



Les macrotroponines

C. Le Goff

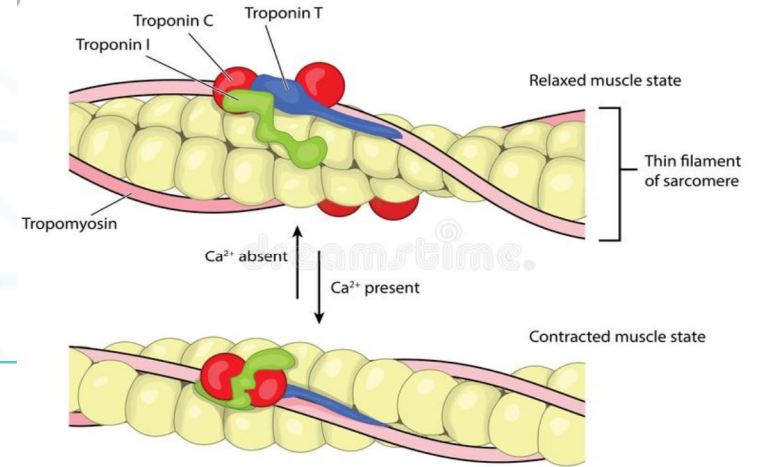
Department of Clinical Chemistry
University Hospital of Liège
Liège, Belgium



Email: c.legoff@chuliege.be



Les troponines



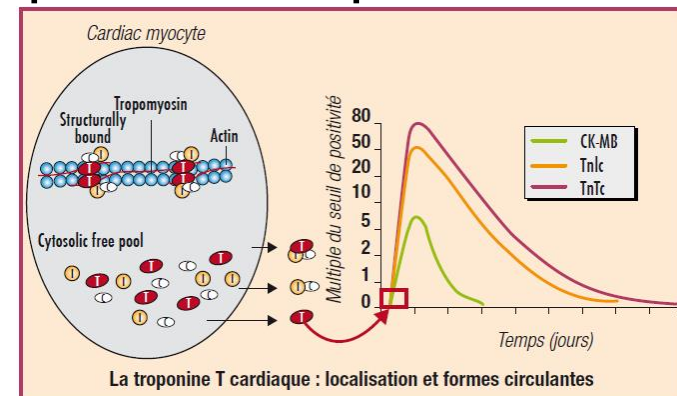
- ❖ Le complexe contient trois protéines régulatrices de la contraction
 - C (liaison au calcium)
 - T (liaison à la tropomyosine)
 - I (inhibitrice)
 - contrôlent les interactions médiées par le calcium entre l'actine et la myosine dans les muscles cardiaques et squelettiques.
- ❖ Diagnostic IAM
- ❖ Ultrasensible → meilleur tri

Les troponines



Différentes formes de troponines circulent

- Troponine libre
- Troponine complexée
 - Complexe binaire de troponine I- troponine C
(TnIc-TnC)
 - Complexe ternaire troponine T-troponine I- troponine C
(TnTc-TnIc-TnC)
- des formes oxydées ou réduites
- des formes phosphorylées ou non
- des formes dégradées



NB: TnIc-TnC est prépondérant dans le plasma des patients souffrants d

Les troponines

Les causes d



Table 1: Conditions associated with cTn elevations.

Cardiac causes

Myocardial infarction
Coronary revascularization procedure
Heart failure
Myocarditis
Cardiomyopathy
Takotsubo syndrome
Cardiac procedure other than revascularization
Catheter ablation
Defibrillator shocks
Cardiac contusion
Sustained tachyarrhythmia
Severe hypertension

General conditions affecting myocardium

Sepsis, infectious disease
Chronic kidney disease
Infiltrative diseases, e.g., amyloidosis, sarcoidosis
Chemotherapeutic agents
Critically ill patients
Strenuous exercise
Hypertrophy
Respiratory failure
Severe anaemia
Hypotension or shock
Stroke, subarachnoid haemorrhage
Pulmonary embolism, pulmonary hypertension

