

Troponine cardiache ad elevata sensibilità (cTnI e cTnT)

Sigla corrente: hs-cTnT , hs-cTnI

Sinonimi: TnT, cTnT, TnI, cTnI

Struttura e caratteristiche molecolari: La Troponina (Tn) è un complesso proteico a struttura quaternaria ad alto peso molecolare che regola la contrazione muscolare. E' costituito da tre subunità proteiche differenti che sono il prodotto di differenti geni: la troponina C (TnC), la troponina I (TnI) e la Troponina T (TnT) ¹. Questo complesso svolge un ruolo fondamentale nella fase di eccitazione-contrazione muscolare, sia nel muscolo scheletrico che nel miocardio. Nel miocardio sono presenti forme cardio specifiche della troponina I (denominata cTnI) e della troponina T (denominata cTnT), ma non della TnC. La cTnI e cTnT hanno rispettivamente un peso molecolare (PM) di circa 23500 Da e 37000 Da e presentano catene aminoacidiche leggermente differenti nella parte NH₂-terminale (i primi 40 amino acidi della catena) rispetto a quelle delle miofibre lisce e muscolo-scheletriche (Fig.1).

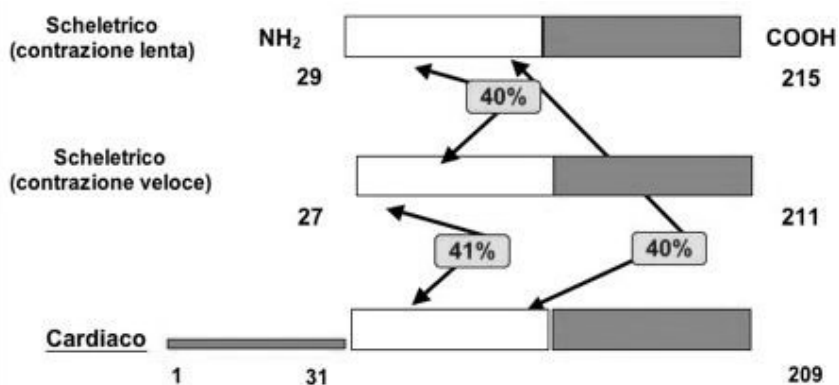


Figura 1
Isoforme della Troponina I

Biosintesi:

La sintesi avviene nelle miofibrille la cui parte proteica comprende: proteine a funzione contrattile (actina e miosina, costituiscono il 70% delle proteine totali), proteine con funzione regolatoria (tropomiosina e troponina), proteine strutturali (come: actnine, desmina, nebulina) e proteine enzimatiche che sostengono il metabolismo muscolare (come: mioglobina, catalasi, citocromi, perossidasi, enzimi glicolitici, enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici) ¹. Il complesso della troponina (PM:76.000) contiene 3 subunità funzionalmente distinte: TnC, TnI e TnT. Si trova legata alla tropomiosina ad intervalli periodici di circa 40 nm. La TnC: possiede 4 siti di legame per il calcio, regola le interazioni delle altre due subunità con le proteine del filamento sottile ¹. La TnI inibisce l'interazione actina-miosina bloccando così l'azione stimolatrice dell'actina sull'attività ATPasica della miosina. La TnT presenta interazione con tropomiosina, actina, TnI e TnC ¹.

Funzioni e significato biologico:

La funzione del complesso troponinico è di inibire la contrazione muscolare quando i livelli di calcio intracellulare sono bassi e attivarla quando la concentrazione si innalza ¹. La TnC (PM: 18000) contiene tre domini principali: due globulari terminali ed uno centrale ad α -elica. Il dominio C-terminale contiene due siti per il calcio ad alta affinità. Gli altri due siti (nella regione N-terminale) sono a bassa affinità e legano ioni Ca⁺⁺ solo dopo che questi hanno occupato i siti ad alta affinità. I siti a bassa affinità sono gli attivatori del processo di con-

