

CARDIOLOGIA CANINA

Determinazione del valore di troponina-I nel cane cardiopatico

Gli Autori valutano la concentrazione sierica di troponina-I in cani affetti da differenti patologie valvolari e/o miocardiche acquisite (insufficienza mitralica, tricuspide e miocardiopatia dilatativa). Lo scopo dello studio è quello di identificare eventuali correlazioni tra la troponina-I ed alcuni dati del segnalamento (età, sesso, peso), gli indici di volume tele-sistolico (ESVI - *end systolic volume index*) e tele-diastolico (EDVI - *end diastolic volume index*) del ventricolo sinistro, e la classe di insufficienza cardiaca (ISACHC). Infine si sono confrontati i valori totali di troponina-I nei gruppi delle cardiopatie considerate.

Riassunto

La nostra ricerca evidenzia come la cTnI non sia correlata con i dati del segnalamento (età, sesso, peso), ma con un aumento di ESVI (indicativo di deficit contrattile) ed EDVI (indice di sovraccarico volumetrico); la variabilità del livello enzimatico nelle classi ISACHC richiede un approfondimento di indagine; rispetto alle cardiopatie del cane considerate, il dosaggio della cTnI risulta interessante nel monitorare il follow-up delle patologie cardiache, in particolare delle miocardiopatie.

Marta Pittorru*
Chiara Locatelli*
Marco Di Marcello**
Vito Tranquillo***
Paola G. Brambilla*
Elisabetta Ferro*

*Sezione di Clinica Medica Veterinaria, Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Milano.

**Libero professionista, Centro Medico Veterinario Cellatica, Brescia.

***Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale della Lombardia - IZSLER (Brescia).

In medicina umana, i biomarkers di danno miocardico sono da tempo oggetto di notevole interesse per la diagnosi precoce di infarto miocardico acuto (IMA) [1, 4].

L'IMA, una delle affezioni più comuni nel mondo occidentale, è una sindrome clinica che deriva dall'occlusione improvvisa e prolungata di un ramo arterioso coronarico con conseguente necrosi ischemica delle cellule miocardiche correlate alla coronaria occlusa. Il riconoscimento precoce della presenza di un danno al miocardio è fondamentale per ridurre la mortalità nel paziente con sospetta sindrome da IMA. I markers biochimici di danno miocardico hanno quindi acquisito notevole importanza in senso diagnostico e prognostico nelle situazioni cliniche dubbie o decisamente complesse [4, 17]. In passato si dosavano prevalentemente molecole enzimatiche, isoenzimatiche e proteiche (aspartatoaminotransferasi - AST, creatinfosfochinasi - CK, lattato deidrogenasi - LDH e mioglobina - Mgb), tuttavia si è dimostrato che queste non sono sufficientemente cardio-sensibili e/o cardio-specifiche, come si era pensato inizialmente (finestra 1).

È stato quindi necessario ricercare nuove molecole ad "elevata efficacia diagnostica" ovvero molto precoci, sensibili e con

una specificità pressoché assoluta [4, 17, 19]. Le troponine cardiache T (cTnT) ed I (cTnI) hanno dimostrato di rispondere, almeno in gran parte, a questi requisiti [2]. Attualmente i biomarkers cardiaci vengono utilizzati non solo per riconoscere un IMA, ma anche per identificare i danni miocardici conseguenti a miocarditi, angioplastica, cardioconversione elettrica delle aritmie, interventi chirurgici, ecc. [11, 20].

Studi condotti nell'uomo, sia pure su un numero limitato di pazienti, affetto da insufficienza cardiaca congestizia di diversa origine, riportano come la troponina-I si elevi anche in corso di grave insufficienza cardiaca, in assenza di sindrome coronarica acuta, e come possa essere considerata un marker predittivo di una prognosi sfavorevole [14, 16]. Missov et al. teorizzano che il livello di cTnI in pazienti con insufficienza cardiaca (IC) rifletta il danno cellulare e la progressione spontanea dei processi degenerativi dell'apparato contrattile [17]. Tuttavia, nonostante il ruolo diagnostico e prognostico di tale enzima sia ben riconosciuto nell'IMA, il suo significato nella evoluzione e nella classificazione dei pazienti con IC non è stato ancora stabilito con certezza [14, 16]. In corso di IC da disfunzione sistolica del ventricolo sinistro è importante identifi- ➤



Descrizione delle molecole enzimatiche, proteiche e isoenzimatiche utilizzate in passato come biomarker di danno miocardico

a) AST (aspartato-amino-transferasi): il primo enzima ad essere utilizzato in laboratorio per la diagnosi di IMA nell'uomo; attualmente non è più considerato come marker cardiaco a causa della sua bassa cardio-specificità: è presente infatti anche in altre cellule dell'organismo ed è considerato un marcatore soprattutto delle patologie epatiche [18].

b) CK-MB (isoenzima MB della creatin-fosfochinasi): nell'uomo è uno dei marker dell'elezione dell'IMA. È il test più sensibile per escludere/confermare la diagnosi di IMA quando il paziente si presenta entro 24 ore dall'insorgenza dei sintomi. Tuttavia non è completamente specifico: viene infatti dosato in associazione alla cTnI [3].

c) LDH (lattato-deidrogenasi): è meno significativo da un punto di vi-

sta clinico perché è un marker tardivo: la conferma ed il monitoraggio del danno miocardico avvengono troppo in ritardo rispetto all'emergenza della situazione. Inoltre è poco cardio-specifico: si reperta anche a livello muscolare scheletrico, renale e gastrico [4].

d) Mgb (mioglobina): presenta le caratteristiche di un buon marker miocardico; nell'uomo un suo mancato rialzo nel sangue periferico assume un valore predittivo molto elevato: infatti, se i valori di Mgb rilevati dopo 4-6 ore dall'inizio dei sintomi sono normali, è possibile escludere l'IMA. Tuttavia, accanto ad una elevata cardio-sensibilità, ha una bassa specificità ed un suo aumento si reperta anche in pazienti con un danno muscolare acuto/cronico od insufficienza renale cronica [16, 19].

