La determinazione della troponina T con il metodo ad alta sensibilità migliora la sensibilità di rilevazione della cardiomiopatia nell'amiloidosi AL*

Gabriele Sarais[1], Alessandra Barassi[2], Giovanni Palladini[1], Ruggero Capra[2], Andrea Foli[1], Paola Russo[1], Riccardo Albertini[3], Letizia Zenone Bragotti[1], Laura Obici[1], Remigio Moratti[3], Gian Vico Melzi D'Eril[2], Giampaolo Merlini[1]

[1]Laboratori Sperimentali di Ricerca di Biotecnologie, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Dipartimento di Biochimica, Università di Pavia

[2]Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Ospedale San Paolo e Università di Milano

[3]Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Dipartimento di Biochimica, Università di Pavia

ABSTRACT

Determination of troponin T with high-sensitivity assay improves the sensitivity for detection of cardiac involvement in AL amyloidosis. In AL amyloidosis cardiac involvement dictates prognosis. It has been demonstrated that cardiac dysfunction is best assessed by measuring serum concentrations of N-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and cardiac troponins. Recently, a new generation of more sensitive assays for troponin measurement has been developed, aiming at identifying minimal cardiac damage. We report the impact of the introduction of a highly sensitive cardiac troponin T (hs-cTnT) assay (Roche Diagnostics) on the detection of cardiac involvement in 109 consecutive newly diagnosed patients with AL amyloidosis. The hs-cTnT was determined on the Modular E system. Cardiac troponin I (cTnI) (Siemens TnI-Ultra™) and NT-proBNP (Roche Diagnostics) were also measured. Sixty nine (63%) patients had cardiac involvement at presentation, as detected by echocardiography. The diagnostic sensitivity of the biomarkers to detect cardiac involvement at diagnosis was 74% for cTnI, 96% for hs-cTnT, and 100% for NT-proBNP, respectively. In additional 15 patients, echographic evidence of amyloid heart involvement developed during 6 months following diagnosis: cTnI was elevated at presentation in 5 cases (33%), hs-cTnT in 12 (80%, P=0,01 versus cTnI) and NT-proBNP in 11 cases (73%). We conclude that hs-cTnT may improve the sensitivity for detection of cardiac damage caused by AL amyloidosis.

INTRODUZIONE

L'amiloidosi AL è causata dalla modificazione conformazionale, aggregazione e deposizione tissutale di catene leggere monoclonali solitamente prodotte da un clone plasmacellulare midollare (1, 2). Questo processo causa un danno funzionale degli organi coinvolti, che ha esito fatale, se non viene bloccato da una terapia efficace (2). Il cuore è coinvolto in circa due terzi dei pazienti con amiloidosi AL, la cui prognosi dipende principalmente dalla gravità del danno cardiaco. Infatti, la maggior parte dei pazienti muore per cause cardiache (3). L'entità della disfunzione cardiaca può essere valutata misurando la concentrazione nel siero del frammento amminoterminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) e delle troponine cardiache: la combinazione di questi marcatori consente un'accurata stratificazione prognostica dei pazienti con amiloidosi AL (4-7).

Recentemente è stata sviluppata una nuova generazione di metodi di misurazione delle troponine cardiache I e T, caratterizzati da elevata sensibilità e migliore imprecisione a basse concentrazioni, con lo scopo di identificare un danno cardiaco anche di minima entità (8-10). L'innalzamento della sensibilità analitica ottenuto con questi metodi si traduce in una più alta sensibilità diagnostica per il danno cardiaco e ne consente una rilevazione più precoce (8-10). D'altro canto, questo è vero anche in presenza di malattie cardiache non ischemiche (11). Se da una parte, ciò può dare origine ad una più bassa specificità per la diagnosi di infarto acuto del miocardio, dall'altra ne ha suggerito la potenziale utilità clinica in altre malattie con coinvolgimento cardiaco per una più precoce individuazione dello stesso (11, 12). In questo studio abbiamo valutato la sensibilità diagnostica della determinazione della troponina T cardiaca con un metodo a più elevata sensibilità (hs-cTnT) nell'individuazione del coinvolgimento cardiaco nei pazienti con amiloidosi AL.

