

IL LABORATORIO NELLE URGENZE ED EMERGENZE

hs Troponina I e Peptidi Natriuretici:
punto di vista del Laboratorio

Ottavia Porzio

*Dipartimento di Medicina di Laboratorio
Laboratorio di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica
Policlinico di Tor Vergata*



Troponine



Danno cardiaco

Peptidi
natriuretici



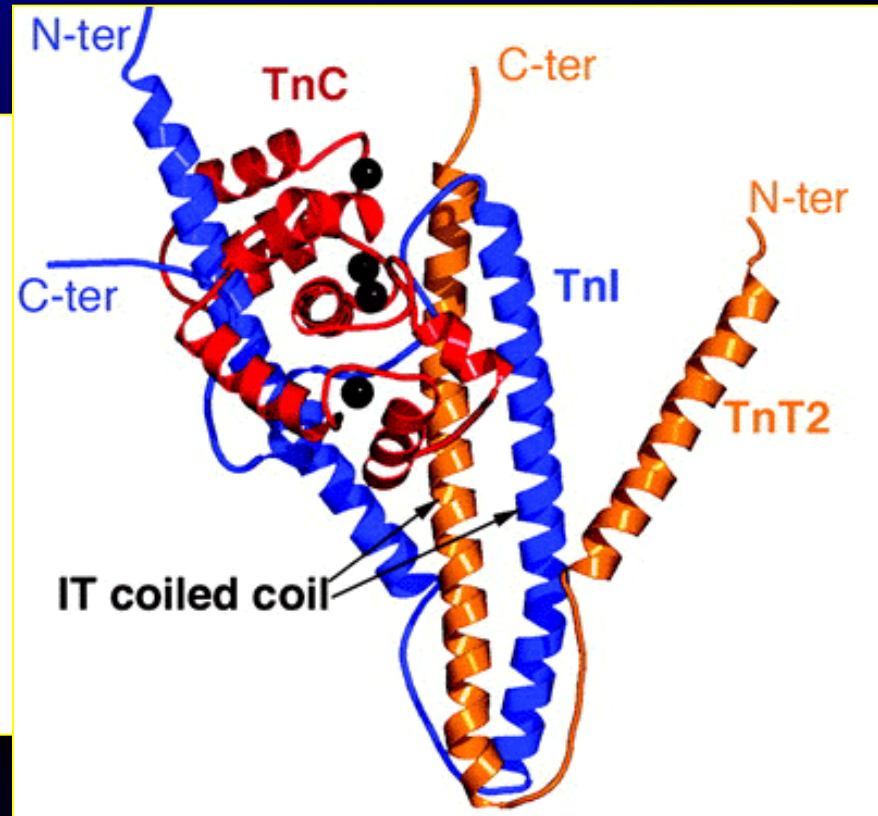
Scompenso cardiaco

Il marcatore biochimico ideale di danno miocardico possiede:

- Alta sensibilità e specificità
- Rapida cinetica di dismissione
- Ampia finestra diagnostica
- Può essere dosato velocemente (rapido turnaround time)

IL LABORATORIO NELLE URGENZE ED EMERGENZE

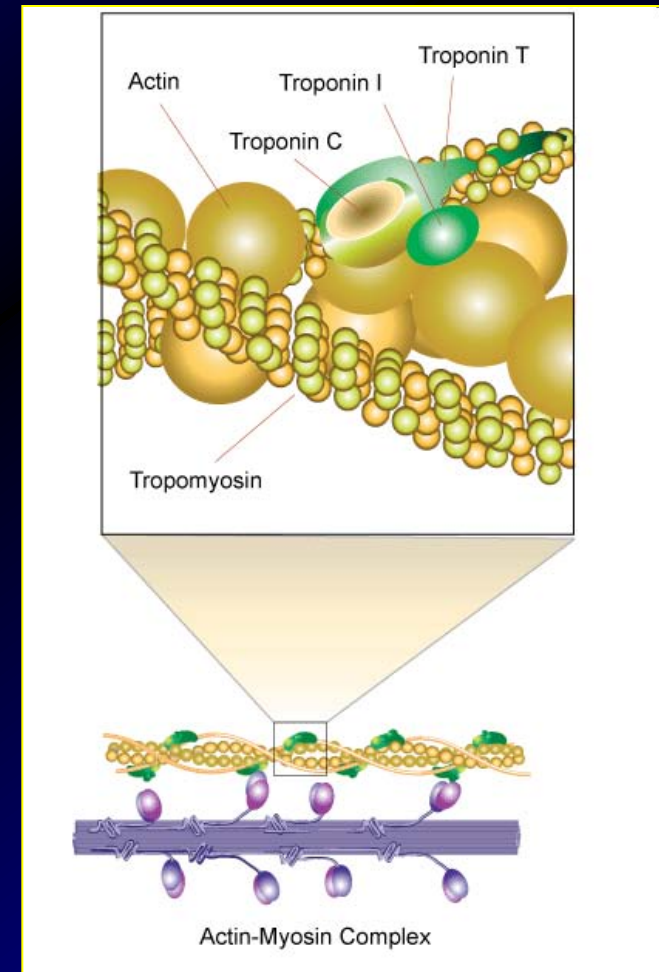
hs Troponina I e Peptidi Natriuretici: punto di vista del Laboratorio



Il complesso delle troponine è responsabile della regolazione della contrazione muscolare, sia nel muscolo scheletrico che cardiaco.

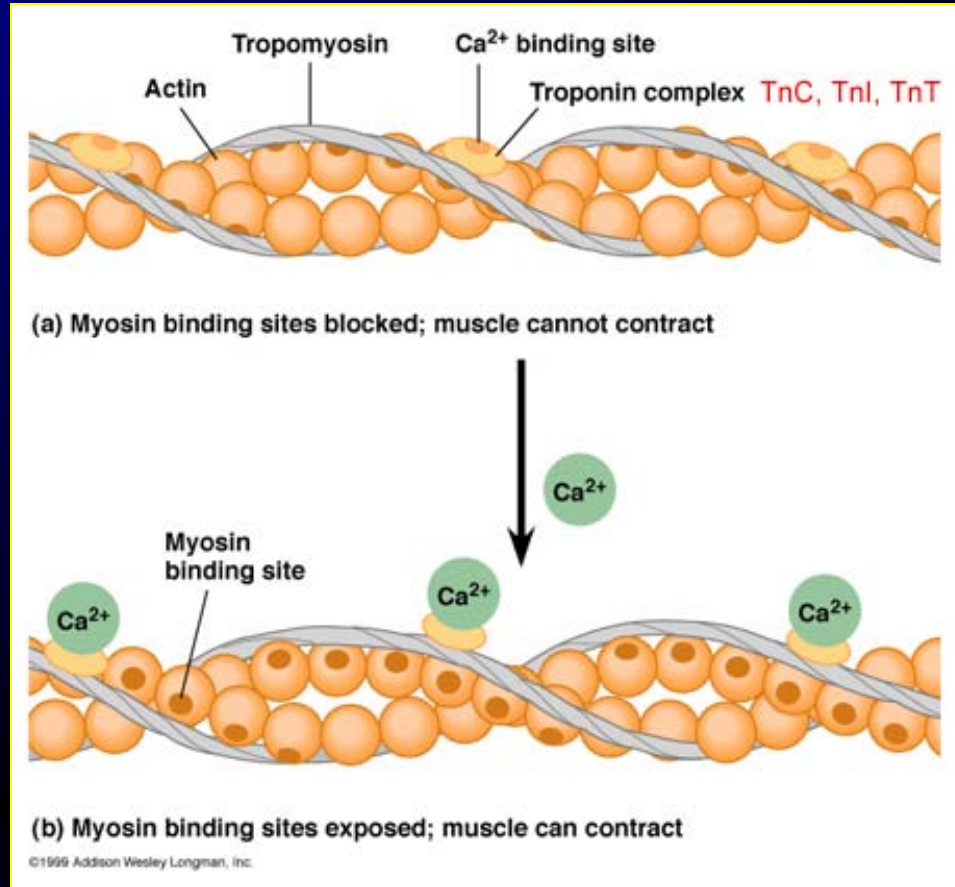
Il complesso è composto da 3 subunità:

- **Troponina C** (TnC), proteina Ca^{2+} -dipendente che interagisce con la troponina I,
- **Troponina I** (TnI), che inibisce l'interazione tra actina e miosina
- **Troponin T** (TnT), responsabile della trasmissione dei cambiamenti conformazionali alle fibre muscolari sottili



IL LABORATORIO NELLE URGENZE ED EMERGENZE

hs Troponina I e Peptidi Natriuretici: punto di vista del Laboratorio



I cardiomiociti esprimono specifiche isoforme della TnI e TnT, indicate rispettivamente come **cTnI** e **cTnT**, che possono essere facilmente distinte mediante immunodosaggi.

Le troponine cardiache sono determinate nel siero mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro epitopi della cTnI e cTnT. Questi anticorpi sono altamente specifici per la forma cardiaca della troponina e non hanno alcuna crossreattività con l'isoforma del muscolo scheletrico.

Limite decisionale raccomandato (cut-off) per cTnI e cTnT:

99th percentile

Il livello di imprecisione (coefficiente di variazione) accettabile a concentrazioni pari al 99° percentile deve essere

$\leq 10\%$.

*National Academy of Clinical Biochemistry, IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines, European Society of Cardiology/American College of Cardiology
Clin Chem 2007, 53,4: 547-574*



The NEW ENGLAND
JOURNAL of MEDICINE

361;9, august 27, 2009

Early Diagnosis of Myocardial Infarction with Sensitive Cardiac Troponin Assays

Tobias Reichlin, M.D., Willibald Hochholzer, M.D., Stefano Bassetti, M.D.,
Stephan Steuer, M.D., Claudia Stelzig, M.Sc., Sabine Hartwiger, M.D.,
Stefan Biedert, M.Sc., Nora Schaub, M.D., Christine Buerge, M.D.,
Mihael Potocki, M.D., Markus Noveanu, M.D., Tobias Breidthardt, M.D.,

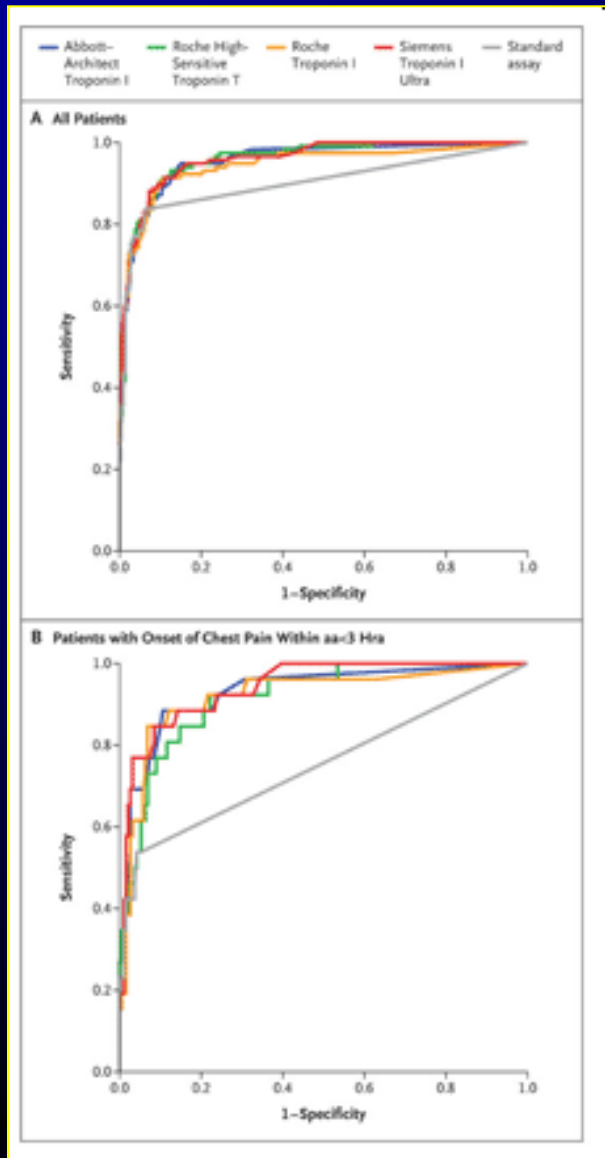
Sensitive Troponin I Assay in Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction

Till Keller, M.D., Tanja Zeller, Ph.D., Dirk Peetz, M.D., Stergios Tzikas, M.D.,
Alexander Roth, Ph.D., Ewa Czyz, M.D., Christoph Bickel, M.D.,
Stephan Baldus, M.D., Ascan Warnholtz, M.D., Meike Fröhlich, M.D.,
Christoph R. Sinning, M.D., Medea S. Eleftheriadis, Philipp S. Wild, M.D.,
Renate B. Schnabel, M.D., Edith Lubos, M.D., Nicole Jachmann, Ph.D.,
Sabine Genth-Zotz, M.D., Felix Post, M.D., Viviane Nicaud, M.A.,

Table 2. Diagnostic Performance of Cardiac Troponin Assays at Presentation.