trazione. Lo ione Ca^{++} ad elevate concentrazioni occupa tutti i siti della TnC e ciò induce variazioni conformazionali nel complesso troponina che attraverso la TnT si trasmettono alla tropomiosina che scivola lungo la scanalatura del filamento di actina rimuovendo l'effetto inibitorio della TnI sull'actina. L'actina libera può quindi interagire con la miosina stimolandone la funzione ATPasica. Per quanto riguarda più specificatamente il tessuto cardiaco, i miocardiociti danneggiati, in modo reversibile o non, rilasciano le proteine intracellulari, meccanismo che costituisce la premessa per una valutazione quantitativa del danno cardiaco mediante il dosaggio di queste molecole circolanti. Le troponine cardiache possono essere misurate nel sangue anche di soggetti in assenza dei tipici sintomi delle sindromi coronariche acute. I nuovi metodi analitici, con sensibilità dell'ordine di pochi ng/L, consentono di misurare le troponine cardiache circolanti anche in soggetti della popolazione generale, apparentemente privi di patologie cardiache ². I meccanismi responsabili del rilascio di troponine dai miocardiociti non sono stati ancora del tutto ben delineati. Nei soggetti con malattie cardiache, specialmente se su base ischemica, i livelli circolanti di cTnI e cTnT sono proporzionali alla estensione della necrosi dei miocardiociti conseguente al danno ischemico ². Meno noti sono i meccanismi fisiopatologici che inducono il rilascio delle troponine da parte dei miocardiociti nei soggetti sani, sia in condizioni di riposo che dopo intensa attività fisica ². Attualmente l'ipotesi di lavoro più accreditata è che i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti sani siano dovuti ad un fisiologico ricambio cellulare dei miocardiociti dovuto ad un processo continuo di apoptosi di alcuni miocardiociti adulti che sono poi rimpiazzati da cellule progenitrici quiescenti che si trovano a livello dei capillari ². Questo rinnovamento "fisiologico" dei miocardiociti sarebbe più elevato nei neonati e dopo i 70 anni di età. E' evidente che qualsiasi danno indotto sui miocardiociti (inclusi traumi al torace, l'azione di farmaci cardiotossici o l'ipossia) può portare ad un rilascio di cTnI e cTnT e quindi ad innalzamento dei livelli circolanti delle troponine. Nella tabella 1 sono riportate le più comuni condizioni cliniche che possono produrre un innalzamento dei livelli circolanti di cTnI e cTnT.

Tabella 1.

Meccanismi di rilascio della troponina dai miociti cardiaci

Necrosi dei miociti
Apoptosi dei miociti
Turnover normale dei miociti
Rilascio cellulare di frammenti di degradazione proteolitica delle troponine
Aumento della permeabilità del sarcolemma
Formazione e rilascio di vescicole di membrana

Utilizzo clinico:

La misura delle cTnI e cTnT dovrebbe essere considerata un biomarcatore cardio-specifico ma non malattia specifico. In altre parole, un innalzamento dei livelli circolanti di cTnI e cTnT al di sopra il livello decisionale (i.e. 99° percentile della distribuzione dei livelli di troponina dei soggetti adulti normali) non è di per sé diagnostico di infarto del miocardio ²⁻⁷. In accordo con le più recenti linee guida nazionali ⁶ ed internazionali ^{3-5,7}, non è possibile porre diagnosi di inclusione od esclusione di infarto del miocardio utilizzando il valore di cTnI e cTnT relativo a un solo campione di un paziente. E' sempre necessario eseguire almeno due prelievi per valutare l'incremento (o il decremento) dei valori delle cTnI e cTnT ³⁻⁷. Inoltre deve essere sempre accertata la causa ischemica del danno cardiaco, che è in genere valutata mediante l'anamnesi, l'esame clinico, e in base ai risultati dell'esame elettrocardiografico, ecocardiografico e/o della arteriografia delle coronarie, in accordo con il documento: *Third Universal Definition of Myocardial Infarction* ⁴. E' importante sottolineare come il dosaggio delle troponine sia stato messo al centro della diagnosi differenziale di infarto del miocardio e quindi sia da considerarsi quasi come il *gold standard* per l'accertamento dell'infarto del miocardio dal suddetto documento e quindi la prescrizione di altri esami di laboratorio, come la CK-MB e la mioglobina, è ormai da considerarsi del tutto inappropriata nei pazienti con sospetto di sindrome coronarica acuta ^{5,6}. Le evidenze sperimentali indicano che, seguendo gli algo-

