



CRITICAL DIAGNOSTICS

3030 Bunker Hill St. Suite 117A
San Diego, CA 92109

Presage® ST2 Assay

EIA-Test kit

Artikelnr. BC-1065E

Advancing Medicine, Saving Lives®

Presage ST2 Assay Bedienungsanleitung

Vorgesehene Verwendung

Immunoassay für die quantitative *in vitro*-Bestimmung von ST2 in Humanserum und Plasma zur Verwendung als Hilfsmittel zur Risikostratifizierung von Patienten mit Herzversagen (HF) oder akutem Koronarsyndrom (ACS).

Einführung

Herzerkrankungen sind weltweit eine führende Todesursache, die jährlich Millionen von Patienten betrifft. Herzerkrankungen sind beispielsweise für 40 Prozent aller Todesfälle in den USA verantwortlich - das ist mehr als für alle Formen der Krebserkrankungen zusammen. Viele Patienten werden wegen koronarer Arterienerkrankung (CAD) und/oder ACS behandelt, entwickeln schließlich jedoch ein Herzversagen. Herzversagen ist eine chronische progressive Erkrankung, bei der die Fähigkeit des Herzens, das erforderliche Herzzeitvolumen zur Verfügung zu stellen, schwächer wird. Dies beeinträchtigt die Fähigkeit des Herzens, ausreichend Blut zu pumpen, um die metabolischen Bedürfnisse des Körpers abzudecken. Weltweit nimmt die Prävalenz des Herzversagens zu. Dies stellt für die Krankenhäuser eine erhebliche Kostenbelastung dar (1). Eine wesentliche Komponente dieser Belastung ist die Tatsache, dass die von fortgeschrittenem Herzversagen betroffenen Patienten mehr Krankenhausaufenthalte aufweisen, die gesundheitlichen Ressourcen in höherem Maße nutzen sowie ein hohes Todesrisiko haben. Die aktuellen Methoden zur Beurteilung der Prognose und der Risikostratifizierung sind bei ACS und HF leider nach wie vor ungenügend. Klinikern steht jetzt ein Biomarker-Test als eine mögliche Option zur Beurteilung zur Verfügung.

Testprinzip

Der Presage ST2 Assay von Critical Diagnostics ist ein quantitativer monoklonaler Sandwich-ELISA in 96 Well-Plattenformat zur Messung von ST2 in Serum oder Plasma. In die entsprechenden Wells in der mit Anti-ST2-Antikörper beschichteten Platte wird verdünntes Plasma oder Serum gegeben und für die vorgeschriebene Zeit inkubiert. Nach einer Reihe von Schritten, in denen Reagenzien von der Platte gewaschen und weitere Reagenzien hinzugefügt und anschließend ausgewaschen werden, wird der Analyt schließlich durch Zugabe eines kolorimetrischen Reagenzes nachgewiesen, und das resultierende Signal wird spektroskopisch bei 450 nm gemessen.

Bereitgestellte Reagenzien und Materialien:

1. Anti-ST2-Antikörper-beschichtete Wells (1 Platte, 96 Wells)
2. Lyophilisierter sST2 Kalibrator, 400 ng/Fläschchen (2 Fläschchen)
3. ST2 Standard-Verdünnungsmittel (13 mL/Fläschchen, 1 Fläschchen)
4. ST2 Proben-Verdünnungsmittel (30 mL/Flasche, 2 Flasche)
5. Anti-ST2-biotinyliertes Antikörperreagenz (13 mL/Fläschchen, 1 Fläschchen)
6. Streptavidin-HRP Konjugatkonzentrat 100X (0,2 mL/Fläschchen, 1 Fläschchen)
7. Streptavidin-HRP Konjugatverdünnungsmittel (13 mL/Fläschchen, 1 Fläschchen)
8. 20X Waschpuffer (50 mL/Flasche, 1 Flasche)
9. TMB-Reagenz (11 mL/Fläschchen, 1 Fläschchen)
10. Stopp-Lösung (11 mL/Fläschchen, 1 Fläschchen)

Zusätzlich erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten):

1. Präzisionspipetten: 100 µl und 1,0 mL Einkanalpipetten und 300µl Mehrkanalpipette pipetten
2. Einwegpipettenspitzen
3. MikrotiterPlatten-Schüttler
4. Mikrotiter-Platten-Leser, der Extinktion bei 450 nm ablesen kann.
5. Nicht-bindende 96-Well U-Boden-Mikrotiterplatte zur Verwendung als Transferlatte
6. Kontroll-Kit (lyophilisiertes rekombinantes humanes sST2) – separat erhältlich von Critical Diagnostics (Artikelnr. BC-1066E).

Lagerungsbedingungen:

1. Das ungeöffnete Kit wird nach Erhalt gekühlt (2-8 °C) gelagert, wenn es nicht gebraucht wird, bis das auf dem Etikett des Kits angebrachte Haltbarkeitsdatum erreicht ist. Das Haltbarkeitsdatum finden Sie auf dem Etikett der Packung.
2. Mikrotiterplatte in einem versiegelten Beutel mit Trockenmittel verwahren, um die Einwirkung von feuchter Luft zu minimieren.
3. Die Mikrotiterplatte ist aus zwölf (12) Streifen mit acht (8) Wells zusammengesetzt. Es wird nur die benötigte Anzahl der Streifen aus der gekühlten Lagerung entnommen, um die gewünschte Anzahl an Proben zu messen.
4. Zur Durchführung eines Assays sollte eine ausreichende Menge der verschiedenen Reagenzien aus den Flaschen entnommen werden. Der Rest sollte wieder gekühlt gelagert werden.
5. Gelöster Kalibrator kann bis zu sieben (7) Tage verwendet werden, wenn er zwischen den Einsätzen gekühlt gelagert wird.

Probensammlung und Lagerung

Der Presage ST2 Assay ist validiert für die Verwendung von humanem Serum, EDTA-Plasma und Heparin-Plasma. Der Presage ST2 Assay ist nicht validiert zur Verwendung von Citrat-Plasma. Blut sollte nach Standard-Entnahmemethoden gesammelt werden.

Die Zentrifugation und Separation von Serum oder Plasma von den zellulären Komponenten sollte so bald wie möglich nach der Probenentnahme erfolgen.

Das empfohlene Probenvolumen für den Presage ST2 Assay beträgt 20 µl, welches für die Doppelbestimmung nach der empfohlenen Probenverdünnung ausreicht. Wenn nötig kann Serum oder Plasma für weitere Analysen aufbewahrt werden. Endogenes humanes ST2 wurde auf Stabilität unter folgenden Bedingungen getestet:

Probenlagerung und -stabilität

Lagerungsbedingung (Temperatur)	Probenstabilität
20°C	48 Stunden
4°C	7 Tage
-20°C und -80°C	18 Monate

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Komponenten dieses Assay Kits, die in direkten Kontakt mit Humanplasma- oder Serumproben kommen, sollten als biogefährlicher Abfall behandelt und gemäß lokalen Vorschriften entsorgt werden.