Troponin Assay	Sensitivity	Specificity	Negative Predictive Value	Positive Predictive Value
	<i>percent (95% confidence interval)</i>			
Sensitive troponin assays				
Abbott–Architect Troponin I				
Limit of detection, 0.010 µg/liter	94 (88–97)	87 (84–89)	98 (97–99)	59 (52–66)
99th percentile, 0.028 µg/liter	86 (79–92)	92 (90–94)	97 (95–98)	69 (61–76)
10% coefficient of variation, 0.032 µg/liter	85 (77–90)	93 (90–95)	97 (95–98)	70 (62–78)
Roche High-Sensitive Troponin T				
Limit of detection, 0.002 µg/liter	100 (97–100)	14 (12–18)	100 (96–100)	19 (16–23)
99th percentile, 0.014 µg/liter*	95 (90–98)	80 (77–83)	99 (97–100)	50 (43–56)
Roche Troponin I				
Limit of detection, 0.100 µg/liter	92 (86–96)	88 (86–91)	98 (97–99)	62 (55–69)
99th percentile, 0.160 µg/liter	84 (76–90)	94 (91–95)	97 (95–98)	73 (65–80)
10% coefficient of variation, 0.300 µg/liter	75 (66–82)	97 (95–98)	95 (93–97)	83 (75–89)
Siemens Troponin I Ultra				
Limit of detection, 0.006 µg/liter	97 (91–99)	68 (64–72)	99 (97–100)	38 (32–44)
99th percentile, 0.040 µg/liter*	89 (82–94)	92 (89–94)	98 (96–99)	68 (60–76)
Standard assay				
Roche Troponin T 4th Generation				
99th percentile, unknown				
Limit of detection, 0.010 µg/liter	83 (76–90)	93 (91–95)	97 (95–98)	72 (64–79)
10% coefficient of variation, 0.035 µg/liter	72 (64–80)	97 (96–98)	94 (92–96)	85 (76–91)

* The criterion of 10% coefficient of variation was fulfilled at the 99th percentile.



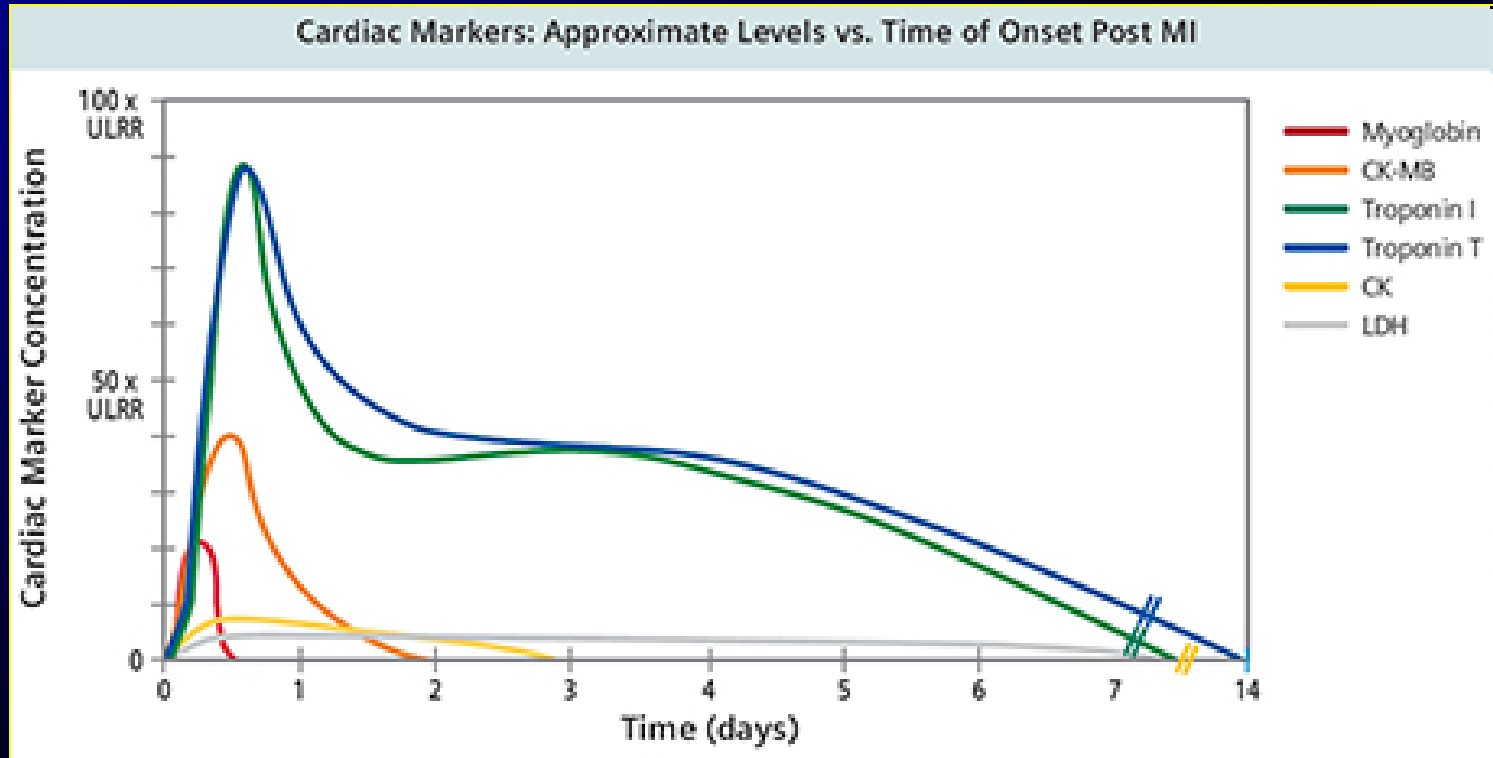
L'accuratezza diagnostica per IMA, quantificata mediante AUC, era significativamente più alta utilizzando la hs-trop rispetto ai dosaggi standard (0.94-0.96 vs 0.90, rispettivamente), differenza più evidente quando venivano considerati soltanto i pazienti con insorgenza recente del dolore toracico.

La hs-Troponina possiede:

😊 Alta sensibilità e specificità

CAUSE NON ISCHEMICHE DI INCREMENTO DELLE TROPONINE

- ✓ Miocardite/pericardite
- ✓ Scompenso cardiaco
- ✓ Cuore polmonare acuto
- ✓ Trauma cardiaco
- ✓ Tossicità miocardica da chemioterapici
- ✓ Rigetto nel trapianto cardiaco
- ✓ Insufficienza renale cronica
- ✓ Intossicazione da monossido di carbonio
- ✓ Distrofie muscolari
- ✓ Sepsi



IL LABORATORIO NELLE URGENZE ED EMERGENZE

hs Troponina I e Peptidi Natriuretici: punto di vista del Laboratorio

Table 3. Correct Diagnosis of Acute Myocardial Infarction, According to the Time of a Single Sensitive Troponin I Assay.*

Time of Testing	Detection of Myocardial Infarction % of patients
On admission	
0 to <6 hr after chest-pain onset	87.7
6 to 12 hr after chest-pain onset	94.5
>12 hr after chest-pain onset	100
After admission	
At 3 hr	100
At 6 hr	100

* The diagnostic criteria for acute myocardial infarction were a troponin I level (as measured by sensitive assay) above the 99th percentile of 0.04 ng per milliliter in at least one measurement and a rise or fall in the level of at least 30%.

