
BC

biochimica clinica

**IN QUESTO NUMERO:
TROPONINE CARDIACHE: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE**

Guest Editors: Aldo Clerico, Martina Zaninotto



*SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di
International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)*



sommario



EDITORIALE

S5

Troponine cardiache: attualità analitiche e prospettive di applicazioni cliniche
A. Clerico, M. Zaninotto, MS. Graziani

RASSEGNE

S8

Le troponine I e T sono biomarcatori cardiaci interscambiabili?
S. Storti, M. Zaninotto, V. Musetti, S. Masotti, A. Padoan, C. Prontera, M. Plebani, A. Clerico

S17

La misura combinata dei biomarcatori cardio-specifici è utile nei pazienti con sospetto di malattie cardiovascolari
C. Passino, M. Zaninotto, S. Masotti, V. Musetti, A. Padoan, M. Perrone, C. Prontera, M. Plebani, A. Clerico

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

S32

Calcolo e valutazione dei valori di riferimento della troponina cardiaca I (cTnI) misurata in un gruppo di volontari sani italiani con metodi immunometrici ad alta sensibilità: uno studio multicentrico

Studio promosso dal Gruppo di Studio Inter-Societario dei Marcatori Cardiaci della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) e dalla Sezione Italiana della European Ligand Assay Society (ELAS).

A. Clerico, M. Zaninotto, S. Masotti, V. Musetti, A. Ripoli, A. Padoan, R. Aloe, S. Rizzardi, R. Dittadi, C. Carrozza, L. Belloni, M. Perrone, T. Fasano, M. Correale, C. Prontera, S. Storti, C. Guiotto, M. Migliardi, S. Bernardini, M. Plebani

S48

Impatto epidemiologico della patologia ischemica del miocardio in Italia
G. Lippi, C. Mattiuzzi, C. Bovo, G. Cervellin

S54

Metodo ad alta sensibilità per la misura della troponina I ed efficienza: risultati di un'esperienza
Al. Leahu, MM. Mion, A. Padoan, M. Zaninotto, M. Plebani

S59

Troponina cardiaca ad alta sensibilità: risultati preliminari di un confronto tra un nuovo strumento "point-of-care" e i più comuni analizzatori impiegati nei laboratori clinici
MM. Mion, L. Baldin, A. Padoan, V. Polesello, R. Dittadi, M. Zaninotto, P. Carraro, M. Plebani

OPINIONI

S67

Patologie cardiovascolari e troponine cardiache: la storia di un legame indissolubile
M. Zaninotto, A. Clerico, M. Plebani

S74

Le troponine cardiache nelle amiloidosi sistemiche
J. Ripepi, G. Palladini

S79

Considerazioni relative alla tecnica statistica del bootstrap
M. Vidali

DOCUMENTI SIBioC

S86

Valutazione del rischio cardiovascolare e del danno cardiaco asintomatico nella popolazione generale utilizzando la misura della troponina cardiaca con metodi ad alta sensibilità

Documento del Gruppo di Studio Inter-societario sui Biomarcatori Cardiaci

N. Aspromonte, M. Zaninotto, A. Padoan, V. Musetti, S. Masotti, C. Prontera, M. Perrone, C. Passino, M. Plebani, A. Clerico

sommario

CASI CLINICI

S97

Interferenza da anticorpi eterofili e anti fosfatasi alcalina in un paziente sottoposto ad intervento cardiocirurgico di David
F. Balboni, M. Biagioli, V. Comito, S. Rapi, M. Vannucci



CORSI FAD ECM SIBioC 2020

CORSO BASE DI COAGULAZIONE PARTE I: FISIOLOGIA DELL'EMOSTASI, METODOLOGIE DI INDAGINE, CONTROLLO DI QUALITÀ

Benedetto Morelli

18 crediti ECM

CORSO BASE DI COAGULAZIONE PARTE II: I TEST DI SCREENING DELL'EMOSTASI

Benedetto Morelli

18 crediti ECM

COME SI SCRIVE UN CONTRIBUTO SCIENTIFICO

Maria Stella Graziani

18 crediti ECM

VARIABILI PREANALITICHE IN MEDICINA DI LABORATORIO

Davide Giavarina, Graziella Bonetti

12 crediti ECM

*Altri corsi FAD ECM provider SIBioC
sono in fase di realizzazione*

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

Rivista della Società Italiana di Biochimica Clinica
e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio
membro di

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

Biochimica Clinica è indicizzata in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) e ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)
Biochimica Clinica is indexed in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) and ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)

Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

Deputy Director

Martina Zaninotto

Associate Editors

Ferruccio Ceriotti
Davide Giavarina
Bruna Lo Sasso
Giampaolo Merlini
Martina Montagnana
Andrea Mosca
Paola Pezzati
Rossella Tomaiuolo
Matteo Vidali

International Advisory Board

Khosrow Adeli *Canada*
Sergio Bernardini *Italy*
Marcello Ciaccio *Italy*
Eleftherios Diamandis *Canada*
Philippe Gillery *France*
Kjell Grankvist *Sweden*
Hans Jacobs *The Netherlands*
Eric Kilpatrick *UK*
Magdalena Krintus *Poland*
Giuseppe Lippi *Italy*
Mario Plebani *Italy*
Sverre Sandberg *Norway*
Ana-Maria Simundic *Croatia*
Tommaso Trenti *Italy*
Cas Weykamp *The Netherlands*
Maria Willrich *USA*
Paul Yip *Canada*

Editorial Secretary

Arianna Lucini Paioni
biochimica.clinica@sibioc.it
Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
Tel. 0245498282
Fax 0245498199
www.bc.sibioc.it

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

Biomedica srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
www.biomedica.net

SIBioC Executive Board 2020-2021

Fiamma Balboni
Umberto Basile
Sergio Bernardini *Past President*
Ciriaco Carru
Giorgio Da Rin
Giuseppe Lippi
Martina Montagnana
Gavino Napolitano
Enza Pavanello
Laura Sciacovelli *Presidente*
Tommaso Trenti

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282



utilizza un Sistema di
Gestione Qualità Certificato
per l'attività di

Fornitura di
servizi per la progettazione,
realizzazione e distribuzione di prodotti editoriali

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

Abbonamento annuo
Euro 50 per Italia/Privati
Euro 75 per Italia/Enti
Euro 75 per Estero/Privati
Euro 90 per Estero/Enti

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

Spedizione in abbonamento postale
D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004
n. 46) art. 1, comma 1, LO/MI

Associato all'USPI
Unione Stampa
Periodica Italiana
Tiratura di questo
numero 2000 copie
2000 copies of this
issue have been printed
ISSN 0393-0564



L'utilizzo degli estratti dei lavori pubblicati è
consentito esclusivamente per uso personale
e non può essere in alcun modo esteso ad
altri impieghi (commerciali, pubblicitari, ecc).
La SIBioC - Medicina di Laboratorio si riserva
di perseguire eventuali utilizzi impropri.

Volume 44
Special Supplement 1

Troponine cardiache: attualità analitiche e prospettive di applicazioni cliniche

Aldo Clerico¹, Martina Zaninotto², Maria Stella Graziani³

¹Fondazione CNR Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Unità Operativa Complessa, Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, Padova

³Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

La misura delle troponine specifiche cardiache (cTnI) e T (cTnT) con metodi ad alta sensibilità (hs) ha cambiato nel corso degli ultimi 10 anni la conoscenza della fisiopatologia della necrosi ischemica miocardica, come pure dell'algoritmo per la diagnosi differenziale delle patologie cardiovascolari e per il monitoraggio dei pazienti con sindrome coronarica acuta (1,2). Inoltre, un numero progressivamente crescente di evidenze sta dimostrando che la misura delle troponine con metodi ad alta sensibilità (hs-cTn) è in grado di evidenziare precocemente un danno cardiaco in soggetti ancora asintomatici. I risultati di questi studi suggeriscono quindi la necessità di uno screening su larga scala nella popolazione generale per identificare i soggetti a più alto rischio di sviluppare a breve termine un danno cardiaco e, successivamente, una disfunzione ventricolare progressiva (3).

Come è noto, tutte le linee guida internazionali recentemente pubblicate, (1,2) raccomandano di eseguire la misura delle troponine cardiache con metodi ad alta sensibilità in tutti i pazienti con sospetto di danno cardiaco, e per tale motivo non solo i professionisti della Medicina di Laboratorio, ma anche i Clinici devono conoscere le caratteristiche e le prestazioni analitiche di questi metodi per poter interpretare correttamente i risultati. Infatti, il documento emanato nel 2018 dalle Società Internazionali AACC e IFCC (4) raccomanda esplicitamente che le Società Scientifiche di Medicina di Laboratorio si facciano carico non solo di fare da collegamento tra il Laboratorio e la Clinica per favorire un più appropriato uso ed una migliore interpretazione dei metodi hs-cTn, ma anche di promuovere studi *ad hoc* per migliorare e condividere le conoscenze scientifiche sulle prestazioni analitiche, le applicazioni fisiopatologiche e l'efficienza ed efficacia cliniche di questi metodi.

In accordo con queste raccomandazioni (4), il Gruppo di Studio dei Biomarcatori Cardiaca delle Società SIBioC ed ELAS-Italia, in collaborazione con la Associazione Nazionale dei Medici Cardiologi Ospedalieri (ANMCO), ha promosso fin dal 2017 alcuni studi collaborativi per valutare in maniera accurata e confrontare tra loro in modo oggettivo ed armonizzato, sia le prestazioni analitiche che i risultati clinici dei nuovi metodi hs-cTn che negli anni più recenti sono stati messi a disposizione dei laboratori clinici italiani.

Considerata l'importanza dell'argomento e la necessità di condividere le conoscenze in questo specifico ambito diagnostico, si è ritenuto importante dedicare un numero monografico di Biochimica Clinica a questo tema. La monografia si propone di riassumere e rendere facilmente fruibile a tutti i soci i risultati del grande lavoro condotto in questi anni anche grazie alla istituzione di gruppi di lavoro intersocietari.

Il numero monografico si apre con due interessanti rassegne a cura di Passino et al e di Storti et al. che affrontano rispettivamente i vantaggi dell'utilizzo combinato di due biomarcatori cardiaci (troponine e peptidi natriuretici) che, valutando differenti aspetti fisiopatologici possono consentire una precoce ed efficace identificazione dei pazienti con sospetto di malattia cardiovascolare (5) ed il vitale problema se le caratteristiche biologiche ed analitiche delle due troponine cardiache I e T permettano di considerare questi due biomarcatori interscambiabili (6). Nella sezione dei contributi scientifici, Lippi et al (7) descrivono l'impatto epidemiologico della patologia ischemica in Italia conseguente all'utilizzo delle troponine e dei metodi ad alta sensibilità, fornendo in questo modo un quadro della rilevanza numerica della patologia nel nostro paese. Segue poi un articolo che riporta i risultati di uno studio multicentrico intersocietario a cura di Clerico et al (8) che risulta di particolare interesse, anche pratico, per il significativo numero di centri italiani coinvolti e che consente, grazie al numero rilevante di campioni analizzati, di calcolare valori di riferimento affidabili per la hs-cTnI misurata con i metodi oggi commercialmente disponibili. Tra i contributi originali vanno segnalati due altri studi che riportano le esperienze di alcuni laboratori italiani relativamente alla implementazione clinica dei nuovi metodi hs-cTn (9,10) di Leahu et al e Mion et al. Il primo (9), utilizzando un

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona, E-mail maria.stella@graziani.eu

Ricevuto: 23.03.2020

Revisionato: 23.03.2020

Accettato: 25.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.032

interessante approccio, riporta i risultati di efficienza ottenuti con l'adozione dei metodi hs in Pronto Soccorso. Di particolare interesse, sono i dati di valutazione contenuti nel secondo studio (10) sulle prestazioni analitiche di un nuovo metodo POCT che viene classificato ad alta sensibilità, e che per ora rappresenta l'unico disponibile in commercio, in confronto alle prestazioni dei metodi più utilizzati e noti, applicati alle piattaforme automatizzate. A completamento della parte più prettamente tecnica, sono pubblicate in questa monografia, alcune opinioni che si prefiggono lo scopo di introdurre evidenze e riflessioni relative non solo alle applicazioni cliniche più diffuse dei metodi hs-cTn che riguardano le patologie cardiovascolari e l'evoluzione nel tempo dell'approccio biochimico alla diagnosi di queste condizioni, a cura di Zaninotto et al (11), ma anche utilizzi specifici e specialistici quali per esempio la rilevazione precoce del danno cardiaco in pazienti con amiloidosi sistemica, una patologia spesso misconosciuta, soprattutto nel paziente anziano, di Ripepi et al. (12). Nella sezione Documenti SIBioC viene pubblicato un importante documento ufficiale emanato dal Gruppo di Studio Intersocietario sui Biomarcatori Cardiaci che ha lo scopo di puntualizzare lo stato dell'arte dei metodi di misura, come pure di dare risposte ai numerosi quesiti analitici e clinici che l'utilizzo di hs-cTn pone a tutta la comunità scientifica e di professionisti clinici e di laboratorio (13).

E' peraltro evidente da quanto finora detto, che solo una profonda conoscenza analitica ed un continuo ed instancabile monitoraggio delle prestazioni dei metodi di misura possono consentire applicazioni cliniche delle troponine sempre più sfidanti; per questo motivo risulta interessante la presentazione di Balboni et al (14) di un caso clinico paradigmatico che descrive come la presenza di autoanticorpi o di anticorpi eterofili, nei campioni dei pazienti possa interferire in modo diverso nei diversi metodi di misura dimostrando come solo il continuo e costante dialogo tra clinica e laboratorio sia dirimente per la sicurezza del paziente.

Infine, poiché come è noto, in tutte le linee-guida cliniche e biochimiche pubblicate dall'anno 2000 in poi, viene posto come criterio decisionale per stabilire la presenza di un danno cardiaco, una concentrazione di troponina superiore al 99° percentile dei valori osservati in una popolazione di riferimento, vale la pena di segnalare l'articolo di Vidali M (15) che commentando il già citato contributo sperimentale sul calcolo dei valori di riferimento (8), approfondisce un aspetto certamente specialistico, ma assai importante dal punto di vista dell'interpretazione dei risultati ottenuti con i metodi hs-cTn, e cioè il metodo statistico corretto per il calcolo del 99° percentile nella popolazione di riferimento. Comprendere le limitazioni riguardanti il calcolo di questo parametro è di vitale importanza perché il valore del 99° percentile URL rappresenta la soglia decisionale e quindi il punto di partenza per la diagnosi ed il trattamento di ogni malattia cardiovascolare come pure per la stratificazione del rischio di sviluppo di cardiopatia in alcune popolazioni di pazienti a maggior rischio oltre che nella popolazione generale. Una mancata conoscenza, applicazione ed armonizzazione tra gli studi del metodo di calcolo corretto potrebbe introdurre un ulteriore problema di discordanza tra i risultati ottenuti con i diversi metodi di misura che si tradurrebbe alla fine in una scorretta classificazione dei pazienti, con gravi e imprevedibili rischi di inappropriato o mancato monitoraggio e trattamento dei pazienti stessi.

Ci auguriamo che la diversa tipologia dei contributi della monografia nonché la loro rilevanza contribuisca ad accrescere nei lettori di Biochimica Clinica la consapevolezza della importanza di una corretta gestione di questi biomarcatori sia sul versante puramente tecnico-analitico che relativamente alla interpretazione dei risultati e alla connessione con la clinica. Solo la sinergia tra questi diversi aspetti potrà condurre all'adozione all'interno del laboratorio di una strategia ottimale nell'utilizzo delle troponine cardiache, assicurando così al paziente il migliore esito.

Con questo auspicio, auguriamo a tutti una piacevole lettura.

BIBLIOGRAFIA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
2. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
3. Passino C, Aimo A, Masotti S, et al. Cardiac troponins as biomarkers for cardiac disease. *Biomark Med* 2019;13:325-30.
4. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
5. Passino C, Zaninotto M, Masotti S, et al. La misura combinata dei biomarcatori cardio-specifici è utile nei pazienti con sospetto di malattie cardiovascolari. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S17-S31.
6. Storti S, Zaninotto M, Musetti V, et al. Le troponine I e T sono biomarcatori cardiaci interscambiabili? *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S8-S16.

7. Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, et al. Impatto epidemiologico della patologia ischemica del miocardio in Italia. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S48-53.
8. Clerico A, Zaninotto M, Masotti S et al. Calcolo e valutazione dei valori di riferimento della troponina cardiaca I (cTnI) misurata in un gruppo di volontari sani italiani con metodi immunometrici ad alta sensibilità: uno studio multicentrico. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S32-S47.
9. Leahu I, Mion MM, Padoan A et al. Metodo ad alta sensibilità per la misura della troponina I ed efficienza: risultati di un'esperienza. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S54-S58.
10. Mion MM, Baldin L, Padoan A, et al. Troponina cardiaca ad alta sensibilità: risultati preliminari di un confronto tra un nuovo strumento "point-of-care" e i più comuni analizzatori impiegati nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S59-66.
11. Zaninotto M, Clerico A, Plebani M. Patologie cardiovascolari e troponine cardiache: la storia di un legame indissolubile. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S67-S73.
12. Ripepi J, Palladini G. Contributo delle troponine cardiache alla gestione del paziente con amiloidosi cardiaca. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S74-S78.
13. Aspromonte N, Zaninotto M, Padoan A et al. Valutazione del rischio cardiovascolare e del danno cardiaco asintomatico nella popolazione generale utilizzando la misura della troponina cardiaca con metodi ad alta sensibilità. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S86-S96.
14. Balboni F, Biagioli T, Comito V. et al. Interferenza da anticorpi eterofili e antifosfatasi alcalina in un paziente sottoposto ad intervento cardiocirurgico di David. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S97-S100.
15. Vidali M. Considerazioni relative alla tecnica statistica del bootstrap: *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S79-S85.

Le troponine I e T sono biomarcatori cardiaci interscambiabili?

Simona Storti¹, Martina Zaninotto², Veronica Musetti¹, Silvia Masotti¹, Andrea Padoan², Concetta Prontera¹, Mario Plebani², Aldo Clerico¹

¹Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Ospedale del Cuore, Massa, e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale, Università di Padova

ABSTRACT

Are troponin I and T interchangeable biomarkers?

The most recent international guidelines recommend that high-sensitivity (hs) methods should be preferred for the measurement of cardiac troponin I (cTnI) and T (cTnT) for the detection of myocardial injury and the differential diagnosis of acute coronary syndromes. Furthermore, these guidelines state that there is no significant difference in accuracy among hs cTnI and cTnT methods for diagnosis of acute myocardial infarction. Myocardial injury is a prerequisite for the diagnosis of acute myocardial infarction, but it is also a distinct entity. The 2018 Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction states that myocardial injury is detected when at least one value above the 99th percentile upper reference limit is measured in a patient by high-sensitivity methods for cTnI or cTnT. Occasionally, discrepancies between hs-cTnI and hs-cTnT test results can be found, when tested in the same blood sample. Several studies have reported discrepancies between hs-cTnI and hs-cTnT test results in some clinical conditions (especially chronic neuromuscular diseases) or even in apparently healthy subjects. This review, summarizes and discusses the biochemical, pathophysiological and analytical possible mechanisms causing discrepancies between hs-cTnI and hs-cTnT test results.

INTRODUZIONE

Le troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) sono i biomarcatori di scelta per la diagnosi differenziale delle sindromi coronariche acute (SCA) (1-3). Le linee guida (1-3), in accordo con le evidenze di moltissimi studi clinici (4-21), sono sostanzialmente d'accordo che entrambe le troponine permettano ai clinici di porre una diagnosi corretta di infarto acuto del miocardio (IMA), utilizzando opportuni algoritmi diagnostici. Tuttavia, bisogna considerare che la cTnI e la cTnT sono proteine che hanno caratteristiche biochimiche, espressione genica, cinetiche di rilascio dai miocardiociti e nella circolazione sanguigna, ed azioni fisiologiche completamente differenti (Tabella 1) (22-28). Inoltre, i metodi di misura presentano caratteristiche e prestazioni analitiche diverse (Tabella 2) (29). Quindi, almeno teoricamente, appare giustificato il dubbio che, in alcune specifiche condizioni cliniche, le prestazioni delle due

troponine non siano completamente assimilabili. In effetti, alcuni studi hanno evidenziato come le determinazioni della cTnI e della cTnT possono talvolta fornire risultati discrepanti in alcune condizioni cliniche specifiche (ad esempio, malattie neuro-muscolari congenite e miopatie infiammatorie croniche) o in alcuni campioni che presentano sostanze capaci di interferire nei sistemi immunometrici utilizzati per la misura delle due troponine (27).

Lo scopo di questa rassegna è valutare se effettivamente la misura delle due troponine fornisca sempre informazioni fisiopatologiche e cliniche equivalenti; oppure se, al contrario, il clinico debba essere informato sul fatto che in alcuni soggetti/pazienti con specifiche condizioni cliniche o che presentano in circolo sostanze interferenti, si possa riscontrare una discrepanza tra i risultati ottenuti con i metodi immunometrici utilizzati per la determinazione delle due troponine.

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 41, 56126 Pisa.

Ricevuto: 16.10.2019

Revisionato: 17.10.2019

Accettato: 02.11.2019

Publicato on-line: 15.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.005

Tabella 1

Caratteristiche biochimiche, cinetica e attività fisiologica delle troponine cardiache I e T.

Troponina	Peso molecolare*	Gene	Proteina*	Attività biologica	Cinetica in vivo
cTnI	24 kDa	gene TNN13 cromosoma 19 (19q13.4)	209 aa	regola l'attività contrattile della miofibrilla cardiaca	più veloce
cTnT	35,9 kDa	gene TNNT2 cromosoma 1(1q32.3)	287 aa	lega e fissa le tre troponine alla troponiosina e actina	più lenta, di tipo bifasico in alcuni pazienti con IMA

I dati riportati in Tabella sono ricavati dalle voci bibliografiche (20,25).

* I dati si riferiscono alla proteina matura (25).

aa, aminoacidi; IMA, infarto acuto del miocardio

Tabella 2

Parametri di sensibilità analitica di alcuni metodi per la misura delle troponine cardiache I e T distribuiti in Italia dopo l'anno 2016.

Metodi	LoB (ng/L)	LoD (ng/L)	LoQ 20% CV (ng/L)	LoQ 10% CV (ng/L)	Ratio
cTnI					
Architect	0,7	1,3	1,8	4,7	5,6
Access Dxl	0,6	1,3	2,1	5,3	3,3
ADVIA XPT	1,0	2,2	3,5	8,4	5,6
cTnT					
ECLIA	3	3-5	6	13	1,3

I valori riportati sono stati valutati in un laboratorio di riferimento (Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa, Italy). Il valore Ratio rappresenta il rapporto tra il valore del 99° percentile URL suggerito dal produttore e il valore di LoQ 10%CV misurato in laboratorio.

Architect: metodo Architect highly Sensitive TnI per la piattaforma Architect i1000SR (Abbott Diagnostics, Ref. B3P250).

Access Dxl: Access hsTnI per la piattaforma Dxl (REF B52699, Beckman Coulter, Inc. Brea, CA 92821 USA).

ADVIA: ADVIA Centaur High-Sensitivity Troponin I (TNIH) (Ref. 10994774-5) per la piattaforma Centaur XPT (Siemens Healthineers, Milano, Italy).

ECLIA: metodo ECLIA Elecsys Troponin T hs per le piattaforme Elecsys e Cobas (Roche Diagnostics, Monza, Italy).

LoB, bianco del metodo; LoD, limite di misura; LoQ 20% CV, valore di quantificazione al 20% di CV; LoQ 10% CV, valore di quantificazione al 10% di CV;

POSSIBILE DISCREPANZA TRA I RISULTATI CLINICI DELLA DETERMINAZIONE DELLE TROPONINE I E T NELLA PRATICA CLINICA

Diagnosi differenziale delle sindromi coronariche acute (SCA)

Le linee guida internazionali raccomandano come valore soglia il 99° percentile URL (Upper Reference Limit) della distribuzione dei valori di troponina, preferibilmente misurati nella popolazione di riferimento con metodi ad alta sensibilità (high-sensitivity, hs) (1-3). Infatti, molti studi hanno dimostrato che, in istituzioni cliniche ad elevata specializzazione, è possibile effettuare il rule-in/rule-out dell'infarto miocardico acuto (IMA) nella maggioranza dei casi con algoritmi che valutano cinetiche

di rilascio anche minori di tre ore, come raccomandato dalle linee guida (1,4-18). Inoltre, è possibile escludere la presenza di IMA con ottima confidenza statistica utilizzando anche il solo prelievo all'ammissione al Pronto Soccorso, se il valore di hs-cTnI o cTnT risulta inferiore alla sensibilità del metodo e la sintomatologia è iniziata alcune ore prima (10,11,13,17,18). Considerando l'importante quantità di dati, si dovrebbe assumere che la misura delle due troponine di fatto fornisca equivalenti risultati clinici, almeno per quanto concerne la diagnosi di IMA (17,19-21). Anche considerando i soli pazienti con IMA di Tipo 1 (3), è stato però riportato che la cinetica delle due troponine è differente in pazienti con SCA-STEMI (cioè con sopra-slivellamento del tratto ST all'ECG) sottoposti ad intervento di rivascolarizzazione per mezzo di angioplastica intra-coronarica (30,31). Infatti, la misura

con il metodo cTnT presenta una cinetica più lenta e di tipo bifasico dopo l'intervento di angioplastica intracoronarica, mentre quella della cTnI è più veloce e simile a quella della CK-MB (26-28). Questi dati dimostrano che si possono effettivamente riscontrare delle differenze di comportamento tra le due troponine, dovuto molto probabilmente ad un rilascio più lento della cTnT dalle miofibrille e/o a una degradazione più lenta in circolo rispetto alla cTnI (26-28,30,31).

Danno miocardico e valutazione del rischio cardiovascolare

Il documento Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (3) pone in primo piano la "certificazione" della presenza di un danno cardiaco (myocardial injury), che assume, quindi, una valenza non solo clinica, ma anche anatomopatologica e medico-legale. Di fatto, si raccomanda al clinico di eseguire la misura della cTnI o cTnT, preferibilmente con metodi hs-cTn, in tutti i soggetti/pazienti in cui vi sia un sospetto di malattia cardiovascolare, e, inoltre, in presenza di un valore di hs-cTn al di sopra del 99° percentile URL, stabilire la condizione clinica (acuta o cronica) che ha causato il danno (3,32). Molti studi hanno dimostrato come solo una minoranza (circa il 30%) dei soggetti/pazienti ammessi al Pronto Soccorso con sospetto di SCA e con un valore di hs-cTnI sopra il 99° percentile URL presenta un IMA di Tipo 1 o 2 (1,2,21,26,33).

Solamente dopo l'anno 2006, con l'introduzione della prima generazione di metodi per la misura di cTnI e cTnT con una aumentata sensibilità analitica, è stato possibile misurare i livelli di questi biomarcatori non solo in pazienti con malattie cardiache ed extra-cardiache, ma anche nei soggetti "sani", arruolati nella popolazione generale (29,34). Utilizzando metodi hs-cTn, molti studi (35-49), comprese tre meta-analisi (50-52), hanno, quindi, potuto dimostrare come il rischio cardiovascolare tenda progressivamente ad aumentare con l'incremento dei valori di concentrazione del biomarcatore nei soggetti apparentemente sani di entrambi i sessi, anche per valori di cTnI e cTnT inferiori al 99° percentile URL. In particolare, un recente studio ha dimostrato che i soggetti della popolazione generale, inclusi nell'ultimo terzile della distribuzione dei valori di hs-cTnI (i.e. >10 ng/L per le donne e >12 ng/L per gli uomini), presentano un rischio di mortalità significativamente maggiore (di circa il 35%) di coloro che hanno concentrazioni del biomarcatore nel primo terzile (valori di hs-cTnI <4 ng/L per le donne e <6 ng/L per gli uomini) (48).

Queste rilevanti evidenze sperimentali e cliniche (35-52) dimostrano che i metodi hs permettono di evidenziare nella popolazione generale gli individui, con valori di hs-cTnI appena superiori al 99° percentile URL, che potrebbero essere considerati falsi positivi, ma che invece presentano un danno miocardico (3). In accordo con le linee guida (3), tutti i soggetti che presentano anche un solo valore di hs-cTnI al di sopra del 99° percentile URL devono essere accuratamente valutati

dal punto di vista clinico e deve essere anche accertata la possibile causa del danno cardiaco.

Dal punto di vista clinico, è importante sottolineare come le troponine cardiache, misurate con metodi ad alta sensibilità, si proponano attualmente come biomarcatori di prima scelta per l'identificazione, nella popolazione generale, di soggetti asintomatici a rischio di sviluppare, a medio termine, lo scompenso cardiaco. Infatti, considerata la relativamente bassa variabilità intra-individuale (circa 9%), rispetto a quella inter-individuale (circa 50%) dei valori misurati (53), e le ottime prestazioni analitiche dei metodi hs-cTnI (29) è teoricamente prevedibile l'applicazione di protocolli sperimentali basati sulla misura in serie delle hs-cTnI nel corso di alcuni mesi per mettere in evidenza nella popolazione generale gli individui apparentemente sani più a rischio di sviluppare uno scompenso cardiaco sintomatico nel breve-medio termine.

Evidentemente, uno screening riguardante la popolazione generale e quindi anche soggetti apparentemente sani, amplierebbe notevolmente lo spettro di utilizzo delle troponine cardiache, che ora sono soprattutto utilizzate nella pratica clinica per la diagnosi di differenziale delle SCA. A differenza di questa, che si fonda sulla cinetica e quindi sulla misurazione del biomarcatore in almeno due prelievi effettuati in serie sullo stesso soggetto nell'arco di alcune ore, la valutazione della presenza del danno miocardico si effettua su una sola determinazione (3). Le probabilità di misclassificazione sono notevoli, considerate le limitazioni riguardanti il calcolo statistico e la relativa interpretazione clinica del valore del 99° percentile URL, che è il valore soglia da considerare per la determinazione della presenza del danno miocardico (2,21,34).

POSSIBILI CAUSE DI MISCLASSIFICAZIONE DI DANNO MIOCARDICO CON LA MISURA DELLE TROPONINE CARDIACHE

Considerando che generalmente per la hs-cTnI si utilizzano dei valori soglia (99° percentile URL) differenziati per il sesso, mentre per la cTnT vi è un solo valore discriminante, le possibilità di diversa classificazione dei soggetti/pazienti che possono presentare (o no) un danno miocardico diventano notevoli, quando si confrontano i risultati di un metodo hs-cTnI con quelli del metodo cTnT.

Come esempio, si riportano alcuni dati raccolti in un laboratorio di riferimento (Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa e Massa). Se si considera nel suo insieme l'ampio intervallo di valori che si riscontrano nella pratica clinica per le due troponine, che copre almeno 5 ordini di grandezza (da 0 fino a circa 100 000 ng/L), si evidenzia che i valori misurati con i metodi hs-cTnI e cTnT risultano ben correlati tra loro (utilizzando la trasformato log-10 dei valori originali) (Figura 1). Tuttavia, come discusso in un recente documento del Study Group on Biomarkers in

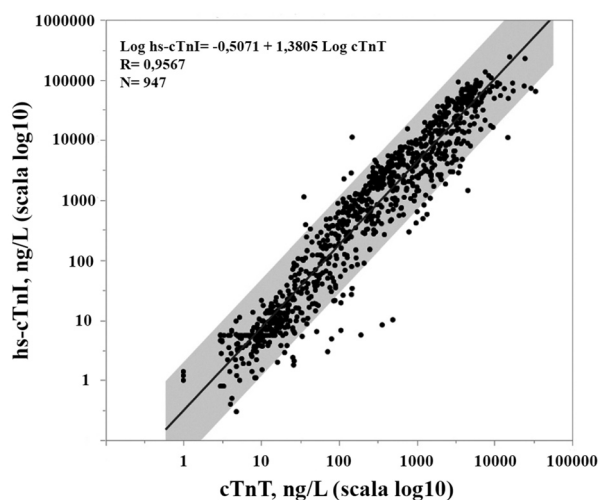


Figura 1

Regressione lineare tra i valori di cTnT (asse delle ascisse), misurata con il metodo ECLIA, e di hs-cTnI (asse delle ordinate), misurata con il metodo Architect. La zona grigia rappresenta la stima dei valori intorno alla regressione (intervallo di confidenza 95%). Per il calcolo della regressione sono state utilizzate le trasformate logaritmiche in base 10 dei valori originali. Nella figura sono riportati: l'equazione della regressione ottenuta, il valore del coefficiente di correlazione (R) e la numerosità del campione.

Cardiology della European Society of Cardiology (ESC), confrontando più a fondo i risultati si possono riscontrare delle discrepanze tra i valori misurati delle due troponine (54). Sfortunatamente, al momento non vi sono studi che abbiano espressamente valutato l'importante quesito clinico se le due troponine si comportino in maniera simile (non-significativamente differente) nella valutazione del danno cardiaco nella popolazione generale. La maggior parte degli studi pubblicati comprende infatti valutazioni effettuate su popolazioni non molto numerose di pazienti con specifiche condizioni cliniche, soprattutto malattie congenite neuro-muscolari degenerative o severe miopatie infiammatorie idiopatiche (localizzate alla sola muscolatura scheletrica o sistemiche) (54,55).

In accordo con altri Autori (26-28,31,54), si possono fornire alcune spiegazioni per queste discrepanze tra metodi:

- vi sono delle differenze di cinetica che riguardano sia il rilascio dai miocardiociti che la circolazione delle due diverse troponine cardiache;
- la cTnT può risultare elevata anche in alcune patologie croniche che coinvolgono il muscolo scheletrico;
- vi sono sostanze presenti nel campione che possono interferire solo con alcuni metodi;
- il valore soglia per alcuni metodi potrebbe essere stato calcolato in modo erroneo (sopra o sottostimato).

Differente espressione genica delle due troponine

Molti studi, sia sperimentali che clinici hanno riportato che la cTnT, in alcune specifiche condizioni cliniche, può essere espressa anche nel muscolo scheletrico dopo la nascita (56-62). In particolare, può essere espressa anche nei miocardiociti di pazienti con malattie congenite neuro-muscolari o malattie croniche infiammatorie del muscolo scheletrico, soprattutto su base autoimmunitaria, per cui si possono riscontrare, in questi casi, aumentati valori di cTnT, ma non di hs-cTnI (56-62). Dal punto di vista clinico, rilevare un danno cardiaco in pazienti con severe miopatie croniche aumenta significativamente il rischio di mortalità anche nel breve-medio termine (63,64). Recentemente, alcuni Autori (64) hanno proposto l'utilizzo della misura della hs-cTnI (ma non della cTnT) insieme con tecniche non invasive (ECG, ecocardiografia, risonanza magnetica) e perfino invasive (come la biopsia miocardica) per determinare il più precocemente possibile la presenza di un impegno miocardico in pazienti con malattie idiopatiche infiammatorie croniche dell'apparato scheletrico.

Sostanze interferenti

Molte sostanze possono alterare la misura di cTnI o cTnT interferendo direttamente con la reazione antigene-anticorpo del saggio immunometrico (54,55,65). Questo tipo di interferenza è generalmente metodo-specifico, per cui può essere evidenziata eseguendo misure dello stesso campione con metodi differenti (66).

La presenza nel campione di auto-anticorpi contro la proteina cTnI è una delle cause più frequenti di interferenza in questi metodi. La presenza di anticorpi anti-cTnI (generalmente della classe IgG delle immunoglobuline) è riportata con una prevalenza variabile dal 5% al 20% nei vari studi (67-69). Sono stati riportati autoanticorpi contro gli epitopi presenti lungo tutta la catena amino-acidica della cTnI, anche se quelli contro la porzione centrale più stabile della proteina sono più frequenti, seguiti da quelli contro la porzione C-terminale (68). Gli autoanticorpi si formano soprattutto in pazienti con malattie auto-immunitarie sistemiche (54,67-69). In genere la presenza di auto-anticorpi genera una sottostima della misura della troponina (65,67-69). Tuttavia, alcuni autoanticorpi possono legare le troponine e quindi impedirne la degradazione ed aumentare la concentrazione in circolo del biomarcatore (55,70-73). La presenza di questi macro-complessi può interferire, anche se in varia misura, con i metodi per la misura delle troponine, causando elevati valori della concentrazione del biomarcatore (73). La presenza del macro-complesso di troponina in un campione di plasma/siero si dimostra per mezzo di tecniche cromatografiche (70-73).

La biotina ha la capacità di formare legami ad alta affinità con la streptavidina (ed in misura minore) con

l'avidina, che sono componenti essenziali di molti sistemi immunometrici, sia competitivi che non-competitivi (74-79). Alcuni metodi immunometrici non competitivi per la misura di cTnI e cTnT utilizzano il legame della biotina con la streptavidina/avidina per amplificare il segnale di misura (74-79). La presenza di livelli elevati di biotina nel campione plasmatico da misurare con questi metodi immunometrici non competitivi causano, quindi, una riduzione del segnale e di conseguenza anche una sottostima dei valori misurati della concentrazione di cTnI e cTnT (74-79).

Alcuni pazienti con malattie neurologiche degenerative (come la sclerosi multipla) ed anche alcuni soggetti che svolgono intensa attività sportiva possono assumere alte dosi della vitamina (da decine a centinaia mg/die) e quindi presentare valori molto elevati di biotina nel sangue. La biotina è presente anche in molte preparazioni polivitaminiche e comuni integratori alimentari in quantità di alcuni mg per compressa. Le aziende produttrici hanno in questi ultimi anni modificato i metodi immunometrici in modo da ridurre la possibilità di interferenza con la biotina. In particolare, la ditta Roche Diagnostics riporta che la biotina non interferisce in modo significativo nel nuovo metodo per la cTnT (Elecys Troponin T hs, REF 08469873190, Roche Diagnostics S.p.A., Monza), distribuito recentemente ai laboratori Europei, compresi quelli Italiani, fino alla concentrazione di 1200 ng/mL (80). Per quanto riguarda la cTnI, sia il metodo VIDAS hs-cTnI (Biomérieux Italia S.p.A, Firenze), che il metodo hs-cTnI ADVIA Centaur XPT (Siemens Healthineers Diagnostics Italia, Milano), utilizzano il sistema biotina-streptavidina per la rilevazione del segnale e quindi possono presentare interferenza da biotina. In accordo con il documento di IFCC (81), i produttori indicano una soglia di interferenza per la biotina pari a 2 000 ng/mL per il metodo VIDAS e 3 500 ng/mL per il metodo ADVIA Centaur XPT.

Valori soglia dei metodi immunometrici

Per quanto riguarda il valore soglia per l'accertamento del danno miocardico, è ben noto che età, sesso, attività fisica intensa, presenza di una malattia cardiaca asintomatica, come pure di comorbidità (renali, epatiche, endocrino-metaboliche, infiammatorie) e l'assunzione di farmaci e droghe di abuso sono tutti fattori che possono influire sui livelli circolanti di cTnI e cTnT e quindi sul calcolo del 99° percentile URL (21,34). Il valore del 99° percentile è molto sensibile alla presenza di valori outlier e pertanto i risultati possono essere diversi a seconda del metodo statistico utilizzato per il calcolo (34). Inoltre, la presenza di un numero significativo di soggetti apparentemente sani, ma con malattia cardiaca asintomatica, che presentano valori $\geq 95^\circ$ percentile della popolazione, può causare un errore anche rilevante nel calcolo del 99° percentile URL (21,34). Altro importante aspetto è che, nel caso della cTnT, l'azienda produttrice raccomanda un solo valore soglia, che è stato calcolato su una popolazione mista di entrambi i sessi (533 soggetti;

intervallo di età: 20-71 anni). Per contro, i metodi hs-cTnI utilizzano due differenti valori soglia, calcolati su due popolazioni distinte per sesso (almeno 300 individui di sesso maschile e altrettanti individui di sesso femminile), come raccomandato dalle linee guida (2,21,34). Questa differente selezione della popolazione di riferimento per il calcolo del 99° percentile URL con i differenti metodi di misura delle due troponine cardiache, potrebbe essere uno dei fattori che crea problemi di misclassificazione nella valutazione del danno miocardico.

CONSIDERAZIONI CLINICHE E PROSPETTIVE FUTURE

È evidente che un errore nella misura delle troponine, qualunque ne sia la causa, comporta sempre un possibile danno per il paziente e un aggravio di costi per il Servizio Sanitario Nazionale. In particolare, il soggetto/paziente con valori superiori al 99° percentile URL potrebbe essere sottoposto non solo ad ulteriori analisi di laboratorio, ma anche ad esami strumentali ed interventi anche invasivi, che presentano non infrequentemente effetti collaterali, richiedono il ricovero in centri specializzati, e quindi risultano molto onerosi ed impegnativi per il paziente. D'altra parte, il rilievo di un valore falso negativo, in un paziente che di fatto presenta un danno miocardico, può comportare una diagnosi clinica inaccurata e quindi un ritardo nell'inizio di una terapia appropriata con peggioramento della disfunzione cardiaca e progressione verso l'insufficienza cardiaca sintomatica.

I dati discussi in questa rassegna indicano che la misura delle due troponine può fornire risultati differenti in alcuni pazienti con IMA, e soprattutto, in soggetti in cui si valuti la presenza di danno miocardico e/o la stratificazione del rischio cardiovascolare. Purtroppo, ancora pochi studi hanno valutato le possibili cause di queste differenze utilizzando protocolli sperimentali e clinici specificatamente designati a questo scopo. Non conoscendo ancora i meccanismi fisiopatologici responsabili di questo differente comportamento delle due proteine del sarcomero, attualmente si può solo ipotizzare che in alcune condizioni cliniche la misura delle due troponine cardiache possa fornire informazioni fisiopatologiche e cliniche che potrebbero essere complementari, piuttosto che contrastanti, come invece appare dai dati, ancora insufficienti, di cui ora disponiamo, sulle forme circolanti e sulle cinetiche di rilascio e degradazione.

Recenti studi hanno evidenziato come il pool plasmatico delle troponine sia molto eterogeneo e completamente differente nei soggetti sani rispetto ai pazienti con infarto del miocardio (22-28,30,31,82-85). Forme degradate a ridotto peso molecolare di cTnI e cTnT sono fisiologicamente presenti sia nel sarcoplasma dei miocardiociti, che in circolo nei soggetti adulti sani (27,28,82). La forma di cTnI e cTnT a più elevato peso molecolare, che è la forma proteica attiva del sarcomero (Tabella 1), è invece misurabile in circolo solo nelle prime ore dopo la necrosi miocardica e viene

progressivamente e rapidamente rimpiazzata dalle forme a più basso peso molecolare, che sono prodotte dall'azione delle proteasi plasmatiche, soprattutto a livello delle porzioni COOH e NH₂-terminali delle catene amino-acidiche (22-28,30,31,82-85).

Nel soggetto che ha praticato uno sforzo fisico intenso (maratona, corsa ciclistica), le troponine presentano un picco precoce con una cinetica della durata totale di circa 24 ore, poiché il pool plasmatico è costituito soprattutto da forme degradate di origine citoplasmatica (82-86). Al contrario, nei pazienti con infarto STEMI si evidenzia tipicamente un picco nelle prime 18-24 ore e una cinetica totale di circa 5-7 giorni. Recenti studi hanno anche evidenziato che può esser presente in alcuni pazienti un danno miocardico reversibile, in cui non si avrebbe una distruzione completa della cellula e, quindi, la rottura della membrana plasmatica potrebbe essere reversibile (27,28,82). Alcuni Autori hanno anche ipotizzato che durante un danno di breve durata il miocardiocita rilascerebbe delle vescicole citoplasmatiche, oppure degli esosomi, contenenti troponine a basso peso molecolare, provenienti dal pool citoplasmatico (27,28,82). In accordo con questi studi (27,28,82), è molto probabile che in un prossimo futuro si potranno mettere a punto dei metodi specifici per misurare le varie forme circolanti e si potranno anche valutare in vivo le cinetiche differenziate delle due troponine.

Si può quindi ipotizzare che avendo a disposizione dei metodi specifici sia per la proteina sarcomerica che per le forme citoplasmatiche degradate delle troponine potremo escludere sia la presenza di un danno miocardico (per l'assenza in circolo della forma ad alto peso molecolare), e forse anche distinguere un danno reversibile dal danno irreversibile di tipo ischemico. Sono, quindi, necessari ulteriori studi basati su protocolli sperimentali e clinici specificatamente designati a valutare le possibili differenze tra i valori misurati con le due troponine, sia nei soggetti sani che nei pazienti con malattie cardiovascolari. Solo allora, utilizzando le informazioni relative sia alla misura delle varie forme circolanti sia alle differenti cinetiche di rilascio, sarà possibile dimostrare che la cTnI e cTnT sono biomarcatori che forniscono informazioni fisiopatologiche differenziate, che possono essere, quindi, utilizzate per comprendere meglio la fisiopatologia del danno miocardico reversibile ed irreversibile.

CONCLUSIONI

In accordo con le linee guida internazionali (2,21,76) e nazionali (75), i professionisti della Medicina di Laboratorio dovrebbero informare i clinici sulle caratteristiche analitiche e sulle possibili differenze dei risultati clinici riscontrabili con i metodi immunometrici per la determinazione hs-cTnI e cTnT. D'altra parte, il clinico dovrebbe informare il laboratorio tutte le volte che il valore misurato della hs-cTnI o cTnT non risulta ben correlato con il quadro clinico del paziente (2,21). Una

stretta collaborazione tra clinici e professionisti della Medicina di Laboratorio è essenziale per dirimere eventuali discrepanze tra metodi nella valutazione del danno miocardico (2,21,65,75). In genere, sono sempre necessarie determinazioni multiple e su campioni ottenuti in tempistiche diverse del soggetto/paziente per confermare che effettivamente esiste una discrepanza tra le due troponine cardiache. Inoltre, in alcuni casi, per confermare definitivamente la presenza di un danno miocardico sono indispensabili esami specialistici non invasivi (ECG, ecocardiografia, esami radiografici, risonanza magnetica) e, talora, anche invasivi (angiografia coronarica o biopsia cardiaca) (64). Come per tutti gli esami di laboratorio, la conoscenza del quadro clinico del singolo paziente e di altri esami diagnostici è necessaria per una diagnosi accurata e sicura, specialmente in un'era di "medicina di precisione".

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
2. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
4. Reichlin T, Schindler C, Drexler B, et al. One-hour rule-out and rule-in of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin T. *Arch Intern Med* 2012;172:1211-8.
5. Than M, Cullen L, Aldous S, et al. 2-Hour accelerated diagnostic protocol to assess patients with chest pain symptoms using contemporary troponins as the only biomarker: the ADA trial. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:2091-8.
6. Than M, Aldous S, Lord SJ, et al. A 2-hour diagnostic protocol for possible cardiac chest pain in the emergency department: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med* 2014;174:51-8.
7. Reichlin T, Cullen L, Parsonage WA, et al. Two-hour algorithm for triage toward rule-out and rule-in of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin T. *Am J Med* 2015;128:369-79.e4.
8. Reichlin T, Twerenbold R, Wildi K, et al. Prospective validation of a 1-hour algorithm to rule-out and rule-in acute myocardial infarction using a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *CMAJ* 2015;187:E243-52.
9. Rubini Gimenez M, Twerenbold R, Jaeger C, et al. One-hour rule-in and rule-out of acute myocardial infarction

- using high-sensitivity cardiac troponin I. *Am J Med* 2015;128:861-70.
10. Mueller C, Giannitsis E, Christ M, et al. Multicenter evaluation of a 0-hour/1-hour algorithm in the diagnosis of myocardial infarction with high-sensitivity cardiac troponin T. *Ann Emerg Med* 2016;68:76-87.
 11. Shah AS V, Anand A, Sandoval Y, et al. High-sensitivity cardiac troponin I at presentation in patients with suspected acute coronary syndrome: a cohort study. *Lancet* 2015;6736:1-8.
 12. Meller B, Cullen L, Parsonage WA, et al. Accelerated diagnostic protocol using high-sensitivity cardiac troponin T in acute chest pain patients. *Int J Cardiol* 2015;184:208-15.
 13. Boeddinghaus J, Twerenbold R, Nestelberger T, et al. Measurement of cardiac troponin for exclusion of myocardial infarction. *Lancet* 2016;387:2288.
 14. Boeddinghaus J, Reichlin T, Cullen L, et al. Two-hour algorithm for triage toward rule-out and rule-in of acute myocardial infarction by use of high-sensitivity cardiac troponin I. *Clin Chem* 2016;62:494-504.
 15. Jaeger C, Wildi K, Twerenbold R, et al. One-hour rule-in and rule-out of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin I. *Am Heart J* 2016;171:92-102.e5.
 16. Neumann JT, Sørensen NA, Schwemer T, et al. Diagnosis of myocardial infarction using a high-sensitivity troponin I 1-hour algorithm. *JAMA Cardiol* 2016;1:397.
 17. Mueller C, Giannitsis E, Möckel M, et al. Rapid rule out of acute myocardial infarction: novel biomarker-based strategies. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2017;6:218-22.
 18. Boeddinghaus J, Nestelberger T, Twerenbold R, et al. High-sensitivity cardiac troponin I assay for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2019;65:893-904.
 19. Giuliani S, Dieplinger B, Mueller T. Head-to-head comparison of three different high-sensitivity cardiac troponin assays for early rule-in and rule-out of acute myocardial infarction. *J Lab Precis Med* 2019;4:4.
 20. Lippi G, Cervellini G. Is one cardiac troponin better than the other? *J Lab Precis Med* 2019;4:19.
 21. Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, et al. IFCC Task Force on Clinical Application of Cardiac Bio-Markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin Chem* 2017;63:73-81.
 22. Katus HA, Remppis A, Scheffold T, et al. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991;67:1360-7.
 23. Wu AHB, Feng YJ, Moore R, et al. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998;44:1198-208.
 24. Bertinchant JP, Robert E, Polge A, et al. Release kinetics of cardiac troponin I and cardiac troponin T in effluents from isolated perfused rabbit hearts after graded experimental myocardial contusion. *J Trauma* 1999;47:474-80.
 25. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry* 2013;78:1447-65.
 26. Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
 27. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018;7:553-60.
 28. Mair J. What is new on cardiac troponin degradation? *J Lab Precis Med* 2019;4:4.
 29. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: A multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 30. Laugaudin G, Kuster N, Petition A. Kinetics of high-sensitivity cardiac troponin T and I differ in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary coronary intervention. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2015;5:354-63.
 31. Solecki K, Dupuy AM, Kuster N, et al. Kinetics of high-sensitivity cardiac troponin T or troponin I compared to creatine kinase in patients with revascularized acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:707-14.
 32. Valentine CM, Tchong JE, Waites T. Translating the translation. What clinicians should know about the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2668-70.
 33. Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin level elevations not related to acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:623-34.
 34. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli M, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology, and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
 35. Hussein AA, Gottdiener JS, Bartz TM, et al. Cardiomyocyte injury assessed by a highly sensitive troponin assay and sudden cardiac death in the community: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2112-20.
 36. Eggers KM, Al-Shakarchi J, Berglund L, et al. High-sensitive cardiac troponin T and its relations to cardiovascular risk factors, morbidity, and mortality in elderly men. *Am Heart J* 2013;166:541-8.
 37. Oluleye OW, Folsom AR, Nambi V, et al. ARIC Study Investigators. Troponin T, B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and cause-specific mortality. *Ann Epidemiol* 2013;23:66-73.
 38. Omland T, de Lemos JA, Holmen OL, et al. Impact of sex on the prognostic value of high-sensitivity cardiac troponin I in the general population: the HUNT study. *Clin Chem* 2015;61:646-56.
 39. Zeller T, Tunstall-Pedoe H, Saarela O, et al. High population prevalence of cardiac troponin I measured by a high-sensitivity assay and cardiovascular risk estimation: the MORGAM Biomarker Project Scottish Cohort. *Eur Heart J* 2014;35:271-81.
 40. Masson S, Agabiti N, Vago T, et al. The fibroblast growth factor-23 and Vitamin D emerge as nontraditional risk factors and may affect cardiovascular risk. *J Intern Med* 2015;277:318-30.
 41. Neumann JT, Havulinna AS, Zeller T, et al. Comparison of three troponins as predictors of future cardiovascular events: prospective results from the FINRISK and BiomaCaRE studies. *PLoS One* 2014;9:e90063.
 42. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2012;126:1596-604.
 43. Thorsteinsdottir I, Aspelund T, Gudmundsson E, et al. High-sensitivity cardiac troponin I is a strong predictor of cardiovascular events and mortality in the AGES-Reykjavik community-based cohort of older individuals. *Clin Chem* 2016;62:623-30.
 44. Blankenberg S, Salomaa V, Makarova N, et al. Troponin I

- and cardiovascular risk prediction in the general population: the BiomarCaRE consortium. *Eur Heart J* 2016;37:2428-37.
45. Hughes MF, Ojeda F, Saarela O, et al. Association of repeatedly measured high-sensitivity-assayed troponin I with cardiovascular disease events in a general population from the MORGAM/BiomarCaRE Study. *Clin Chem* 2017;63:334-42.
 46. Zhu K, Knuiman M, Divitini M, et al. High-sensitivity cardiac troponin I and risk of cardiovascular disease in an Australian population-based cohort. *Heart* 2018;104:895-903.
 47. Zellweger MJ, Haaf P, Maraun M, et al. Predictors and prognostic impact of silent coronary artery disease in asymptomatic high-risk patients with diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 2017;244:37-42.
 48. Sigurdardottir FD, Lynbakken MN, Holmen OL, et al. Relative prognostic value of cardiac troponin I and C-reactive protein in the general population (from the North-Trøndelag Health [HUNT] Study). *Am J Cardiol* 2018;121:949-55.
 49. Welsh P, Preiss D, Shah ASV, et al. Comparison between high-sensitivity cardiac troponin T and cardiac troponin I in a large general population cohort. *Clin Chem* 2018;64:1607-16.
 50. Sze J, Mooney J, Barzi F, et al. Cardiac troponin and its relationship to cardiovascular outcomes in community populations - A systematic review and meta-analysis. *Heart Lung Circ* 2016;25:217-28.
 51. Willeit P, Welsh P, Evans JDW, et al. High-sensitivity cardiac troponin concentration and risk of first-ever cardiovascular outcomes in 154,052 participants. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:558-68.
 52. van der Linden N, Klinkenberg LJ, Bekers O, et al. Prognostic value of basal high-sensitive cardiac troponin levels on mortality in the general population: a meta-analysis. *Medicine* 2016;95:e5703.
 53. van der Linden N, Hilderink JM, Cornelis T, et al. Twenty-four-hour biological variation profiles of cardiac troponin I in individuals with or without chronic kidney disease. *Clin Chem* 2017;63:1655-6.
 54. Mair J, Lindahl B, Müller C, et al. Editor's Choice-What to do when you question cardiac troponin values. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018;7:577-86.
 55. Giannitsis E, Mueller C, Katus HA. Skeletal myopathies as a non-cardiac cause of elevations of cardiac troponin concentrations. *Diagnosis* 2019;6:189-201.
 56. Aggarwal R, Lebedz-Odrobina D, Sinha A, et al. Serum cardiac troponin T, but not troponin I, is elevated in idiopathic inflammatory myopathies. *J Rheumatol* 2009;36:2711-4.
 57. Cox F, Delgado V, Verschuuren J, et al. The heart in sporadic inclusion body myositis: a study in 51 patients. *J Neurol* 2010;257:447-51.
 58. Jaffe AS, Vasile VC, Milome M, et al. Diseased skeletal muscle. A noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin T. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:1819-24.
 59. Rittoo D, Jones A, Lecky B, et al. Elevation of cardiac troponin T, but not cardiac troponin I, in patients with neuromuscular diseases. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2411-20.
 60. Hughes M, Lilleker VB, Herrick AL, et al. Cardiac troponin testing in idiopathic inflammatory myopathies and systemic sclerosis-spectrum disorders: biomarkers to distinguish between primary cardiac involvement and low grade skeletal muscle disease activity. *Ann Rheum Dis* 2015;74:795-8.
 61. Schmid J, Liesinger L, Bimer-Gruenberg R, et al. Elevated cardiac troponin T in patients with skeletal myopathies. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:1540-9.
 62. Vroemen WHM, de Boer D, Streng AS, et al. Elevated cardiac troponin T in skeletal myopathies. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:347-9.
 63. Lundegerg IE. The heart in dermatomyositis and polymyositis. *Rheumatology* 2006;45:iv18-iv21.
 64. Chen F, Peng Y, Chen M. Diagnostic approach to cardiac involvement in idiopathic inflammatory myopathies. A strategy combining cardiac Troponin I but not T assay with other methods. *Int Heart J* 2018;59:256-62.
 65. Vafaei M, Biener M, Mueller M, et al. Analytically false or true positive elevations of high sensitivity cardiac troponin: a systematic approach. *Heart* 2014;100:508-14.
 66. Clerico A, Belloni L, Carozza C, et al. A Black Swan in clinical laboratory practice: the analytical error due to interferences in immunoassay methods. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:397-402.
 67. Tang G, Wu Y, Zhao W, et al. Multiple immunoassay systems are negatively interfered by circulating cardiac troponin I autoantibodies. *Clin Exp Med* 2012;12:47-53.
 68. Savukoski T, Twarda A, Hellberg S, et al. Epitope specificity and IgG subclass distribution of autoantibodies to cardiac troponin. *Clin Chem* 2013;59:512-8.
 69. Savukoski T, Ilva T, Lund J, et al. Autoantibody prevalence with an improved immunoassay for detecting cardiac troponin-specific autoantibodies. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:273-9.
 70. Michielsen EC, Bisschops PG, Janssen MJ. False positive troponin result caused by a true macrotroponin. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:923-5.
 71. Wong SL, Isserow S, Pudek M. Macro-troponin causing elevation in cardiac troponin I. *Can J Cardiol* 2014;956:e5-6.
 72. Warner JV, Marshall GA. High incidence of macro-troponin I with a high-sensitivity I assay. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1821-9.
 73. Kavsak PA, Roy C, Malinowski P, et al. Macrocomplexes and discordant high-sensitivity cardiac concentrations. *Ann Clin Biochem* 2018;55:500-4.
 74. Clerico A, Plebani M. Biotin interference on immunoassay methods: sporadic cases or hidden epidemic? *Clin Chem Lab Med* 2017; 55:777-9.
 75. Lippi G, Bonetti G, Modenese A, et al. per il GdS SIBioC sulla variabilità extra-analitica (SIBioC-VEA). Interferenza da biotina negli immunodosaggi: raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA). *Biochim Clin* 2019;43:343-7.
 76. Food and Drug Administration. FDA warns that biotin may affect some lab test results. <https://labtestsonline.org/news/fda-warns-biotin-may-affect-some-lab-test-results>. (ultimo accesso: Novembre 2019).
 77. Dorizzi RM. Biotina e interferenze nei metodi immunologici; problemi e opportunità. *Riv Ital Med Lab* 2017;13:1-9.
 78. Fitzgerald RL, Hollander JE, Peacock WF, et al. Analytical performance evaluation of the Elecsys Troponin T Gen 5 Stat assay. *Clin Chim Acta* 2019;495:522-8.
 79. Frame I, Joshi PH, Mwangi C, et al. Susceptibility of cardiac troponin assay to biotin interference. *Am J Clin Pathol* 2019;151:486-93.
 80. Elecsys Troponin T hs, instruction manual (REF 08469873190), version 06-2019, V 2.0 English, pag. 1-8. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Germany).
 81. Document of International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Cardiac troponin assay interference:

- table designated by manufacturer: hemolysis and biotin IFCC Committee on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. <http://www.ifcc.org/media/477402/ifcc-cardiac-troponin-interference-table-v072618.pdf> (ultimo accesso: novembre 2019)
82. Hickman PE, Potter JM, Aroney C, et al. Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. *Clin Chim Acta* 2010;411:318-23.
 83. Gresslien T, Agewall S. Troponin and exercise. *Int J Cardiol* 2016;221:609-21.
 84. Vroemen WHM, Mezger STP, Masotti S, et al. Cardiac troponin T: only small molecules in recreational runned after marathon completion. *J Appl Lab Med* 2019;3:909-11.
 85. Cardinaels EP, Mingels AM, van Rooij T, Collinson PO, Prinzen FW, van Dieijen-Visser MP. Time-dependent degradation pattern of cardiac troponin T following myocardial infarction. *Clin Chem* 2013;59:1083-90.
 86. Middleton N, George K, Whyte G, et al. Cardiac troponin T release is stimulated by endurance exercise in healthy humans. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1813-4.