Reagenzherstellung:

1. Alle Reagenzien sollten vor Gebrauch auf Zimmertemperatur (18-25 °C) erwärmt werden. **Erwärmen Sie die Reagenzien vor Gebrauch mindestens 1 Stunde lang auf Zimmertemperatur!**
2. Lyophilisierten Standard mit dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Volumen an deionisiertem Wasser rekonstituieren. Dies ergibt eine Arbeitskonzentration des Standards von 400 ng/mL. Lassen Sie den rekonstituierten Standard 30 Minuten lang stehen und mischen Sie ihn von Zeit zu Zeit durch. Zur Analyse einer einzigen 96-Well-Platte wird eine Reihe von 2-fachen seriellen Verdünnungen des Standardkonzentrats in den folgenden Schritten durchgeführt:
 - a. 200 ng/mL: 0,4 mL von 400 ng/mL Stock mit 0,4 mL Standardverdünnungsmittel
 - b. 100 ng/mL: 0,4 mL von 200 ng/mL mit 0,4 mL Standardverdünnungsmittel
 - c. 50 ng/mL: 0,4 mL von 100 ng/mL mit 0,4 mL Standardverdünnungsmittel
 - d. 25 ng/mL: 0,4 mL von 50 ng/mL mit 0,4 mL Standardverdünnungsmittel
 - e. 12,5 ng/mL: 0,4 mL von 25 ng/mL mit 0,4 mL Standardverdünnungsmittel
 - f. 6,25 ng/mL: 0,4 mL von 12,5 ng/mL mit 0,4 mL Standardverdünnungsmittel
 - g. 3,125 ng/mL: 0,4 mL von 6,25 ng/mL mit 0,4 mL Standardverdünnungsmittel
 - h. 0,0 ng/mL Blindprobe: 0,4 mL Standardverdünnungsmittel.
3. Patientenproben, EDTA- oder Heparin-Plasma oder Serum unter Verwendung des mitgelieferten Probenverdünnungsreagenzes 50-fach verdünnen, um eine verdünnte Probenplatte herzustellen (Abbildung der Probenverdünnungsplatte siehe unten):
 - a. Schritt 1: 96 Well-Rundbodenplatte mit 0,180 mL Probenverdünnungsmittel in Spalten 1-5 und 0,200 mL Probenverdünnungsmittel in Spalten 6-10 vorbereiten.
 - b. Schritt 2: 0,020 mL Patientenprobe in Spalten 1-5 der Probenverdünnungsplatte in individuelle Wells pipettieren.
 - c. Schritt 3: 0,050 mL von jeder verdünnten Patientenprobe in den Spalten 1-5 der Probenverdünnungsplatte in entsprechende Positionen der Spalten 6-10 derselben Probenverdünnungsplatte transferieren.
4. Vorbereitung des Konjugat-Reagenz Streptavidin-HRP: 100X Streptavidin-HRP Konjugatkonzentrat vor Gebrauch 100-fach in Streptavidin-HRP Konjugatverdünnungsmittel verdünnen. (z. B. 100 µl von 100X Streptavidin-HRP Konjugatkonzentrat + 9,9 mL Streptavidin-HRP Konjugatverdünnungsmittel)
5. Arbeitsansatz Waschpuffer (1X): 50 mL 20X Waschpuffer zu 950 mL destilliertem Wasser geben. Der 1X Waschpuffer ist bei 2-8 °C 30 Tage stabil.
 - a. **HINWEIS:** Jegliche Kristalle, die infolge von hoher Salzkonzentration vorhanden sein können, müssen vor Herstellung der Verdünnung bei Raumtemperatur aufgelöst werden.
6. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Beispiel einer Probenverdünnungsplatte

	1. Verdünnung 1:10				2. Verdünnung 1:5 für 1:50 (finale Verdünnung)							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1-1	S9-1	S17-1	S25-1	S33-1	S1-2	S9-2	S17-2	S26-2	S33-2		
B	S2-1	S10-1	S18-1	S26-1	S34-1	S2-2	S10-2	S18-2	S27-2	S34-2		
C	S3-1	S11-1	S19-1	S27-1	S35-1	S3-2	S11-2	S19-2	S28-2	S35-2		
D	S4-1	S12-1	S20-1	S28-1	S36-1	S4-2	S12-2	S20-2	S29-2	S36-2		
E	S5-1	S13-1	S21-1	S29-1	S37-1	S5-2	S13-2	S21-2	S30-2	S37-2		
F	S6-1	S14-1	S22-1	S30-1	S38-1	S6-2	S14-2	S22-2	S31-2	S38-2		
G	S7-1	S15-1	S23-1	S31-1	S39-1	S7-2	S15-2	S23-2	S32-2	S39-2		
H	S8-1	S16-1	S24-1	S32-1	S40-1	S8-2	S16-2	S24-2	S32-2	S40-2		

Assay-Verfahren:

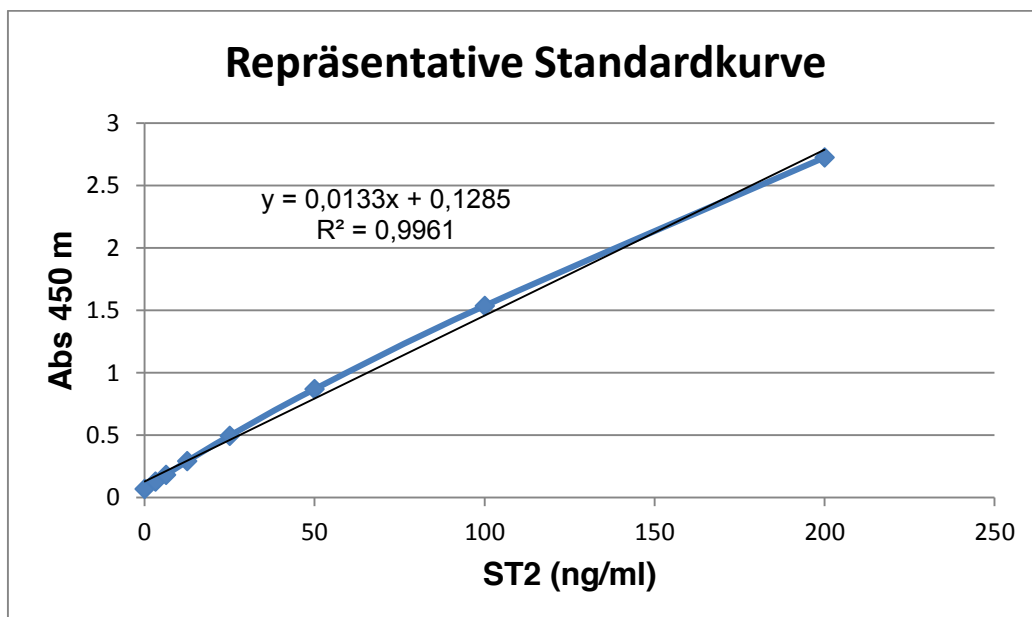
- Die gewünschte Anzahl der Anti ST2 Antikörper-beschichteten Wells in dem Halter befestigen.
- 100 µl Kalibratoren und verdünnte Patientenproben in die entsprechenden Anti ST2 Antikörper-beschichteten Wells pipettieren. Der Transfer der Patientenproben, Kontrollen, Standards und Blanks sollte innerhalb von 5 Minuten erfolgen.
- Bei Raumtemperatur (18-25 °C) 60 Minuten unter Schütteln mit 750 UpM inkubieren.
- Die Inkubationsmischung entfernen, indem der Platteninhalt in ein Abfallgefäß geleert wird.
 - Manueller Waschschrift: Die Mikrotiterplatte 3 Mal mit 1X-Waschpuffer spülen und leeren. Kräftig auf Saugpapier oder Papiertüchern ausschlagen, um alle restlichen Puffertröpfchen zu entfernen.
 - Automatischer Waschschrift: 350 µl pro Well, 3 Durchgänge mit verdünntem 1x-Waschpuffer. Nach dem dritten Durchgang Wells bei Bedarf auf Saugpapier ausklopfen.
Hinweis: Stellen Sie vor dem automatischen Waschschrift sicher, dass sich die Wasch-/Aspirationsspitzen knapp über dem Boden der Wells befinden und dabei nicht die Oberfläche berühren bzw. verkratzen.
- 100 µl Anti ST2-biotinyliertes Antikörperreagenz in jedes Well geben.
- Bei Raumtemperatur (18-25 °C) 60 Minuten unter Schütteln mit 750 UpM inkubieren.
- Schritt 4 wiederholen.
- 100 µl Arbeitsansatz Streptavidin-HRP-Konjugat in jedes Well geben.
- Bei Raumtemperatur (18-25 °C) 30 Minuten unter Schütteln mit 750 UpM inkubieren.
- Schritt 4 wiederholen.
- 100 µl TMB Reagenz in jedes Well geben.
- Bei Raumtemperatur (18-25 °C) 20 Minuten unter Schütteln mit 750 UpM im Dunkeln inkubieren.
- 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well geben.
- 30 Sekunden vorsichtig mischen.
- Extinktion bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten -Leser innerhalb von 15 Minuten ablesen.

Berechnung der Ergebnisse:

1. Den mittleren Extinktionswert (OD₄₅₀) für jeden Satz von Referenzstandards, Kontrollen und Proben berechnen.
2. Standardkurve der mittleren Extinktionswerte und Konzentrationen unter Verwendung einer linearen Standardkurvengleichung auftragen.
3. Die entsprechende ST2-Konzentration (ng/mL) kann mathematisch aus der Standardkurve unter Verwendung des Mittelwerts der Extinktion für jede Probe unter Verwendung der Formelfunktion in Excel oder eines Datengrafikprogramms wie Graphpad PRISM® bestimmt werden. Beispielhafte Standardkurve siehe unten.

Beispiel für eine repräsentative Standardkurve

ST2 (ng/mL)	A ₄₅₀
0	0,070
3,125	0,129
6,25	0,183
12,5	0,293
25,0	0,496
50,0	0,870
100,0	1,537
200,0	2,725



Kontrollen

Das Presage ST2 Assay Control Kit (separat erhältlich) liefert Testmaterial in zwei (2) Konzentrationen als versiegelte lyophilisiertes Material, das der Anwender in einem angegebenen Volumen an Wasser rekonstituiert. Die Kontrolle für die niedrige Konzentration ist so formuliert, dass sie im Konzentrationsbereich von 18,8 bis 35 ng/mL liegt, und die Kontrolle für hohe Konzentration ist so formuliert, dass sie im Konzentrationsbereich von 65,3 bis 105 ng/mL liegt. Jeder Charge der Kontrollen sind chargenspezifische detaillierte Konzentrationsangaben auf dem

Analysenzertifikat beigelegt. Es wird empfohlen, bei jeder Durchführung eines Tests Kontrollen (doppelt) einzuschließen.

Interpretation der Ergebnisse

Analytische Interpretation

Bei der Auswertung eines einzelnen Tests sollte die Standardkurve in etwa dem obigen Beispiel entsprechen und die Ergebnisse aus beiden Kontrollen sollten innerhalb des Qualitätskontrollbereichs liegen. Falls eine dieser Bedingungen nicht erfüllt ist, sollte der Anwender den Assay wiederholen und nach möglichen Gründen für das unerwartete Ergebnis suchen.

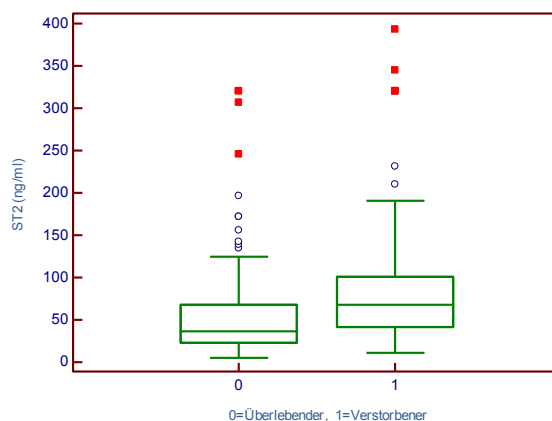
Klinische Interpretation

Die Beurteilung des Mortalitäts- oder Morbiditätsrisikos von Patienten mit schwerwiegenden und lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie ACS oder HF, basiert normalerweise nicht nur auf zwei Faktoren. Das Alter ist beispielsweise ein bedeutsamer Vorhersagefaktor der Mortalität, wobei das Risiko mit zunehmendem Alter steigt. Das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko eines Patienten steigt gleichermaßen mit zunehmenden ST2-Konzentrationen. Patienten, bei denen ACS oder HF diagnostiziert wurde und die ST2-Konzentrationen >30 ng/mL (ungefähr die 85. Perzentile des Normalwerts) aufweisen, haben ein Mortalitätsrisiko innerhalb eines (1) Jahres, das über demjenigen von Patienten mit ST2-Konzentrationen unter dieser Höhe liegt. Das Mortalitätsrisiko steigt außerdem mit zunehmenden ST2-Konzentrationen, wie aus der folgenden Abbildung 3 hervorgeht, in der das relative Risiko (RR) der Mortalität innerhalb eines Jahres zwischen den 1. und 3. Terzilen 1,7 beträgt.