Till Keller MD, NEJM 361,2009

La hs-Troponina possiede:

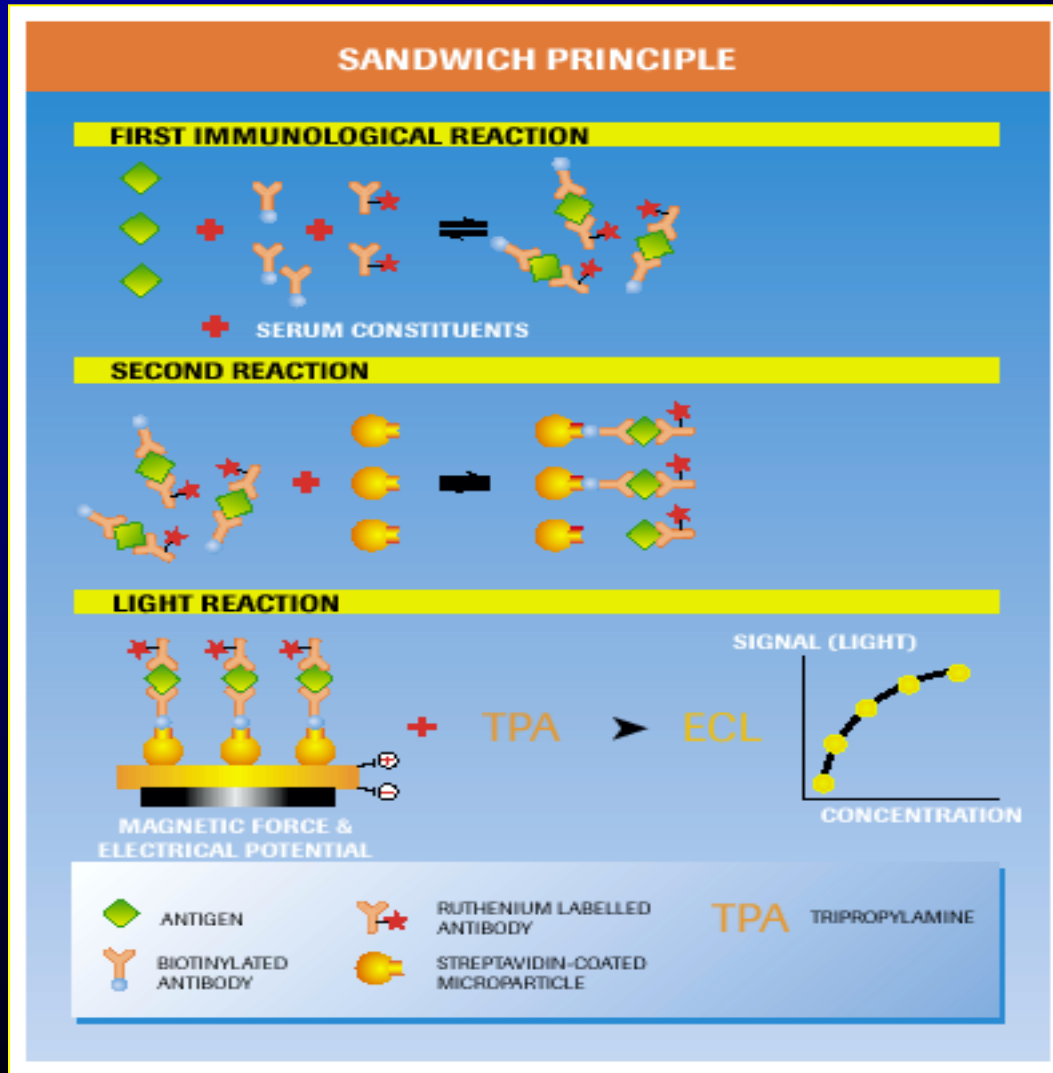
- 😊 Alta sensibilità e specificità
- 😊 Rapida cinetica di dismissalone
- 😊 Ampia finestra diagnostica

IL LABORATORIO NELLE URGENZE ED EMERGENZE

hs Troponina I e Peptidi Natriuretici: punto di vista del Laboratorio



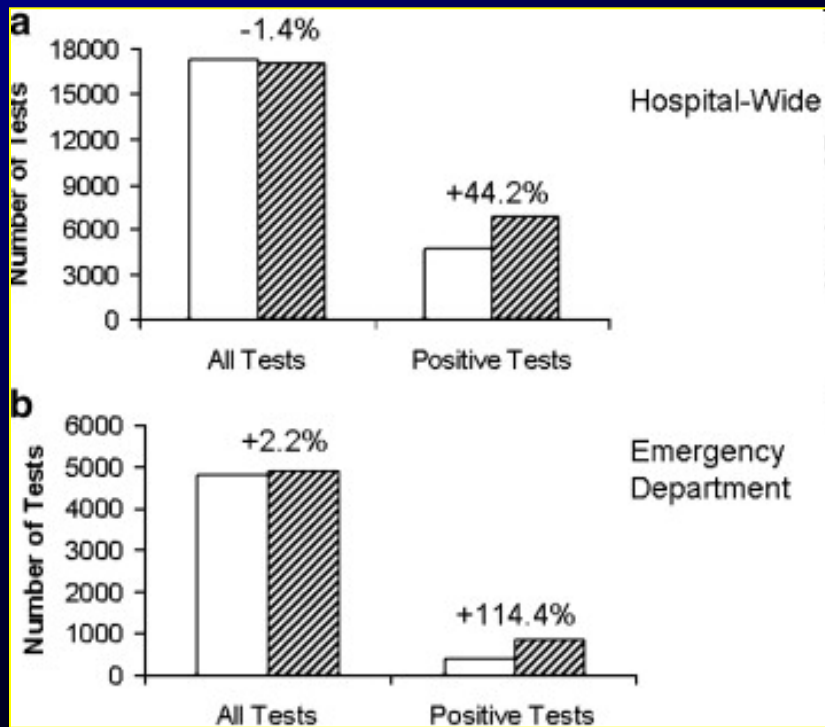
18 minuti



La hs-Troponina possiede:

- 😊 Alta sensibilità e specificità
- 😊 Rapida cinetica di dismissione
- 😊 Ampia finestra diagnostica
- 😊 Può essere dosato velocemente (rapido turnaround time)

Quale potrebbe essere l'impatto dei nuovi metodi ad alta sensibilità delle troponine I e T sulla diagnostica della Sindrome Coronarica Acuta ?



L'utilizzo della TnI-Ultra aumenta significativamente il numero di valori positivi, senza modificare il numero dei test richiesti. L'elevato numero di valori positivi è da ricondurre ai risultati presenti nel range dei bassi-positivi ($0.05-0.10 \mu\text{g/l}$).

Pertanto, il dosaggio ultrasensibile della cTnI permette di identificare più precocemente il danno cardiaco ma aumenta anche in patologie non correlate al danno ischemico.



