

High-sensitivity cardiac troponin assays : laboratory and clinical aspects

Citation for published version (APA):

Mingels, A. M. A. (2012). *High-sensitivity cardiac troponin assays : laboratory and clinical aspects*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20120203am>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120203am](https://doi.org/10.26481/dis.20120203am)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn de belangrijkste oorzaak van overlijden wereldwijd. Het grootste aandeel wordt veroorzaakt door ischemische ziekten, zoals een acuut myocard infarct (AMI). Eigenschappen van de ideale biomerker om AMI te diagnostiseren zijn specificiteit voor hartschade, een vroege detectie na het ontstaan van de eerste symptomen en een lange halfwaardetijd. Op dit moment voldoen de cardiale troponines (cTn), cardiale troponine T (cTnT) of I (cTnI), het meest aan deze criteria. De troponines zijn eiwitten die een regulerende functie hebben in het contractiemechanisme van het hart. Volgens de meest recente internationale richtlijnen kan de diagnose AMI gesteld worden wanneer sprake is van een stijging of daling van cTn concentratie met tenminste één waarde boven de 99^{ste} percentiel van een referentie/controlgroep, samen met andere klinische bevindingen en beeldvorming.

De huidige cTn immunoassays zijn echter niet (of met onvoldoende precisie) in staat om cTn concentraties te detecteren in de bloedcirculatie van gezonde personen en de 99^{ste} percentiel concentratie als afkapwaarde kan daarom niet behoorlijk bepaald worden. Bovendien zijn er sterke verschillen in cTnI resultaten tussen verschillende laboratoria en klinische studies. Er zijn namelijk meer dan 20 cTnI assays commercieel verkrijgbaar die tot wel 20 maal kunnen variëren in uitslagen, dit in tegenstelling tot de cTnT assay waar nog altijd patent op zit. Tenslotte zijn er tegenstrijdige resultaten beschreven betreffende de structuur van cTn in de bloedcirculatie. In dit proefschrift trachten we de analytische beperkingen van de huidige cTn metingen te overwinnen.

– Meetbare troponine concentraties bij gezonde personen

Zeer recentelijk zijn er verbeteringen bereikt in het lage meetbereik van de cTn assays. Dit heeft geleid tot de zogenaamde hoog-sensitieve (hs) cTn immunoassays zoals bediscussieerd in *hoofdstuk 2*. Wij hebben als eerste gepubliceerd over toepassing van de hs-cTnT assay in gezonde personen. In *hoofdstuk 3* hebben we laten zien dat cTnT concentraties in de bloedcirculatie van deze gezonde referentiepopulatie een typisch gaussische verdeling heeft met een 99^e percentiel afkapwaarde van 16 ng/L. We ontdekten een verschil in concentratie tussen mannen en vrouwen, terwijl een relatie met leeftijd minder duidelijk was. Waarom cTn bij gezonde personen in bloed kan worden aangetoond is nog onduidelijk. Voorheen

werd verondersteld dat myocyten vanaf geboorte bestaan en dat veroudering en ziekten leiden tot verlies van myocyten. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat aanmaak van nieuwe myocyten wel mogelijk is.

Desalniettemin, de hs-cTnT assay was de enige commercieel verkrijgbare cTn assay die de diagnostische afkapwaarde kon meten met de aanbevolen precisie (variatie coëfficiënt <10%), zoals besproken in *hoofdstuk 2 en 3*. Het blijft vooralsnog onduidelijk of deze richtlijn in precisie noodzakelijk is voor diagnostische doeleinden. Voor prognostische doeleinden zou het echter veel belangrijker kunnen zijn om het hele referentiegebied te meten met optimale precisie en om geslachts- en leeftijdsafhankelijke afkapwaarden toe te passen.