La misura combinata dei biomarcatori cardio-specifici è utile nei pazienti con sospetto di malattie cardiovascolari

Claudio Passino¹, Martina Zaninotto², Silvia Masotti¹, Veronica Musetti¹, Andrea Padoan², Marco Perrone³, Concetta Prontera¹, Mario Plebani², Aldo Clerico¹

¹Laboratorio Clinico, Fondazione CNR-Regione Toscana, G. Monasterio e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale, Università di Padova, Padova

³Laboratorio Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Tor Vergata, Roma

ABSTRACT

The combined measurement of cardio-specific biomarkers is a useful tool in patients with suspected cardiovascular disease.

A huge amount of experimental and clinical evidences clearly demonstrate that the measurement of cardio-specific biomarkers [cardiac natriuretic peptides (CNP), and cardiac troponins (cTns)] can significantly and independently improve the diagnostic accuracy and risk stratification in cardiovascular diseases. Furthermore, several recent studies report that the measurement of cardio-specific biomarkers has a beneficial impact also on management and outcome of patients with cardiovascular diseases. Considering the significant and independent information associated to cardio-specific biomarkers, several studies have recently reported that the combined assay of CNP and cTns may be cost effective not only for diagnosis, prognosis and treatment of cardiac disease, but also for screening in general population of individuals at high cardiovascular risk. Due to the higher cost of their measurement in comparison to other laboratory tests, the clinical appropriateness of the combined measurement of CNP and cTns should be accurately evaluated. Accordingly, an increase in clinical utilization of a laboratory test should be based not only on the peculiar pathophysiological characteristics of a biomarker, but also on the high performance of immunoassay methods used for the biomarker measurement. From a pathophysiological point of view, elevated CNP values indicate that some stressor substances or situations are having an adverse impact on cardiac function; while an increase in cTn levels above the cut-off value indicates that a sustained or powerful stress has actually produced a damage on cardiomyocytes (i.e. a myocardial injury). Consequently, the combined measurement of CNP and cTns gives complementary and distinct rather than redundant clinical information. These two distinct pathophysiological mechanisms also explain why cardiovascular risk is strongly increased in patients with both CNP and cTns elevated. In conclusions, the combined measurement of CNP and cTns is a useful tool for diagnosis, follow-up, and stratification of risk in all patients with suspected cardiac disease, especially those admitted to the emergency department.

INTRODUZIONE

Le più recenti linee guida internazionali raccomandano l'utilizzo dei peptidi natriuretici cardiaci (PNC) come marcatori di prima scelta nella diagnosi e nel monitoraggio dei pazienti con scompenso cardiaco (SC) (1,2). Nel 2018, il documento "Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction" (3) ha stabilito che le troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) sono da considerare i biomarcatori di scelta per la valutazione del

danno miocardico e la diagnosi di infarto del miocardio (IM). Per questo motivo l'utilizzo dei PNC, peptide natriuretico di tipo B (BNP) e frammento aminoterminale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP), viene universalmente considerato appropriato nella diagnosi e nel monitoraggio dei pazienti con SC (1,2), mentre quello delle troponine nella diagnosi differenziale delle sindromi coronariche acute (SCA) (3-5).

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 4, 56126 Pisa

Ricevuto: 15.10.2019

Revisionato: 16.10.2019

Accettato: 22.01.2020

Publicato on-line: 11.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.022

Tuttavia, la misura delle troponine cardiache non deve essere considerata come un test si/no per la diagnosi differenziale delle SCA, come anche la misura dei peptidi natriuretici non deve essere interpretata esclusivamente come un test per la diagnosi si/no dello SC. L'indicazione per un utilizzo ad ampio spettro in tutti i pazienti con malattie cardiovascolari della misura dei biomarcatori cardio-specifici nasce da considerazioni che riguardano sia le loro caratteristiche biochimiche che le proprietà fisiopatologiche, come anche dalle elevate prestazioni analitiche dei metodi immunometrici che sono attualmente impiegati per la loro misura (6-12).

Le caratteristiche dei metodi di determinazione dei biomarcatori cardio-specifici hanno cambiato nel corso degli ultimi 10 anni non solo l'algoritmo diagnostico per la diagnosi differenziale delle più importanti malattie cardiache, come IM e SC, ma anche la classificazione, la stratificazione del rischio e il monitoraggio dei pazienti con malattie cardiovascolari. Come sempre accade per le più importanti scoperte scientifiche, le nuove evidenze acquisite con l'utilizzo dei biomarcatori cardio-specifici, hanno fornito risposte a fondamentali quesiti fisiopatologici e clinici, ma hanno anche aperto nuove strade per la ricerca sperimentale e clinica. Tra le applicazioni più promettenti che i biomarcatori cardio-specifici hanno evidenziato vi è la possibilità di identificare i soggetti a più alto rischio di presentare a medio termine un accelerato rimodellamento miocardico irreversibile che porti progressivamente verso uno SC sintomatico (7,13). Queste nuove applicazioni dei biomarcatori cardio-specifici comportano un allargamento dello spettro di situazioni fisiopatologiche e cliniche, nelle quali la misura di PNC e/o troponine cardiache deve essere considerata appropriata. Questa rassegna si propone di discutere la rilevanza e l'efficienza clinica della misura combinata dei due biomarcatori cardio-specifici soprattutto in alcune delle più frequenti e gravi condizioni cliniche riscontrate nei pazienti che sono ammessi al Pronto Soccorso (PS) in condizioni critiche.

CARATTERISTICHE ANALITICHE E RILEVANZA FISIOPATOLOGICA DEI BIOMARCATORI CARDIO-SPECIFICI

I peptidi BNP/NT-proBNP e le proteine cTnI/cTnT sono presenti in differenti isoforme sia all'interno dei miocardiociti che nel plasma. Attualmente, entrambi i biomarcatori sono misurati nella pratica clinica di laboratorio con metodi immunometrici. Gli anticorpi monoclonali utilizzati nei sistemi immunometrici, anche se sono stati preparati e selezionati per la loro alta affinità per gli epitopi specifici del biomarcatore, presentano comunque varie interferenze con altre proteine, peptidi o differenti molecole presenti nel plasma sia di soggetti sani che di pazienti con malattie cardiovascolari. Per questo motivo risulta molto difficile mettere a punto sistemi immunometrici per sostanze biologiche che hanno concentrazioni plasmatiche nei

sogetti sani intorno a pochi ng/L. Risulta quindi importante analizzare le specifiche di qualità dei metodi immunometrici per la determinazione di PNC e troponine, perché le loro caratteristiche e prestazioni analitiche hanno importanti ricadute sia sull'accuratezza che sull'interpretazione clinica dei risultati.

Metodi ad alta sensibilità per le troponine cardiache

Il documento pubblicato nel 2018 dall'American Association for Clinical Chemistry (AACC) e IFCC (5) stabilisce due criteri fondamentali per definire un metodo per la misura delle troponine cardiache ad alta sensibilità. Il primo criterio stabilisce che il 99° percentile della distribuzione dei valori delle cTnI o cTnT nella popolazione di riferimento (99° percentile URL) debba essere misurato con un errore, espresso come coefficiente di variazione, minore od uguale al 10% (5). Il secondo criterio, più restrittivo, stabilisce che un metodo ad alta sensibilità sia in grado di misurare le concentrazioni di cTnI e cTnT con valori al di sopra del limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD) del metodo nella maggior parte di una popolazione costituita da almeno 300 individui di entrambi i sessi (almeno 300 femmine + 300 maschi) (5). In pratica, considerando che le donne mostrano mediamente valori inferiori di cTnI e cTnT rispetto agli uomini, questo criterio richiede che i metodi ad alta sensibilità siano in grado di fornire valori misurabili del marcatore nella maggior parte di una popolazione costituita da almeno 300 donne apparentemente sane (5). Dal punto di vista dell'analisi statistica, il secondo criterio richiede che il valore della mediana della distribuzione della troponina sia maggiore o uguale al valore del LoD del metodo. Le linee guida (5) raccomandano un numero non inferiore a 300 individui per raggiungere la numerosità necessaria del campione per ottenere una stima valida del 99° percentile della distribuzione dei valori di troponina (cioè con un livello di tolleranza di almeno il 95%).

Da un punto di vista fisiopatologico risulta fondamentale comprendere perché esistano valori misurabili di cTnI e cTnT nel sangue di soggetti adulti, apparentemente sani. Considerazioni teoriche (7) ed evidenze sperimentali in animali e nell'uomo (14) indicano che il valore del 99° percentile URL corrisponde alla quantità di cTnI e cTnT presente in circa 40 mg di tessuto miocardico (circa lo 0,015% della massa miocardica totale). In accordo con i più recenti studi, i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti adulti apparentemente sani potrebbero essere considerati come un indice del rinnovamento fisiologico del cuore (7,14-16).

Il 99° percentile URL della distribuzione di cTnI e cTnT riveste una grande rilevanza, sia clinica che medico-legale, perché è raccomandato dalle linee guida come unica soglia decisionale per la rilevazione della presenza di un danno miocardico e per la diagnosi di IM (3). Tuttavia, la valutazione del 99° percentile URL di cTnI e cTnT è influenzata non solo dalle caratteristiche

demografiche della popolazione di riferimento (sesso, età, probabilmente etnia), ma anche (e forse soprattutto) dai criteri di inclusione/esclusione adottati per valutare lo stato di salute dei volontari "apparentemente sani" arruolati nello studio (10, 16-22). La distribuzione di cTnI e cTnT è molto asimmetrica nei soggetti adulti apparentemente sani (Figura 1). In particolare, la maggior parte di questi soggetti (soprattutto le donne con età <50 anni), presenta valori medi di cTnI, misurati con metodi ad alta sensibilità, che sono circa 10 volte inferiori del 99° percentile URL (10, 17-22) (Figura 1).

Molti studi, comprese tre meta-analisi (23-25), hanno dimostrato che il rischio cardiovascolare correla positivamente con l'aumento della concentrazione del biomarcatore nei soggetti apparentemente sani di entrambi i sessi, anche per valori di cTnI e cTnT inferiori al 99° percentile URL. Questi studi indicano anche che gli individui, che ancora non presentano i sintomi dello SC, ma hanno valori di cTnI e cTnT nel terzile più elevato, potrebbero essere a maggior rischio per una progressione verso lo SC (26). Questi dati sono in accordo con l'evidenza che la maggior parte dei pazienti con SC presenta valori di troponine significativamente più elevati rispetto ai soggetti apparentemente sani, e, in una percentuale significativa, anche valori superiori al 99° percentile URL (27,28).

Per quanto concerne la diagnosi differenziale delle SCA nei pazienti ammessi al PS, solamente un terzo dei pazienti ammessi con valori di cTnI o cTnT superiore al 99° percentile URL, misurati con metodi ad alta sensibilità, presenta effettivamente un IM (3,4,29). È importante sottolineare che un valore superiore al 99°

percentile URL indica sempre la presenza di un danno cardiaco, ma per dimostrare che il danno miocardico è dovuto ad un IM, bisogna anche dimostrare che il danno è acuto e di natura ischemica (3,4,30,31). Molte sono le condizioni cliniche, cardiache ed extra-cardiache, che possono produrre un danno miocardico di natura non-ischemica, e che quindi devono essere escluse per la diagnosi differenziale di SCA in un paziente ammesso al PS con dolore toracico (3,30,31) (Tabella 1).

Metodi per la misura dei peptidi natriuretici cardiaci

La misura dei PNC presenta alcune difficoltà analitiche in quanto questi peptidi, soprattutto gli ormoni attivi [peptide natriuretico atriale (ANP) e BNP], circolano nel sangue in concentrazione di pochi ng/L, per cui occorrono metodi immunometrici estremamente sensibili per misurarne le concentrazioni nei soggetti sani (6,8,9). Inoltre, i PNC appartenenti alla stessa famiglia (ANP o BNP), che derivano dallo stesso precursore (proANP e proBNP), sono molto simili tra loro. Per questo motivo, in questi ultimi anni sono stati messi a punto, sia per la misura dell'ormone attivo BNP che del peptide inattivo NT-proBNP, metodi immunometrici che si avvalgono di anticorpi monoclonali e della rilevazione in chemiluminescenza (32-34).

Dal punto di vista analitico, la principale limitazione dei metodi immunometrici per il BNP e il NT-proBNP è che subiscono in varia misura l'interferenza da parte del peptide precursore proBNP (35). L'interferenza del precursore proBNP ha una rilevanza fisiopatologica, in

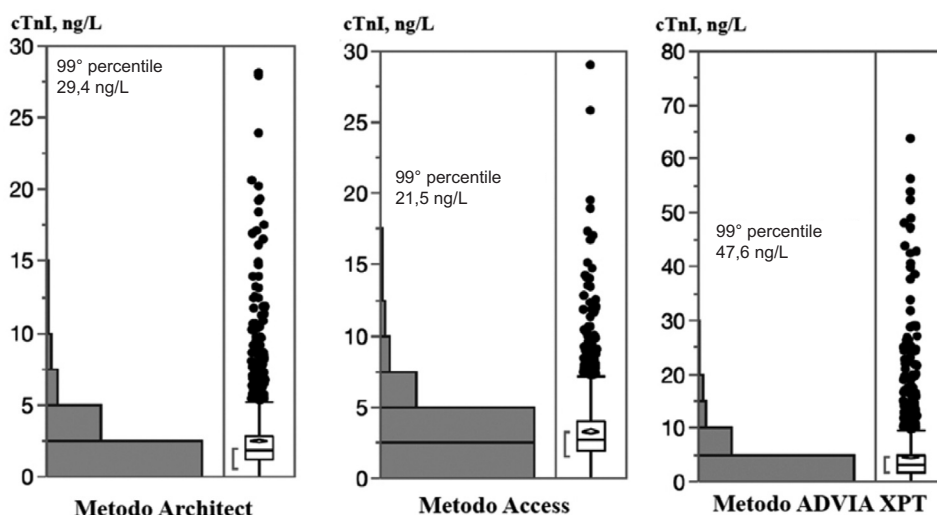


Figura 1

Distribuzione dei valori di cTnI misurati con metodi ad alta sensibilità nella popolazione italiana, in accordo con lo studio multicentrico del Gruppo di Studio Inter-Societario SIBioC/ELAS sui biomarcatori cardiaci (10). La figura riporta per ciascun metodo l'istogramma dei valori a sinistra e il box plot a destra. Il box plot riporta (dal basso): il valore del primo quartile – l'intervallo interquartile, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile, il valore del terzo quartile + l'intervallo interquartile. A sinistra del box plot, è riportato l'intervallo che comprende il 50% delle osservazioni. Il diamante centrale all'interno del box plot rappresenta il valore medio \pm IC 95%. Il valore calcolato del 99° percentile URL con il metodo non-parametrico robusto è anche riportato nella figura dell'istogramma.

Tabella 1

Meccanismi fisiopatologici che possono causare danno miocardico e sono, quindi, associati all'aumento dei livelli circolanti delle troponine cardiache sopra il 99° percentile URL, in accordo con il documento Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (3).

Danno miocardico dovuto ad ischemia miocardica

(Infarto del Miocardio di tipo 1)

Rottura di una placca aterosclerotica con trombosi e conseguente ostruzione completa (o semi completa) del vaso coronarico

Danno miocardico conseguente a uno squilibrio tra l'apporto di ossigeno e nutrienti da parte del circolo coronarico

e la domanda del tessuto miocardico che provoca una ischemia acuta

(Infarto del Miocardio di tipo 2)

Cause di ridotta perfusione miocardica:

- Spasmo coronarico, disfunzione del micro-circolo
- Embolia delle arterie coronariche
- Dissezione delle arterie coronariche
- Bradi-aritmia sostenuta
- Ipotensione o shock
- Insufficienza respiratoria
- Anemia severa

Cause di aumentata richiesta di ossigeno/nutrienti:

- Tachi-aritmia sostenuta
- Iperensione severa con o senza ipertrofia ventricolare

Altre cause di danno miocardico

Malattie cardiache, interventi endovasali e cardio-chirurgici, traumi cardiaci:

- Scompenso cardiaco
- Miocardite
- Cardiomiopatie di varia origine
- Sindrome di Takotsubo
- Procedure di rivascolarizzazione coronarica
- Interventi cardio-chirurgici
- Ablazione miocardica mediante catetere
- Shock da defibrillazione
- Trauma cardiaco

Malattie sistemiche:

- Infezione e sepsi
- Malattia renale cronica
- Ictus ischemico ed emorragico
- Embolia ed ipertensione polmonare
- Malattie infiltrative del miocardio (amiloidosi, sarcoidosi)
- Farmaci e droghe di abuso cardi tossici
- Pazienti in condizioni critiche
- Esercizio fisico strenuo (maratona, corse ciclistiche di lunga durata, corse di endurance estrema)

quanto questa è la forma peptidica predominante nel plasma dei pazienti con SC, ma possiede una attività biologica assai inferiore a quella del BNP (6,8,9,36). Da un punto di vista fisiopatologico, lo scopo di misurare il BNP (invece del peptide inattivo NT-proBNP) è ottenere una migliore stima dell'attività endocrina cardiaca, cioè della quantità di peptidi natriuretici attivi prodotti dai miocardiociti. Con tutta evidenza quindi, l'interferenza

del proBNP nei metodi per il BNP compromette l'accuratezza della stima dell'attività endocrina del cuore (6,8,9,36).

Altra limitazione della misura dei PNC è che sono poco stabili sia *in vivo* che *in vitro*. I peptidi attivi (ANP e BNP) sono velocemente degradati dagli enzimi proteolitici, per cui la matrice di scelta deve essere plasma con EDTA, che è un inibitore di alcune proteasi

plasmatiche. Per limitare il più possibile la degradazione dei peptidi, è anche preferibile trasportare le provette in ghiaccio, centrifugarle a 4°-8° C ed eseguire la misura in tempi molto brevi (6,8,9). Il peptide NT-proBNP è più stabile e quindi si possono utilizzare per la misura sia il siero che il plasma (EDTA o litio-eparina) (6,8,9). Qualora la misura dei PNC non venga effettuata subito dopo il prelievo, i campioni di plasma e siero dovrebbero essere conservati in congelatore (meglio se a -80°C) (6,8,9).

Dal punto di vista fisiopatologico, al contrario delle troponine, i livelli circolanti di BNP e NT-proBNP sono più elevati nelle donne rispetto agli uomini di pari età (37). La misura dei PNC consente non solo di distinguere i soggetti sani dai pazienti nelle primissime fasi della malattia (classe funzionale NYHA I o II), ma anche dai soggetti che presentano alcune alterazioni strutturali cardiache, ma non manifestano ancora i sintomi dello SC (stadio B della storia naturale della malattia) (38). I livelli circolanti di PNC sono aumentati praticamente in tutte le malattie cardiache e in molte altre condizioni patologiche sistemiche in cui si abbia una attivazione del sistema neuro-immuno-ormonale (Tabella 2). La misura dei PNC è raccomandata con il massimo grado di evidenza da tutte le linee guida nazionali (11) e internazionali (1,2,39) sia per la diagnosi che per la stratificazione prognostica dei pazienti con SC. Inoltre, la misura dei PNC dovrebbe svolgere un ruolo centrale nello screening dei pazienti ad alto rischio, che dovrebbe essere effettuato dai medici di famiglia e da alcuni specialisti (come i diabetologi) a livello della popolazione generale, come raccomandato da un recente documento della Heart Failure Association (HFA) e della European

Society of Cardiology (ESC) (39).

E' importante sottolineare che la misura dell'ormone peptidico BNP fornisce informazioni fisiopatologiche differenti da quelle del peptide inattivo NT-proBNP (9,36,40). Alcune considerazioni aggiuntive sono quindi necessarie da parte del clinico per effettuare una più appropriata richiesta del tipo di peptide da misurare e anche per una più corretta interpretazione dei risultati che si ottengono con i metodi immunometrici per i PNC. Queste considerazioni diventano essenziali per la corretta interpretazione dei risultati della misura di BNP e NT-proBNP nei pazienti trattati con la nuova classe di farmaci denominata Angiotensin Receptor-Nepriylsin Inhibitors (ARNI), che contiene un inibitore del legame dell'angiotensina II al proprio recettore (Valsartan) e un inibitore dell'enzima neprilina che degrada gli ormoni natriuretici cardiaci ANP e BNP (Sacubitril) (41). Nei pazienti che rispondono positivamente al trattamento con il farmaco ARNI, si riscontra una riduzione significativa dei livelli circolanti di NT-proBNP e delle troponine cardiache già nelle prime settimane di trattamento. Questa diminuzione dei biomarcatori cardio-specifici può essere spiegata con la riduzione dello stress e del danno cardiaco dovuta all'effetto del Valsartan, che blocca il recettore dell'angiotensina II. D'altra parte, l'azione del Sacubitril (inibitore della neprilina) può causare un innalzamento dei livelli circolanti degli ormoni attivi (ANP e BNP), poiché inibisce la degradazione di questi peptidi da parte dell'enzima neprilina (ma non quella dei peptidi inattivi come NT-proBNP e proBNP) (40-42). L'innalzamento dei livelli degli ormoni attivi ANP e BNP è a sua volta responsabile dell'aumento dei livelli urinari del guanosin

Tabella 2

Alcune più comuni condizioni cliniche in cui i livelli circolanti dei peptidi natriuretici cardiaci sono alterati (diminuiti od aumentati).

MALATTIA	Livelli circolanti
Malattie cardiovascolari	
Insufficienza cardiaca	molto elevati
Infarto del miocardio (primi giorni)	elevati
Ipertensione arteriosa con cardiomiopatia	elevati
Malattie polmonari	
Embolia polmonare	elevati
Malattia polmonare cronica ostruttiva	elevati
Malattie endocrino-metaboliche	
Ipertiroidismo	elevati
Ipotiroidismo	diminuiti
Sindrome di Cushing	elevati
Iperaldosteronismi primitivi e secondari	elevati
Diabete mellito	normali o elevati
Cirrosi epatica con ascite	elevati
Insufficienza renale acuta e cronica	molto elevati
Sindrome paraneoplastica	normali o elevati
Ictus ischemico e emorragia subaracnoidea	elevati

monofosfato (GMP) ciclico (40,42). Infatti, questo effetto rappresenta l'azione farmacologica principale del composto ARNI, dovuta ad un potenziamento dell'attività natriuretica dei PNC, mediata da recettori specifici posizionati sulla membrana delle cellule tubulari del nefrone, che riconoscono come secondo messaggero, appunto il GMPciclico. Se i pazienti rispondono al trattamento con un miglioramento protratto della condizione clinica, dopo alcune settimane anche i livelli del BNP tendono a diminuire parallelamente a quelli del peptide inattivo NT-proBNP e delle troponine cardiache (9,36,40). Quindi, il clinico dovrebbe essere informato da parte degli esperti di Medicina di Laboratorio sulle differenti caratteristiche analitiche e fisiopatologiche dei PNC per essere messo in grado di richiedere al laboratorio la misura del biomarcatore (BNP o NT-proBNP), che lui ritiene più indicato per i suoi pazienti.

RILEVANZA CLINICA DELLA MISURA COMBINATA DEI BIOMARCATORI CARDIO-SPECIFICI

Sindromi coronariche acute (SCA)

La messa a punto di nuove generazioni di metodi per la misura di cTnI e cTnT con metodiche ad alta sensibilità ha ridotto drasticamente il tempo di diagnosi nei pazienti ammessi al PS con sospetto di SCA. Se all'inizio degli anni 2000 occorrevano dalle 12 alle 24 ore per il rule-in e rule-out, successivamente negli anni 2005-2007 il tempo si è dimezzato a circa 6-12 ore, e attualmente le linee guida raccomandano algoritmi diagnostici di 3 ore (ed anche meno per il solo rule-out in alcuni casi particolari) (4).

Il prezzo da pagare per un aumento della sensibilità

è comunque sempre una diminuzione della specificità (Figura 2). I valori che possono essere misurati con i metodi disponibili per le troponine cardiache spaziano in un intervallo molto ampio che copre cinque ordini di grandezza (da circa 1 a 100 000 ng/L). Tale intervallo di misura comprende da una parte i valori dei soggetti sani e dall'altra i livelli molto elevati di troponine che si possono riscontrare nei pazienti con IM di grande estensione. Valori di troponine cardiache al di sopra del 99° percentile URL indicano sicuramente la presenza di un danno miocardico, ma per la diagnosi di IM è necessario che il danno sia acuto e di origine ischemica (3). Vi è una zona grigia che include i valori di troponine, compresi tra il 99° percentile URL e circa 2000 ng/L in cui la diagnosi differenziale tra IM e le altre cause di danno miocardico risulta più difficile (Figura 2). La probabilità che un paziente con sospetto di SCA presenti effettivamente un IM aumenta progressivamente con i valori del biomarcatore e diviene molto alta per concentrazioni >3-5 volte la soglia del metodo (3,4).

Giannitsis et al. (29) stimano che solo circa il 30% dei pazienti ammessi al PS con valori di troponine cardiache maggiori del 99° percentile URL abbia effettivamente un IM. In un diverso studio è stata misurata la cTnT in un campione random di 651 individui (età media 65 anni) che si sono presentati al PS, ma che non sembravano presentare malattie cardiache o extra-cardiache in grado di produrre un significativo danno miocardico; il 36% degli individui di questa popolazione con età ≥65 anni presentavano valori di cTnT superiori al 99° percentile URL (ad esempio 14 ng/L), rispetto a solo il 2% di quelli con età <65 anni (43). Irfan et al. (44) hanno arruolato 572 (su un totale di 1181) pazienti consecutivi ammessi

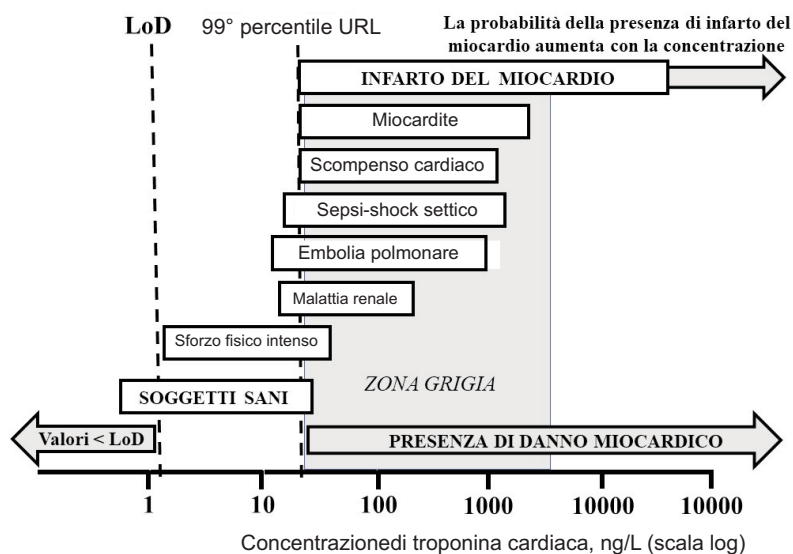


Figura 2
 Ampio intervallo di valori che si possono misurare con i metodi ad alta sensibilità delle troponine cardiache nei soggetti sani (sia a riposo che dopo intenso esercizio fisico) e nei pazienti con malattie cardiache ed extra-cardiache.

al PS con dolore toracico acuto, ma che non avevano una causa cardiaca che spiegasse la sintomatologia clinica. Elevati valori di cTnT sono stati misurati in 88 dei 572 pazienti (15,4%), che avevano una storia clinica negativa per patologie cardiache o non cardiache in grado di spiegare l'aumento del biomarcatore (44). Le condizioni cliniche più frequentemente correlate a valori elevati di cTnT in questi pazienti erano in ordine di importanza: età avanzata, insufficienza e/o malattia renale cronica, ipertensione, precedente IM (44). Più recentemente, Lee et al. (45) hanno misurato i valori di hs-cTnI in 918 pazienti ammessi consecutivamente al PS senza sospetto di SCA. Valori elevati di hs-cTnI sono stati trovati in 114 (12,4%) pazienti: in 2 (0,2%) è stata posta una diagnosi di IM di tipo 1, in altri 3 (0,3%) IM di tipo 2; infine i restanti 109 pazienti (11,9%) hanno avuto una diagnosi di danno miocardico (45). Valori elevati di hs-cTnI erano strettamente correlati con età, funzione renale, co-morbidità multiple e prognosi peggiore. Infine, altri studi più recenti hanno dimostrato che la misura della hs-cTnI in aggiunta agli score standard di rischio, era in grado di identificare i pazienti con IM di tipo 2 rispetto ai pazienti con danno cardiaco (46), come pure di stratificare più accuratamente il rischio di morte e ri-ospedalizzazione nei pazienti con IM di tipo 2 (47).

Considerando il documento "Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction" (3), forse il compito più difficile per il clinico è distinguere tra una possibile diagnosi di IM del tipo 1 o 2 da tutte le altre cause di aumento delle troponine cardiache (11). I risultati degli studi clinici appena discussi confermano che il principale problema clinico nella diagnosi differenziale di SCA in PS è attualmente individuare il più velocemente possibile, tra i molti individui che hanno elevati valori di hs-cTnI e hs-cTnT, i pochi pazienti che hanno effettivamente una necrosi acuta del miocardio e che quindi devono essere avviati al trattamento anti-trombotico e all'indagine coronarica invasiva, come raccomandato dalle linee guida (4).

Scompenso cardiaco (SC)

La causa senz'altro più frequente di riscontro di un elevato valore di hs-cTnI o cTnT, specialmente in pazienti con età >65 anni e con co-morbidità, è la presenza di uno SC. Livelli di hs-cTnI o cTnT appena al di sopra del 99° percentile URL, che non variano significativamente nell'arco delle 3 ore, accompagnati da valori di BNP/NT-proBNP molto aumentati (più di 3 volte rispetto al livello decisionale del metodo), suggeriscono la presenza di uno SC e di un danno miocardico. Al contrario, elevati livelli di hs-cTnI o cTnT che aumentano (o diminuiscono) significativamente nell'arco di tre ore, accompagnati da elevati livelli di BNP (>80 ng/L) o NT-proBNP (>1170 ng/L negli uomini e di 2150 ng/L nelle donne) suggeriscono un IM ad alto rischio, con possibile severa compromissione funzionale del ventricolo sinistro (48). Nei pazienti con IM i valori di PNC correlano positivamente con l'area di necrosi e negativamente con la funzione ventricolare (48-50). Uno studio riporta che in

pazienti con IM che presentano valori di NT-proBNP <1115 ng/L hanno un'alta probabilità di recuperare la funzionalità cardiaca (51). Al contrario, i pazienti con shock cardiogeno e IM che presentano valori di NT-proBNP >12782 ng/L sono ad alto rischio di prognosi infausta nonostante la rivascolarizzazione coronarica (51).

Aritmie atriali

E' ben noto che le aritmie atriali (soprattutto fibrillazione e flutter atriali) costituiscono un grave problema di salute pubblica che è in continuo aumento, tanto da essere considerate una delle più comuni cause di ammissione al PS nei paesi occidentali (52). I pazienti con fibrillazione atriale hanno un'età media di circa 70 anni, sono in lieve prevalenza donne (51-53%) e presentano spesso co-morbidità, come ipertensione, SC, malattie renali croniche, alterazioni delle valvole cardiache, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e diabete mellito (52). I pazienti con fibrillazione atriale presentano frequentemente sintomi come la dispnea, mentre lo SC acuto è presente in circa il 65% dei casi (39). Inoltre, due recenti rassegne sistematiche con meta-analisi hanno confermato che la fibrillazione atriale è associata al rischio di sviluppare sia IM (anche in pazienti senza malattia coronarica) che SC (53,54). Considerando questi dati, non è sorprendente che in un paziente ammesso al PS con sintomi di dispnea e/o dolore toracico si debba prendere in considerazione come diagnosi differenziale, le aritmie atriali.

Ovviamente, nei pazienti ammessi al PS la presenza di aritmie atriale è accertata mediante esame elettrocardiografico. La misura dei biomarcatori cardio-specifici è utile soprattutto per la stratificazione del rischio. Infatti, pazienti con aritmie, come la fibrillazione o il flutter atriale, presentano valori elevati sia dei PNC, come anche di troponine, anche se in percentuale minore. In particolare, è ben noto che elevati livelli di BNP predicono il rischio di sviluppare a breve termine fibrillazione atriale, con una accuratezza migliore dei rilievi clinici e i classici marcatori di rischio cardiovascolare (55). Valori molto elevati di BNP/NT-proBNP (generalmente più di 5 volte rispetto ai livelli decisionali dello specifico metodo) sono generalmente riportati in pazienti con fibrillazione atriale durante gli episodi acuti (56-60); mentre valori di cTnI e cTnT risultano elevati al di sopra del valore decisionale solo in alcuni (generalmente dal 10% al 15%) pazienti con episodi di fibrillazione atriale (61-63). E' importante sottolineare che valori di cTnI e cTnT al di sopra del 99° percentile URL, misurati con metodi ad alta sensibilità certificano la presenza di un danno cardiaco (3). La presenza di un danno cardiaco in pazienti con fibrillazione atriale spiega perché questi pazienti abbiano una prognosi molto peggiore e, in particolare, una mortalità più elevata rispetto a quelli senza aumento delle troponine cardiache (61-63).

Sincope

Le linee guida definiscono la sincope come una transitoria perdita di conoscenza (*Transient loss of consciousness*) dovuta a ipo-perfusione cerebrale e caratterizzata da un rapido inizio e uno spontaneo e completo recupero (64,65). La prevalenza della sincope in pazienti ammessi al PS varia, in letteratura, tra lo 0,8% e il 2,4% (64). La sincope è classificata in tre gruppi a seconda del possibile meccanismo fisiopatologico: sincope mediata da riflessi nervosi, dovuta a ipotensione ortostatica o a cause cardiache (65). Le cause cardiache di sincope sono più frequenti nei soggetti >60 anni, nel sesso maschile e nei pazienti con anamnesi positiva per malattie cardiache. Al contrario, nei giovani le cause non cardiache di sincope sono più frequenti; gli episodi sono evidenziati solo in posizione verticale (o dal passaggio dalla posizione supina a quella eretta), frequentemente preceduti da nausea, vomito e sensazione di caldo, e spesso sono ricorrenti (64, 65).

E' ben noto che il rischio di morte o di eventi avversi è molto più elevato nei pazienti con sincope di origine cardiaca, piuttosto che non-cardiaca (64, 65). Molti studi hanno quindi valutato se la misura dei biomarcatori cardio-specifici (soprattutto i PNC) potesse essere utile nella diagnosi differenziale (soprattutto nel distinguere tra cause cardiache e non cardiache) e/o nella stratificazione del rischio dei pazienti ammessi al PS con sincope (66-69).

Per quanto riguarda la diagnosi differenziale, Pfister et al. (66) hanno riportato in 61 pazienti ammessi al PS con sincope, che i valori di NT-proBNP erano significativamente più elevati nei casi da cause cardiache (mediana 514 ng/L, intervallo interquartile 286-1 154 ng/L) rispetto a quelli con sincope da cause non cardiache (mediana 82 ng/L, intervallo interquartile 70-378 ng/L) con un valore soglia di 164 ng/L, che aveva una sensibilità del 90%, una specificità del 48,8% e un valore predittivo negativo del 91% (66). Più recentemente, du Fay de Lavallaz et al. (67) hanno arruolato 1 539 pazienti ammessi al PS con sincope, di cui 234 (15,2%) avevano una diagnosi di sincope per cause cardiache. I valori di BNP, NT-proBNP, hs-cTnI e cTnT sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con sincope dovuta a cause cardiache. L'accuratezza diagnostica, valutata con le curve ROC, di tutti i marcatori cardio-specifici era praticamente uguale (il valore di AUC era compreso tra 0,77 e 0,78) (67). Inoltre, combinando insieme i valori di BNP/NT-proBNP con quelli di hs-cTnI/cTnT si otteneva un ulteriore incremento della accuratezza diagnostica con un valore di AUC pari a 0,81. Questo recente studio ha inoltre confermato che la misura dei biomarcatori cardio-specifici è superiore agli score clinici più comunemente utilizzati per la valutazione del rischio cardiovascolare in questi pazienti (67).

Per quanto riguarda la stratificazione del rischio, una meta-analisi pubblicata nel 2015 (69), includeva 11 studi con 4 246 pazienti, in cui era valutata e confrontata l'accuratezza prognostica sia dei PNC (1 353 pazienti)

che delle troponine cardiache con metodi non ad alta (2 693 pazienti) o ad alta sensibilità (819 pazienti). Questa meta-analisi ha dimostrato che sia i PNC che i metodi ad alta-sensibilità per le troponine cardiache hanno un buon grado di accuratezza prognostica nei pazienti ammessi al PS con sincope nella maggior parte dei casi causata da disturbi cardiaci o cardiovascolari (69).

Embolia polmonare

L'embolia polmonare (EP) è una malattia piuttosto comune caratterizzata da alta mortalità, se non precocemente diagnosticata e appropriatamente trattata (70,71). L'EP è considerata la terza più frequente malattia cardiovascolare con una incidenza annuale di circa 100-200 per 100 000 abitanti e la diagnosi è spesso accertata solo con l'autopsia (70). Le linee guida ESC, pubblicate nel 2019, riportano che l'utilizzo di uno o più biomarcatori dovrebbe consentire una migliore stratificazione dei pazienti nelle tre categorie a basso rischio (rischio intermedio alto, intermedio basso e basso), soprattutto per quanto riguarda la morte precoce (29,70). Il recente documento del Pulmonary Embolism Response Team (PERT) Consortium raccomanda per la stratificazione del rischio, di utilizzare un modello multi-parametrico che include: rilievo clinico, pressione arteriosa, frequenza cardiaca, emogasanalisi, imaging cardiaca e misura dei biomarcatori cardio-specifici (PNC e troponine cardiache) (71). Le linee guida ESC del 2019 specificano che le troponine cardiache dovrebbero essere considerate come indicatori di prima scelta per la valutazione del rischio di mortalità precoce, mentre il peptide NT-proBNP (con valori ≥ 600 ng/L) è suggerito come indicatore di rischio addizionale (70).

Già nel 2008, una meta-analisi (72) aveva dimostrato una stretta associazione tra le concentrazioni di BNP/NT-proBNP e le condizioni cliniche dei pazienti con EP acuta. Relativamente bassi livelli dei PNC sono associati ad esiti più favorevoli, mentre livelli più elevati ad una prognosi più severa (72). Purtroppo, gli studi clinici suggeriscono valori decisionali differenti per BNP e NT-proBNP, per l'identificazione dei pazienti rispettivamente ad alto/intermedio rischio o basso rischio a causa non solo delle differenze sistematiche tra metodi, ma anche dei differenti criteri di inclusione/esclusione dei pazienti arruolati nei vari studi (29). Tuttavia, tutti gli studi sono concordi nel rilevare che livelli meno elevati dei PNC sono associati a un decorso più rapido e una prognosi più favorevole (29).

Per quanto riguarda le troponine cardiache, ben tre meta-analisi hanno dimostrato che la misura delle hs-cTnI e cTnT identifica pazienti, anche nel gruppo ad intermedio o basso rischio, che possono più frequentemente presentare eventi avversi e rischio di morte anche nel breve periodo (73-75). Poiché elevati livelli di troponine cardiache sono stati osservati anche in pazienti che non sembravano presentare segni di malattia coronarica, si ipotizza che il danno cardiaco, evidenziato in questi pazienti con la misura del

biomarcatore specifico, possa essere causato dallo squilibrio emodinamico e/o dalla ipossiemia (29).

Infine, tutti gli studi clinici confermano che i risultati delle tecniche per immagini di interesse cardiologico (ecocardiografia, angiografia e/o TAC) e della misura dei biomarcatori cardio-specifici (PNC e troponine) forniscono informazioni fisiopatologiche e cliniche complementari. Per tale motivo, gli Autori generalmente suggeriscono di eseguire la misura di PNC e troponine in tutti i pazienti con EP acuta, compresi quelli a basso rischio, per una migliore stratificazione del rischio a breve-medio termine (29,70-75).

Ictus cerebrale (stroke)

Gli accidenti cerebrovascolari (ictus) e l'IM costituiscono la più importante causa di morte e sono la maggior causa di invalidità nei paesi sviluppati, Italia compresa (76). Nonostante i più recenti progressi nella pratica medica, l'ictus cerebrale rimane un rilevante problema clinico perché è associato ad alta mortalità, lunga degenza, ri-ospedalizzazione, e soprattutto invalidità (presente in circa il 50% dei casi) (77-79). Una precoce ed accurata diagnosi dell'ictus ischemico è essenziale in quanto un ritardo nell'inizio della specifica terapia produce un allargamento della zona di necrosi e la finestra temporale entro la quale l'inizio del trattamento trombolitico produce un sicuro beneficio è assai ristretta (77).

Attualmente la diagnosi di ictus si basa essenzialmente sull'esame clinico e sui risultati delle tecniche diagnostiche per immagini (TAC e/o NMR) (77-79). L'esame TAC ha un'alta sensibilità per la diagnosi di ictus emorragico, ma non per il tipo ischemico, in quanto in circa 2/3 dei pazienti, l'esame può risultare negativo entro le prime 3 ore dall'inizio dell'ischemia (77-78). Per contro, l'esame NMR presenta una più elevata sensibilità per la diagnosi di ictus ischemico rispetto alla TAC, ma presenta anche un costo più elevato, tempi tecnici più lunghi, non è praticabile in alcune tipologie di pazienti e non è disponibile in tutte le strutture sanitarie (77-79).

Considerando queste limitazioni degli esami TAC e NMR, molti Autori hanno suggerito di affiancare agli esami di imaging la misura di biomarcatori specifici (78,79). Per quanto riguarda i PNC, nel 2015 una meta-analisi (2 834 pazienti) ha dimostrato che i livelli circolanti di BNP (1 570 pazienti) e NT-proBNP (1 264 pazienti) sono significativamente aumentati nei pazienti con ictus ischemico dovuto a trombo-embolia o aterosclerosi dei vasi cerebrali (80). Una più recente meta-analisi (16 studi, 3 298 pazienti) ha valutato l'efficacia diagnostica della misura di BNP (10 studi) e NT-proBNP (6 studi) nel distinguere tra ictus cardio-embolico e non cardio-embolico (81). La misura di BNP ha dimostrato una sensibilità di 0,65 (IC 95%: 0,63-0,68) e una specificità di 0,85 (IC 95%: 0,83-0,87), con un valore di AUC di 0,8718 (ES 0,0248), mentre la misura di NT-proBNP una sensibilità di 0,55 (IC 95%: 0,52-0,59), una specificità di 0,93 (IC 95%: 0,91-0,94) e un valore di

AUC di 0,8746 (ES 0,0280) (81). Questi risultati indicano che la sensibilità diagnostica nel distinguere tra le cause di ictus dei PNC appare mediamente scarsa, mentre la specificità risulta accettabile. La misura dei PNC nei pazienti con ictus fornisce, quindi, dal punto di vista diagnostico una informazione complementare rispetto alle tecniche di imaging cerebrale, che costituiscono il principale presidio diagnostico nei pazienti con sospetto di ictus (79). In particolare, la misura dei PNC potrebbe essere utile soprattutto quando i risultati delle tecniche di imaging cerebrale non sono disponibili, oppure non risultano sufficienti per una diagnosi definitiva (79).

Per quanto riguarda l'efficacia prognostica, recenti studi hanno confermato che i livelli plasmatici di PNC sono in grado di predire con un'ottima accuratezza la comparsa di ictus cardio-embolico in una larga coorte della popolazione generale, soprattutto in pazienti a rischio (82-85). In conclusione, recenti evidenze (80-85) supportano l'evidenza che la misura del BNP/NT-proBNP può essere utile soprattutto nella stratificazione del rischio degli eventi cerebro-vascolari acuti.

Per quanto riguarda la misura delle troponine, una meta-analisi pubblicata nel 2017, che include 26 studi, riporta che l'incidenza di livelli superiori al 99° percentile URL di cTnI e cTnT nei pazienti con ictus può variare, nei diversi studi, dal 4% al 40% (86). Questo dato potrebbe essere certamente sottostimato in quanto la maggior parte degli studi riportati in questa meta-analisi utilizzava metodi non ad alta sensibilità per la misura delle troponine cardiache (87). Un'altra più recente meta-analisi (12 studi, 7 905 pazienti con ictus ischemico) indica che elevati livelli di cTnI o cTnT (incidenza variabile dal 10% al 60% nei differenti studi) all'ammissione in ospedale erano indipendentemente associati con una mortalità a breve termine per cause cardiache e extra-cardiache (88). I risultati di questa meta-analisi sono stati recentemente confermati da altri studi che hanno riportato come in pazienti con ictus ischemico, elevati livelli di cTnT siano associati a grave disabilità e/o mortalità più elevata anche a breve termine (89-92). Per quanto riguarda pazienti con emorragia sub-aracnoidea, una meta-analisi ha riportato che valori elevati di troponine cardiache sono associati a un aumento del rischio di ischemia cerebrale tardiva e di mortalità (93).

In conclusione, molti studi confermano che i pazienti con ictus, sia ischemico che emorragico, possono presentare elevati valori sia di BNP/NT-proBNP che di troponine cardiache (specialmente se misurati con metodi ad alta sensibilità) (78-91), suggerendo che in una percentuale significativa di questi pazienti è presente un danno cardiaco (3). Inoltre, elevati valori dei biomarcatori cardio-specifici sono associati a prognosi più severa e ad un alto rischio di mortalità e di invalidità permanente (78-80,84,86,88,91).

Sepsi

La linea guida Sepsis-3 (94) definisce la sepsi come una disfunzione che coinvolge più organi e che è

potenzialmente letale; mentre lo shock settico rappresenta una forma più severa della sepsi, in cui sono presenti alterazioni sia metaboliche che cardiocircolatorie, talmente gravi da aumentare significativamente la mortalità. La sepsi severa e lo shock settico occorrono in circa il 2-3% dei pazienti ospedalizzati, ma si presentano con un'incidenza molto maggiore nei pazienti ricoverati nelle Unità di Terapia Intensiva (UTI) raggiungendo il 10-15% e presentano tuttora un'alta mortalità (dal 40% al 70%), anche se in diminuzione negli anni più recenti (95,96).

Lo SC è una complicazione frequente della sepsi severa e dello shock settico, raggiungendo un'incidenza del 50% in questa grave condizione clinica (95-99). Di conseguenza, una precoce rilevazione della presenza di una disfunzione ventricolare è fondamentale per instaurare una appropriata terapia. Numerosi studi, discussi in dettaglio in una recente rassegna e due meta-analisi, hanno dimostrato che valori elevati di PNC in pazienti con sepsi severa e shock settico sono associati ad una prognosi sfavorevole (95-99). I risultati di questi studi dimostrano che la misura dei PNC identifica precocemente nei pazienti con sepsi una disfunzione ventricolare, anche subclinica, suggerendo, quindi, al clinico una terapia appropriata (95-99).

Per quanto riguarda la misura delle troponine, praticamente tutti gli studi che hanno utilizzato metodi ad alta sensibilità, hanno riportato valori elevati di hs-cTnI e cTnT nei pazienti con sepsi di grado severo o shock settico (100-110). Questi risultati indicano che un danno miocardico è quasi sempre rilevabile in pazienti con sepsi severa e soprattutto shock settico e che, inoltre, elevati valori di troponine si associano ad una prognosi

notevolmente peggiore nei pazienti con sepsi, soprattutto se associati a valori aumentati di PNC (110), indicando un più elevato rischio di mortalità a breve termine.

CONSIDERAZIONI FISIOPATOLOGICHE

Le evidenze cliniche e sperimentali discusse in questa rassegna dimostrano che in numerose condizioni cliniche, sia cardiache che extra-cardiache, è presente la compromissione della funzionalità cardiaca (evidenziata dai valori elevati di PNC), che è spesso associata ad un danno miocardico (evidenziato da elevati livelli di troponine cardiache misurate con metodi ad alta sensibilità). Si deve sottolineare il fatto che è possibile dimostrare questa associazione tra disfunzione e danno cardiaco solo quando si utilizzino metodi immunometrici sensibili e con adeguati valori di riferimento per la misura dei due marcatori cardio-specifici.

Da un punto di vista clinico è importante rilevare come la presenza di una disfunzione cardiaca e/o di un danno tissutale miocardico possa essere ancora subclinica nelle prime fasi di alcune di queste condizioni cliniche. Quindi, l'utilizzo dei marcatori cardio-specifici consente di istituire rapidamente una terapia adeguata, riducendo la mortalità e la morbidità della condizione clinica, soprattutto nei pazienti critici (12,13,29,39,100,110,111). Un'altra importante osservazione è che la misura associata nello stesso paziente di PNC e troponine non risulta mai ridondante, ma invece complementare. Infatti, è stato dimostrato come valori elevati di entrambi i biomarcatori aumentino notevolmente il rischio di mortalità e di esiti gravemente

Tabella 3

Alcune comuni condizioni cliniche in cui i livelli circolanti dei peptidi natriuretici cardiaci e/o delle troponine cardiache sono elevati (valori al di sopra del limite di riferimento).

Condizioni cliniche	Peptidi natriuretici cardiaci	Troponine cardiache
Malattie cardiovascolari		
Insufficienza cardiaca	molto elevati	elevati
Infarto del miocardio tipo 1 e 2	elevati	molto elevati
Iperensione arteriosa con cardiomiopatia	elevati	normali o elevati
Aritmie atriali e sopra-ventricolari parossistiche	elevati o molto elevati	normali o elevati
Miocardite	elevati	elevati
Amiloidosi e sarcoidosi cardiache	elevati	elevati
Dissezione aortica	elevati	normali o elevati
Sindrome di Takotsubo	elevati	normali o elevati
Malattie polmonari		
Embolia polmonare	elevati	normali o elevati
Malattia polmonare cronica ostruttiva	elevati	normali o elevati
Insufficienza renale acuta e cronica	molto elevati	normali o elevati
Ictus ischemico e emorragia subaracnoidea	elevati	normali o elevati
Sincope	elevati	normali o elevati
Sepsi, shock settico	molto elevati	elevati

invalidanti in pazienti ammessi al PS in condizioni critiche (73-75,88,91,93,96-99,106-110).

Sebbene in molte condizioni cliniche acute, sia cardiache che extra-cardiache, i due biomarcatori cardio-specifici risultino quasi sempre entrambi sopra la soglia critica, molto spesso un biomarcatore risulta molto più elevato dell'altro. Nella Tabella 3 abbiamo riportato alcune condizioni cliniche con i rispettivi livelli circolanti di PNC e troponine, che possono essere elevati in misura differente (rispetto al valore decisionale). Il rapporto tra i livelli circolanti dei due biomarcatori nelle differenti condizioni cliniche acute o croniche copre un ampio spettro di valori e può, quindi, essere utilizzato come una utile informazione aggiuntiva da utilizzare per la diagnosi differenziale. Per esempio si può considerare da una parte l'infarto acuto del miocardio di tipo 1, che presenta elevatissimi livelli circolanti di hs-cTnI e cTnT (maggiori di più di tre volte il 99° percentile URL) (Figura 2) (3,4). Tuttavia, i valori di PNC nei pazienti con IM sono generalmente elevati non più di due o tre volte il valore decisionale (39), a meno che non sia presente anche una severa disfunzione ventricolare con uno shock cardiogeno (100,110). Dall'altra parte dello spettro, si può considerare un episodio acuto di SC, in cui i valori di PNC sono in genere molto elevati di più di cinque volte il valore soglia (distinto per età e sesso) (1,2,39), mentre spesso i valori delle troponine cardiache non sono generalmente così aumentati, a meno che non sia presente anche un infarto acuto del miocardio di tipo 1 o 2 (3,111). Infine, nelle aritmie atriali (fibrillazione e flutter) i valori di PNC sono generalmente elevati, mentre quelli delle hs-cTn possono essere, soprattutto nei pazienti più giovani, al di sotto del 99° percentile URL, suggerendo che in questi pazienti l'episodio aritmico acuto non ha provocato un significativo danno cardiaco (39,95-98,112).