Troponine



Danno cardiaco

Peptidi
natriuretici

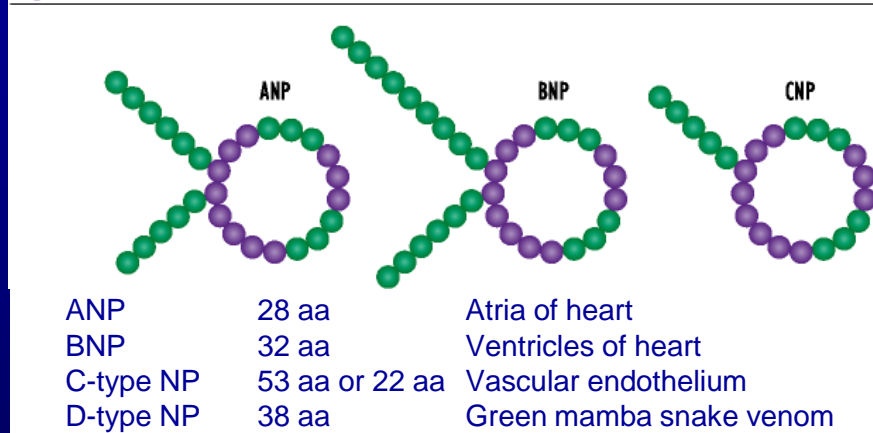


Scompenso cardiaco

I *Peptidi Natriuretici Cardiaci* (PNC) appartengono ad una famiglia di peptidi, con funzione ormonale, costituita da molecole altamente omologhe:

- ❖ *ANP*: Peptide Natriuretico di tipo A o atriale, prodotto dalle cellule atriali;
- ❖ *BNP*: Peptide Natriuretico di tipo B o cerebrale, isolato per la prima volta nel cervello di suino;
- ❖ *CNP*: Peptide Natriuretico di tipo C, prodotto prevalentemente dalle cellule endoteliali e a livello del SNC;
- ❖ *DNP*: Dendroaspis Natriuretic Peptide, il cui ruolo fisiopatologico e le cui origini sono ancora incerte
- ❖ *Urodilatina*: prodotta esclusivamente dal rene, non si trova in circolo ma solo nelle urine

Figure 1: Structure of Natriuretic Peptides



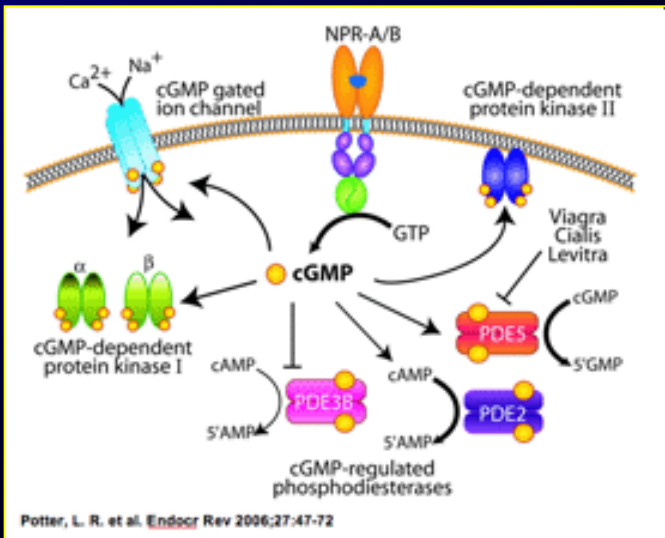
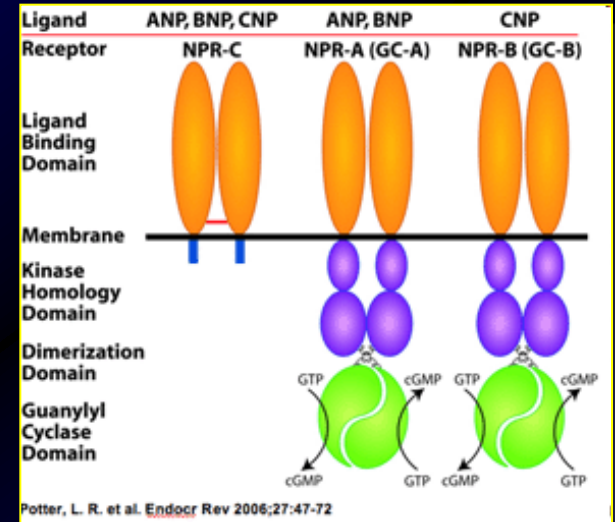
I peptidi natriuretici possiedono una regione conformata ad anello, per la presenza di un ponte cisteinico. La porzione residua della molecola è costituita dalle estremità terminali libere (-NH₂ e -COOH terminali) della catena peptidica.

I vari peptidi natriuretici hanno in comune la porzione anulare della molecola, di cui condividono gran parte della sequenza aminoacidica. La lunghezza e la composizione aminoacidica delle porzioni residue della catena peptidica variano notevolmente tra i vari ormoni natriuretici.

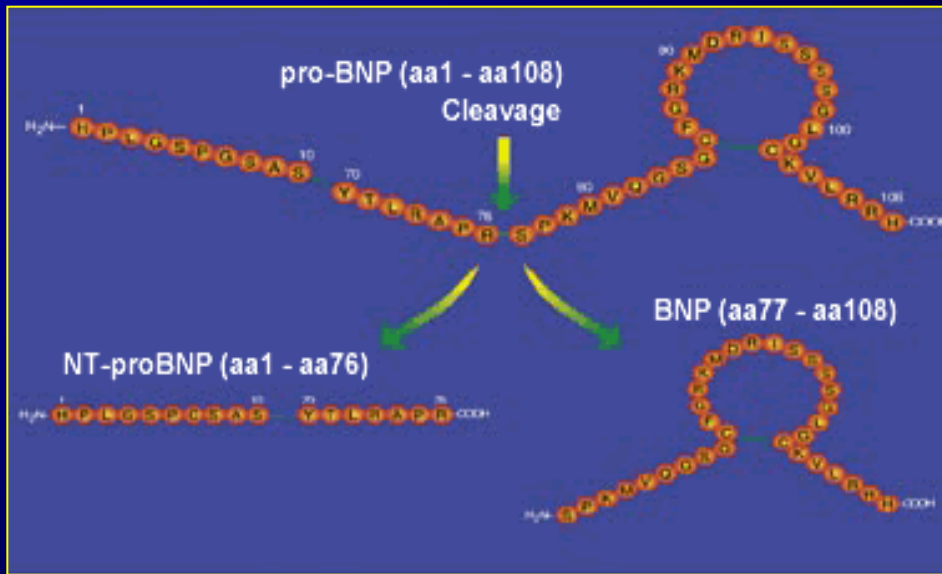
L'anello è la porzione recettore-specifica della molecola.

I **recettori di I tipo** (NPR-A ed NPR-B) hanno un sito di legame extracellulare, una regione idrofobica transmembrana e un dominio carbossi-terminale intracellulare con attività guanil-ciclasica. La struttura dell'anello intatto è essenziale per il legame recettoriale.

Il legame con il recettore determina la produzione di GMPc come secondo messaggero.



I **recettori di II tipo**, NPR-C, non possiedono attività guanil-ciclasica e il loro ruolo è quello di controllare la concentrazione plasmatica dei peptidi natriuretici mediante la loro internalizzazione, endocitosi e degradazione lisosomiale.



