

## Indagine conoscitiva sull'utilizzo dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo

Franca Pagani<sup>1</sup>, Graziella Bonetti<sup>1</sup>, Martino Cristoferi<sup>2</sup>, Arialdo Vernocchi<sup>3</sup>, Marina Vitillo<sup>4</sup>, Cecilia Zuppi<sup>5</sup>, Martina Zaninotto<sup>6</sup>, Mauro Panteghini<sup>7</sup> per il Gruppo di Studio SIBioC Marcatori Biochimici di Rimodellamento Osseo

<sup>1</sup>Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia

<sup>2</sup>Azienda U.S.L. della Valle d'Aosta, Aosta

<sup>3</sup>Ospedale di Treviglio

<sup>4</sup>Azienda Complesso Ospedaliero San Filippo Neri, Roma

<sup>5</sup>Policlinico Gemelli, Università Cattolica, Roma

<sup>6</sup>Azienda Ospedaliera, Padova

<sup>7</sup>Università degli Studi, Milano

### ABSTRACT

**National survey on measurement of markers of bone remodelling.** Bone biomarkers can be determined in serum and urine to evaluate the formation and resorption phases of bone remodelling. The SIBioC Working Group on Biochemical markers of bone turnover has performed a survey to investigate the utilization of bone markers among Italian laboratories. A questionnaire has been distributed concerning analytical and preanalytical aspects and clinical utilization. The need for a national EQAS was also investigated. A total of 67 laboratories responded, 37 of which (55%) routinely performed the biomarker measurements. Most of these laboratories (78%) determined both formation and resorption markers to study bone remodelling. Immunometric assays were used by the majority of laboratories. Reference intervals were heterogeneous, due to the variety of analytical assays. The types of urine samples for resorption marker determination were also heterogeneous: first morning, 2 h and 24 h samples were used in different laboratories. Bone marker determinations were prescribed in most cases by general practitioners (85%), but also by specialists (e.g. endocrinologists). Interest for a national EQAS was expressed by 81% of participants. From the collected data it is evident that only a minority of laboratories measure bone markers. An educational activity to promote bone marker determination and to standardize reference intervals and the type of biological specimen for determination is needed.

### INTRODUZIONE

I marcatori biochimici di rimodellamento osseo (MBRO) possono essere determinati nel siero o nell'urina quali indicatori dei processi di formazione e di riassorbimento osseo (1). I più tradizionali tra essi (fosfatasi alcalina totale sierica e idrossiprolina urinaria) sono stati per anni utilizzati nella valutazione del rimodellamento osseo nelle varie patologie dello scheletro. Tuttavia, le loro basse specificità e sensibilità cliniche hanno più recentemente portato allo sviluppo di metodologie per la determinazione di nuove molecole (Tabella 1). Questi "nuovi" marcatori biochimici possono essere impiegati per valutare disordini generalizzati del rimodellamento osseo, quali l'osteoporosi, sia primitiva che secondaria (2), alterazioni localizzate dello scheletro, quali il morbo di Paget (3), le metastasi ossee (4), patologie endocrine (5, 6), monitorare pazienti sottoposti a terapie che possono avere come effetto collaterale un coinvolgimento del metabolismo osseo (7) e valutare soggetti con malassorbimento (8). Essi presentano dei vantaggi clinici, rappresentati da maggiori sensibilità e specificità per le patologie ossee, anche se non sono esenti da alcune limitazio-

ni dovute alla loro generalmente elevata variabilità biologica ed alle problematiche analitiche derivanti dalla mancanza di standardizzazione, che ne limitano la diffusione nei laboratori clinici (9-11).

Al fine di valutare il reale utilizzo dei MBRO, di conoscere quali sono prevalentemente utilizzati, con quali modalità di esecuzione ed impiego clinico, il Gruppo di Studio "Marcatori Biochimici di Rimodellamento Osseo" della SIBioC ha effettuato un'indagine conoscitiva tra i laboratori nazionali.