CONCLUSIONI

Molte evidenze sperimentali e cliniche dimostrano come la misura combinata dei PNC e delle troponine nei pazienti con sospetto di disfunzione e/o danno miocardico sia utile per il clinico e soprattutto vantaggiosa per il paziente. Infatti da un punto di vista fisiopatologico, elevati livelli di PNC indicano che agenti o situazioni stressanti stanno causando una alterazione della funzione cardiaca (6). D'altra parte, un aumento sopra il 99° percentile URL dei livelli circolanti di troponine, misurate con metodi a elevata sensibilità, certifica che è presente un danno cardiaco (*myocardial injury*) (3). Quindi, la misura combinata dei due marcatori cardio-specifici fornisce informazioni fisiopatologiche ed anche cliniche distinte e complementari nei pazienti con sospetto di malattie cardiovascolari.

In particolare, ormai molti hanno dimostrato che nei pazienti che si presentano al PS in condizioni critiche, l'utilizzo combinato dei due marcatori cardio-specifici risulta di ausilio nella diagnosi differenziale e nella stratificazione del rischio, ma soprattutto è in grado di

evidenziare precocemente una disfunzione e un danno cardiaco. Questa evidenza precoce di un danno miocardico consente al clinico di instaurare precocemente una terapia più adeguata e più efficace per il paziente, soprattutto in alcune condizioni critiche, in cui il primitivo meccanismo fisiopatologico dell'evento acuto non sia di natura cardiaca (ictus, embolia polmonare, sepsi).

In conclusione, le evidenze disponibili nella letteratura suggeriscono che la misura combinata dei PNC e delle troponine (con metodi ad alta sensibilità) risulta sempre appropriata soprattutto quando si sospetti una disfunzione ventricolare e/o un danno miocardico in un paziente che accede al PS per un evento acuto.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACCF/AHA/HFSA focused update for the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2017;136:e137-e161.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2016;18:891-975.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
4. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
5. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
6. Emdin M, Vittorini S, Passino C, et al. Old and new biomarkers of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009;11:331-5.
7. 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.
8. Passino C, Barison A, Vergaro G, et al. Markers of fibrosis, inflammation, and remodeling pathways in heart failure. *Clin Chim Acta* 2015;443:29-38.
9. Clerico A, Passino C, Franzini M, et al. Cardiac biomarker testing in the clinical laboratory: Where do we stand?

- General overview of the methodology with special emphasis on natriuretic peptides. *Clin Chim Acta* 2015; 443:17-24.
10. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: a multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 11. Aspromonte N, Gulizia MM, Clerico A, et al. ANMCO/ELAS/SIBioC Consensus Document: biomarkers in heart failure. *Eur Heart J Suppl.* 2017;19(Suppl D):D102-D112.
 12. Passino C, Aimo A, Masotti S, et al. Cardiac troponins and high sensitivity methods as biomarkers for cardiac disease. *Biomark Med* 2019;13:325-30.
 13. Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
 14. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 2015;161:1566-75.
 15. Lázár E, Sadek HA, Bergmann O. Cardiomyocyte renewal in the human heart: insights from the fall-out. *Eur Heart J* 2017;38:2333-42.
 16. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli M, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology, and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
 17. Franzini M, Lorenzoni V, Masotti S, et al. The calculation of the cardiac troponin T 99th percentile of the reference population is affected by age, gender, and population selection: A multicenter study in Italy. *Clin Chim Acta* 2015;438:376-81.
 18. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of reference change values for a hs-cTnI immunoassay using both plasma samples of healthy subjects and patients and quality control samples. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:e241-e243.
 19. Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high-sensitivity cTnI method: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;493:156-61.
 20. Clerico A, Masotti S, Musetti V, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of the hs-cTnI method using ADVIA Centaur XTP platform: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;495:161-6.
 21. Masotti S, Musetti V, Aloe R, et al. Evaluation of 99th percentile value of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chim Acta* 2019;496:45-7.
 22. Clerico A, Zaninotto M, Masotti S et al. Calcolo e valutazione dei valori di riferimento della troponina cardiaca I (cTnI) misurata in un gruppo di volontari sani italiani con metodi immunometrici ad alta sensibilità: uno studio multicentrico. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1: S48-S53
 23. Sze J, Mooney J, Barzi F, et al. Cardiac troponin and its relationship to cardiovascular outcomes in community populations - A systematic review and meta-analysis. *Heart Lung Circ* 2016;25:217-28.
 24. Willeit P, Welsh P, Evans JDW, et al. High-sensitivity cardiac troponin concentration and risk of first-ever cardiovascular outcomes in 154,052 participants. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:558-68.
 25. Van der Linden N, Klinkenberg LJ, Bekers O, et al. Prognostic value of basal high-sensitive cardiac troponin levels on mortality in the general population: a meta-analysis. *Medicine* 2016;95:e5703.
 26. Sigurdardottir FD, Lynbakken MN, Holmen OL, et al. Relative prognostic value of cardiac troponin I and C-reactive protein in the general population (from the North-Trøndelag Health [HUNT] Study. *Am J Cardiol* 2018;121:949-55.
 27. Wetterstein N, Maisel A. Role of cardiac troponin levels in acute heart failure. *Card Fail Rev* 2015;1:102-6.
 28. Yousufuddin M, Abdalrhim AD, Wang Z, et al. Cardiac troponin in patients hospitalized with acute decompensated heart failure: A systematic review and meta-analysis. *J Hosp Med* 2016;11:446-54.
 29. Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin levels elevations not related to acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:623-34.
 30. Thygesen K. What's new in the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction? *Eur Heart J* 2018;39, 3757-65.
 31. Valentine CM, Tchong JE, Waites T. Translating the translation. What clinicians should know about the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2668-70.
 32. Prontera C, Zucchelli CG, Vittorini S, et al. Comparison between analytical performances of polyclonal and monoclonal electrochemiluminescence immunoassays for NT-proBNP. *Clin Chim Acta* 2009;400:70-3.
 33. Emdin A, Passino C, Prontera C, et al. Comparison of Brain Natriuretic (BNP) and amino-terminal proBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem* 2007;53:1289-97.
 34. Clerico A, Zaninotto M, Prontera C, et al. State of the art of BNP and NT-proBNP immunoassays: the CardioOrmoCheck study. *Clin Chim Acta* 2012;414:112-19.
 35. Luckenbill KN, Christenson RH, Jaffe AS, et al. Cross-reactivity of BNP, NT-proBNP, and proBNP in commercial BNP and NT-proBNP assays: preliminary observations from the IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem* 2008;54:619-21.
 36. Clerico A, Passino C, Franzini M, et al. Natriuretic peptides as biomarkers of cardiac endocrine function in heart failure: new challenges and perspectives. *Future Cardiol* 2016;12:573-84.
 37. Clerico A, Fontana M, Vittorini S, et al. The search for a pathophysiological link between gender, cardiac endocrine function, body mass regulation and cardiac mortality: proposal for a working hypothesis. *Clin Chim Acta* 2009;405:1-7.
 38. Emdin A, Passino C, Prontera C, et al. Comparison of Brain Natriuretic (BNP) and amino-terminal proBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem* 2007;53:1289-97.
 39. Mueller C, McDonald K, de Boer RA, et al. Heart Failure Association of the European Society of Cardiology practical guidance on the use of natriuretic peptide concentrations. *Eur J Heart Fail* 2019;21:715-31.
 40. Clerico A, Zaninotto M, Passino C, et al. New issues on measurement of B-type natriuretic peptides. *Clin Chem Lab Med* 2017;56:32-9.
 41. McCormack. Sacubitril/Valsartan: A review in chronic heart failure with reduced ejection fraction. *Drugs* 2016; 76:387-96.
 42. Packer M, McMurray JJ, Desai AS, et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with

- heart failure. *Circulation* 2015;131:54-61.
43. Hammarsten O, Fu MLX, Sigurjonsdottir R, et al. Troponin T percentiles from a random population sample, emergency room patients and patients with myocardial infarction. *Clin Chem* 2012;58:619-27.
 44. Irfan A, Twerenbold R, Reiter M, et al. Determinants of high-sensitivity troponin T among patients with a noncardiac cause of chest pain. *Am J Med* 2012;125:491-8.
 45. Lee KK, Noaman A, Vaswani A, et al. Prevalence, determinants, and clinical associations of high-sensitivity cardiac troponin in patients attending emergency departments. *Am J Med* 2019;132:110:e9-e22.
 46. Cediél G, Gonzalez-Del-Hoyo M, Carrasquer A, et al. Outcomes with type 2 myocardial infarction compared with nonischaemic myocardial injury. *Heart* 2017;103:616-22.
 47. Cediél G, Sandoval Y, Sexter A, et al. Risk Estimation in Type 2 Myocardial Infarction and Myocardial Injury: The TARRACO Risk Score. *Am J Med* 2019;132:217-26.
 48. Thygesen K, Mair J, Mueller C, et al. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: a position statement from the study group on biomarkers in cardiology of the ESC working group on acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012;33:2001-6.
 49. Steen H, Futterer S, Merten C, et al. Relative role of NT-proBNP and cardiac troponin T at 96 hours for estimation of infarct size and left ventricular function after acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson* 2007;9:749-58.
 50. Mayr A, Mair J, Schocke M, et al. Predictive value of NT-proBNP after acute myocardial infarction: relation with acute and chronic infarct size and myocardial function. *Int J Cardiol* 2011;147:118-23.
 51. Jarai R, Fellner B, Haoula D, et al. Early assessment of outcome in cardiogenic shock: relevance of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and interleukin-6 levels. *Crit Care Med* 2009;37:1873-44.
 52. Rozen G, Hosseini SM, Kaaden MI, et al. Emergency department visits for atrial fibrillation in the United States: trends in admission rates and economic burden from 2007 to 2014. *J Am Heart Assoc* 2018;7:e009024.
 53. Violi F, Soliman EZ, Pignatelli P, et al. Atrial Fibrillation and myocardial infarction: A systematic review and appraisal of pathophysiological mechanisms. *J Am Heart Assoc* 2016;5:e003347.
 54. Ruddox V, Sandven I, Munkhaugen J, et al. Atrial fibrillation and the risk for myocardial infarction, all-cause mortality and heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol* 2017;24:1555-66.
 55. Schnabel RB, Larson MG, Yamamoto JF, et al. Relations of biomarkers of distinct pathophysiological pathways and atrial fibrillation incidence in the community. *Circulation* 2010;121:200-7.
 56. Möllmann H, Weber M, Elsässer A, et al. NT-ProBNP predicts rhythm stability after cardioversion of lone atrial fibrillation. *Circ J* 2008;72:921-5.
 57. Danicek V, Theodorovich N, Bar-Chaim S, et al. Sinus rhythm restoration after atrial fibrillation: the clinical value of N-terminal pro-BNP measurements. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008;31:955-60.
 58. Shin DI, Jaekel K, Schley P, et al. Plasma levels of NT-pro-BNP in patients with atrial fibrillation before and after electrical cardioversion. *Z Kardiol* 2005;94:795-800.
 59. Buob A, Jung J, Siaplaouras S, et al. Discordant regulation of CRP and NT-proBNP plasma levels after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006;29:559-63.
 60. Kallergis EM, Manios EG, Kanoupakis EM, et al. Effect of sinus rhythm restoration after electrical cardioversion on apelin and brain natriuretic peptide prohormone levels in patients with persistent atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2010;105:90-4.
 61. Costabel P, Burgos M, Trivi M. The significance of troponin elevation in atrial fibrillation. *J Atr Fibrillation* 2017;9:1530.
 62. Parwani AS, Boldt LH, Huemer M, et al. Atrial fibrillation-induced cardiac troponin I release. *Int J Cardiol* 2013;168:2743-7.
 63. Thelin J, Melander O. Dynamic high-sensitivity troponin elevations in atrial fibrillation patients might not be associated with significant coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord* 2017;17:169.
 64. Shen WK, Sheldon RS, Benditt DG, et al. 2017 ACC/AHA/HRS Guidelines for the evaluation and management of syncope: Executive Summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines and Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:620-63.
 65. Brignole M, Moya A, de Lange FJ, et al.; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC Guidelines for the diagnosis and management of syncope. *Eur Heart J* 2018;39:1883-948.
 66. Pfister R, Diedrichs H, Larbig R, et al. NT-pro-BNP for differential diagnosis in patients with syncope. *Int J Cardiol* 2009;133:51-4.
 67. du Fay de Lavallaz J, Badertscher P, Nestelberger T, et al. B-type natriuretic peptides and cardiac troponins for diagnosis and risk-stratification of syncope. *Circulation*. 2019 doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038358.
 68. Isbitan A, Hawatmeh A, ElnaharY, et al. Utility of brain natriuretic peptide assay as a predictor of short term outcomes in patients presenting with syncope to the emergency department. *Cardiovasc Diagn Ther* 2016;6:234-40.
 69. Thiruganasambandamoorthy V, Ramaekers R, Rahman MO, et al. Prognostic value of cardiac biomarkers in the risk stratification of syncope: a systematic review. *Intern Emerg Med* 2015;10:1003-14.
 70. Konstantinidis SV, Meyer G, Becattini C, et al. Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS). *Eur Heart J* 2020; 41:543-603.
 71. Rivera-Lebron B, McDaniel M, Ahrar K, et al. Diagnosis, treatment and follow up of acute pulmonary embolism: Consensus practice from the PERT Consortium. *Clin Appl Tromb Hemost* 2019;25:1-6.
 72. Klok FA, Mos IC, Huisman MV. Brain-type natriuretic peptide levels in the prediction of adverse outcome in patients with pulmonary embolism: a systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:425-30.
 73. Becattini C, Vedovati MC, Agnelli G. Prognostic value of troponins in acute pulmonary embolism: a meta-analysis. *Circulation* 2007;116:427-33.
 74. Bajaj A, Saleeb M, Rathor P, et al. Prognostic value of troponins in acute non massive pulmonary embolism: A meta-analysis. *Heart Lung* 2015;44:327-34.
 75. Barco S, Mahmoudpour SH, Planquette B, et al. Prognostic value of right ventricular dysfunction or elevated cardiac biomarkers in patients with low-risk pulmonary embolism: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 2019;40:902-10.
 76. Alleanza italiana per le malattie cardio-cerebrovascolari. Ministero della Salute. Documento di Strategia. 2017. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2606_a

- llegato.pdf (ultimo accesso: gennaio 2020).
77. Adams HP, Jr, Del Zoppo G, Alberts MJ et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Circulation* 2007;115, e478-e534.
 78. Saenger AK, Christenson RH. Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation and treatment. *Clin Chem* 2010;56:21-33.
 79. Monbailliu T, Goossens J, Hachimi-Idrissi S. Blood protein biomarkers as diagnostic tool for ischemic stroke: a systematic review. *Biomark Med* 2017;11:503-12.
 80. Lombart V, Antolin-Fontes A, Bustamante A, et al. Natriuretic peptides help in cardioembolic stroke diagnosis. Pooled data meta-analysis. *Stroke* 2015;46:1187-95.
 81. Bai J, Sun H, Xie L, et al. Detection of cardioembolic stroke with B-type natriuretic peptide or N-terminal pro-BNP: a comparative diagnostic meta-analysis. *Int J Neurosci* 2018;128:1100-8.
 82. Nakamura M, Ishibashi Y, Tanaka F, et al. Ability of B-type natriuretic peptide testing to predict cardioembolic stroke in the general population. Comparison with C-reactive protein and urinary albumin. *Circ J* 2018;82:1017-25.
 83. Wei W, Chen Y, Lei D, et al. Plasma brain natriuretic peptide is a biomarker for screening ischemic cerebral small vessel disease in patients with hypertension. *Medicine* 2018;97:35e12088.
 84. Tomich C, Liegey JS, Sagnier S et al. Contribution of routine cardiac biological markers to the etiological workup of ischemic stroke. *Am J Emerg Med* 2019;37:194-8.
 85. Rodríguez-Castro E, Hervella P, López-Dequid I, et al. NT-pro-BNP: A novel predictor of stroke risk after transient ischemic attack. *Int J Cardiol* 2020; 298:93-7.
 86. Dous G, Grigos AC, Grodman R. Elevated troponin in patients with acute stroke – Is it a true heart attack? *Egyptian Heart J* 2017;69:165-70.
 87. Scheitz JF, Nolte CH, Laufs U, et al. Application and interpretation of high-sensitivity cardiac troponin assays in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2015;46:1132-40.
 88. Fan Y, Jiang M, Gong D, et al. Cardiac troponin for predicting all-cause mortality in patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis. *Biosci Rep* 2018 doi: 10.1042/BSR20171178
 89. He L, Wang J, Dong W. The clinical prognostic significance of hscTnT elevation in patients with acute ischemic stroke. *BMC Neurology* 2018;18:118.
 90. Cao YZ, Zhao LB, Liu S, et al. Prognostic value of elevated high-sensitivity cardiac troponin T levels in patients with acute ischemic stroke treated with endovascular thrombectomy. *J Clin Neurosci* 2019;64:145-9.
 91. Jia X, Sun W, Hoogeveen RC, et al. High-sensitivity Troponin I and incident coronary events, stroke, heart failure hospitalization, and mortality in the ARIC Study. *Circulation* 2019;139:2642-53.
 92. Sui Y, Liu T, Luo J, et al. Elevation of high-sensitivity cardiac troponin T at admission is associated with increased 3-month mortality in acute ischemic stroke patients treated with thrombolysis. *Clin Cardiol* 2019; 42:881-8.
 93. Zhang L, Wang Z, Qi S. Cardiac Troponin elevation and outcome after subarachnoid hemorrhage: A systematic review and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015;24:2375-84.
 94. Singer M, Deuschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definition for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
 95. Luhr R, Cao Y, Söderquist B, et al. Trends in sepsis mortality over time in randomised sepsis trials: a systematic literature review and meta-analysis of mortality in the control arm, 2002–2016. *Critical Care* 2019;23:241.
 96. Clerico A, Plebani M. Biomarkers for sepsis: an unfinished journey. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1135-8.
 97. Wang F, Wu Y, Tang L, et al. Brain natriuretic peptide for prediction of mortality in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2012;16:R74.
 98. Bai YL, Hu BL, Wen Hc, et al. Prognostic value of plasma brain natriuretic peptide value for patients with sepsis: A meta-analysis. *J Crit Care* 2018;48:145-52.
 99. Kakoullis L, Giannopoulou E, Papachristodoulou E, et al. The utility of brain natriuretic peptides in septic shock as markers for mortality and cardiac dysfunction: A systematic review. *Int J Clin Pract* 2019;73:e13374.
 100. Latini R, Caironi P, Masson S. Cardiac dysfunction and circulating cardiac markers during sepsis. *Minerva Anesthesiol* 2016;82:697-710.
 101. Hussein N. Elevated cardiac troponins in setting of systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *ISRN Cardiology* 2013;ID 723435.
 102. Saad YM, McEwan J, Shugman IM, et al. Use of a high-sensitivity troponin T assay in the assessment and disposition of patients attending a tertiary Australian emergency department: a cross-sectional pilot study. *Emerg Med Australas* 2015;27:405-11.
 103. Vallabhajosyula S, Kakhuja A, Geske JB, et al. Role of admission troponin-T and serial troponin-T testing in predicting outcomes in severe sepsis and septic shock. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e005930.
 104. Yang CW, Li H, Thomas L, et al. Retrospective cause analysis of troponin I elevation in non-CAD patients. Special emphasis on sepsis. *Medicine* 2017; 96:37(e8027).
 105. Andersson P, Frigyesi A. High-sensitivity troponin T is an important independent predictor in addition to the Simplified Acute Physiology Score for short-term ICU mortality, particularly in patients with sepsis. *J Crit Care* 2019;53:218-22.
 106. Ehrman RR, Sullivan AN, Favot MJ, et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature. *Crit Care* 2018;22:112.
 107. Frencken JF, Donker DW, Koster-Brouwer ME, et al. Myocardial injury in patients with sepsis and its association with long-term outcome. *Circ Cardiovasc Qual Outcome* 2018;11:e004040.
 108. Frencken JF, van Baal L, Kappen TH, et al. Myocardial injury in critically ill patients with community-acquired pneumonia. A Cohort Study. *Ann Am Thorac Soc* 2019;16:606-12.
 109. Kim JS, Kim M, Kim YJ, et al. Troponin testing for assessing sepsis-induced myocardial dysfunction in patients with septic shock. *J Clin Med* 2019;8:239.
 110. Masson S, Caironi P, Fanizza C, et al. Albumin Italian Outcome Sepsis Study Investigators. Sequential N-

Terminal pro-B-type natriuretic peptide and high-sensitivity cardiac troponin measurements during albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *Crit Care Med* 2016;44:707-16.

111. Eggers KM, Lindahl B. Application of cardiac troponin in cardiovascular diseases other than acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2017;63:223-35.
112. Costabel P, Burgos M, Trivi M. The significance of troponin elevation in atrial fibrillation. *J Atr Fibrillation* 2017;9:1530.

Calcolo e valutazione dei valori di riferimento della troponina cardiaca I (cTnI) misurata in un gruppo di volontari sani italiani con metodi immunometrici ad alta sensibilità: uno studio multicentrico

Studio promosso dal Gruppo di Studio Inter-Societario dei Marcatori Cardiaci della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) e dalla Sezione Italiana della European Ligand Assay Society (ELAS).

Aldo Clerico¹, Martina Zaninotto², Silvia Masotti¹, Veronica Musetti¹, Andrea Ripoli¹, Andrea Padoan², Rosalia Aloe³, Sara Rizzardi⁴, Ruggero Dittadi⁵, Cinzia Carrozza⁶, Lucia Belloni⁷, Marco Perrone⁸, Tommaso Fasano⁷, Mario Correale⁹, Concetta Prontera¹, Simona Storti¹, Cristina Guiotto¹⁰, Marco Migliardi¹⁰, Sergio Bernardini⁸, Mario Plebani²

¹Laboratorio Clinico, Fondazione CNR-Regione Toscana, G. Monasterio e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa.

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale, Università di Padova, Padova.

³Struttura Semplice Dipartimentale Biochimica ad Elevata Automazione, Dipartimento Diagnostico Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

⁴Azienda Socio-Sanitaria Territoriale di Cremona, Unità Operativa Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Cremona.

⁵Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Ospedale dell'Angelo ULSS 3 Serenissima, Mestre.

⁶Unità Operativa Complessa Chimica, Biochimica e Biologia Molecolare Clinica, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli", IRCCS, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

⁷Laboratorio di Autoimmunità, Allergologia e Biotecnologie Innovative, Azienda Unità Sanitaria Locale, IRCCS, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche ed Endocrinologia-Arcispedale S.Maria Nuova, Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia.

⁸Laboratorio Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Tor Vergata, Roma.

⁹Unità di Patologia Clinica, IRCCS De Bellis, Castellana Grotte, e Laboratorio di Analisi Cliniche e Microbiologiche Polo Ospedaliero San Paolo Bari.

¹⁰Struttura Complessa Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano di Torino.

ABSTRACT

Establishment and evaluation of cardiac troponin I reference values measured in a group of Italian healthy volunteers using high-sensitivity methods: a multi-center study.

Introduction: this study compares the cardiac troponin I (cTnI) values measured with three high-sensitivity (hs) different methods in apparently healthy volunteers enrolled in a multicenter study.

Methods: heparinized plasma samples were collected from 1511 volunteers in 8 Italian clinical institutions (mean age 51.5 years, SD 14.2, range 18-86, female to male ratio 0.94). All volunteers denied chronic or acute diseases and had normal values of routine laboratory tests and ECG. The reference laboratory of the study (Laboratorio Fondazione Regione Toscana G. Monasterio, Pisa, Italy) assayed all plasma samples with three hs-methods: Architect hs-cTnI, Access hs-cTnI and ADVIA Centaur XPT hs-cTnI. After the exclusion of outlier values, calculation of 99th percentile (Upper Reference Limit, URL) values was performed using both robust nonparametric and bias corrected and accelerated bootstrap methods.

Results: large between-method differences were found. ADVIA Centaur measured higher cTnI values (up to 2-fold) than the two other methods. cTnI values were significantly higher in men than in women, and progressively increased with age over 55 years. Moreover, 99th percentile URL values also depended on the statistical approach used for calculation (robust non-parametric *versus* bootstrap). All 99th percentile URL values calculated with non-parametric robust method were on average slightly lower than those suggested by manufacturers (mean difference 4.2 ng/L, standard error 1.7, p=0.0273).

Conclusion: clinicians should be advised that plasma samples from the same patient should be measured for hs-cTnI in the same laboratory. Specific clinical studies are needed to establish the most appropriate statistical approach to calculate 99th percentile URL values for hs-cTnI methods.

Questo documento intersocietario è pubblicato congiuntamente da Biochimica Clinica e da Ligand Assay

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Fondazione CNR Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 41, 56126 Pisa, E-mail clerico@ftgm.it

Ricevuto: 16.06.2019

Revisionato: 03.09.2019

Accettato: 14.09.2019

Pubblicato on-line: 15.11.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.065

INTRODUZIONE

Le troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) sono ormai universalmente considerate come i biomarcatori di scelta per la diagnosi differenziale delle sindromi coronariche acute (SCA) (1-3). Le linee guida internazionali raccomandano come valore di riferimento il 99° percentile della distribuzione nella popolazione di riferimento (URL) del biomarcatore. In particolare, il documento *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction*, pubblicato nel settembre del 2018, stabilisce che è sufficiente anche un solo valore al di sopra del 99° percentile URL per accertare la presenza di un danno cardiaco (*myocardial injury*) (3). Inoltre, le linee guida raccomandano che il valore di riferimento sia misurato con una imprecisione minore o uguale al 10% (1-3). Infine, un danno del miocardio è definito acuto se presenta nel corso di un certo periodo di tempo (in genere da 1 a 3 ore) una tendenza significativa ad un aumento e/o diminuzione nella concentrazione del biomarcatore (3).

In questi ultimi 10 anni si è assistito ad un progressivo miglioramento delle prestazioni analitiche dei metodi immunometrici per la misura di cTnI e cTnT (4-12). È importante sottolineare che solo i metodi che sono in grado di soddisfare le specifiche di qualità stabilite dalle linee guida internazionali si devono definire ad alta sensibilità (*high-sensitivity*, hs) (12,13). Queste specifiche di qualità, come anche la terminologia appropriata per definire i metodi hs-Tn, sono state recepite integralmente in un documento ufficiale SIBioC pubblicato nel 2018 (13). Il documento pubblicato nel 2018 dalle società internazionali *American Association for Clinical Chemistry* (AACC) e IFCC ha chiaramente stabilito che due criteri si devono ritenere fondamentali per stabilire se un metodo di misura per le troponine cardiache può essere definito ad alta sensibilità (*hs-cTn methods*) (2). Il primo criterio stabilisce che un metodo hs-cTn debba misurare il 99° percentile URL con una imprecisione (espressa come CV) $\leq 10\%$ (2). Il secondo criterio stabilisce che un metodo hs-cTn deve misurare livelli del biomarcatore al di sopra del valore del *limit of detection* (LoD) in oltre il 50% di una popolazione costituita da almeno 300 individui apparentemente sani, sia di donne che di uomini (2). Poiché le donne mostrano in media valori di cTn più bassi rispetto agli uomini di pari età, questo secondo criterio, in pratica, richiede che un metodo-hs misuri valori cTn al di sopra del valore di LoD nella maggioranza di una popolazione di almeno 300 donne apparentemente sane. Infine, tutte le più recenti linee guida raccomandano che tutti i laboratori clinici utilizzino preferibilmente metodi ad alta sensibilità per la misura di cTnI e cTnT per la diagnosi differenziale delle SCA in pazienti ammessi al pronto soccorso (1-3).

Sebbene le più recenti linee guida abbiano fatto indubbiamente chiarezza sulla definizione di danno cardiaco e infarto del miocardio (3) e sulle specifiche di qualità dei metodi hs-Tn (2), rimangono ancora non pochi problemi irrisolti sia dal punto di vista analitico (12) che di interpretazione clinica dei risultati ottenuti con i

metodi hs-cTn in pazienti con malattie sia cardiache che extra-cardiache (13-19).

Molti studi hanno, infatti, dimostrato come il valore del 99° percentile URL dipenda non solo dal metodo di misura della cTn, ma anche dalle caratteristiche demografiche della popolazione di riferimento (età, rapporto tra i sessi e criteri di inclusione/esclusione dei soggetti arruolati) e persino dal metodo statistico utilizzato per il calcolo della distribuzione dei valori di cTn (14,15). Data la fondamentale importanza non solo clinica, ma anche anatomo-patologica e forense, di questo parametro come valore decisionale nella rilevazione del danno cardiaco (3), risulta essenziale comprendere le tematiche legate alla sua valutazione nella popolazione di riferimento (14,15), alla sua interpretazione fisiopatologica (4,5,16-18) e infine alla sua applicazione in ambito clinico (1-3, 18,19).

Nel 2016, le linee guida della *European Society of Cardiology* (ESC) hanno suggerito differenti algoritmi per la diagnosi differenziale di SCA, con una tempistica che può variare da 0 a 3 ore a seconda delle condizioni cliniche del paziente ammesso al dipartimento di emergenza/urgenza (DE) (1). Queste linee guida, in accordo con recenti studi clinici, stabiliscono che il migliore approccio per la valutazione clinica delle variazioni significative in aumento/diminuzione di cTnI e cTnT è quello di valutare la variazione in valore assoluto delle concentrazioni (in ng/L), piuttosto che la variazione percentuale, soprattutto quando si utilizzino metodi hs (1). La valutazione della variazione statisticamente significativa tra due misure consecutive del biomarcatore (*Reference Change Value*, RCV) richiede che siano accuratamente determinate sia la variabilità analitica del metodo, che la variabilità biologica del biomarcatore (20).

Come puntualizzato anche dalle più recenti linee guida (3), i singoli laboratori clinici possono non essere in grado di affrontare i complessi problemi analitici e organizzativi derivanti da una valutazione accurata della distribuzione di cTnI e cTnT in una popolazione di riferimento apparentemente sana, come anche il successivo calcolo del valore di riferimento (cioè il valore del 99° percentile URL), con algoritmi matematico-statistici adeguati. Di tale impegno, infatti, si dovrebbero fare carico le Società Scientifiche Nazionali e Internazionali in collaborazione con le aziende produttrici dei metodi di misura (3). In particolare, le linee guida AACC/IFCC del 2018 raccomandano che il valore del 99° percentile URL sia calcolato in una popolazione campione che abbia le stesse caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti che si presentano al DE, cioè che sia composta da volontari adulti apparentemente sani che costituiscano un campione rappresentativo della popolazione residente nell'area geografica considerata (2,3).

Pertanto, in accordo con le raccomandazioni delle linee guida internazionali (3), le Società Italiane SIBioC ed *European Ligand Assay Society* (ELAS Italia) hanno promosso fin dal 2017 uno studio multicentrico con lo scopo di valutare sia le prestazioni analitiche che i valori

di riferimento dei più recenti e comuni metodi per la misura della cTnI, resi disponibili in Italia dalle aziende produttrici. Negli anni 2017 e 2018, sono già stati pubblicati i primi risultati di questo studio inter-societario multicentrico, relativi alla valutazione delle prestazioni di alcuni nuovi metodi con caratteristiche analitiche che sembrano soddisfare il primo criterio per la definizione di metodi ad alta sensibilità per la misura della cTnI (metodi hs-cTnI) (8-11). Più recentemente, sono stati riportati i risultati preliminari della distribuzione dei valori della hs-cTnI in una popolazione italiana di riferimento, calcolando sia il valore del 99° percentile URL, che i rispettivi RCV di questi metodi (21-23).

Scopo di questo articolo è quello di descrivere i risultati definitivi dello studio multicentrico promosso dalle Società SIBioC ed ELAS riguardanti la distribuzione dei valori, la valutazione del 99° percentile e dei valori di riferimento nella popolazione italiana utilizzando metodi hs-cTnI. Verranno anche discusse alcune problematiche relative sia all'arruolamento che al calcolo dei valori di riferimento, come pure all'interpretazione fisiopatologica e all'utilizzo clinico dei risultati ottenuti con questi metodi hs-cTnI.

METODI

Popolazione di riferimento e raccolta dei campioni plasmatici

Lo studio descrive i risultati ottenuti in una vasta popolazione costituita da 1511 volontari, adulti apparentemente sani, arruolati da 8 centri clinici¹ e di ricerca italiani, con una età compresa da 18 a 86 anni.

Il laboratorio clinico di ciascun centro partecipante allo studio ha raccolto da 50 a 150 campioni di soggetti volontari, di entrambi i sessi. Questi soggetti sono stati scelti perché sottoposti a visite periodiche di medicina preventiva o perché sottoposti ai controlli previsti dalla legge vigente per i donatori di sangue. Il volume del plasma utilizzato per il presente studio multicentrico è quindi il residuo del campione di plasma originale rimasto dopo aver effettuato gli esami di controllo presso il laboratorio clinico. In accordo con le raccomandazioni delle linee guida internazionali (2), tutti i soggetti volontari hanno negato la presenza di malattie croniche o acute in atto e presentavano valori nella norma degli esami di laboratorio di base eseguiti in queste popolazioni (inclusi: emocromo, glucosio, creatinina e troponina I o T con i metodi utilizzati nella routine clinica

del laboratorio). I soggetti volontari hanno inoltre negato il consumo continuativo di droghe voluttuarie, come anche di integratori alimentari, inclusi i preparati contenenti vitamine del gruppo B. Sono stati esclusi soggetti che hanno riferito di aver praticato attività fisica intensa (come una gara od un allenamento sportivo) nei tre giorni precedenti il prelievo.

Per valutare più accuratamente le concentrazioni di cTnI nei soggetti con età maggiore di 47 anni (età media 63,0 anni, DS 8,1), sono stati arruolati 457 soggetti volontari dello studio Montignoso Heart Lung Project (MEHLP), come precedentemente descritto (24). Questi soggetti sono stati sottoposti ad una accurata visita cardiologica, che includeva elettrocardiogramma (ECG), misura della pressione arteriosa, esame ecografico del cuore e delle carotidi, tomografia assiale computerizzata per la valutazione della presenza di calcificazioni cardiache e determinazione delle concentrazioni di cTnI e del frammento amminotermale del pro peptide natriuretico di tipo BNT/NT-proBNP (24). Criteri di esclusione erano: pregresse malattie cardiache, ipertensione arteriosa sistemica, diabete, obesità, segni di malattia aterosclerotica sistemica, malattie tumorali, epatiti, broncopneumopatie croniche ostruttive e l'uso continuativo di farmaci e droghe d'abuso (24).

Ogni laboratorio ha conservato i campioni a temperature comprese da -25°C a -80°C in due distinte provette contenenti ciascuna circa 1 mL di plasma eparinato. Solo i campioni plasmatici esenti da emolisi visibile sono stati conservati. Le provette sono state identificate mediante un codice alfanumerico, stabilito dal laboratorio, in modo tale da rendere anonime le generalità del soggetto. Le provette sono state poi spedite, entro due mesi dalla raccolta, al laboratorio di riferimento dello studio (Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa) con un trasporto autorizzato utilizzando un apposito contenitore contenente ghiaccio secco. Il pacco contenente le provette era accompagnato da una lista in cui erano elencati i campioni dei soggetti con il rispettivo codice alfanumerico e con l'indicazione dell'età e del sesso. All'arrivo presso il laboratorio di riferimento (durata del viaggio di trasporto meno di 36 ore), le provette sono state classificate e conservate da -25°C a -80°C fino al momento della determinazione di cTnI con i tre metodi, che è avvenuta entro tre mesi dalla data di spedizione. Il periodo complessivo dello studio, partendo dalla raccolta fino al momento della determinazione dell'ultimo gruppo di campioni ricevuti dal laboratorio di riferimento, si è

¹Elenco dei laboratori che hanno partecipato allo studio multicentrico.

1. Unità Operativa Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Cremona
2. Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Ospedale dell'Angelo ULSS 3 Serenissima, Mestre.
3. Laboratorio Arcispedale S. Maria Nuova, Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia.
4. Laboratorio di Analisi Cliniche e Microbiologiche Polo Ospedaliero San Paolo Bari.
5. Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano di Torino
6. Dipartimento di Biochimica ad Elevata Automazione, Dipartimento Diagnostico Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.
7. Laboratorio Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Tor Vergata, Roma
8. Laboratorio Clinico Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa e Massa

protratto da dicembre 2017 fino a marzo 2019. Le provette sono state scongelate una sola volta prima della determinazione. Prima della misura con i metodi hs-cTnI tutti i campioni plasmatici sono stati di nuovo controllati per la presenza di emolisi ed eventuali filamenti di fibrina.

Tutti i soggetti volontari hanno fornito il loro consenso alla partecipazione dello studio in accordo con le linee guida interne e dei comitati etici delle istituzioni cliniche e di ricerca partecipanti allo studio.

Metodi per la determinazione della hs-cTnI

La determinazione della distribuzione dei valori di cTnI nella popolazione di riferimento italiana è stata effettuata utilizzando tre differenti metodi immunometrici ad alta sensibilità: il metodo Access hs-cTnI (Beckman Coulter Diagnostics, USA), il metodo Architect hs-cTnI (Abbott Diagnostics, USA) e il metodo ADVIA Centaur XPT hs-cTnI (Siemens Healthineers Diagnostics, Germany). Le prestazioni analitiche di questi metodi sono state valutate dal laboratorio di riferimento, utilizzando protocolli internazionali standardizzati (25,26), come riportato in articoli precedentemente pubblicati (8-12). I valori del bianco del metodo (LoB), del limite di misura (LoD) e i valori di quantificazione al 20% (LoQ 20%) e al 10% CV (LoQ 10%) dei tre metodi hs-cTnI ottenuti negli studi indicati sono riportati nella Tabella 1.

La valutazione delle prestazioni analitiche del metodo hs-cTnI (REF 3P25-27), che utilizza la piattaforma i1000SR (ARCHITECT STAT High Sensitive Troponin-I, Abbott Diagnostics Division, Ireland), è stata precedentemente riportata (8,9). In particolare, il metodo hs-cTnI Architect è un sistema immunometrico in chemiluminescenza che utilizza rispettivamente due anticorpi monoclonali con epitopi 24-40 (anticorpo di cattura) e 41-49 (anticorpo di rilevazione) della cTnI umana. Come standard di riferimento, utilizzato per la curva di calibrazione, questo metodo utilizza cTnI ricombinante umana tracciabile con lo standard di riferimento internazionale (SRM) del *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

Le caratteristiche analitiche del metodo Access hsTnI (REF B52699), che utilizza la piattaforma Dxl (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA 92821 USA), sono state precedentemente valutate e riportate in dettaglio (9) (Tabella 1). In particolare, il metodo hs-cTnI Access è un metodo immunometrico in chemiluminescenza che utilizza due anticorpi monoclonali rispettivamente specifici per gli epitopi 41-49 (anticorpo di cattura) e 80-90 (anticorpo di rilevazione) della cTnI umana. Il complesso della cTnI umana ricombinante è utilizzato come standard interno per la costruzione della curva di calibrazione.

Le prestazioni analitiche del metodo ADVIA High-Sensitivity Troponin, che utilizza la piattaforma Centaur XPT (Ref. 10994774-5, Siemens Healthineers Diagnostics), sono state precedentemente valutate e riportate in dettaglio (11) (Tabella 1). Il metodo ADVIA XPT è un sistema immunometrico tipo sandwich a tre siti, che utilizza la rilevazione in chemiluminescenza. Per il sistema di cattura questo metodo utilizza due anticorpi monoclonali coniugati con streptavidina, mentre per la fase di rilevazione viene impiegato un anticorpo ricombinante di pecora contro la cTnI umana, che è covalentemente legato ad albumina bovina sierica. I due anticorpi di cattura sono specifici per due differenti epitopi posizionati nelle parti C- e N-terminali della cTnI umana, mentre l'anticorpo di rilevazione riconosce un epitopo a livello della regione N-terminale.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica di base è stato utilizzato il programma JMP (versione 12.1.0, SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA). Poiché i livelli circolanti di cTnI non sono normalmente distribuiti nella popolazione di riferimento, sono stati utilizzati metodi non-parametrici (generalmente il test di Wilcoxon/Kruskal Wallis, quando non altrimenti specificato nel testo). Metodi parametrici dopo trasformazione logaritmica (in base 10) dei dati originali sono stati utilizzati in alcuni casi come confronto rispetto ai metodi non parametrici, ma i risultati non sono stati riportati nel testo. In particolare, per il calcolo della media

Tabella 1

Parametri di sensibilità analitica dei tre metodi hs-cTnI valutati nello studio

Metodi	LoB (ng/L)	LoD (ng/L)	LoQ 20% CV (ng/L)	LoQ 10% CV (ng/L)	99° percentile URL* (ng/L)	Ratio**
Architect	0,7	1,3	1,8	4,7	26,2	5,6
Access Dxl	0,6	1,3	2,1	5,3	17,5	3,3
ADVIA XPT	1,0	2,2	3,5	8,4	47,3	5,6

*99°percentile URL: valore del 99° percentile URL raccomandato dalle aziende produttrici per la popolazione generale.

**Ratio: questo indice rappresenta il rapporto tra il valore del 99° percentile URL (ng/L) suggerito dalle aziende produttrici per la popolazione generale (riportato in colonna 6) e il rispettivo valore di LoQ 10% CV (ng/L) calcolato dal laboratorio di riferimento dello studio (riportato in colonna 5).

LoB, bianco del metodo; LoD, limite di misura; LoQ 20% CV, valore di quantificazione al 20% di CV; LoQ 10% CV, valore di quantificazione al 10% di CV; URL, upper reference limit.

e della DS sono stati utilizzati metodi robusti.

Per l'identificazione dei valori outlier della distribuzione di cTnI nella popolazione di riferimento è stato utilizzato il test di Tukey (27). Questo test utilizza l'intervallo interquartile (IQR) come parametro di *gating*, assumendo una distribuzione log-normale della cTnI nella popolazione di riferimento (27). I valori outlier sono stati calcolati utilizzando la seguente formula: $cTnI > Q3 + 3 \text{ IQR}$; dove, Q3 e IQR sono rispettivamente il terzo quartile e l'intervallo interquartile ($Q3 - Q1$) della distribuzione dei valori di cTnI.

Per il calcolo dei parametri di distribuzione di cTnI nella popolazione di riferimento è stato utilizzato un metodo robusto non parametrico come raccomandato dalle linee guida internazionali (2,14,15). Le rispettive distribuzioni log-normali sono state anche calcolate per confronto e per valutare la presenza di possibili valori outlier con il test di Tukey. Infine, le distribuzioni dei valori di cTnI nella popolazione di riferimento sono state calcolate anche con il metodo parametrico robusto *bias corrected and accelerated (BCa) bootstrap*, utilizzando un rimpiazzo random del 68,27 % della popolazione totale con 100 000 ripetizioni (28), utilizzando il pacchetto *boot* del programma statistico R (versione 3.4.4, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). In particolare, questo metodo statistico è stato utilizzato per il calcolo degli intervalli di confidenza al 95% e 99% (95%IC e 99%IC) per i valori del 99° percentile della distribuzione.

I valori uguali a 0 ng/L cTnI sono risultati essere circa il 2,5% del totale per il metodo hs-cTnI ADVIA Centaur XPT, e all'incirca lo 0,5% per i metodi hs-cTnI Access e hs-cTnI Architect. Questi valori di hs-cTnI, sono stati considerati uguali a 0,1 ng/L, quando sono state utilizzate le trasformate log in base 10. Questa variazione di valori (cioè da 0 a 0,1 ng/L) non ha generato modifiche nel calcolo dei parametri della distribuzione riportati nelle Tabelle 2-4 utilizzando sia il metodo robusto non-parametrico che il metodo BCa bootstrap. Per contro la sostituzione del valore 0 ng/L (e soprattutto di tutti valori di hs-cTnI al di sotto di LoB o LoD) con i rispettivi valori della LoB (o della LoD) per ogni metodo può portare a variazioni significative in alcuni parametri della distribuzione, soprattutto la mediana e il 25° percentile.

Per valutare le differenze sistematiche tra i tre metodi hs-cTnI, è stato utilizzato il classico protocollo sperimentale raccomandato da Bland & Altman, utilizzando sia la regressione lineare dei dati originali che la successiva analisi degli stessi per mezzo del Bland-Altman plot (29,30). Per un ulteriore confronto dei risultati ottenuti con i tre metodi, è stato utilizzato il metodo di analisi delle componenti principali *Principal Component Analysis (PCA)* (31,32). Questa analisi statistica consente di ridurre un numero elevato di variabili che descrivono un insieme di dati, ad un numero minore di variabili latenti, riducendo il più possibile la perdita di informazione, espressa come variabilità tra i valori osservati delle variabili (31,32). Questo risultato

viene ottenuto per mezzo di una trasformazione lineare delle variabili che proietta quelle originarie in un nuovo sistema cartesiano nel quale la nuova variabile con la maggiore varianza viene proiettata sul primo asse (prima componente principale), la seconda variabile per dimensione della varianza (seconda componente principale) sul secondo asse e così via, ottenendo dei vettori di trasformazione. Per questa analisi sono stati utilizzati i valori log-trasformati di cTnI. I vettori di trasformazione sono stati calcolati considerando la matrice di correlazione del sistema di tre variabili costituito dai valori di cTnI misurati dai tre metodi. Con l'approccio statistico della PCA è possibile costruire un tipo particolare di grafico, definito *loading plot*, nel quale le variabili sono riportate nel nuovo sistema avente per assi le componenti principali. Con questo tipo di grafico è possibile osservare se due variabili sono simili e pertanto forniscono la stessa tipologia di informazione. Variabili che forniscono simili tipologie di informazione sono riportate nel grafico in posizioni molto ravvicinate, mentre variabili posizionate più lontane nelle coordinate cartesiane, forniscono differenti tipologie di informazione.

RISULTATI

Distribuzione dei valori di cTnI nella popolazione di riferimento

Il numero totale di volontari arruolati nella popolazione originale era di 1526 individui. Considerando il risultato del test di Tukey, sono stati eliminati 15 individui (corrispondente allo 0,98 % del numero totale) che hanno mostrato valori elevati con tutti e tre i metodi. Pertanto, la popolazione di riferimento è risultata costituita da 1511 volontari apparentemente sani con un ampio intervallo di età (18-86 anni), di cui 734 donne (età media 51,8 anni, DS 14,4, valore minimo 18, massimo 86) e 777 uomini (età media 51,1 anni, DS 13,9, valore minimo 18, massimo 85). La popolazione di riferimento non presenta differenze significative in base all'età ($p=0,3570$, test di Wilcoxon) e ha un rapporto tra sessi (F/M) di 0,95. Purtroppo, la quantità di plasma raccolta non è stata sufficiente per misurare in tutti gli individui la cTnI con tutti e tre i metodi, quindi le distribuzioni del biomarcatore, misurate con i tre metodi, presentano numerosità differenti (Tabella 2).

I valori di cTnI misurati con i tre metodi evidenziano distribuzioni simili, molto asimmetriche, e che approssimano una distribuzione log-normale (Figura 1, pannelli A, B e C). I valori dei parametri di distribuzione delle concentrazioni di cTnI misurate con i tre metodi sono rispettivamente riportati nelle tabelle: Tabella 2 (metodo Architect), Tabella 3 (metodo Access) e Tabella 4 (metodo ADVIA). I valori di media, DS, mediana, intervallo inter-quartile e 97,5° percentile sono risultati non statisticamente differenti calcolati sia con il metodo non parametrico robusto, che con il metodo bootstrap (per questo motivo nelle Tabelle 2-4 viene riportato un solo valore per ognuno di questi parametri). Per contro, i

Tabella 2*Distribuzione dei valori di cTnI (ng/L) misurati con il metodo hs-cTnI Architect*

POPOLAZIONI	Media (DS)	Mediana	25° percentile	75° percentile	97,5° percentile	99° percentile	99° percentile BS (95%IC) (99%IC)
Popolazione totale (N= 1462)	2,5 (2,5)	1,8	1,2	2,8	9,6	18,1	14,4 (12,0-17,5) (11,4-19,2)
Donne (N=699)	1,8 (1,7)	1,4	0,9	2,3	6,5	11,5	9,7 (6,8-12,4) (6,7-12,5)
Uomini (N=763)	3,0 (3,0)	2,1	1,5	3,3	11,8	19,5	17,2 (14,2-20,6) (13,4-23,9)
Popolazione totale ≤ 55 anni (N= 824)	2,0 (2,1)	1,5	1,0	2,3	7,5	17,1	11,5 (8,7-16,9) (8,0-17,4)
Donne ≤ 55 anni (N= 388)	1,4 (1,2)	1,1	0,7	1,8	4,8	10,3	6,7 (5,0-11,0) (4,7-14,3)
Uomini ≤ 55 anni (N= 436)	2,5 (2,5)	1,8	1,3	2,8	9,5	18,2	15,8 (9,6-18,4) (9,1-18,9)
Popolazione totale > 55 anni (N= 638)	3,1 (3,1)	2,3	1,5	3,4	11,8	23,2	16,3 (12,5-22,7) (12,2-26,4)
Donne > 55 anni (N= 311)	2,4 (2,0)	1,9	1,3	2,8	7,9	15,9	10,2 (7,7-19,4) (7,0-20,2)
Uomini > 55 anni (N= 327)	3,8 (3,7)	2,7	1,9	4,0	14,9	28,0	20,3 (14,6-28,1) (13,7-28,1)

*BS, metodo bootstrap; 95%IC, intervallo di confidenza al 95%; 99%IC, intervallo di confidenza al 99%.***Tabella 3***Distribuzione dei valori di cTnI (ng/L) misurati con il metodo hs-cTnI Access*

POPOLAZIONI	Media (DS)	Mediana	25° percentile	75° percentile	97,5° percentile	99° percentile	99° percentile BS (95%IC) (99%IC)
Popolazione totale (N= 1460)	3,3 (2,5)	2,7	1,9	4,0	10,0	16,8	13,1 (11,8-15,2) (11,7-16,8)
Donne (N=703)	2,7 (1,9)	2,3	1,6	3,2	6,4	15,5	9,2 (7,2-14,2) (6,6-16,8)
Uomini (N=757)	3,9 (2,8)	3,2	2,3	4,6	11,8	17,5	14,0 (12,4-17,0) (12,1-19,5)
Popolazione totale ≤ 55 anni (N= 816)	2,7 (2,0)	2,3	1,6	3,3	8,1	15,1	11,5 (8,7-15,4) (8,4-16,6)

BS, metodo bootstrap; 95%IC, intervallo di confidenza al 95%; 99%IC, intervallo di confidenza al 99%.

Tabella 3
Continua

POPOLAZIONI	Media (DS)	Mediana	25° percentile	75° percentile	97,5° percentile	99° percentile	99° percentile BS (95%IC) (99%IC)
Donne ≤ 55 anni (N= 387)	2,1 (1,5)	1,9	1,3	2,6	5,1	12,2	6,5 (5,2-12,6) (5,0-16,8)
Uomini ≤ 55 anni (N= 429)	3,3 (2,2)	2,8	2,0	3,8	9,1	16,7	12,5 (9,1-17,0) (8,9-18,8)
Popolazione totale > 55 anni (N= 644)	4,0 (3,0)	3,3	2,3	4,8	11,8	18,5	14,1 (12,3-18,9) (12,0-25,8)
Donne > 55 anni (N= 316)	3,3 (2,1)	2,8	2,0	4,0	7,8	18,0	11,7 (7,6 -18,7) (7,2-18,9)
Uomini > 55 anni (N= 328)	4,7 (3,2)	3,8	2,8	5,4	12,5	26,9	14,1 (12,5-28,1) (12,3-29,0)

Tabella 4*Distribuzione dei valori di cTnI (ng/L) misurati con il metodo hs-cTnI ADVIA XPT*

POPOLAZIONI	Media (DS)	Mediana	25° percentile	75° percentile	97,5° percentile	99° percentile	99° percentile BS (95%IC) (99%IC)
Popolazione totale (N= 1409)	4,6 (6,0)	3,3	1,8	4,9	21,9	42,8	33,5 (26,2-42,8) (25,2-47,1)
Donne (N=679)	3,4 (4,4)	2,7	1,61	3,9	14,1	36,1	24,7 (16,3-37,8) (15,8-40,2)
Uomini (N=730)	5,7 (7,0)	3,9	2,6	5,6	25,3	48,2	41,8 (28,7-48,8) (26,6-52,2)
Popolazione totale ≤ 55 anni (N= 826)	4,1 (6,1)	2,8	1,2	4,3	22,0	42,8	30,4 (24,6-42,7) (24,5-47,1)
Donne ≤ 55 anni (N= 400)	2,9 (4,0)	2,0	0,6	3,3	14,0	27,0	24,3 (14,1-27,0) (12,9-33,7)
Uomini ≤ 55 anni (N= 426)	5,2 (7,4)	3,5	1,9	5,0	25,1	48,0	41,9 (26,0-52,2) (24,9-60,5)
Popolazione totale > 55 anni (N= 583)	5,3 (5,8)	3,9	2,8	5,6	19,9	47,1	37,8 (24,0-48,9) (22,6-53,8)
Donne > 55 anni (N= 279)	4,2 (4,8)	3,4	2,3	4,6	14,7	43,6	37,8 (14,9-56,1) (14,2-56,1)
Uomini > 55 anni (N= 304)	6,3 (6,5)	4,6	3,2	6,7	27,5	26,950,7	35,9 (22,9-47,9) (19,8-53,8)

BS, metodo bootstrap; 95%IC, intervallo di confidenza al 95%; 99%IC, intervallo di confidenza al 99%.

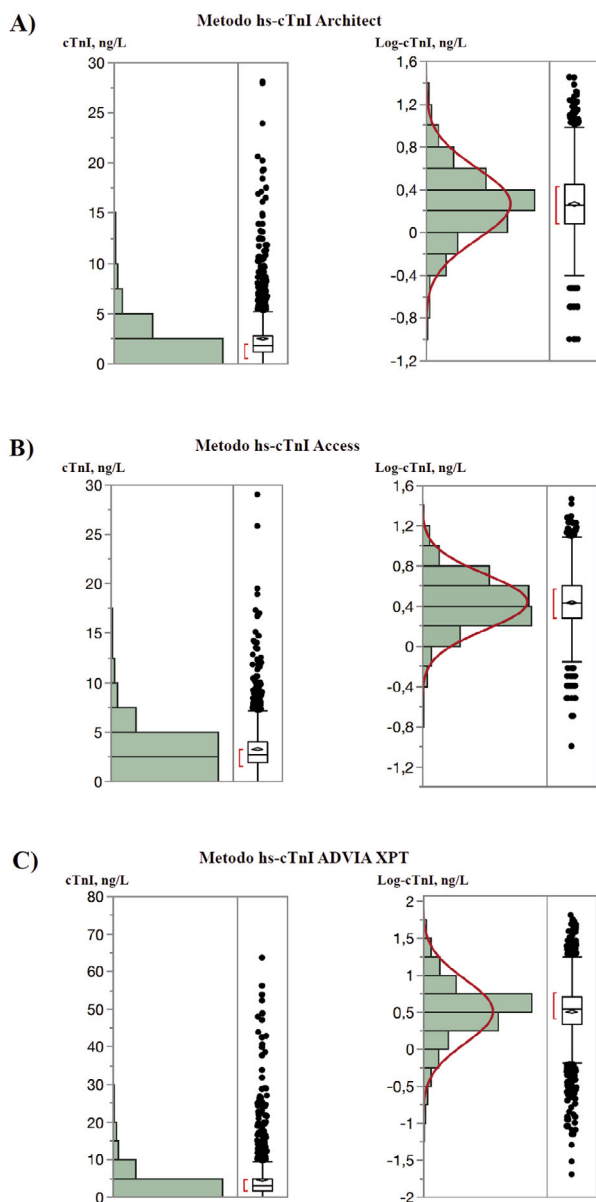


Figura 1

Distribuzione dei valori di cTnI misurati nei soggetti volontari apparentemente sani con i tre metodi valutati nello studio. A sinistra: distribuzioni con i valori originali. A destra: distribuzione con i valori log-trasformati. L'approssimazione alla trasformazione log-normale è indicata con una linea continua a forma di campana. I risultati ottenuti con il metodo Architect, Access e ADVIA XPT sono riportati rispettivamente nelle parti A, B e C della figura.

valori del 99° percentile, calcolati con i due differenti metodi statistici, sono risultati significativamente differenti (differenza media 6,3 ng/L, DS 3,4, CV 53,1%, $p < 0,0001$ metodo non parametrico di Wilcoxon) per cui nelle Tabelle sono riportati, per ogni metodo e per

questo parametro di distribuzione, due valori. Nelle Tabelle 2-4 sono riportati per il 99° percentile anche gli 95%IC e 99%IC calcolati con il metodo bootstrap. Infine, nelle stesse Tabelle sono riportati i valori di cTnI misurati con ogni metodo, sia nella popolazione generale che per i gruppi distinti per età (≤ 55 anni e > 55 anni) e per sesso.