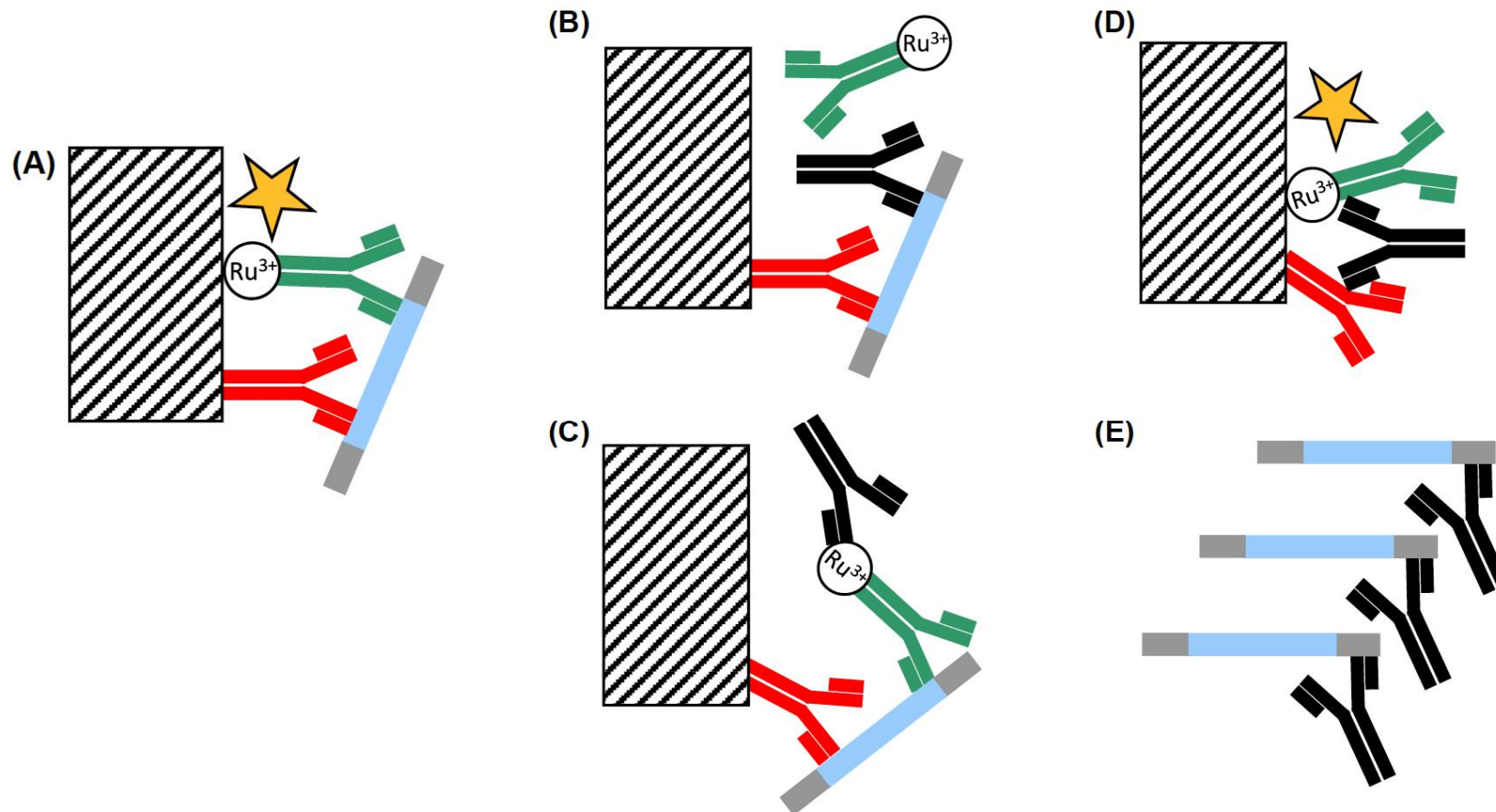
Modified from [1].

Ola Hammarsten*, Janet V. Warner, Leo Lam, Peter Kavsak, Bertil Lindahl, Kristin M. Aakre, Paul Collinson, Allan S. Jaffe, Amy K. Saenger, Richard Body, Nicholas L. Mills, Torbjørn Omland, Jordi Ordonez-Llanos and Fred S. Apple

Antibody-mediated interferences affecting cardiac troponin assays: recommendations from the IFCC Committee on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers

Les troponines

Les causes d



Une macromolécule

Une macromolécule

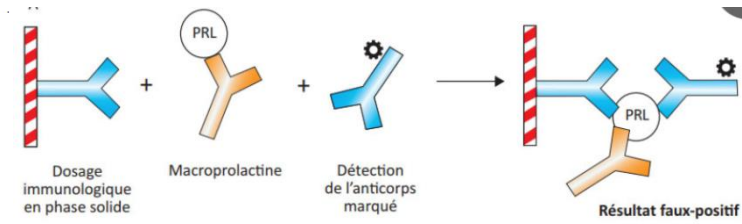
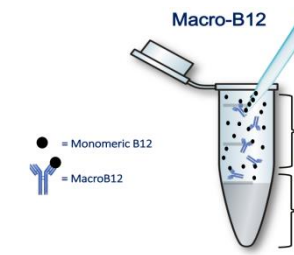
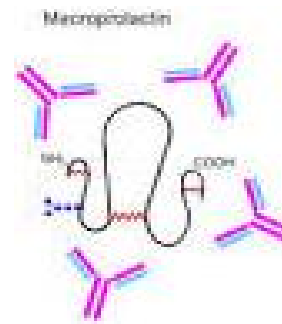
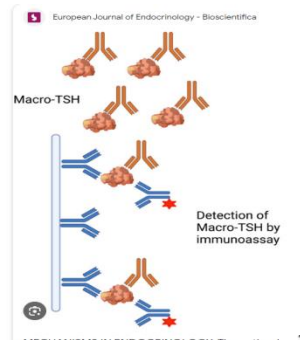
Définition



- Une macromolécule?
 - Entité chimique constituée par un très grand nombre d'eux par des liaisons covalents.
 - Poids moléculaires qui sont très $>$ à celui des molécules habituelles
 -

Les macromolécules connues

- Macro-PRL ou big-big PRL
- Macro-Vit B12
- Macro-TSH
- Macro-Insuline
-



Les macromédecines déjà décrites

Comment s'en débarrasser?



Une macrotroponine

Une macrotroponine

- o 2002: 1ère fois qu
- o Une macrotroponine = un assemblage d - anticorps anti-troponines cardiaques.
- o C (à des auto-anticorps) = haut PM! 150-220 kDa.
- o Pourquoi des concentrations hautes?
 - Vu le haut PM → élimination plus lente et t_{1/2} plus longue → accumulation.

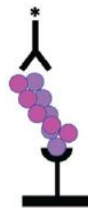


Figure 2 A: True positive troponin result



Figure 2 B: False positive troponin results due to macrotroponin

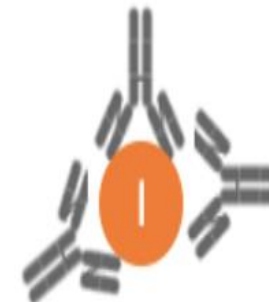
Les différents types de macrotroponines



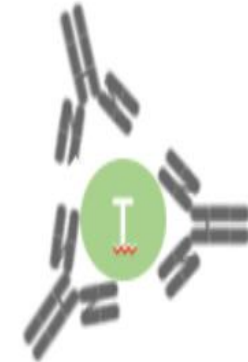
Macro-cTn-TIC



Macro-cTn-IC



Macro-cTn-I



Macro-cTn-T

Signification?



- o L -anticorps → signification clinique?
MAIS retrouvé aussi chez sujets en bonne santé
- o L -troponines =
auto-Ac endogènes de troponine Cardiaque (cTnAAB) et de
troponine cardiaque circulante (cTn).
- o 2-20% de la population (maladies cardiaques ou non)
 - Différent d
spécificité de l'épitope et de son affinité à se lier à la
troponine cardiaque

Importance clinique et diagnostique?



Mécanismes d ?

- Génétique
- Environnement
- Hormonal
- Immunologique
- Après un incident cardiaque

Fréquence?



> 5 % des résultats discordants mais
prévalence des auto-Ac : 10% (voire 2-3X
plus haut)
Troponine I > Troponine T
Ig G médiée

En clinique



Patient admis pour
douleurs thoraciques



Bio avec troponines



Troponines positives



Examens complémentaires

ECG

Echo

IRM



Interférences?

Les différentes interférences



HAMA?

FR?

Anticorps anti-hétérophiles?

Un médicament?

Une IR?