– Nieuwe inzichten in het lage meetbereik van troponine

Met de huidige cTn assays werden af en toe cTn concentraties gemeten bij personen zonder duidelijke klinische aanwijzingen voor een AMI. Dit zou mogelijk kunnen duiden op het feit dat cTn kan vrijkomen uit beschadigde myocyten zonder dat necrose van de hartspiercel is opgetreden. Doordat wij als een van de eersten beschikten over de hs-cTnT assay waren wij in de gelegenheid om verschillende populaties met een cardiaal risico te bestuderen, met cTnT concentraties in het lage meetbereik.

Inspannings-geïnduceerde verhoging van cTn concentraties zijn nu en dan gemeten na langdurige inspanning maar in de afwezigheid van klinische symptomen. Zoals bediscussieerd in *hoofdstuk 4* was dit ook afhankelijk van het type inspanning, de gebruikte assay, en de daarbij gekozen afkapwaarde. In *hoofdstuk 3 en 4* laten we zien dat cTnT concentraties na het lopen van een marathon waren gestegen in nagenoeg alle lopers (86%) en één dag na de loop weer zakten. Deze inspannings-geïnduceerde verhoging van cTn konden we niet verklaren door uitdroging (*hoofdstuk 3 versus 4*) of door een verminderde renale klaring (*hoofdstuk 5*). We vonden een positieve associatie met de gelopen afstand (*hoofdstuk 4*) en een negatieve associatie met training (*hoofdstuk 3*). Dit alles suggereert dat cTn verhoging door inspanning symptomatisch is voor cardiale schade en dat met voldoende training het hart hiertegen wordt beschermd.

Daarnaast blijft het onduidelijk waarom patiënten met terminale nierinsufficiëntie een chronisch verhoogde cTn concentratie vertonen, of dit komt door cardiale ziekte of door verminderde of zelfs afwezige renale klaring. *Hoofdstuk 6* beschrijft dat cTnT concentraties waren verhoogd tot boven de 99^{ste} percentiel afkapwaarde in nagenoeg al deze patiënten

(94%). Opvallend was dat de patiënten met een historie van cardiovasculaire ziekte significant hogere cTnT concentraties vertoonden met een hogere intra-individuele variabiliteit in vergelijking tot de patiënten zonder deze historie. Dit doet vermoeden dat de chronische cTn verhoging wordt veroorzaakt door een combinatie van zowel coronaire als renale aandoeningen.

De identificatie van patiënten met coronaire aandoeningen blijft een grote uitdaging. Traditionele risicofactoren, predictiemodellen, en biomerkers worden tot nu toe beperkt toegepast. In *hoofdstuk 7* hebben we patiënten bestudeerd met stabiele klachten van pijn-op-de-borst. We vonden een significante associatie tussen cTnT concentraties in de circulatie en de mate van atherosclerose in de coronaire arteriën zoals gedetecteerd met computed tomografie. Een dergelijke associatie vonden we niet voor de biomerkers NT-proBNP en hsCRP. Onderzoek naar de overlevingsduur in *hoofdstuk 8* bevestigde inderdaad dat cTnT was geassocieerd met het krijgen van een cardiaal event (revascularisatie, acuut coronaire syndroom, of cardiaal overlijden). We vonden meer dan drie maal zoveel cardiale events in patiënten met een hs-cTnT concentratie in het vierde kwartiel (>6.7 ng/L), ook wanneer gecorrigeerd voor traditionele risicofactoren. In mindere mate vonden we zelfs een verbeterde classificatie bovenop de detectie van coronaire plaque met computed tomografie.

Alles te samen ondersteunen de resultaten in dit proefschrift de hypothese dat elke meetbare cTn concentratie moet worden geassocieerd met cardiaal lijden, dat te allen tijde vermeden dient te worden.