In diesem Dokument beschriebene ST2-Konzentrationen sollten nur als Referenz verwendet werden. Spezifische Konzentrationen und klinische Entscheidungen, die auf diesen Konzentrationen basieren, müssen durch die Einrichtung verifiziert und im Kontext der Patienten und der Erkrankung, die beurteilt werden, abgesichert werden.

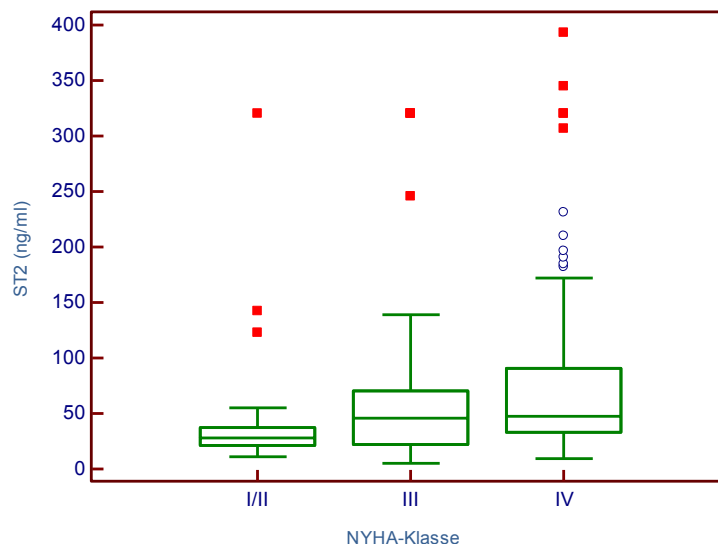
Zusammenfassung der Ergebnisse aus klinischen Studien

In der vorliegenden Studie wurde eine Gruppe von 368 Patienten mit gesicherter Diagnose von Herzversagen analysiert, um zu bestätigen, dass ST2 das Mortalitätsrisiko innerhalb eines Jahres vorhersagt. Abbildung 1 illustriert die Beziehung zwischen den ST2-Konzentrationen in dieser Kohorte von Patienten, die innerhalb eines (1) Jahres starben, im Vergleich mit denjenigen, die überlebt haben.

Abbildung 1: ST2-Konzentrationen nach Prognose bei Patienten mit Herzversagen (HF)

In dieser Analyse hatten Patienten mit HF, die innerhalb 1 Jahres starben, einen Median der ST2-Konzentration von 67,4 ng/mL (IQR 41,5 - 101,1). Die überlebenden Patienten mit HF hatten im Vergleich dazu einen Median der ST2-Konzentration von 36,1 ng/mL (IQR 23,1 - 67,5), $p < 0,0001$ gemäß Kruskal-Wallis-Test.

In dieser Gruppe aus 368 Patienten mit Herzversagen wurde gezeigt, dass ST2-Konzentrationen mit zunehmender Schwere des Herzversagens tendenziell höher sind, wie sich in der NYHA-Klassenangabe widerspiegelt, die in Abbildung 2 gezeigt ist. Der Unterschied zwischen den ST2-Konzentrationen bei Patienten der NYHA-Klasse II und Klasse III sowie zwischen Patienten der Klasse III und Klasse IV ist signifikant ($p = 0,0008$ gemäß Kruskal-Wallis-Test).

Abbildung 2: ST2-Konzentrationen gemäß NYHA-Klasse

Die Cox-Regressionsanalyse des Todesrisikos innerhalb eines Jahres mit ST2 als durch natürlichen Logarithmus (\log_e) transformierter Variablen bestätigte in einem univariaten sowie einem multivariaten Modell, dass ST2 ein signifikanter und unabhängiger Vorhersagefaktor der Mortalität innerhalb 1 Jahres ist.

Tabelle 1: Univariate Analyse von ST2 für das Mortalitätsrisiko innerhalb eines Jahres

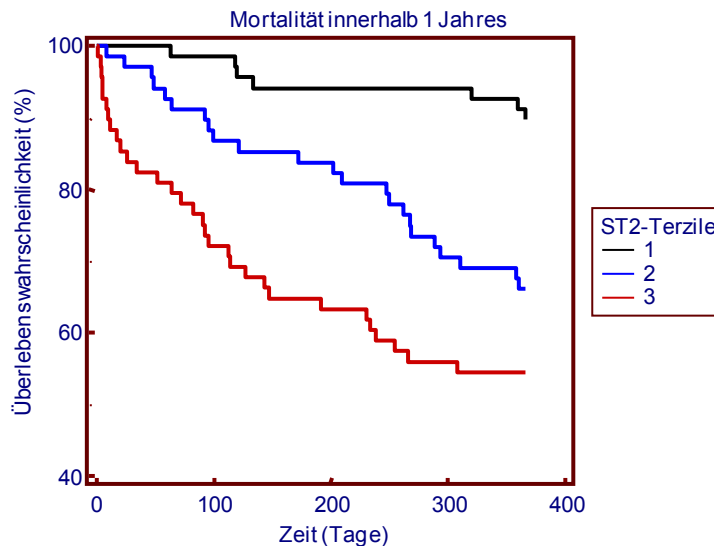
HR	p	95 % CI von HR
1,73	<0,0001	1,40 bis 2,15

Tabelle 2: Multivariate Analyse von ST2 für das Mortalitätsrisiko innerhalb 1 Jahres

Kovariate	HR	p	95 % CI von HR
log _e ST2	1,67	0,0020	1,21 bis 2,32
Alter	1,05	0,0011	1,02 bis 1,09
LVEF	0,995	0,5105	0,98 bis 1,01
eGFR	0,99	0,0163	0,98 bis 0,998
NYHA-Klasse	1,62	0,0335	1,04 bis 2,52
Diabetes	1,76	0,0377	1,04 bis 2,98
Hypertonie	0,74	0,3050	0,42 bis 1,31

Unter Verwendung von ST2-Terzilen als weitere Darstellung des erhöhten Mortalitätsrisikos mit zunehmender ST2-Konzentration wurde auch eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse durchgeführt. Das Mortalitätsrisiko nimmt mit zunehmenden ST2-Konzentrationen zu, wie in Abbildung 3 zu sehen ist. In dieser Analyse betrug das relative Risiko (RR) zwischen der ersten (untersten) Terzile und der dritten (höchsten) Terzile ungefähr 1,7 nach einem (1) Jahr Nachsorge.