MATERIALI E METODI

Casistica

Sono stati inclusi nello studio 109 pazienti con diagnosi istologica di amiloidosi AL non trattati in preceden-

**Questo lavoro è stato in parte presentato al 41° Congresso Nazionale SIBioC, 27-30 ottobre 2009, Napoli, sotto forma di poster (Biochim Clin 2009;33:455), ricevendo, nella persona del suo primo autore (G. Sarais), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.*

za, afferiti tra il 2004 e il 2008 al Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia. Tutti i pazienti hanno dato il proprio consenso informato scritto al trattamento di dati clinici a scopo di ricerca, secondo le linee guida del Comitato di Bioetica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo. L'età mediana era 65 anni (38-84 anni) e 70 (64%) erano maschi. I depositi di amiloide sono stati caratterizzati come AL mediante analisi immunoistochimica in microscopia elettronica ed eventuali forme ereditarie sono state escluse con l'analisi del DNA. In tutti i pazienti sono state quantificate le catene leggere libere circolanti e la componente monoclonale amiloidogenica è stata individuata nel siero e/o nelle urine con elettroforesi con immunofissazione ad alta risoluzione (13). L'eventuale interessamento cardiaco era definito come uno spessore medio della parete ventricolare sinistra >12 mm in assenza di altre cause, in accordo con i criteri della Società Internazionale della Amiloidosi (14).

Metodi

La hs-cTnT è stata determinata su uno strumento Roche Modular E, utilizzando un kit precommerciale della Roche Diagnostics. Le prestazioni analitiche di questo metodo sono state recentemente descritte (15). Il NT-proBNP è stato misurato con un metodo immunologico in elettrochemiluminescenza (ECLIA) (Roche Diagnostics). Il limite superiore di riferimento utilizzato era, rispettivamente, 88 ng/L (maschi) e 153 ng/L (femmine) nei soggetti di età <50 anni, e 227 ng/L (maschi) e 334 ng/L (femmine) nei soggetti di età ≥50 anni. La troponina I cardiaca (cTnI) è stata misurata con un metodo in chemiluminescenza (TnI-Ultra™, Advia Centaur CP, Siemens Diagnostics). Le specifiche analitiche del metodo fornite dal produttore indicano un limite superiore di riferimento (come 99° percentile della distribuzione) pari a 40 ng/L e un'imprecisione pari ad un CV del 10% a 30 ng/L di cTnI. La validazione clinica di questo metodo è stata recentemente descritta da Apple et al. (16). Nel nostro studio, una concentrazione di cTnI >40 ng/L è stata considerata indice di lesione miocardica.

Sia il NT-proBNP che la cTnI sono stati misurati su campioni di siero freschi raccolti nel giorno di arruolamento dei pazienti. La determinazione della hs-cTnT era eseguita su sieri congelati, conservati a – 80 °C, raccolti al momento della diagnosi.

Analisi statistica

Le differenze nelle variabili quantitative tra sottogruppi sono state analizzate per la significatività statistica mediante U-test non parametrico di Mann-Whitney. Il test di Fisher o il test del χ^2 sono stati usati per confrontare variabili categoriche. Le curve di sopravvivenza sono state disegnate secondo il metodo Kaplan-Meier e le differenze di sopravvivenza sono state analizzate per la significatività statistica con il test log-rank.

RISULTATI

Il limite superiore di riferimento, definito ad una concentrazione corrispondente al 99° percentile della distribuzione dei valori di hs-cTnT nel siero di 546 volontari apparentemente sani, era 14 ng/L (95% intervallo di confidenza (CI): 12-25 ng/L). Tale limite era utilizzato per definire la positività all'esame.

In 69 pazienti con amiloidosi AL (63%) erano soddisfatti i criteri ecocardiografici di interessamento cardiaco al momento della diagnosi. 15 ulteriori soggetti (14%) raggiungevano uno spessore medio della parete del ventricolo sinistro >12 mm (condizione necessaria per porre diagnosi di coinvolgimento cardiaco) in sei mesi dalla diagnosi. Degli altri compartimenti tissutali, il rene era coinvolto in 81 pazienti (74%), il fegato in 16 (15%), il sistema nervoso periferico e autonomo rispettivamente in 28 (26%) e 24 (22%) pazienti. Il numero mediano di organi coinvolti era due (intervallo: 1-4).

La concentrazione dei tre marcatori cardiaci valutati era significativamente più alta nei pazienti con interessamento cardiaco alla diagnosi (Tabella 1). In questi, la cTnI era superiore al limite superiore di riferimento in 51 pazienti (74%), la hs-cTnT in 66 pazienti (96%) ed il NT-proBNP in tutti i 69 pazienti (100%). Nei 15 pazienti che hanno sviluppato segni ecocardiografici di amiloidosi cardiaca sei mesi dopo la diagnosi, la cTnI era già elevata al momento della diagnosi in 5 casi (33%), la hs-cTnT in 12 casi (80%, P=0,01 in confronto alla cTnI) e il NT-proBNP in 11 casi (73%).