– **Harmonisatie en standaardisatie van troponine assays**

Harmonisatie- en standaardisatiepogingen van de verschillende cTnI assays laten nog zeer te wensen over, ook met gebruik van het gezuiverde en goed gekarakteriseerde standaard referentiemateriaal NIST SRM 2921. In *hoofdstuk 9* laten we haar instabiliteit zien na standaard additie in serum en heparineplasma, wat beperkingen geeft in de harmonisatie van cTnI assays. Op dit moment lijkt cTn-positief patiëntenmateriaal de voorkeur te hebben als harmonisator, ondanks dat dit moeilijk te verkrijgen is en minder goed is gespecificeerd en gekarakteriseerd.

– **Volledig gedegradeerde troponine T in de bloedsomloop**

Tegenstrijdige resultaten zijn beschreven over de structuur van cTn in de bloedsomloop. Wij laten in *hoofdstuk 10* duidelijk zien dat cTnT na een AMI volledig is gedegradéerd in serum. Daarnaast bevestigen we dat cTnI met name voorkomt in het cTn I-C complex en slechts gedeeltelijk is gedegradéerd. Klinische consequenties zijn afhankelijk van een validatie studie in een grotere AMI populatie en of er eventueel ziekte afhankelijke fragmenten of fragmentpatronen geïdentificeerd kunnen worden.

– **Richtingen voor toekomstig onderzoek**

Het is van groot klinisch belang om fout-positieve toekenning van patiënten met cardiaal lijden te minimaliseren. Toekomstig onderzoek moet zich daarom richten op het nog beter onderscheid kunnen maken tussen een gezonde myocyte en een myocyte met de eerste tekenen van cardiovasculair lijden. Dit kan bereikt worden door bijvoorbeeld het moleculaire mechanisme, wanneer en in welke vorm cTn vrijkomt uit beschadigde myocyten, verder uit te diepen of door een nog betere of complementaire cardiale biomarker te ontdekken.

Summary

Cardiac and/or vascular disease is the leading cause of death worldwide. The highest incidence accounts for ischemic diseases, like an acute myocardial infarction (AMI). Specifications of a perfect biomarker to diagnose AMI are heart specificity, early detection after first symptoms, and a long half-life. The current preferred biomarkers are cardiac troponins (cTn), either cardiac troponin T (cTnT) or I (cTnI), being regulatory proteins of the cardiac contractile apparatus. As recently redefined by the international guidelines, AMI is diagnosed with the detection of a rise and/or fall of cTn with at least one value exceeding the 99th percentile of a reference control group, together with clinical and imaging findings.

Up to now, however, the contemporary cTn immunoassays were unable to detect cTn concentrations in the blood circulation of healthy individuals (or with insufficient precision) and the 99th percentile cutoff concentration could thus not be properly determined. In addition, comparison of cTnI results among different laboratories and clinical studies remained limited since more than 20 cTnI assays are commercially available, in contrast to the highly patented cTnT assay, that deviate up to 20-fold in assay result. Finally, conflicting results have been reported on the structural aspects of cTn in the blood circulation. In this thesis, we attempt to overcome these analytical limitations in the cTn measurements.

– Measurable troponin concentrations in healthy individuals

Improvements in the lower cTn measuring range have lately been achieved, resulting in the so called high-sensitivity (hs) cTn immunoassays as reviewed in *chapter 2*. By using the hs-cTnT assay, as described in *chapter 3*, we were the first who showed that cTnT concentrations in the blood circulation of a healthy reference population follow a typical gaussian distribution and we reported the 99th percentile cutoff at 16 ng/L. We found a significant difference between sexes, while an age effect was not that obvious. The reason for the presence of cTn concentrations in healthy individuals remains unclear. It was previously considered that the number of myocytes is established at birth and is lost with age or disease, though recent research has shown the existence of (slow) renewal of myocytes. Nevertheless, the hs-cTnT assay was the only commercially available cTn assay that measured the diagnostic cutoff concentration with sufficient precision according to the guidelines, as can be concluded from *chapter 2 and 3*. It remains to be elucidated, however,

whether the predicate “guideline acceptance” is required for diagnostic purposes. For prognostic and screening purposes, it might become more important to measure with optimal precision across the complete reference range and to apply sex- and age-specific cutoff concentrations.