Finestra 1

care i pazienti ad alto rischio: è noto infatti che, accanto a soggetti che hanno dei significativi miglioramenti nella funzionalità del ventricolo sinistro a seguito di terapia medica, altri possono addirittura peggiorare e sviluppare una disfunzione ventricolare sinistra. Un marker che possa contribuire all'identificazione dei pazienti che tendono incrementare la funzionalità del ventricolo sinistro sarebbe di particolare aiuto nel management dell'IC [14].

Nell'IMA, quindi, un notevole aumento della concentrazione sierica di cTnI è considerato estremamente indicativo della presenza di un danno cellulare di tipo necrotico acuto. Nell'IC cronica, invece, la fisiopatologia che caratterizza un rialzo dell'enzima è diversa: esiste infatti una perdita progressiva di miocardiociti attraverso la necrosi e l'apoptosi cellulare. Piccoli aumenti (rispetto ad IMA) di cTnI possono quindi significare la presenza di limitate, ma irreversibili aree di necrosi. In conclusione, la troponina-I è in grado di predire in modo significativo un aumento della percentuale di mortalità in pazienti con IC di natura ischemica e non ischemica. In altre parole si potrebbe in futuro approfondire il legame tra il rialzo del titolo di cTnI e la presenza di un danno dei miocardiociti attribuendogli un valore di tipo prognostico [14]. Inol-

tre è importante ricordare che, sia la miocardiopatia dilatativa, sia la degenerazione valvolare non sono causa primaria di un danno cellulare miocardico. Glistudi riportati da Pelander et al. nel 2002 riferiscono come in cani affetti da miocardiopatia dilatativa (MCD) con elevati livelli di cTnI, all'esame autoptico erano evidenti aree infartuali ed ulcere miocardiche. Secondo gli stessi Autori, questi reperti sono assenti in pazienti affetti da MCD con valori di cTnI nella norma o borderline. Questo conferma il legame tra un rialzo del tasso sierico di cTnI e la presenza di una lesione dei miocardiociti. Tutto ciò è avvalorato dal riscontro di un titolo dell'enzima relativamente normale nei soggetti con MCD e degenerazione mitralica senza complicazioni di tipo aritmico [20].

Le cTnT ed I sono inoltre considerate un biomarker ideale per il riconoscimento precoce della cardiotoxicità indotta da doxorubicina. L'utilizzo di questo anti-neoplastico è infatti limitato dall'insorgenza di una cardiomiopatia dose-dipendente caratterizzata da vacuolizzazione dei miocardiociti e fibrosi a livello periarteriolare ed interstiziale. Il dosaggio delle troponine viene quindi richiesto per identificare i danni cardiaci indotti da questo farmaco al loro esordio, quando potrebbero non essere ancora evidenziabili con i sistemi tradizionali (ECG, ecocardiocolor Doppler) e sperimentali (biopsia cardiaca) [5, 13].

In medicina veterinaria il dosaggio della cTnI è attualmente in fase sperimentale nel cavallo; per quanto riguarda il cane in bibliografia sono già disponibili i parametri di normalità [21]. Sempre a proposito di questa specie, è interessante ricordare che, nonostante non sia presente una sintomatologia infartuale paragonabile a quella dell'uomo, all'esame anatomico-patologico è abbastanza comune repertare aree infartuali di piccole dimensioni [23].

● Complesso troponinico

Le troponine sono un complesso di proteine miofibrillari che regolano l'attività contrattile della muscolatura scheletrica e cardiaca, intervenendo nell'interazione tra actina e miosina. Esistono tre forme di troponine C, T ed I, ma solo la cTnT e la cTnI sono state identificate come cardiosensibili e specifiche [9].

La cTnT è il punto di ancoraggio delle subunità del complesso troponinico all'inter-

Cardio-sensibilità e specificità della cTnT (troponina-T cardiaca)

cTnT

- ▶ Elevata cardio-sensibilità
- ▶ Elevata cardio-specificità ?

Danni tissutali extra-cardiaci

Finestra 2

Cardio-sensibilità e specificità della cTnI (troponina-I cardiaca)

cTnI

- ▶ 100% cardio-sensibilità
- ▶ 100% cardio-specificità

Finestra 3

Andamento in circolo dei biomarker cardiaci espresso in ore (h) ed in giorni (gg)

Enzimi	Tempo di comparsa in circolo *	Picco Plasmatico	Normalizzazione
CK-MB	3-8 h	9-30 h	48-72 h
LDH	8-18 h	4-5 gg	8-15 gg
cTnT	3-4 h	24-48 h	6-14 gg
cTnI	4-8 h	16-48 h	9-12 gg
Mgb	1-5 h	4-12 h	24 h

CK-MB: isoenzima MB della creatinfosfochinasi; LDH: lattato deidrogenasi; cTnT: troponina-T cardiaca; cTnI: troponina-I cardiaca; Mgb: mioglobina.

* Rispetto all'insorgenza del tipico dolore toracico da IMA.