Influenza dell'età e del sesso sui valori di cTnI nella popolazione di riferimento

I dati riportati nelle Tabelle 2-4 (colonna due, media \pm DS) dimostrano che mediamente le donne hanno valori di hs-cTnI significativamente inferiori agli uomini di pari età con tutti e tre i metodi ($p < 0,0001$ con il test di Wilcoxon/Kruskal-Wallis). Per tutti e tre i metodi hs-cTnI la mediana delle donne nella popolazione generale è maggiore del valore di LoD del rispettivo metodo (Tabella 1). Questi dati indicano che i tre metodi hs-cTnI, valutati in questo studio, sono in grado di misurare valori di cTnI nella maggior parte delle donne apparentemente sane di età compresa tra 18 e 86 anni. Tuttavia, se si considera solo il gruppo di donne con età minore di 55 anni, la mediana dei valori di cTnI diminuisce, come pure la percentuale di donne con valore del biomarcatore al di sopra del valore di LoD. Come si può vedere dai dati riportati rispettivamente nelle Tabelle 2 e 4, il metodo Architect e il metodo ADVIA Centaur XPT presentano per le donne con età tra 18 e 55 anni valori di hs-cTnI minori delle rispettive mediane del metodo, a differenza del metodo Access che presenta anche per le donne con età < 55 anni il valore della mediana più elevato del valore di LoD. In particolare, il metodo Architect è in grado di misurare valori di hs-cTnI maggiori del valore di LoD nel 44,5% e il metodo ADVIA Centaur XPT nel 47,9%, mentre il metodo Access è in grado di misurare valori al di sopra del valore di LoD nel 78,1% delle donne con età compresa tra 18 e 55 anni.

Inoltre, i dati riportati nelle Tabelle 2-4 e in Figura 2 dimostrano che i metodi hs-cTnI misurano valori significativamente più elevati del biomarcatore nel gruppo di soggetti volontari apparentemente sani con età superiore a 55 anni ($p < 0,0001$, test di Wilcoxon/Kruskal-Wallis). La tendenza all'innalzamento dei valori di hs-cTnI dopo l'età di 55 anni è anche confermata dall'analisi di regressione mediante interpolazione della funzione *spline* (Figura 2). Questa funzione è stata ottenuta suddividendo i valori di hs-cTnI (asse delle ordinate) in molti piccoli intervalli di età (asse delle ascisse) e calcolando la media dei valori compresi in ciascun intervallo. Infine, i risultati dell'analisi statistica, che utilizza un modello multivariato che include i valori di cTnI, come variabile dipendente (trasformate log dei valori originali), e, rispettivamente, come variabili indipendenti, età (variabile continua) e sesso (variabile dicotomica, F e M), dimostrano che queste due variabili influenzano indipendentemente ($p < 0,0001$) i livelli circolanti del biomarcatore [(i dettagli sull'analisi statistica di regressione sono riportati nel materiale supplementare (1S)].

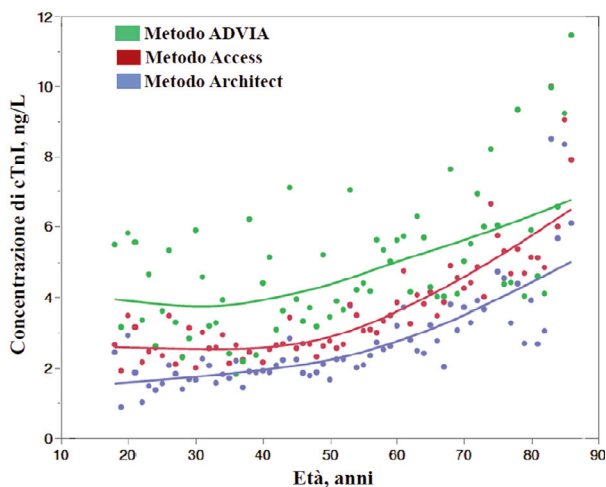


Figura 2

Analisi di regressione con l'approccio di interpolazione della funzione spline dei valori di cTnI, misurati con i tre metodi valutati nello studio indicati con differenti colori. La funzione, ottenuta interpolando i valori medi dei differenti intervalli di età, è indicata nella figura con una linea continua utilizzando un differente colore per ciascun metodo.

Differenze sistematiche tra metodi

Considerando i valori riportati nella colonna 2 delle Tabelle 2-4 (media±DS), il metodo ADVIA mostra mediamente valori significativamente più elevati di hs-cTnI, mentre il metodo Architect i valori più bassi, sia quando la popolazione di riferimento viene considerata nel suo complesso, sia quando è suddivisa per il sesso (Tabelle 2-4) o per l'età (Figura 2) ($p < 0,0001$ con il test non parametrico di Wilcoxon/Kruskal-Wallis). Questi risultati suggeriscono che esistono significative differenze sistematiche nella misura dei valori di cTnI tra i tre metodi studiati. Per analizzare più in dettaglio le differenze delle misure di hs-cTnI tra i metodi, abbiamo utilizzato sia l'analisi di Bland-Altman (31,32), che l'analisi PCA (31,32).

Nel pannello A della Figura 3, è riportata la regressione lineare tra i metodi Architect e Access (asse ordinate) [$y = 1,5667$ (ES 0,0623) + $0,7177$ (ES 0,0177) x ; $r = 0,7319$; $N = 1416$; $p < 0,0001$], mentre nel pannello B l'analisi di Bland-Altman. Questi dati dimostrano che vi è una differenza sistematica costante ($p < 0,0001$ test di Wilcoxon) tra i due metodi lungo tutto l'intervallo di concentrazioni di cTnI dei soggetti apparentemente sani (intervallo di concentrazione da 0 a 30 ng/L) con una differenza media di 0,9 ng/L. Infatti, la concentrazione cTnI media (asse delle ascisse), misurata con i due metodi, non correla significativamente con la differenza media (metodo Access - metodo Architect, asse delle ordinate) tra i valori di cTnI misurati con i due metodi ($r = 0,014034$, $p = 0,2584$).

Nel pannello A della Figura 4, è riportata la regressione lineare tra i metodi Architect e ADVIA

Centaur XPT (asse delle ordinate) [$y = 0,5245$ (ES 0,1677) + $1,7016$ (ES 0,0506) x ; $r = 0,6696$; $N = 1389$; $p < 0,0001$], mentre nel pannello B l'analisi di Bland-Altman. Questi dati dimostrano che vi è una regressione lineare significativa tra la differenza delle misure (metodo ADVIA - metodo Architect, asse delle ordinate) e la concentrazione media tra le misure di hs-cTnI con i due metodi [$y = -1,3043$ (ES 0,0959) + $1,0046$ (ES 0,0187) x ; $r = 0,8222$; $N = 1389$; $p < 0,0001$], indicando che la differenza tra i valori di hs-cTnI aumenta in maniera lineare con la concentrazione media di hs-cTnI misurata con i due metodi.

Nel pannello A della Figura 5, è riportata la regressione lineare tra i metodi Access e ADVIA Centaur XPT (asse delle ordinate) [$y = 0,3404$ (ES 0,2195) + $1,2878$ (ES 0,0541) x ; $r = 0,5399$; $N = 1375$; $p < 0,0001$], mentre nel pannello B l'analisi di Bland-Altman. Questi dati dimostrano che vi è una regressione lineare significativa tra la differenza delle misure (metodo ADVIA - metodo Access, asse delle ordinate) e la concentrazione media tra le misure di hs-cTnI con i due metodi [$y = -2,6679$ (ES 0,1252) + $1,0111$ (ES 0,0234) x ; $R = 0,7591$; $N = 1375$; $p < 0,0001$] indicando che la differenza tra i valori di hs-cTnI aumenta in maniera lineare con la concentrazione media del biomarcatore misurata con i due metodi.

Infine, l'analisi PCA ha confermato che il metodo ADVIA XPT evidenzia risultati molto differenti rispetto agli altri due metodi hs-cTnI. Infatti la matrice di correlazione tra questi metodi mostra come i metodi Architect e Access siano meglio correlati tra loro ($r = 0,6072$) che con il metodo ADVIA XPT (Architect *versus* ADVIA $r = 0,5087$, Access *versus* ADVIA $r = 0,4863$). La prima componente spiega la maggior parte della variabilità tra metodi (70,0%), mentre le altre componenti spiegano una frazione minore della variabilità totale tra i dati: la seconda il 18,0 % e la terza il 13,1 %, rispettivamente. Il *loading plot* del grafico della PCA, che include in ascissa la prima componente e in ordinata la seconda, conferma come i metodi Architect e Access abbiano le prime due componenti principali più simili tra loro (raffigurate come vettori) rispetto al metodo ADVIA XPT (Figura 6).

DISCUSSIONE

Prestazioni analitiche e differenze sistematiche tra i metodi hs-cTnI

Questo studio multicentrico e intersocietario SIBioC/ELAS riporta per la prima volta un confronto tra le prestazioni analitiche e i valori di cTnI misurati in una larga popolazione italiana di soggetti volontari apparentemente sani, tra i metodi Architect, Access e ADVIA XPT, immessi recentemente in commercio dalle rispettive aziende nel mercato italiano ed europeo. I risultati ottenuti confermano che i metodi Architect, Access e ADVIA XPT presentano prestazioni analitiche che soddisfano le specifiche di qualità richieste dalle

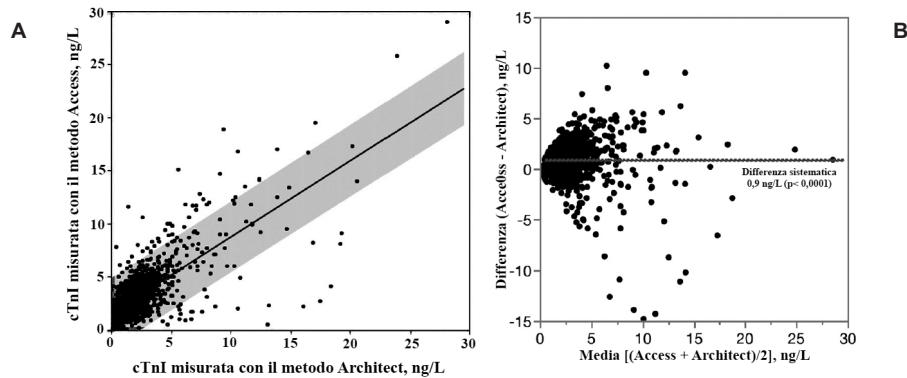


Figura 3.

Pannello A. Analisi di regressione lineare tra i valori di hs-cTnI, rispettivamente misurati con il metodo Architect (asse delle ascisse) e il metodo Access (asse delle ordinate). I limiti di confidenza (del 95%) della previsione intorno alla retta di regressione sono evidenziati da una ombreggiatura.

Pannello B. Grafico secondo Bland&Altman dei dati di regressione tra i due metodi. I dati relativi alla media dei valori di hs-cTnI misurati con i due metodi sono riportati sull'asse delle ascisse, mentre i dati relativi alla differenza tra le misure con i due metodi (metodo Access – metodo Architect) sono riportati sull'asse delle ordinate. La differenza media tra i due metodi di 0,9 ng/L è indicata con una linea tratteggiata.

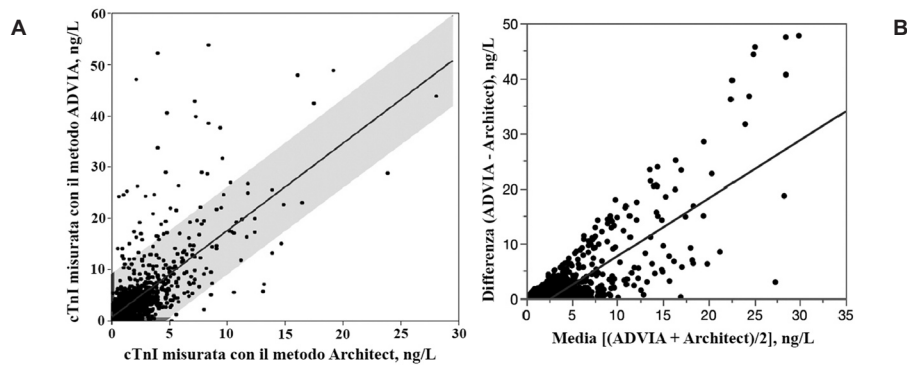


Figura 4

Pannello A. Analisi di regressione lineare tra i valori di hs-cTnI, rispettivamente misurati con il metodo Architect (asse delle ascisse) e il metodo ADVIA XPT (asse delle ordinate). I limiti di confidenza (del 95%) della previsione intorno alla retta di regressione sono evidenziati da una ombreggiatura

Pannello B. Grafico secondo Bland&Altman dei dati di regressione tra i due metodi. In figura sono anche riportati i dati della analisi di regressione lineare tra la media dei dati (asse delle ascisse) e la differenza (asse delle ordinate) tra i valori misurati con i due metodi.

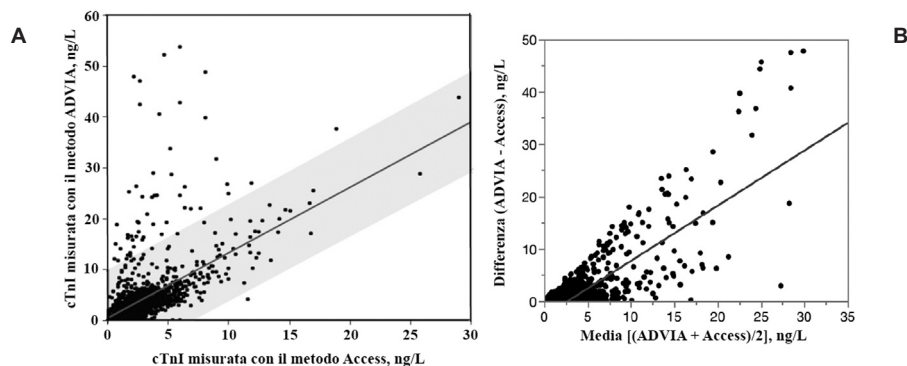


Figura 5

Pannello A. Analisi di regressione lineare tra i valori di hs-cTnI, rispettivamente misurati con il metodo Access (asse delle ascisse) e il metodo ADVIA XPT (asse delle ordinate). I limiti di confidenza (del 95%) della previsione intorno alla retta di regressione sono evidenziati da una ombreggiatura.

Pannello B: Grafico secondo Bland&Altman dei dati di regressione tra i due metodi. In figura sono anche riportati i dati della analisi di regressione lineare tra la media dei dati (asse delle ascisse) e la differenza (asse delle ordinate) tra i valori misurati con i due metodi.

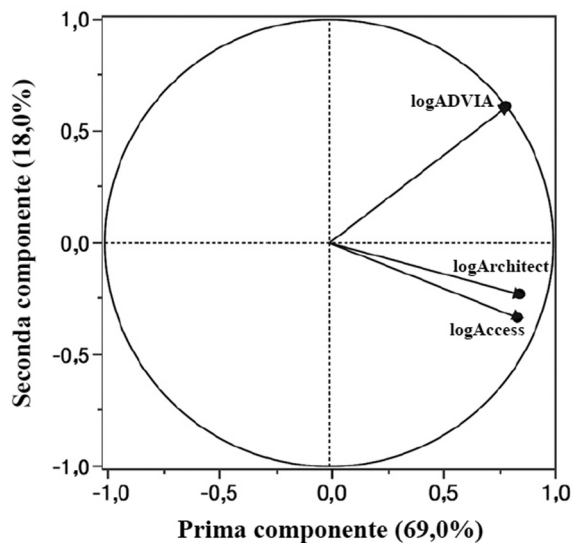


Figura 6
 Analisi delle componenti principali (PCA). La figura riporta il loading plot delle prime due componenti principali (raffigurate come vettori) dei valori di hs-cTnI misurati con i tre metodi e analizzati mediante il modello statistico di analisi multivariata mediante PCA. In figura, è riportata anche la percentuale di variabilità (espressa come varianza) spiegata rispettivamente dalla prima componente (asse delle ascisse) e dalla seconda componente (asse delle ordinate).

linee guida internazionali (2). In particolare, questi metodi misurano il 99° percentile URL con una imprecisione tra il 4% e il 6% CV (Tabella 1) (8,9,11), cioè circa la metà di quella richiesta dalle linee guida internazionali (2) e nazionali (13) e sono anche in grado di misurare valori di cTnI al di sopra della LoD del metodo nella maggior parte di una popolazione di donne apparentemente sane di età ≥ 20 anni, come richiesto dal secondo criterio stabilito dalle linee guida (2,13). Infine, i risultati di questo studio confermano che persistono differenze sistematiche significative tra i valori di cTnI, misurati con i più recenti metodi, che presentano peraltro tutti caratteristiche analitiche conformi alle specifiche di qualità richieste per i metodi hs-cTnI (2,13).

In particolare, in questo studio è stato utilizzato l'approccio matematico-statistico dell'analisi PCA per mettere in risalto le differenze di specificità analitica tra i metodi hs-cTnI (Figura 6). Studi recenti hanno dimostrato che vi sono in circolo differenti forme molecolari di cTnI e cTnT nei soggetti apparentemente sani e nei pazienti con necrosi del miocardio (16-18,33-36). Nei soggetti adulti sani sembrano essere predominanti le forme degradate delle troponine cardiache, che possono essere determinate nel citoplasma dei miocardiociti, ma non nel sarcomero dove invece è presente la forma intatta (non degradata) delle proteine cTnI e cTnT (16-18,33-36). La forma non degradata delle proteine cTnI e cTnT si ritrova tipicamente nel circolo di pazienti con danno cardiaco

irreversibile, in particolare nei pazienti con infarto acuto del miocardio nelle prime ore dopo l'inizio della necrosi (16-18).

Sebbene i metodi per la misura della cTnI utilizzino differenti fasi leganti, in genere sono preferiti gli anticorpi che riconoscono gli epitopi compresi tra gli aminoacidi 20 e 110 della catena peptidica della cTnI (37). Infatti, la parte più centrale della molecola risulta più protetta dalla degradazione da parte degli enzimi proteolitici plasmatici, che attaccano di preferenza le porzioni N- e C-terminali della catena peptidica della proteina. Inoltre, questa parte più centrale della cTnI risulta protetta dalla degradazione perché legata alla troponina C (TnC), sia nel complesso sarcomerico, che in circolo (37).

Vi sono differenze significative tra le fasi leganti dei tre metodi hs-cTnI valutati in questo studio. Il metodo ADVIA XPT utilizza tre anticorpi monoclonali, di cui due per la fase legante di cattura. Questi due anticorpi di cattura riconoscono due differenti epitopi situati rispettivamente sulle estremità opposte N- e C-terminali della cTnI umana. Il terzo anticorpo è poi utilizzato per la rilevazione ed è specifico per la parte più centrale, meno degradabile, della porzione N-terminale della cTnI umana. Per contro, i metodi Architect e Access utilizzano due anticorpi specifici per la porzione meno degradabile della catena peptidica della proteina, di cui, rispettivamente, uno per la fase di cattura e l'altro per la rilevazione del segnale.

Considerando la differente struttura dei sistemi immunometrici, è quindi ipotizzabile che il metodo ADVIA XPT sia più specifico, rispetto ai metodi Architect e Access, per la forma intatta (meno degradata) della cTnI umana. I risultati pubblicati recentemente dello stesso studio multicentrico (38), che utilizzava sia campioni plasmatici di soggetti volontari apparentemente sani che pazienti ammessi al pronto soccorso con sospetto di SCA, hanno dimostrato che in questi pazienti vi era una migliore armonizzazione tra i risultati ottenuti dai tre metodi hs-cTnI con coefficienti di correlazione che variavano da 0,9728 a 0,9826 rispetto ai coefficienti di correlazione molto più bassi trovati in questo studio nei soggetti volontari apparentemente sani. Inoltre, lo stesso studio (38) riporta che la componente principale della PCA era in grado di spiegare il 98,5% della variabilità totale dei valori del biomarcatore misurati con i tre metodi hs-cTnI nei pazienti con SCA rispetto a solo il 69,0% della variabilità spiegata dalla stessa componente nei soggetti volontari apparentemente sani arruolati nel presente studio. La discrepanza tra i risultati ottenuti dal metodo ADVIA XPT rispetto agli altri due metodi potrebbe essere spiegata dal fatto che nei pazienti con SCA la forma intatta (o comunque meno degradata) della cTnI è quella predominante ed è misurata da tutti i tre metodi hs-cTnI. Nei pazienti con SCA vi è quindi una migliore armonizzazione tra i risultati ottenuti con i tre metodi hs-cTnI rispetto ai risultati ottenuti sui soggetti normali, come dimostrano sia i migliori coefficienti di correlazione che la più elevata prima componente della PCA riscontrati nei pazienti rispetto ai soggetti sani. Per

contro, nei soggetti sani sono predominanti le forme degradate della cTnI che sono probabilmente meglio determinate dai metodi Architect e Access rispetto al metodo ADVIA XPT. È importante sottolineare che la differenza tra i valori misurati con il metodo ADVIA XPT e i metodi Architect e Access aumenta linearmente con la concentrazione di cTnI nei soggetti apparentemente sani. Questo dato suggerisce che tanto più elevata è la concentrazione misurata del biomarcatore, tanto più elevata risulta anche la probabilità di trovare in circolo forme intatte della proteina. Infatti, più ampia sarà l'area di necrosi miocardica, tanto più elevata sarà anche la quantità di molecole di cTnI intatta (meno degradata) immessa in circolo (Figure 4 e 5).

Valutazione del 99° percentile URL dei metodi hs-cTnI nella popolazione italiana

Per quanto riguarda i valori del 99° percentile nella popolazione italiana di riferimento (Tabelle 2-4), tutti e tre i metodi mostrano valori di hs-cTnI maggiori delle mediane sia per la popolazione generale, che per la popolazione divisa per sesso. Tuttavia, solo il metodo hs-cTnI Access mostra il valore della mediana maggiore della LoD anche per le donne con età <55 anni. Il nostro studio indica che il metodo hs-cTnI Architect e ADVIA Centaur XPT non misurano valori di cTnI al di sopra del valore di LoD nella maggior parte delle donne con età <55 anni (rispettivamente il 44,5% e 47,9%).

Il documento AACC/IFCC del 2018 (2) raccomanda che il valore del 99° percentile URL debba essere valutato in una popolazione (almeno 300 uomini e 300 donne) di individui apparentemente sani con un'età ≥20 anni, senza quindi precisare un intervallo superiore per l'età della popolazione di riferimento. In accordo con quanto raccomandato dal documento AACC/IFCC del 2018 (2), tutti e tre i metodi valutati nel presente studio soddisfano entrambi i criteri per essere definiti metodi ad alta sensibilità per la misura della cTnI. Evidentemente, il dato che il metodo Architect e il metodo ADVIA Centaur XPT presentino una mediana per la distribuzione dei valori di hs-cTnI minore della LoD per la popolazione che include donne con età <55 anni, deve essere confermato in popolazioni più ampie di quella del presente studio.

Criticità nella valutazione del 99° percentile URL

Il documento *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction* stabilisce che è sufficiente anche un solo valore al di sopra del 99° percentile della distribuzione dei valori delle proteine cTnI o cTnT, misurate preferibilmente con metodi ad alta sensibilità, per accertare la presenza di un danno cardiaco (3). In accordo con questo documento, la misura delle proteine cTnI e cTnT con metodi ad alta sensibilità assume una grande rilevanza non solo dal punto di vista clinico, ma anche medico-legale (3). Risulta, quindi, fondamentale che tutti gli operatori sanitari conoscano le caratteristiche analitiche dei metodi hs-cTnI e cTnT, come anche che sappiano correttamente interpretare i risultati ottenuti

con questi metodi. Particolare rilevanza assume poi la misura del valore del 99° percentile URL, in quanto designato da tutte le linee guida come valore soglia per la rilevazione della presenza di un danno cardiaco e di conseguenza anche per la diagnosi di infarto del miocardio (3,19).

La scelta di stabilire come valore soglia il 99° percentile URL della distribuzione dei valori di cTnI e cTnT presenta delle criticità che sia i professionisti della medicina di laboratorio come pure i clinici dovrebbero tenere ben presenti (2,14,15,18,19). È ben noto che l'età, il sesso, l'attività fisica intensa, la presenza di una malattia cardiaca asintomatica, come anche di comorbidità (renali, epatiche, endocrino-metaboliche, infiammatorie) e l'assunzione di farmaci e droghe di abuso sono tutti fattori che possono influire sui livelli circolanti di cTnI e cTnT e quindi sul calcolo del 99° percentile URL (2,14,15,18,19). Per questo motivo le linee guida raccomandano che i criteri di inclusione/esclusione della popolazione di riferimento siano esplicitati in dettaglio negli articoli degli studi clinici, come anche negli inserti di prodotti emanati dalle aziende.

Per quanto concerne i dati demografici, di grande rilievo sono il rapporto tra i sessi e l'età, in quanto influiscono sul calcolo del valore di riferimento. Il documento pubblicato nel 2018 dalle Società AACC/IFCC raccomanda di calcolare i valori del 99° percentile URL differenziati per sesso, mentre non raccomanda valori differenziati per intervalli di età o per etnia (2). Tuttavia, come anche dimostrato dai risultati del presente studio (Tabelle 2-4, Figura 2), inserire soggetti apparentemente sani con età superiore a 55 anni influenza notevolmente il valore del 99° percentile misurato con metodi hs-cTnI (14,15,18). Il nostro studio conferma i dati di altri studi di popolazione che hanno riportato un aumento progressivo dei valori di cTnI e cTnT dopo i 60 anni di età (2,14,15,18). Nel presente studio è stato scelto di suddividere la popolazione di riferimento in due sotto-gruppi in relazione all'età, utilizzando un valore soglia di 55 anni, in quanto questa età può essere considerata quella nella quale la maggior parte delle donne italiane è in menopausa e quindi non è più protetta dai benefici effetti degli estrogeni endogeni sul sistema cardiovascolare (39).

Il calcolo del 99° percentile è molto sensibile alla presenza di valori outlier (28,40,41) e pertanto i risultati possono essere diversi a seconda del metodo statistico utilizzato nel calcolo. La presenza anche di pochi volontari apparentemente sani, ma con malattia cardiaca asintomatica, che presentano valori significativamente più elevati dell'intervallo interquartile della popolazione di riferimento, può quindi causare un errore rilevante nel calcolo del 99° percentile (14,15,18,40,43). Il documento AACC/IFCC del 2018 raccomanda un'accurata valutazione dello stato di salute della popolazione di riferimento. Tuttavia, le evidenze di un'anamnesi completamente negativa anche per eventi cardiovascolari minori, come pure di valori entro i limiti di riferimento sia degli esami ematochimici di routine che

dell'ECG, non sono in grado di escludere la presenza di una patologia cardiaca sub-clinica e ancora asintomatica. Come verrà discusso più in dettaglio nel prossimo paragrafo, è ben noto come i biomarcatori cardio-specifici (cioè i peptidi natriuretici e le cTn) siano in grado di mettere in evidenza un danno cardiaco precoce in pazienti ancora asintomatici, ma che già presentano le prime alterazioni anatomo-patologiche del sistema cardiovascolare (Stadio B della storia naturale dello scompenso cardiaco) (5,16,17,33,43-48). In particolare, i metodi hs-cTn sono in grado di evidenziare lesioni miocardiche che non possono essere messe in evidenza anche dalle più sofisticate e sensibili tecniche di imaging cardiaco (5,16).

Per questi motivi, Sandoval et al. (14) hanno suggerito che la misura dei peptidi natriuretici debba essere considerata un fondamentale criterio di inclusione/esclusione dei volontari apparentemente sani da arruolare nella popolazione di riferimento per il calcolo del 99° percentile per i metodi hs-cTn. Tuttavia anche i peptidi natriuretici presentano un progressivo aumento dei valori con l'età dopo i 60 anni in entrambi i sessi. Inoltre, non vi è accordo su quale sia il valore di riferimento da adottare per le varie fasce di età (2). Infine, i peptidi natriuretici (BNP e NT-proBNP) sono biomarcatori meno stabili sia *in vivo* che *in vitro* delle troponine e il loro possibile stato di degradazione in campioni di plasma conservati a basse temperature per lunghi periodi di tempo non è stato mai accuratamente quantificato. Infine, la loro variabilità intra-individuale è molto elevata (40-60%), rispetto a quella della cTn misurata con metodi ad alta sensibilità (circa 9%) (49). In particolare, dati non ancora pubblicati su 231 volontari apparentemente sani arruolati nello studio MEHLP (età 47-85 anni) dimostrano che non vi è alcuna correlazione ($r = 0,0460$; $p = 0,4740$) tra i valori di NT-proBNP, misurato con il metodo ECLIA (50), e quelli di hs-cTn, misurata con il metodo ADVIA XPT (11,23). Questi fattori limitano l'utilizzo dei peptidi natriuretici come indice più accurato per individuare i soggetti di una popolazione di riferimento che risultino ragionevolmente in buona salute e soprattutto del tutto esenti da malattie sub-cliniche e asintomatiche.

Il presente studio ha dimostrato ampie differenze tra i valori del 99° percentile misurati con i tre metodi hs-cTn nella popolazione totale (mediamente di circa 2 volte tra il metodo ADVIA XPT, che presenta valori più elevati, e gli altri due metodi) (Tabelle 2-4). Utilizzando l'approccio statistico non-parametrico, che è raccomandato dalle linee guida per il calcolo del 99° percentile URL (2), i dati ottenuti nel presente studio evidenziano valori significativamente minori sia nella popolazione totale che specifici per sesso nei tre metodi hs-cTn (differenza media 4,2 ng/L, ES 1,7, $p = 0,0273$, $N = 9$, test di Wilcoxon) rispetto ai valori di riferimento suggeriti dai produttori. Tale discrepanza è probabilmente dovuta a differenze dell'intervallo di età e del rapporto tra i sessi della popolazione di riferimento reclutata nel presente studio rispetto a quella considerata dalle aziende produttrici. In particolare,

considerando i risultati del metodo hs-cTn Architect, l'unico di cui siano già disponibili molti dati in letteratura, una recente meta-analisi dimostra una differenza media tra i sessi di 10,97 ng/L (95%IC 7,10-14,85 ng/L), ottenuta in 11 popolazioni con differente etnia (17). Nel presente studio la differenza calcolata è risultata pari a 9,7 ng/L, quindi confrontabile con la differenza media ottenuta nella meta-analisi (Tabella 2). Questi risultati supportano l'ipotesi che la distribuzione dei valori di cTn sia abbastanza simile anche tra popolazioni costituite da differenti etnie e che quindi le discrepanze osservate tra i valori del 99° percentile misurati con lo stesso metodo siano dovute a differenze di età, rapporto tra i sessi e criteri di inclusione/esclusione dei volontari apparentemente sani arruolati nelle differenti popolazioni di riferimento.

La distribuzione dei valori di cTn nei soggetti adulti risulta molto asimmetrica e approssima una distribuzione normale, ma in modo che non può essere considerato ottimale, se si utilizza la trasformazione logaritmica dei valori originali misurati con i metodi hs-cTn. Per questo motivo, le linee guida internazionali raccomandano di utilizzare il metodo non-parametrico robusto per il calcolo del 99° percentile URL (2). Pertanto, per una stima di tale valore con una confidenza del 95%, occorrono almeno 300 individui e dovrebbero essere eliminati tutti i possibili valori outlier, con un test statistico considerato robusto, come il test di Tukey, utilizzato nel presente studio (27). Il test di Tukey assume però una distribuzione log-normale, che generalmente è solo approssimata nel caso dei valori di hs-cTn, anche quando si prendono in considerazione popolazioni numerose, come nel presente studio. Per tale motivo l'utilizzo del metodo non-parametrico robusto, raccomandato dalle linee-guida, potrebbe essere influenzato dalla presenza di possibili valori outlier (per esempio, volontari con danno miocardico sub-clinico e asintomatico). Per questo motivo, in questo studio è stata utilizzata anche un'analisi statistica più complessa e laboriosa (richiede 100 000 replicazioni e quindi un lungo tempo di calcolo) basata sulla procedura del bootstrap utilizzando un approccio che è molto meno sensibile alla presenza di valori outlier di hs-cTn, sebbene questa non sia la procedura raccomandata dalle linee guida (2). I dati riportati nelle Tabelle 2-4 dimostrano che i valori ottenuti con il metodo bootstrap sono significativamente inferiori a quelli del metodo standard non-parametrico robusto per il calcolo del 99° percentile URL. Tuttavia i valori di distribuzione della hs-cTn per i percentili inferiori, compreso il 97,5° percentile, che è utilizzato per molti analiti come limite superiore dell'intervallo di normalità, sono risultati non significativamente differenti, se calcolati con i due diversi approcci statistici.

I risultati di questo studio multicentrico dimostrano quindi che anche quando si utilizzino rigorosi criteri di inclusione/esclusione e test statistici robusti per selezionare la popolazione di riferimento, possono ancora essere presenti dei valori outlier, che rendono meno accurata la stima del 99° percentile URL. Da un

punto di vista clinico, i valori di cTnI, calcolati con il metodo del bootstrap, essendo inferiori rispetto a quelli suggeriti dalle aziende produttrici, dovrebbero teoricamente dimostrare una sensibilità diagnostica superiore, ma anche una specificità inferiore, sia nella rilevazione della presenza del danno miocardico, che nella diagnosi differenziale dell'infarto del miocardio.

Considerazioni fisiopatologiche e interpretazione clinica dei valori di hs-cTnI nei soggetti apparentemente sani

Il documento delle Società AACC/IFCC (2) riporta alcune specifiche raccomandazioni sull'importanza di stimolare la collaborazione tra le aziende, i professionisti della medicina di laboratorio (incluse le Società Scientifiche) e i clinici su alcune criticità che riguardano i metodi di misura di cTnI e cTnT. Esse sono: le specifiche di qualità, i valori di riferimento, la scarsa armonizzazione tra metodi e l'interpretazione clinica dei risultati. I produttori dovrebbero informare i laboratori sulle caratteristiche analitiche (incluse le informazioni sugli epitopi anticorpi-specifici e sullo standard di cTnI utilizzato per la calibrazione della curva di taratura), i valori di riferimento e le unità di misura dei metodi hs-cTnI, che dovrebbero essere chiaramente riportate nei foglietti illustrativi dei metodi. Inoltre, le prestazioni analitiche e i valori di riferimento, che dovrebbero rispondere ai requisiti previsti nelle linee-guida, dovrebbero essere ottenuti in accordo con i protocolli internazionali standardizzati, quali i documenti CLSI EP17 e CLSI EP5-A2 (25,26), utilizzati nel presente studio (8-11,21-23).

Considerate le significative differenze sistematiche tra i metodi hs-cTnI, i clinici dovrebbero essere informati sui valori di riferimento dei metodi e sulla necessità di eseguire la misura dei valori della cTnI nei campioni di plasma dello stesso soggetto/paziente sempre nello stesso laboratorio (2).

In questi ultimi 5 anni, la messa a punto di metodi ad alta sensibilità ha dimostrato non solo che concentrazioni misurabili di cTnI e cTnT sono presenti in soggetti in apparente buona salute, sia adulti che in età pediatrica (5-11), ma anche che i livelli di cTnI aumentano dopo esercizi fisici intensi (maratona, gare di endurance, corse ciclistiche) sia in soggetti adulti sani che negli atleti professionisti, raggiungendo talvolta valori anche superiori al 99° percentile URL (5,16-18,33-36). Alcuni Autori hanno suggerito che i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti adulti sani siano strettamente collegati al rinnovamento fisiologico dei miocardiociti (5,16-18,51,52), che dipende dal processo di maturazione e proliferazione delle cellule staminali endogene. Tali cellule sostituiscono i miocardiociti che hanno ormai terminato il ciclo naturale della loro vita e che muoiono per apoptosi (5,18-20,51,52). Secondo gli studi più recenti la velocità di rinnovamento dei miocardiociti umani è più elevata nelle prime due decadi di vita, con un tasso di rinnovamento di circa 1% per anno all'età di 20 anni, e con un declino progressivo che raggiunge un

tasso di rinnovamento del solo 0,5% per anno nella senescenza (51,52). Sempre secondo l'ipotesi del rinnovamento fisiologico, il numero di miocardiociti che si rinnovano ogni giorno dovrebbe dipendere dalla massa cardiaca. Studi recenti indicano, infatti, che i livelli circolanti di cTnI nei soggetti adulti in apparente buona salute sono correlati con la massa ventricolare (53,54). Queste evidenze sono in accordo con i risultati che dimostrano che le donne adulte, che in media presentano una massa cardiaca minore dei coetanei maschi, hanno anche livelli significativamente minori di cTnI e cTnT (Tabella 2).

L'ipotesi che i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti sani dipendano dal rinnovamento fisiologico non è in grado di spiegare il progressivo incremento dei livelli del biomarcatore in entrambi i sessi dopo i 65 anni di età, come dimostrato anche in questo studio. Pertanto, è necessario ipotizzare che alcuni meccanismi fisiopatologici, caratteristici della senescenza, siano responsabili di un aumento della morte dei miocardiociti (55-56). Il cuore dell'anziano è generalmente caratterizzato dalla presenza di ipertrofia, con una riduzione del numero totale di miocardiociti e un aumento relativo o assoluto di fibrosi (55-56). I risultati di questo studio sembrano supportare l'ipotesi che alcuni soggetti apparentemente sani con età superiore a 65 anni abbiano valori più elevati di hs-cTnI a causa di un aumento del tasso di morte dei miocardiociti. Questa osservazione sembra avvalorare l'ipotesi che le concentrazioni di hs-cTnI di soggetti apparentemente normali, con valori in prossimità del 99° percentile URL, potrebbero indicare la presenza di un danno miocardico asintomatico che potrebbe essere a sua volta responsabile di un aumento del rischio cardiovascolare nei soggetti apparentemente sani della popolazione generale che presentano valori nel terzile più elevato della distribuzione di cTnI (43-48). In particolare, è stato recentemente dimostrato che valori di hs-cTnI, misurati in prelievi seriali nella popolazione generale, che incrementano progressivamente nel tempo (monitoraggio fino a 3500 giorni), siano forti predittori di mortalità (57).

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio dimostrano che esistono differenze sistematiche significative (fino a 2 volte) tra i valori della proteina misurati con i diversi metodi hs-cTnI, con conseguenti differenti intervalli di riferimento. Per tale motivo va sottolineata la necessità di eseguire la misura dei valori della cTnI nei campioni di plasma dello stesso soggetto/paziente sempre nello stesso laboratorio.

Secondo quanto raccomandato dalle più recenti linee guida internazionali (2), questo studio mette a disposizione dei laboratori italiani un'accurata valutazione delle prestazioni analitiche e i valori del 99° percentile URL, calcolati in una popolazione di riferimento italiana, utilizzando i più comuni metodi hs-cTnI presenti in commercio.

I risultati ottenuti dimostrano infine come siano necessari rigorosi studi clinici per definire quale sia l'approccio statistico migliore per il calcolo del 99° percentile URL dei metodi hs-cTnI, e quale sia il parametro di distribuzione delle troponine cardiache che presenta la migliore accuratezza diagnostica per la diagnosi differenziale dell'infarto del miocardio.

RINGRAZIAMENTI

I materiali, i metodi e le piattaforme automatizzate necessarie per questo studio sono state messe a disposizione dalle rispettive aziende di diagnostici, cioè: Abbott Diagnostics Italia (Roma), Beckman Coulter Srl Italia (Cassina de' Pecchi, Milano), e Siemens Healthineers Italia srl (San Giovanni, Milano).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
- Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
- Clerico A, Fortunato A, Ripoli A, et al. Distribution of plasma cardiac troponin I values in healthy subjects: pathophysiological considerations. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:804-8.
- 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.
- 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.
- Krintus M, Kozinsk M, Boudry P, et al. European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT high sensitive troponin I immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2016;52:1657-65.
- Caselli C, Cangemi G, Masotti S, et al. Plasma cardiac troponin I concentrations in healthy neonates, children and adolescents measured with a high sensitive immunoassay method: High sensitive troponin I in pediatric age. *Clin Chim Acta* 2016;458:68-71.
- Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:492-501.
- Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e174-6.
- Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of the analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the measurement of cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e229-31.
- Clerico A, Zaninotto M, Masotti S, et al. Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cardiac troponin I and T: from theory to laboratory practice. Joint document of SIBioC and European Ligand Assay Society. *Biochim Clin* 2018;42:152-4.
- Clerico A, Zaninotto M, Graziani MS, et al. Specifiche di qualità, terminologia e definizione dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T. *Biochim Clin* 2018;42:335-42.
- Sandoval Y, Apple FS. The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin. *Clin Chem* 2014;60:455-62.
- Clerico A, Zaninotto M, Ripoli M, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology, and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
- Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
- Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018;7:553-60.
- Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, et al. IFCC Task Force on clinical application of cardiac bio-markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin Chem* 2017;63:73-81.
- Valentine CM, Tchong JE, Waites T. Translating the translation. What clinicians should know about the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2668-70.
- Fraser CG. Reference change values. *Clin Chem Lab Med* 2011;50:807-12.
- Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of reference change values for a hs-cTnI immunoassay using both plasma samples of healthy subjects and patients and quality control samples. *Clin Chem Lab Med* 2019 doi: 10.1515/cclm-2019-0032.
- Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high-sensitivity cTnI method: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;493:156-61.
- Clerico A, Masotti S, Musetti V, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of the hs-cTnI method using ADVIA Centaur XTP platform: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;495:161-6.
- Franzini M, Lorenzoni V, Masotti S, et al. The calculation of the cardiac troponin T 99th percentile of the reference population is affected by age, gender, and population selection: A multicenter study in Italy. *Clin Chim Acta* 2015;438:376-81.
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline, second edition. CLSI document EO17-A2. CLSI Wayne, PA, 2012.
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline, third edition. CLSI document EP05-A3. CLSI Wayne, PA, 2014.
- Tukey W. *Exploratory Data Analysis*. Reading (PA):

- Addison-Wesley, 1977.
28. Carpenter J, Bithell J. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat Med* 2000;19:1141-64.
 29. Altman DG, Bland JM. Assessing agreement between methods measurement. *Clin Chem* 2017;63:1653-54.
 30. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999;8:135-60.
 31. Fabrigar LR, Wegener DT. Exploratory factor analysis. New York:Oxford University Press Inc, 2001.
 32. Jolliffe IT. Principal component analysis. New York, Springer,2013.
 33. Hickman PE, Potter JM, Aroney C, et al. Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. *Clin Chim Acta* 2010;411:318-23.
 34. Gresslien T, Agewall S. Troponin and exercise. *Int J Cardiol* 2016;221:609-21.
 35. Vroemen WHM, Mezger STP, Masotti S, et al. Cardiac troponin T: only small molecules in recreational runner after marathon completion. *J Appl Lab Med* 2018;72:347-9.
 36. Cardinaels EP, Mingels AM, van Rooij T, et al. Time-dependent degradation pattern of cardiac troponin t following myocardial infarction. *Clin Chem* 2013; 59:1083-90.
 37. Panteghini M. Assay-related issues in the measurement of cardiac troponins. *Clin Chim Acta* 2009;402:88-93.
 38. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: a multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 39. Ricci A, Manna P, Piscicelli C, et al. Sintomi, abitudine di vita e fattori di rischio nella donna italiana in menopausa. *Ann Ist Super Sanità* 1997;33:183-7.
 40. Eggers KM, Apple FS, Lind L, et al. The applied statistical approach highly influences the 99th percentile of cardiac troponin I. *Clin Biochem* 2016;49:1109-12.
 41. Hickman PE, Koerbin G, Potter JM, et al. Statistical considerations for determining high-sensitivity cardiac troponin reference intervals. *Clin Biochem* 2017;50:502-5.
 42. Emdin M, Passino C, Prontera C, et al. Comparison of Brain Natriuretic Peptide (BNP) and amino-terminal ProBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem* 2007;53:1289-97.
 43. Eggers KM, Venge P, Lindhal B, et al. Cardiac troponin I levels measured with a high-sensitive assay increase over time and are strong predictors of mortality in an elderly population. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1906-13.
 44. van der Linden N, Klinkenberg LJ, Bekers O, et al. Prognostic value of basal high-sensitive cardiac troponin levels on mortality in the general population: a meta-analysis. *Medicine* 2016;95:e5703.
 45. Sze J, Mooney J, Barzi F, et al. Cardiac troponin and its relationship to cardiovascular outcomes in community populations - A systematic review and meta-analysis. *Heart Lung Circ* 2016;25:217-28.
 46. Willeit P, Welsh P, Evans JDW, et al. High-sensitivity cardiac troponin concentration and risk of first-ever cardiovascular outcomes in 154,052 participants. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:558-68.
 47. Passino C, Aimo A, Masotti S, et al. Cardiac troponins as biomarkers for cardiac disease. *Biomark. Med.* 2019;13:322-30.
 48. Sigurdardottir FD, Lynbakken MN, Holmen OL, et al. Relative prognostic value of cardiac troponin I and C-reactive protein in the general population (from the North-Trøndelag Health [HUNT] Study. *Am J Cardiol* 2018;121:949-55.
 49. van der Linden N, Hilderink JM, Cornelis T, et al. Twenty-four-hour biological variation profiles of cardiac troponin I in individuals with or without chronic kidney disease. *Clin Chem* 2017;63:1655-6.
 50. Prontera C, Zucchelli CG, Vittorini S, et al. Comparison between analytical performances of polyclonal and monoclonal electrochemiluminescence immunoassays for NT-proBNP. *Clin Chim Acta* 2009;400:70-3.
 51. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98-102.
 52. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 2015;161:1566-75.
 53. Sinning C, Keller T, Zeller T, et al. Association of high-sensitivity assayed troponin I with cardiovascular phenotypes in the general population: the population-based Gutenberg health study. *Clin Res Cardiol* 2014;103:211-22.
 54. Bossard M, Thériault S, Aeschbacher S, et al. Factors independently associated with cardiac troponin I levels in young and healthy adults from the general population. *Clin Res Cardiol* 2016;106:96-104.
 55. Sheydina A, Riordon DR, Boheler KR. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clin Sci* 2011; 121:315-29.
 56. Rota M, Goichberg P, Anversa P, et al. Aging effects on cardiac progenitor cell physiology. *Compr Physiol* 2015; 5:1775-814.
 57. Henning RH, Brundel BJJM. Proteostasis in cardiac health and disease. *Nat Rev Cardiol* 2017;14:637-53.
 58. Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, et al. Aging and autophagy in the heart. *Circ Res* 2016;118:1563-76.
 59. Lyngbakken MN, Røsjø H, Holmen OL, et al. Temporal changes in cardiac troponin are associated with risk of cardiovascular events in the general population: The Nord-Trøndelag Health Study. *Clin Chem* 2019;65:871-81.

Impatto epidemiologico della patologia ischemica del miocardio in Italia

Giuseppe Lippi¹, Camilla Mattiuzzi², Chiara Bovo³, Gianfranco Cervellin^{4,5}

¹Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

²Servizio per il Governo Clinico, Agenzia provinciale per i servizi socio-sanitari, Trento

³Direzione Sanitaria, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

⁴Academy of Emergency Medicine and Care, Pavia

ABSTRACT

Epidemiologic burden of ischemic heart disease in Italy.

Background: this article provides an updated overview on the current epidemiologic burden of ischemic heart disease (IHD) in Italy.

Methods: an electronic search was carried out in the Global Health Data Exchange (GHDx) registry, using the keyword "ischemic heart disease", for retrieving recent information (year 2017) on incidence, prevalence, health loss (expressed as disability-adjusted life year, DALYs) and mortality of IHD in Italy.

Results: the cumulative incidence, prevalence and mortality of IHD in Italy are 0.38%, 3.47% and 0.16% respectively, whilst the impact on health loss is 1.11 million DALYs (6.73% of total DALYs). Incidence, prevalence and DALYs are higher in men than in women, whilst mortality is only marginally higher in males. Overall, IHD is the first cause of death in Italy (15.5% of all deaths). During the last three decades the incidence has constantly increased (+30%), whilst DALYs have declined in both sexes by ~30%. Mortality for IHD steadily decreased in men (-13%), whilst it remained almost unchanged in women. The curve of incidence of IHD in Italy peaks between 60-84 years in men and between 75-94 years in women. The mortality curve of IHD in Italy peaks in both sexes between 85-94 years. Hypertension, hypercholesterolemia and diabetes are the leading risk factors for IHD in Italy.

Conclusions: IHD still poses a substantial clinical, social and economic burden in Italy.

INTRODUZIONE

Sulla base della definizione più recente, il termine danno miocardico è usato per definire condizioni in cui sia evidenza di valori elevati di troponine cardiache (cTn) con almeno un valore superiore al 99° percentile del limite superiore dell'intervallo di riferimento (URL) (1). Il danno è da considerarsi acuto quando si è in presenza di variazione dinamica (incremento e/o diminuzione) recente del valore di cTn, mentre si definisce danno cronico un incremento dei valori troponine cardiache sopra l'URL, persistente e pressoché costante, riscontrabile in situazioni cliniche quali lo scompenso cardiaco, alcune miocardiopatie, il cuore polmonare cronico. Il termine infarto del miocardio è invece riservato a tutte le condizioni caratterizzate da danno miocardico acuto conseguente a ischemia miocardica con evidenza di variazione dinamica (incremento e/o diminuzione) recente del valore di cTn,

con almeno un valore superiore al 99° percentile URL, e con almeno una delle seguenti caratteristiche: sintomi di ischemia miocardica, comparsa di anomalie elettrocardiografiche suggestive di ischemia, dimostrazione di necrosi miocardica o anomalie cinetiche mediante tecniche di imaging, e/o identificazione di un trombo intracoronarico durante angiografia o come rilievo autoptico (1).

Così come evidenziato dalla quarta definizione universale di infarto del miocardio emanata congiuntamente da European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF), la patologia ischemica del miocardio rappresenta oggi un problema sanitario globale, al punto che gli studi epidemiologici divengono essenziali per predisporre interventi di prevenzione, diagnosi e cura più efficaci ed efficienti, rivolti soprattutto alle popolazioni più vulnerabili (1). Secondo statistiche recenti dell'Organizzazione

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona, Piazzale LA Scuro, 37134 Verona, Tel 0039-045-8122970, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 06.09.2019

Revisionato: 10.09.2019

Accettato: 02.10.2019

Publicato on-line: 15.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.004

Mondiale della Sanità (OMS), la cardiopatia ischemica è la prima causa di mortalità nel mondo (circa 9,4 milioni di decessi/anno), davanti alle neoplasie maligne (9,0 milioni di decessi/anno) (2). In qualsiasi continente eccetto l'Africa, la patologia ischemica del miocardio si conferma essere la prima causa di morte. Altri dati molto recenti, raccolti in 21 Paesi di diverse aree geografiche, confermano come la malattia cardiovascolare rimanga la principale causa di morte tra gli adulti di età compresa tra i 35 e i 70 anni nei Paesi ad alto reddito, mentre in alcuni Paesi a medio reddito i decessi per neoplasia stanno superando quelli per malattia cardiovascolare. Ciò sembrerebbe indicare un pattern di transizione della mortalità; è quindi prevedibile che in un futuro prossimo le neoplasie divengano la prima causa di morte in molti Paesi del mondo (3,4). In un articolo correlato ai due precedentemente citati si fa anche notare come la maggior parte dei casi di malattia cardiovascolare possa essere attribuita ad un piccolo numero di fattori di rischio modificabili, fatto questo che riveste un'importanza fondamentale nell'ambito delle strategie preventive (5). Sempre secondo l'OMS, in anni recenti la mortalità per cardiopatia ischemica sembra essere diminuita nei Paesi con indice socio-economico più elevato, mentre è complessivamente aumentata in quelli con indice socio-economico più basso (2). Indipendentemente dall'impatto clinico, la patologia ischemica del miocardio erode sostanziali risorse umane ed economiche. Secondo le stime più recenti dell'AHA, i costi annuali (diretti e indiretti) della cardiopatia ischemica negli Stati Uniti ammontano a circa 218,7 miliardi di dollari all'anno (6), con una allarmante proiezione che sembrerebbe indicare un raddoppio dei costi nei prossimi 10 anni. Alla luce di queste importanti evidenze epidemiologiche, lo scopo di questo articolo è quello di offrire ai lettori un panorama epidemiologico aggiornato relativo all'impatto clinico e sociale della patologia ischemica del miocardio in Italia.

METODI

Per valutare l'attuale impatto epidemiologico della patologia ischemica del miocardio in Italia abbiamo interrogato il registro *Global Health Data Exchange* (GHDx) (7), un ampio database epidemiologico gestito dall'Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), contenente dati epidemiologici relativi ad oltre 350 patologie in 195 diversi Paesi, negli anni dal 1990 al 2017 (8). Rispetto al database dell'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT) (9), il registro GHDx consente di ottenere informazioni relative a incidenza, prevalenza, perdita di salute (espressa in termini di, *disability-adjusted life years* -DALYs) per ogni singola patologia o per gruppi di esse, selezionare le variabili mediante ricerca semplice e successiva esportazione in formato compatibile con software di analisi statistica. La ricerca elettronica è stata eseguita utilizzando la parola chiave *ischemic heart disease* [patologia ischemica del miocardio; codici della Classificazione Internazionale delle Malattie (ICD-10) I20-I21.6, I21.9-I25.9, Z82.4-

Z82.49], combinata alle variabili epidemiologiche *years* (anni), *sex* (sesso), *age* (età), *location* (luogo) e *risk* (fattori di rischio). Nel registro GHDx i casi concernenti la cardiopatia ischemica sono stati importati sulla base di una definizione diagnostica validata e standardizzata (10), applicando retrospettivamente i criteri della terza definizione universale dell'infarto del miocardio (11). Da ciò si evince che l'impatto dell'infarto del miocardio di tipo 2 potrebbe essere sottostimato sulla base di questi criteri, giacché i dati fino all'anno 2017 sono antecedenti alla quarta definizione universale dell'infarto del miocardio, pubblicata nel 2018 (1). La valutazione epidemiologica complessiva per la patologia ischemica del miocardio si avvale del registro di informazioni derivate da 520 siti differenti in 61 Paesi, Italia compresa. La stima epidemiologica si basa quindi sull'utilizzo dello strumento di analisi *DisMod*, così come descritto più dettagliatamente in altre pubblicazioni (10,12).

Per lo scopo di questa ricerca sono stati utilizzati i dati relativi all'anno 2017 (l'ultimo disponibile nel registro GHDx), selezionando "Italia" nell'opzione luogo. Il risultato della ricerca elettronica è stato quindi scaricato in valori separati da virgola (CSV), importato in un file Excel (Microsoft, Redmond, WA, US) e analizzato con *Analyse-it* (*Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK*) e *MedCalc software* (*MedCalc Software, Ostenda, Belgio*). Il rischio è stato espresso in termini di odds ratio (OR) e relativo intervallo di confidenza al 95% (95%CI). Lo studio è stato condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki e secondo i termini della legislazione locale pertinente. Non è stato necessario ottenere l'approvazione del locale comitato etico (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona), poiché non prevista per pubblicazioni basate su ricerche in database scientifici di libero accesso.

RISULTATI

L'impatto epidemiologico attuale della patologia ischemica del miocardio in Italia è riassunto in tabella 1. Secondo le stime più recenti, incidenza, prevalenza e mortalità sono stimate rispettivamente a 0,38%, 3,47% e 0,16%, mentre l'impatto sulla salute persa è di circa 1,11 milioni di DALYs ogni anno (6,73% dei DALYs complessivi). Incidenza (0,45% *versus* 0,30%; OR 1,50; 95%CI; 1,49-1,50; $p<0,001$), prevalenza (4,19% *versus* 2,79%; OR 1,52; 95%CI, 1,52-1,53; $p<0,001$) e impatto sulla salute persa (8,14% *versus* 5,32%; OR 1,58; 95%CI, 1,57-1,59; $p<0,001$) sono significativamente maggiori nell'uomo rispetto alla donna, mentre la mortalità è solo marginalmente superiore nel sesso maschile (0,163% *versus* 0,156%; OR 1,04; 95%CI, 1,03-1,05; $p<0,001$). In termini relativi, la cardiopatia ischemica occupa il primo posto in Italia tra le principali cause di morte (15,5% di tutti i decessi), rappresentando anche la prima causa di morte nel sesso maschile (16,0% di tutti i decessi) e la seconda nel sesso femminile (15,0% di tutti i decessi). Questi dati sono sostanzialmente sovrapponibili all'ultima statistica

Tabella 1
Epidemiologia della patologia ischemica del miocardio in Italia (anno 2017).