ritmi proposti dalle linee guida³⁻⁷, la diagnosi di infarto del miocardio, utilizzando i metodi a più elevata sensibilità, raggiunge una accuratezza diagnostica vicino al 100%⁸. Il vantaggio principale dei nuovi metodi a più elevata sensibilità analitica è che la diagnosi di inclusione (o di esclusione) di infarto del miocardio in regime di urgenza/emergenza può essere posta entro tre ore (rispetto alle 6-12 ore dei metodi a non elevata sensibilità) a partire dal primo valore di cTnI o cTnT, in genere ottenuto all'ingresso al pronto soccorso, con almeno due prelievi di sangue (per esempio: il valore basale e quello dopo tre ore)⁵⁻⁸. Come è già stato osservato in precedenza, deve essere attentamente valutata la cinetica dei valori di cTnI e cTnT. Purtroppo a questo riguardo è da rilevare che non si è ancora ottenuto un accordo unanime sui criteri da utilizzare per valutare l'incremento, valutato come percentuale o in valore assoluto, da considerarsi significativo dei livelli di troponine, soprattutto a causa delle differenze sistematiche che ancora vi sono tra i metodi di dosaggio della cTnI^{6,8-10}. I nuovi metodi immunometrici ad alta sensibilità per le troponine richiedono, quindi, da parte degli esperti di medicina di laboratorio e soprattutto dei clinici un'attenta riflessione, sia riguardo al quesito diagnostico per cui il test è richiesto, sia all'interpretazione dei risultati ottenuti. Per questo motivo, è assolutamente necessario che in tutte le istituzioni si apra un confronto tra i laboratoristi e i clinici per individuare il percorso clinico più adeguato per ciascuna realtà clinico-sanitaria^{6,10}.

DETERMINAZIONE

Matrice biologica:

Siero, plasma raccolto con EDTA, plasma raccolto con Litio-Eparina

Variabilità preanalitica

Variabilità biologica:

Uno studio recente suggerisce che i valori di cTnT, misurati con un metodo a elevata sensibilità, potrebbero avere un ritmo circadiano in soggetti senza malattie cardiache con una variazione media intorno al 25%¹¹. Un altro studio riporta che la variabilità biologica in soggetti normali della cTnI e cTnT, misurati con metodi a elevata sensibilità, possono variare dal 3% al 48%¹². In uno studio riguardante pazienti con sospetto di sindrome coronarica acuta, la variazione intra-individuale di cTnI, misurata con un metodo a elevata sensibilità, è stata riportata essere di circa il 14% per concentrazioni < 40 ng/L¹³. In una rassegna sull'argomento, la variabilità biologica intra-individuale di 5 metodi ad elevata sensibilità per la cTnI (tra cui alcune metodiche prototipo non in commercio in Italia) variava dal 6,15% al 15,2%, mentre quella tra-individui da 12,3% al 70,5%¹⁴. Sempre questo studio riporta che l'intervallo di riferimento per l'incremento (o il decremento) significativo dei valori di cTnI (*Reference Change Value*, RCV) può variare dal +46,0% al +69,5% (mentre il decremento dal -32,0% al -40,9%)¹⁴.

Interferenze:

Le linee guida internazionali raccomandano che le aziende produttrici forniscano ai laboratori tutte le informazioni necessarie riguardo alla possibilità d'interferenza per trigliceridi, bilirubina, emolisi, presenza di auto-anticorpi o anticorpi eterofili¹⁵. La presenza di auto-anticorpi o anticorpi eterofili è risultata senza dubbio essere una criticità assai importante per le precedenti generazioni dei metodi di dosaggio delle troponine^{16,17}. Le aziende riportano nei manuali tecnici di aver apportato modifiche alle nuove generazioni di metodi immunometrici per le troponine allo scopo di eliminare, o almeno significativamente diminuire, l'interferenza da auto-anticorpi e anticorpi eterofili. Comunque, la presenza di questo tipo di interferenza può essere valutata utilizzando opportune procedure¹⁸.

Stabilità - conservabilità:

Anche se la stragrande maggioranza dei più citati studi clinici, che hanno valutato l'accuratezza diagnostica e prognostica dei metodi di dosaggio delle cTnI e cTnT, dichiara di aver utilizzato campioni stoccati anche per lungo tempo (mesi o anni) a bassa temperatura (-20°C o -80°C), pochi studi sono reperibili

in letteratura che abbiano valutato la stabilità in vitro della cTnI e cTnT in campioni di plasma o siero conservati per lungo tempo a bassa temperatura¹⁹⁻²¹. Roche Diagnostics dichiara che la cTnT, misurata con il metodo ECLIA ad elevata sensibilità è stabile a 24 ore a 2-8° C e 12 mesi a -20°C. Abbott Diagnostics dichiara che i campioni di sangue possono essere conservati fino a 8 ore a temperatura ambiente oppure fino a 72 ore a temperatura di 2°-8°C. Dichiara inoltre che i campioni di siero sono stabili alla temperatura di -10°C o inferiori per un massimo di 30 giorni. Comunque, alcuni studi¹⁹⁻²¹ riportano che le cTnT e cTnI sono stabili per 5 anni a -80°C in campioni di siero o plasma.