Tabella 1

no del filamento sottile della muscolatura striata nei vertebrati [6]. Questa forma è stata ampiamente studiata per valutare se possa essere sensibile e specifica per i danni miocardici. In effetti è stato visto che, accanto ad una elevata sensibilità per la necrosi cardiaca (elemento questo che la rende utile nella diagnosi di IMA), essa manca in specificità [2, 16] poiché è rilasciata anche in seguito a gravi danni tessutali extra-cardiaci [22]. Il problema della specificità è quindi importante in quanto se è alta, gli aumenti dei livelli enzimatici possono essere attribuiti ad un danno miocardico; al contrario se essa è bassa, occorre differenziare tra un problema muscolare scheletrico ed uno miocardico [2, 16] (finestre 2 e 3).

La cTnI è una proteina con PM di 22.500 D che inibisce l'acto-miosina ATPasi; è presente in tre isoforme codificate da geni diversi: la prima riguarda la muscolatura scheletrica a contrazione lenta; la seconda la muscolatura a contrazione rapida e la terza il muscolo cardiaco [7, 8]. A differenza della cTnT, la sua determinazione ha 97% di sensibilità e 95% di specificità per le patologie cardiache [10], anche in presenza di concomitanti lesioni muscolari scheletriche [8, 2, 1].

Nell'uomo, a seguito d'infarto acuto del miocardio, la cTnI è rilasciata in circolo

dopo 4-8 ore dall'insorgenza del tipico dolore toracico, raggiunge un picco a 12-16 ore e rimane elevata per 9-12 giorni dalla scomparsa della sintomatologia [15] (tabella 1).

● Scopo del lavoro

Allo scopo di poter evidenziare l'importanza diagnostica e prognostica della troponina-I nel cane cardiopatico abbiamo indagato le eventuali correlazioni tra le variazioni del titolo di troponina-I e alcuni dati del segnalamento (età, sesso, peso), gli indici di volume tele-sistolico (ESVI) e tele-diastolico (EDVI) del ventricolo sinistro, con le diverse classi di insufficienza cardiaca (ISACHC) ed, infine, con le patologie considerate.

● Materiale e metodi

1. Criteri di inclusione nello studio: scelta del campione

Nel nostro studio abbiamo arruolato 48 soggetti cardiopatici il cui segnalamento, classe ISACHC (*International Small Animal Cardiac Health Council*) di insufficienza cardiaca, e diagnosi sono riportati in tabella 2.

Gli animali sono stati inclusi nello studio



Il campione

N° Cane	Razza	Età (anni)	Sesso	Peso (Kg)	ISACHC	Diagnosi
1	Incrocio	16	M	8,5	II	Insuff. M+T
2	Incrocio Pastore Tedesco	9	M	46	II	MCD
3	Barboncino	22	FC	7,5	II	Insuff. M+T
4	Bassotto	15	FC	6,8	Ib	Insuff. M+T
5	Dogue de Bordeaux	6	FC	50	Ib	MCD
6	Incrocio	14	M	21	II	Insuff. M+T
7	Incrocio volpino	15	MC	8,8	IIIa	Insuff. M+T
8	Airedale Terrier	8	FC	28	Ia	Insuff. M
9	Incrocio	8	M	30	II	Insuff. M+T
10	Incrocio Pastore Tedesco	13	FC	30	II	Insuff. M
11	Yorkshire	14	M	4	Ib	Insuff. M
12	Yorkshire	11	FC	5	IIIa	Insuff. M+T
13	Bolognese	13	FC	7,5	Ib	Insuff. M
14	Dobermann	6	FC	31	II	MCD
15	Incrocio	8	M	9	II	Insuff. M
16	Cavalier King Charles Spaniel	10	F	10	Ib	Insuff. M+T
17	Schnauzer Gigante	8	M	50	IIIa	Insuff. M
18	Pastore Tedesco	10	M	40	IIIa	MCD
19	Incrocio	13	M	21	II	Insuff. M
20	Golden Retriever	13,6	M	34	Ib	Insuff. M
21	Boxer	10,6	MC	38	II	MCD
22	Incrocio	16	M	6,3	II	Insuff. M
23	Labrador	10	M	32	Ib	Insuff. M
24	Barboncino	11	M	6	II	Insuff. M
25	Barboncino	12	M	7	II	Insuff. M
26	Incrocio	11	M	18	Ib	Insuff. M
27	Incrocio	12	M	7	II	Insuff. M
28	Incrocio	11	M	5	II	Insuff. M
29	Dalmata	10	FC	24	Ia	Insuff. M + T
30	Barboncino	10	F	5	II	Insuff. M
31	Incrocio	10,6	M	6,5	II	Insuff. M + T
32	Incrocio	10	MC	22	Ia	Insuff. M
33	Yorkshire	12	M	6,5	Ib	Insuff. M
34	Fox Terrier	12	M	13	Ib	Insuff. M
35	Incrocio	14	M	11	II	Insuff. M
36	Incrocio	11	FC	6	II	Insuff. M
37	Incrocio	16	M	14	II	Insuff. M
38	Bassotto	8	FC	8	Ia	Insuff. M
39	Incrocio Bassotto	12	M	9	II	Insuff. M+T
40	Yorkshire	15	FC	6,8	II	Insuff. M+T
41	Barboncino	12	FC	8,3	IIIa	Insuff. M+T
42	Whippet	12	M	11	Ib	Insuff. M
43	Incrocio	10	FC	23	Ib	Insuff. M
44	Incrocio	9	FC	8,2	IIIa	Insuff. M+T
45	Barboncino	9	M	12	Ib	Insuff. M
46	Barboncino	12	F	5	II	Insuff. M
47	Incrocio	10	F	28	Ib	Insuff. M
48	Barboncino	12	MC	14	Ia	Insuff. M

Tabella 2

Insuff. M: insufficienza mitralica; Insuff. M+T: insufficienza mitralica + tricuspide; MCD: miocardiopatia dilatativa; ISACHC: *International Small Animal Cardiac Health Council*.