	Cumulativa	Donne	Uomini
Incidenza	0,38% (227 285 casi /anno)	0,30% (94 090 casi /anno)	0,45% (133 194 casi/anno)
Prevalenza	3,47% (2101 870 casi)	2,79% (869 009 casi)	4,19% (1232 861 casi)
DALYs	6,73% (1,11 milioni/anno)	5,32% (0,44 milioni/anno)	8,14% (0,67 milioni/anno)
Mortalità	0,16% (96 461 decessi/anno)	0,16% (48 609 decessi/anno)	0,16% (47 852 decessi/anno)

DALYs, disability-adjusted life year

dell'ISTAT per l'anno 2016 (l'ultimo disponibile nel registro ISTAT), che conferma un indice di mortalità cumulativa per patologia ischemica del miocardio sostanzialmente identico (0,15% *versus* 0,16% nel database GHDx anche per l'anno 2016), confermando altresì il marginale eccesso di mortalità nel sesso maschile (~8%) (9). Per quanto concerne l'impatto sulla salute persa, la cardiopatia ischemica è cumulativamente al primo posto in termini di DALYs in Italia, rappresentando la prima causa di perdita di salute nell'uomo e la quarta causa di perdita di salute nella donna, preceduta nel sesso femminile da lombalgia, demenze ed emicrania.

La tendenza registrata dal 1990 al 2017 per incidenza, prevalenza, perdita di salute e mortalità per patologia ischemica del miocardio nei due sessi è riassunta in figura 1. L'incidenza nel corso delle ultime tre decadi appare costantemente in aumento in ambo i sessi (+30%), nonostante sia possibile apprezzare un lieve declino nel corso degli ultimi 5 anni (figura 1A). La tendenza della prevalenza tra 1990 e 2017 manifesta un andamento abbastanza simile, anche se l'incremento nelle donne appare inferiore a quello negli uomini (12% *versus* 35%) (figura 1B). In netta controtendenza appare invece l'impatto sulla perdita di salute, che in entrambi i sessi è diminuito di circa il 30% nel corso delle ultime tre decadi (figura 1C). La tendenza diversificata di prevalenza nei due sessi si riflette poi in quella della mortalità, giacché il numero di decessi per cardiopatia ischemica è costantemente diminuito nel corso delle ultime tre decadi negli uomini (-13%), mentre è rimasto pressoché costante nelle donne (+1%) (figura 1D).

La distribuzione di incidenza di patologia ischemica del miocardio per età in Italia è raffigurata in figura 2A. Nonostante le curve nei due sessi seguano un andamento simile, l'incidenza negli uomini aumenta più precocemente e raggiunge il picco tra 60-84 anni, mentre nelle donne aumenta in modo meno marcato e raggiunge il picco tra 75-94 anni. La curva di mortalità appare invece più omogenea, seppure anche in questo caso aumenti più rapidamente negli uomini rispetto alle donne. In ambo i sessi, il picco di decessi si concentra tra 85-94 anni (figura 2B).

L'elenco dei maggiori fattori di rischio in Italia è infine

riassunto in figura 3, dalla quale si evince come ipertensione, ipercolesterolemia e diabete appaiono i fattori che maggiormente incidono sull'epidemiologia della cardiopatia ischemica nel nostro Paese.

DISCUSSIONE

Un'accurata e approfondita base epidemiologica rappresenta il cardine di qualsiasi intervento sanitario atto a prevenire, diagnosticare più efficientemente e curare più efficacemente qualsiasi malattia, compresa quindi anche la patologia ischemica del miocardio (13). Per quanto concerne la Medicina di Laboratorio, conoscere più precisamente gli ambiti della popolazione a maggior rischio per questa patologia, così come la sua evoluzione nel corso degli anni, consente di pianificare meglio le risorse umane, economiche e tecnologiche per consentire quindi una diagnosi più rapida e accurata, congiuntamente ad un trattamento più mirato ed efficiente (14). È quindi proprio in quest'ottica che questo articolo si propone di presentare un panorama epidemiologico recente relativo all'impatto clinico e sociale della cardiopatia ischemica in Italia.

Una valutazione globale dei dati presentati in questo articolo consente di evidenziare come la patologia ischemica del miocardio imponga tuttora un fardello epidemiologico rilevante in termini clinici, sociali ed economici, poiché essa rimane la prima causa di mortalità e perdita di salute in Italia. Nonostante la tendenza recente sembri confermare una graduale diminuzione dell'impatto sulla perdita di salute (figura 1), verosimilmente imputabile ad una diagnosi più precoce frutto della recente introduzione di nuovi metodi per la determinazione delle troponine cardiache ad elevata sensibilità (15) e di strategie terapeutiche più efficienti (16), la mortalità rimane ancora elevata, soprattutto nelle donne. È interessante notare come l'esito più sfavorevole della cardiopatia ischemica nel sesso femminile trovi conferma in pubblicazioni recenti. Esse dimostrano, infatti, come ciò sia sostanzialmente imputabile a ritardo di presentazione dalla comparsa dei sintomi, che determina quindi un rischio di mortalità maggiore (fino al 60%) a 30 giorni rispetto agli uomini

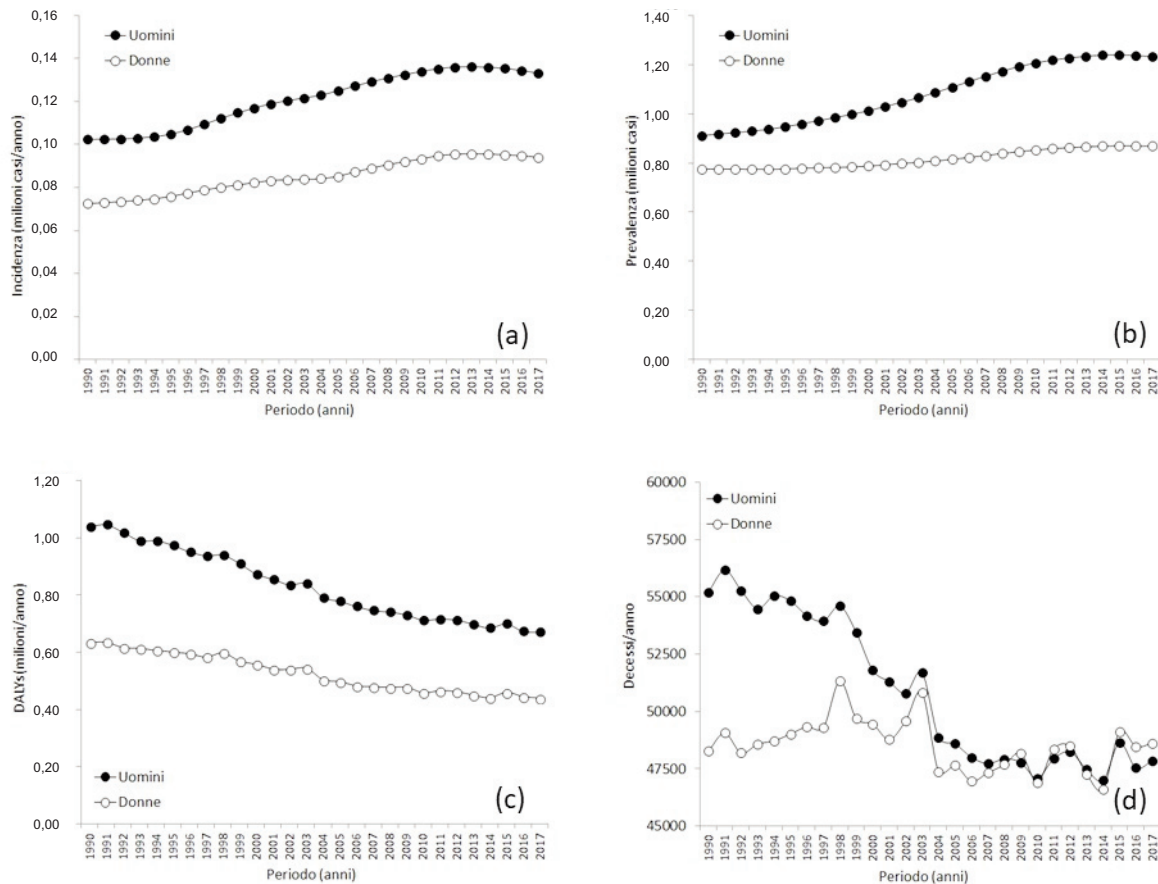


Figura 1

Tendenza di incidenza (a), prevalenza (b), perdita di salute (disability-adjusted life year, DALYs) (c) e mortalità (d) per patologia ischemica del miocardio in Italia dal 1990 al 2017.

(17), maggior impatto di comorbidità (diabete, ipertensione) che possono influenzare negativamente il decorso clinico (18), così come fattori sociali, economici e culturali che portano le donne a sottovalutare maggiormente la gravità della sintomatologia (19).

Per quanto concerne i dati relativi all'incidenza, essi appaiono superiori a quelli riportati dalle statistiche recenti dell'AHA negli Stati Uniti (6), ove si stima si manifestino 805 000 casi di patologia ischemica del miocardio ogni anno, per un'incidenza cumulativa pari a 0,25%. Analogamente a quanto evidenziato dai nostri dati, l'incidenza negli Stati Uniti, così come in Italia, è tutt'ora maggiore negli uomini rispetto alle donne (+59% negli Stati Uniti *versus* +50% in Italia), mentre l'età d'esordio negli Stati Uniti è 65 anni negli uomini e 72 anni nelle donne, dati molto simili a quelli della popolazione italiana. Sorprendentemente, nonostante l'incidenza di cardiopatia ischemica appaia ancora inferiore negli Stati Uniti rispetto all'Italia, la mortalità è invece più che doppia in USA (0,35% *versus* 0,16% in Italia) (6). Ciò potrebbe riflettere la diversità di accesso alle cure assicurate dai servizi sanitari dei due Paesi,

quello italiano votato all'universalità delle cure mentre quello statunitense è più dipendente dalle coperture assicurative, così come dall'impatto delle comorbidità nei pazienti infartuati che potrebbero compromettere più seriamente l'efficienza delle cure negli Stati Uniti rispetto all'Italia. Questi dati non sono comunque del tutto sorprendenti, giacché anche le recenti statistiche dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) (anno 2017) confermano che la mortalità a 30 giorni dopo un infarto acuto del miocardio è pari a 5,4% in Italia rispetto a 6,5% negli Stati Uniti (il che equivale ad un eccesso di mortalità del 20% a 30 giorni dall'infarto) (20).

Particolare enfasi merita la discussione sulla distribuzione per età della patologia ischemica del miocardio, giacché essa tende oggi a concentrarsi in età sempre più avanzata, anche per effetto del graduale invecchiamento della popolazione (21). Questo aspetto non può essere assolutamente sottovalutato, poiché è oggi ben noto come la sintomatologia dell'ischemia miocardica acuta diventi sempre meno "specificata" con il progredire dell'età, tanto che in età avanzata (>80 anni)

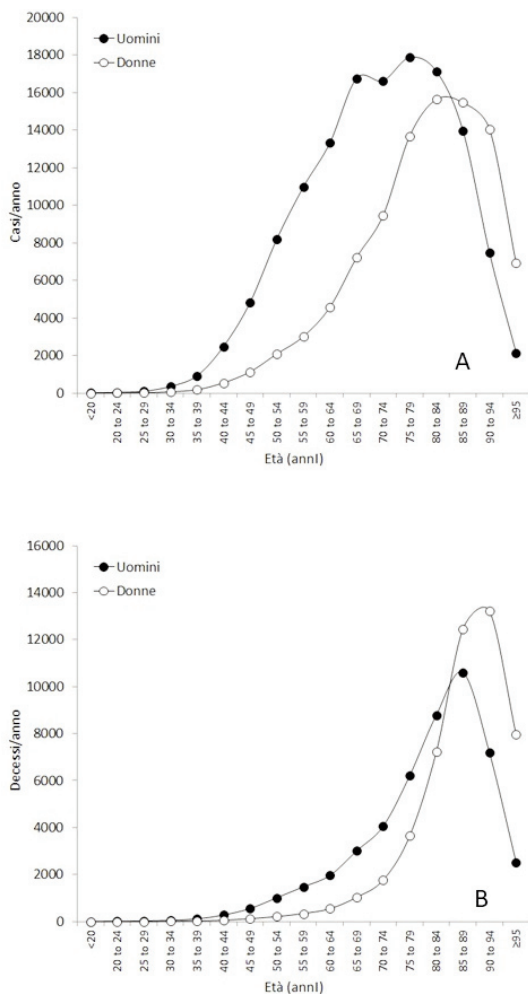


Figura 2
Distribuzione di incidenza (A) e mortalità (B) per patologia ischemica del miocardio in Italia in relazione a sesso ed età.

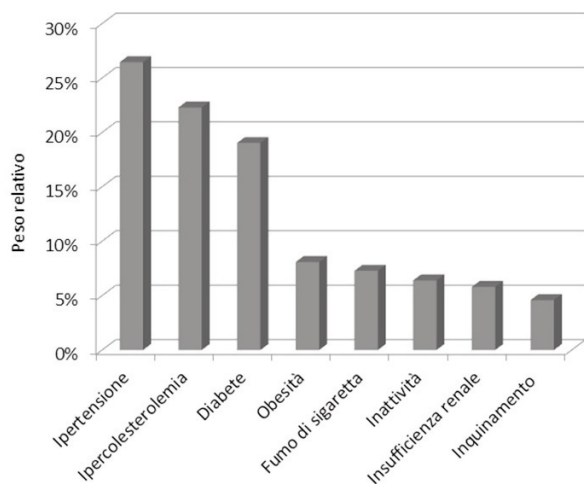


Figura 3
Elenco dei maggiori fattori di rischio per patologia ischemica del miocardio in Italia.

l'esordio con sintomi "atipici" caratterizza ben oltre il 50% dei pazienti (22). In termini diagnostici ciò rappresenta una grossa sfida poiché, venendo a mancare progressivamente l'apporto della clinica, è necessario un maggiore ricorso a strategie diagnostiche alternative basate sulla diagnostica *in vitro* e per immagini. Altra causa di redistribuzione delle fasce di età è la crescente importanza assunta dall'infarto miocardico tipo 2 secondo la recente definizione universale (1). Oggi si ritiene che l'infarto di tipo 2 sia più frequente di quello di tipo 1, raggiungendo percentuali sul totale variabili dal 57% al 75%, associandosi a età più avanzata e comorbidità, e gravato da prognosi spesso peggiore rispetto al tipo 1 (23).

Appaiono poi meritevoli di menzione e discussione i dati presentati alcuni anni fa da un'indagine epidemiologica che ha coinvolto 296 Unità Coronariche italiane (24), secondo cui la mortalità durante il ricovero per infarto del miocardio con soprasslivellamento ST (STEMI) è moderatamente maggiore rispetto a quella per infarto del miocardio senza soprasslivellamento ST (NSTEMI; 7,5% *versus* 5,2%), così come è moderatamente superiore anche la mortalità a 30 giorni (9,5% *versus* 7,1%). Al contrario, il rischio di re-infarto (1,3% *versus* 1,0%) e riammissione per cardiopatia ischemica (2,8% *versus* 2,5%) appaiono maggiori nei pazienti con NSTEMI rispetto a quelli con STEMI. Questi dati riflettono altre evidenze pubblicate più recentemente da Darling et al. (25), secondo cui la mortalità a breve termine è maggiore nei pazienti con STEMI rispetto ai pazienti con NSTEMI, mentre nei 5 anni seguenti la mortalità è superiore del 28% nei pazienti con NSTEMI rispetto a quelli con STEMI.

In conclusione, il quadro epidemiologico che emerge dalla nostra ricerca dimostra come la patologia ischemica del miocardio rappresenti tuttora il principale problema di salute pubblica in Italia. Seppur essa sia storicamente considerata una patologia più prevalente nel sesso maschile, i dati recenti dimostrano come la forbice tra i due sessi si stia progressivamente chiudendo, soprattutto per quanto concerne i dati sulla perdita di salute e mortalità. Maggiore attenzione dovrebbe altresì essere riposta nell'identificazione precoce di soggetti a rischio maggiore, potenziando pertanto le risorse per indagini volte alla diagnosi precoce di ipertensione, ipercolesterolemia e diabete, patologie in cui la Medicina di Laboratorio gioca un ruolo determinante.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* 2018;138:e618-e651.
2. World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country

- and by Region, 2000-2016. Geneva. 2018. https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html (ultimo accesso: settembre 2019).
3. Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, et al. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 2019; doi:10.1016/S0140-6736(19)32007-0.
 4. Kocarnik J. Cancer's global epidemiological transition and growth. *Lancet* 2019; doi:10.1016/S0140-6736(19)32046-X.
 5. Yusuf S, Joseph P, Rangarajan S, et al. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 2019; doi:10.1016/S0140-6736(19)32008-2.
 6. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2019;139:e56-e528.
 7. Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange. <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> (ultimo accesso: settembre 2019).
 8. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392:1789-858.
 9. Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT). Mortalità per territorio di residenza. <http://dati.istat.it/?lang=en> (ultimo accesso: settembre 2019).
 10. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. *Lancet* 2018;392:1789-858.
 11. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012;33:2551-67.
 12. Barendregt JJ, Van Oortmarssen GJ, Vos T, et al. A generic model for the assessment of disease epidemiology: the computational basis of DisMod II. *Popul Health Metr* 2003;1:4.
 13. Roger VL. Epidemiology of myocardial infarction. *Med Clin North Am* 2007;91:537-52.
 14. Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. Trends of popularity of cardiac biomarkers: Insights from Google Trends. *Emerg Care J* 2018; 14:7769.
 15. Galli C, Lippi G. High-sensitivity cardiac troponin testing in routine practice: economic and organizational advantages. *Ann Transl Med* 2016;4:257.
 16. Reddy K, Khaliq A, Henning RJ. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction. *World J Cardiol* 2015;7:243-76.
 17. Bugiardini R, Ricci B, Cenko E, et al. Delayed care and mortality among women and men with myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* 2017;6(8). pii: e005968. doi: 10.1161/JAHA.117.005968.
 18. Johansson S, Rosengren A, Young K, et al. Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. *BMC Cardiovasc Disord* 2017;17-53.
 19. Chandrasekhar J, Gill A, Mehran R. Acute myocardial infarction in young women: current perspectives. *Int J Womens Health* 2018;10:267-84.
 20. Organisation for Economic Co-operation and Development. Health at a Glance 2017: OECD Indicators - Mortality following acute myocardial infarction (AMI). OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/health_glance-2017-en.
 21. Zijlstra F, de Boer MJ. Acute myocardial infarction in the elderly. *Neth Heart J* 2015;23:475-6.
 22. Grosmaître P, Le Vavasseur O, Yachouh E, et al. Significance of atypical symptoms for the diagnosis and management of myocardial infarction in elderly patients admitted to emergency departments. *Arch Cardiovasc Dis* 2013;106:586-92.
 23. Sandoval Y, Jaffe AS. Type 2 Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:1846-60.
 24. Di Chiara A, Chiarella F, Savonitto S, et al. Epidemiology of acute myocardial infarction in the Italian CCU network: the BLITZ study. *Eur Heart J* 2003;24:1616-29.
 25. Darling CE, Fisher KA, McManus DD, et al. Survival after hospital discharge for ST-segment elevation and non-ST-segment elevation acute myocardial infarction: a population-based study. *Clin Epidemiol* 2013;5:229-36.

Metodo ad alta sensibilità per la misura della troponina I ed efficienza: risultati di un'esperienza

Anca Irina Leahu¹, Monica Maria Mion¹, Andrea Padoan^{1,2}, Martina Zaninotto¹, Mario Plebani^{1,2}

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio, Ospedale – Università, Padova

²Dipartimento di Medicina, Università di Padova

ABSTRACT

High-sensitive method to measure troponin I and efficiency: the results of an experience.

Background: the development of improved methods for cardiac troponins measurement, characterized by higher analytical sensitivity, allows to adopt rapid rule-in and rule-out strategies by increasing diagnostic accuracy and optimizing the clinical and organizational pathways.

Methods: the efficiency achieved with the adoption of a high sensitive troponin I method, defined by its analytical characteristics a “new generation” method (STAT high sensitive troponin I, hs-TnI, Abbott Diagnostics), in place of a previous assay (LOCI CTNI, Siemens Health Care Diagnostics), has been evaluated. The results obtained in 1 000 consecutive patients admitted to the Emergency Department (ED) with acute chest pain, in 2015 (before the new method) have been compared with those obtained in 1 004 consecutive patients admitted in 2017 (after the introduction of the hs-TnI method).

Results: in 2017 an increased number of troponin I baseline values higher than 99th percentile (10.7 *versus* 8.3% in 2015, $p = 0.089$) has been observed. Furthermore, an improvement on the following clinical and organizational aspects has been detected in 2017: the adoption of an accelerated algorithm, being the median interval between two consecutive measurements 3 h and 18 min in 2017 and 4 h and 30 min in 2015 ($p < 0.001$); in the 75% of patients showing either positive or negative value at admission, the second measurement has been carried out within 180 min and 225 min ($p = 0.024$), respectively (in 2015 the timings were 239 e 337 min, $p < 0.001$, respectively). Finally, in 2017 a third troponin I measurement has been carried out in 0.4% of patients only (it was 3.5% in 2015, $p = 0.044$).

Conclusions: These data demonstrate a significant improvement in the patient management as well as an optimization of human and organizational resources with the adoption of a method with improved analytical performances to measure troponin I in ED.

INTRODUZIONE

La progressiva introduzione nella pratica clinica dei metodi di misura ad alta sensibilità per la determinazione della concentrazione circolante delle troponine cardiache, ha determinato non solo un notevole miglioramento nella sensibilità diagnostica e di esclusione della patologia cardiaca acuta nei pazienti con dolore toracico, ma ha anche consentito l'adozione di algoritmi accelerati nella valutazione di pazienti che si presentano al dipartimento di emergenza con segni e sintomi suggestivi di patologia ischemica acuta (1-3).

Come raccomandato nelle linee-guida cliniche,

infatti, la valutazione biochimica va effettuata attraverso la valutazione delle cinetiche di rilascio del biomarcatore, con l'esecuzione di prelievi seriati (4). Con i metodi di misura attuali, caratterizzati da sempre migliore sensibilità analitica, gli algoritmi diagnostici sono passati da tempistiche di prelievo con intervalli di 6-12 ore dopo il prelievo all'ammissione, a 3-6 ore con i metodi attuali, fino alla proposizione di algoritmi ad 1 ora come ipotizzato nelle più recenti linee-guida cliniche (5,6).

Scopo di questo studio è stato valutare le ricadute organizzative e cliniche dell'introduzione di un metodo ad alta sensibilità nell'UOC Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova (AOP),

Corrispondenza a: Martina Zaninotto, Dipartimento Medicina di Laboratorio Ospedale-Università Padova, E-mail martina.zaninotto@aopd.veneto.it

Ricevuto: 29.11.2019

Revisionato: 09.01.2020

Accettato: 21.01.2020

Publicato on-line: 09.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.021

mettendo a confronto le modalità operative e di gestione dei pazienti con dolore toracico che si sono presentati al Pronto Soccorso (PS) dell'AOP prima e dopo l'introduzione di un nuovo metodo con migliorate prestazioni analitiche.

METODI

Nel mese di dicembre 2016, l'UOC Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, ha introdotto, in regime di urgenza/emergenza ed in routine, un metodo ad alta sensibilità per la misura della troponina I applicato sullo strumento Architect i2000 (metodo A, principio analitico immunochimoluminescenza, STAT High Sensitive Troponin I - Abbott, USA) che ha sostituito il metodo precedente, applicato sullo strumento Dimension Vista (metodo B, principio analitico LOCI, Siemens Healthcare Diagnostics, Milano, Italia) che per le caratteristiche analitiche era classificato come un "metodo di ultima generazione". Le seguenti variabili: ora dell'apertura della cartella clinica; orari (intervalli) delle determinazioni di troponina I; orario di chiusura della pratica del PS per dimissione o ricovero, sono state confrontate su 1 000 pazienti consecutivi che si sono presentati in PS con dolore toracico nei mesi di gennaio e febbraio 2015, con quelle relative alla gestione di 1 004 pazienti consecutivi che tra gennaio e febbraio 2017 hanno avuto accesso in PS per il medesimo sintomo, il dolore toracico. Le principali caratteristiche della popolazione studiata sono riassunte nella Tabella 1. L'algoritmo diagnostico utilizzato per i pazienti con dolore toracico è quello raccomandato dalle recenti linee-guida cliniche (4), ed applicato come Percorso Diagnostico Terapeutico Assistenziale (PDTA)

dall'Azienda Ospedaliera di Padova, che prevede all'ammissione l'esecuzione dell'elettrocardiogramma ed il monitoraggio biochimico con prelievi serati per la determinazione della troponina I, effettuati all'ammissione (tempo 0) e dopo 3 e 6 ore rispettivamente.

Nel corso dello studio, le prestazioni analitiche dei metodi sono state monitorate mediante l'esecuzione di controlli interni di qualità di parte terza (Liquicheck, Biorad, Milano, Italia) a diversi livelli di concentrazione con almeno 1 valore prossimo al 99° percentile di ciascun metodo dichiarato dal produttore (metodo A: 16 ng/L femmine; 34 ng/L maschi; metodo B: 0,045 µg/L). L'imprecisione totale (CV%) nel corso dello studio, valutata su differenti lotti dei materiali di controllo citati, è risultata per il metodo A: 5,5% (15,6 ng/L) e 3,8% (34,2 ng/L); per il metodo B: 7,2% (0,033 µg/L).

Analisi statistica

Nello studio sono state considerate variabili confondenti l'età e il sesso dei soggetti inclusi, nonché il momento in cui il paziente raggiunge il PS (servizio diurno se tra le 8:00 e le 20:00). Per studiare la differenza delle proporzioni degli esami eseguiti tra il 2015 e il 2017, è stata utilizzata l'analisi logistica multivariata. Il modello di Cox è stato utilizzato per stimare l'effetto delle variabili studiate sugli intervalli di tempo intercorsi tra le determinazioni della troponina I (analisi multivariata). Nelle analisi multivariate sono state incluse le variabili confondenti. L'analisi di Kaplan-Meier è stata utilizzata, invece, per evidenziare il numero di esami eseguiti fino a ciascun determinato momento (incidenza cumulativa), stratificando i risultati per l'anno 2015 e 2017.

Tabella 1

Caratteristiche della popolazione studiata

	2015	2017
Numero totale pazienti	1 000	1 004
Età media, anni (intervallo)	55 (43-82)	59 (45-88)
Maschi	527 (52,7%)	536 (53,4%)
Femmine	473 (47,3%)	468 (46,6%)
Dolore toracico tipico	225 (22,5%)	268 (26,7%)
Dolore toracico atipico	775 (77,5%)	736 (73,3%)
Senza diagnosi	2 (0,2%)	0 (0,0%)
Ricoverati	219 (21,9%)	231 (23,0%)
Dimessi	757 (75,7%)	765 (76,2%)
Rifiuto ricovero	21 (2,1%)	6 (0,6%)
Allontanamento spontaneo	3 (0,3%)	2 (0,2%)

RISULTATI

Nello studio sono stati inclusi 2004 soggetti. In 1 767 soggetti è stata effettuata almeno una determinazione di troponina I all'ammissione in PS, mentre in 237 soggetti la troponina I non è stata misurata: 206 (86,9%) sono stati dimessi o hanno rifiutato il ricovero e 31 sono stati ricoverati con diagnosi di pneumotorace (n=5), broncopneumopatia (n=12), epigastralgia (n=8), infezioni polmonari (n=3), infezioni intestinali (n=3), rispettivamente. I due gruppi di soggetti non differiscono significativamente per sesso (Fisher's exact test, $p = 0,788$) e per età (Mann-Whitney, $z = 1,56$, $p = 0,118$). I risultati riassuntivi dei 1 767 pazienti sui quali è stata effettuata almeno 1 determinazione di troponina I all'ammissione sono riassunti in Tabella 2A.

I dati riportati, suddivisi per anno, dimostrano un aumento (anche se non statisticamente significativo) dei pazienti con troponina I positiva al primo prelievo nell'anno 2017 rispetto al 2015 (10,7 *versus* 8,3% Fisher's exact test, $p = 0,089$) ed un aumento del numero dei pazienti ricoverati (8,7 *versus* 7,0%, test per il confronto delle proporzioni, $z = 0,431$, $p = 0,666$). Si osserva inoltre, come una percentuale, anche se modesta, di pazienti venga dimessa nonostante il valore positivo di troponina I all'ammissione, percentuale che raddoppia negli anni considerati (2015 *versus* 2017: 0,8% *versus* 1,8%, $z = 6,44$, $p < 0,001$). In 521 pazienti viene effettuato un secondo prelievo (29,5%) con una percentuale molto simile nel 2015 (13,8%) e nel 2017 (13,0%). Una percentuale di questi pazienti, che raddoppia nel corso degli anni (2,0 *versus* 3,9%) viene dimessa dopo il secondo prelievo, nonostante la positività del biomarcatore (Tabella 2B). Queste differenze non raggiungono tuttavia la significatività statistica ($z = -0,13$, $p = 0,899$; $z = -0,80$, $p = 0,425$, rispettivamente).

Relativamente all'intervallo di tempo trascorso tra il

1° ed il 2° prelievo, si osserva complessivamente come, con l'introduzione del metodo ad alta sensibilità, il PS adotti un algoritmo accelerato per la gestione dei pazienti, con un tempo mediano tra i 2 prelievi consecutivi di 191 minuti (3 ore e 11 minuti) nel 2017 in confronto a 261 minuti (4 ore e 21 minuti) nel 2015 (HR = 2,61, $p < 0,001$ Mann-Whitney, $z = 10,07$, $p < 0,001$). Inoltre, la gestione più efficiente dei pazienti ammessi con dolore toracico in PS, è indipendente dal valore basale di troponina I, ovvero si riscontra sia nel caso di un valore basale positivo che negativo, risultando pertanto correlata all'introduzione del metodo ad alta sensibilità (HR = 2,59, $p < 0,001$ per l'effetto dell'anno in studio). La Figura 1 riporta invece le differenze di tempo tra il 1° ed il 2° prelievo, nel caso di troponina negativa o positiva al 1° prelievo, nei due periodi di tempo considerati. Nei pazienti con troponina negativa al 1° prelievo, la differenza mediana tra il tempo del 1° e del 2° prelievo è di 74 minuti (Mann-Whitney, $z = 9,61$, $p < 0,001$) mentre in quelli con troponina positiva al 1° prelievo la differenza mediana si riduce a 43 minuti (Mann-Whitney, $z = 2,65$, $p = 0,008$) (HR = 2,59, $p < 0,001$). Questa differenza comporta che con il metodo ad alta sensibilità (anno 2017), il 75% dei pazienti con troponina positiva, entro 180 minuti dall'ammissione aveva effettuato 2 prelievi mentre quelli con troponina negativa entro 225 minuti (test per l'eguaglianza delle funzioni di sopravvivenza, $p = 0,024$). Nel 2015, con il metodo di generazione precedente per la determinazione della troponina I, le tempistiche per questi pazienti erano di 239 e 337 minuti rispettivamente (test per l'eguaglianza delle funzioni di sopravvivenza, $p < 0,001$). Inoltre, nel 2017, il 3° prelievo è stato effettuato solamente nello 0,4% mentre nel 2015 nel 3,5% dei pazienti (test tra proporzioni $z = 2,01$, $p = 0,044$). Le modalità e le tempistiche di gestione riportate, non sono risultate significativamente diverse nell'attività di urgenza diurna e notturna.

Tabella 2

Caratteristiche dei pazienti studiati con almeno 1 determinazione di troponina I all'ammissione al Pronto Soccorso (A) e di quelli con 2 determinazioni (B).

A	Troponina Positiva	Troponina Negativa	B	Troponina Positiva	Troponina Negativa
Anno 2015	>0,045 µg/L		Anno 2015	>0,045 µg/L	
N= 876			N= 245		
Ricoverati	65	143	Ricoverati	19	15
Dimessi	8	660	Dimessi	5	206
Anno 2017	F: >16 ng/L; M: >34 ng/L		Anno 2017	F: >16 ng/L; M: >34 ng/L	
N=891			N=276		
Ricoverati	78	133	Ricoverati	25	15
Dimessi	18	662	Dimessi	11	225

F, femmine; M, maschi

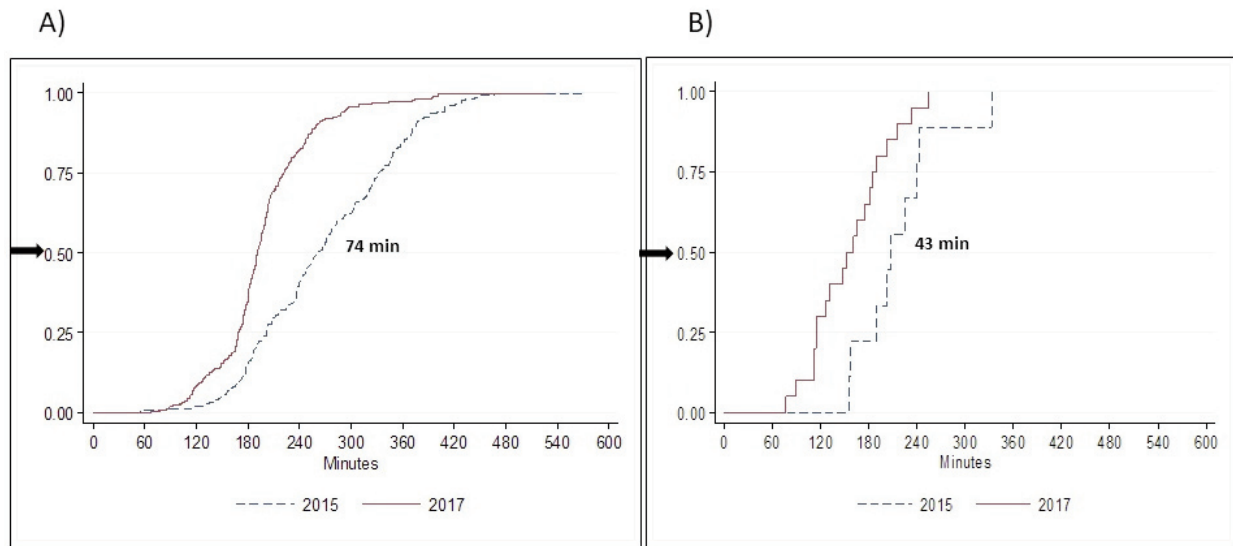


Figura 1

Relazione tra il tempo (in minuti) intercorso tra il prelievo basale (tempo 0) e il prelievo successivo della troponina I, e la percentuale di pazienti che avevano eseguito la seconda determinazione della troponina I in tale periodo. In figura sono riportati i risultati per i pazienti con troponina I negativa (A) e troponina I positiva (B) all'ammissione. Al momento in cui il 50% dei pazienti aveva eseguito la seconda determinazione della troponina I (freccia nera), era stimabile una differenza tra il 2017 e il 2015 complessivamente di 74 minuti e 43 minuti per chi aveva un risultato negativo o positivo del marcatore all'ammissione, rispettivamente.

DISCUSSIONE

La disponibilità di nuovi metodi a migliorata sensibilità analitica per la determinazione delle troponine cardiache, che sono caratterizzate peraltro da assoluta specificità tissutale, ha comportato un notevole miglioramento nella diagnostica biochimica e di esclusione della patologia cardiaca acuta nei pazienti con dolore toracico (7,8) e ha consentito lo sviluppo di algoritmi accelerati nella valutazione seriata della cinetica di rilascio del biomarcatore (9,10).

I risultati ottenuti nel corso dello studio che si proponeva di valutare se all'efficacia clinica, già nota date le caratteristiche del biomarcatore (11), si possa associare anche una aumentata efficienza per tutta l'organizzazione (12, 13), permettono di evidenziare alcuni aspetti interessanti. Innanzitutto, la notevole omogeneità e stabilità nel tempo della popolazione di pazienti che si sono presentati al PS per dolore toracico: non solo si è osservato un numero confrontabile di accessi per il sintomo "dolore toracico" nei 2 periodi considerati (7 500 nel 2015 e 8 002 nel 2017) ma le caratteristiche delle popolazioni sono analoghe per quanto riguarda la caratterizzazione anagrafica, la distribuzione tra i due sessi, l'età media. Anche dal punto di vista clinico si osservano percentuali confrontabili di pazienti ricoverati e dimessi come pure di pazienti diagnosticati con dolore toracico di origine cardiaca e dolore toracico di altra eziologia. Il risultato più rilevante, è la significativa diminuzione del tempo di attesa per il

secondo prelievo tra il 2017 (dopo l'introduzione del metodo ad alta sensibilità) ed il 2015, osservata nei pazienti che vengono dimessi in seguito all'esecuzione dell'esame (esclusione di patologia ischemica acuta). In particolare, una percentuale pari al 25,0% è ancora in attesa del secondo prelievo per la dimissione dopo 335 minuti nel 2015 rispetto ai 222 minuti nel 2017. Tale differenza molto significativa dal punto di vista statistico ($p = 0,007$), può determinare ricadute potenziali in termini di: ottimizzazione delle risorse generali relative a migliorata ed accelerata gestione clinica del paziente (sia in termini di diagnosi e quindi di ricovero che in termini di esclusione di patologie e quindi di dimissione); ottimale utilizzo delle risorse professionali intese nel senso di tempo-uomo del medico o dell'infermiere dedicato al singolo paziente; potenziale riduzione del sovraffollamento nelle aree di osservazione breve del PS (14). Pertanto è possibile concludere che con la sola introduzione del metodo ad alta sensibilità, il tempo di permanenza in PS viene diminuito, dal momento che il tempo di risposta del laboratorio, nei due periodi messi a confronto, è rimasto invariato: 50 minuti nel 2015 *versus* 51 minuti nel 2017.

Con l'applicazione di protocolli biochimici accelerati che prevedevano nel 2015 l'esecuzione del prelievo per la misura della troponina all'ammissione (tempo 0) e ad intervalli successivi (3-6 ore) ma che, con l'adozione dei metodi di misura ad alta sensibilità, hanno potuto essere ulteriormente avvicinati (anche se non sono state

introdotte modifiche nel PDTA) si osserva una significativa diminuzione dell'intervallo di tempo tra il 1° e il 2° prelievo di troponina, indipendentemente dal valore all'ammissione (Figura 1). Va sottolineato, inoltre, che la migliorata sensibilità analitica garantisce una elevata accuratezza anche nella determinazione di basse concentrazioni di troponina circolante, inferiori al limite di sensibilità analitica che, se confermate in prelievi successivi, garantiscono una dimissione in sicurezza del paziente: nel 2017, solo il 36,6% dei pazienti ha presentato valori inferiori al limite di sensibilità analitica mentre nel 2015 era il 75,6% (15).

Un altro aspetto molto importante rilevato nel 2017, infine, è la marcata riduzione, statisticamente significativa, del numero di pazienti a cui è stato effettuato un 3° prelievo (0,4% versus 3,5% nel 2015, $p = 0,044$).

Tale dato supporta la migliorata informazione clinica fornita dai risultati del metodo ad alta sensibilità, con una conseguente riduzione di costi non solo per prelievo ed esame di laboratorio ma anche per la migliore gestione delle risorse umane e strutturali di tutta l'organizzazione.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Anand A, Shah ASV, Beshiri A et al. Global adoption of high-sensitivity cardiac troponins and the universal definition of myocardial infarction. *Clin Chem* 2019;65:484-9.
- Pickering JW, Than MP, Cullen L et al. Rapid rule-out of acute myocardial infarction with a single high-sensitivity cardiac troponin T measurement below the limit of detection: a collaborative meta-analysis. *Ann Intern Med* 2017;166:715-24.
- Boeddinghaus J, Nestelberger T, Twerenbold R et al. Direct comparison of 4 very early rule-out strategies for acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin I. *Circulation* 2017;135:1597-611.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2018;13:305-38.
- Casagrandi 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.
- Nestelberger T, Wildi K, Boeddinghaus J et al. Characterization of the observe zone of the ESC 2015 high-sensitivity cardiac troponin 0h/1h-algorithm for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2016;207:238-45.
- Shah ASV, Sandoval Y, Noaman A, et al. Patient selection for high sensitivity cardiac troponin testing and diagnosis of myocardial infarction: prospective cohort study. *BMJ* 2017;359:j4788.
- Jaffe AS, White H. Ruling-in myocardial injury and ruling-out myocardial infarction with the European Society of Cardiology 1-hour algorithm. *Circulation* 2016;134:1542-45.
- Meller B, Cullen L, Parsonage WA et al. Accelerated diagnostic protocol using high-sensitivity cardiac troponin T in acute chest pain patients. *Int J Cardiol* 2015;184: 208-15.
- Jaeger C, Wildi K, Twerenbold R et al. One-hour rule-in and rule-out of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin I. *Am Heart J* 2016;171:92-102.
- Vittorini S, Clerico A. Cardiovascular biomarkers: increasing impact of laboratory medicine in cardiology practice. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:748-63.
- Forberg JL, Henriksen LS, Edenbrandt L et al. Direct hospital costs of chest pain patients attending the emergency department: a retrospective study. *BMC Emerg Med* 2006;6:1-7.
- Ambavane A, Lindahl B, Giannitis E et al. Economic evaluation of the one-hour rule-out and rule-in algorithm for acute myocardial infarction using the high-sensitivity cardiac troponin T assay in the emergency department. *PlosOne* 2017;12:1-17.
- Julicher P, Greenslade JH, Parsonage WA, et al. The organisational value of diagnostic strategies using high-sensitivity troponin for patients with possible acute coronary syndromes: a trial-based cost-effectiveness analysis. *BMJ Open* 2017;7:e013653.
- Boeckel J, Palapies L, Zeller T et al. Estimation of values below the limit of detection of a contemporary sensitive troponin I assay improves diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2015;61:1197-206.

Troponina cardiaca ad alta sensibilità: risultati preliminari di un confronto tra un nuovo strumento “point-of-care” e i più comuni analizzatori impiegati nei laboratori clinici

Monica Maria Mion¹, Laura Baldin¹, Andrea Padoan¹, Vania Polesello², Ruggero Dittadi², Martina Zaninotto¹, Paolo Carraro², Mario Plebani¹

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale di Padova

²Medicina di Laboratorio, Ospedale dell'Angelo, Mestre, Venezia

ABSTRACT

High sensitivity cardiac troponin: preliminary results of a new point-of-care analyzer compared with the analyzers routinely used in clinical laboratories.

Introduction: cardiac troponin concentration measured using a point-of-care testing (POCT) analyzer could accelerate the management of patients awaiting assessment for suspected acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation in the emergency department (ED).

Methods: we evaluated a new high sensitivity cardiac troponin I (hs-cTnI) assay applied to the POCT PATHFAST™ (Gepa, Italia). The study of imprecision was carried out using commercial control materials and lithium-heparin plasma pools. The percentages of detectable hs-cTnI values between the Limit of Detection (LoD) and the 99th percentile as declared by the manufacturer were studied in a population of reference donors. The clinical diagnostic performance was evaluated in a population of patients presenting to the ED with chest pain (lithium-heparin plasma samples were collected at admission and 3 hours later), in comparison to the most common methods that measure hs-cTnI in clinical laboratories: Architect PLUS i2000_{SR}, Dimension Vista, Advia Centaur XPT, UniCel DXI 800. Using the gender-specific 99th percentile as declared from each manufacturer, the percentages of agreement and disagreement for the classification of hs-cTnI results were calculated as well as the Cohen's Kappa values.

Results: imprecision: concentration range (CV% range)=14.6-12227.3 ng/L (2.8-9.8%); % of hs-cTnI >LoD and <99th percentile in males and females were 30.0% and 18.5% respectively. The percentage ranges of agreement *versus* disagreement observed in the clinical study were 76.8-96.3% *versus* 3.7-23.2% respectively, and the corresponding Cohen's Kappa values ranged from 0.532 to 0.864. The prevalence of discordant results was obtained on admission sample (range=59.1-83.3%).

Discussion: the observed analytical imprecision was satisfactory while the percentages of subjects with hs-cTnI>LoD and <99th percentile were lower than those declared by the manufacturer because a limited number of subjects has been evaluated. The clinical performance has shown an overall satisfactory agreement with all the analytical platforms used.

INTRODUZIONE

Lo sviluppo di metodiche con sensibilità analitica progressivamente crescente per la determinazione delle troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT), ha determinato una significativa modifica della definizione di infarto miocardico (IM), nella quale la determinazione delle cTnI e cTnT è diventata il “gold standard” biochimico.

Nell'anno 2000, le prime linee guida internazionali hanno stabilito che la cTnI e la cTnT dovevano essere considerate i biomarcatori di elezione per la diagnosi di IM. Inoltre, la concentrazione di cTnI e cTnT corrispondente al 99° percentile misurato in una popolazione di riferimento (limite superiore di normalità) doveva essere considerata il valore soglia (livello decisionale clinico) per la diagnosi di IM e più in generale

Corrispondenza a: Monica Maria Mion, Dipartimento Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale di Padova, Via Giustiniani n° 2, 35128 Padova, Tel 39 049 821 2781, E-mail monica.mion@aopd.veneto.it

Ricevuto: 12.12.2019

Revisionato: 13.12.2019

Accettato: 05.02.2020

Publicato on-line: 10.04.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.025

di lesione miocardica. Questo livello decisionale doveva essere determinato con un'impresione, espressa come coefficiente di variazione analitico (CV), uguale o inferiore al 10% (1). Negli anni successivi, tutte le linee guida nazionali e internazionali che si sono susseguite hanno confermato queste raccomandazioni (2-9). L'inarrestabile evoluzione tecnologica ha consentito poi in anni recenti la produzione e la commercializzazione di metodi di misura delle troponine cardiache di ultima generazione definiti "ad alta sensibilità" (hs-cTnI e hs-cTnT) che devono rispondere contemporaneamente a 2 requisiti specifici: una impresione espressa come CV inferiore al 10% alla concentrazione corrispondente al 99° percentile della distribuzione dei valori determinati in una popolazione di riferimento, ed una capacità di misurare valori compresi tra la concentrazione corrispondente al limite di rilevabilità (LoD) ed il 99° percentile, superiore al 50%, sia nei maschi che nelle femmine di una popolazione di riferimento (10). Tali requisiti si applicano sia alle piattaforme analitiche completamente automatizzate e ad elevata produttività dei laboratori clinici che alla strumentazione point-of-care testing (POCT). L'applicazione di un metodo ad alta sensibilità per la determinazione delle troponine cardiache su strumentazione POCT, con adeguate prestazioni analitiche e ridotti tempi di risposta, sarebbe particolarmente utile, in quanto potrebbe migliorare il flusso di pazienti in Pronto Soccorso (PS) in attesa di accertamento per danno miocardico. Infatti, i pazienti con segni e sintomi suggestivi di sindrome coronarica acuta (SCA), ed in particolare di IM acuto (IMA) senza sopraslivellamento persistente del tratto ST (Non ST-Segment Elevation Myocardial Infarction, NSTEMI) al tracciato elettrocardiografico (ECG), costituiscono il sottogruppo di pazienti più frequente e più dispendioso in termini di tempo, provocando sovraffollamento nel PS. Per questi pazienti, la disponibilità di una misura in POCT delle hs-cTn, potrebbe velocizzare la diagnosi con importanti benefici sia per i pazienti ricoverati in PS che per tutta l'organizzazione dell'attività assistenziale (11). Infatti, l'utilizzo di sistemi POCT consente, da un lato di ottenere risultati in tempi molto rapidi e dall'altro, data la semplicità di utilizzo, di dislocarli direttamente in aree di emergenza, garantendo che le determinazioni vengano eseguite in loco, con riduzione del tempo di trasporto del campione e preparazione dello stesso, grazie all'impiego di sangue intero. Tuttavia, vi sono numerosi esempi in letteratura che dimostrano come gli strumenti POCT presentino caratteristiche analitiche differenti e/o inferiori rispetto alle strumentazioni presenti all'interno dei laboratori clinici. Nello specifico, le prestazioni analitiche dei POCT per cTn sono generalmente inferiori, sostanzialmente per la minore sensibilità analitica rispetto a quella dei metodi utilizzati nei laboratori clinici; questo limite non consente di classificare tali metodi "ad alta sensibilità" (12-13). Il presente studio si è posto l'obiettivo di valutare un metodo di recente introduzione, PATHFAST™ hs-cTnI (Gepa, Milano), attualmente l'unico POCT in commercio con caratteristiche dichiarate

dal produttore di alta sensibilità (hs-cTnI). In particolare, lo studio ha previsto sia una valutazione analitica [valutazione dell'impresione e verifica della percentuale di valori di hs-cTnI misurabili tra la concentrazione corrispondente al limite di rilevabilità (LoD) e il 99° percentile dichiarati dal produttore] che una valutazione clinica con verifica delle prestazioni clinico-diagnostiche in confronto a quelle di metodi che misurano la hs-cTnI su strumentazioni consolidate e diffuse nei laboratori clinici.

METODI

Popolazione utilizzata per la valutazione analitica

I campioni di plasma da litio-eparina sono stati raccolti da 67 soggetti donatori sani dell'Associazione Volontari Italiani del Sangue (AVIS), raccolti a luglio 2019 (Tabella 1A), per verificare la capacità del metodo di misurare valori compresi tra la concentrazione corrispondente al LoD ed il 99° percentile dichiarati dal produttore.

I criteri di inclusione sono stati i seguenti: intervallo di età, 18-80 anni; acquisizione del consenso informato; frequenza cardiaca e pressione arteriosa diastolica e sistolica nei limiti di normalità; digiuno di almeno 8 ore; anamnesi negativa per ipertensione, cardiomiopatia, insufficienza renale, obesità (BMI >40 kg/m²), terapia insulinica o altra terapia farmacologica; astensione da attività fisica intensa da almeno 2 giorni; valori nell'intervallo di normalità per colesterolo totale, LDL, HDL, glucosio, creatinina, velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) e Lp(a), determinati sull'analizzatore Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Milano, Italia) seguendo le istruzioni del produttore, peptide natriuretico di tipo B (BNP), misurato sullo strumento Architect PLUS i2000_{SR} (Abbott Diagnostics, Milano, Italia). La concentrazione di hs-cTnI è stata determinata con il metodo POCT in valutazione per ciascun donatore su un campione raccolto al mattino.

Popolazione utilizzata per la valutazione clinico-diagnostica

Sono stati utilizzati i campioni di plasma da litio-eparina di 133 pazienti che si sono presentati al PS dell'Università – Ospedale di Padova per dolore toracico nel novembre 2017 (Tabella 1B). Il valore di hs-cTnI è stato ottenuto con il metodo POCT in valutazione e confrontato con il valore ottenuto con quattro diversi metodi eseguiti su analizzatori utilizzati in laboratorio, come sotto specificato. I campioni sono stati raccolti all'ammissione in PS e, quando disponibili, dopo 3 ore dall'ammissione, come previsto dall'algoritmo diagnostico utilizzato nella nostra realtà clinica. Durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 (http://www.wma.net/e/humanrights/policy_mee-tings.htm).

Tabella 1*Popolazioni studiate durante la valutazione analitica (A) e clinica (B) del metodo PATHFAST™ hs-cTnI.*

(A) Soggetti sani (donatori di sangue)					
Numero soggetti	Periodo di arruolamento	Maschi	Femmine	Intervallo di età (anni)	Numero di campioni
67	3-4 luglio 2019	40	27	19-64	67
(B) Pazienti con dolore toracico					
Numero pazienti	Periodo di arruolamento	Maschi	Femmine	Intervallo di età (anni)	Numero di campioni
133	12-14 novembre 2017	69	64	18-96	191

Metodi analitici*PATHFAST™ hs-cTnI*

PATHFAST™ è il primo strumento POCT sul quale è stato applicato e reso commercialmente disponibile un nuovo metodo per la determinazione quantitativa in vitro di hs-cTnI nel sangue intero anticoagulato e nel plasma. Il saggio PATHFAST™ hs-cTnI, consente di ottenere una misura della concentrazione di cTnI in soli 17 minuti. Il metodo si basa sulla misura immunoenzimatica in chemiluminescenza (CLEIA) e sulla tecnologia MAGTRATION®, un sistema di separazione in cui le particelle magnetiche vengono lavate nel puntale della pipetta. La fosfatasi alcalina legata ad un anticorpo monoclonale anti-cTnI e le particelle magnetiche rivestite di un altro anticorpo monoclonale anti-cTnI si uniscono al campione. La cTnI contenuta nel campione si lega agli anticorpi anti-cTnI del saggio immunometrico per formare un immunocomplesso costituito da cTnI, l'anticorpo marcato con l'enzima e l'anticorpo che riveste le particelle magnetiche. Dopo la rimozione dell'anticorpo marcato con l'enzima non legato nell'immunocomplesso, viene aggiunto un substrato chemiluminescente. Dopo un breve periodo di incubazione (circa 1 minuto), viene misurata l'intensità della luminescenza che è proporzionale alla concentrazione di cTnI del campione. Ad ogni nuovo lotto di reagente, la concentrazione di cTnI viene calcolata mediante l'installazione di una "curva di calibrazione principale" (leggendo il codice a barre in dotazione in ciascuna confezione di reagente) seguita dalla "calibrazione utente" (impiegando i calibratori a 2 livelli di concentrazione). Quest'ultima deve essere eseguita ogni 4 settimane dalla prima "calibrazione utente". Le principali caratteristiche analitiche descritte dal produttore sono riportate in Tabella 2. Possono essere utilizzati campioni di sangue intero o plasma con sodio-eparina, litio-eparina o EDTA. I campioni di sangue intero devono essere analizzati entro 4 ore dal prelievo, mescolati manualmente in modo delicato e non con miscelatore vortex prima di essere caricati sullo strumento.

Strumentazione e metodi utilizzati come confronto per la determinazione di hs-cTnI

Sono state utilizzate le seguenti piattaforme analitiche e i relativi metodi:

- Architect PLUS i2000_{SR} (Abbott Diagnostics, Milano, Italia): saggio immunologico a due fasi con rivelazione in chemiluminescenza che utilizza la tecnologia "Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay" (CMIA);
 - Advia Centaur XPT (Siemens Health Care Diagnostics, Milano, Italia): immunodosaggio sandwich a 3 siti, che si avvale di una tecnologia chemiluminometrica diretta;
 - Dimension Vista (Siemens Health Care Diagnostics, Milano, Italia): immunodosaggio di tipo sandwich chemiluminescente in fase omogenea, basato sulla tecnologia "Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay" (LOCI®);
 - UniCel DXI 800 (Beckman Coulter, Milano, Italia): saggio immunoenzimatico sequenziale a due fasi di tipo sandwich con rivelazione in chemiluminescenza.
- Le principali caratteristiche analitiche dichiarate dai produttori per i metodi elencati sono riassunte in Tabella 2.

Materiali

Per il controllo di qualità interno (CQI) sono stati utilizzati materiali di controllo del commercio di parte terza a diversi livelli di concentrazione forniti dalla ditta Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, United States) e dalla ditta SERO (SERO AS, Billingstad, Norway). Inoltre, sono stati preparati tre pool di plasma da litio-eparina utilizzando residui di campioni della routine pervenuti al Dipartimento Medicina di Laboratorio dell'Università-Ospedale di Padova. I campioni di CQI e i pool, utilizzati per la valutazione analitica dell'imprecisione, sono stati misurati all'inizio e alla fine di ogni seduta analitica.

Tabella 2

Specifiche di qualità dei metodi di misura della troponina cardiaca I ad alta sensibilità (hs-cTnI) fornite dai produttori.