Nel successivo "follow-up" [tempo mediano di "follow-up" 38 mesi (intervallo: 14-67 mesi)], 37 pazienti (34%) sono deceduti. Un'elevata concentrazione di ciascun biomarcatore valutato alla diagnosi di amiloidosi è risultata associata ad una prognosi peggiore. In particolare, la sopravvivenza a tre anni è risultata significativamente inferiore nei pazienti con hs-cTnT >14 ng/L (58% vs. 84% nei pazienti con hs-cTnT ≤14 ng/L, P=0,01) e cTnI >40 ng/L (52% vs. 75% nei pazienti con cTnI ≤40 ng/L, P=0,007) (Figura 1).

Tabella 1

Concentrazione (mediana ed intervallo) di troponina T cardiaca, misurata con metodo ad elevata sensibilità (hs-cTnT), troponina I cardiaca (cTnI) e frammento amminoterminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) nel siero di 109 pazienti con amiloidosi AL in rapporto alla presenza di interessamento cardiaco all'esame ecocardiografico

Marcatore	Pazienti con coinvolgimento cardiaco	Pazienti senza coinvolgimento cardiaco	P
	n = 69	n = 40	
hs-cTnT, ng/L	55 (3-267)	13 (3-222)	<0,0001
cTnI, ng/L	60 (<5-85)	20 (<5-40)	<0,0001
NT-proBNP, ng/L	2888 (396-24350)	187 (59-814)	<0,0001

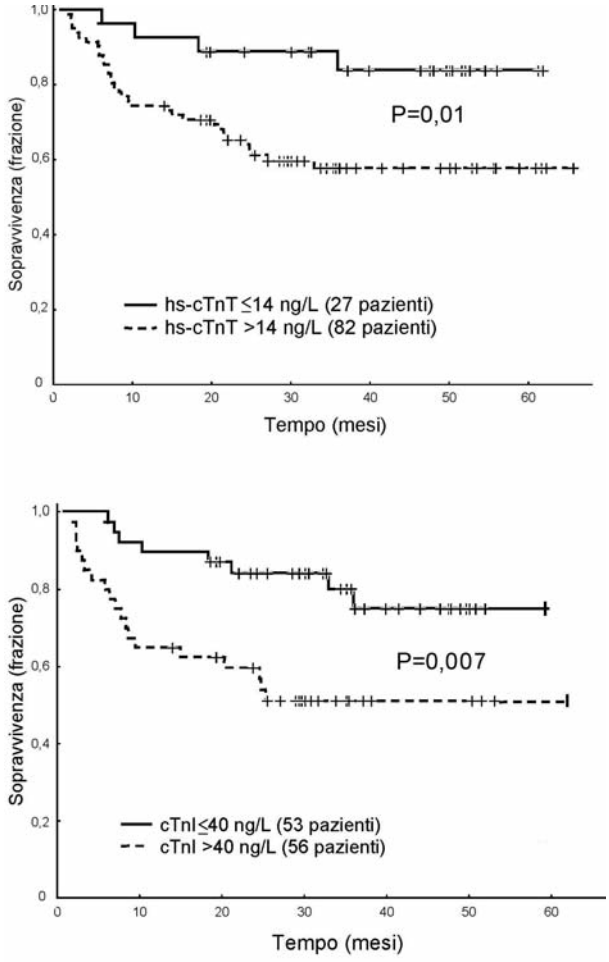


Figura 1
Curve di sopravvivenza nei pazienti con amiloidosi AL studiati in funzione delle concentrazioni di troponina T cardiaca, misurata con metodo ad elevata sensibilità (hs-cTnT), e troponina I cardiaca (cTnI), ottenute al momento della diagnosi.