Indici volumetrici del ventricolo sinistro

► **ESVI (end systolic volume index):** è l'indice di volume tele-sistolico del ventricolo sinistro (VSx); è correlato alla contrattilità cardiaca ed al post-carico (ovvero la forza che si oppone alla contrazione durante la sistole). E' dato dal rapporto tra volume del VSx a fine sistole e superficie corporea.
Valore normale < 30-35 ml/m²

Se elevato è indicativo di una ridotta funzione sistolica del VSx

► **EDVI (end diastolic volume index):** è l'indice di volume tele-diastolico del ventricolo sinistro (VSx); è correlato con il pre-carico (ovvero la forza che dilata il miocardio a fine diastole), le proprietà diastoliche del cuore e la presenza di ipertrofia eccentrica. E' dato dal rapporto tra volume del VSx a fine diastole e superficie corporea.
Valore normale < 100 ml/m²

Se elevato è indicativo di sovraccarico di volume del VSx

Finestra 4

tra i pazienti pervenuti al reparto di cardiologia della sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Mi-

Suddivisione in gruppi secondo i valori di ESVI (end systolic volume index) ed EDVI (end diastolic volume index)

Gruppo	ESVI (VN ≤30-35 ml/m ²)	EDVI (VN ≤100 ml/m ²)	N° cani
1	≤ 30-35 ml/m ²	≤ 100 ml/m ²	14
2	≤ 30-35 ml/m ²	≥ 100 ml/m ²	11
3	≥ 30-35 ml/m ²	≥ 100 ml/m ²	23

N° CANI: indica il numero di pazienti arruolati in ciascuno dei 3 gruppi in esame.

Tabella 3

lano, nel periodo compreso tra marzo 2004 e gennaio 2005. La diagnosi cardiologica è stata ottenuta sulla base di una visita clinica, di un esame elettrocardiografico ed ecocardiocolor Doppler e, in taluni casi, radiografico. Le indagini diagnostiche strumentali sono state eseguite seguendo le linee guida riportate dalla letteratura internazionale, così come i parametri di normalità utilizzati per l'interpretazione dei referti [24, 12]. Sulla base dei valori di ESVI ed EDVI (finestra 4) abbiamo arruolato 14 soggetti con ESVI ed EDVI normali (Gruppo 1), 11 con solo EDVI aumentato (Gruppo 2) e 23 con ESVI ed EDVI aumentati (Gruppo 3) (tabella 3).

Le caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche, nonché il valore di cTnI di ciascun gruppo sono riportate nelle tabelle 4, 5 e 6.

Caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche dei cani appartenenti al Gruppo 1

N° cane	Razza	ECG: freq.	Aritmia	EPSS mm	FS %	ESVI ml/m ²	EDVI ml/m ²	ASx/Ao	cTnI ng/ml
1	Incrocio	120	No	1,6	59	11,49	100	1,99	0,00
3	Barboncino	120	No	1,9	41	21,53	81,29	1,97	0,00
8	Airedale Terrier	140	No	/	35	33,92	94,12	1,9	0,00
9	Incrocio	160	No	/	44	13,91	58,94	1,82	0,00
11	Yorkshire	110	No	/	32	28,03	74,8	1,7	0,30
15	Incrocio	120	No	/	51	16,82	98,79	1,84	0,05
20	Golden Retriever	100	No	/	32	33,17	82,64	1,13	0,05
29	Dalmata	110	No	/	25	31,81	64,04	1,54	0,03
31	Incrocio	120	No	/	43	14,82	61,19	1,96	0,01
32	Incrocio	130	No	/	35	34,34	98,07	1,51	0,01
34	Fox Terrier	130	No	/	35	24,97	72,73	1,35	0,22
35	Incrocio	/	/	/	38	22,78	75,29	1,37	0,01
38	Bassotto	180	No	/	41	16,5	64	1,38	0,02
48	Barboncino	180	TS	/	49	13,33	72,39	1,47	0,02

TS: tachicardia sinusale; EPSS: E-Point septal separation; FS: frazione di accorciamento; ESVI: end systolic volume index; EDVI: end diastolic volume index; ASx/Ao: rapporto atrio sinistro/radice aortica; cTnI: troponina-I cardiaca.

Tabella 4



Caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche dei pazienti del Gruppo 2

N° cane	Razza	ECG: freq.	Aritmia	EPSS mm	FS %	ESVI ml/m ²	EDVI ml/m ²	ASx/Ao	cTnl ng/ml
10	Incrocio Pastore Tedesco	80	No	/	45	27,14	111,68	2,17	0,12
22	Incrocio	100	No	5,5	52	18,72	120,87	1,76	0
24	Barboncino	170	No	/	46	31,52	201,29	2,24	0,05
25	Barboncino	110	No	/	46	31,24	146,32	2,24	0,09
27	Incrocio	140	BBD	/	48	28,82	143,41	2,24	0,09
30	Barboncino	160	No	/	44	30,90	131,75	1,76	0,04
39	Incrocio Bassotto	140	No	/	45	27,07	119,24	2,11	0,04
40	Yorkshire	140	No	/	41	27,41	103,92	2,32	0,02
42	Whippet	120	No	/	43	28,26	113,2	1,67	0,15
43	Incrocio	100	No	3,4	48	21,95	107,37	1,8	0,02
46	Barboncino	120	No	/	43	28,25	117,88	2,3	0,04

BBD: blocco di branca destro; EPSS: E-point septal separation; FS: frazione di accorciamento; ESVI: end systolic volume index; EDVI: end diastolic volume index; ASx/Ao: rapporto atrio sinistro/radice aortica; cTnl: concentrazione di Troponina-I cardiaca.

