

# О чем следует помнить при определении концентрации сердечных тропонинов в крови?<sup>\*</sup>

**Беневоленский Д.С.**

*Специалист по продукции компании «Radiometer Medical ApS» (Дания)*

## Клиническая необходимость определения концентрации тропонинов в крови

Определение концентрации сердечных тропонинов I или T в крови больного – краеугольный камень современной лабораторной диагностики инфаркта миокарда. Согласно рекомендациям как Европейского общества кардиологов [1], так и Национальной академии клинической биохимии (США) [2] определение концентрации сердечных тропонинов следует проводить у всех больных при подозрении на острый коронарный синдром. Сходные рекомендации приняты и Всероссийским научным обществом кардиологов. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 19 августа 2009 г. №599н «Об утверждении порядка оказания плановой и неотложной медицинской помощи населению Российской Федерации при болезнях системы кровообращения кардиологического профиля» предписывает всем лечебно-профилактическим учреждениям, где оказывается неотложная помощь больным с сердечно-сосудистыми заболеваниями, проводить определение уровня тропонинов «в экстренном (безотлагательном) порядке и в любое время суток».

Такое внимание к тропонинам, а точнее к сердечным изоформам тропонинов I и T, определяется их уникальной биохимической структурой, что позволяет создать тест-системы с высочайшей клинической чувствительностью и специфичностью в отношении повреждения миокарда. В 2007 году решением наиболее авторитетных американских, европейских и международных кардиологических ассоциаций диагноз инфаркта миокарда был напрямую связан с повышением уровня тропонинов в крови [3]. Согласно этому документу «термин инфаркт миокарда следует использовать при наличии данных о некрозе миокарда на фоне клинической картины, соответствующей ишемии миокарда». Причем под данными о некрозе миокарда понимается «выявление роста и/или падения уровня сердечных биомаркеров (предпочтительно тропонина) с, по крайней мере, одной величиной, превышающей

верхний референсный предел», а достаточным свидетельством ишемии считается хотя бы одно из следующего:

- Наличие симптомов ишемии;
- Изменения ЭКГ, свидетельствующие о появлении ишемии (появление изменений ST-T или появление блока левой ножки пучка Гиса);
- Развитие патологического зубца Q на ЭКГ;
- Свежая потеря жизнеспособности миокарда или нарушение региональной подвижности его стенки, подтвержденное методами визуализации.

Фактически предусматривается только один вариант постановки диагноза без определения уровня тропонинов: «внезапная, неожиданная сердечная смерть, включающая остановку сердца, часто с симптомами ишемии миокарда, и сопровождающаяся предположительно новым подъемом ST, или новой блокады левой ножки пучка Гисса, и/или выявлением нового тромба при коронарографии и/или при аутопсии, произошедшая до взятия проб крови, или до выявления сердечных биомаркеров в крови».

Для диагностики острого инфаркта миокарда исключительно важно выявить рост и/или падение уровня тропонинов, то есть «волну» повышенной концентрации, возникающую после появления участков некроза, причем хотя бы в одной точке эта концентрация должна быть выше верхнего референсного предела (ВРП) в течение первых 24 часов после болевого приступа [2]. ВРП устанавливается на основе исследования группы не менее чем из 120 здоровых людей, не имеющих заболеваний сердца в анамнезе. Для тропонинов I и T пороговым значением выявления поражения сердца признана 99-я перцентиль распределения полученных результатов, то есть у 99% здоровых людей уровень соответствующего анализата в плазме ниже этой величины. В идеале каждая лаборатория должна установить собственный ВРП для каждой тест-системы и анализатора, соответствующий особенностям популяции. Однако учитывая сложность проведения такого исследования, допускается ориентироваться на значения, приведенные производителями оборудования.

Согласно рекомендации Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (IFCC)

<sup>\*</sup> Сердечные изоформы тропонина I и тропонина T.

аналитическая чувствительность метода должна быть примерно в 5 раз ниже клинически значимого порогового уровня [4]. Кроме того, общая погрешность, определяемая коэффициентом вариации (CV), на ВРП не должна превышать 10%, иначе тест будет приводить к появлению ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов. Устройства для внелабораторной диагностики (РОСТ-анализаторы) должны соответствовать тем же критериям [4].