Metodo di riferimento:

Le linee guida consigliano di utilizzare metodiche immunometriche ad elevata sensibilità che utilizzano piattaforme automatizzate; in alternativa, dove queste non siano disponibili, si dovrebbero utilizzare metodiche clinicamente utilizzabili (CV a livello del 99° percentile della popolazione di riferimento < 20%)³⁻⁶. Al momento, le metodiche POCT in commercio in Italia non soddisfano le specifiche di qualità, richieste dalle linee guida, e quindi, in accordo con le linee guida, non si dovrebbero utilizzare per la diagnosi differenziale dell'infarto del miocardio. Quindi, i metodi POCT si dovrebbero considerare come metodiche di primo intervento (*screening*) in quelle località/situazioni in cui non sia disponibile una metodica che risponda ai requisiti richiesti dalle linee guida.

Standard internazionale di riferimento: non disponibile

Unità di misura

Corrente:

µg/L (le linee guida nazionali ed internazionali suggeriscono di non utilizzare più queste unità)³⁻⁶.

SI:

ng/L (unità di misura suggerita dalle linee guida per evitare l'utilizzo di risultati con necessità di un elevato numero di cifre decimali)³⁻⁶.

Fattore di conversione:

1 µg/L = 1000 ng/L

Metodologie impiegabili:

immunometriche con l'impiego di anticorpi monoclonali e traccianti ad elevata sensibilità analitica.

Refertazione:

indicare il tipo di isoforma circolante determinato (cTnT o cTnI) e la metodica utilizzata con il rispettivo valore di riferimento (cioè il 99° percentile della distribuzione della troponina calcolato in una adeguata popolazione di adulti apparentemente sani).

Valori di riferimento:

Tutte le linee guida raccomandano³⁻⁷ come livello decisionale per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (IMA) un aumento delle concentrazioni di cTnI e cTnT al di sopra del 99° percentile della distribuzione dei valori misurati in una popolazione di riferimento costituita da almeno 300 individui apparentemente sani. Le stesse linee guida raccomandano che questo livello decisionale sia misurato con un'imprecisione analitica ≤ 10% (espressa come coefficiente di variazione, CV%). Pur con questi prerequisiti generali le diverse metodiche disponibili forniscono valori non confrontabili; ne consegue che gli intervalli di riferimento sono metodo dipendenti ed assolutamente non intercambiabili tra loro. In tabella 2 è riportato un confronto tra i parametri di sensibilità analitica (LoD e LoQ al 10% e 20%) e i valori del 99° percentile dei metodi più studiati, utilizzando i dati forniti dalla letteratura.

Scheda tecnica

Tabella 2

Limite di misura (LoD), limite di quantificazione (LoQ) al 10% CV, e 99° percentile di alcuni metodi di dosaggio della cTnI e della cTnT.

Metodi	LoD (ng/L)	LoQ 10% CV (ng/L)	LoQ 20% CV (ng/L)	99° percentile (ng/L)	Referenza
cTnI ADVIA	6	57	30	40-72	23
cTnI DxI	10	60	20	40	14
cTnI AIA	8	100	30	33	24
cTnI Architect	1,1-1,9	6,8-10,6	-	26,2	25
cTnT ECLIA	5	13	-	13,5	26,27

DISPONIBILITÀ DI MERCATO

Produttore	Distributore	Prodotto	Tecnica	Strumentazione richiesta
cTnT				
Roche Diagnostics www.roche-diagnostics.com	Roche Diagnostici www.roche.it	Elecsys cardiac Troponin T high-sensitivity	ECLIA	piattaforme Elecsys/COBAS
cTnI				
Siemens Healthcare Diagnostics Inc www.siemens.com	Siemens Healthcare Diagnostics www.siemens.com	ADVIA Centaur Troponin I Ultra	ICMA	piattaforma ADVIA Centaur
Beckman Coulter SpA www.beckmancoulter.com	Beckman Coulter Italia www.beckmancoulter.it	ACCESS Accu TnI+3	CLIA	piattaforme Access e DxI
TOSOH Bioscience www.tosohbioscience.com	TOSOH Bioscience Italia www.tosohbioscience.com	ST AIA-pack cTnI 3 generazione	IEMA	piattaforma AIA
Abbott Diagnostics www.abbottdiagnostics.com	Abbott Diagnostici Italia www.abbotitalia.com	STAT Architect high sensitive TnI	CMIA	piattaforma Architect