Tabella 5

Caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche dei pazienti del Gruppo 3

N° cane	Razza	ECG: freq.	Aritmia	EPSS mm	FS %	ESVI ml/m ²	EDVI ml/m ²	ASx/Ao	cTnl ng/ml
2	Incrocio Pastore Tedesco	180	FA	12,3	15	92,56	134,46	2,68	0,20
4	Bassotto	130	No	3,5	38	39,96	129,1	1,97	0,08
5	Dogue de Bordeaux	140	FA	6,2	31	68,32	159,36	1,62	0,09
6	Incrocio	170	No	10,2	30	82,3	189,82	3,14	0,11
7	Incrocio Volpino	180	No	/	47	54,6	247,95	3	0,07
12	Yorkshire	180	No	/	36	62,37	185,78	3,97	0,21
13	Bolognese	140	No	/	40	34,78	123,49	1,47	0
14	Dobermann	140	No	1,55	11	90,74	120,58	/	0,2
16	Cavalier King Charles Spaniel	130	No	/	41	37,85	136,84	1,92	0
17	Schnauzer Gigante	170	FA	12,4	20	94,5	156,2	2,01	0,05
18	Pastore Tedesco	230	TV	18,7	10	79,33	102,12	2,2	0,07
19	Incrocio	140	No	/	31	89,6	210,25	2,15	0,07
21	Boxer	160	CAP	/	19	77,3	127,44	2,14	0,23
23	Labrador Retriever	100	No	5,8	30	56,44	125,75	1,21	0,09
26	Incrocio	120	No	5,3	37	45,22	138,97	1,63	0
28	Incrocio	180	No	7,2	36	103,06	304,89	2,71	0,08
33	Yorkshire	150	No	/	44	41,19	168,49	2,61	0,16
36	Incrocio	/	No	/	36	87,78	250,32	2,84	0,12
37	Incrocio	180	TS	/	38	36,97	118,27	1,78	0,22
41	Barboncino	160	No	/	44	40,21	167,88	2,3	0,14
44	Incrocio	210	TS	/	51	37,84	216,56	2,9	0,1
45	Barboncino	100	No	4	33	40,99	107,49	1,41	0,06
47	Incrocio	110	No	/	36	40,58	116,41	1,5	0,02

EPSS: E-Point septal separation; FS: frazione di accorciamento; ESVI: end systolic volume index; EDVI: end diastolic volume index; ASx/Ao: rapporto atrio sinistro/radice aortica; FA: fibrillazione atriale; TV: tachicardia ventricolare; CAP: complessi atriali prematuri; TS: tachicardia sinusale.

Tabella 6

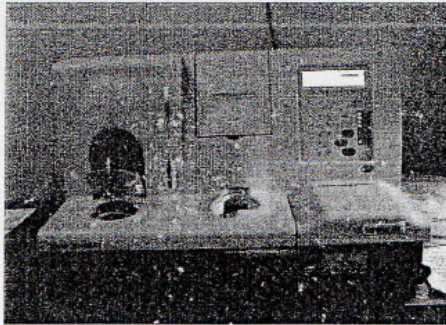


Foto 1. Stratus® CS STAT Fluorometric Analyzer (foto Dade Behring Incorporated, Newark, DE).

2. Protocollo operativo

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematico (2 ml di sangue trasferiti in Vacuette sterili) per il dosaggio della cTnI. Il substrato utilizzato è stato sieroso, ottenuto per centrifugazione a 4000 giri/minuto per 10 minuti, fresco o congelato (-20 °C). Le determinazioni sono state eseguite mediante Stratus® CS STAT Fluorometric Analyzer (Dade Behring Incorporated, Newark, DE) (foto 1).

I valori di riferimento utilizzati sono quelli riportati da Sleeper et al. (< 0,03-0,07 ng/ml) [21], confermati da noi su un campione di 20 cani sani che praticano abitualmente l'agility, in cui il valore di cTnI è risultato compreso tra 0 e 0,03 ng/ml [25].

3. Analisi statistica

La distribuzione della concentrazione di cTnI nel campione in esame è stata descritta mediante rappresentazione grafica (istogramma) e stima della densità secondo il metodo della Kernel-density. Le differenze di concentrazione dell'enzima tra i tre gruppi d'interesse clinico sono state analizzate mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis. In caso di confronti multipli, il valore soglia di significatività statistico è stato determinato secondo il test di Behrens-Fisher. L'associazione tra la concentrazione di cTnI e le variabili misurate su scala continua, quali età e peso, sono state studiate mediante test di correlazione non parametrica di Spearman. Tutte le analisi ed i grafici sono stati effettuati mediante le procedure del software R.

● Risultati e discussione

I soggetti cardiopatici reclutati nello studio avevano un'età compresa tra 6 e 22 anni (mediana 11,55); 25 (53%) erano ma-

schisti interi, 4 (8%) maschi castrati, 15 (31%) femmine sterilizzate e 4 (8%) femmine intere. Il peso variava da 4 a 50 kg (16.7 ± 12.9 kg).

Sul totale dei soggetti esaminati, il titolo della cTnI era compreso tra un minimo di 0.00 ng/ml ed un massimo di 0.30 ng/ml (0.078 ± 0.075 ng/ml).

Come si può osservare dal grafico (figura 1), la distribuzione dei valori di cTnI è risultata molto asimmetrica: il 50% dei pazienti da noi esaminati aveva valori inferiori o uguali a 0.05 ng/ml.

Il titolo di cTnI non è risultato correlato in alcun modo con le caratteristiche del segnalamento da noi considerate, quali l'età (Spearman $r = -0.04$, $p = 0.77$), il sesso (Kruskal-Wallis chi-squared = 3.8312, $df = 3$, $p\text{-value} = 0.2803$) ed il peso (Spearman $r = 0.08$, $p = 0.55$).