Использование 99-ой перцентили распределения концентраций тропонинов у здоровых людей в качестве ВРП позволяет достигнуть высокой клинической чувствительности и специфичности по отношению к острому инфаркту миокарда. В таблице 1 приведены эти величины для внелабораторной диагностики неотложных состояний нового анализатора «AQT90 FLEX» компании «Radiometer». В качестве пороговой величины, отличающей норму от патологии, взята концентрация 0,023 мкг/л, соответствующая 99-ой перцентили.

**Таблица 1.**

*Диагностическая чувствительность и специфичность тропонинов при остром инфаркте миокарда (с учетом ВРП)*

| При поступлении (0–2 часа)        |               |
|-----------------------------------|---------------|
| Чувствительность                  | Специфичность |
| 65%                               | 91%           |
| Через 6–9 часов после поступления |               |
| Чувствительность                  | Специфичность |
| 91%                               | 88%           |

Достаточно точное количественное определение уровня тропонина позволяет не только подтвердить некроз миокарда, но и установить степень риска серьезных осложнений и смертельного исхода с целью выбора наиболее адекватного метода лечения. На рисунке 1 представлен упрощенный алгоритм диагностики острого коронарного синдрома, принятый Европейским обществом кардиологов.

|                     |   |                |  |
|---------------------|---|----------------|--|
| Поступление         | → Боль в груди                            |                |  |
| Рабочий диагноз     | → Подозрение на острый коронарный синдром |                |  |
| ЭКГ                 | → Стойкое повышение сегмента ST           | Нарушения ST/T | Норма или неопределенные изменения ЭКГ |
|                     |   | ↓ ↘ ↙ ↓        | ↓                                      |
| Биомаркеры          | →   | Тропонин ↑     | Тропонин отрицательный дважды          |
| Стратификация риска | →   | Высокий риск   | Низкий риск                            |
| Диагноз             | → ИМ (+) ST                               | ИМ (-) ST      | Нестабильная стенокардия               |
| Лечение             | → Реперфузия                              | Инвазивное     | Неинвазивное                           |

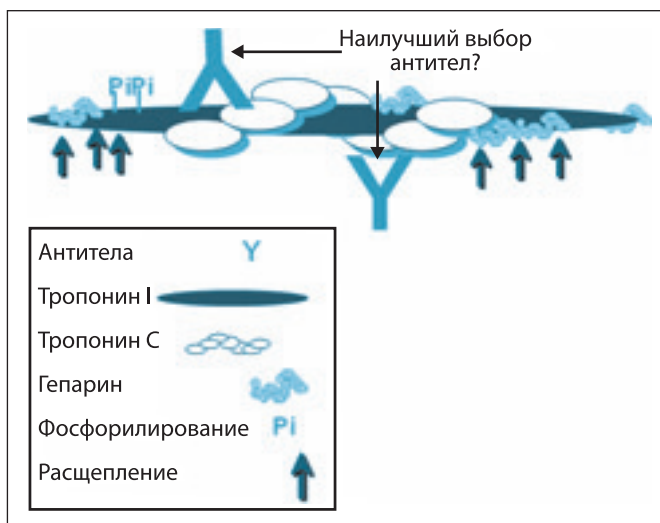
**Рисунок 1.**

*Алгоритм обследования при остром коронарном синдроме [1].*

Все современные клинические и лабораторные рекомендации не учитывают различий между тропонинами I и T с точки зрения диагностики инфаркта миокарда.