### MATERIALI E METODI

Un questionario è stato inviato nel mese di febbraio 2006 a tutti gli iscritti alla SIBioC attraverso la segreteria della società. Nel questionario erano richieste le modalità di esecuzione dei MBRO. In particolare, si richiedevano informazioni su: 1) quali MBRO fossero eventualmente utilizzati per lo studio del rimodellamento osseo; 2) l'eventuale esecuzione in associazione di un marcatore di formazione ed un marcatore di riassorbimento; 3) il metodo utilizzato per la determinazione; 4) gli intervalli di riferimento utilizzati; 5) il tipo di campione biologico su cui

**Tabella 1**

*Indicatori biochimici di rimodellamento osseo recentemente proposti per l'impiego clinico*

*Marcatori di formazione*

- Fosfatasi alcalina ossea (Bone ALP)
- Osteocalcina (OC)
- Propeptide C-terminale del procollagene I (PICP)
- Propeptide N-terminale del procollagene I (PINP)

*Marcatori di riassorbimento*

- Piridinoline (PYD)/Desossipiridinoline (DPD) (Crosslinks)
- Fosfatasi acida tartrato-resistente (TRACP)
- Telopeptide N-terminale del collagene I (NTX-I)
- Telopeptide C-terminale del collagene I (CTX-I)
- Telopeptide C-terminale del collagene I (CTX-MMP)

**Tabella 2**

*Quadro riassuntivo dei metodi utilizzati nei laboratori partecipanti all'indagine conoscitiva*

Metodo/Strumento	No. laboratori
<i>Osteocalcina:</i>	29
Chemiluminometrico/Liaison	8 (28%)
Chemiluminometrico/Immulate	7 (24%)
IRMA/RIA	4 (14%)
Electrochemiluminometrico/Elecsys-Modular	4 (14%)
EIA/ELISA	4 (14%)
Chemiluminometrico/Non specificato	1 (3%)
<i>Fosfatasi alcalina ossea:</i>	27
EIA	13 (48%)
IRMA	7 (26%)
Chemiluminometrico/Access	4 (15%)
Elettroforetico	3 (11%)
Non specificato	1 (4%)
<i>Crosslink del piridinio:</i>	17
Chemiluminometrico/Immulate	9 (53%)
HPLC	4 (24%)
ELISA manuale	2 (12%)
Chemiluminometrico/ACS:180	1 (6%)
Chemiluminometrico/Non specificato	1 (6%)
<i>Telopeptide C-terminale del collagene I (CTX-I):</i>	12
ELISA manuale	6 (50%)
Electrochemiluminometrico /Elecsys-Modular	6 (50%)
<i>Telopeptide N-terminale del collagene I (NTX-I):</i>	6
EIA/ELISA	6 (100%)

veniva effettuata la determinazione; 6) il numero delle determinazioni effettuate per unità di tempo; 7) quali specialisti inviassero le richieste; 8) l'interesse a partecipare ad una specifica VEQ.

## RISULTATI

Al questionario hanno risposto 67 laboratori da tutto il territorio nazionale, 66% dal Nord, 22% dal Centro e 12% dal Sud e Isole. 37 (55%) di questi laboratori già utilizzano i MBRO nella pratica quotidiana, mentre in 4 laboratori dovrebbero essere introdotti entro breve tempo. Il marcatore maggiormente impiegato è l'osteocalcina (OC) (78% dei laboratori), seguita dalla fosfatasi alcalina ossea (BALP) (73%), i crosslink del piridinio (CL) (46%), il telopeptide C-terminale del collagene di tipo I (CTX-I) (32%), il telopeptide N-terminale del collagene di tipo I (NTX-I) (16%) e la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRACP) (8%). Un solo laboratorio impiega ancora indagini ritenute ormai obsolete, come l'idrossiprolinuria. Per quanto riguarda la modalità d'impiego, si evidenzia come nel 78% dei laboratori sia disponibile un'associazione di uno o più marcatori di formazione con uno o più marcatori di riassorbimento osseo.

La Tabella 2 mostra le metodologie utilizzate per la determinazione dei MBRO. Largamente impiegati sono i metodi immunometrici, soprattutto quelli automatizzati, seguiti da altre metodologie più indaginose, quali HPLC, impiegata nel 24% dei laboratori che determinano i CL, e l'elettroforesi, usata nel 11% dei laboratori per la determinazione della BALP.