– **New insights in the lower troponin measuring range**

With the contemporary assays, measurable cTn concentrations have occasionally been noticed without the clear evidence of AMI. This raises the possibility that cTn can be released from damaged myocytes but without typical myocardial necrosis. The availability of the hs-cTnT assay enabled us to investigate several populations at (low) coronary risk in more detail.

Exercise-induced cTn concentrations have occasionally been noticed after prolonged strenuous exercise but in the absence of clinical symptoms. This turned out to be dependent on the type of exercise, the assay, or the cutoff used. As described in *chapter 3 and 4*, after marathon running, post-run cTnT concentrations elevated to above the 99th percentile cutoff in almost all runners (86%) and returned to baseline one day after the run. The exercise-induced cTnT concentrations could neither be clarified by a diminished renal function (*chapter 5*), nor by dehydration (*chapter 3 versus 4*). We furthermore found a positive association to running distance (*chapter 4*) and a negative association to experience (*chapter 3*). Overall, this indicates that exercise-induced cTnT elevations are symptomatic for minor myocardial injury and that sufficient training protects the heart from real cardiac damage.

In addition, it remains unclear whether chronic cTn elevations in patients with End-Stage Renal Disease are caused by cardiac disease or by the decrease or absence of renal clearance. *Chapter 6* describes that cTnT concentrations were above the 99th percentile cutoff in almost all patients (94%). Interestingly, in the patients with a history of cardiovascular disease, significantly higher cTnT concentrations were found with higher intra-individual variability compared to patients without this history. This might suggest that the chronic cTn elevations are caused by a combination of coronary and renal disease.

The identification of patients at coronary risk remains an ongoing challenge. Traditional risk factors, prediction models, and biomarkers turned out to be of limited use so far. In *chapter 7*, we investigated patients with stable chest-pain. We found a significant association between circulating cTnT concentrations and the extent of coronary atherosclerotic plaque

as assessed with coronary computed tomography. Such an association we did not find for NT-proBNP and hsCRP. Survival analysis in *chapter 8* indeed confirmed that cTnT was associated with the occurrence of a cardiac event (revascularization, acute coronary syndrome, or cardiac death). We found more than three as much cardiac events in patients with hs-cTnT concentrations in the fourth quartile (>6.7 ng/L), also when hs-cTnT was corrected for traditional risk factors. To a lesser extent, improved risk classification was even obtained on top of coronary plaque assessment.

Overall, the results shown in this thesis support the hypothesis that any measurable cTn concentration is associated with cardiac injury that should be avoided at any time.

– **Harmonization and standardization of troponin assays**

Harmonization and standardization efforts for cTnI assays have been of limited success when using the purified and highly characterized standard reference material NIST SRM 2921. In *chapter 9*, we showed its instability when spiked in serum and heparin plasma, and its limited ability in harmonization of cTnI results. For now, cTn-positive patient material seems preferable, despite the fact that it is difficult to obtain and less specified and characterized.

– **Fully degraded troponin T in the blood circulation**

Conflicting results have been reported on the structural aspects of cTnT in the blood circulation. We evidently show in *chapter 10* that cTnT after AMI is completely degraded in serum. Furthermore, we confirm that cTnI is predominantly present in the cTn I-C complex and only partly degraded. Clinical consequences are dependent on the validation in a larger AMI population and whether disease specific modification or modification-patterns exist.

– **Directions for future research**

It is of great clinical relevance to minimize false-positively assigned subjects at coronary risk. Future in-depth research should therefore focus on improving the distinction between a healthy myocyte and preliminary signs of cardiovascular disease. This could possibly be achieved by unraveling the molecular mechanism when and in what form cTn is released from myocytes, or by identifying an even better or complementary cardiac biomarker.