**Трудности определения концентрации тропонинов в крови**

В крови здоровых людей концентрация этих белков крайне мала. Концентрация тропонина I на уровне ВРП примерно 3 000 000 000 раз меньше общей концентрации белков в плазме, в 5000 и в 300 раз меньше соответствующих концентраций других широко известных биомаркеров некроза – миоглобина и креатинкиназы MB. Тройной комплекс тропонинов I, T и C, попадая из некротизированных кардиомиоцитов в кровь, распадается на свободный тропонин T и двойной комплекс из тропонинов I и C. Это и есть основные формы тропонинов в крови. Однако уже внутри кардиомиоцитов начинается протеолитическое расщепление тропонинов I и T [5]. В крови протеолиз продолжается, что приводит к постепенному отщеплению концевых фрагментов молекул тропонина I (рис. 2). Кроме того, тропонин I подвергается фосфорилированию/дефосфорилированию и окислению. Поэтому в крови циркулируют не собственно тропонины, а постоянно изменяющийся спектр их модифицированных фрагментов.



**Рисунок 2.**

*Факторы, влияющие на выбор антител для определения тропонина I.*

Все имеющиеся на сегодняшний день методы определения концентрации тропонинов основаны на иммунохимической реакции, так называемом сэндвич-анализе. Обычно используется 1–2 типа антител для связывания антигена и 1–2 типа детекторных антител, меченных каким-либо способом.

Применяются мышинные моноклональные антитела, полученные против определенного эпитопа сердечного тропонина. Они способны связаться лишь с некоторыми фрагментами молекулы тропонина. Различия в наборах антител у разных производителей тестов – основная причина в разбросе абсолютных величин, получаемых с помощью разных тест-систем при определении тропонинов в крови больных. Специальный комитет Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) совместно с Американской ассоциацией клинической химии (ААСС) приложили немало усилий для стандартизации методов определения тропонина I. Национальным институтом стандартов и технологий США (NIST) был принят новый стандартный референсный материал для сердечного тропонинового комплекса человека SRM 2921, который должен помочь в будущей стандартизации методик для определения тропонина. При практически идеальной корреляции величин, полученных наилучшими наборами реагентов, абсолютные величины концентраций могут различаться в 5–10 раз. Поэтому прямое сравнение абсолютных значений невозможно, а границы нормы должны быть определены отдельно для каждой методики (набора реагентов определенного производителя). И хотя клиническая интерпретация результатов с учетом соответствующих референсных диапазонов в целом совпадает при использовании разных наборов, эта ситуация создает очевидное неудобство.

Остаются и «серые зоны», особенно в близкой к ВРП области значений. Частично это связано со статистической природой получаемых данных, а частично с трудностью и неточностью установления ВРП, то есть 99-й перцентили распределения концентрации в группе здоровых людей.

Наборы реагентов для определения тропонина Т до недавнего времени выпускал только один производитель – «Roche Diagnostics», поэтому результаты определения его концентрации на разных анализаторах были сопоставимы.

### **Анализатор Radiometer «AQT90 FLEX» впервые может определить как тропонин I, так и тропонин Т в одной пробе.**

Следует помнить о статистическом характере полученных в результате анализа величин, причем, чем ниже концентрация, тем больше погрешность определения. Например, если истинная концентрация тропонина в пробе составляет 0,039 мкг/л, а CV в этой точке равен 10%, то при идеальной работе анализатора по законам статистики из 1000 определений 956 попадут в интервал 0,031–0,047 мкг/л, но в одном случае полученная величина будет ниже 0,027 мкг/л, а в другом – выше 0,051 мкг/л.

### **Возможные ошибки при определении концентрации тропонинов в крови**

Если лабораторные данные существенно расходятся с клинической картиной, то возможно, что это произошло в результате ошибки анализа.

*Преаналитические ошибки.* Преаналитический этап – источник примерно 60–70% ошибок в экспресс-лаборатории [6]. Их причинами могут быть неправильная идентификация больного или пробы, ошибки при взятии крови, в т.ч. использование нестандартных пробирок или антикоагулянтов, а также ошибки при обработке и хранении пробы. Значительного числа ошибок можно избежать при использовании стандартных средств забора крови, например вакуумных пробирок. При работе с сывороткой причиной ложно-положительных результатов определения тропонинов может быть наличие фибриновых сгустков в результате неполного свертывания крови, например у больных с коагулопатиями или получающих антикоагулянтную терапию. Некоторые тест-системы очень чувствительны к гемолизу.