Gli intervalli di riferimento impiegati per i marcatori di osteoformazione BALP e OC non sono parametrizzati nel 52% e 66% dei laboratori, rispettivamente, mentre lo sono in base al sesso nel 19% e 28% e in base al sesso e presenza o meno di menopausa nel 19% (solo per BALP). Per i marcatori di riassorbimento osseo, gli intervalli di riferimento non sono parametrizzati per CL, CTX-I e NTX-I nel 47%, 25% e 33% dei laboratori, rispettivamente, mentre lo sono in base al sesso nel 47%, 17% e 33% ed in base al sesso e presenza o meno di menopausa nel 33% e 17% (per CTX-I e NTX-I). Un solo laboratorio, tra quelli che hanno risposto al questionario, riporta specifici intervalli di riferimento per la popolazione pediatrica.

Per quanto concerne la scelta del campione biologico, non considerando i marcatori di osteoformazione che possono essere determinati solo su siero o plasma, per i marcatori di riassorbimento osseo emerge come per CTX-I tutti i laboratori che lo determinano dichiarino di impiegare siero ed un laboratorio dichiara di impiegare sia siero che urina, per NTX-I la maggioranza dei laboratori (83%) impiega urina, mentre per CL il solo campione biologico utilizzato è l'urina. Va inoltre sottolineato come per quanto riguarda il tipo di campione di urina utilizzato esista una totale mancanza di uniformità, andando dal campione della prima o seconda minzione del mattino al campione delle 24 ore, fino ad associazioni di campioni a diversa temporalizzazione.

Metà dei laboratori che determinano MBRO esegue circa 50 determinazioni mensili per ciascun marcatore. Il resto esegue numeri inferiori. Le richieste provengono nel 85% dei casi da medici di medicina generale, quindi da endocrinologi (63%), ortopedici (48%), ginecologi (45%), nefrologi/urologi (25%), gastroenterologi (18%), oncologi/radioterapisti (10%) e reumatologi (8%).

Infine, un interesse alla partecipazione ad una specifica VEQ è stato espresso dal 81% dei laboratori che hanno risposto all'indagine.

## DISCUSSIONE

L'attenzione dimostrata nella compilazione delle risposte al questionario ha evidenziato un notevole interesse per l'argomento, anche se il numero di questionari pervenuto ed elaborato non può essere considerato del tutto rappresentativo della situazione dei laboratori nazionali. Tuttavia, l'evidenza è che la determinazione dei MBRO non è ancora molto diffusa.

Rilevante è il dato che la quasi totalità dei laboratori determini in associazione sia marcatori di formazione che marcatori di riassorbimento, convalidando la necessità di studiare il metabolismo osseo nel suo complesso. Nella maggioranza dei casi sono determinati due marcatori di formazione e due o più di riassorbimento, con la possibilità di approfondire l'eventuale relazione, non ancora del tutto chiarita, tra differenti marcatori di una stessa fase del rimodellamento. Dati recentemente ottenuti in pazienti con morbo celiaco indicano, per esempio, la possibilità che i vari marcatori biochimici, seppur nel loro complesso indicativi di alterazioni del rimodellamento, riflettano aspetti fisiopatologici diversi nell'ambito del metabolismo osseo (12).

La maggior praticabilità analitica spiega il più largo impiego dei metodi immunoassistiti per la determinazione della BALP. Questi metodi rappresentano, infatti, una più praticabile alternativa alla separazione elettroforetica delle forme molecolari della fosfatasi alcalina, metodica dotata di maggior specificità ma più indaginosa (13). Tuttavia, data la parziale crossreattività degli anticorpi anti-BALP utilizzati nei metodi immunochimici verso l'isofor- ma epatica dell'enzima, non può essere esclusa la possibilità che sieri di pazienti con marcati incrementi di fosfatasi epatica possano mostrare falsi aumenti della BALP, fatto che può significativamente limitare il valore diagnostico dell'esame (14, 15).