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Katrukha IA.** Human cardiac troponin complex. Structure and functions *Biochemistry (Moscow)* 2013; 78:1447-65
- Giannoni A, Giovannini S, Clerico A.** Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1167-77
- Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al.** The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology. (ESC). ESC guidelines for the management of acute coronary syndrome in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2011; 32:2999-3054
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al.** Third Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60:1581-98
- Thygesen K, Mair J, Giannitis E, et al.** Study group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute cardiac care. How to use high-sensitivity cardiac troponin in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012; 33: 2252-7
- Casagrande I, Cavazza M, Clerico A, et al.** Proposal for the use in emergency departments of cardiac troponins measured with the latest generation methods in patients with suspected acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51:1727-37
- Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al.** Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2016; 37:267-315
- Mueller M, Vafaie M, Biener M, et al.** Cardiac Troponin T. From diagnosis of myocardial infarction to cardiovascular risk prediction. *Circ J* 2013; 77:1653-61

9. **Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al.** Pilot study on harmonization of cardiac troponin I immunoassays using patients and quality control plasma samples. On behalf of the Italian Section of the European Ligand Assay Society (ELAS) and of the Study Group on Cardiovascular Biomarkers of the Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBioC). *Clin Chem Acta* 2016; 456:42-48
10. **Clerico A, Zaninotto M.** Specifiche di qualità ed appropriatezza della richiesta del dosaggio delle troponine cardiache con particolare riguardo al contesto clinico del sospetto di sindrome coronarica acuta. *LigandAssay* 2013; 18:337-42
11. **Klinkenberg LJ, van Dijk JW, Tan FE, et al.** Circulating cardiac troponin T exhibits a diurnal rhythm. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63:1788-95
12. **Simpson AJ, Potter JM, Koerbin G, et al.** Use of observed within-person variation of cardiac troponin in emergency department patients for determination of biological variation and percentage and absolute reference change values. *Clin Chem* 2014; 60:848-54
13. **Nordenskjöld AM, Ahlström H, Eggers KM, et al.** Short- and long-term individual variation in cardiac troponin in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chem* 2013; 59:401-9
14. **Apple FS, Collinson PO.** Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem* 2012; 58:54-61
15. **Apple FS, Jesse RL, Newby LK, et al.** National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007; 53:547-51
16. **Lippi G, Aloe R, Meschi T, et al.** Interference from heterophilic antibodies in troponin testing. Case report and systematic review of the literature. *Clin Chim Acta* 2013; 426:79-84
17. **Pfäfflin A.** Highly sensitive cardiac troponin I assay leads to lowered specificity. *Clin Chem* 2009; 55: 1749..
18. **Franeková J, Bláha M, Bělohoubek J, et al.** A clinical and laboratory approach used to elucidate discordant results of high-sensitivity troponin T and troponin I. *Clin Chim Acta* 2015; 446:128-31
19. **Kavsak PA, Macrae AR, Yerna MJ, Jaffe AS.** Analytic and clinical utility of a next-generation, highly sensitive cardiac troponin I assay for early detection of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; 55:573 - 7
20. **McGill D, Talaulikar G, Potter JM, et al.** Over time, high-sensitivity TnT replaces NT-proBNP as the most powerful predictor of death in patients with dialysis-dependent chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2010; 411:936 - 9
21. **Koerbin G, Tate J, Potter JM, et al.** Characterisation of a highly sensitive troponin I assay and its application to a cardio-healthy population. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50:871- 8.
22. **Rezvanpour A, Shortt C, Clark L, et al.** Analytical factors to consider when assessing a high-sensitivity cardiac troponin I assay compared to a contemporary assay in clinical studies. *Clin Chim Acta* 2014; 429:6 -7.
23. **Prontera C, Fortunato A, Storti S, et al.** Evaluation of Analytical Performance of the Siemens ADVIA TnI Ultra Immunoassay. *Clin Chem* 2007; 53: 1722-3
24. **Franzini M, Prontera C, Masotti S, et al.** Evaluation of analytical performance of a novel immunoenzymometric assay for cTnI. *Clin Chim Acta* 2013; 416: 48-9
25. **Krintus M, Kozinski M, Boudry P, et al.** European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT high sensitive troponin I immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:1657-65
26. **Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, et al.** Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010; 56:254-61
27. **Saenger AK, Beyrau R, Braun S, et al.** Multicenter analytical evaluation of a high-sensitivity troponin T assay. *Clin Chim Acta* 2011; 412:748-54