**Анализатор «Radiometer «AQT90 FLEX» работает со стандартными вакуумными пробирками большинства производителей, содержащими гепарин или ЭДТА, и не требует никакой обработки или раскапывания пробы крови, что экономит время и исключает значительную часть преаналитических ошибок. Встроенный сканер распознает штрих-код на пробирке. Применение системы 1st automatic позволяет связать данные о больном, пробе и операторе и передать их в информационную систему во время взятия пробы, что исключает ошибки идентификации.**

*Аналитические ошибки.* Неправильная работа анализатора – возможная причина аналитических ошибок. Прежде всего необходимо убедиться, что анализатор откалиброван в соответствии с требованиями производителя, и что внутрилабораторный контроль качества проведен надлежащим образом. Скрытой причиной получения ложно-отрицательных или ложно-положительных результатов определения тропонинов может быть наличие интерферирующих веществ в пробе крови, например:

- гетерофильных антител;
- эндогенных компонентов крови, таких как билирубин и гемоглобин;
- иммунных комплексов;
- высокой концентрации щелочной фосфатазы.

Гетерофильные антитела – это антитела, образующиеся против неизвестных антигенов (часто чужеродных белков). Сообщалось о циркулирующих антителах человека, специфичных к широкому спектру иммуноглобулинов животных,

таких как мышь, крыса, кролик и другие. У больного эти антитела могут появиться вследствие разных причин, включая применение мышинных моноклональных антител при лечении онкологических заболеваний; контакт с микробными антигенами; контакт ветеринаров, фермеров и рабочих пищевой промышленности с чужеродными белками; присутствие в доме домашних животных. Аутоиммунные заболевания приводят к образованию таких аутоантител, как ревматоидный фактор (антитела к Fc-фрагменту иммуноглобулинов G). Распространенность интерферирующих антител среди населения достаточно велика. Все эти находящиеся в крови антитела могут перекрестно взаимодействовать со связывающими и детекторными антителами тест-системы, приводя к положительному результату в отсутствие в пробе повышенной концентрации тропонинов.

Помимо этого, у 5,5% людей без признаков сердечно-сосудистых заболеваний и у 21% больных с острым коронарным синдромом были обнаружены аутоантитела к тропонину I [7]. Взаимодействуя с центральной частью молекулы тропонина, они могут блокировать связывание антител тест-системы, что иногда приводит к ложно-отрицательным результатам анализа.

Из-за большого разнообразия интерферирующих антител какого-либо специфического теста, который мог бы подтвердить или исключить присутствие таких антител в пробе не существует. Лабораторные специалисты должны заподозрить наличие интерферирующих антител в тесте на тропонину, когда результат теста:

- расходится с клиническими данными о больном;
- не воспроизводится на той же или на другой тест-системе;
- результат нелинеен после серии разведений.

**Тест-система анализатора «Radiometer» «AQT90 FLEX» для предотвращения эффекта интерферирующих антител содержит мышинный IgG и бычий  $\gamma$ -глобулин. Одно из связывающих и детекторное антитела тест-системы взаимодействуют с тропонином за пределами его центрального участка – мишени аутоантител к тропонину, что снижает влияние аутоантител на результаты анализа. В качестве способа получения сигнала от детекторных антител выбран чисто физический метод: флуоресценция хелата европия с временным разрешением. Это исключает влияние избытка щелочной фосфатазы, отмеченного при ферментативном методе. Наконец, гемолиз не оказывает влияния на результаты определения как тропонина I, так и тропонина T [8].**

*Постаналитические ошибки.* Обработка информации, сравнение с референсными диапазонами и передача данных

лечащему врачу существенно упрощаются, а риск ошибок уменьшается при подключении анализатора к информационной системе.

Важно помнить, что тропонины попадают в кровь не сразу после возникновения некроза. Поэтому результат определения тропонинов может быть отрицательным на фоне очевидных признаков острого инфаркта миокарда, если взятие проб крови производилось в первые часы после начала болевого приступа. В то же время, анализ пробы крови сразу после поступления больного в приемное отделение дает важную клиническую информацию (таблица 1).