L'OC, piccola proteina formata da 49 amminoacidi, è presente in circolo sia come molecola intatta che come frammenti di degradazione di varie dimensioni. Circa un terzo delle concentrazioni plasmatiche è rappresentato dalla molecola intatta, un terzo da un grande frammento N-terminale (a.a. 1-43) ed il terzo restante da frammenti di più piccole dimensioni. E' noto, inoltre, che la proteina va incontro a processi di degradazione e frammentazione anche in vitro. I metodi disponibili in commercio per la determinazione della OC sono molto eterogenei. Si tratta in generale di metodi immunoassistiti, che utilizzano anticorpi policlonali o monoclonali con diversa specificità ed affinità per i vari frammenti o per la molecola intatta e calibratori costituiti da OC estratta da osso di origine umana o bovina (16, 17). Dalle risposte al questionario emerge che nella maggior parte dei laboratori sono utilizzati metodi immunoassistiti che determinano sia la molecola intatta che il frammento 1-43; in un numero minore di casi sono impiegati metodi i cui anticorpi riconoscono solo la molecola intatta.

L'eterogeneità dei metodi utilizzati porta inevitabilmente ad una diversità dei risultati forniti dai laboratori ed alla conseguente impossibilità di comparare i dati ottenuti nello stesso paziente con metodi diversi.

Piridinoline e desossipiridinoline, due tipi di crosslink del collagene di tipo I, possono essere determinati contemporaneamente mediante HPLC. I campioni di urina impiegati sono sottoposti ad idrolisi acida prima della separazione cromatografica per liberare i crosslink dai peptidi cui sono legati ed ottenere così la determinazione dei CL totali. Solo il 24% dei laboratori utilizza tale metodo che risulta, se non automatizzato, relativamente indaginoso e di difficile applicazione. Questa è probabilmente la ragione per la quale la maggioranza dei laboratori utilizza metodi immunoassistiti automatizzati che sono dotati di maggior praticabilità analitica. Bisogna in ogni caso ricordare che questi metodi sono solitamente impiegati su campioni non sottoposti ad alcun pretrattamento, limitandosi a determinare le concentrazioni urinarie di desossipiridinolina libera, permettendo tuttavia di ottenere informazioni generalmente equivalenti ai metodi in HPLC.

Gli intervalli di riferimento rilevati sono molto eterogenei, ovvia conseguenza dell'utilizzo di metodi analitici diversi. E' da notare, tuttavia, come per lo stesso marcatore, in alcuni casi gli intervalli siano unici, mentre in altri siano parametrizzati per sesso ed in altri ancora siano differenziati in base alla presenza o meno di menopausa. Anche per quanto riguarda la tipologia del campione di urina utilizzato per la determinazione dei marcatori di riassorbimento, l'atteggiamento non è uniforme. La presenza di un significativo ritmo circadiano nell'escrezione urinaria dei marcatori di riassorbimento impone una particolare attenzione alla scelta del tipo di campione su cui eseguire le determinazioni (per es. urina del primo mattino, urina delle 2 ore, urina delle 24 ore) e, conseguentemente, sulla possibile diversità degli intervalli di riferimento da adottare in base al campione utilizzato (18, 19). Il rischio è, infatti, che l'impiego degli stessi intervalli di riferimento per determinazioni effettuate su campioni raccolti con diverse modalità porti ad interpretazioni erronee, per una non comparabilità dei risultati ottenuti. Una raccomandazione su quale campione preferire può essere derivata dai dati di variabilità biologica che suggeriscono di orientarsi, a parità di caratteristiche fisiopatologiche, verso l'impiego del campione biologico che associa migliore praticità e più bassa variazione individuale, in questo caso rappresentato dal campione del primo mattino (20).

Dai dati raccolti, i medici di medicina generale sono quelli che più frequentemente richiedono i MBRO. Essendo eterogenea la popolazione da questi valutata risulta difficile fare ipotesi sulle patologie indagate con questi marcatori. La problematica legata all'osteoporosi potrebbe spiegare, almeno in parte, le richieste da parte di endocrinologi, ginecologi e gastroenterologi (osteopenia da malassorbimento). L'interesse da parte degli oncologi deriva dalla necessità di stimare un eventuale interessamento osseo in corso di neoplasie, mentre emerge anche un interesse dei reumatologi in rapporto

al possibile coinvolgimento del tessuto osseo nelle patologie autoimmuni.