	PATHFAST™	Architect PLUS i2000 _{SR}	ADVIA Centaur XPT	Dimension Vista	UniCel DXI 800
Unità di misura	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L
Intervallo di misura	0-50000	0-50000	0-25000	0-25000	0-27027
LoB	1,23	0,7-1,3	0,90	1,0	1,7
LoD	2,33	1,1-1,9	2,21	2,0	2,3
LoQ (CV%)	4,00 (20%)	4,0-10,0 (10%)	2,50 (20%)	3,0 (20%)	2,3 (20%)
hs-cTnI (10% CV)	15,00	4,0-10,0	>20,00	10,0	5,6
99° percentile M (IC)	29,7 (IC ND)	34,2 (28,9-39,2) (90% IC)	57,27 (38,58-90,15) (90% IC)	78,5 (41,4-114,5) (90% IC)	19,8 (14,0-42,9) (95% IC)
99° percentile F (IC)	20,3 (IC ND)	15,6 (13,8-17,5) (90% IC)	36,99 (30,22-72,63) (90% IC)	53,7 (37,7-115,7) (90% IC)	11,6 (8,4-18,3) (95% IC)
99° percentile M+F (IC)	27,9 (IC ND)	26,2 (23,3-29,7) (90% IC)	47,34 (36,39-64,27) (90% IC)	58,9 (42,2-82,3) (90% IC)	17,5 (12,6-20,7) (95% IC)

LoB, Limite del bianco; LoD, Limite di rilevabilità; LoQ, Limite di quantificazione; CV, Coefficiente di Variazione; IC, Intervallo di Confidenza; M, maschi; F, femmine; ND, non dichiarato.

Analisi statistica

Per la valutazione analitica dell'imprecisione sono stati calcolati: media, deviazione standard (DS) e CV% per ciascun CQI e pool di plasma. Nella popolazione di soggetti sani è stato valutato il numero e la percentuale di soggetti con una concentrazione di hs-cTnI compresa tra il LoD e il 99° percentile del produttore. Per la valutazione clinica sono stati calcolati il grado di concordanza, il grado di discordanza e la Kappa di Cohen tra il PATHFAST™ e ciascuno dei metodi utilizzati per il confronto: PATHFAST™ versus Architect PLUS i2000_{SR}; PATHFAST™ versus Advia Centaur XPT; PATHFAST™ versus Dimension Vista; PATHFAST™ versus UniCel DXI 800. Il grado di concordanza è stato calcolato come la percentuale di campioni con una concentrazione di hs-cTnI superiore al 99° percentile in entrambi i metodi a confronto (positivo/positivo) sommata alla percentuale di campioni con una concentrazione di hs-cTnI inferiore o uguale al 99° percentile in entrambi i metodi a confronto (negativo/negativo). Il grado di discordanza è stato calcolato come la percentuale di campioni con una concentrazione di hs-cTnI superiore al 99° percentile con il metodo PATHFAST™ e inferiore o uguale al 99°

percentile con il metodo a confronto (positivo/negativo) sommata alla percentuale di campioni con una concentrazione di hs-cTnI inferiore o uguale al 99° percentile con il metodo PATHFAST™ e superiore al 99° percentile con il metodo a confronto (negativo/positivo). Un valore di hs-cTnI era considerato positivo se superiore al 99° percentile; un valore di hs-cTnI era considerato negativo se inferiore o uguale al 99° percentile. Le statistiche descrittive sono state eseguite con Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) mentre la Kappa di Cohen è stata calcolata con Stata 13.1 (StataCorp, Lakeway Drive, TX, USA).

RISULTATI

Imprecisione del metodo PATHFAST™ hs-cTnI

I risultati ottenuti nella valutazione dell'imprecisione sono riportati in Tabella 3A per i CQI e in Tabella 3B per i pool di plasma. Tutte le imprecisioni osservate risultano complessivamente molto contenute e inferiori al 10% CV. In particolare, i due materiali con concentrazioni prossime al limite di quantificazione (LOQ) dichiarato dal produttore (15 ng/L; 10% CV) mostrano CV% di 6,9%

Tabella 3

Imprecisione del metodo PATHFAST™ hs-cTnl.

(A) Materiale del commercio							
	L-1B	L-1	L-2	L-3	L-1*	L-2*	L-1S
n	29	29	12	12	15	15	15
media, ng/L	44,7	17,2	1835,1	12227,3	70,8	1633,9	36,6
DS, ng/L	2,5	1,2	91,7	613,6	1,9	55,6	1,6
CV%	5,6	6,9	5,0	5,0	2,8	3,4	4,5

(B) Pool di plasma			
	POOL 1	POOL 2	POOL 3
n	27	31	32
media, ng/L	14,6	24,6	17,3
DS, ng/L	1,4	2,0	1,6
CV%	9,8	8,1	9,1

L, livello di concentrazione; L-1B, controllo di qualità Bio-Rad livello di concentrazione 1B; L-1, controllo di qualità Bio-Rad livello di concentrazione 1; L-2, controllo di qualità Bio-Rad livello di concentrazione 2; L-3, controllo di qualità Bio-Rad livello di concentrazione 3; L-1S, controllo di qualità SERO livello di concentrazione 1; n, numerosità; DS, deviazione standard; CV, coefficiente di variazione; * denota un diverso lotto di controlli dello stesso materiale.

(17,2 ng/L) e 9,8% (14,6 ng/L) rispettivamente. Il metodo POCT risulta quindi conforme al primo dei due requisiti essenziali per definire ad alta sensibilità un metodo di misura della troponina cardiaca.

Valutazione della hs-cTnl misurata con il metodo PATHFAST™ nei soggetti sani

La Tabella 4 riassume i risultati ottenuti per la verifica della percentuale di valori di hs-cTnl misurabili tra il LoD e il 99° percentile. Le concentrazioni, dichiarate dal produttore di hs-cTnl corrispondenti al 99° percentile e le percentuali di valori misurabili tra il limite di rilevabilità (LoD, 2,33 ng/L) e il 99° percentile in una popolazione di soggetti sani sono: femmine, 20,3 ng/L, 52,8%; maschi, 29,7 ng/L, 78,8%; femmine e maschi, 27,9 ng/L, 66,3%. Tali prestazioni, verificate in una popolazione di soggetti sani, sebbene di limitate dimensioni (n=69), mostrano una percentuale di valori di hs-cTnl superiori al LoD e inferiori al 99° percentile, significativamente più bassa: femmine, 18,5% *versus* 52,8%; maschi, 30,0% *versus* 78,8%; femmine e maschi, 25,4% *versus* 66,3% (Tabella 4).

Studio clinico

La Tabella 5 riassume i risultati dello studio clinico in termini di concordanza e discordanza tra metodi analitici diversi, relativamente ai valori di hs-cTnl misurata nei

pazienti con dolore toracico. Il grado di concordanza osservato tra il POCT e le altre piattaforme analitiche utilizzate, è risultato elevato e compreso nell'intervallo 76,8-96,3%, confermato dai valori ottenuti dal calcolo della Kappa di Cohen (intervallo 0,532-0,864) (Tabella 5A). La percentuale di discordanza è risultata contenuta e compresa nell'intervallo 3,7-23,2% (Tabella 5A).

La percentuale dei campioni falsi negativi ($\leq 99^\circ$ percentile per POCT e $> 99^\circ$ percentile per le altre piattaforme analitiche) è risultata particolarmente elevata, con un intervallo di valori 2,6-23,2%; mentre la percentuale dei campioni falsi positivi ($> 99^\circ$ percentile per POCT e $\leq 99^\circ$ percentile per le altre piattaforme analitiche) mostra un intervallo di valori molto inferiore (0,0-2,6%).

I risultati falsi negativi per il PATHFAST™ sono stati osservati prevalentemente sul primo prelievo all'ammissione in PS, nella maggioranza dei pazienti studiati (59,1-83,3%) (Tabella 5B). Tuttavia, nella maggior parte di questi casi (72,6%), il valore di PATHFAST™ hs-cTnl risultava comunque prossimo al 99° percentile al primo prelievo e diventava positivo ($> 99^\circ$ percentile) nel prelievo successivo.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel corso dello studio, che si proponeva di valutare le prestazioni analitiche e cliniche di un nuovo metodo di misura per la troponina I

Tabella 4

Numero e percentuale (%) di soggetti donatori sani con valori di PATHFAST™ hs-cTnI compresi tra il LoD e il 99° percentile dichiarati dal produttore.

	Femmine	Maschi	Femmine + Maschi
Numero	27	40	67
Numero (%) di soggetti con valori di hs-cTnI >LoD e ≤99° percentile	5 (18,5%)	12 (30,0%)	17 (25,4%)

Tabella 5

Percentuali di concordanza e discordanza riscontrati durante lo studio clinico (positivo >99° percentile; negativo ≤99° percentile).

(A) Tutti i campioni (prelievo basale e successivi)				
Metodi	% di concordanza; Kappa di Cohen (95% IC)	% di discordanza (positivo/negativo + negativo/positivo)	% di discordanza (positivo/negativo)	% di discordanza (negativo/positivo)
Architect PLUS i2000 _{SR} vs PATHFAST™	88,5; 0,686 (0,571-0,799)	11,5	11,5	0,0
Advia Centaur XPT vs PATHFAST™	96,3; 0,864 (0,652-1,000)	3,7	3,2	0,5
Dimension Vista vs PATHFAST™	94,8; 0,810 (0,704-0,915)	5,2	2,6	2,6
UniCel DXI 800 vs PATHFAST™	76,8; 0,532 (0,333-0,730)	23,2	23,2	0,0

Prelievo basale, prelievo all'ammissione in pronto soccorso; IC, Intervallo di Confidenza.

(B) Campioni del prelievo basale					
Metodi	Campioni discordanti positivo/negativo		Campioni discordanti negativo/positivo		
	Percentuale sul prelievo basale	Percentuale sui prelievi successivi	Metodi	Percentuale sul prelievo basale	Percentuale sui prelievi successivi
A vs P	59,1	40,9	A vs P	0,0	0,0
AC vs P	83,3	16,7	AC vs P	0,0	100,0
D vs P	80,0	20,0	D vs P	60,0	40,0
B vs P	68,8	31,2	B vs P	0,0	0,0

Prelievo basale, prelievo all'ammissione in pronto soccorso; A, Architect PLUS i2000_{SR}; P, PATHFAST™; AC, Advia Centaur XPT; D, Dimension Vista; B, UniCel DXI 800.

dichiarato ad alta sensibilità, recentemente disponibile in commercio su uno strumento POCT (PATHFAST™), hanno consentito di dimostrare prestazioni analitiche conformi a quelle dichiarate dal produttore ed adeguate per i metodi definiti ad alta sensibilità per quanto attiene l'imprecisione e quindi conforme al primo dei due criteri essenziali per definire ad alta sensibilità un metodo di misura della troponina cardiaca. Relativamente al

secondo requisito, le prestazioni verificate nel nostro studio in una popolazione di soggetti sani, dimostrano che la percentuale di soggetti con valori di hs-cTnI superiori al LoD e inferiori al 99° percentile risulta inferiore al 50%, e quindi il secondo requisito non risulterebbe ottemperato (10). Diversamente, altri autori hanno dimostrato che il sistema analitico PATHFAST™ hs-cTnI soddisfa non solo il primo ma anche il secondo

criterio richiesto per la definizione di metodo della troponina ad alta sensibilità. In particolare, utilizzando 3 diversi modelli statistici, "Harrell-Davis", "Nonparametrico" e "Robusto", raccomandati da IFCC e descritti nel documento CLSI C28-A3, in 734 campioni di soggetti sani (382 maschi e 352 femmine), la percentuale di valori di hs-cTnI >LoD e <99° percentile, risultava >50% nei maschi (n=301; 78,8%), nelle femmine (n=186; 52,8%) e nella popolazione totale studiata (n=487; 66,3%). Inoltre, utilizzando il metodo "Robusto" risultava differente, in modo statisticamente significativo, il 99° percentile calcolato nei maschi e nelle femmine (14). Le diverse prestazioni osservate in riferimento al secondo criterio, nel nostro studio in confronto a quello sopra citato, sono probabilmente riconducibili al limitato numero di soggetti arruolati (69 *versus* 734), ai diversi criteri di inclusione/esclusione delle due popolazioni e al diverso intervallo di età esplorato (media, intervallo: 40, 19-64 *versus* 41, 18-91 anni). E' noto infatti che i valori di troponina cardiaca aumentano con l'età, come dimostrato da alcuni lavori della letteratura scientifica (15).

I risultati ottenuti dallo studio clinico suggeriscono una minore sensibilità clinica del POCT rispetto agli altri analizzatori, determinata probabilmente da una minore capacità di rilevare accuratamente basse concentrazioni di cTnI e quindi un minor potere predittivo negativo. Questo aspetto è particolarmente rilevante dal momento che i risultati falsi negativi per il PATHFAST™ sono stati osservati prevalentemente sul prelievo basale raccolto all'ammissione in PS, nella maggioranza dei pazienti studiati. Analogamente, in uno studio recentemente pubblicato, il sistema PATHFAST™ hs-cTnI è stato utilizzato in una popolazione di pazienti afferenti al PS con sospetto IMA, con l'adozione di un algoritmo diagnostico 0-1 ora che prevedeva: per l'esclusione (*rule-out*) un valore di hs-cTnI all'ammissione <4 ng/L e una variazione di concentrazione tra 0 e 1 ora <3 ng/L; per l'inclusione (*rule-in*), un valore hs-cTnI all'ammissione ≥90 ng/L o una variazione di concentrazione tra 0 e 1 ora ≥20 ng/L. Tale strategia ha consentito di ottenere un elevato valore predittivo negativo (99,7%; *rule-out* per il 48% dei pazienti) e positivo (86,5%; *rule-in* per il 14,6% dei pazienti). Inoltre, nello studio citato, le prestazioni diagnostiche del POCT sono risultate confrontabili con quelle del metodo di misura applicato sullo strumento Architect PLUS_{2000SR}, tra gli analizzatori maggiormente utilizzati negli studi clinici di valutazione dei metodi ad alta sensibilità, ed impiegato anche nel nostro lavoro (16).

In conclusione, i risultati preliminari ottenuti permettono di evidenziare che il metodo POCT PATHFAST™ hs-cTnI fornisce risultati riproducibili e accurati, sostanzialmente confrontabili con quelli ottenuti con i principali sistemi analitici in uso nei laboratori clinici. Questi dati assumono una particolare rilevanza poiché finora nessuno dei metodi per la determinazione della troponina cardiaca applicati su strumentazione POCT disponibili in commercio presentava i requisiti

necessari per essere definito ad alta sensibilità. Inoltre, le prestazioni clinico-diagnostiche ottenute hanno evidenziato un grado di concordanza soddisfacente con tutte le piattaforme analitiche utilizzate, anche se la minore sensibilità riscontrata nei pazienti afferenti al PS con dolore toracico, suggerisce un'interpretazione prudente del risultato, soprattutto quando il valore risulta <99° percentile. Tuttavia, l'utilizzo di PATHFAST™ hs-cTnI in accordo ai percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali (PDTA) e ai protocolli per la gestione del paziente con dolore toracico, che prevedono l'esecuzione di prelievi seriali per verificare la variazione temporale della concentrazione del biomarcatore cardiaco, garantisce l'accuratezza diagnostica necessaria sia per il rule-in che per il rule-out, e quindi per la gestione in sicurezza del paziente in emergenza.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-69.
2. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173-95.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for universal definition of Myocardial Infarction. Third Universal Definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1581-98.
4. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:552-74.
5. 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.
6. Thygesen K, Mair J, Katus H, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010;31:2197-206.
7. Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012;33:2252-7.
8. 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.
9. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without

- Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
10. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical Laboratory Practice Recommendations for the Use of Cardiac Troponin in Acute Coronary Syndrome: Expert Opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
 11. Bingisser R, Cairns C, Christ M, et al. Cardiac troponin: a critical review of the case for point-of-care testing in the ED. *Am J Emerg Med* 2012;30:1639-49.
 12. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014;130:2354-94.
 13. Amundson BE, Apple FS. Cardiac troponin assays: a review of quantitative point-of-care devices and their efficacy in the diagnosis of myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:665-76.
 14. Christenson RH, Mullins K, Duh S-H. Validation of high-sensitivity performance for a United States Food and Drug Administration cleared cardiac troponin I assay. *Clin Biochem* 2018;56:4-10.
 15. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli A, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
 16. Sørensen NA, Neumann JT, Ojeda F, et al. Diagnostic evaluation of a high-sensitivity troponin I point-of-care assay. *Clin Chem* 2019;65:1592-601.

Patologie cardiovascolari e troponine cardiache: la storia di un legame indissolubile

Martina Zaninotto¹, Aldo Clerico², Mario Plebani^{1,3}

¹Unità Operativa Complessa, Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi-Padova

²Scuola Superiore S. Anna, Dipartimento Medicina di Laboratorio, Pisa

³Dipartimento di Medicina, Università degli Studi-Padova

ABSTRACT

Cardiovascular diseases and cardiac troponins: the history of a lasting connection. The evolution of the biochemical diagnosis of cardiac diseases, represents a paradigm of the laboratory medicine evolution in the recent years. Starting from the use of poor specific and sensitive biomarkers, the “so-called” cardiac enzymes (aspartate aminotransferase; lactate dehydrogenase; creatine kinase) recommended by World Health Organization for the acute myocardial infarction (AMI) diagnosis, a fundamental development in biochemical knowledge has been obtained, providing new biomarkers (CK-MB, myoglobin) for a more specific and early diagnosis according to the clinical and therapeutic needs. However, the revolutionary biochemical issue has been represented by the discovery of cardiac troponins and by the implementation of methods allowing their measurement in emergency setting in patients with acute chest pain. Cardiac troponins, are characterized by an absolute cardiac specificity and by a high sensitivity that allow to carry out a timely and safe diagnosis of AMI, being recognized as “gold standard” in all clinical and biochemical guidelines. In patients with acute chest pain and in ischemic clinical setting, a typical kinetic release of biomarker concentration may be suggestive of AMI even if ECG typical patterns are lacking. The actual improvement in analytical performance of troponins methods, particularly in the analytical sensitivity, allows to extend the measurement also in diagnosis of minor myocardial damage in patients suffering from different cardiac disease, to monitor the efficacy of therapy, the progression of the disease and to provide prognostic information and risk-stratification in addition to the clinical pathway.

INTRODUZIONE

L'elevata morbilità e mortalità delle malattie cardiovascolari, impone l'attenta valutazione dei fattori di rischio e una diagnosi precoce, in modo particolare per le situazioni acute. Per questo motivo, nel tempo, si sono sviluppate nuove conoscenze fisiopatologiche e nuove tecnologie, con un crescente interesse verso l'utilizzo di nuovi biomarcatori (1,2).

Negli anni '70 del secolo scorso, il laboratorio metteva a disposizione del cardiologo per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (IMA) solo pochi e poco specifici marcatori biochimici quali gli enzimi del gruppo delle amino-transferasi (aspartato-aminotransferasi, AST), l'enzima creatinfosfochinasi (CK) e, successivamente, gli isoenzimi della CK e della lattato deidrogenasi (LD), che hanno consentito un

miglioramento della specificità diagnostica (3) (Figura 1).

Lo sviluppo, nei successivi anni '90 di metodi immunometrici per la determinazione dell'isoenzima MB della CK (CK-MB) e della mioglobina, ha consentito di porre diagnosi di IMA entro 4 ore dalla comparsa del dolore, grazie al rapido rilascio in circolo di tali molecole e alla loro determinazione con metodi di analisi rapidi (4,5). La vera svolta nella diagnostica biochimica della patologia cardiovascolare è stata tuttavia l'introduzione dei metodi di determinazione delle troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) (6,7) che ha modificato gli algoritmi diagnostici dei pazienti con sospetto di sindrome coronarica acuta (SCA), e contribuito allo sviluppo di nuove ipotesi fisiopatologiche sull'insorgenza delle cardiomiopatie e sulla progressione verso lo scompenso cardiaco cronico (8-10).

Corrispondenza a: Martina Zaninotto, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi, via Giustiniani 2 35126 Padova, email: martina.zaninotto@aopd.veneto.it

Ricevuto: 11.01.2019

Revisionato: 16.01.2019

Accettato: 12.02.2019

Pubblicato on-line: 10.06.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.021

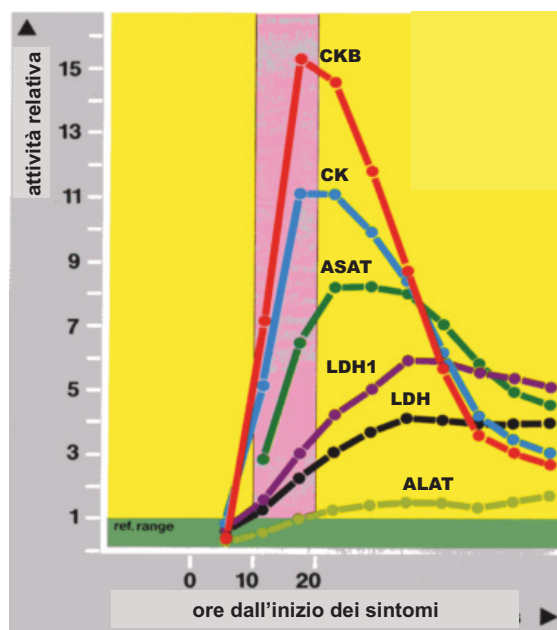


Figura 1

Marcatori biochimici raccomandati per la diagnosi di infarto acuto del miocardio negli anni '70 e loro cinetiche di rilascio (modificata dal riferimento 3).

CKB, isoenzima MB dell'enzima creatinfosfochinasi; CK, creatinfosfochinasi; ASAT, aspartato-aminotrasferasi; LDH1, isoenzima 1 dell'enzima lattato deidrogenasi; LDH, lattato deidrogenasi; ALAT, alanina-aminotrasferasi.

DAGLI ENZIMI CARDIACI ALLE TROPONINE CARDIACHE (ANNI 1970 – 2000)

Il primo documento sui criteri diagnostici per IMA pubblicato nel 1979 (3), descriveva una triade di fattori: 1) una sintomatologia tipica anginoso; 2) un quadro elettrocardiografico (ECG) specifico; 3) l'alterazione delle concentrazioni/attività di alcuni marcatori biochimici. La presenza di almeno due di questi tre fattori era necessaria e sufficiente per confermare la diagnosi. I pazienti con storia e/o sintomatologia tipica e con ECG diagnostico per IMA (sopra-slivellamento del tratto-ST), sono classificati ancora oggi come pazienti con IMA-STEMI.

Tuttavia, molti pazienti con IMA, soprattutto se anziani, con diabete mellito e di sesso femminile, presentano sintomi diversi dal dolore toracico, e in circa il 50% di essi, l'ECG non è alterato in modo specifico come pure possono non essere cardio-specifici gli aumenti delle concentrazioni degli enzimi (CK, LD e aminotrasferasi), perché indotti da patologie extra-cardiache (11).

L'introduzione dell'ecocardiografia (negli anni '80) e di marcatori biochimici con rapida cinetica di rilascio e maggiore sensibilità (CK-MB misurata in concentrazione di massa e mioglobina), ha consentito una migliore definizione diagnostica, essenziale per sfruttare le opportunità terapeutiche del trattamento fibrinolitico, e, successivamente, della rivascolarizzazione coronarica percutanea.

Infine, la disponibilità (a fine anni '90) di metodi per la determinazione delle troponine cardiache ha radicalmente cambiato l'approccio diagnostico alla SCA, specialmente nei pazienti con ECG senza innalzamento del tratto ST (N-STEMI). I metodi di determinazione di cTnI e cTnT, infatti, presentano il fondamentale vantaggio della cardio-specificità poiché utilizzano anticorpi monoclonali specifici per il riconoscimento delle sole isoforme cardiache, differenti dalle isoforme del muscolo scheletrico per la presenza di alcuni aminoacidi nella prima parte della catena peptidica: tali metodi garantiscono una assoluta specificità analitica e una elevata sensibilità (8,12) (Figura 2).

RIDEFINIZIONE DELL'INFARTO DEL MIOCARDIO (ANNI 2000 – 2006)

Nel documento *Myocardial Infarction Redefined* pubblicato nell'anno 2000 (13), viene riconosciuto, per la prima volta, il ruolo fondamentale di cTnI e cTnT nella diagnosi differenziale di SCA: si raccomanda che la diagnosi di IMA venga effettuata sulla base dell'aumento delle concentrazioni circolanti delle troponine nei pazienti con sospetto clinico di ischemia miocardica. Dopo questo documento, tutte le successive linee guida, raccomanderanno di misurare le troponine cardiache in tutti i pazienti con sospetto di IMA-NSTEMI, in quanto biomarcatori di scelta per la diagnosi differenziale di SCA.

Questo documento di consenso stabilisce anche che

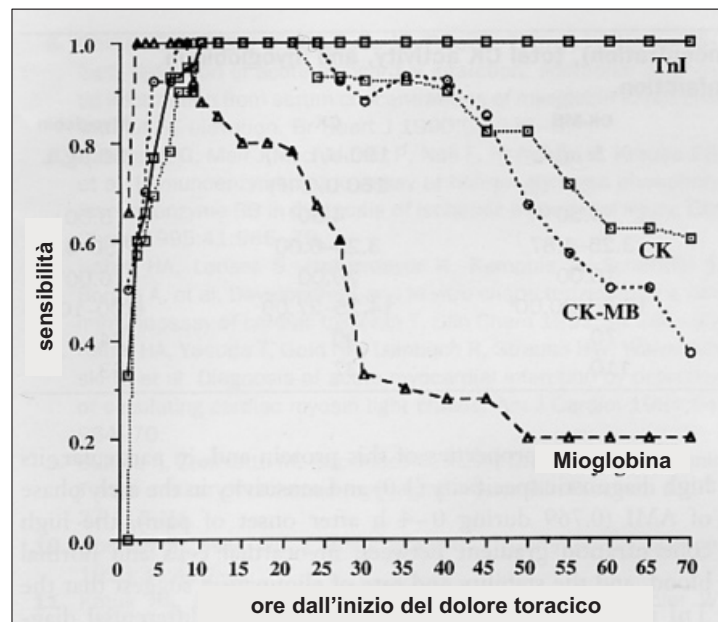


Figura 2

Confronto tra sensibilità diagnostiche dei biomarcatori per la diagnosi di infarto acuto del miocardio dopo la scoperta e l'introduzione nella pratica clinica delle troponine (anno 1994, modificata dal riferimento 8).

TnI, troponina I; CK, creatinfosfochinasi; CK-MB, isoenzima MB dell'enzima creatinfosfochinasi.

il livello decisionale per la diagnosi di IMA sia il 99° percentile della distribuzione dei valori di cTnI e cTnT in una popolazione normale di riferimento e che a tale concentrazione i metodi abbiano un'imprecisione (espressa come coefficiente di variazione, CV) uguale o inferiore al 10%. Al tempo della pubblicazione del documento non erano disponibili metodi in grado di soddisfare tali specifiche di qualità e di misurare, con sicurezza analitica, il 99° percentile della distribuzione dei valori delle troponine nella popolazione di riferimento in quanto non riuscivano a misurare valori superiori al limite di determinazione (*Limit of Detection*, LoD), nella maggior parte dei soggetti adulti sani: tali metodi vengono definiti "metodi attuali" nella Tabella 1 (14).

Inoltre, per la mancanza di standardizzazione, i risultati di cTnI, ottenuti con i diversi metodi potevano variare fra loro fino ad oltre 20 volte, a differenza dei risultati di cTnT che erano determinati con un unico metodo di misura da un unico produttore (15).

Dal punto di vista clinico inoltre, non era chiaro quale fosse il motivo della presenza in circolo di quantità misurabili di cTnI e cTnT (16). Vi era infatti la convinzione che valori misurabili di troponina fossero sempre provocati da una lisi totale delle strutture citoplasmatiche del miocardio, in quanto si riteneva che tali proteine fossero presenti solo nel sarcomero del miocardiocita. La scarsa sensibilità analitica dei metodi di determinazione disponibili, permetteva di misurare con un'accettabile precisione (CV $\leq 20\%$), solo valori superiori al livello decisionale, e quindi alimentava la falsa convinzione che la misura delle troponine fosse un esame di laboratorio che rispondeva al quesito

diagnostico presenza/assenza di IMA in maniera dicotomica (cioè valori superiori al livello decisionale indicavano infarto acuto del miocardio) (17).

LA DEFINIZIONE UNIVERSALE DI INFARTO DEL MIOCARDIO (2007-2018)

Dopo la pubblicazione del documento *Myocardial Infarction Redefined*, vi è stato un notevole e rapido sviluppo di tecnologie per soddisfare le specifiche di qualità richieste dalle linee guida. Fino al 2004, tuttavia, i laboratori non disponevano di metodi con sensibilità analitica adeguata per calcolare il 99° percentile con un CV $\leq 10\%$ e solamente dopo il 2005, la sensibilità analitica (espressa come LoD) dei metodi di nuova generazione era circa 3-6 ng/L con un rapporto prossimo a 1 tra sensibilità funzionale (concentrazione di troponina misurata con CV $\leq 10\%$, detta anche limite di quantificazione, LoQ, al 10% CV) e 99° percentile, come richiesto dalle linee guida internazionali (13, 17-19).

L'aumentata sensibilità analitica dei nuovi metodi, ha determinato un'aumentata sensibilità diagnostica e prognostica. Rianalizzando con metodi più sensibili, i campioni di pazienti con danno miocardico certo, ma con valori di troponina negativi con i metodi di precedente generazione, si è osservato un incremento di valori positivi (superiori al 99° percentile) dal 14% fino al 60% dei casi riesaminati. Questi studi hanno anche dimostrato che i metodi ad alta sensibilità riescono a classificare più precocemente i soggetti con IMA (veri positivi), ma misurano valori elevati (superiori al 99° percentile) anche in un numero maggiore di pazienti con

Tabella 1*Metodi di determinazione delle troponine cardiache***Classificazione dei metodi di nuova generazione ad alta sensibilità per la determinazione di cTnI e cTnT**

Accettabilità	Imprecisione a livello del 99° percentile (CV%)
Accettabile secondo le linee guida	≤10%
Clinicamente utilizzabile	<10% a ≤20%
Non più accettabili	<20%
Livello	Percentuale di valori misurabili di cTnI o cTnT al di sotto del 99° percentile della popolazione di riferimento
Primo (metodi attuali)	<50
Secondo (prima generazione hs)	da 50 a <75
Terzo (seconda generazione hs)	da 75 a <95
Quarto (terza generazione hs)	≥95

cTnI e cTnT, troponine cardiache I e T; hs (high sensitivity), metodi ad alta sensibilità

danno cardiaco non ischemico (20,21) (Tabella 2).

Negli stessi anni, con lo sviluppo di tecniche di imaging specifiche per l'apparato cardiovascolare quali ecocardiografia, tomografia computerizzata ad emissione di fotoni, (SPECT), tomografia ad emissione di positroni, (PET), tecniche di risonanza magnetica nucleare, (NMR) con mezzo di contrasto, (22) è stato raggiunto un significativo miglioramento nella gestione dei pazienti con malattie cardiovascolari, consentendo una rivalutazione dei principi fisiopatologici comunemente accettati per la cardiomiopatia ischemica.

Nel 2007 viene pubblicato un nuovo documento *Universal Definition of Myocardial Infarction* (23) che descrive i criteri clinici, biochimici e di imaging cardiaco per una più accurata definizione clinica e anatomopatologica dei vari tipi di infarto acuto del miocardio. Il documento stabilisce che il termine "infarto del miocardio" venga utilizzato quando vi sia evidenza di necrosi miocardica in presenza di una condizione clinica consistente con ischemia miocardica. Nel caso di un paziente che si presenti al Pronto Soccorso con sospetto di SCA, la diagnosi di IMA deve basarsi sulla variazione cinetica delle concentrazioni di troponina, caratterizzata da una fase di aumento e/o diminuzione, associata a sintomi di ischemia, oppure ad un quadro elettrocardiografico/ecocardiografico suggestivo di necrosi miocardica. Il documento definisce anche i criteri per la diagnosi di IMA in caso di coronarografia, di angioplastica o di cardiocirurgia per by-pass aorto-coronarico, come pure quelli da utilizzare al tavolo autoptico in un soggetto con morte improvvisa per arresto cardiaco in assenza di una determinazione di troponina.

La definizione di infarto del miocardio in questo documento, si differenzia dalle precedenti (anni 1979 e 2000) (1,13), poiché viene considerata prioritaria la dimostrazione di un danno cardiaco ottenuta per mezzo

della determinazione delle troponine. Di conseguenza, la misura del biomarcatore deve essere sempre eseguita all'ammissione al Pronto Soccorso, contestualmente alla visita clinica e all'esame ECG (Figura 3).

Questo ribaltamento nell'impostazione dell'algoritmo diagnostico, che mette in primo piano la determinazione della troponina, verrà accentuato nei tre successivi documenti di revisione (2011, 2012 e 2018) (24-26). In particolare, l'ultimo documento (*Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction*) definisce rigorosamente il danno cardiaco (*myocardial injury*), una condizione clinica che deve essere tenuta ben separata dall'infarto del miocardio. La conferma della presenza di un danno cardiaco è ottenuta dalla rilevazione di almeno un valore di troponina (meglio se misurata con metodi ad alta sensibilità) superiore al 99° percentile (27-29). Il danno è da considerare acuto se si dimostra un aumento e/o una diminuzione significativa dei valori del biomarcatore (cinetica di rilascio tipica) misurati in almeno due campioni successivi. Il termine infarto del miocardio, infine, deve essere utilizzato quando il danno cardiaco acuto (come descritto precedentemente) è presente in un paziente in associazione ad evidenze cliniche, elettrocardiografiche, ecocardiografiche e/o coronarografiche di ischemia cardiaca. Per poter classificare come IMA una lesione cardiaca, deve sempre esserne accertata la natura ischemica non essendo sufficiente il riscontro di valori del biomarcatore superiori al 99° percentile. I valori di troponina, infatti, possono essere elevati in pazienti con danno cardiaco, indipendentemente dalla eziologia dello stesso come pure dall'origine primitiva dell'insulto patogeno che può comprendere anche malattie sistemiche e di origine extra-vascolare che, secondariamente, interessano il cuore (30-32).

In presenza di ECG non diagnostico, quindi, la diagnosi di IMA deve essere confermata (o esclusa) da

Tabella 2

Condizioni fisiopatologiche e sindromi cliniche associate ad aumento dei livelli circolanti di troponine cardiache (valori superiori al 99°percentile della popolazione di riferimento) a causa di un danno cardiaco

Danno miocardico associato ad ischemia miocardica acuta (IMA tipo 1)

Rottura di una placca aterosclerotica intra-coronarica con trombosi associata

Danno miocardico associato ad una ischemia acuta miocardica causata da uno sbilanciamento tra apporto e domanda di ossigeno (IMA tipo 2)

Ridotta perfusione miocardica associata a:

- Spasmo coronarico, disfunzione del microcircolo
- Embolia coronarica
- Dissezione di un'arteria coronarica
- Aritmia a bassa frequenza
- Ipotensione o shock
- Anemia severa
- Insufficienza respiratoria

Aumentata domanda di ossigeno associata a:

- Tachiaritmia di lunga durata
- Ipertensione severa con o senza ipertrofia ventricolare

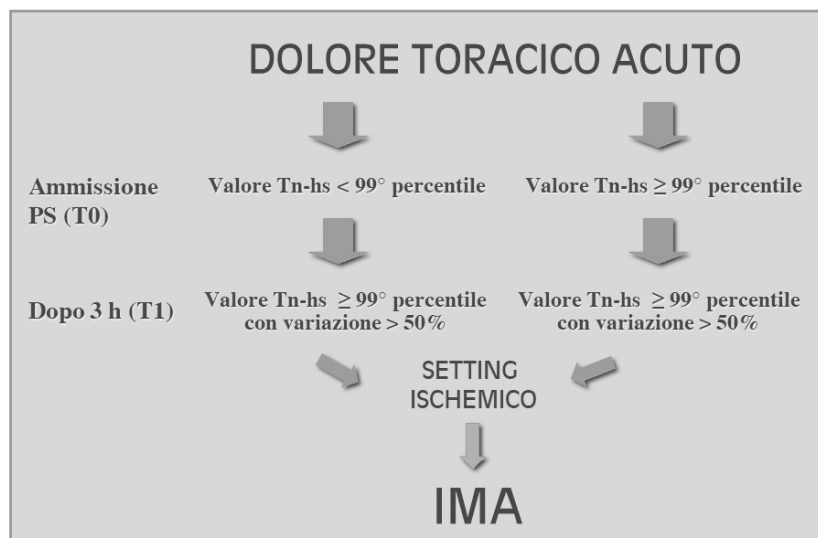
Altre cause di danno miocardico

Condizioni cardiache:

- Scompenso cardiaco
- Miocardite
- Cardiomiopatie
- Sindrome di Takotsubo
- Procedura di rivascularizzazione coronarica
- Altre procedure cardiache invasive
- Ablazione mediante catetere
- Defibrillazione cardiaca
- Trauma cardiaco

Condizioni sistemiche:

- Sepsi, malattie infettive sistemiche
- Insufficienza renale cronica
- Stroke, emorragia sub-aracnoidea
- Embolia polmonare, ipertensione polmonare
- Malattie infiltrative sistemiche, come amiloidosi e sarcoidosi
- Agenti chemioterapici e droghe di abuso cardio-tossiche (cocaina)
- Pazienti in condizioni critiche
- Esercizio fisico intenso (sport di endurance, maratona, ciclismo)



PS: Pronto Soccorso
Setting ischemico: sintomi (dolore toracico o equivalente ischemico) e/o variazioni ECG e/o variazioni imaging

Figura 3

Algoritmo per la diagnosi di infarto acuto del miocardio con l'utilizzo di troponine misurate con i metodi ad alta sensibilità (anno 2013, modificata dal riferimento 21).

Tn-hs, troponina cardiaca misurata con metodi ad alta sensibilità.

almeno due determinazioni successive di troponina, ad un intervallo di 3 ore se si utilizzano metodi ad alta sensibilità. La rilevazione della tipica cinetica di variazione dei livelli circolanti, risulta quindi indispensabile sia per stabilire la diagnosi di IMA sia per distinguere la lesione di tipo ischemico acuto da altre condizioni di danno cardiaco non ischemico, nelle quali i valori di cTnI e cTnT sono costantemente elevati senza una cinetica tipica di aumento e diminuzione (31,32).

Da un punto di vista clinico, è importante sottolineare che la determinazione delle troponine è cardio-specifica, non malattia-specifica. Le informazioni fornite dal biomarcatore devono quindi sempre essere interpretate nel contesto clinico del paziente. I nuovi metodi ad alta sensibilità richiedono da parte dei professionisti della medicina di laboratorio e dei clinici una attenta riflessione sul quesito clinico per cui l'esame viene richiesto (33): livelli elevati di troponine cardiache dimostrano che si è prodotto un danno strutturale al miocardio, ma NON forniscono indicazioni sul meccanismo fisiopatologico responsabile del danno (34).

Infine, la troponina cardiaca deve essere considerata come una variabile che si modifica nel tempo. Grazie alla sua elevata specificità e migliore sensibilità rispetto alle indagini strumentali (imaging cardiaco), potrebbe essere clinicamente utile e appropriata una valutazione seriata delle concentrazioni del biomarcatore determinate con metodi ad alta sensibilità, nei pazienti ad alto rischio per scompenso cardiaco. Un aumento progressivo dei valori, infatti, potrebbe indicare la presenza di un rimodellamento patologico del miocardio. Dall'altro lato, la loro diminuzione durante un appropriato trattamento

terapeutico, potrebbe suggerire un miglioramento dell'impegno miocardico con una diminuzione del rischio cardiovascolare. Nei contesti clinici considerati, la determinazione delle troponine travalica lo stesso campo di applicazione delle sindromi coronariche acute per allargare il suo raggio di azione a tutto il più ampio spettro delle malattie cardiache in cui vi può essere un danno miocardico. L'esame di laboratorio assume quindi una rilevanza fondamentale nell'ambito di tutte le malattie cardiache, acute e croniche, per il monitoraggio della terapia e dell'evoluzione della malattia, per la prognosi e la stratificazione del rischio.

BIBLIOGRAFIA

1. Wu AHB, McCord RG. New biochemical markers for heart disease. In: Wu AHB, editor. Cardiac markers, Humana Press: Totowa 1998;281-94.
2. Plebani M. Biochemical markers of cardiac damage: from efficiency to effectiveness. Clin Chim Acta 2001;311:3-7.
3. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on Standardization of Clinical Nomenclature. Circulation 1979;59:607-9.
4. Penttilä I, Penttilä K, Rantanen T. Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain. Clin Chem Lab Med 2000; 28:187-97.
5. Plebani M, Zaninotto M. Diagnostic strategies using myoglobin measurement in myocardial infarction. Clin Chim Acta 1998;272:69-77.
6. Bodor GS, Porter S, Landt Y, et al. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. Clin Chem 1992;38:2203-14.

7. Katus HA, Looser S, Borgya KH, et al. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992;38:386-93
8. Burlina A, Zaninotto M, Secchiero S, et al. Troponin T as a marker of ischemic myocardial injury. *Clin Biochem* 1994; 27:113-21.
9. Galvani M, Ferrini D, Ghezzi F, et al. Cardiac markers and risk stratification: an integrated approach. *Clin Chim Acta* 2001;311:9-17.
10. Vittorini S, Clerico A. Cardiovascular biomarkers: increasing impact of laboratory medicine in cardiology practice. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:748-63.
11. Gamal R, Swain DG, Nightingale PG, et al. The effective use of cardiac enzymes and electrocardiograms in the diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly. *Postgrad Med J* 1990;66:375-7.
12. Zaninotto M, Altinier S, Lachin M, et al. Strategies for the early diagnosis of acute myocardial infarction using biochemical markers. *Am J Clin Pathol* 1999;111:399-405
13. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial Infarction Redefined—A Consensus Document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-69.
14. Clerico A, Zaninotto M. Specifiche di qualità e appropriatezza della richiesta del dosaggio delle troponine cardiache con particolare riguardo al contesto clinico di sospetto di sindrome coronarica acuta. *LA* 2013;18:337-42.
15. Panteghini M, Pagani F, Yeo KT et al. Committee on standardization of markers of cardiac damage of the IFCC. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem*. 2004;50: 327-32.
16. 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.
17. Blomkalns AL, Gibler WB. Markers and the initial triage and treatment of patients with chest pain. *Cardiovasc Toxicol* 2001;1:111-5.
18. Clerico A, Zaninotto M, Masotti S, et al. Valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T: dalla teoria alla pratica di laboratorio. Documento congiunto del Gruppo di Studio Biomarcatori Cardiovascolari di SIBioC-Medicina di Laboratori ed European Ligand Assay Society (ELAS). *Biochim Clin* 2018;42:155-66.
19. Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: it's time to keep a scorecard. *Clin Chem* 2009;55:1303-6.
20. Clerico A, Giannoni A, Prontera T, et al. High-sensitivity troponin: a new toll for pathophysiological investigation and clinical practice. *Adv Clin Chem* 2009;49:1-30.
21. 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.
22. El Aidi H, Adams A, Moons KG, et al. Cardiac magnetic resonance imaging findings and the risk of cardiovascular events in patients with recent myocardial infarction or suspected or known coronary artery disease: a systematic review of prognostic studies. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1031-45.
23. Thygesen K, Alpert JSA, White HD on behalf of the joint ESC/ACCF/AHA/WHF task force for the definition of myocardial infarction. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173-95.
24. Mendis S, Thygesen K, Kuulasmaa K, et al. Writing group on behalf of the participating experts of the WHO consultation for revision of WHO definition of myocardial infarction. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int J Epidemiol* 2011;40:139-46.
25. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012;33:2551-67.
26. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
27. Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012;33:2252-7.
28. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli A, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
29. Clerico A, Zaninotto M, Graziani MS, et al. Specifiche di qualità, terminologia e definizione dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T. *Biochim Clin* 2018;42:335-42.
30. Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin levels elevation not related to acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:623-34.
31. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
32. 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.
33. Apple FS, Jaffe AS, Collinson P, et al. on behalf of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem* 2015;48:201-3.
34. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.

Le troponine cardiache nelle amiloidosi sistemiche

Jessica Ripepi¹, Giovanni Palladini¹

¹Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

ABSTRACT

Cardiac troponins in systemic amyloidosis.

Systemic amyloidosis is an increasingly recognized cause of heart failure. The two most common forms of amyloidosis involving the heart are AL (caused by monoclonal immunoglobulin light chains) and ATTR (caused by wild-type or variant transthyretin) amyloidosis. Involvement of the heart is by far the most important prognostic determinant, and its severity is easily and accurately stratified by cardiac biomarkers (natriuretic peptides and troponins). In AL amyloidosis, cardiac troponins are also useful in the design of the therapeutic strategy (excluding fragile patients from autologous stem cell transplantation) and in identification of cardiac progression. Response and progression criteria are still lacking in ATTR amyloidosis, and studies addressing this topic are warranted.

INTRODUZIONE

Le amiloidosi sistemiche sono causate dalla deposizione in diversi organi di fibrille formate dall'aggregazione di proteine autologhe. Le proteine amiloidogeniche causano un danno degli organi interessati, che è progressivo e fatale se non è riconosciuto in stadi ancora reversibili e se non è trattato in modo efficace (1). La prognosi delle amiloidosi sistemiche dipende dalla presenza e dalla gravità dell'interessamento del cuore (1). I tipi più comuni di amiloidosi che possono presentarsi con coinvolgimento cardiaco sono riportati nella Tabella 1. Le forme più frequenti sono l'amiloidosi AL, causata da catene leggere libere prodotte da un piccolo clone plasmacellulare (2,3) e l'amiloidosi da transtiretina non mutata (ATTRwt) (4), in passato conosciuta come amiloidosi sistemica senile. L'incidenza di quest'ultimo tipo di amiloidosi è in rapido aumento per la possibilità di una diagnosi non biotica basata sulla scintigrafia con bisfosfonati, che dà un segnale cardiaco più marcato nelle amiloidosi non-AL (5). Tuttavia, anche nell'amiloidosi AL ci può essere una localizzazione cardiaca del tracciante. Pertanto, in un paziente in cui si sospetta un'amiloidosi cardiaca, si deve per prima cosa ricercare la presenza di una componente monoclonale

con tecniche sensibili (immunofissazione di siero e urine e quantificazione delle catene leggere libere circolanti) e i soggetti con componente monoclonale devono essere avviati rapidamente alla diagnosi biotica e alla tipizzazione su tessuto (6). Nelle forme non-AL, l'analisi del DNA è necessaria per distinguere l'amiloidosi ATTRwt dalle forme ereditarie. La corretta diagnosi differenziale tra i diversi tipi di amiloidosi è fondamentale perché gli approcci terapeutici sono radicalmente diversi a seconda del tipo di amiloidosi in causa. Le tecniche cardiologiche di diagnostica per immagini, in particolare l'ecocardiografia, la scintigrafia con bisfosfonati e la risonanza magnetica nucleare sono fondamentali nel riconoscere l'amiloidosi cardiaca. Tuttavia, gli attuali sistemi di stadiazione, si basano interamente sui marcatori biochimici di disfunzione e di danno cardiaco, [il peptide natriuretico di tipo B (BNP), la porzione N-terminale del suo pro-peptide (NT-proBNP) e le troponine cardiache (cTn)], di disfunzione renale e di malattia clonale nell'amiloidosi AL.

LE TROPONINE CARDIACHE NELL'AMILOIDOSI AL

Il primo biomarcatore cardiaco a entrare nella pratica clinica nell'amiloidosi AL, causata da catene

Corrispondenza a: Giovanni Palladini, Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Viale Golgi, 19, 27100 Pavia, Tel +39-0382-502994, E-mail giovanni.palladini@unipv.it

Ricevuto: 03.12.2019

Revisionato: 07.01.2020

Accettato: 10.01.2020

Pubblicato on-line: 06.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.017

Tabella 1*Tipi più comuni di amiloidosi sistemica con interessamento cardiaco*

Acronimo	Precursore	Acquisita o Ereditaria	Incidenza relativa	Principi di terapia specifica
AL	Catene leggere immunoglobuliniche monoclonali	Acquisita	65%	- Chemioterapia diretta contro il clone plasmacellulare produttore della catena leggera amiloidogenica
ATTRwt	Transtiretina non mutata	Acquisita	30%	- Stabilizzazione del tetramero di transtiretina - Silenziamento del gene transtiretina
ATTRv	Transtiretina mutata	Ereditaria	5%	- Trapianto di fegato - Stabilizzazione del tetramero di transtiretina - Silenziamento del gene transtiretina
AApoAI	Apolipoproteina AI mutata	Ereditaria	<1%	

L'incidenza relativa è calcolata su 231 nuovi pazienti con amiloidosi cardiaca diagnosticati presso il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia nel 2018.

leggere immunoglobuliniche monoclonali, sono state le troponine cardiache T e I (cTnT e cTnI). Il gruppo della Mayo Clinic ha mostrato che i pazienti con cTnT e cTnI misurabili avevano una sopravvivenza mediana di soli 6-8 mesi, significativamente inferiore a quella dei soggetti con troponina non rilevabile (7). Dopo la dimostrazione da parte del nostro gruppo che l'NT-proBNP è un marcatore diagnostico molto sensibile e un importante predittore prognostico nell'amiloidosi AL (8), Dispenzieri et al. hanno integrato l' NT-proBNP e troponine in un semplice sistema di stadiazione, in grado di discriminare accuratamente gruppi di pazienti con prognosi molto diversa (9). I sistemi di stratificazione prognostica in uso nell'amiloidosi AL sono descritti in Tabella 2; essi sono basati su metodiche non ad alta sensibilità per la misurazione della troponina. Recentemente il gruppo della Mayo Clinic ha aggiornato questi sistemi di stadiazione, utilizzando la misura delle troponine con metodi ad elevata sensibilità (hs-cTnT) (10). Successivamente, è apparso chiaro che i pazienti in stadio III, quelli con NT-proBNP e troponine superiori alle soglie, non erano un gruppo omogeneo. Pertanto, in uno studio europeo, lo stadio III è stato diviso in due gruppi, IIIa e IIIb, sulla base del valore di NT-proBNP (superiore o inferiore a 8 500 ng/L) (11, 12). I pazienti in stadio IIIb rappresentano circa il 20% dei soggetti con amiloidosi AL e hanno una sopravvivenza di pochi mesi soltanto. In questi soggetti la chemioterapia deve essere attenuata per adattarsi alla loro estrema fragilità e spesso questa non ha il tempo di esercitare la propria efficacia (13).

Cionondimeno, i pochi pazienti che ottengono in breve tempo una risposta ematologica molto buona, cioè una profonda riduzione delle catene leggere libere amiloidogeniche, godono di un prolungamento della sopravvivenza (14). Questi sistemi di stadiazione non tengono conto delle dimensioni del clone

plasmacellulare. Pertanto, Kumar et al. hanno proposto un nuovo sistema che include, oltre a NT-proBNP e troponina, anche la differenza fra le catene leggere libere circolanti coinvolte (amiloidogeniche) e quelle non coinvolte (dFLC) (15). Recentemente, i ricercatori del Centro per l'Amiloidosi dell'Università di Heidelberg e della Mayo Clinic hanno condotto studi per paragonare la capacità di discriminazione prognostica dei sistemi di stadiazione sopra descritti, tenendo conto anche di condizioni che possono interferire con l' eliminazione e con la produzione dei marcatori cardiaci, come l'insufficienza renale e la fibrillazione atriale (16,17). Il sistema Europeo, basato su NT-proBNP e troponine è risultato quello con il maggior potere di discriminazione, soprattutto per la predizione delle morti precoci, mentre il sistema che include la dFLC è risultato in grado di predire le morti tardive, probabilmente perché il marcatore clonale permette di tener conto del rischio di ricaduta dopo chemioterapia (18).

I metodi ad alta sensibilità per la misurazione della cTnT (hs-cTnT) sono stati valutati nell'amiloidosi AL da diversi gruppi. Kristen et al. hanno mostrato che la concentrazione plasmatica di hs-cTnT è associata con le caratteristiche morfologiche e funzionali dell'interessamento del cuore nell'amiloidosi AL e predice la sopravvivenza (19). Il nostro gruppo ha riconosciuto nella hs-cTnT il singolo fattore rilevato alla diagnosi in grado di predire in modo più accurato la sopravvivenza dei pazienti con amiloidosi AL (20). In seguito, il gruppo della Mayo Clinic ha proposto un sistema di stadiazione basato sulla sola hs-cTnT, il quale però ha trovato minori applicazioni nella pratica clinica e nel disegno delle sperimentazioni cliniche rispetto a quelli che includono anche l'NT-proBNP (21).

Le troponine cardiache non sono soltanto impiegate nella stratificazione prognostica dei pazienti con amiloidosi AL, ma sono anche utili nella scelta della

Tabella 2*Sistemi di stadiazione nell'amiloidosi AL*

Sistema di stadiazione	Marcatori e soglie	Stadi	Sopravvivenza mediana negli stadi*
Mayo Clinic 2004 (9)	- NT-proBNP 332 ng/L - cTnT 0,035 ng/mL (o cTnl 0,1 ng/L o hs-cTnT 50 ng/L)	I: nessun marcatore oltre la soglia II: un solo marcatore oltre la soglia III: entrambi i marcatori oltre la soglia	I: non raggiunta II: 49 mesi III: 9 mesi
Sistema Europeo 2013-2015 (11,12)	- NT-proBNP 332 ng/L e 8 500 ng/L - cTnT 0,035 ng/mL (o cTnl 0,1 ng/L o hs-cTnT 50 ng/L)	I: NT-proBNP <332 ng/L e troponina sotto la soglia II: NT-proBNP >332 ng/L o troponina oltre la soglia IIIa: NT-proBNP >332 ng/L e troponina oltre la soglia, ma NT- proBNP <8 500 ng/L IIIb: NT-proBNP >8 500 ng/L e troponina oltre la soglia	I: non raggiunta II: 49 mesi IIIa: 14 mesi IIIb: 5 mesi
Mayo Clinic 2012 (15)	- NT-proBNP 1 800 ng/L - cTnT 0,025 ng/mL (o hs-cTnT 40 ng/L) - dFLC 180 mg/L	I: nessun marcatore oltre la soglia II: un solo marcatore oltre la soglia III: due marcatori oltre la soglia IV: tre marcatori oltre la soglia	I: non raggiunta II: 57 mesi III: 18 mesi IV: 6 mesi
Mayo Clinic 2014 (21)	- hs-cTnT 14 ng/L e 54 ng/L	I: hs-cTnT <14 ng/L II: hs-cTnT ≥14 ng/L ma <54 ng/L III: hs-cTnT >54 ng/L	I: 71 mesi II: 43 mesi III 6 mesi (dati della pubblicazione originale) (21)

* In 1378 pazienti diagnosticati presso il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia dal 2004 al 2018. cTnT C Tnl, troponine cardiache T e I; dFLC, differenza tra la concentrazione delle catene leggere libere circolanti coinvolte (amiloidogeniche) e non coinvolte; NT-proBNP, porzione amino-terminale del pro-peptide natriuretico di tipo B.

strategia terapeutica. Il gruppo della Mayo Clinic ha mostrato che quasi tutti i casi di morte precoce (nei primi 100 giorni) dopo autotrapianto di cellule staminali del sangue periferico avvengono in pazienti che hanno una concentrazione di cTnT >0,06 ng/mL (o NT-proBNP >5000 ng/L o hs-cTnT >75 ng/L) (22,10). Pertanto, c'è un sostanziale accordo tra i vari centri di riferimento per l'amiloidosi nel mondo, che a questi pazienti l'autotrapianto di cellule staminali non dovrebbe essere proposto (3).

Infine, i marcatori cardiaci hanno un ruolo fondamentale nel monitoraggio dell'interessamento cardiaco in corso di terapia. La troponina non entra nella definizione della risposta alla terapia, che è basata sulla riduzione della concentrazione di NT-proBNP (23). Tuttavia, è noto che i pazienti che tre o sei mesi dopo la diagnosi hanno un aumento della troponina di almeno il 33% hanno una sopravvivenza più breve (20). Pertanto, l'aumento della concentrazione della troponina è validato come parametro di progressione nei soggetti con amiloidosi AL (23).

LE TROPONINE CARDIACHE NELL'AMILOIDOSI ATTR

Per il momento, i marcatori cardiaci sono stati studiati in modo meno esteso nell'amiloidosi ATTR. Nel 2008, Suhr et al. osservarono elevati valori di cTnT in alcuni pazienti con amiloidosi ereditaria da transtiretina (ATTRv) (24). Nel 2013, il gruppo di Londra riportò che la presenza di troponina misurabile era associata ad una sopravvivenza più breve nell'amiloidosi ATTRwt (25). L'anno successivo, il gruppo di Heidelberg riportò l'osservazione che una concentrazione di cTnT superiore a 0,0375 ng/mL era l'unico fattore in grado di predire in modo indipendente la sopravvivenza in un modello che comprendeva NT-proBNP e parametri ecocardiografici avanzati in una popolazione di 70 pazienti con amiloidosi ATTR (26).