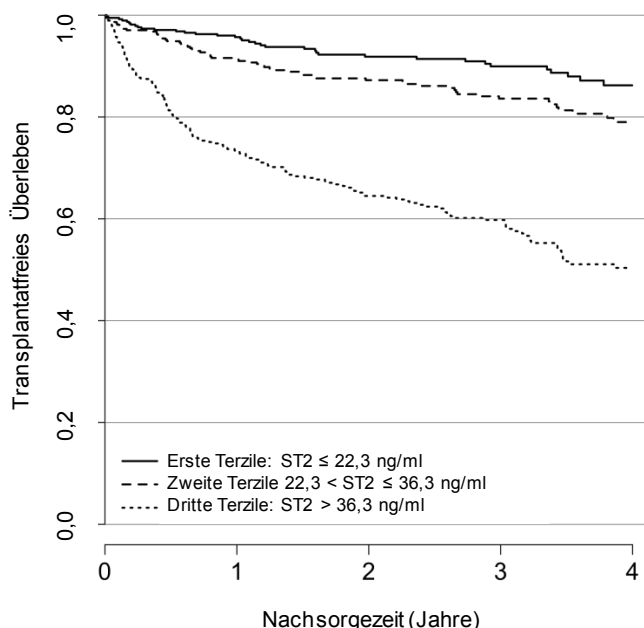
Abbildung 3: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse pro ST2-Terzile



Weitere Belege

Der prognostische Nutzen von ST2 wurde auch in einer Kohorte von ambulanten Patienten mit chronischem Herzversagen beurteilt (Veröffentlichung ausstehend). Die Studie sollte ST2 als Risikovorhersagefaktor in einer großen Kohorte mit Herzversagen kritisch evaluieren und seinen Vorhersagewert mit etablierten Risikovorhersagefaktoren vergleichen. An 1141 Probanden der Penn-Heart-Failure-Studie, einer multizentrischen prospektiven Kohortenstudie von Patienten mit chronischem Herzversagen, die einen weiten Schwerebereich der Erkrankung repräsentierten, wurde lösliches ST2 gemessen. Diese Auswertung betont die Stärke und Unabhängigkeit des Zusammenhangs zwischen ST2 und transplantatfreiem Überleben, die Nützlichkeit von ST2, um Risiken individueller Patienten zu differenzieren, sowie den zusätzlichen Wert von ST2, wenn es in Kombination mit zwei etablierten Risikovorhersagefaktoren eingesetzt wird: Natriuretischer Peptidspiegel und die Bewertung im Seattle Heart Failure Model (SHFM). Abbildung 4 zeigt eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse von ST2-Konzentrationen, die für diese Kohorte in Terzilen unterteilt wurden. In dieser Analyse beträgt das relative Risiko (RR) zwischen der ersten (untersten) Terzile und der dritten (höchsten) Terzile ungefähr 1,5 nach einem (1) Jahr Nachsorge und ungefähr 1,7 nach vier (4) Jahren. Diese Ergebnisse zeigen, dass ST2 bei Patienten mit HF bis zu vier Jahren signifikanten prognostischen Nutzen aufweist.

Abbildung 4: ST2-Konzentrationen als Vorhersage des Überlebens bei Patienten mit chronischem HF über vier Jahre



Der prognostische Nutzen von ST2 wurde auch bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) bewertet, von denen einige einen Myokardinfarkt (MI) hatten. In einem Bericht von Sabatine et al., 2008, wurde in einer Studie mit über 1200 ACS-STEMI-Patienten gezeigt, dass ST2 innerhalb von 30 Tagen nach Indexevent prognostisch für Mortalität war. Die Forschungsergebnisse von Eggars et al., 2010, bestätigen, dass in einer Studie an 401 Patienten mit ACS und MI ohne ST-Segmenthebung (NSTEMI) die ST2-Konzentrationen früh stiegen und einen unabhängigen prognostischen Nutzen für das Mortalitätsrisiko innerhalb eines (1) Jahres lieferten.

Tabelle 3 fasst eine logistische Regressionsanalyse aus dieser Studie des Mortalitätsrisikos innerhalb eines (1) Jahres unter Verwendung von ST2 als mit natürlichem Logarithmus (\log_e) transformierter kontinuierlicher Variable zusammen, gemessen an einer Patientenprobe, die bei der Vorstellung des Patienten entnommen wurde. ST2 ist ein signifikanter und unabhängiger Vorhersagefaktor der Mortalität bei Patienten mit ACS-NSTEMI.

Tabelle 3: Prognostischer Wert von ST2 bei NSTEMI-ACS-Patienten

Modell 1			Modell 2		
N	OR (95 % CI)	p-Wert	N	OR (95 % CI)	p-Wert
401	2,5 (1,4-4,5)	0,003	398	2,3 (1,1-4,6)	0,025

Modell 1: unangepasst

Modell 2: angepasst für univariate Vorhersagefaktoren der Mortalität (Alter, kongestives Herzversagen, Diabetes, vorangegangener AMI, vorangegangener Schlaganfall)

Schlussfolgerung

Die bei der Vorstellung von Patienten mit Herzversagen (HF) oder akutem Koronarsyndrom (ACS) gemessenen ST2-Konzentrationen sind signifikante und unabhängige Prognosefaktoren

des Mortalitätsrisikos innerhalb eines (1) Jahres. ST2 kann somit als Hilfsmittel zur Bestimmung des Mortalitätsrisikos bei solchen Patienten verwendet werden.

Normalbereich-Referenzintervall

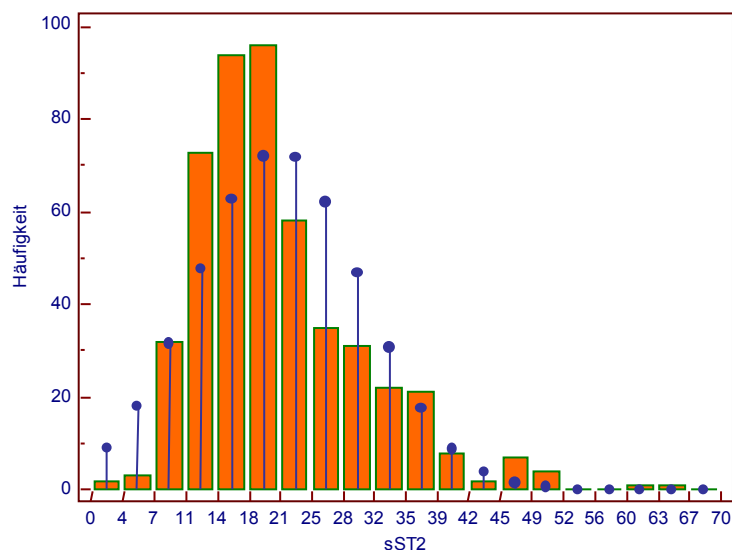
Es wurden Referenzwerte gemessen, um den normalen Konzentrationsbereich für ST2 zu ermitteln. Diese subjektiv gesunde Kohorte bestand aus 490 Spendern mit ausgewogener Geschlechterverteilung und Altersangaben zwischen 18 und 84 Jahren, von denen 40 > 70 Jahre alt waren. Die Spender wurden nicht durch weiteres Screening von Biomarkern oder anderweitig beurteilt oder qualifiziert.

Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der Anzahl der Individuen in jeder Altersgruppe und nach Geschlecht für die subjektiv gesunde Kohorte. Abbildung 5 zeigt ein Histogramm der Verteilung der ST2-Konzentration für diesen Spenderpool.

Tabelle 4: Subjektiv gesunde Kohorte

	Anzahl der Individuen pro Altersdekade						Gesamt
	<30	30-39	40-49	50-59	60-69	>70	
Weiblich	61	35	53	39	38	19	245
Männlich	65	47	40	41	31	21	245
Gesamt	126	82	93	80	69	40	490

Abbildung 5: ST2-Konzentrationsverteilung der subjektiv gesunden Kohorte



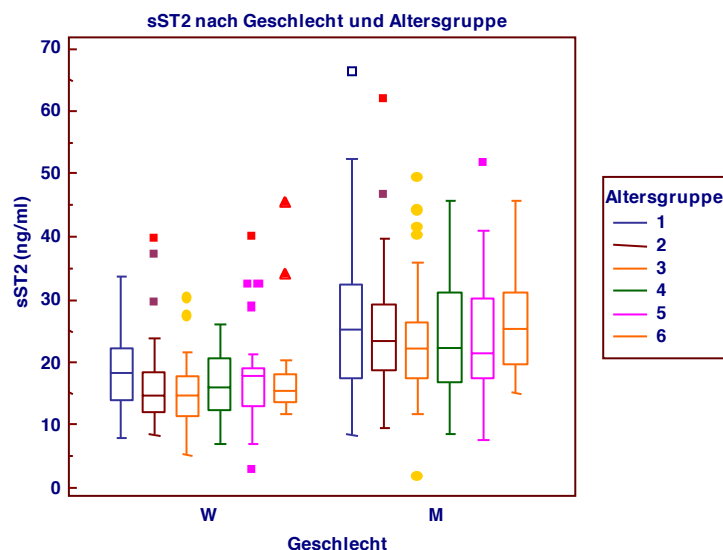
In dieser Auftragsung stehen die orangefarbenen Balken für die tatsächliche Häufigkeit des Auftretens pro ST2-Konzentrationsbereich, und die blauen Linien stehen für eine theoretische Normalverteilung. Die Verteilung der Konzentrationen ist bei diesen gesunden Individuen nicht normal (Chi-Quadrat-Test für Normalverteilung $p < 0,0001$). Nach einer \log_e -Transformation war die Verteilung jedoch annähernd normal (Chi-Quadrat-Test für Normalverteilung $p < 0,146$). Tabelle 5 zeigt die gesamte Konzentrationsverteilungsstatistik für diese gesunde Referenzkohorte.

Tabelle 5: ST2-Konzentrationen bei speziellen Schwellenwerten - gesunde Referenzkohorte

Parameter	ST2 (ng/mL)	95 % CI
Median	18,8	18,1 bis 19,9
25. Perzentile	14,5	13,7 bis 15,3
75. Perzentile	25,3	23,8 bis 27,0
80. Perzentile	27,8	25,5 bis 29,5
90. Perzentile	34,3	32,2 bis 35,7
95. Perzentile	37,9	35,6 bis 41,6
97,5. Perzentile	45,6	39,5 bis 48,8

Es gibt bei den ST2-Werten keine beobachtbare Verzerrung nach Alter (Kruskal-Wallis-Test; Männer $p = 0,501$, Frauen $p = 0,056$) in der subjektiv gesunden Kohorte. Die Konzentrationen als Funktion des Geschlechts sind jedoch signifikant verschieden (Kruskal-Wallis Test $p < 0,0001$). Abbildung 6 zeigt die ST2-Konzentrationen nach Alter und Geschlecht. Geschlechtsspezifische, jedoch nicht altersspezifische Referenzwerte wurden daher nach einer nichtparametrischen Perzentilmethode (95 % doppelseitig) berechnet. In Tabelle 6 werden auch die Ergebnisse nach Geschlecht und für die gesamte Kohorte zusammengefasst.

Abbildung 6: Auftragung der ST2-Werte nach Alter und Geschlecht für die gesunde Referenzkohorte



In dieser Auftragung sind die Altersgruppen: 1=<30, 2=30-39, 3=40-49, 4=50-59, 5=60-69 und 6= \geq 70

Tabelle 6: Zusammenfassung gesunde Referenzkohorte

Parameter/Gruppe	Gesamte Gruppe	Männlich	Weiblich
N	490	245	245
Median ST2 (ng/mL)	18,8	23,6	16,2
95 % Konfidenzintervall (CI)	18,1 – 19,9	21,3 – 25,1	15,3 - 17,4
Interquartilbereich	14,5 – 25,3	17,6 – 30,6	12,4 - 19,9
Referenzintervall (95 %)	1,75 – 34,3	8,5 – 49,3	7,1 – 33,5

Das Referenzintervall der 95. Perzentile ist bezogen auf diese Analyse bei normalen gesunden Männern 8,5-49,3 ng/mL (Median 23,6 ng/mL), bei Frauen 7,1-33,5 ng/mL (Median 16,2 ng/mL) und in der gesamten Gruppe 1,75-34,3 (Median 18,8 ng/mL).

Genauigkeit

Die Genauigkeit des Assays wurde gemäß den Richtlinien EP5-A des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) bewertet. Vier (4) gepoolte Patientenplasmaproben wurden für jede Konzentrationsstufe in zwanzig 1,5 mL Kunststoffröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Diese Proben wurden 20 Tage lang in Duplikaten in einem Durchlauf pro Tag analysiert. Die Ungenauigkeit innerhalb der Analysenreihe und der gesamten Analysenreihe (CV_A) wurde mit dem CLSI-Einzelbestimmungstest zur Genauigkeitsbewertung berechnet. Der Assay hatte einen Variationskoeffizienten innerhalb der Analysenreihe CV_A von 6,5 % und einen Gesamtvariationskoeffizienten CV_A von 9,1 % bei einer mittleren Konzentration von 16,9 ng/mL (niedrig), einen Variationskoeffizienten innerhalb der Analysenreihe CV_A von 3,4 % und einen Gesamtvariationskoeffizienten CV_A von 5,5 % bei einer mittleren Konzentration von 33,1 ng/mL (mittel-1), einen Variationskoeffizienten innerhalb der Analysenreihe CV_A von 3,8 % und einen Gesamtvariationskoeffizienten CV_A von 6,3 % bei einer mittleren Konzentration von 68,7 ng/mL (mittel-2) und einen Variationskoeffizienten innerhalb der Analysenreihe CV_A von 2,4 % und einen Gesamtvariationskoeffizienten CV_A von 4,8 % bei einer mittleren Konzentration von 159,1 ng/mL (hoch).