In conclusione, dalle risposte al questionario si deduce un certo grado d'interesse verso l'impiego dei MBRO. Sono, tuttavia, indubbiamente necessari ulteriori approfondimenti sia delle problematiche preanalitiche e analitiche che per meglio chiarire l'applicazione clinica. Teoricamente, i MBRO possono offrire significativi vantaggi nella pratica clinica, potendo essere ripetuti più volte nel tempo, con variazioni eventualmente rilevabili in tempi molto più brevi rispetto alle metodiche di "imaging". Tuttavia, per un loro corretto utilizzo vanno attentamente considerate tutte le possibili cause di variabilità dei risultati. Sarebbe indubbiamente necessario implementare strategie di standardizzazione, anche se risultati sotto questo aspetto non sono ottenibili in tempi brevi. Nel frattempo, l'effettuazione di programmi di VEQ dei metodi analitici e l'implementazione delle raccomandazioni riguardanti la nomenclatura dei MBRO (vedi Tabella 1) potrebbero rappresentare i primi passi concreti al fine di conoscere lo stato attuale della qualità di queste determinazioni ed evitare confusione nell'interpretazione dei dati riportati, rendendo univoca la refertazione da parte dei laboratori che eseguono queste indagini (21-23).

## BIBLIOGRAFIA

- Pagani F, Francucci CM, Moro L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest* 2005;28(suppl):8-13.
- Seibel JM. Biochemical markers of bone turnover. Part II: Clinical application in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 2006;27:123-38.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1999;14:66-9.
- Seibel MJ. Clinical use of markers of bone turnover in metastatic bone disease. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:504-17.
- Jordan Gimeno E, Munoz-Torres M, Escobar-Jimenez F, et al. Identification of metabolic bone disease in patient with endogenous hyperthyroidism: role of biological markers of bone turnover. *Calcif Tissue Int* 1997;61:370-6.
- Seibel MJ, Gartenberg F, Silverberg SJ, et al. Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992;74:481-6.
- Loddenkemper K, Bohl N, Perka C, et al. Correlation of different bone markers with bone density in patients with rheumatic diseases on glucocorticoid therapy. *Rheumatol Int* 2006;26:331-6.
- Kemppainen T, Kroger H, Janatuinen E, et al. Osteoporosis in adult patient with celiac disease. *Bone* 1999;24:249-55.
- Pagani F, Panteghini M. Variabilità biologica dei marcatori biochimici ossei: significato ed implicazioni pratiche. *Biochim Clin* 1998;22:573-5.
- Plebani M, Bernardi D, Meneghetti MF, et al. Biological variability in assessing the clinical value of biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2000;299:77-86.
- Bernardi D, Zaninotto M, Plebani M. Requirements for improving quality in measurement of bone markers. *Clin Chim Acta* 2004;346:79-86.
- Pagani F, Bonetti G, Lanzarotto F, et al. Utilità dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo in pazienti con morbo celiaco. *Biochim Clin* 2006;30:389.
- Panteghini M. Fosfatasi alcalina ossea: quale metodo? *Biochim Clin* 1998;22:562-6.
- Bonora R, Pagani F, Panteghini M. Valutazione di un test immunoassistito per la determinazione della fosfatasi alcalina ossea nel siero. *Biochim Clin* 1996;20:553-4.
- Panteghini M, Bais R, van Solinge WW. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2006:623-4.
- Banfi G. Problematiche di standardizzazione nella determinazione dell'osteocalcina. *Biochim Clin* 1998;22:567-8.
- Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000;37:432-46.
- Pagani F, Panteghini M. Valutazione della variazione circadiana dell'escrezione urinaria delle piridinoline derivate dal collagene di tipo I. *Biochim Clin* 1996;20:700-1.
- Zaninotto M, Bernardi D, Ujka F, et al. A proposal for standardizing urine collections for bone resorption markers measurement. *J Clin Lab Anal* 1998;12:145-9.
- Panteghini M, Pagani F. Biological variation in urinary excretion of pyridinium crosslinks: recommendations for the optimum specimen. *Ann Clin Biochem* 1996;33:36-42.
- Seibel MJ, Lang M, Geilenkeuser WJ. Interlaboratory variation of biochemical markers of bone turnover. *Clin Chem* 2001;47:1443-50.
- Vesper HW, Smith SJ, Audain C, et al. Comparison study of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline measurements in 13 US laboratories. *Clin Chem* 2001;47:2029-31.
- Delmas PD. Standardization of bone marker nomenclature. *Clin Chem* 2001;47:1497.