava byla komerčně dostupná ještě na jaře 2004 pouze v USA (patentováno firmou Ischemia Technologies Inc., název vyšetření ACB-IMA). Teprve v posledním roce se rozběhla distribuce i v Evropě. Na druhé straně je nutno uvést, že existuje jednoduchá nekomerční aplikace tohoto vyšetření, jehož zhodnocení bylo publikováno v březnu 2003, která je levná a rychlá a lze ji jednoduše modifikovat a zavést do rutinní praxe (1).

V publikovaných sděleních bylo prezentováno, že jedinci s akutním infarktem myokardu nebo ICHS měli oproti pacientům bez ICHS hodnoty ACB významně vyšší. Stanovením ACB bylo možno rozhodovat mezi kardiogenní ischemickou a neischemickou bolestí za sternem. Senzitivita stanovení ACB se pohybovala mezi 83–96 % a specifická mezi 69–94 %, pozitivní prediktivní hodnota 92–97 % a negativní prediktivní hodnota 91–96 % (2, 6–8).

Pro odlišení mezi infarktem myokardu a nestabilní anginou pectoris však nebylo možno stanovení ACB využít (8). Stanovení ACB bylo možno s 6–24hodinovým předstihem odhadovat pozitivní a negativní tropoin jedince (tedy predikovat pacienty s následným vznikem nekrózy myokardu) (11) a sériové měření ACB se osvědčilo při odhadu efektivity koronární cirkulace (2).

Pokud byla pro odhad přítomnosti AKS použita kombinace stanovení srdečního troponinu I a ACB, podařilo se pozitivní diagnózu již při příjmu pacienta zjistit u 60 % nemocných (při pouhém stanovení troponinu to bylo jen u 23 % jedinců). Při použití kombinace diagnostických metod pro odhad AKS se při vstupním vyšetření také významně zvýšila specifická (při kombinaci EKG + cTnI + ACB činila 70 %; pokud byla použita kombinace cTnI+EKG činila specifická pouhých 50 %) (14–16).

Zdá se, že díky znalosti hodnot ACB lze také významně zkrátit hospitalizaci/observaci pacientů na několik hodin (průměrně na 2 hodiny); pozitivní výsledky by měly vést ke změně léčebné intervence (7, 14).

Stanovení ACB se osvědčilo také při odhadu latentní ischemie. Vyšetření se provádělo před ukončením ergometrie a po ní, přičemž se ukázalo, že jedinci s latentní ischemií mají vyšší hodnoty ACB na vrcholu zátěže než pacienti bez ischemie. Senzitivita stanovení ACB se pohybovala v rozmezí 75–100 % a specifická mezi 72–73 % (4–6).

Stanovení ACB se osvědčilo také při odhadu účinnosti provedení PTCA (implantace a průchodnost sten-tu). U jedinců s prolongovanou myokardiální ischemií byly hodnoty ACB vyšší; senzitivita činila 96 % (10). Za zajímavé lze také považovat nálezy, které hovoří o možnosti využití ACB v diferenciální diagnostice mozkových příhod. Bylo totiž zjištěno, že osoby s ischemickou mozkovou příhodou nebo přechodnou ischemií

CNS (TIA) mají vyšší hodnoty ACB než jedinci s hemoragickou mozkovou příhodou (4).

Současně je však nutno upozornit, že stanovení ACB není pro myokard specifické vyšetření. Teoreticky bychom měli nalézat zvýšení ACB při jakékoliv tkáňové ischemii; v praxi byly však podobné nálezy prezentovány pouze ojediněle, a až s velkým odstupem po jejím vzniku (např. 24–48 hodin po vyčerpávající zátěži při gastrointestinální ischemii).

Falešně pozitivní hodnoty ACB také nalézáme u malého procenta jedinců s delečním defektem N-terminálního konce albuminu (1–3 %). Uvedený výskyt falešně pozitivních nálezů je však vzhledem k významné diagnostické senzitivitě a vysoké specifitě zanedbatelný (1, 5–8, 13).

Výhody klinického použití stanovení ACB v časně diagnostice AKS a latentní myokardiální ischemie jsme potvrdili i na našem pracovišti. Výsledky použité modifikace i závěry z nich vyplývající odpovídají výsledkům i závěrům prezentovaných jinými autory (1, 11, 17–19). V současné práci potvrzujeme, že se při této použité modifikaci výsledky ACB u jedinců bez známek myokardiální ischemie pohybují v podobných mezích jako v dříve prezentovaných studiích – tedy pod hodnotou OD 0,5.