Dal pre-proBNP, attraverso il distacco proteolitico del *peptide segnale*, origina il pro-ormone (**pro-BNP**).

Il successivo clivaggio enzimatico del legame tra gli aa in posizione 76 e 77 dà luogo a due frammenti, secreti in quantità equimolecolare nel circolo sanguigno:

il frammento carbossi-terminale del pro-BNP 77-108, biologicamente attivo, noto con il nome di **BNP**

il frammento amino-terminale del pro-BNP 1-76, sprovvisto di attività ormonale, chiamato **NT-pro-BNP**

A differenza della sintesi dell'ANP, che avviene a livello dell'atrio in risposta alla distensione della parete conseguente all'aumento del volume intravascolare, la sintesi ventricolare del BNP è assente in condizioni basali ma è regolata a livello trascrizionale da stimoli parietali e stimoli endocrini.

1. stimoli parietali

- ✓ distensione della parete ventricolare
- ✓ fibrosi e ipertrofia parietale (stress cronico della parete ventricolare)
- ✓ ischemia

2. stimoli endocrini

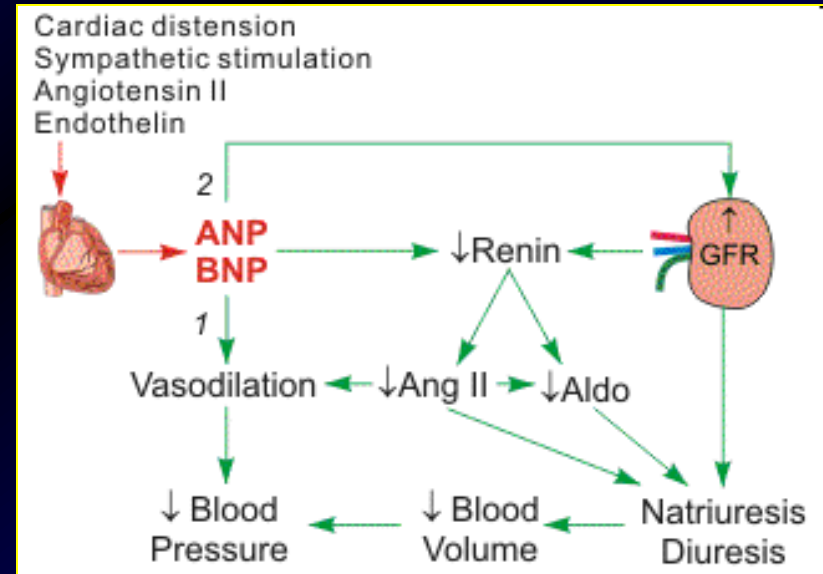
- ✓ Noradrenalina
- ✓ Endotelina
- ✓ Angiotensina II
- ✓ Glicocorticoidi
- ✓ Estrogeni (gravidanza)
- ✓ Ormoni tiroidei
- ✓ Fattori di crescita
- ✓ Citochine (TNF α , IL-1, IL-6)

I PNC svolgono un'azione di controregolazione dei sistemi neuromonale ed immunologico.

Essi hanno infatti:

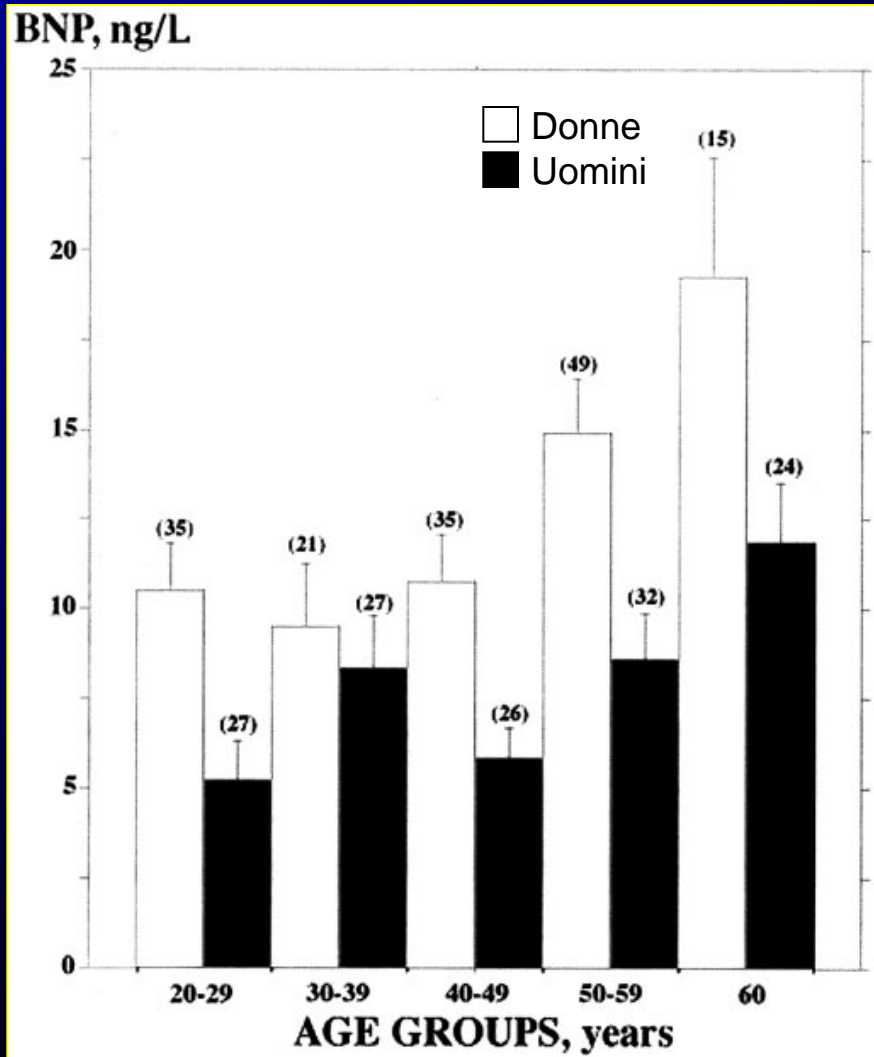
- azione diuretica
- azione natriuretica
- azione vasodilatatrice

Attraverso queste azioni i peptidi natriuretici svolgono il ruolo di antagonisti degli effetti vasocostrittori e sodio-ritentivi del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone.



Tutti e tre i peptidi (pro-BNP, NT-proBNP e BNP) sono dosabili nel plasma.

- Variabilità biologica
- Variabilità pre-analitica
- Variabilità analitica



Variabilità biologica

Nei soggetti normali, la concentrazione plasmatica del BNP e dell'NT-proBN variano con il sesso e con l'età: nelle donne in età fertile il peptide raggiunge valori doppi rispetto agli uomini di pari età; dopo i 50 anni, aumenta in entrambi i sessi.

Per tale motivo è stato proposto di usare livelli decisionali diversi in funzione dell'età e del sesso.