Tabelle 7: Zusammenfassung der Genauigkeitsanalyse

Probe	Mittelwert ST2 (ng/mL)	Innerhalb der Analysenreihe		Insgesamt	
		SD	CV	SD	CV
1	16,9	1,09	6,5 %	1,54	9,1 %
2	33,1	1,12	3,4 %	1,83	5,5 %
3	68,7	2,64	3,8 %	4,32	6,3 %
4	159,1	3,77	2,4 %	7,68	4,8 %

Der Assay zeigt über den erwarteten klinisch signifikanten Konzentrationsbereich keine Genauigkeitsverzerrung.

Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeitsgrenzen wurden gemäß CLSI EP17-A bestimmt. Um die Erfassungsgrenze (limit of blank, LoB) zu bestimmen, wurden im Verlauf von 4 Tagen mindestens 60 Replikate des Kalibratorverdünnungsmittels mit mindestens 15 Replikaten pro Tag analysiert. Um die Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) zu bestimmen, wurden vier (4) eindeutige Plasmaproben ausgewählt, bei denen zuvor niedrige sST2-Konzentrationen ermittelt wurden. Jede wurde über vier (4) aufeinanderfolgende Tage mit 15 Replikatemessungen pro Tag gemessen. Die Proben aus der LoD-Analyse wurden zur Abschätzung von Verzerrung und Ungenauigkeit verwendet, um die Quantifizierungsgrenze (limit of quantification, LoQ) der Proben zu ermitteln. Die zur Berechnung von LoQ verwendete Gleichung ist:

$$\text{LoQ} = \text{Verzerrung} + 2 \cdot \text{SD}_s$$

Zur Berechnung von LoQ wurden vier (4) weitere Proben in dem gleichen niedrigen Konzentrationsbereich verwendet. In Tabelle 7 werden die Werte für LoB, LoD und LoQ zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammenfassung der analytischen Bestimmungen

Parameter	Wert
Erfassungsgrenze (LoB)	0,5 ng/mL
Nachweisgrenze (LoD)	1,8 ng/mL
Quantifizierungsgrenze (LoQ)	2,4 ng/mL

Der LoQ-Wert liegt knapp über der 5. Perzentile der normalen Referenzkonzentration, 1,71 ng/mL, und liegt knapp unter der untersten Konzentration des Kalibrators, der für die Standardkurve empfohlen wird, 3,125 ng/mL.

Linearität

Es wurden frische Plasmaproben mit ST2-Konzentrationen erhalten, die den quantitativen Bereich des Assays abdecken, um die Linearität gemäß der CLSI-Richtlinie Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement (Auswertung der Linearität von quantitativen Messungen, EP6-A) zu ermitteln. Für diese Analyse wurde ein Hochkonzentrationspool mit einer Konzentration knapp über der Obergrenze von 200 ng/mL der Standardkurve (Abs450 >3,0) hergestellt. Ein Niedrigkonzentrationspool hatte eine mittlere Konzentration von 9,9 ng/mL (Abs450 = 0,359), einen Wert unterhalb der Mediankonzentration normaler Spender

(18,8 ng/mL). Diese Proben decken den gesamten Analysenbereich des Assays ab. Mit den Probenpools mit niedriger bzw. hoher Konzentration wurde eine direkte Verdünnungsreihe von elf (11) Testproben in folgenden Volumenverhältnissen hergestellt (Niedrigkonzentrationspool + Hochkonzentrationspool): Pool 1, nur hoch; Pool 2, 0,1 niedrig + 0,8 hoch; Pool 3, 0,2 niedrig + 0,7 hoch; Pool 4, 0,3 niedrig + 0,6 hoch und weiter in Schritten von 0,1 für jeden Pool bis zu einem Endwert von Pool 11, nur niedrig. Jeder Pool wurde in sechs (6) Replikaten gemessen. Die höchsten beiden (2) Konzentrationstestproben lagen über der oberen Nachweisgrenze (EUL) mit Abs450-Werten >3,0, der Maximalgrenze des Plattenlesers. Somit wurden für die Linearitätsanalyse neun (9) Messungen verwendet. Die Replikate in dieser Analyse waren in hohem Maße konsistent mit den CV-Werten <5 % im gesamten Konzentrationsbereich überein und die Serie ist linear, $R^2 = 0,9939$. Die lineare Regressionsanalyse für diese Serie wurde mit der Software Analyze-it für Excel, Version 2.21, ausgewertet, wobei Linearitätsgrenzwerte von 5 ng/mL bzw. 10 % festgelegt wurden. Die Zusammenfassung der Linearitätsanalysergebnisse wird in Abbildung 7 und Tabelle 9 gezeigt.

Abbildung 7: Auftragung der primären Linearitätsergebnisse

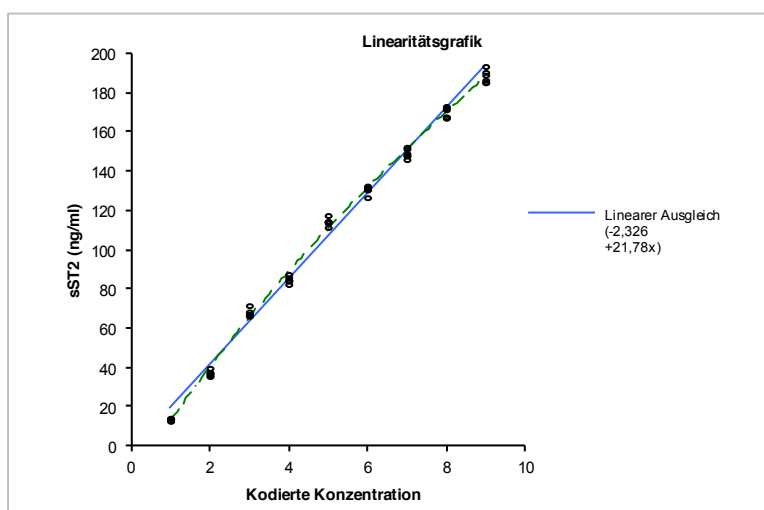


Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Linearitätsanalyse

Pool	Durchschnittl. sST2	Linearer Ausgleich	Nichtlinearer Ausgleich	Nichtlinearität	Nichtlinearität (%)	Nichtlinearitätsziel	Erreicht Linearitätsziel
1	13,84	19,45	12,84	-6,61	-47,8%	5,00	nein
2	37,44	41,23	40,11	-1,13	-3,0%	5,00	ja
3	68,27	63,01	65,35	2,34	3,4%	6,83	ja
4	85,22	84,79	88,83	4,04	4,7%	8,52	ja
5	114,69	106,57	110,79	4,22	3,7%	11,47	ja
6	131,01	128,35	131,48	3,14	2,4%	13,10	ja
7	149,57	150,13	151,16	1,04	0,7%	14,96	ja
8	170,31	171,91	170,08	-1,83	-1,1%	17,03	ja
9	188,77	193,68	188,48	-5,21	-2,8%	18,88	ja