Jsme si vědomi skutečnosti, že pro kvalifikovanější rozhodnutí o srovnatelnosti popsané metody s metodou prezentovanou v roce 2003 (1) by bylo potřeba více měření v celé šíři obvykle získávaných výsledků (0,2–0,9 OD). Na druhé straně je téměř jisté, že pro rozhodovací algoritmus budou mít význam pravděpodobně pouze hodnoty OD mezi 0,35–0,65 (1, 4–5).

Závěrem lze konstatovat, že byla předložena modifikace metodiky na stanovení ACB v rutinní praxi běžného laboratorního provozu, která by mohla být levnou alternativou vyšetření ACB-IMA (Ischemia Modified Albumin, výrobce Ischemia Technologies). První klinické výsledky odpovídají závěrům publikovaným v odborné literatuře a v souladu s nimi by mohly svědčit pro použitelnost tohoto vyšetření v běžné klinické praxi.

Literatura

1. **Bhagavan, N. V., Lai, E. M., Rios, P. A., Yang, J. et al.** Evaluation of Human Serum Albumin Cobalt Binding Assay for Assessment of Myocardial Ischemia and Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry*, 2003, 49, p. 581–585.
2. **Bar-Or, D., Solomons, C.** Test for rapid evaluation of ischemic state. *United States Patent*, 1993, 5, 227, p. 307.
3. **Bar-Or, D., Lau, E.** Marker useful for detection and measurement of free radical damage and method. *United States Patent*, 2002, 6, 475, p. 743.
4. **Bar-Or, D., Lau, E., Winkler, J. V.** Test for rapid evaluation of ischemic states and kit. *United States Patent*, 2002, 6, 461, p. 875.
5. **Bar-Or, D., Lau, E., Winkler, J. V.** Test for rapid evaluation of ischemic states and kit. *United States Patent*, 2002, 6, 492, p. 179.
6. **Bar-Or, D., Solomons, C.** Test for rapid evaluation of ischemic states and kit. *United States Patent*, 1994, 5, 290, p. 519.
7. **Morrow, D. A., de Lemos, J. A., Sabatine, M. S., Altman, E. M.** The Search for a Biomarker of Cardiac Ischemia. *Clinical Chemistry*, 2003, 49, p. 537–539.
8. **Bhagavan, N. V., Lai, E. M., Rios, P. A., Yang, J.** Evaluation of Human Serum Albumin Cobalt Binding Assay for the Assessment of Myocardial Ischemia and Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry*, 2003, 49, p. 581–585.
9. **Bar-Or, D., Lau, E., Winkler, J. V.** A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report. *J. Emerg. Med.*, 2000, 19, p. 311–315.
10. **Bar-Or, D., Winkler, J. V., Vanbenthuyssen, K., Hartus, L., Lau, E., Hetzel, F. W.** Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to Creatin Kinase, Creatin Kinase-MB, myoglobin, and troponin I. *Am. Heart J.*, 2001, 141, p. 985–991.
11. **Christenson, R. H., Duh, S. H., Sanhai, W. R., Wu, A. H. B. et al.** Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for Assessment of Acute Coronary Syndrome Patients: A Multi-center Study. *Clinical Chemistry*, 2001, 47, p. 464–470.
12. **Sinha, M. K., Gaze, D. C., Tippins, J. R., Collinson, P. O. et al.** Ischemia Modified Albumin Is a Sensitive Marker of Myocardial Ischemia after Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation*, 2003, 107, p. 2403.
13. **Apple, F. S., Quist, H. E., Otto, A. P. et al.** Release Characteristics of Cardiac Biomarkers and Ischemia-modified Albumin as Measured by the Albumin Cobalt-binding Test after a Marathon Race. *Clinical Chemistry*, 2002, 48, p. 1097–1100.
14. Info: www.ischemia.com.
15. http://www.cap.org/captoday/archive/2002/cardiovascular_feature.html.
16. <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2003/ANS01200.html>.
17. **Stejskal, D., o ret, B., Juráková, R. et al.** Vazebná kapacita albuminu pro kobalt – test pro diagnostiku myokardiální ischemie. *Cor et Vasa*, 2004, 46, p. 435–438.
18. **Lačňák, B., Stejskal, D., Juráková, R. et al.** Využití stanovení vazebné kapacity pro kobalt (ACB) v diagnostice latentní myokardiální ischemie. *Intervenční a akutní kardiologie*, 2003, 2, A15.
19. **Stejskal, D., Lačňák, B., Juráková, R. et al.** First experience with cobalt binding capacity (ACB) test in diagnosis of acute coronary syndrome (a pilot study). *Vnitř Lék.*, 2004, 50, p. 734–739.

Do redakce došlo 7. 3. 2005.

Adresa pro korespondenci:
Bc. Renata Juráková
Oddělení laboratorní medicíny
Nemocnice Šternberk
Jívavská 20
785 16 Šternberk
e-mail: olm@nemstbk.cz