Il primo obiettivo che ci siamo posti è stato quello di verificare la concentrazione di troponina-I nei tre gruppi stabiliti sulla base dei valori di ESVI ed EDVI. Di seguito riportiamo i valori enzimatici riscontrati (figura 2):

- Gruppo 1: $n = 14$, media = 0.05 ng/ml (sd = 0.09 ng/ml);
- Gruppo 2: $n = 11$, media = 0.06 ng/ml (sd = 0.04 ng/ml);
- Gruppo 3: $n = 23$, media = 0.10 ng/ml (sd = 0.07 ng/ml).

Il test di Kruskal-Wallis indica che, tra i tre gruppi, le concentrazioni di cTnI sono significativamente differenti (Kruskal-Wallis chi-squared = 7.7186, $df = 2$, $p\text{-value} = 0.02108$).

In particolare, risulta che la concentrazione di cTnI dei cani appartenenti al Gruppo 3 è significativamente più elevata di

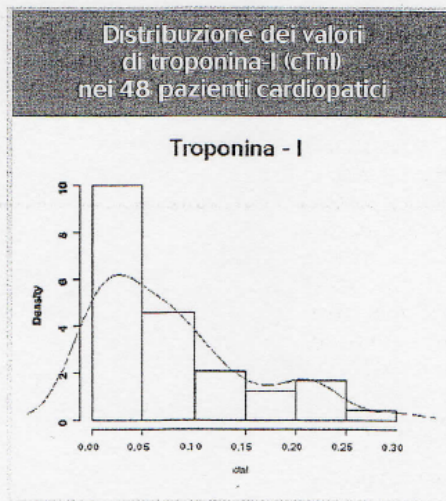
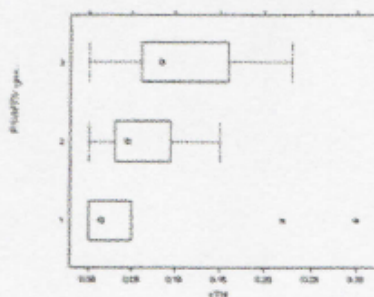


Figura 1

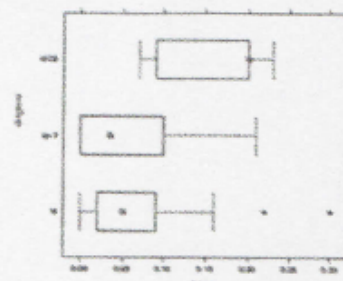
Distribuzione della concentrazione di troponina-I nei tre gruppi in esame



Gruppo 1: ESVI ed EDVI normali; Gruppo 2: solo EDVI aumentato; Gruppo 3: ESVI ed EDVI aumentati.

Figura 2

Distribuzione dei livelli di troponina-I (tropo) nelle tre patologie cardiache trattate dagli autori



MCD: miocardiopatia dilatativa; M+T: insufficienza mitralica e tricuspideale; M: insufficienza mitralica.

Figura 4

Distribuzione della concentrazione di troponina-I nelle diverse classi di insufficienza cardiaca (ISACHC)

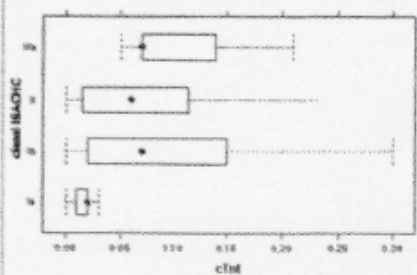


Figura 3

Distribuzione del valore di troponina-I (cTnI) nei pazienti affetti da aritmia (SI) rispetto a quelli euritmici (NO)

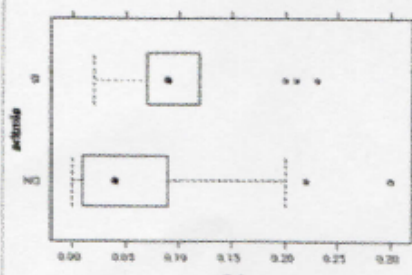


Figura 5

quanto osservato nei pazienti del Gruppo 1 (Behrens-Fisher test, $p=0.03$). A questo proposito è necessario ricordare che nel Gruppo 3 sono compresi anche 5 soggetti affetti da miocardiopatia dilatativa, di cui 4 risultati aritmici (2 con fibrillazione atriale, 1 con tachicardia ventricolare ed 1 con complessi atriali prematuri). Questo ci ha indotti ad introdurre nei nostri obiettivi una verifica preliminare sulla correlazione tra troponina-I ed evento aritmico.

Facendo riferimento alla classe di insufficienza cardiaca (ISACHC), il 10% del campione apparteneva alla classe Ia, il 29% alla Ib, il 49% alla classe II ed il 12% alla

classe IIIa (figura 3).

Dal test di Kruskal-Wallis tra livello di troponina-I e classe ISACHC è emerso che le differenze riscontrate non risultano statisticamente significative (Kruskal-Wallis chi-squared = 5.5972, $df = 3$, p -value = 0.1329). Come si può osservare dal grafico, nei pazienti di classe Ia la concentrazione di cTnI ha una bassa dispersione rispetto ad i cani delle altre classi, in cui, oltre ad un valore mediano più elevato, si evidenzia una forte variabilità del livello enzimatico. A nostro parere, quando si osserva nelle classi II e IIIa stimola ad un approfondimento di indagine: infatti, la classe di insufficienza cardiaca

in cui pensavamo di ottenere valori di cTnI più elevati (IIIa), in realtà ha dimostrato di essere quasi sovrapponibile non solo alla classe II, ma anche alla Ib. Si osserva, comunque, che nei cani di classe IIIa, il valore minimo di troponina-I era pari a 0,05 ng/ml a differenza dei pazienti delle altre classi in cui non era presente in circolo.