Die Daten aus dieser Analyse entsprechen sowohl einer Gleichung erster Ordnung als auch einer Gleichung zweiter Ordnung. Die Ergebnisse der Gleichung zweiter Ordnung liegen jedoch innerhalb der für die Analyse erster Ordnung festgelegten Grenzen, daher ist die Methode über diesen Analysenbereich hinreichend linear.

Störungen

Ein möglicher Antikoagulanseffekt wurde in fünfundvierzig (45) Proben aus einer Kombination gesunder Spender und Patienten aus der Notaufnahme eines Krankenhauses getestet. Die Plasmaproben wurden in den üblichen Röhrchentypen abgenommen; Serum, EDTA-Plasma und Heparin-Plasma. Die Analyse wurde unmittelbar nach normalem Zentrifugieren und Verarbeiten durchgeführt. Jeder Vergleich ergab einen hoch signifikanten R²-Wert von 0,998 und 0,996. Es wurden keine Verzerrungen nach Röhrchentyp gemessen.

Der Test auf störende Substanz wurde gemäß CLSI-Protokoll EP7-A2 für die fünf (5) üblichsten Verbindungen, Gesamtprotein (BSA), Triglyzeride, Hämoglobin, Cholesterin und Bilirubin, in drei (3) humanen EDTA-Plasmapools durchgeführt, in denen ST2 zuvor gemessen worden war: 1 mit einer niedrigen (Normalbereich) ST2-Konzentration (~15 ng/mL), 1 mit einer mittleren ST2-Konzentration (~25 ng/mL) und 1 mit einer hohen ST2-Konzentration (~100 ng/mL) bei Testsubstanzkonzentrationen von 0,3 bis 10 mg/mL. Jeder Plasmapool wurde in Reihen von acht (8) Replikaten mit störender Substanz in Lösungsmittel und zwei (2) Testkonzentrationen von jeder störenden Substanz getestet. Die Wirkung der störenden Substanz wurde verifiziert, indem die Ergebnisse des ST2-Assays in jeder Probe, die die störende Substanz enthielt, mit der Probe mit Lösungsmittel allein verglichen wurden. Bei keiner der fünf (5) getesteten Substanzen wurde eine signifikante Störung gefunden.

Weitere Informationen










Für zusätzliche Informationen oder bei Fragen rufen Sie Critical Diagnostics unter 1-877-700-1250 Durchwahl -3 oder 1-858-270-2400 an.

Referenzen

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, H M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y. **Heart Disease and Stroke Statistics – 2008 Update**. Circulation 2008;117:e25-e146.
2. Januzzi JL Jr, Peacock WF, Maisel AS, Chae CU, Jesse RL, Baggish AL, O'Donoghue M, Sakhuja R, Chen AA, van Kimmenade RR, Lewandrowski KB, Lloyd-Jones DM, Wu AH. **Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study**. J Am CollCardiol. 2007 Aug 14;50(7):607-13
3. Mueller T, Dieplinger B, Gegenhuber A, Poelz W, Pacher R, Haltmayer M. **Increased plasma concentrations of soluble ST2 are predictive for one-year mortality in patients with acute destabilized heart failure**. ClinChem 2008;54:752-6.
4. Rehman, S, Mueller T, Januzzi JL Jr. **Characteristics of the Novel Interleukin Family Biomarker ST2 in Patients with Acute Heart Failure**. JACC 2008;52(18):1458-1465.
5. Dieplinger B, Januzzi J, Steinmair M, Gabriel C, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T. **Analytical and Clinical Evaluation of a Novel High-Sensitivity Assay for Measurement of Soluble ST2 in Human Plasma – The Presage™ ST2 Assay**. ClinicaChemicaActa. 2009;409:33-40.
6. Ky B, French B, McCloskey K, Rame JE, McIntosh E, Shahi P, Dries D, Tang W, Wu A, Fang J, Boxer R, Sweitzer N, Levy W, Goldberg L, Jessup M Cappola T. **High-Sensitivity ST2 for Prediction of Adverse Outcomes in Chronic Heart Failure**. CircHF. 2010 (publication pending)
7. Sabatine MS, Morrow DA, Higgins LJ, MacGillivray C, Guo W, Bode C, Rifai N, Cannon CP, Gerszten RE, Lee RT. **Complementary Roles for Biomarkers of Biomechanical Strain ST2**

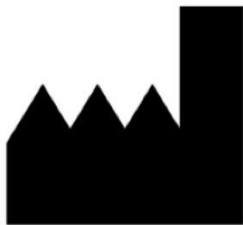
and N-terminal Prohormone B-type Natriuretic Peptide in Patients with ST-elevation Myocardial Infarction. *Circulation.* 2008;117(15):1936-44.

8. Eggers KM, Armstrong PW, Califf RM, Simoons ML, Venge P, Wallentin L, James SK. **ST2 and mortality in non-ST-segment elevation acute coronary syndrome.** *Am Heart J.* 2010 May;159(5):788-94.

	Hersteller
	Medizingerät zur in vitro-Diagnostik
	Gebrauchsanweisung beachten
	Katalognummer
	Temperaturgrenzen
	Chargennummer
	Verfallsdatum
	Autorisierter Vertreter
	CE-Kennzeichen



MediTech Strategic Consultants B.V.
Maastrichterlaan 127-129
NL - 6291 EN Vaals
+31-43-306-3320
+31-43-306-3338



Critical Diagnostics
3030 Bunker Hill Street, Suite 117A
San Diego, CA 92109
+1-877-700-1250 ext. 3
+1-858-270-2400
www.criticaldiagnostics.com



*Critical Diagnostics, Presage, und Advancing Medicine, Saving Lives sind
Warenzeichen von Critical Diagnostics in den USA and anderen Ländern.*

PN 201006G REV 4

2014 Critical Diagnostics. Alle Rechte vorbehalten.