Nel 2016, il gruppo della Mayo Clinic ha proposto un sistema di stadiazione basato su NT-proBNP e cTnT nell'amiloidosi ATTRwt (Tabella 3) (27). Nel 2017, un studio basato sul registro THAOS (TranstHyretin Amyloidosis Outcome Survey) che includeva più di 1 600

Tabella 3*Sistemi di stadiazione nell'amiloidosi ATTR*

Sistema di stadiazione	Marcatori e soglie	Stadi	Sopravvivenza mediana negli stadi*
Mayo Clinic 2016 (27)	- NT-proBNP 3 000 ng/L - cTnT 0,05 ng/mL	I: nessun marcatore oltre la soglia II: un solo marcatore oltre la soglia III: entrambi i marcatori oltre la soglia	I: 66 mesi II: 40 mesi III: 20 mesi
Registro THAOS 2017 (28)	- BNP 195 ng/L (o NT-proBNP 2 584 ng/L) - cTnT 0,05 ng/mL (o cTnI 0,12 ng/mL)**	I: nessun marcatore oltre la soglia II: un solo marcatore oltre la soglia III: entrambi i marcatori oltre la soglia	I: 98 mesi II: 81 mesi III: 40 mesi
UK-NAC 2018 (29)	- NT-proBNP 3 000 ng/L - eGFR 45 mL/min/1,73 m ²	I: NT-proBNP <3 000 ng/L ed eGFR >45 mL/min/1,73 m ² II: NT-proBNP >3 000 ng/L o eGFR <45 mL/min/1,73 m ² III: NT-proBNP >3 000 ng/L ed eGFR <45 mL/min/1,73 m ²	I: 69 mesi II: 47 mesi III: 24 mesi

* *Dati delle pubblicazioni originali.****Questi valori definivano il quarto quartile nella popolazione del registro.**BNP, peptide natriuretico di tipo B, cTn, troponina cardiaca; eGFR, velocità di filtrazione glomerulare stimata; NT-proBNP, porzione amino-terminale del pro-peptide natriuretico di tipo B; UK-NAC, United Kingdom National Amyloidosis Centre.*

pazienti, dei quali circa 800 disponevano di una misurazione della troponina, ha mostrato che dividendo la popolazione in quartili sulla base della concentrazione di BNP, NT-proBNP e troponina, la mortalità aumentava progressivamente (28). Tuttavia, questi sistemi di stadiazione non sono ancora stati validati su una popolazione indipendente. Recentemente, Gillmore et al. hanno proposto e validato un nuovo sistema di stadiazione basato su NT-proBNP e velocità di filtrazione glomerulare stimata (Tabella 3) (29).

CONCLUSIONE

La Medicina di Laboratorio ha un ruolo fondamentale nella gestione clinica dei pazienti con amiloidosi sistemica. Nell'amiloidosi AL i marcatori cardiaci NT-proBNP e troponina, permettono un'accurata stratificazione del rischio e contribuiscono alla definizione della strategia terapeutica e sono utili nel valutare la risposta e la progressione del coinvolgimento cardiaco dopo la terapia specifica. Anche nell'amiloidosi ATTR i marcatori cardiaci sono utili nella stratificazione prognostica. Tuttavia, in questa forma di amiloidosi mancano ancora criteri validati di risposta e progressione del danno cardiaco. La recente disponibilità di terapie specifiche per l'amiloidosi ATTR rende ancora più acuto il bisogno di parametri per la valutazione dei pazienti durante il trattamento e di robusti "end point" surrogati per le sperimentazioni

cliniche. È probabile che i biomarcatori cardiaci abbiano un ruolo da giocare anche in questo contesto ed è importante che si raccolgano ampie casistiche internazionali per stabilire e validare al più presto i criteri di risposta e di progressione anche nell'amiloidosi ATTR cardiaca.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Palladini G, Milani P, Merlini G. Novel strategies for the diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2015;13:1195-211.
- Merlini G, Stone M. Dangerous small B-cell clones. *Blood* 2006;108:2520-30.
- Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:38.
- Ihne S, Morbach C, Obici L, et al. Amyloidosis in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2019;16:285-303.
- Gillmore JD, Maurer MS, Falk RH, et al. Nonbiopsy diagnosis of cardiac transthyretin amyloidosis. *Circulation* 2016;133:2404-12.
- Maurer MS, Bokhari S, Damy T, et al. Expert Consensus recommendations for the suspicion and diagnosis of transthyretin cardiac amyloidosis. *Circ Heart Fail* 2019;12:e006075.
- Dispenzieri A, Kyle R, Gertz M, et al. Survival in patients

- with primary systemic amyloidosis and raised serum cardiac troponins. *Lancet* 2003;361:1787-9.
8. Palladini G, Campana C, Klersy C, et al. Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis. *Circulation* 2003;107:2440-5.
 9. Dispenzieri A, Gertz M, Kyle R, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004;22:3751-7.
 10. Muchtar E, Kumar SK, Gertz MA, et al. Staging systems use for risk stratification of systemic amyloidosis in the era of high-sensitivity troponin T assay. *Blood* 2019;133:763-6.
 11. Wechalekar AD, Schonland SO, Kastritis E, et al. A European collaborative study of treatment outcomes in 346 patients with cardiac stage III AL amyloidosis. *Blood* 2013;121:3420-7.
 12. Palladini G, Sachchithanantham S, Milani P, et al. A European collaborative study of cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone in upfront treatment of systemic AL amyloidosis. *Blood* 2015;126:612-5.
 13. Palladini G, Merlini G. What is new in diagnosis and management of light chain amyloidosis? *Blood* 2016;128:159-68.
 14. Manwani R, Foard D, Mahmood S, et al. Rapid hematologic responses improve outcomes in patients with very advanced (stage IIIb) cardiac immunoglobulin light chain amyloidosis. *Haematologica* 2018;103:e165-e8.
 15. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol* 2012;30:989-95.
 16. Ditttrich T, Benner A, Kimmich C, et al. Performance analysis of AL amyloidosis cardiac biomarker staging systems with special focus on renal failure and atrial arrhythmia. *Haematologica* 2019;104:1451-9.
 17. Muchtar E, Therneau TM, Larson DR, et al. Comparative analysis of staging systems in AL amyloidosis. *Leukemia* 2019;33:811-4.
 18. Palladini G, Milani P, Merlini G. Predicting survival in light chain amyloidosis. *Haematologica* 2019;104:1294-6.
 19. Kristen AV, Giannitsis E, Lehrke S, et al. Assessment of disease severity and outcome in patients with systemic light-chain amyloidosis by the high-sensitivity troponin T assay. *Blood* 2010;116:2455-61.
 20. Palladini G, Barassi A, Klersy C, et al. The combination of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) at presentation and changes in N-terminal natriuretic peptide type B (NT-proBNP) after chemotherapy best predicts survival in AL amyloidosis. *Blood* 2010;116:3426-30.
 21. Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar SK, et al. High sensitivity cardiac troponin T in patients with immunoglobulin light chain amyloidosis. *Heart* 2014;100:383-8.
 22. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Refinement in patient selection to reduce treatment-related mortality from autologous stem cell transplantation in amyloidosis. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:557-61.
 23. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol* 2012;30:4541-9.
 24. Suhr OB, Anan I, Backman C, et al. Do troponin and B-natriuretic peptide detect cardiomyopathy in transthyretin amyloidosis? *J Intern Med* 2008;263:294-301.
 25. Pinney JH, Whelan CJ, Petrie A, et al. Senile systemic amyloidosis: clinical features at presentation and outcome. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000098.
 26. Kristen AV, Scherer K, Buss S, et al. Noninvasive risk stratification of patients with transthyretin amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2014;7:502-10.
 27. Grogan M, Scott CG, Kyle RA, et al. Natural History of Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis and Risk Stratification Using a Novel Staging System. *J Am Coll Cardiol* 2016;68:1014-20.
 28. Kristen AV, Maurer MS, Rapezzi C, et al. Impact of genotype and phenotype on cardiac biomarkers in patients with transthyretin amyloidosis - Report from the Transthyretin Amyloidosis Outcome Survey (THAOS). *PLoS One* 2017;12:e0173086.
 29. Gillmore JD, Damy T, Fontana M, et al. A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur Heart J* 2018;39:2799-806.

Considerazioni relative alla tecnica statistica del bootstrap

Matteo Vidali

Struttura Complessa di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

ABSTRACT

A note to bootstrap methods.

The bootstrap is a computer-intensive method, part of the broad umbrella of resampling methods. It represents a different approach to statistical inference when population distribution is not known, when sampling distribution of the statistic of interest is intractable or assumptions are not met. Limiting the mathematical details, the paper focuses on the key idea of bootstrapping to resample with replacement from the observed sample and on how to implement the process. Bootstrap confidence intervals are briefly discussed.

INTRODUZIONE

In questo volume monografico, Clerico et al. presentano i dati di uno studio multicentrico relativo alla valutazione dei valori di riferimento della troponina I, misurata con metodi immunometrici ad alta sensibilità (1). In aggiunta al metodo non parametrico, raccomandato dalle linee guida internazionali (2), gli autori riportano il valore del 99° percentile, ed il relativo intervallo di confidenza (IC), calcolati con il metodo "bootstrap". L'utilizzo di questi metodi statistici si sta sempre più diffondendo nell'ambito della ricerca scientifica: una ricerca su PubMed, limitata agli ultimi 5 anni, evidenzia circa 300 lavori con un interesse specifico per questi metodi (termine "bootstrap" o "bootstrapping" nel titolo). Il numero aumenta fino a circa 5500 citazioni, se si includono tutti i lavori nel cui testo è presente uno di questi termini. Anche nell'ambito della Medicina di Laboratorio questi metodi sono sempre più utilizzati, in particolare per il calcolo degli intervalli di riferimento, come anche riportato nel documento CLSI EP28-A3C (2). Data la diffusione e le potenzialità di questi strumenti statistici, è auspicabile che i laboratoristi, ed in particolare i giovani specialisti in formazione, approfondiscano questi temi. Sebbene i metodi "bootstrap" non siano specificatamente elencati nel Syllabus EFLM 2018 per la formazione post-laurea per specialisti in Medicina di Laboratorio, essi sono

implicitamente considerati tra i metodi statistici riportati al punto A6.3 del documento (ad esempio metodi per la statistica inferenziale e metodi diretti e indiretti per gli intervalli di riferimento) (3,4).

Scopo di questo breve documento è quello di introdurre i lettori di Biochimica Clinica all'utilizzo e al razionale dei metodi "bootstrap".

CONCETTI PROPEDEUTICI: STATISTICA INFERENZIALE E CAMPIONAMENTO STATISTICO

Per una migliore comprensione dell'utilizzo dei metodi "bootstrap" è necessario richiamare alcuni concetti relativi alla statistica inferenziale e al campionamento statistico.

Il ricercatore, nel condurre un esperimento o indagine scientifica, è interessato a conoscere un certo aspetto o parametro della popolazione (quali ad esempio media, mediana, proporzione, differenza tra medie, rischio, sopravvivenza). È opportuno ricordare che nel linguaggio statistico il termine popolazione indica l'universo delle unità statistiche oggetto dell'indagine. Nella realtà, tuttavia, raramente il ricercatore è in grado di studiare tutte le unità che compongono la popolazione, a causa di difficoltà tecniche, delle tempistiche molto lunghe o di costi difficilmente sostenibili. L'indagine è quindi ristretta ad

Corrispondenza a: Matteo Vidali, SCU Biochimica Clinica, AOU Maggiore della Carità, C.so Mazzini 18, 28100 Novara, Tel 03213733036, E-mail matteo.vidali@maggioreosp.novara.it

Ricevuto: 14.01.2020

Revisionato: 15.01.2020

Accettato: 17.01.2020

Pubblicato on-line: 10.04.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.018

una porzione della popolazione selezionata con criterio casuale, detta campione statistico (il procedimento di selezione casuale è noto come campionamento statistico). Il campione è studiato con la speranza che l'informazione ottenuta da esso sia generalizzabile all'intera popolazione (inferenza statistica). Il fine del procedimento di inferenza statistica è quindi quello di utilizzare una statistica calcolata nel campione (come ad esempio media \bar{x} , deviazione standard s , proporzione p) per stimare un parametro ignoto della popolazione (media μ , deviazione standard σ , proporzione π). Tuttavia, anche se il campionamento statistico è stato condotto correttamente ed il campione è rappresentativo dell'intera popolazione, è improbabile che la statistica calcolata nel campione sia uguale al vero parametro della popolazione: un diverso campione potrebbe infatti fornire una stima differente. In altre parole, data una statistica ottenuta dal campione, stima del vero parametro della popolazione, il ricercatore è interessato a valutare l'incertezza o l'errore associati a tale stima. A tal fine è necessario conoscere la distribuzione di campionamento di tale statistica, cioè la distribuzione dei possibili valori della statistica campionaria calcolata al variare del campione estratto dalla popolazione (per tutti i possibili campioni della stessa numerosità estratti dalla popolazione). La distribuzione di campionamento di alcune statistiche è nota. Ad esempio, la distribuzione delle medie di campioni di dimensione n estratti da una popolazione con distribuzione gaussiana è a sua volta gaussiana con media μ (uguale a quella della popolazione) e deviazione standard

$$\sigma/\sqrt{n}$$

(dove σ è la deviazione standard della popolazione). La quantità σ/\sqrt{n} , deviazione standard della distribuzione delle medie campionarie, è chiamato errore standard della media. Questo risultato è, inoltre, vero anche se la popolazione da cui i campioni sono estratti non è gaussiana, a patto che n sia sufficientemente grande (Teorema del Limite Centrale). Nella realtà, il ricercatore non conosce la deviazione standard σ della popolazione e dispone di un unico campione (e non di tutti i possibili campioni da cui è possibile ottenere la distribuzione di campionamento della statistica). Tuttavia, l'errore standard della media può essere comunque calcolato come

$$s/\sqrt{n}$$

utilizzando s , deviazione standard campionaria, per stimare la deviazione standard della popolazione σ .

Generalizzando, la conoscenza della distribuzione di campionamento di una statistica campionaria consente di calcolare l'intervallo di confidenza di una statistica, espresso nella forma

$$\hat{\theta} \pm k^{(1-\alpha)} \hat{\sigma}$$

dove $\hat{\theta}$ è la statistica calcolata o stima puntuale (o stimatore) del parametro θ della popolazione, $k^{(1-\alpha)}$ un

fattore moltiplicativo scelto da una particolare distribuzione e $\hat{\sigma}$ la stima della deviazione standard dello stimatore (o deviazione standard della sua distribuzione di campionamento o il suo errore standard). L'errore standard è calcolato in modo differente per le differenti statistiche campionarie. L'intervallo di confidenza permette quindi di associare ad ogni stima puntuale, ottenuta da un campione, un intervallo di valori (stima intervallare) in cui riponiamo un certo livello di confidenza (ad esempio 90%, 95%, 99%) che contenga il vero parametro della popolazione.

Sfortunatamente, ci sono numerose situazioni in cui la distribuzione di campionamento della statistica di interesse non è nota, oppure le assunzioni richieste non sono rispettate, oppure nelle quali l'errore standard è molto difficile da stimare. In questi casi è possibile utilizzare le tecniche di "bootstrap" (o "bootstrapping") e gli altri metodi di ricampionamento.

BOOTSTRAPPING: ORIGINE, DEFINIZIONE E RAZIONALE

Il termine "bootstrapping" si fa derivare da "bootstraps", nome inglese che indica i tiranti degli stivali. Il termine si ritrova a partire dal diciannovesimo secolo nell'espressione to "pull oneself up by one's own bootstraps" (sollevarsi attaccandosi ai tiranti degli stivali), ad indicare un'azione chiaramente impossibile. Con riferimento a questo significato, l'espressione è stata anche associata erroneamente al romanzo "Le straordinarie avventure del Barone di Munchausen" di Rudolf Erich Raspe, in quanto il protagonista in una delle sue mirabolanti avventure riesce a liberarsi dal fango di una palude dove era finito, sollevandosi da solo non per i tiranti degli stivali ma grazie alla treccia dei propri capelli. La diversa accezione che l'espressione ha assunto successivamente, e cioè "farcela da solo, cavarsela con le proprie forze", offre, come vedremo in seguito, qualche indizio sulla natura di questi metodi statistici.

Il bootstrap appartiene all'insieme dei metodi statistici di ricampionamento (*resampling methods*). In questo lavoro con bootstrap si intende specificatamente il metodo bootstrap non-parametrico. Nei metodi di bootstrap, l'unico campione disponibile

$$x = \{x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n\}$$

di numerosità n , estratto da una popolazione con distribuzione F non nota, è utilizzato per generare numerosi altri B campioni, estratti dallo stesso campione x con re-immissione. Questi nuovi campioni, generati con re-immisione da x , sono chiamati campioni bootstrap (x^* ; la notazione con l'asterisco sottolinea che x^* non è il campione originale ma piuttosto un campione casuale estratto con re-immisione da x). Poiché le osservazioni sono estratte da x con re-immisione è possibile che la stessa osservazione compaia più volte in alcuni campioni bootstrap x^* , oppure che non compaia affatto. La probabilità che un campione bootstrap non

contenga una particolare osservazione del campione originario di dimensione n è infatti $(1-1/n)^n$. L'idea del bootstrap è quindi quella di utilizzare solo ciò che conosciamo dai dati (cioè l'unico campione disponibile) per calcolare una statistica e stimare la sua distribuzione di campionamento, senza fare alcuna assunzione sulla distribuzione della popolazione da cui il campione è stato tratto (in questo senso si intuisce l'accezione moderna del termine bootstrap vista sopra).

Più formalmente, l'assunzione fondamentale del bootstrap è che la distribuzione di campionamento della statistica $\hat{\theta}$ per i campioni estratti da una popolazione con distribuzione F non nota può essere approssimata dalla distribuzione di campionamento di $\hat{\theta}^*$ utilizzando la distribuzione empirica \hat{F} , dove $\hat{\theta}^*$ rappresenta la statistica di interesse calcolata non nel campione originario ma nei B campioni bootstrap. La distribuzione empirica \hat{F} è quella distribuzione di probabilità in cui ogni osservazione $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ ha probabilità $1/n$ di essere estratta. In pratica la distribuzione della popolazione non nota è sostituita con la distribuzione empirica. La Tabella 1 riassume il rationale del bootstrap rispetto al procedimento tradizionale di campionamento.

È opportuno sottolineare che, poiché la variabilità della statistica campionaria dipende dalla dimensione campionaria, è importante che la dimensione n dei campioni bootstrap sia la stessa di quella del campione originario. Come descritto sopra, i campioni bootstrap sono costruiti estraendo con re-immissione n unità dal campione originario di numerosità n :

$$x_{(b)}^* = \{x_1^*, x_2^*, \dots, x_n^*\}$$

dove $x_{(b)}^*$ rappresenta il b -esimo campione estratto. Secondo il calcolo combinatorio, da un campione con dimensione pari a n si possono ottenere, se l'ordine degli elementi non conta,

$$\beta = \binom{2n-1}{n} = \frac{(2n-1)!}{n!(n-1)!}$$

possibili campioni bootstrap di dimensione n (! indica l'operatore fattoriale). β cresce molto rapidamente al crescere di n , superando 10^9 già con $n=17$. L'insieme di tutti i possibili β campioni forma la distribuzione bootstrap teorica, valutabile solo se n non è elevato. Nella pratica, più spesso si considera solo una parte di tutti i possibili β campioni bootstrap (cioè B). L'utilizzo di B campioni bootstrap (in sostituzione di tutti i possibili campioni) è nota come approssimazione Monte Carlo. Quanto grande deve essere B ? Alcuni autori hanno suggerito che è sufficiente B tra 50 e 200 per stimare l'errore standard e B tra 1000 e 2000 per calcolare un intervallo di confidenza, mentre altri raccomandano B maggiori (ad esempio $B=10000$) (5-8).

I metodi di bootstrap richiedono comunque l'uso intensivo del computer ed elevati "tempo macchina" (tempo richiesto per l'esecuzione dell'analisi) e questo spiega la recente diffusione di queste tecniche, nonostante la loro formulazione teorica sia di molti anni antecedente (9).

BOOTSTRAPPING IN PRATICA: COME FUNZIONA

Il processo di bootstrap può essere così schematizzato:

- 1) dato un campione $x = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ di numerosità n , si calcola la statistica di interesse o stimatore del parametro della popolazione ($\hat{\theta}$);
- 2) si estrae con re-immissione dal campione originale, ottenendo un campione bootstrap $x_{(b)}^* = \{x_1^*, x_2^*, \dots, x_n^*\}$ di numerosità n ;
- 3) si calcola la stessa statistica (del punto 1) utilizzando però il campione bootstrap del punto 2, per ottenere una stima bootstrap $\hat{\theta}_{(b)}^*$;
- 4) si ripetono i punti 2 e 3 B volte;
- 5) le B statistiche bootstrap calcolate (una per ogni campione bootstrap) sono utilizzate per valutare la distribuzione bootstrap e ottenere la caratteristica desiderata (ad esempio l'errore standard, il bias o l'intervallo di confidenza).

Tabella 1

Processo di bootstrap e confronto con il procedimento tradizionale del campionamento statistico. Si osservi che $\hat{\theta}$ e $\hat{\theta}^$ rappresentano la stessa funzione (ad esempio media, mediana, proporzione); tuttavia, mentre la prima è calcolata dall'unico campione osservato dalla popolazione, la seconda è calcolata da un particolare campione bootstrap estratto con re-immissione dall'originale campione.*

Realtà		Bootstrap (simulazione computer)	
Da una popolazione con distribuzione non nota	F	da una distribuzione empirica	\hat{F}
Si osserva un campione di dimensione n	$x = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$	si estrae con re-immissione un campione bootstrap di dimensione n	$x^* = \{x_1^*, x_2^*, \dots, x_n^*\}$
Da cui si calcola la statistica di interesse	$\hat{\theta}$	da cui si calcola la statistica bootstrap	$\hat{\theta}^*$

Tabella 2

Esemplificazione del processo di ri-campionamento per 10 campioni bootstrap. In ogni riga è mostrato il numero del campione (i primi 10 dei B estratti), le osservazioni che lo compongono e la relativa statistica bootstrap (media). Poiché il campionamento è fatto con re-immissione, è possibile che la stessa osservazione compaia più volte in alcuni campioni bootstrap (ad esempio 190 nel primo campione o 230 nel secondo), oppure che non compaia affatto (ad esempio 209 nel primo campione).

b	x ₁ *	x ₂ *	x ₃ *	x ₄ *	x ₅ *	x ₆ *	x ₇ *	$\hat{\theta}^* = \bar{x}^*$
1	230	260	186	190	245	178	190	211,3
2	245	209	178	230	178	230	260	218,6
3	190	178	260	245	260	209	186	218,3
4	178	190	230	186	209	190	245	204
5	186	260	209	190	245	245	178	216,1
6	178	230	260	245	230	186	178	215,3
7	260	245	190	178	186	245	209	216,1
8	186	230	230	178	230	209	245	215,4
9	190	178	186	260	245	245	230	219,1
10	209	186	186	178	190	260	230	205,6

La Tabella 2 riassume quanto descritto: si ipotizzi di aver estratto/osservato da una popolazione un campione di numerosità n=7 con

$$x = \{x_1=209, x_2=190, x_3=230, x_4=186, x_5=178, x_6=260, x_7=245\}$$

e di aver calcolato la media campionaria (la statistica di interesse) ottenendo

$$\hat{\theta} = \bar{x} = 214$$

Da questo campione si estrapolano con re-immissione B=1000 campioni bootstrap, calcolando per ciascuno la statistica bootstrap (sempre la media). I primi 10 campioni estratti sono elencati in Tabella 2.

L'insieme delle statistiche bootstrap calcolate per i B campioni bootstrap ci permette di studiare:

- la forma della distribuzione di campionamento (10);
- il valore centrale o centro della distribuzione bootstrap: è opportuno a questo punto ricordare che il valore centrale della distribuzione bootstrap non è necessariamente uguale al valore centrale della distribuzione di campionamento. La distribuzione di campionamento è centrata sul valore del parametro stesso della popolazione, mentre la distribuzione bootstrap è centrata sul valore della statistica calcolata dal campione originario. In altre parole, la media della distribuzione bootstrap (media delle statistiche bootstrap) non è utilizzata per rimpiazzare la statistica stimata dal campione originario; il bootstrap può invece dirci quanto la stima calcolata sul campione originario è accurata (11);
- la stima della distorsione dello stimatore (bias) ottenuta dalla differenza tra il valore medio delle B stati-

stiche bootstrap e quello calcolato nel campione originario;

- la stima bootstrap dell'errore standard, calcolata come deviazione standard delle B statistiche bootstrap:

$$\hat{\sigma}_B = \sqrt{\frac{1}{B-1} \sum_{b=1}^B (\hat{\theta}_{(b)}^* - \hat{\theta}_{(\cdot)}^*)^2}$$

dove $\hat{\theta}_{(b)}^*$ rappresenta la statistica bootstrap calcolata sul campione bootstrap b-esimo e $\hat{\theta}_{(\cdot)}^*$ la media delle statistiche bootstrap dei B campioni. Bias ed errore standard di uno stimatore sono quantità che ci permettono di valutare le prestazioni dello stimatore; - l'intervallo di confidenza (IC) per lo stimatore $\hat{\theta}$ calcolato sul campione. Vi sono differenti modi per costruire intervalli di confidenza utilizzando le stime bootstrap, tra cui bootstrap standard, bootstrap-t, bootstrap percentile, bootstrap corretto (BC) e bootstrap corretto e accelerato (BCa). La descrizione dettagliata di queste tipologie di intervalli di confidenza richiederebbe molto spazio; il lettore interessato è invitato ad approfondire vantaggi e limiti di ogni IC (7,8,11,12). Tuttavia, può essere utile ricordare i due intervalli di confidenza bootstrap più diffusi nella letteratura scientifica (e nell'ambito della medicina di laboratorio): l'IC bootstrap percentile e l'IC BCa (Accelerated Bias-Corrected).

L'IC bootstrap percentile: ottenuto come

$$(\hat{\theta}_B^{*(\alpha/2)}, \hat{\theta}_B^{*(1-\alpha/2)})$$

dove $\hat{\theta}_B^{*(\alpha/2)}$ rappresenta il quantile $\alpha/2$ nella distribuzione delle stime bootstrap. In pratica, per calcolare l'IC con

questo metodo, dopo aver ordinato in senso crescente le stime bootstrap calcolate per i B campioni bootstrap, si selezionano le stime corrispondenti ai quantili $\alpha/2$, limite inferiore dell'IC: $(\alpha/2)(B+1)$, e $1-\alpha/2$, limite superiore dell'IC: $(1-\alpha/2)(B+1)$

Se $(\alpha/2)(B+1)$ e $(1-\alpha/2)(B+1)$ non fossero numeri interi, i limiti vengono trovati per interpolazione. Ad esempio se $B=999$, i limiti dell'IC al $(1-\alpha)=95\%$ corrispondono alle stime bootstrap ordinate in posizione 25esima e 975esima. Il vantaggio di questo tipo di IC (che ne spiega la grande diffusione in letteratura) è la facilità di calcolo: i limiti dell'IC sono ottenuti direttamente dalla distribuzione delle stime bootstrap utilizzando i percentili. Tuttavia, l'utilizzo di questo tipo di IC bootstrap presenta alcune limitazioni e non è consigliato (ad esempio l'IC bootstrap percentile tende ad essere troppo stretto per n non sufficientemente grande).

Se il numero di osservazioni del campione originario è piccolo, se la media delle stime bootstrap differisce dalla media campionaria o se la distribuzione delle stime bootstrap è asimmetrica, l'IC bootstrap percentile e altri IC bootstrap tendono ad essere inaccurati. A tal fine sono stati proposti altri IC bootstrap come l'IC BCa (5,12,14).

L'IC BCa (Accelerated Bias-Corrected): sebbene questo tipo di IC richieda calcoli più complessi (richiede infatti la stima di alcuni parametri: correzione di distorsione e accelerazione), esso è preferito da molti autori perché corregge per il bias e l'asimmetria della distribuzione delle stime di bootstrap. A fronte di una maggiore accuratezza, l'utilizzo dell'IC BCa è piuttosto complesso dal punto di vista computazionale; tuttavia, lo sviluppo e la disponibilità di linguaggi di programmazione specifici (ad esempio Linguaggio R) ha reso possibile il suo impiego (15).

La Figura 1 mostra una popolazione (A), 3 campioni estratti da essa con $n=30$ (campionamento statistico) (B-D), la distribuzione di campionamento della media (E) e le distribuzioni delle medie bootstrap calcolate ri-campionando con re-immissione 1000 campioni bootstrap dagli stessi 3 campioni mostrati nella prima colonna (F-H). In accordo al Teorema del Limite Centrale, la distribuzione di campionamento della media (Figura 1E) segue una distribuzione gaussiana, con deviazione standard pari a σ/\sqrt{n} , anche se la popolazione non è gaussiana, ma con n sufficientemente grande. Inoltre, come è possibile osservare, ogni distribuzione bootstrap (Figura 1F-H) è centrata sul valore della statistica calcolata dal rispettivo campione (alla sua sinistra) piuttosto che sul valore della media della popolazione. Inoltre, la forma e la variabilità delle tre distribuzioni bootstrap sono simili a quella di campionamento (Figura 1E).

Il metodo bootstrap è la procedura suggerita dal CLSI per ottenere l'IC al 90% dell'intervallo di riferimento quando il metodo robusto è utilizzato al posto del tradizionale metodo non-parametrico (2). Gli IC al 90% del limite inferiore e superiore dell'intervallo di riferimento sono calcolati con il metodo bootstrap

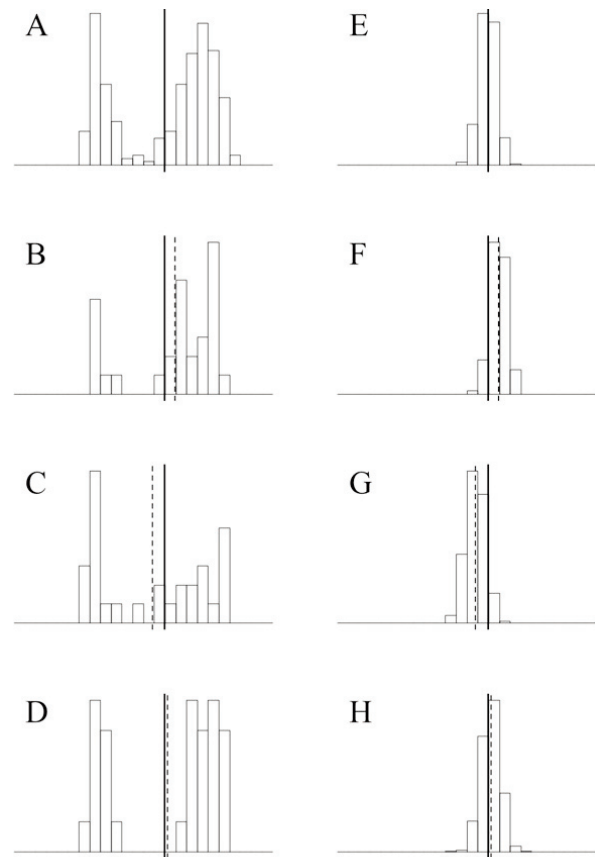


Figura 1

Distribuzioni bootstrap di medie di campioni con $n=30$. Nella prima colonna dall'alto in basso è mostrata la distribuzione della popolazione (A) e di 3 campioni (B-D). Nella seconda colonna dall'alto in basso è possibile osservare la distribuzione di campionamento della media (E) e le distribuzioni delle medie bootstrap calcolate ri-campionando con re-immissione 1000 campioni bootstrap dagli stessi 3 campioni mostrati nella prima colonna (F-H). In ogni distribuzione la linea spessa indica la media della popolazione (μ), mentre la linea tratteggiata rispettivamente la media di 3 campioni (a sinistra, B-D) o delle tre distribuzioni bootstrap (a destra, F-H). I grafici sono realizzati con il Linguaggio R v. 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e con il pacchetto boot.

percentile, considerando i quantili 5° e 95° delle due distribuzioni delle stime bootstrap (cioè delle distribuzioni bootstrap delle stime rispettivamente del limite inferiore e del limite superiore calcolate nei campioni bootstrap). Come già accennato sopra, un problema di questo approccio è che fornisce IC eccessivamente ampi se il campione non è sufficientemente grande. La letteratura suggerisce $n=80$ come dimensione limite per l'accettabilità degli IC così calcolati (16). Alcuni dati, ottenuti tramite studi di simulazione, sono disponibili in letteratura relativamente alle prestazioni di vari metodi bootstrap per il calcolo dei limiti di confidenza di intervalli di riferimento in campioni

di bassa numerosità (17).

Infine, è necessario sottolineare che un metodo bootstrap, quantunque accurato (e seppur con un numero molto elevato di campioni bootstrap), non può tuttavia fornire stime accurate se il campione originario, da cui estraiamo con re-immissione i campioni bootstrap, non è rappresentativo della popolazione. In altre parole, il metodo bootstrap non “compensa” per eventuali errori, negligenze o superficialità compiute nella selezione degli individui su cui calcolare l'intervallo di riferimento ed i relativi limiti di confidenza.

BOOTSTRAP E TROPONINA

Alla luce degli elementi di base del metodo bootstrap fin qui introdotti, è possibile tentare un commento dei risultati del lavoro di Clerico et al. (1). Secondo la letteratura, i metodi maggiormente utilizzati per il calcolo degli intervalli di riferimento e del 99esimo percentile sono il metodo non-parametrico, il metodo robusto ed il metodo bootstrap non-parametrico (noto anche come metodo bootstrap di Harrell-Davis) (2,18-19). A differenza del metodo non-parametrico, entrambi gli altri due metodi usano le tecniche di bootstrap (percentile, BCa o altre) per la determinazione dell'intervallo di confidenza dei quantili stimati (quantili 2,5esimo e 97,5esimo nel caso più comune di un intervallo di riferimento, quantile 99esimo nel caso del valore soglia utilizzato per la troponina per accertare la presenza di un danno cardiaco). Clerico et al., in questo lavoro ed in uno simile pubblicato recentemente, riferiscono che i valori del 99esimo percentile ottenuti con il metodo non-parametrico sono inferiori a quelli dichiarati dal Produttore e che i risultati ottenuti con il metodo bootstrap non-parametrico sono significativamente inferiori a quelli del metodo non-parametrico (1,20). Possibili spiegazioni di queste discrepanze, come suggerito dallo stesso Clerico e da altri autori, sono da ricercare nei diversi criteri di inclusione ed esclusione (e più in generale nella diversa composizione della popolazione di riferimento studiata) e nei metodi statistici utilizzati (1,18,20-24). Relativamente ai metodi statistici, le variabili che più impattano sono essenzialmente la numerosità campionaria, i metodi per l'identificazione degli outliers, o valori aberranti, ed i metodi per la determinazione del 99esimo percentile, ivi inclusi i differenti algoritmi per il calcolo dei quantili (18,21-22). È interessante ricordare, inoltre, che differenti software statistici implementano diversi algoritmi per il calcolo dei quantili; ad esempio con il Linguaggio R è possibile specificare fino a 9 algoritmi differenti.

Al fine di raggiungere una maggiore uniformità dei risultati, le recenti linee guida AACC/IFCC, e diversi autori, raccomandano un campione di almeno 300 uomini e 300 donne, l'utilizzo del metodo di Reed/Dixon per l'individuazione e l'esclusione degli outliers e del metodo non-parametrico per il calcolo del 99esimo percentile (18,21-23). È opportuno sottolineare, invece, che la scelta di una determinata procedura di bootstrap

(ad esempio percentile o BCa) influenza la determinazione dell'intervallo di confidenza ma non il calcolo del 99esimo percentile. Infatti, come si è visto, quest'ultimo è uno stimatore calcolato direttamente dal campione (indipendentemente quindi dalla procedura di bootstrap), mentre i limiti dell'intervallo di confidenza sono calcolati utilizzando le stime bootstrap dei numerosi campioni bootstrap. A parità, poi, di stimatore (algoritmo per il calcolo del quantile) e di procedura bootstrap scelti, una variabilità, anche se minima, dell'intervallo di confidenza è ovviamente ineliminabile, perché i campioni bootstrap sono ottenuti casualmente con re-immissione dal campione originario. Questo significa, inoltre, che la ripetizione del procedimento di bootstrap porterà a intervalli di confidenza ogni volta differenti dai precedenti.

In conclusione, anche alla luce dei risultati osservati da Clerico et al., tre aspetti peculiari meritano di essere sottolineati: in primo luogo, una maggiore uniformità di risultati può essere raggiunta aderendo alle raccomandazioni AACC/IFCC; in secondo luogo, le differenze osservate tra i vari metodi nella determinazione del 99esimo percentile si riducono all'aumentare della dimensione campionaria: questo è comprensibile, se si riflette sul fatto che il 99esimo percentile dipende dai valori estremi di una distribuzione e che l'esclusione anche di poche osservazioni (outliers secondo un determinato metodo) da un campione piccolo può portare a distribuzioni e quantili molto differenti; in terzo luogo, per una corretta interpretazione e comparazione dei risultati è fondamentale riportare accuratamente i metodi ed il software statistico utilizzati: parte almeno della confusione intorno ai valori del 99esimo percentile riportati in letteratura è infatti da attribuire alla scarsa qualità delle descrizioni dei metodi statistici (23).

RIASSUNTO DEI CONCETTI CHIAVE

Il metodo bootstrap appartiene all'insieme dei metodi statistici di ri-campionamento, utilizzabile in alternativa all'approccio tradizionale all'inferenza statistica, quando la distribuzione della popolazione è ignota, quando la distribuzione di campionamento della statistica campionaria è difficile da trattare o quando alcune assunzioni non sono rispettate. Nel processo di bootstrap il campionamento avviene per re-immissione utilizzando lo stesso campione originario e generando numerosi campioni bootstrap da cui calcolare la statistica di interesse.

La distribuzione di campionamento è centrata sul valore del parametro stesso della popolazione, mentre la distribuzione bootstrap è centrata sul valore della statistica calcolata nel campione originario.

La distribuzione delle stime bootstrap è utilizzata per fare inferenza al posto della distribuzione di campionamento. La dimensione dei campioni bootstrap deve essere uguale alla dimensione del campione originario.

Si consiglia di utilizzare un numero di campioni bootstrap

uguale a 10000.

Per il calcolo dell'IC preferire l'IC BCa (bias-corrected and accelerated bootstrap).

Riportare sempre accuratamente i metodi statistici ed il software utilizzato.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Clerico A, Zaninotto M, Masotti S et al. Calcolo e valutazione dei valori di riferimento della troponina cardiaca I (cTnI) misurata in un gruppo di volontari sani italiani con metodi immunometrici ad alta sensibilità: uno studio multicentrico. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl 1:S32-S47.
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; approved guideline, 3rd ed. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA, 2010.
- Jassam N, Lake J, Dabrowska M et al. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 – 2018. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1846-63.
- Jassam N, Lake J, Dabrowska M et al. Il Syllabus EFLM per la formazione post-laurea per specialisti in Medicina di Laboratorio: versione n 5 (2018). Traduzione a cura di Maria Sole Cigoli e Bruna Lo Sasso. *Biochim Clin* 2018;42:247-62.
- Efron B, Tibshirani RJ. An introduction to the bootstrap. London: Chapman and Hall, 1993.
- Hesterberg TC. What teachers should know about the bootstrap: resampling in the undergraduate statistics curriculum. *Am Stat* 2015;69:371-86.
- Carpenter J, Bithell J. Bootstrap confidence intervals: When, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat Med* 2000;19:1141-64.
- Davison AC, Hinkley DV. Bootstrap methods and their application. New York: Cambridge University Press, 1997.
- Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann Stat* 1979;7:1-26.
- Curran-Everett D. Explorations in statistics: the bootstrap. *Adv Physiol Educ* 2009;33:286-92.
- Chernick MR. Bootstrap methods: a guide for practitioners and researchers. Newtown: Wiley-Interscience, 2008.
- Di Ciccio TJ, Efron B. Bootstrap confidence intervals. *Statist Sci* 1996;11:189-228.
- Martinez WL, Martinez AR. Computational statistics handbook with MATLAB. Chapman and Hall/CRC, 2015.
- Efron B. Better bootstrap confidence intervals. *J Am Stat Ass* 1987;82:171-85.
- Chernick MR, LaBudde RA. An introduction to bootstrap methods with applications to R. Hoboken: Wiley-Interscience, 2011.
- Cerioti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009;46:8-17.
- Bjerner J, Theodorsson E, Hovig E et al. Non-parametric estimation of reference intervals in small non-Gaussian sample sets. *Accred Qual Assur* 2009;14:185-92.
- Wu AHB, Christenson RH, Greene DN et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
- Harrell FE, Davis CE. A new distribution-free quantile estimator. *Biometrika* 1982;69:635-40.
- Clerico A, Ripoli A, Masotti S et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high sensitivity cTnI method: A multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;493:156-61.
- Hickman PE, Koerbin G, Potter JM et al. Statistical considerations for determining high-sensitivity cardiac troponin reference intervals. *Clin Biochem* 2017;50:502-5.
- Eggers KM, Apple FS, Lind L et al. The applied statistical approach highly influences the 99th percentile of cardiac troponin I. *Clin Biochem* 2016;49:1109-12.
- Sandoval Y, Apple FS. The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin. *Clin Chem* 2014;60:455-62.
- Krintus M, Kozinski M, Boudry P et al. Defining normality in a European multinational cohort: Critical factors influencing the 99th percentile upper reference limit for high sensitivity cardiac troponin I. *Int J Cardiol* 2015;187:256-63.

Valutazione del rischio cardiovascolare e del danno cardiaco asintomatico nella popolazione generale utilizzando la misura della troponina cardiaca con metodi ad alta sensibilità

Documento del Gruppo di Studio Inter-societario sui Biomarcatori Cardiaci

Nadia Aspromonte¹, Martina Zaninotto², Andrea Padoan², Veronica Musetti³, Silvia Masotti³, Concetta Prontera³, Marco Perrone⁴, Claudio Passino³, Mario Plebani², Aldo Clerico³

¹Polo Scienze Cardiovascolari e Toraciche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Universitario, Università degli Studi di Padova

³Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Fondazione CNR-Regione Toscana, G. Monasterio, Pisa

⁴Laboratorio Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Tor Vergata, Roma

ABSTRACT

Evaluation of cardiovascular risk and asymptomatic myocardial injury in the general population with high-sensitivity methods for cardiac troponin assay.

Only very recently the set-up of some immunoassay methods with high-sensitivity analytical performance allowed the accurate detection of cardiac troponin I (cTnI) and T (cTnT) levels in healthy adult subjects. Several studies have demonstrated the association between the risk of major cardiovascular events and cardiac troponin concentrations even for biomarker values within the reference intervals. High-sensitivity cTnI and cTnT methods enable to monitor myocardial renewal and remodelling, and to promptly identify patients at highest risk to heart failure development. An early and effective treatment of individuals at higher cardiovascular risk may revert the initial myocardial remodelling and slow down heart failure progression. Dedicated trials are needed also in Italian population to demonstrate the efficiency of general population screening by means of cost benefit analysis for individuals at higher risk for heart failure progression.

INTRODUZIONE

Secondo i dati raccolti dal *Club Inter Pharmaceutique* in accordo con la classificazione dell'*European Diagnostic Manufacturers Association*, il mercato europeo delle troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) per l'anno 2018 era valutato attorno ai 19 milioni di euro (in calo di circa il 2% rispetto al 2017), mentre quello del peptide natriuretico BNP/NT-proBNP era attorno ai 26 milioni di euro (in aumento di circa il 10% rispetto al 2017). Da questi dati si può assumere che in molti laboratori clinici italiani i biomarcatori cardio-specifici (peptidi natriuretici e troponine cardiache) figurano in testa alla lista della spesa per gli analiti determinati con metodi immunometrici. Questi dati ci invitano a

restringere la misura dei biomarcatori cardio-specifici solo ai casi nei quali questa sia non solo clinicamente appropriata, ma anche risponda al principio fondamentale della *Evidence Based Laboratory Medicine* (EBLM) che raccomanda che un esame di laboratorio non solo debba essere efficace, ma soprattutto dimostrare di possedere un rapporto costo/beneficio favorevole (1). È ben noto che solamente gli esami di laboratorio che riescono a influenzare significativamente la diagnosi, la prognosi e/o la terapia di una malattia possono essere ritenuti clinicamente efficaci. Di conseguenza, il risultato di un esame di laboratorio che non modifica la storia naturale di una malattia difficilmente potrà risultare veramente efficace nella routine clinica e assistenziale (1). In

Questo documento intersocietario è pubblicato congiuntamente da Biochimica Clinica, Ligand Assay e dalle Società Scientifiche che hanno partecipato alla sua stesura

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Fondazione CNR Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 41, 56126 Pisa, E-mail clerico@ftgm.it

Ricevuto: 14.07.2019

Revisionato: 11.09.2019

Accettato: 18.09.2019

Pubblicato on-line: 26.11.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.066

accordo con tutte le più recenti linee guida, i peptidi BNP/NT-proBNP sono indicati come i biomarcatori di prima scelta sia per la diagnosi differenziale che per la stratificazione del rischio nei pazienti con scompenso cardiaco (SC) (2,3), mentre le cTnI e cTnT presentano le medesime indicazioni nei pazienti con infarto del miocardio (IM) (4-6).

Le malattie cardiovascolari sono la prima causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati (7-10), e lo SC, che può presentare una evoluzione sia acuta che cronica, è la via finale di tutte le malattie cardiovascolari (9,11-13). Poiché la possibilità di ammalarsi di SC cronico è correlata positivamente con l'età, il numero dei pazienti con SC è destinato ad aumentare, man mano che si ha un incremento della durata di vita media, come avviene in tutti i paesi più industrializzati.

Un recente studio del *Santa Fé Institute* ha calcolato che se si riuscisse ad abbattere significativamente l'impatto negativo delle malattie cardiovascolari si potrebbe ottenere un aumento della durata della vita media fino a 6 anni, almeno nei paesi più industrializzati (10). I risultati di questa analisi possono essere meglio compresi se si tiene conto della storia naturale dello SC cronico, che è generalmente suddiviso in quattro stadi (12,13). I primi due stadi (A e B) comprendono i soggetti che non hanno ancora sviluppato i sintomi dello SC. Fattori genetici (quindi già presenti alla nascita), come pure quelli ambientali (a cui siamo esposti durante la vita), producono nei soggetti predisposti (per presenza di ipertensione, aterosclerosi, obesità, malattie metaboliche, e/o diabete) le prime alterazioni anatomo-patologiche a livello del cuore e dei vasi (stadio A), che però possono rimanere per un certo periodo di tempo del tutto asintomatiche o pauci-sintomatiche (alterazioni a livello delle valvole del cuore, ipertrofia ventricolare, rimodellamento cardiaco con riduzione della frazione di eiezione del ventricolo sinistro, LVEF) (stadio B) (12,13). Gli ultimi due stadi (stadio C e D) si riferiscono invece alla fase sintomatica dello SC cronico. Nello stadio C i pazienti rispondono ancora alla terapia farmacologica standard, mentre nello stadio D i pazienti necessitano di una terapia farmacologica potenziata e interventi anche invasivi (9,12,13). Nonostante i continui successi della ricerca biomedica e farmacologica, attualmente, lo SC sintomatico è ancora considerato una patologia non reversibile, che può essere rallentata nella sua progressione, ma che porta inevitabilmente all'*exitus* (9). È importante sottolineare che la mortalità dei pazienti nello stadio D dello SC è simile, se non peggiore, a quella dei pazienti con tumori maligni aggressivi, quali il carcinoma del polmone a piccole cellule o il tumore della testa del pancreas (9).

Tenendo conto della storia naturale dello SC cronico, è molto importante rallentare il più possibile il passaggio verso la fase irreversibile e quindi intervenire già nelle fasi precoci della malattia, che sono considerate ancora reversibili (9,11,13). Ne consegue che lo scopo principale della medicina preventiva in ambito cardiovascolare dovrebbe essere l'individuazione dei pazienti a medio-alto rischio di progressione della

malattia, che presentano già un danno cardiaco, ma sono ancora nella fase asintomatica e forse ancora reversibile dello SC (stadio B). Infatti, è ipotizzabile che un intervento precoce potrebbe allungare significativamente l'aspettativa di vita e consentire un prolungamento degli anni liberi da eventi cardiovascolari, come anche dalle conseguenti comorbidità, che limitano pesantemente la qualità della vita nei soggetti più anziani.

Lo scopo principale di questo articolo è discutere i fondamenti fisiopatologici e i possibili vantaggi clinici dell'utilizzo dei biomarcatori cardio-specifici, non solo per la valutazione del rischio nella popolazione generale, ma anche per l'individuazione dei pazienti che presentano un SC, ma sono ancora asintomatici. La possibilità di suscitare e promuovere una discussione e di avviare anche in Italia studi multicentrici per valutare il costo/beneficio dell'uso dei biomarcatori cardio-specifici nell'identificazione di soggetti a maggior rischio di sviluppo di SC, con il patrocinio delle Società Scientifiche interessate e in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale, rappresentano un fondamentale contributo che la medicina di laboratorio può fornire nel miglioramento della prevenzione e della gestione degli eventi cardiovascolari nella popolazione italiana.

LE TROPONINE CARDIACHE COME MARCATORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE NELLA POPOLAZIONE GENERALE: EVIDENZE SPERIMENTALI E CLINICHE

Solamente dopo l'anno 2006, con l'introduzione della prima generazione di metodi per la misura di cTnI e cTnT con una aumentata sensibilità analitica, è stato possibile misurare i livelli di questi biomarcatori non solo in pazienti con malattie cardiache ed extra-cardiache (renali, polmonari, endocrino-metaboliche e infiammatorie), ma anche nei soggetti sani (11,14-29). Molti studi (30-44), comprese tre meta-analisi (45-47), hanno dimostrato che il rischio cardiovascolare tende ad aumentare nei soggetti apparentemente sani di entrambi i sessi, anche per valori di cTnI e cTnT inferiori al 99° percentile della popolazione di riferimento (*Upper Reference Limit*, URL), che è raccomandato dalle linee guida internazionali come valore di riferimento, sia per la definizione di danno miocardico, che per la diagnosi di IM (4).

In particolare, una meta-analisi (46) effettuata su 154 052 individui apparentemente senza malattie cardiache, ha evidenziato che i valori di cTnI, determinati con un metodo ad alta sensibilità (hs-cTnI) erano misurabili complessivamente nell'82,6% degli individui, mentre per la cTnT nel 69,7%. In questa meta-analisi è risultato significativamente aumentato il rischio per eventi fatali cardiovascolari e ictus tra i soggetti che presentavano valori del biomarcatore nel primo rispetto all'ultimo terzile (46).

Più recentemente, Welsh et al. (44) hanno valutato la

cTnT e la cTnI in una popolazione generale che includeva 19 501 individui (età compresa tra 18 e 98 anni). Concentrazioni misurabili di cTnT e cTnI sono state osservate nel 53,3% e 74,8% rispettivamente degli individui. Le donne, soprattutto se giovani, presentano valori inferiori, confermando che il metodo hs-cTnI è in grado di misurare i valori di troponina in una percentuale superiore di donne rispetto al metodo cTnT ECLIA. Nel 3,6% dei maschi e nel 7,9% delle femmine i valori erano superiori al 99° percentile URL della cTnT, mentre solo l'1,0% sia dei maschi che delle femmine presentavano valori superiori al 99° percentile URL della cTnI (44). In media, i valori più elevati di troponine sono stati osservati negli individui più anziani, con valori più elevati di *Body Mass Index* (BMI), pressione arteriosa sistolica, creatinina e con anamnesi positiva per malattie cardiovascolari e diabete (44).

Lo studio *North-Trøndelag Health* (HUNT) (43) ha misurato la cTnI (*Abbott Diagnostics Architect STAT High-Sensitive Troponin*) in 9 005 individui apparentemente senza malattie cardiache, reclutati nella popolazione generale e seguiti con un monitoraggio medio di 13,9 anni. Il dato più importante di questo studio è che i soggetti con un valore di hs-cTnI nell'ultimo terzile hanno mostrato un rischio più elevato di circa il 35% rispetto a coloro che mostravano valori del biomarcatore nel primo terzile (43). I risultati di questo studio dimostrano che il rischio cardiovascolare aumenta significativamente in entrambi i sessi, anche per valori di hs-cTnI molto inferiori ai valori del 99° percentile URL divisi per sesso (15,6 ng/L per le donne e 34,2 ng/L per gli uomini, come indicato dal produttore).

Questi recenti studi (30-47) suggeriscono quindi che potrebbe essere utile valutare il rischio cardiovascolare utilizzando la misura delle cTn con metodi ad alta sensibilità, anche nella popolazione generale, che comprende soggetti in apparente buona salute, ma che potrebbero presentare un rischio più elevato di sviluppare a medio-termine uno SC. Risulta quindi importante analizzare più a fondo le possibili conseguenze cliniche di queste evidenze sperimentali, considerando le prestazioni analitiche dei metodi di misura delle cTn e le possibili interpretazioni fisiopatologiche dei livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti adulti in apparente buona salute.

Le troponine cardiache misurate con metodi ad alta sensibilità: considerazioni analitiche, interpretazione fisiopatologiche e rilevanza clinica

È importante sottolineare come solamente utilizzando metodi ad alta sensibilità, sia possibile valutare accuratamente il rischio nella popolazione generale, perché solo questi metodi sono in grado di misurare i valori del biomarcatore nella maggior parte della popolazione di riferimento (6). Ne consegue che è molto importante anche per i clinici conoscere le caratteristiche analitiche dei metodi ad alta sensibilità

per la misura delle troponine cardiache (6).

Il documento pubblicato nel 2018 dalle società scientifiche AACC (*American Association for Clinical Chemistry*) e IFCC (6) stabilisce i due criteri fondamentali per definire ad alta sensibilità un metodo per la misura delle troponine cardiache (metodi hs-cTn). Il primo criterio stabilisce che il 99° percentile della distribuzione dei valori di cTnI o cTnT nella popolazione di riferimento (99° percentile URL) debba essere misurato con un errore (espresso come coefficiente di variazione, CV) minore od uguale al 10%. Il secondo criterio, più restrittivo, stabilisce che un metodo ad alta sensibilità deve misurare le concentrazioni di cTnI e cTnT con valori superiori al limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD) del metodo, nella maggior parte dei soggetti appartenenti ad una popolazione costituita da almeno 300 individui apparentemente sani di entrambi i sessi. In pratica, considerato che le donne mostrano generalmente valori inferiori di cTn rispetto agli uomini, questo criterio richiede che i metodi hs-cTn siano in grado di fornire valori misurabili del marcatore nella maggior parte di individui di una popolazione costituita da almeno 300 donne adulte sane.

Da un punto di vista fisiopatologico risulta fondamentale comprendere perché esistano valori misurabili di cTnI e cTnT nel sangue di soggetti adulti sani. Considerazione teoriche (11) e evidenze sperimentali in animali e nell'uomo (18) indicano che il valore del 99° percentile URL corrisponde alla quantità di cTnI e cTnT presente in circa 40 mg di tessuto miocardico (circa lo 0,015% della massa miocardica totale). In accordo con questi studi (11,18), i metodi hs-cTnI che dimostrano valori di LoD intorno a 2 ng/L, come alcuni tra quelli riportati nella Tabella 1, sarebbero in grado di misurare la quantità di cTnI contenuta in circa 5 mg di tessuto miocardico. Chiaramente, questi metodi hs-cTnI posseggono una sensibilità analitica molto migliore della risoluzione spaziale delle tecniche di imaging quali la Tomografia assiale, la Tomografia ad emissione di positroni e la Risonanza magnetica nucleare (11,18). Inoltre, alcuni studi clinici confermano che i livelli circolanti di hs-cTnI tendono ad essere correlati con i valori della massa cardiaca calcolati con metodiche ecocardiografiche e risonanza magnetica in soggetti adulti normali di entrambi i sessi e di differente età (48-51). Un'altra caratteristica fisiologicamente importante dei livelli circolanti di hs-cTnI nei soggetti apparentemente sani è che la variabilità biologica intra-individuale è bassa (in media del 9%), mentre quella tra-individui è molto più elevata (in media 50%) (52).