Важнейшая часть постаналитического этапа – помощь клиницистам в интерпретации полученных данных. Здесь необходим вдумчивый подход и выработка общих правил оценки результатов, полученных при использовании разных реагентов, например, на портативных анализаторах у постели больного и в центральной лаборатории. Хотя повышение уровня тропонинов в отсутствие острого инфаркта миокарда происходит довольно редко, оно может ввести врача в заблуждение. В случае сомнения в достоверности

**Таблица 2.**

*Причины повышения уровня тропонинов в отсутствие острого коронарного синдрома [3]*

|  |
|--|
| Ушиб сердца или другая травма вследствие хирургической операции, катетерной деструкции, электрокардиостимуляции и т.д. |
| Застойная сердечная недостаточность – хроническая или острая   |
| Расслаивание аорты   |
| Порок аортального клапана  |
| Гипертрофическая кардиомиопатия  |
| Тахи- или брадиаритмии или атриовентрикулярная блокада   |
| Синдром «разбитого сердца» (кардиомиопатия такоцубо)   |
| Рабдомиолиз с поражением сердца  |
| Тромбоэмболия легочной артерии, тяжелая легочная гипертензия   |
| Почечная недостаточность   |
| Острые неврологические заболевания, включая инсульт и субарахноидальное кровоизлияние                                  |
| Инфильтративные заболевания: амилоидоз, гемохроматоз, саркоидоз и склеродермия   |
| Воспалительные заболевания: миокардит или поражение миокарда при эндо- или перикардите                                 |
| Употребление наркотиков или токсических веществ  |
| Критические состояния, особенно в сочетании с дыхательной недостаточностью или сепсисом                                |
| Ожоги, особенно, если они поражают >30% поверхности тела   |
| Чрезмерные физические нагрузки   |

результата нужно постараться найти другую возможную клиническую причину повышения уровня тропонинов, не связанную с инфарктом миокарда, повторно проанализировать клиническую картину и назначить дополнительные диагностические тесты. Возможные причины повышения концентрации тропонинов приведены в таблице 2.

#### **Что делать в случае сомнения в правильности определения тропонинов в крови?**

1) Прежде всего, нужно убедиться в правильности работы анализатора. Для этого необходимо проводить калибровки и техническое обслуживание с частотой, рекомендованной производителем. В случае сомнения, проведите измерение образцов контроля качества в соответствии с рекомендациями производителя. **По меньшей мере, один контрольный образец должен соответствовать клинически значимой пороговой концентрации (ВРП) тропонинов.**

2) Проверить правильность взятия пробы крови, и повторить взятие пробы и тестирование.

Если результаты контроля качества свидетельствуют о правильной работе анализатора, взятие пробы крови осуществляется в соответствии с инструкциями производителя, а полученные данные по-прежнему не соответствуют клинической картине, то нужно попытаться найти скрытую причину в особенностях пробы или заболевания:

1) Повторить анализ пробы после нескольких разведений и проверить линейность результатов, нарушение которой позволяет выявить интерферирующие антитела.

2) Использовать имеющиеся в продаже гетерофильные блокирующие агенты (обычно это смесь иммуноглобулинов) или нормальную мышиную (или другого животного) сыворотку в качестве блокирующего агента.

3) Проверить наличие гемолиза или иктеричности в пробе для исключения возможности негативного влияния билирубина и/или гемоглобина.

4) По возможности, повторить анализ той же пробы с помощью другой тест-системы для проверки результата. Если нет другой тест-системы, то послать образец в другую лабораторию для проверки другим способом.

5) Если имеется достаточное количество образца, сохранить часть пробы для дальнейшего тестирования в лаборатории другого ЛПУ или лаборатории производителя реагентов (анализатора).

6) Обсудить с лечащим врачом противоречия между результатом анализа и клинической картиной. Повторно проанализировать клиническую картину и назначить дополнительные диагностические тесты (например, рассмотреть возможность другой причины боли в груди, повторить ЭКГ и т.д.), и постараться оценить возможность выявления другой клинической причины повышения уровня тропонинов, не связанной с инфарктом миокарда\*.

\* Список литературы находится в редакции