Variabilità pre-analitica:


1) eterogeneità delle molecole circolanti derivate dal pro-BNP

Le molecole di pro-BNP, così come quelle dei peptidi da esso derivati, possono interagire tra loro, dando luogo ad oligomeri circolanti.

Trattandosi di forme molecolari multiple, è possibile che alcuni epitopi siano più esposti di altri nel legame con gli Ab specifici utilizzati per la loro determinazione.

2) stabilità del campione biologico

2) Stabilità del campione biologico



Sia in vivo sia in vitro, il BNP subisce l'azione di alcune proteasi plasmatiche che staccano i 2 aminoacidi terminali (serina 77 e prolina 78) della molecola: il campione biologico, pertanto, è instabile a temperatura ambiente.

Possibili ripercussioni sui metodi di dosaggio che contengono un Ab contro l'estremità N-terminale del BNP.

Non è possibile effettuare il prelievo utilizzando una provetta di vetro: la callicreina, una volta attivata, esercita un'azione proteolitica sull'estremità C-terminale della molecola del BNP.



Anche in questo caso, pertanto, la stabilità del campione biologico è compromessa.

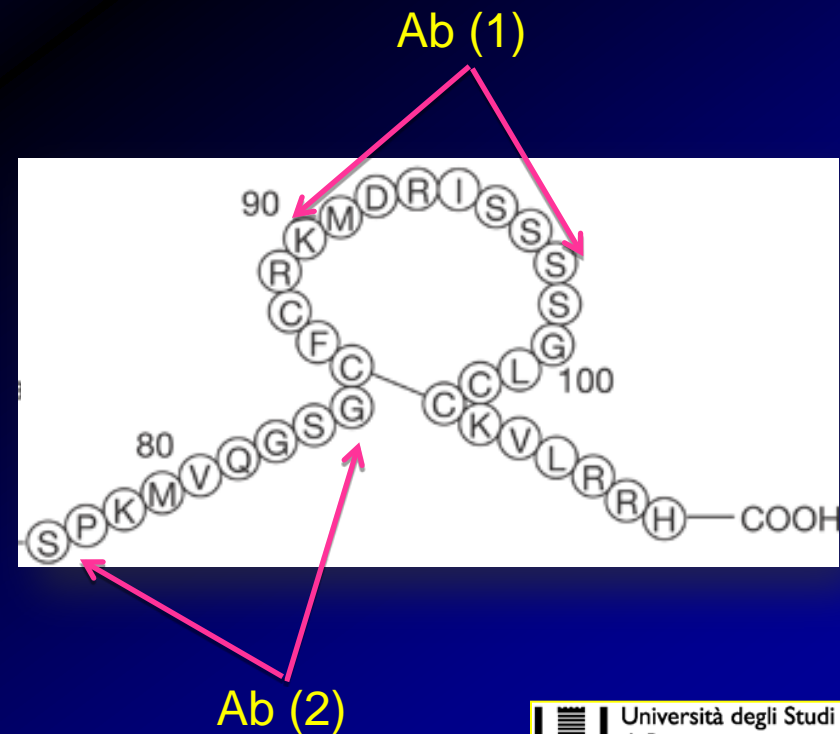
Possibile interferenza con i metodi analitici che riconoscono l'epitopo C-terminale

Variabilità analitica:

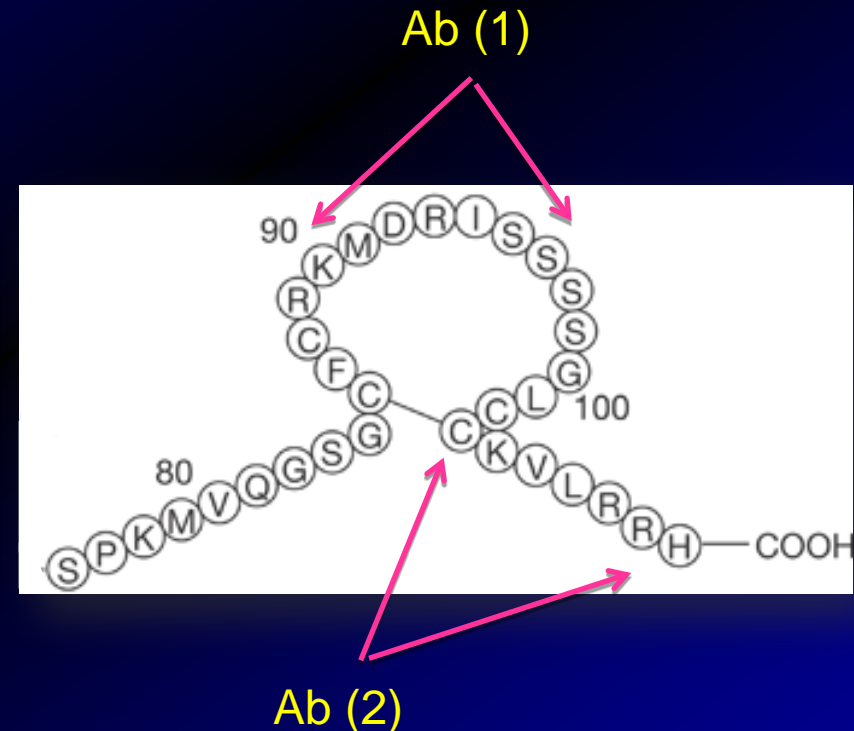
I metodi più diffusi per la determinazione dei peptidi natriuretici BNP e NT-proBNP sono di tipo immunometrico (sandwich).

Per la determinazione del **BNP**, disponiamo di due metodiche analitiche:

- 1) Ab (1) specifico per la struttura anulare del BNP (aminoacidi 90-97) e di un Ab (2) specifico per l'estremità N-terminale del BNP (aminoacidi 77-86).



2) un secondo gruppo, più eterogeneo, comprende quei metodi in cui il sandwich è formato da un Ab (1) specifico per la struttura anulare e da un Ab (2) specifico per l'estremità carbossi-terminale della molecola (residui 103-107 del pro-BNP).

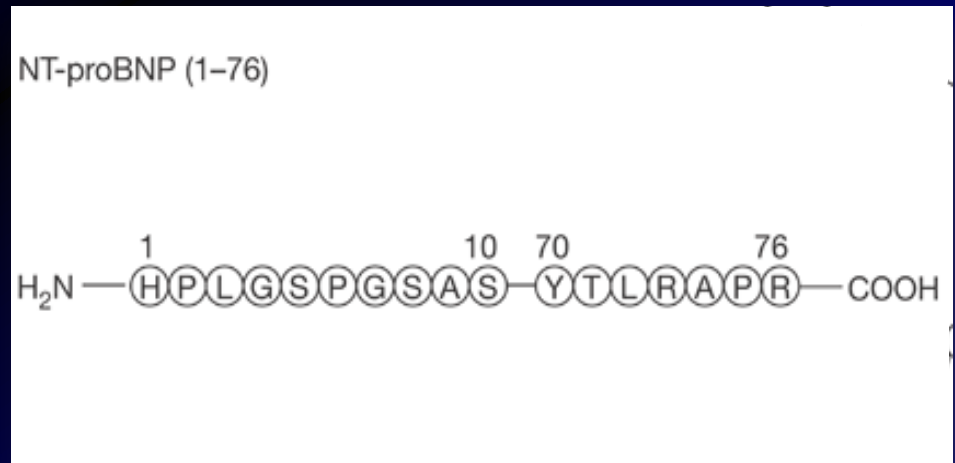


Questi metodi dosano anche il proBNP intatto circolante: possibile sovrastima della concentrazione del BNP

Per il dosaggio dell' **NT-proBNP** è disponibile un solo metodo immunometrico totalmente automatizzato, che sfrutta il principio della ElettoChemiLuminescenza (ECLIA).