DISCUSSIONE

Nell'amiloidosi AL il riconoscimento precoce del coinvolgimento cardiaco è di fondamentale importanza clinica, non soltanto perché la disfunzione cardiaca è il principale fattore che influenza la prognosi, ma anche perché la presenza di amiloidosi cardiaca condiziona le scelte terapeutiche, impedendo l'accesso dei pazienti con più grave disfunzione d'organo alle terapie più aggressive (2, 17). Sono ora infatti disponibili diversi approcci terapeutici efficaci, rivolti contro il clone plasmacellulare che produce la catena leggera amiloidogenica, che possono arrestare la progressione del danno d'organo e permetterne il recupero funzionale, quando il danno è ancora reversibile, rendendo possibile un significativo prolungamento della sopravvivenza in circa un terzo dei pazienti (17, 18). Per questi motivi è necessario disporre di metodi in grado di identificare in modo accurato e precoce la presenza di danno cardiaco da amiloidosi, allo scopo di avviare alle terapie più efficaci i soggetti che lo necessitino e, nello stesso tempo, poter escludere dai trattamenti più aggressivi i pazienti con una disfunzione cardiaca tale da rendere inaccettabile la tossicità legata al trattamento.

Fino ad ora, l'individuazione dell'interessamento cardiaco nei pazienti con amiloidosi si è basata sul rilievo ecografico delle pareti ventricolari ispessite per la presenza dei depositi (14). Tuttavia, è da tempo stata segnalata la sensibilità non ottimale di questo approccio (6). I nostri dati indicano che solo circa 80% dei soggetti con cardiomiopatia amiloidotica presenta parametri ecocardiografici patognomonici. In questo studio, abbiamo dimostrato che la hs-cTnT potrebbe dimostrarsi un marcatore promettente di coinvolgimento cardiaco nell'amiloidosi AL. I tre marcatori cardiaci testati (NT-proBNP, cTnI e hs-cTnT) hanno tutti mostrato una buona sensibilità nell'individuazione del coinvolgimento cardiaco da amiloidosi. Nostri lavori precedenti (6, 7) e i dati attuali dimostrano che i marcatori considerati sono fattori prognostici molto potenti. La determinazione della hs-cTnT, quando confrontata con uno dei metodi di misurazione della cTnI attualmente disponibili in commercio, mostrava un significativo aumento della sensibilità diagnostica. Inoltre, la hs-cTnT sembrava in grado di individuare nel 80% dei pazienti con amiloidosi AL il coinvolgimento cardiaco, anche quando questo non era ancora individuabile con i criteri ecocardiografici convenzionali. La capacità di individuare la presenza di un interessamento cardiaco ancora non evidente all'ecocardiografia consentirebbe di indirizzare più precocemente la strategia terapeutica verso approcci più aggressivi con l'obiettivo di prevenire l'insorgere dell'insufficienza cardiaca. Questa possibilità insieme allo studio della rilevanza prognostica della hs-cTnT e del suo valore come indicatore di risposta alla terapia è oggetto di ulteriori studi che sono in corso presso il nostro Centro.

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato in parte supportato dal Ministero della Salute (Ricerca Finalizzata IRCCS).

BIBLIOGRAFIA

1. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. N Engl J Med 2003;349:583-96.
2. Merlini G, Stone M. Dangerous small B-cell clones. Blood 2006;108:2520-30.
3. Obici L, Perfetti V, Palladini G, et al. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. Biochim Biophys Acta 2005;1753:11-22.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, et al. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL amyloidosis. Blood 2006;107:3854-8.
8. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. N Engl J Med 2009;361:858-67.
9. Keller T, Zeller T, Peetz D, et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. N Engl J Med 2009;361:868-77.
10. Giannitsis E, Becker M, Kurz K, et al. High-sensitivity cardiac troponin T for early prediction of evolving non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients with suspected acute coronary syndrome and negative troponin results on admission. Clin Chem 2010:56:642-50.
11. Rosenbaum LS, Jannuzzi JL. Moving troponin testing into the 21st century: will greater sensitivity be met by greater sensibility? Cardiovasc Hematol Disord - Drug Targets 2008;8:118-26.
12. Jaffe A, Apple F. High-sensitivity cardiac troponin: Hype, help, and reality. Clin Chem 2010;56:342-4.
13. Palladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. Clin Chem 2009;55:499-504.
14. Gertz M, Comenzo R, Falk R, et al. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): A consensus opinion from the 10th international symposium on amyloid and amyloidosis, Tours, France, 18-22 April 2004. Am J Hematol 2005;79:319-28.
15. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, et al. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. Clin Chem 2010;56:254-61.
16. Apple FS, Smith SW, Pearce LA, et al. Use of the TnI-Ultra assay for detection of myocardial infarction and adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndromes. Clin Chem 2008;54:723-8.
17. Palladini G, Merlini G. Current treatment of AL amyloidosis. Haematologica 2009;94:1044-8.
18. Merlini G, Palladini G. Amyloidosis: is a cure possible? Ann Oncol 2008;19(suppl 4):iv63-6.