Se si suddivide il campione in base al tipo di patologia, il 59% dei soggetti era affetto da insufficienza mitralica, il 31% da insufficienza mitralica e tricuspide associate e il restante 10% da miocardiopatia dilatativa (MCD). Come si può osservare nella figura 4, i soggetti con MCD presentavano un valore mediano di cTnI più elevato rispetto a quello osservato nei pazienti valvulopatici; inoltre non si è rilevata una differenza significativa tra i pazienti affetti da insufficienza mitralica e quelli con insufficienza mitralica e tricuspide associate (Kruskal-Wallis chi-squared = 6.0234, df = 2, p-value = 0.04921).

In particolare la concentrazione di cTnI è risultata significativamente più elevata nei cani con MCD rispetto a quelli con insufficienza mitralica (Behrens-Fisher, p-value = 0.007519) ed insufficienza mitralica e tricuspide associate (Behrens-Fisher, p-value = 0.0105), mentre tra queste due entità diagnostiche non è stata evidenziata nessuna differenza significativa.

Il valore di cTnI relativamente più elevato nei pazienti affetti da miocardiopatia dilatativa potrebbe essere motivato da un danno cellulare secondario che caratterizza le patologie miocardiche, cui conseguirebbe la messa in circolo dell'enzima. Ciò supporta il valore del test in termini di specificità e sensibilità verso le affezioni a carico del miocardio.

Nel corso dello studio è emerso inoltre che, a prescindere dalle patologie cardiache sottostanti, i soggetti aritmici presentavano valori di troponina-I più elevati rispetto a quelli in ritmo sinusale. Abbiamo quindi verificato la significatività di questo rilievo. Dalla figura 5 si evidenzia che i 9 pazienti con aritmia (di cui 4 affetti da miocardiopatia dilatativa) presentavano valori di troponina-I significativamente più elevati rispetto agli euritmici. Un'analisi sulla correlazione tra la concentrazione di cTnI ed evento aritmico non era stata posta tra gli obiettivi di questo studio preliminare. In questa sede, pertanto, vista l'esiguità del numero di pazienti affetti da aritmia, riteniamo di poter avanzare solo delle ipotesi che

potrebbero servire da spunto per successivi approfondimenti.

Conclusioni

Lo studio realizzato è da considerarsi propeedeutico all'introduzione della troponina-I nella diagnostica cardiologia del cane ed in questo riteniamo abbia risposto alle nostre aspettative nel qualificare questo biomarker cardiaco di notevole interesse per future applicazioni nella clinica cardiologia di routine. Nel corso della ricerca inoltre si sono individuati alcuni elementi interessanti che ci inducono a proseguire nelle indagini (es: rapporto tra i biomarkers ed evento aritmico).

L'assenza di correlazioni significative tra il titolo di troponina-I e i dati del segnalamento considerati (età, sesso, peso) esclude il loro intervento nel modificare il titolo dell'enzima. A nostro parere ciò aumenta il valore diagnostico della cTnI in quanto più strettamente vincolato ad un danno miocardico.

Lo studio delle relazioni tra il valore di troponina-I ed i gruppi creati in base ai valori di ESVI ed EDVI, a nostro parere, enfatizza il significato del legame tra l'enzima ed il deficit di contrattilità così come il sovraccarico di volume. Le considerazioni relative al Gruppo 3 (ESVI ed EDVI aumentati), che comprende anche soggetti con gravi alterazioni del ritmo cardiaco, lasciano inoltre intravedere la possibilità che l'evento aritmico possa giocare un ruolo importante sull'andamento della concentrazione ematica del biomarker. La grande variabilità del livello di troponina-I nelle diverse classi di insufficienza cardiaca e l'assenza di significatività statistica non consentono di trarre delle conclusioni definitive su questo punto.

I risultati ottenuti correlando il valore di troponina-I con il tipo di patologia cardiaca lasciano aperte interessanti prospettive sullo studio del biomarker come elemento per il monitoraggio del follow-up delle affezioni cardiache, ma in particolare delle miocardiopatie, estendendo il suo utilizzo ad un settore più ampio rispetto a quello per il quale è stato introdotto in medicina umana (es: riconoscimento IMA).

Vogliamo infine concludere questo nostro studio preliminare sottolineando un aspetto che, secondo noi, merita di essere approfondito, cioè quanto emerso dall'analisi delle concentrazioni dell'enzima nei 9 soggetti aritmici (di cui 4 affetti da miocardiopatia dilatativa) per i quali, ad eccezione di un solo paziente, la troponina-I è

Ringraziamo
Si ringrazia la Dade Behring,
e in particolare il Dott. Di
Gemaro, per averci
concesso in uso gratuito
l'apparecchiatura Status® CS
STAT Fluorometric Analyzer,
con la quale abbiamo potuto
realizzare la nostra ricerca.

risultata aumentata. In tali pazienti non ci è stato possibile effettuare un esame anatomico-patologico, quindi non ci è dato di confermare la presenza/assenza di aree infartuali che, come proposto in bibliografia, giustificerebbero l'aumento della concentrazione di troponina-I. Quanto la gravità dell'evento aritmico, il suo persistere e la recidiva gravino sul coinvolgimento

delle cellule miocardiche e, quindi, sulla liberazione in circolo dell'enzima, è un punto a nostro parere interessante che sarà oggetto di nostri futuri approfondimenti. È chiaro che in quest'ottica sarà indispensabile rivisitare il protocollo dello studio considerando le caratteristiche dell'aritmia che, in questo lavoro preliminare, non abbiamo approfondito.