Anche in questo caso sono utilizzati due anticorpi:

- un Ab di cattura, specifico per l'epitopo 1-21 dell'estremo N-terminale
- un Ab di rivelazione che si lega all'epitopo della regione centrale della molecola (residui aminoacidici 39-50).



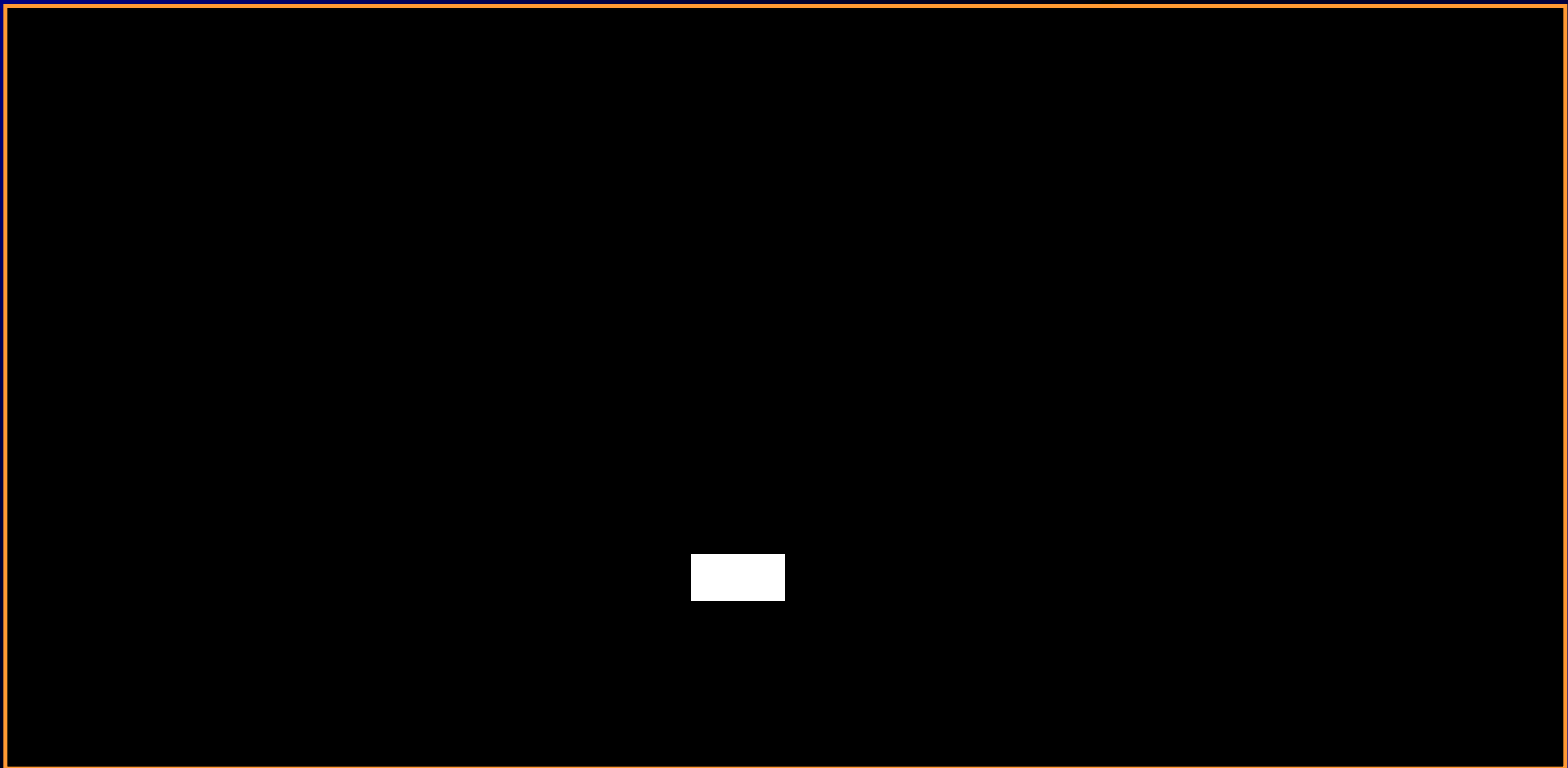
I vari metodi di determinazione non forniscono risultati comparabili.

Infatti, i risultati analitici risentono significativamente dell'eterogeneità metodologica.

Tale eterogeneità si deve a:

- la diversa specificità immunologica (tipo di Ab impiegato)
- la differente standardizzazione analitica (tipo di Ag utilizzato come calibratore)

L'eterogeneità metodologica si ripercuote sulla scelta dei valori di riferimento e dei cut-off



Patologia

Concentrazioni Peptide natriuretico

Malattie cardiache

Scompenso cardiaco

Molto aumentato

Infarto del miocardio (primi 2–5 giorni)

Molto aumentato

Ipertensione essenziale con IVS

Aumentato

Malattie polmonari

Dispnea acuta

Aumentato

Embolia polmonare

Aumentato

BPCO

Aumentato

Malattie endocrino-metaboliche

Ipertiroidismo

Aumentato

Ipotiroidismo

Diminuito

Sindrome di Cushing

Aumentato

Iperaldosteronismo primario

Aumentato

Diabete mellito

Normale o Aumentato

Cirrosi epatica con ascite

Aumentato

Insufficienza renale (acuta o cronica)

Molto aumentato

Sindrome paraneoplastica

Normale o Aumentato

Emorragia subaracnoidea

Aumentato

- E' necessario utilizzare valori di riferimento e livelli decisionali propri del metodo analitico adottato (metodi differenti → valori numerici differenti)
- Non è possibile identificare cut-off validi per tutte le condizioni cliniche: si possono utilizzare valori decisionali puramente indicativi, limitatamente ai metodi di dosaggio più documentati in letteratura

Qualsiasi sia la metodologia scelta, tanto il BNP quanto l'NT-proBNP sono utilizzabili quali *markers biochimici di disfunzione cardiaca*.

I rispettivi vantaggi sono:

- **BNP**
 - più stretta relazione tra attività biologica ed immunologica
 - concentrazione plasmatica più sensibile alle variazioni acute (emodialisi, attività fisica, risposta più pronta alla terapia)

- **NT-proBNP**
 - livelli circolanti più elevati e più stabili nel tempo
 - minore degradazione in vitro