L'insieme di queste evidenze cliniche e sperimentali, suggerisce che i livelli circolanti nei soggetti normali sono correlati ad uno specifico processo fisiologico. Una ipotesi possibile è che i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti normali adulti sani siano un indice del rinnovamento fisiologico del cuore (11). Questa ipotesi è anche compatibile con il dato di un aumento dei livelli circolanti di hs-cTnI nella prima infanzia e una loro lenta, ma progressiva diminuzione durante l'adolescenza per

Tabella 1

Parametri di sensibilità analitica di alcuni metodi per la misura della cTnI disponibili in Italia dopo l'anno 2016

Metodi	LoB (ng/L)	LoD (ng/L)	LoQ 20% CV (ng/L)	LoQ 10% CV (ng/L)	Ratio
Architect	0,7	1,3	1,8	4,7	5,6
Access Dxl	0,6	1,3	2,1	5,3	3,3
ADVIA XPT	1,0	2,2	3,5	8,4	5,6
CLEIA AIA	1,1	2,1	15,0	30,9	1

LoB, valore del bianco; LoD, limite di sensibilità; LoQ 20%CV, limite di quantificazione con coefficiente di variazione al 20%; LoQ 10%CV, limite di quantificazione con coefficiente di variazione al 10%.

Il valore Ratio rappresenta il rapporto tra il valore del 99° percentile URL suggerito dal produttore e il valore di LoQ 10%CV misurato in laboratorio.

Architect: metodo Architect highly Sensitive Tnl per la piattaforma Architect i1000SR (Abbott Diagnostics, Ref. B3P250) (24).

Access Dxl: Access hsTnl per la piattaforma Dxl (REF B52699, Beckam Coulter, Inc. Brea, CA 92821 USA) (25).

ADVIA: ADVIA Centaur High-Sensitivity Troponin I (TNIH) (Ref. 10994774-5) per la piattaforma Centaur XPT (Siemens Healthineers, Milano, Italy) (27).

CLEIA AIA: metodo CLEIA (CL AIA-PACK cTnI TEST) per la piattaforma AIA-CL2400 (TOSOH BIOSCIENCE, Tessenderlo, Belgium) (26).

I valori dei parametri sono stati ottenuti nel laboratorio di riferimento dello studio (Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa)

stabilizzarsi poi nell'età adulta (24,28). Infatti, secondo gli studi più recenti la velocità di rinnovamento dei miocardiociti umani è più elevata nelle prime due decadi di vita, con un tasso di rinnovamento di circa 1% per anno all'età di 20 anni, con un successivo e progressivo declino per raggiungere un tasso di rinnovamento di solo lo 0,5% per anno nella senescenza (53-57).

Il 99°percentile URL della distribuzione di cTnI e cTnT assume una grande rilevanza, sia clinica che medico-legale, perché è indicato dalle linee guida come unica soglia decisionale per la rilevazione della presenza di danno miocardico e per la diagnosi di IM (4). Tuttavia, è ben noto che la stima del valore del 99°percentile URL di cTnI e cTnT dipende non solo dalle caratteristiche demografiche della popolazione di riferimento (sesso, età, probabilmente etnia), ma anche (e forse soprattutto) dai criteri di inclusione/esclusione adottati per valutare lo stato di salute dei volontari "apparentemente sani" arruolati nello studio (58,59). Inoltre, questo valore decisionale, per la sua natura stessa di parametro statistico della distribuzione di valori di una popolazione, presenta delle proprietà che devono essere ben comprese dai clinici.

Per chiarire meglio le importanti implicazioni fisiopatologiche dell'utilizzo del 99°percentile URL, prenderemo come esempio la distribuzione dei valori di cTnI, misurata con il metodo ad alta sensibilità Architect in una popolazione italiana, che include 1462 individui apparentemente sani, arruolati da otto differenti centri italiani (699 donne, 763 uomini; età media 51,5 (14,1) anni, intervallo di età 18-86) (Figura 1). La scelta di questo metodo di misura è stata determinata dalla presenza in letteratura di studi effettuati su 11 popolazioni di differenti etnie, che rende possibile un confronto tra le

varie popolazioni (59). La distribuzione dei valori di cTnI è molto asimmetrica nei soggetti adulti apparentemente sani (Figura 1A), mentre approssima una distribuzione normale, quando si utilizzino le trasformate logaritmiche dei valori originali (Figura 1B). I risultati riportati in Figura 1 mostrano che il 90% degli individui apparentemente sani italiani ha una concentrazione di cTnI ≤ 5 ng/L, mentre il 99° percentile è 18,1 ng/L, cioè circa 4 volte più elevato; inoltre, rispetto alla mediana (1,8 ng/L), l'aumento del 99° percentile è di circa 10 volte. Tale tipo di distribuzione risulta simile, nella popolazione italiana, valutata anche con altri metodi hs-cTnI (60-64), come anche per la cTnT (65).

È ormai accertato che la maggior parte dei pazienti con SC presenta valori significativamente più elevati di cTnI e cTnT dei soggetti apparentemente sani e molti di questi presentano valori superiori al 99° percentile URL, soprattutto se il marcatore è misurato con metodi ad alta sensibilità (66,67). In particolare, i pazienti con una ridotta frazione di eiezione ventricolare sinistra (HFrEF) presentano valori mediamente più elevati di cTnI e cTnT di quelli con una conservata frazione di eiezione (HFpEF) (68,69), e anche un numero più elevato di valori superiori al 99° percentile URL (68).

Tutte le linee guida nazionali (70) e internazionali (2,3) raccomandano la misura di cTnI e cTnT per la valutazione del rischio di morte o di eventi maggiori nei pazienti con SC acuto e cronico. Una recente meta-analisi condotta su 67 063 soggetti apparentemente liberi da malattie cardiache reclutati nella popolazione generale ha dimostrato che la misura di cTn non solo è un forte predittore di sviluppare SC (71), ma anche che il valore predittivo è indipendente e addizionale rispetto, sia ai convenzionali fattori di rischio, che alla misura dei

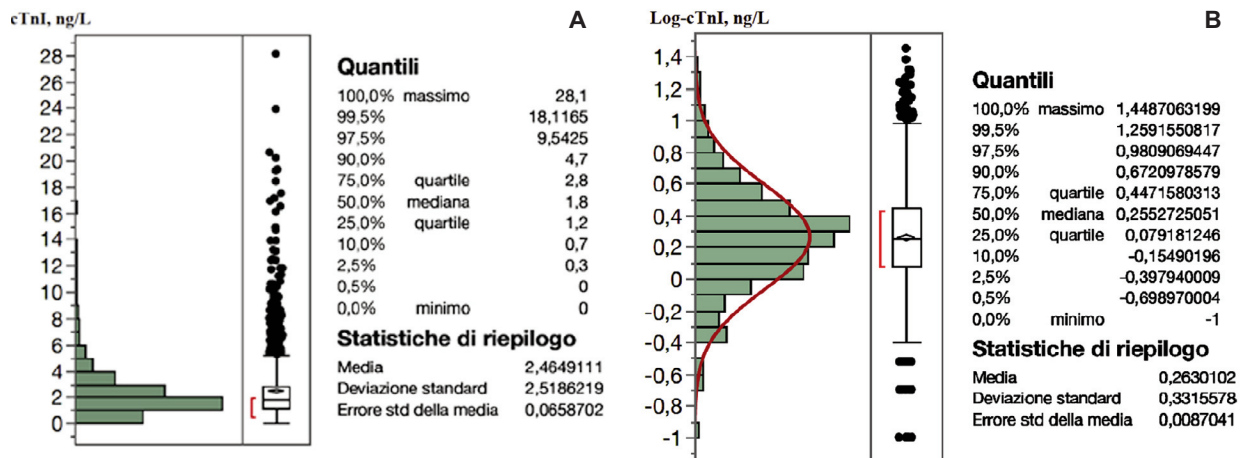


Figura 1

A) Distribuzione dei valori di cTnI misurata con il metodo hs-cTnI Architect in una popolazione di 1462 soggetti apparentemente sani. In figura sono anche riportati valori numerici della distribuzione in quantili. La figura illustra la distribuzione molto asimmetrica dei valori di cTnI. Nel box plot sono indicati il valore mediano e l'intervallo interquartile.

B) Distribuzione dei valori di cTnI, riportati nella Figura 1A, dopo trasformazione logaritmica in base 10 dei valori originali. In figura sono anche riportati i valori numerici della distribuzione in quantili. La figura dimostra come i valori log-trasformati della cTnI approssimino una distribuzione log-normale (indicata in figura con una linea curva di colore rosso). Nel box plot sono indicati il valore mediano e l'intervallo interquartile.

peptidi natriuretici (71). Inoltre, è già stato dimostrato da numerose evidenze sperimentali che il rischio cardiovascolare tende ad aumentare nei soggetti apparentemente sani di entrambi i sessi, anche per valori di cTnI e cTnT al di sotto del 99° percentile URL (30-47).

Le troponine cardiache come marcatore di rischio nella popolazione generale

Il clinico si trova regolarmente di fronte al problema di confrontare la misura effettuata su di un singolo paziente con un valore decisionale calcolato su una popolazione di riferimento. Nel caso di metodi hs-cTn, conviene affrontare questo problema da differenti punti di vista: statistico, analitico e fisiopatologico.

Da un punto di vista statistico, gli studi di valutazione del rischio cardiovascolare in pazienti con SC o nella popolazione generale utilizzano comunemente un solo valore basale per il calcolo del valore predittivo del marcatore (1,7,8,72,73). Questo approccio sperimentale fornisce generalmente per i più comuni fattori di rischio cardiovascolare, dei valori decisionali, calcolati con l'analisi statistica (C-statistics) basata sulle curve ROC, che dovrebbero presentare il migliore valore di accuratezza predittiva, valutato sia come rapporto sensibilità/specificità che come indice di ri-classificazione (*Net Reclassification Improvement*, NRI) (72-74).

Da un punto di vista sia analitico che dell'analisi statistica, si devono prendere in considerazione due distinte valutazioni. In alcuni casi, un valore di un marcatore, misurato su un singolo individuo, viene confrontato con un valore soglia ottenuto su una ampia

popolazione (come il valore soglia calcolato con le curve ROC per l'analisi del rischio, oppure il 99° percentile URL per la valutazione della presenza di danno cardiaco). È chiaro che nel confronto tra la misura del biomarcatore del singolo individuo e quella di un indice calcolato sulla popolazione generale la differenza (se molto ampia) tra variabilità intra- e inter-individuale può giocare un ruolo fondamentale. In altri casi, è, invece, necessario confrontare due valori misurati in tempi diversi sullo stesso individuo.

Nel caso specifico di due misure effettuate sullo stesso individuo in tempi successivi, per valutare se vi è una differenza significativa tra le due misure, bisogna considerare la variabilità dovuta all'errore analitico, come pure la variabilità intra-individuale (tra due misure nello stesso soggetto) (75). Uno studio recente (52) ha dimostrato che la variabilità intra-individuale dei valori di cTnI, misurata con il metodo hs-cTnI Architect, sia in soggetti adulti apparentemente sani, che in pazienti con insufficienza renale cronica in dialisi, è mediamente del 9%. Per contro, la variabilità tra soggetti, che dipende da molteplici fattori (età, sesso, costituzione fisica, attività fisica, stato di salute) è molto più elevata (mediamente intorno al 40-60%) (52). Nel caso specifico del confronto di due determinazioni eseguite nello stesso individuo con lo stesso metodo si può stimare quale è la differenza significativa con una confidenza del 95% (detta comunemente differenza critica, *Reference Change Value*, RCV) tra due determinazioni utilizzando la formula

$$RCV = 1,96 [2(CV_A^2 + CV_I^2)]^{1/2}$$

In questa formula, CV_A rappresenta la variabilità analitica del metodo di misura, mentre CV_I la variabilità intra-individuale della cTn (entrambe espresse come CV%) (75). Per esempio, la variabilità analitica si può determinare dal profilo di imprecisione del metodo hs-cTnI, riportato in Figura 2. Utilizzando i dati riportati nella Figura 2 per il CV_A (asse dell'ordinate) relativi ad ogni concentrazione misurata (asse delle ascisse) e inserendo questi dati nella formula, è possibile calcolare per ogni valore di cTnI il relativo RCV sia in percentuale che in valore assoluto (ng/L), come riportato in Tabella 2. Possiamo quindi utilizzare i dati della Tabella 2 per verificare se due misure effettuate con il metodo hs-cTnI sono significativamente differenti tra di loro. I dati riportati indicano che un aumento (o una diminuzione) maggiore del 30% tra due valori di cTnI, misurata con il metodo hs-cTnI nello stesso soggetto in tempi differenti, risulta sempre significativo con una confidenza del 95%.

Per meglio individuare la relazione tra valori di hs-cTnI ed età, è stato valutato il valore medio del marcatore in una serie successiva di piccoli intervalli di età. In Figura 3, sono riportati i valori di hs-cTnI (asse delle ordinate, valori già riportati in Figura 1), osservati nella popolazione di riferimento italiana in funzione dell'età (asse delle ascisse). Questi risultati dimostrano come vi sia una tendenza all'aumento dei valori di hs-cTnI dopo l'età di 55 anni. In particolare, vi è una differenza di circa 4 volte tra il valore mediano della distribuzione nella popolazione intera (1,8 ng/L) e il valore medio a circa 85 anni di età (circa 7 ng/L), mentre la differenza risulta rispettivamente di circa 10 volte nei confronti del 99° percentile URL (18 ng/L) (Figura 1A). Ciò significa che in un soggetto che a circa 40 anni

presenta una concentrazione del marcatore nei valori mediani, la quantità di cellule cardiache che ogni giorno muore dovrebbe aumentare di circa 10 volte per raggiungere all'età di 86 anni, una concentrazione di hs-cTnI uguale al 99° percentile URL.

L'ipotesi che i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti sani dipendano dal rinnovamento fisiologico del miocardio, prevede anche un declino progressivo del tasso di rinnovamento dopo l'età adulta fino alla senescenza. Questo meccanismo non è quindi chiaramente in grado di spiegare i livelli progressivamente crescenti di cTnI e cTnT durante la senescenza, come invece confermano i risultati riportati in Figura 3. Per spiegare il progressivo incremento dei livelli di cTnI e cTnT in entrambi i sessi dopo i 65 anni di età, è necessario ipotizzare che alcuni meccanismi fisiopatologici, caratteristici della senescenza, siano responsabili di un aumento della morte dei miocardiociti (76-79). Il cuore dell'anziano è generalmente caratterizzato dalla presenza di ipertrofia, con una riduzione del numero totale di miocardiociti e un aumento relativo di fibrosi (77,79). Inoltre, i miocardiociti del cuore senile sono caratterizzati da un progressivo accumulo, nel citoplasma, di proteine anomale e di mitocondri disfunzionanti, per cui la funzionalità cardiaca (che include la capacità di attivazione, di conduzione degli stimoli, di contrazione e di rilasciamento del muscolo cardiaco) risulta complessivamente ridotta (76-79).

Da un punto di vista fisiopatologico è necessario valutare quale possa essere il miglior approccio sperimentale per evidenziare se un individuo apparentemente sano sia in realtà a più alto rischio di progressione verso lo SC. I risultati di molti studi sembrano supportare l'ipotesi che alcuni soggetti apparentemente sani di età superiore a 65 anni con valori di hs-cTnI nell'ultimo terzile, siano effettivamente ad alto rischio di progressione più rapida verso uno SC sintomatico (43-47). In particolare, due recenti studi hanno dimostrato come valori progressivamente elevati nel tempo (monitoraggio fino a 5 anni) di hs-cTnI siano forti predittori di mortalità sia nella popolazione adulta (30-60 anni) (40) che più anziana (>70 anni) (80).

Queste evidenze suggeriscono l'ipotesi di lavoro che l'approccio sperimentale di valutare in un arco di tempo di alcuni mesi o anni, l'aumento progressivo dei livelli del marcatore cardio-specifico con controlli periodici di hs-cTnI sia in grado di evidenziare aumenti anche di pochi ng/L per anno nel singolo soggetto, partendo da valori mediani della distribuzione di cTnI e quindi di molto inferiori al 99° percentile URL, cioè del valore soglia per rilevazione del danno miocardico. Come riportato nella Tabella 2 anche aumenti di soli 3-5 ng/L, partendo da valori di 2-4 ng/L, sono da considerare significativi per il metodo hs-cTnI Architect. Simili tabelle di dati sono state recentemente pubblicate anche per i metodi hs-cTnI che utilizzano le piattaforme Access Dxl e ADVIA Centaur XPT (61,62). In supporto di questa ipotesi di lavoro, Lyngbakken et al. (81) hanno

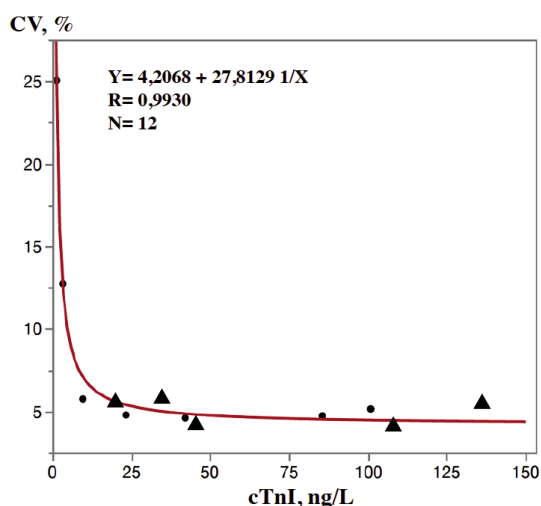


Figura 2

Profilo di imprecisione del metodo hs-cTnI Architect. In ascissa sono riportate le concentrazioni di cTnI di 7 pool plasmatici (cerchi pieni) di soggetti sani o pazienti con malattie cardiaca misurate 40 volte nel laboratorio di riferimento dello studio. Sono stati anche riportati i valori medi delle misure di 5 campioni di controllo di qualità (triangoli pieni) distribuiti negli anni 2017 e 2018 nel programma di Verifica Esterna di Qualità QualiMedLab (complessivamente 450 risultati da 19 laboratori italiani).

Tabella 2

Differenza critica in percentuale (Reference Change Value) e in valore assoluto (Δ) del metodo hs-cTnI Architect nell'intervallo di concentrazioni di cTnI da 2 ng/L a 40 ng/L

cTnI (ng/L)	CV _A (%)	RCV 95% IC (%)	Δ 95% IC (ng/L)	RCV 99% IC (%)	Δ 99% IC (ng/L)
2	18,1	56,1	1,1	73,8	1,5
5	9,8	36,9	1,8	48,6	2,4
10	7,0	31,6	3,2	41,6	4,2
15	6,1	30,1	4,5	39,7	6,0
20	5,6	29,4	5,9	38,6	7,7
40	4,9	28,4	11,4	37,3	14,9

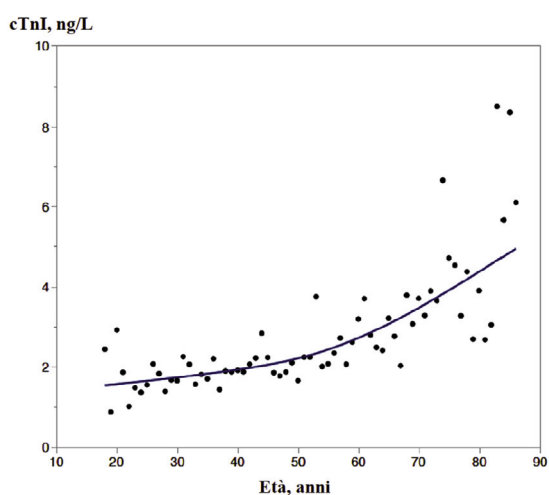
CV_A: variabilità analitica calcolata dal profilo di imprecisione (da Figura 2).

RCV 95% e 99%: valori dell'intervallo di confidenza (IC) al 95% e 99% del Reference Change Value.

Δ 95% e 99%: valori dell'intervallo di confidenza (95% e 99%) della differenza critica in valore assoluto, ng/L.

I valori di RCV sono stati calcolati utilizzando la formula riportata nel testo e assumendo un coefficiente di variazione intra-individuale del 9% (riferimento 75).

I dati sono stati ottenuti nel laboratorio di riferimento dello studio (Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa).

**Figura 3**

Distribuzione dei valori dei valori di cTnI, misurati con il metodo Architect (riportati in Figura 1), rispetto all'età. I valori di hs-cTnI sono stati mediati dopo essere stati raggruppati per piccoli intervalli di età. La media dei valori di cTnI, calcolata per ogni intervallo di età, è stata riportata sulle ordinate, in corrispondenza dell'età media dell'intervallo considerato (asse delle ordinate). In figura è riportata la curva che rappresenta la tendenza media dei valori di cTnI rispetto all'età.

recentemente dimostrato che sia cambiamenti assoluti che relativi della hs-cTnI nei soggetti della popolazione generale arruolati negli studi HUNT sono indipendentemente associati con il rischio cardiovascolare.

Vantaggi delle troponine cardiache rispetto ad altri marcatori per la valutazione del rischio cardiovascolare nella popolazione generale

Molti biomarcatori sono stati proposti in questi ultimi anni per la valutazione del rischio cardiovascolare sia nella popolazione generale che nei pazienti con SC (13,70,73,74,82). Le troponine cardiache, come anche i peptidi natriuretici, hanno il vantaggio, rispetto a tutti gli altri biomarcatori proposti di essere cardio-specifici (13,70,82). Dal punto di vista delle caratteristiche analitiche, come abbiamo riportato nei paragrafi precedenti per i metodi hs-cTnI, anche per i peptidi natriuretici (soprattutto il peptide NT-proBNP) abbiamo a disposizione dei metodi immunometrici sensibili e specifici (83-86). Considerate queste caratteristiche, sia analitiche che fisiopatologiche, non è affatto sorprendente che le troponine cardiache e i peptidi natriuretici siano raccomandati da tutte le linee guida nazionali e internazionali come biomarcatori di prima scelta per la valutazione del rischio cardiovascolare nei pazienti con SC (2,3,70). Infine, rispetto ad altri biomarcatori non cardio-specifici, sia i peptidi natriuretici (70,85) che le troponine (38-48) sono in grado di evidenziare i soggetti a rischio, ancora asintomatici, cioè nei primi due stadi (A e B) dello SC.

Rispetto ai peptidi natriuretici, le troponine cardiache presentano alcuni vantaggi, sia dal punto di vista analitico che fisiopatologico, come marcatori di rischio cardiovascolare nella popolazione generale. Infatti, i peptidi natriuretici presentano una variabilità sia intra- che inter-individuale elevata, intorno al 40-60%, e, inoltre, sono meno stabili sia in vivo che in vitro, rispetto alle troponine cardiache e quindi richiedono una particolare cura nella fase preanalitica della misura e nella conservazione dei campioni (70,84,86). Tuttavia, sono riportati in letteratura solo pochi studi che hanno valutato la variabilità biologica delle troponine cardiache con metodi ad alta sensibilità (52, 87-90). Quindi sono necessari altri studi per valutare più accuratamente la variabilità intra-individuale delle troponine cardiache sia in soggetti sani che nei pazienti con malattie

cardiovascolari

Infine, è importante sottolineare dal punto di vista clinico come i metodi ad alta sensibilità delle troponine cardiache possano permettere di evidenziare nella popolazione generale gli individui, con valori di cTn appena al di sopra del 99° percentile URL, che potrebbero essere considerati falsi positivi, ma che invece presentano un danno miocardico (4). In accordo con la più recente definizione di IM (4), tutti i soggetti che presentano anche un solo valore di hs-cTn al di sopra del 99° percentile URL devono essere accuratamente valutati dal punto di vista clinico e deve essere anche accertata la possibile causa dello SC.

CONCLUSIONI

Considerate le loro ottime prestazioni analitiche e le loro favorevoli caratteristiche fisiopatologiche, le troponine cardiache, misurate con metodi ad alta sensibilità, si propongono come biomarcatori di prima scelta per l'identificazione, nella popolazione generale, di soggetti asintomatici a rischio di sviluppare a medio termine lo SC. Ormai molti studi hanno dimostrato che questi biomarcatori cardio-specifici, soprattutto se misurati con metodi ad alta sensibilità, sono in grado di evidenziare un aumento del rischio cardiovascolare già per valori inferiori al valore soglia per la diagnosi di SC (cioè il 99° percentile URL) (43-47). Considerata la relativamente bassa variabilità biologica intra-individuale delle troponine cardiache (6%-10%), rispetto a quella inter-individuale (circa 50%), e le ottime prestazioni analitiche, è teoricamente prevedibile l'applicazione di protocolli sperimentali basati sulla misura in serie del biomarcatore nel corso di alcuni mesi per mettere in evidenza nella popolazione generale gli individui apparentemente sani più a rischio di sviluppare uno SC sintomatico nel breve-medio termine. Vi sono quindi tutte le premesse scientifiche per iniziare a programmare una valutazione del rischio cardiovascolare nella popolazione generale utilizzando la misura delle troponine cardiache con metodi ad alta sensibilità.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Price CP, Christenson RH. The clinical question: a system for formulating answerable questions in laboratory medicine. In *Evidence Based Laboratory Medicine – Principles, Practice, and Outcome*. Second edition 2007, AACCPress, Washington DC, pag. 25-52.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA/HFSA focused update for the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2017;136:e137-61.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2016;18:891-975.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
- Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
- Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
- Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2935-59.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2016;37:2315-81.
- Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail* 2013;1:1-20.
- West G. *Scale: life, growth, and death in organisms, cities, and companies*. New York: Penguin Press, 2017.
- 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.
- Jessup M, Abraham WT, Casey DE, et al. 2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009;119:1977-2016.
- Emdin M, Vittorini S, Passino C, et al. Old and new biomarkers of heart failure *Eur J Heart Fail* 2009;11:331-5.
- Álvarez I, Hernández L, García H, et al. High-sensitivity troponin T assay in asymptomatic high cardiovascular risk patients. The TUSARC Registry. *Rev Esp Cardiol* 2017;70:261-6.
- Hasler S, Manka R, Greutmann M, et al. Elevated high-sensitivity troponin T levels are associated with adverse cardiac remodelling and myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Swiss Med Wkly* 2016;146:w14285.
- Neeland IJ, Drazner MH, Berry JD, et al. Biomarkers of chronic cardiac injury and hemodynamic stress identify a malignant phenotype of left ventricular hypertrophy in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:187-95.
- Sundström J, Ingelsson E, Berglund L, et al. Cardiac troponin-I and risk of heart failure: a community-based cohort study. *Eur Heart J* 2009;30:773-81.
- Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem*

- 2017;63:990-6.
19. Prontera C, Fortunato A, Storti S, et al. Evaluation of analytical performance of the Siemens ADVIA Tnl Ultra Immunoassay. *Clin Chem* 2007;53:1722-3.
 20. Jarausch J, Braun S, Dolci A, et al. Evaluation of a development version of the Elecsys highly sensitive troponin T assay. *Clin Chem* 2008;54(Suppl 6):A91.
 21. Saenger AK, Beyrau R, Braun S, et al. Multicentre analytical evaluation of a high-sensitive troponin T assay. *Clin Chim Acta* 2011;412:748-54.
 22. Venge P, James S, Jansson L, et al. Clinical performance of two highly sensitive cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2009;55:109-16.
 23. Krintus M, Kozinski M, Boudry P, et al. European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT highly sensitive troponin I immunoassay. *Clin. Chem Lab Med* 2014;52:1657-65.
 24. Caselli C, Cangemi G, Masotti S, et al. Plasma cardiac troponin I concentrations in healthy neonates, children and adolescents measured with a highly sensitive immunoassay method: Highly sensitive troponin I in pediatric age. *Clin Chim Acta* 2016;458:68-71.
 25. Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:492-501.
 26. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e174-76.
 27. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of the analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the measurement of cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e229-31.
 28. Koerbin G, Potter JM, Abhayaratna WP, et al. The distribution of cardiac troponin I in a population of healthy children: lessons for adults. *Clin Chim Acta* 2013;417:54-6.
 29. McKie PM, Heublein DM, Scott CG, et al. Defining high sensitivity cardiac troponin concentrations in the community. *Clin Chem* 2013;59:1099-107.
 30. Hussein AA, Gottdiener JS, Bartz TM, et al. Cardiomyocyte injury assessed by a highly sensitive troponin assay and sudden cardiac death in the community: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2112-20.
 31. Eggers KM, Al-Shakarchi J, Berglund L, et al. High-sensitive cardiac troponin T and its relations to cardiovascular risk factors, morbidity, and mortality in elderly men. *Am Heart J* 2013;166:541-8.
 32. Oluleye OW, Folsom AR, Nambi V, et al ARIC Study Investigators. Troponin T, B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and cause-specific mortality. *Ann Epidemiol* 2013;23:66-73.
 33. Omland T, de Lemos JA, Holmen OL, et al. Impact of sex on the prognostic value of high-sensitivity cardiac troponin I in the general population: the HUNT study. *Clin Chem* 2015;61:646-56.
 34. Zeller T, Tunstall-Pedoe H, Saarela O, et al. High population prevalence of cardiac troponin I measured by a high-sensitivity assay and cardiovascular risk estimation: the MORGAM Biomarker Project Scottish Cohort. *Eur Heart J* 2014;35:271-81.
 35. Masson S, Agabiti N, Vago T, et al. The fibroblast growth factor-23 and Vitamin D emerge as nontraditional risk factors and may affect cardiovascular risk. *J Intern Med* 2015;277:318-30.
 36. Neumann JT, Havulinna AS, Zeller T, et al. Comparison of three troponins as predictors of future cardiovascular events: prospective results from the FINRISK and BiomaCaRE studies. *PLoS One* 2014;9:e90063.
 37. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2012;126:1596-604.
 38. Thorsteinsdottir I, Aspelund T, Gudmundsson E, et al. High-sensitivity cardiac troponin I is a strong predictor of cardiovascular events and mortality in the AGES-Reykjavik community-based cohort of older individuals. *Clin Chem* 2016;62:623-30.
 39. Blankenberg S, Salomaa V, Makarova N, et al. Troponin I and cardiovascular risk prediction in the general population: the BiomarCaRE consortium. *Eur Heart J* 2016;37:2428-37.
 40. Hughes MF, Ojeda F, Saarela O, et al. Association of repeatedly measured high-sensitivity-assayed troponin I with cardiovascular disease events in a general population from the MORGAM/BiomarCaRE Study. *Clin Chem* 2017;63:334-42.
 41. Zhu K, Knuiman M, Divitini M, et al. High-sensitivity cardiac troponin I and risk of cardiovascular disease in an Australian population-based cohort. *Heart* 2018;104:895-903.
 42. Zellweger MJ, Haaf P, Maraun M, et al. Predictors and prognostic impact of silent coronary artery disease in asymptomatic high-risk patients with diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 2017;244:37-42.
 43. Sigurdardottir FD, Lynbakken MN, Holmen OL, et al. Relative prognostic value of cardiac troponin I and C-reactive protein in the general population (from the North-Trøndelag Health [HUNT] Study. *Am J Cardiol* 2018;121:949-55.
 44. Welsh P, Preiss D, Shah ASV, et al. Comparison between high-sensitivity cardiac troponin T and cardiac troponin I in a large general population cohort. *Clin Chem* 2018;64:1607-16.
 45. Sze J, Mooney J, Barzi F, et al. Cardiac troponin and its relationship to cardiovascular outcomes in community populations - A systematic review and meta-analysis. *Heart Lung Circ* 2016;25:217-28.
 46. Willeit P, Welsh P, Evans JDW, et al. High-sensitivity cardiac troponin concentration and risk of first-ever cardiovascular outcomes in 154,052 participants. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:558-68.
 47. van der Linden N, Klinkenberg LJ, Bekers O, et al. Prognostic value of basal high-sensitive cardiac troponin levels on mortality in the general population: a meta-analysis. *Medicine* 2016;95:e5703.
 48. McKie PM, Heublein DM, et al. Defining high sensitivity cardiac troponin concentrations in the community. *Clin Chem* 2013;59:1099-107.
 49. Eggers KM, Lind L, Ahlström H, et al. Prevalence and pathophysiological mechanisms of elevated cardiac troponin I levels in a population-based sample of elderly subjects. *Eur Heart J* 2008;29:2252-8.
 50. Sinning C, Keller T, Zeller T, et al. Association of high-sensitivity assayed troponin I with cardiovascular phenotypes in the general population: the population-based Gutenberg health study. *Clin Res Cardiol* 2014;103:211-22.
 51. Bossard M, Thériault S, Aeschbacher S, et al. Factors independently associated with cardiac troponin I levels in young and healthy adults from the general population. *Clin Res Cardiol* 2017;106:96-104.
 52. van der Linden N, Hilderink JM, Cornelis T, et al. Twenty-four-hour biological variation profiles of cardiac troponin I in individuals with or without chronic kidney disease. *Clin*

- Chem 2017;63:1655-6.
53. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1068-79.
 54. Buja LM, Vela D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol* 2008;17:349-74.
 55. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98-102.
 56. Lázár E, Sadek HA, Bergmann O. Cardiomyocyte renewal in the human heart: insights from the fall-out. *Eur Heart J* 2017;38:2333-42.
 57. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 2015;161:1566-75.
 58. Sandoval Y, Apple FS. The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin. *Clin Chem* 2014;60:455-62.
 59. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli M, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology, and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
 60. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of reference change values for a hs-cTnI immunoassay using both plasma samples of healthy subjects and patients and quality control samples. *Clin Chem Lab Med* doi: 10.1515/cclm-2019-0032.
 61. Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high-sensitivity cTnI method: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;493:156-61.
 62. Clerico A, Masotti S, Musetti V, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of the hs-cTnI method using ADVIA Centaur XTP platform: a multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;495:161-6.
 63. Masotti S, Musetti V, Aloe R, et al. Evaluation of 99th percentile value of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chim Acta* 2019;496:45-47.
 64. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: a multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 65. Franzini M, Lorenzoni V, Masotti S, et al. The calculation of the cardiac troponin T 99th percentile of the reference population is affected by age, gender, and population selection: A multicenter study in Italy. *Clin Chim Acta* 2015;438:376-81.
 66. Wetterstein N, Maisel A. Role of cardiac troponin levels in acute heart failure. *Card Fail Rev* 2015;1:102-6.
 67. Yousufuddin M, Abdalrhim AD, Wang Z, et al. Cardiac troponin in patients hospitalized with acute decompensated heart failure: A systematic review and meta-analysis. *J Hosp Med* 2016;11:446-54.
 68. Gohar A, Chong JPC, Liew OW, et al. The prognostic value of highly sensitive cardiac troponin assays for adverse events in men and women with stable heart failure and a preserved vs. reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 2017;19:1638-47.
 69. Myre P, O'Meara E, Claggett BL, et al. Cardiac troponin I and risk of cardiac events in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2018;11:e005312.
 70. Aspromonte N, Gulizia MM, Clerico A, et al. ANMCO/ELAS/SIBioC Consensus Document: biomarkers in heart failure. *Eur Heart J Suppl.* 2017;19(Suppl D):D102-D112.
 71. Evans JDW, Dobbin SJH, Pettit SJ, et al. High-sensitivity cardiac troponin and new-onset heart failure: A systematic review and meta-analysis of 67,063 patients with 4,165 incident heart failure events. *JAAC Heart Fail* 2018;6:187-97.
 72. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2009;119:2408-16.
 73. Wang TJ. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation* 2011;123:551-65.
 74. Pencina MJ, D'Agostino RB, Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Stat Med* 2011;30:11-21.
 75. Fraser CG. Reference change values. *Clin Chem Lab Med* 2011;50:807-12.
 76. Sheydina A, Riordon DR, Boheler KR. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clin Sci* 2011;121:315-29.
 77. Rota M, Goichberg P, Anversa P, et al. Aging effects on cardiac progenitor cell physiology. *Compr Physiol* 2015;5:1775-814.
 78. Henning RH, Brundel BJJM. Proteostasis in cardiac health and disease. *Nat Rev Cardiol* 2017;14:637-53.
 79. Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, et al. Aging and autophagy in the heart. *Circ Res* 2016;118:1563-76.
 80. Eggers KM, Venge P, Lindhal B, et al. Cardiac troponin I levels measured with a high-sensitive assay increase over time and are strong predictors of mortality in an elderly population. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1906-13.
 81. Lyngbakken MN, Røsjø H, Holmen OL, et al. Temporal changes in cardiac troponin I are associated with risk of cardiovascular events in the general population: the Nord-Trøndelag Health Study. *Clin Chem* 2019;65:871-81.
 82. Passino C, Barison A, Vergaro G, et al. Markers of fibrosis, inflammation, and remodeling pathways in heart failure. *Clin Chim Acta* 2015;443:29-38.
 83. Prontera C, Zucchelli CG, Vittorini S, et al. Storti S, Comparison between analytical performances of polyclonal and monoclonal electrochemiluminescence immunoassays for NT-proBNP. *Clin Chim Acta* 2009;400:70-3.
 84. Clerico A, Passino C, Franzini M, et al. Cardiac biomarker testing in the clinical laboratory: Where do we stand? General overview of the methodology with special emphasis on natriuretic peptides. *Clin Chim Acta* 2015;443:17-24.
 85. Emdin A, Passino C, Prontera C, et al. Comparison of Brain Natriuretic (BNP) and amino-terminal proBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem* 2007;53:1289-97.
 86. Clerico A, Zaninotto M, Prontera C, et al. State of the art of BNP and NT-proBNP immunoassays: the CardioOrmoCheck study. *Clin Chim Acta* 2012;414:112-19.
 87. Aakre KM, Røraas T, Petersen PH, et al. Weekly and 90-minute biological variations in cardiac troponin T and cardiac troponin I in hemodialysis patients and healthy controls. *Clin Chem* 2014;60:838-47.
 88. Corte Z, Garcia C, Venta R. Biological variation of cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease and in healthy individuals. *Ann Clin Biochem* 2015;52(Pt 1):53-60.

89. Fournier S, Iten L, Marques-Vidal P, et al. Circadian rhythm of blood cardiac troponin T concentration. *Clin Res Cardiol* 2017;106:1026-32.
90. Zaninotto M, Padoan A, Mion MM, Marinova M, Plebani M. Short-term biological variation and diurnal rhythm of cardiac troponin I (Access hs-TnI) in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2020;504:163-7.

Interferenza da anticorpi eterofili e anti fosfatasi alcalina in un paziente sottoposto ad intervento cardiocirurgico di David

Fiamma Balboni¹, Manuel Biagioli², Vincenzo Comito², Stefano Rapi³, Mauro Vannucci²

¹Laboratorio Analisi, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze

²Unità Operativa di Riabilitazione Cardiologica, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze

³Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi AOUC, Firenze

ABSTRACT

Etherophilic and anti-alkaline phosphatase antibodies interference in a patient undergoing David procedure.

We describe the case of a 47 years old male patient who underwent cardiac surgery for valve sparing root replacement (known as David procedure), in September 2018. In the post-operative period and during the rehabilitation stage, the patient was constantly monitored with the measurement of cardiac troponin I (cTnI), performed in different hospital facilities using different cTnI analytical methods. In the rehabilitation clinic, cTnI [measured with Access AccuTnI+3 method (Beckman Coulter)] was found steadily raising, so the patient was readmitted to the hospital to undergo a coronary angiography. The coronary arteries were found free from critical lesions and the cTnI [measured with Advia Centaur cTnI Ultra method, (Siemens Healthcare)] was repeatedly negative. This finding rose the suspect of an analytical interference in the Access AccuTnI+3 method. This was actually the case: heterophile and anti-alkaline phosphatase antibodies were demonstrated in the patient sample; they both were responsible for the elevated values of cTnI.

CASO CLINICO

Nel settembre 2018 si ricovera presso l'Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA) in Unità Operativa di Riabilitazione Cardiologica, un uomo di anni 47 proveniente dalla Unità Operativa di Cardiocirurgia dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi (AOUC).

In anamnesi vengono riportate un'abitudine tabagica ed una insufficienza renale cronica di grado lieve. Nel mese precedente, per comparsa di dolore retrosternale oppressivo, della durata di circa mezz'ora, il paziente si era recato al Dipartimento Emergenza e Accettazione dell'Ospedale Santa Maria Annunziata (Firenze). Qui veniva rilevata una concentrazione di cTnI misurata con metodo Access AccuTnI+3, (Beckman Coulter), lievemente aumentata [0,27 µg/L; v.r. <0,04 (99° percentile e livello decisionale alla concentrazione con CV <10%)]. L'ecocardiogramma evidenziava una funzione sistolica globale ai limiti inferiori [frazione di eiezione (FE) 50%] con acinesia infero-laterale medio-

basale e ipocinesia inferiore e laterale medio-basale.

Il paziente era sottoposto a studio angiotomografico dell'aorta toraco-addominale che evidenziava una dilatazione aneurismatica dell'aorta ascendente a livello del piano valvolare/sopravalvolare con diametro trasverso di 5,8 cm; al terzo medio dell'aorta ascendente il diametro massimo era 4 cm. Si segnalava inoltre l'incidentale riscontro di molteplici nodularità e pseudonodularità in tutti i lobi polmonari, prevalentemente subcentimetriche (la maggiore di 5 x 5 cm in sede subpleurica del lobo superiore destro). Il paziente veniva quindi trasferito presso la Struttura Organizzativa Dipartimentale di Cardiocirurgia AOUC e sottoposto ad intervento cardiocirurgico di David (sostituzione della radice e dell'aorta ascendente con protesi retta e reimpianto della valvola aortica nativa).

Il decorso post-operatorio era regolare, con un episodio di fibrillazione atriale ad alta frequenza trattato farmacologicamente. Il picco di cTnI era 7,88 µg/L; [v.r. <0,04 (99° percentile e livello decisionale alla concentrazione con CV <10%)] e l'analita era misurato

Corrispondenza a: Fiamma Balboni, Laboratorio Analisi, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Firenze, E-mail lab.ifca@giomi.com

Ricevuto: 08.11.2019

Revisionato: 06.12.2019

Accettato: 19.12.2019

Publicato on-line: 06.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.014

con Advia Centaur cTnI Ultra, (Siemens Healthcare). Le due metodiche, Beckman e Siemens, mostrano valori decisionali molto simili. All'ecocardiogramma post-operatorio vengono rilevati esiti di intervento di David con protesi retta normoposizionata, valvola aortica con escursioni delle cuspidi nei limiti senza rigurgito significativo (gradiente massimo 10 mmHg), ventricolo sinistro ai limiti superiori per diametri (diametro tele diastolico 55 mm) con sfumata ipocinesia diffusa ed FE 48%; lieve insufficienza mitralica, sezioni destre nei limiti con gradiente ventricolo destro-atrio destro 23 mmHg; non versamento pericardico; vena cava inferiore VCI nei limiti. L'ultima cTnI era 0,4 µg/L.

Il paziente viene dimesso da AOUC dopo 5 giorni e trasferito presso la Riabilitazione Cardiologica IFCA. Durante la degenza accusa, a seguito di seduta fisioterapica, un dolore toracico irradiato alle scapole, della durata di circa 20 minuti per il quale sono stati eseguiti ECG ed ecocardiogramma, invariati rispetto ai precedenti. Le successive misure di cTnI eseguite con metodo Access AccuTnI+3, hanno mostrato un progressivo incremento (0,63 µg/L *versus* 0,24 µg/L). Era anche presente una frequente extrasistolia ventricolare isolata, in triplette ed "in run" di tachicardia ventricolare non sostenuta (massimo 8 battiti), per cui è stato progressivamente titolato il betabloccante fino a dosaggio massimale. L'andamento incrementale della cTnI e la presenza dell'extrasistolia ventricolare hanno reso necessario un nuovo trasferimento presso la Cardiocirurgia AOUC per accertamenti diagnostici.

Viene dunque eseguita una coronarografia, che conferma un quadro indenne da lesioni critiche. All'ecocardiogramma di controllo post-procedurale: ventricolo sinistro ipertrofico con setto post-chirurgico e funzione sistolica globale conservata (FE 55%), senza versamento pericardico; invariati i restanti reperti.

Durante la permanenza in Cardiocirurgia AOUC, la concentrazione della cTnI misurata con Advia Centaur cTnI Ultra è stata persistentemente <0,02 µg/L.

A causa della segnalazione alla telemetria di una turba della conduzione (una onda P non condotta, seguita da un'extrasistole atriale bloccata e successiva ripresa di ritmo sinusale con frequenza normale) è stato ridotto il betabloccante.

Il paziente è stato nuovamente trasferito presso la Riabilitazione Cardiologica IFCA, dove la prima misura di cTnI è risultata 0,82 µg/L (con Access AccuTnI+3).

Le misure di cTnI eseguite nelle due sedi (AOUC e IFCA) con i due metodi sono riportate in Tabella 1.

Il paziente ha successivamente concluso con beneficio il percorso riabilitativo.

DISCUSSIONE

Il paziente accede al DEA in data 30 agosto e la cTnI viene eseguita presso il Laboratorio Analisi dello stesso Ospedale con metodica Access AccuTnI+3 Beckman e, come descritto in precedenza, il risultato è lievemente aumentato (0,27 µg/L).

Per eseguire l'intervento chirurgico il paziente viene

Tabella 1

Risultati di cTnI ottenuti con i due metodi (Access AccuTnI+3, Beckman e Advia Centaur cTnI Ultra, Siemens)

Access AccuTnI+3	cTnI, µg/L	Advia Centaur cTnI Ultra	cTnI, µg/L
OSMA, ingresso	0,27		
		AOUC, post-intervento	7,88
		AOUC, dimissione	0,4
IFCA, ingresso	0,25		
IFCA, monitoraggio	0,24		
IFCA, monitoraggio	0,32		
IFCA, monitoraggio	0,43		
IFCA, dopo dolore toracico	0,63		
		AOUC, post angiografia	<0,02
		AOUC, post angiografia	<0,02
IFCA, ingresso post angiografia	0,82		
IFCA, monitoraggio	0,94		

OSMA, Ospedale S.Maria Annunziata, pronto soccorso; AOUC, Azienda Ospedaliera di Careggi, Cardiocirurgia; IFCA, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza.

poi trasferito, presso la UO Cardiocirurgica di AOUC dove la cTnI è eseguita dal Laboratorio dello stesso Ospedale con metodica ADVIA Centaur cTnI Ultra Siemens.

Al trasferimento presso la UO Riabilitazione Cardiologica IFCA il paziente nuovamente è controllato per la cTnI con metodica Access AccuTnI+3 Beckman e come detto mostra valori incrementali della stessa: 0,25 - 0,24 - 0,32 - 0,43 - 0,63 µg/L.

Durante il percorso di cura e riabilitazione, quindi il paziente è stato monitorato con due metodi diversi di cTnI: il metodo Access AccuTnI+3 (Beckman Coulter) ed il metodo Advia Centaur cTnI Ultra (Siemens Healthcare) (Tabella 1). Questi metodi utilizzano anticorpi monoclonali differenti, specifici per ciascuna metodica, diretti verso la cTnI. A seguito dell'esame coronarografico, che ha mostrato coronarie indenni da lesioni critiche, dal Laboratorio IFCA viene posto il sospetto di una interferenza sul metodo Access AccuTnI+3. Pertanto, è stata chiesta una consulenza sul caso al Laboratorio Specialistico di Pisa dove sono state inviate due provette di siero del paziente prelevate in contemporanea e il cui risultato con Access AccuTnI+3 era 0,63 µg/L.

Dall'indagine successiva presso questo stesso laboratorio, è emerso una misura della troponina cardiac T (cTnT) di 20,58 ng/L [con apparecchio Roche Cobas e411, v.r. <14; (99° percentile popolazione sana)]; la hs-cTnI è invece risultata di 6,3, 4,7 e 5,91 ng/L [misurata rispettivamente con AbbottARCHITECT i1000 v.r. <26,2 (99° percentile popolazione sana) e con Beckman Coulter Dxl 800 v.r. <17,5 (99° percentile popolazione sana) e Siemens ADVIA Centaur XPT v.r. <47,34 (99° percentile popolazione sana)]. È importante segnalare che i risultati sopra riportati sono espressi in unità di misura differenti rispetto alla cTnI Access AccuTnI+3, (ng/L *versus* µg/L) a causa delle diverse procedure analitiche utilizzate presso il Laboratorio di Pisa. Sono queste infatti metodiche definite "ad elevata sensibilità".

Per chiarire la causa delle discrepanze, tramite la

sede italiana di Beckman Coulter sono stati inviati due campioni del paziente (S1 e S2) (con cTnI 0,94 µg/L determinata con Access AccuTnI+3) al centro francese Beckman Coulter di Marsiglia. Presso questo laboratorio, i campioni processati nativi con metodica Access AccuTnI+3 hanno fornito il risultato di 0,54 e 0,64 µg/L, del tutto analoghi ai risultati ottenuti nel laboratorio IFCA.

L'approfondimento successivo è consistito nell'aggiunta ai campioni di proteine in grado di bloccare l'attività di eventuali anticorpi interferenti. Il primo passo è stata l'aggiunta di PolyMak 33 e HBR-1, denominato pool1 (miscele di anticorpi verso derivati animali) che hanno ridotto il segnale fornito dai due campioni ottenendo un risultato pari a 0,34 µg/L, con una diminuzione del 37,4% e del 46,1% rispettivamente del valore ottenuto sui campioni nativi. Aggiungendo poi AP muteina (un bloccante correlato alla fosfatasi alcalina), i valori del segnale sono ulteriormente diminuiti: 0,02 e 0,01 µg/L, determinando quindi una riduzione del 97% e del 99% (Tabella 2).

È stato così possibile indentificare, nei campioni del paziente, la presenza di una doppia interferenza da anticorpi eterofili e contro la fosfatasi alcalina, visto che i bloccanti utilizzati nelle prove hanno modificato significativamente il valore ottenuto (in presenza di interferenti è attesa infatti una differenza percentuale superiore a ±25%). È stato perciò raccomandato dalla Casa Produttrice di registrare questa informazione nell'anamnesi del paziente così da poter interpretare in modo migliore i risultati futuri alla luce dei rischi potenziali. Sebbene l'incidenza di tali interferenze sia bassa, in letteratura è stata ben descritta (1). La presenza di interferenti nei metodi immunometrici è difatti ben nota e si configura come un "errore" di laboratorio (2).

Interessante da notare è l'aumento incrementale di cTnI misurata con metodo Access AccuTnI+3 Beckman che pone l'intrigante sospetto diagnostico di aver evidenziato in questo caso clinico una insorgenza

Tabella 2

Risultati delle prove con bloccanti anticorpi interferenti

Descrizione	Risultato (µg/L)	differenza %
S1 nativo	0,54	-
S1 + pool 1	0,34	-37,4
S1 + AP Muteina	0,02	-97
S2 nativo	0,64	-
S2 + pool 1	0,34	-46,1
S2 + AP Muteina	0,01	-99

S1 e S2 campioni nativi del paziente con valore di cTnI 0,94 µg/L determinato con Access AccuTnI+3 Beckman; pool 1, miscela bloccante gli anticorpi eterofili (PolyMak 33 + HBR-1); AP Muteina, miscela bloccante correlata alla fosfatasi alcalina.

recente di anticorpi eterofili e anti-fosfatasi alcalina rilevati in circolo in aumento. I risultati iniziali positivi ottenuti con Advia Centaur cTnI Ultra Siemens infatti, sono riferibili a prelievi post-intervento chirurgico in cui l'incremento della troponina è atteso. Il valore lievemente superiore all'intervallo di riferimento per la TnT Roche è compatibile con la storia clinica per la presenza di scompenso cardiaco nel paziente.

Il paziente è stato dimesso dalla Riabilitazione Cardiologica IFCA sottolineando il fatto che la cTnI misurata in Cardiocirurgia AOUC con metodo Siemens, sia pre- che post-coronarografia, risultavano negative, mentre le determinazioni ottenute in IFCA con metodica Access AccuTnI+3 Beckman la mattina stessa del trasferimento in AOUC (pre-coronarografia) ed il giorno del rientro in IFCA (quindi post-coronarografia) erano alterate, (rispettivamente 0,63 µg/L e 0,82 µg/L) e alla dimissione cTnI di 0,94 µg/L. Il paziente viene informato che nel suo sangue sono presenti anticorpi che possono interferire con i saggi immunometrici di laboratorio e gli viene consegnato il referto emesso dalla casa produttrice contenente il valore misurato con Access AccuTnI+3 in modo che egli lo possa conservare e mostrare al proprio medico curante e ad ogni altro eventuale accesso in ospedale.

Il caso riportato evidenzia egregiamente come la presenza di anticorpi nel sangue del paziente possa interferire con i metodi di laboratorio (3-4) nei quali l'interazione fra un anticorpo ed un antigene è alla base del metodo stesso. Questa problematica è ben nota fin dalla disponibilità dei metodi stessi, ma insidiosa, imprevedibile ed in grado di dare interferenza in tutti i saggi immunometrici non solo nei saggi per la misura delle troponine cardiache (5-7).

Non c'è dubbio che il nodo cruciale di questo problema sia la stretta collaborazione fra clinica e laboratorio. Solo i dubbi del clinico in presenza di un risultato inatteso che non correla con la clinica del paziente (2-6) possono fare nascere l'esigenza della ricerca di una possibile fonte di interferenza nel campione (8).

In questo caso, l'interferenza da due anticorpi diversi (eterofili e anti-fosfatasi alcalina) associata ad un decorso clinico con alterazioni del ritmo, episodio di dolore toracico ed extrasistolia ventricolare resistente al trattamento farmacologico, hanno reso più complicata l'interpretazione dei dati ottenuti e reso necessario un approfondimento diagnostico con coronarografia.

È da rilevare l'importanza della segnalazione al paziente di quanto accaduto e del reperto riscontrato, nell'ottica della gestione più appropriata del rischio clinico. In caso di futuro accesso in ospedale il paziente può così segnalare ai clinici la presenza in circolo di anticorpi potenzialmente interferenti in alcuni immunodosaggi, in modo che i risultati degli esami, quando discordanti con la situazione clinica del paziente, possano essere interpretati con cautela alla luce di questo dato.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Laboratorio della Fondazione CNR Regione Toscana, G. Monasterio di Pisa e la Azienda Beckman Coulter Italia Srl (Cassina de' Pecchi, Milano) e il Laboratorio Beckman Coulter di Marsiglia per la collaborazione.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tate J, Ward G. Interferences in Immunoassays. Clin Biochem Rev 2004; 25:105-20.
2. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, et al. Errors in laboratory medicine. Clin Chem 2002;48:691-8.
3. Levinson SS, Millera JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. Clin Chim Acta.2002;325:1-15.
4. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interference in immunological assays. Clin Chem 1999;45:942-56.
5. Selby C. Interference in immunoassay. Ann Clin Biochem 1999;36:704-21.
6. Ismail AAA, Walker PL, Cawood ML, et al. Interference in immunoassay is an underestimated problem. Ann Clin Biochem 2002;39:366-73.
7. Bolstad N, Warren DJ, Nustad K. Heterophilic antibody interference in immunometric assays. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2013;27:647-61.
8. 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.

STAT PROFILE
Prime+[®]

L'evoluzione tecnologica nel Critical Care Testing

Fino a 22 Analiti, compresi
importanti test:

iMg

BUN

Creat

Tecnologia Nova MicroSensor
Card™ senza Manutenzione

CQ liquido automatico
e preciso

Protezione Clot Block™

Menù:

pH, PCO_2 , PO_2 , Na, K, Cl, iCa,
iMg, Glu, Lac, Urea (BUN),
Creat, Hct, TCO_2 , $SO_2\%$, O_2Hb ,
COHb, MetHb, HHb, tBil,
tHb, HbF



nova[®]
biomedical
novabio.us.it

Nova Biomedical Italia S.r.l.
Via Como 19 - 20020 Lainate (MI)
Tel. +39 02 87070041
it-info@novabio.com





BIOMEDIA

La condivisione del sapere

“ Da oltre vent'anni al servizio della comunità scientifica ”



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

Biomedica progetta, organizza e coordina eventi formativi ECM medico-scientifici residenziali e a distanza. È partner di numerose Società Scientifiche, editore in ambito sanitario, ed è attiva nell'ambito della comunicazione digitale, realizzando servizi sviluppati e gestiti *in house*.