Bibliografia

1-Adams J.E, Sicard G.A., Allen B.T., Bridwell K.H., Lenke L.G., Davila-Roman V.G., Bodor G.S., Ladenson J.H., Jaffe A.S. Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin-I. *New England Journal of Medicine*. 1994; vol. 330, n. 10; pp. 670-674.

2-Adams J.E., Bodor G.S., Davila-Roman V.G., Delmez J.A., Apple F.S., Ladenson J.H., Jaffe A.S. Myocardial injury/infarction: Cardiac troponin-I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*. 1993; vol. 88, n. 1; pp. 101-106.

3-Aitiner S. La determinazione delle isoforme della CK-MB nel nuovo panorama biochimico. Relazioni del Convegno "vecchi e nuovi marcatori enzimatici di danno miocardico". *Biochimica Clinica*. 1999, n. 06.

4-Badano L., Cassin M., Solinas L., Burelli C., Macor F.A., Zanuttini D. Clinical impact of local implementation of agreed guidelines for the management of patient with acute myocardial infarction. *G Ital Cardiol*. 1999; vol. 29, n. 1; pp. 39-47.

5-Bertinchant J.P., Polge A., Juan J.M., Oliva-Lauraire M.C., Giuliani I., Marty-Double C., Burdy J.Y., Fabro-Peray P., Laprade M., Ball J.F., Granier C., de la Coussaye J.E., Dauzat M. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clinica Chimica Acta*. 2003; vol. 329; pp. 39-51.

6-Biesiadecki B., Elder B.D., Yu Z., Jin J. Cardiac troponin T variants produced by aberrant splicing of multiple exons in animals with high instances of dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2002; vol. 277, n. 52; pp. 50275-50285.

7-Bodor G.S., Porter S., Landt Y., Ladenson J.H. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clinical Chemistry*. 1992; vol. 38, n. 11; pp. 2203-2214.

8-Cummins B., Cummins P. Cardiac-specific troponin-I release in canine experimental myocardial infarction: development of a sensitive enzyme-linked immunobassay. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1987; vol. 19; pp. 999-1010.

9-DeFrancesco T.C., Atkins C.E., Keene B.W., Coats J.R., Hauck M.L. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin-T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med*. 2002; vol. 16; pp. 553-557.

10-Falahati A., Sharkey S.W., Christensen D., et al. Implementation of serum cardiac troponin-I as a marker for detection of acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1999; vol. 137; pp. 332-337.

11-Falk T., Jönsson L. Ischaemic heart disease in the dog, a review of 65 cases. *Journal of Small Animal Practice*. 2000; vol. 41; pp. 97-103.

12-Fox PS., Sisson SD., Moise NS. *Textbook of canine and feline cardiology. Principles and clinical practice*. II edition. WB Saunders Company. 1999.

13-Fredericks S., Merton G.K., Lerena M.J., Heiming P., Carter N.D., Holt D.W. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. *Clinica Chimica Acta*. 2001; vol. 304; pp. 65-74.

14-Horwich TB., Patel J., MacLellan R., Fonarow G.C. Cardiac troponin I associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation*. 2003; vol. 108; pp. 833-838.

15-Larue C., et al. Cardiac-specific immunoenzymometric assay of troponin I in the early phase of acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry*. 1993; vol. 39, n. 6; pp. 972-979.

16-Lucia P., Coppola A., Manetti L.L., Cerroni F., Sebastiani M.L., Colliardo A., Strappini P.M., De Martinis C. La troponina I nella cardiopatia ischemica acuta. *Ital Heart J Suppl*. 2000; vol. 1, n. 2; pp. 232-240.

17-Missov E., Calzolari C., Pau B. Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. *Circulation*. 1997; vol. 96; pp. 2953-2958.

18-Panteghini M., Cuccia C., Paganì F., Bonetti G. Gli "Enzimi cardiaci" nell'era delle troponine: cosa salvare. Relazioni del Convegno "Vecchi e nuovi marcatori enzimatici di danno miocardico". *Biochimica Clinica*. 1999, n. 6.

19-Panteghini M., Dolci A., Galvani M., Ottani F., Piebani M., Tubaro M., Zaninotto M. Marcatori biochimici di danno miocardico nelle sindromi coronariche acute. *Biochimica Clinica*. 1998; vol. 22; pp. 516-522.

20-Pelander L., Haggstrom J., Jones B. Troponin I - a possible marker of myocardial cell damage in the dog? *Svensk Veterinar Tidning*. 2001; vol. 53, n. 10; pp. 497-502.

21-Sleeper M.M., Clifford C.A., Laster L.L. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2001; vol. 15; pp. 501-503.

22-Soonsongwan J., Durongpisitkul K., Ratanarapee S., Leowattana W., Nana A., Laothaprasitporn D., Akanroj S., Limpimwong N., Kangkagate C. Cardiac troponin T: its role in the diagnosis of clinically suspected acute myocarditis and chronic dilated cardiomyopathy in children. *Pediatric Cardiology*. 2002; vol. 23, n. 5; pp. 531-535.

23-Spratt DP., Mellaby R.J., Drury N., Archer J. Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *Journal of small animal practice*. 2005; vol. 46; pp. 129-145.

24-Tilley LP. *Fondamenti di elettrocardiografia del cane e del gatto*. Gollardica Editrice, Parma 1982.

25-Valena E. Determinazione di alcuni parametri elettrocardiografici, ecocardiografici e del valore di troponina-I in cani che praticano agility dog. Tesi di specializzazione, Anno Accademico 2003-2004, Università degli Studi di Milano.