Conséquences de ces macrotroponines

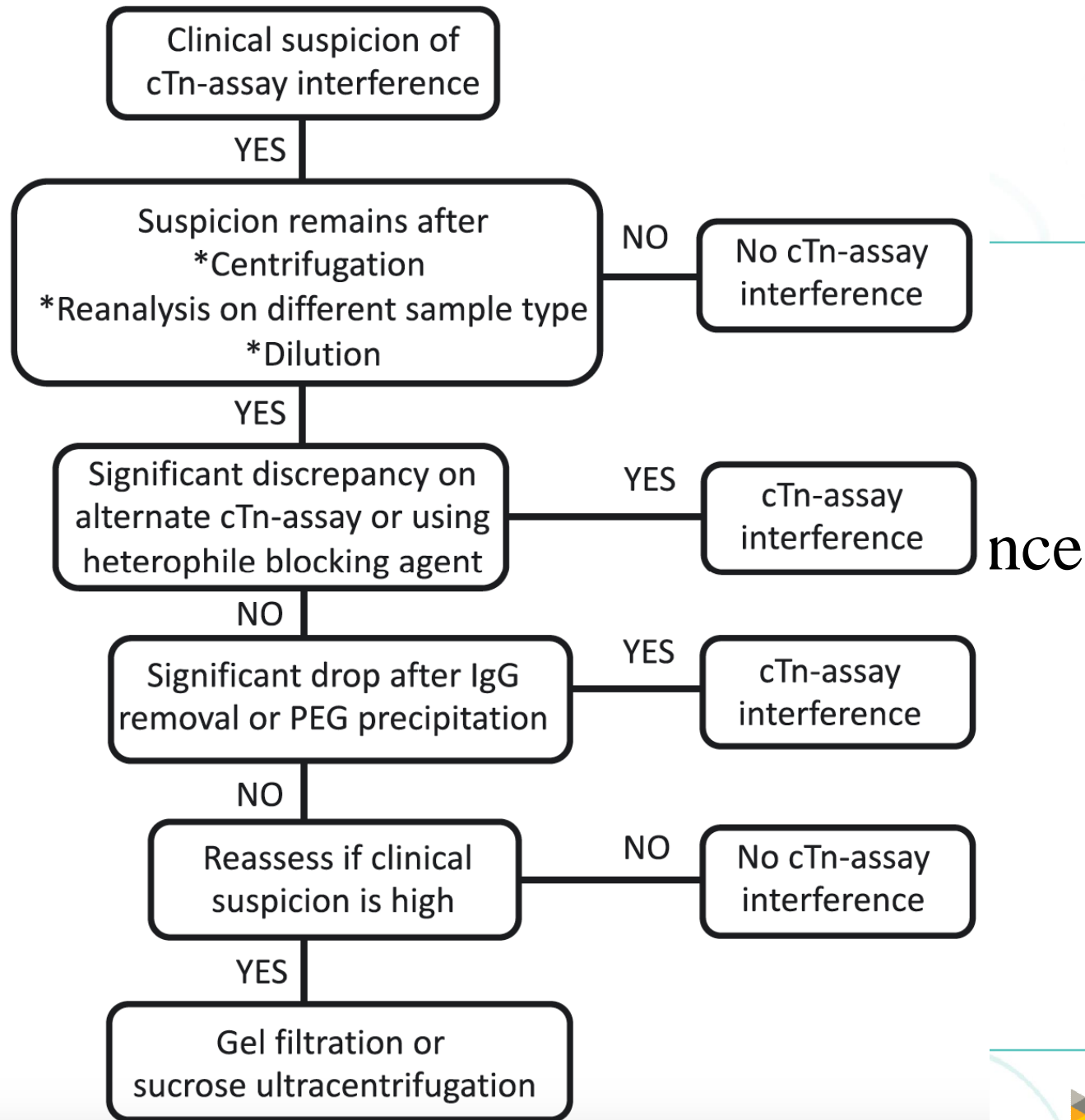


Interférences avec les dosages immunologiques
Faux positifs ou faux négatifs
Mauvais diagnostic, traitements invasifs

Démarches en cas de suspicion

- Fibrine?
- Tester d
- Si discordance → probable interférence
 - PEG
 - Heterophile blocking tube (HBT)
 - Protein A plus
 - Gel filtration chromatography
 - Sucrose gradient ultracentrifugation

➤ Fi
➤ Te
➤



Résumé des méthodes



Routine lab methods

Method	Mode of action	Analysis time	Pros	Cons
Alternative hs-cTn assay	Variable	<1 h	Easy. Fast. Inexpensive. Extensively used in clinical routine.	May miss cTn-assay interferences.
Polyethylene glycol (PEG) precipitation	Precipitation of large molecules including immunoglobulins	1 h	Easy. Fast. Inexpensive. Extensively used in clinical routine.	Exactly what is precipitated in patient sample not known. Different cTn assays are affected differently by presence of PEG in the sample.
Dilution	Unknown	<1 h	Easy. Fast. Inexpensive. Extensively used in clinical routine.	May miss cTn-assay interferences.

Reference lab methods

Protein A/G spin column	Removal of IgG	1 h	Specific removal of IgG. Easy. Fast. Inexpensive.	Only IgG mediated interference will be detected. Not available in most labs.
Heterophile blocking reagent	Blocking of crosslinking antibodies	<1 h	Easy. Fast. Inexpensive. Extensively used in clinical routine.	Do not detect macrotroponin. Heterophile antibodies may be an uncommon cause of interference.
Gel filtration chromatography	Separation based on molecular weight	24 h	Will find any type of antibody mediated interference.	Slow and labor intensive. One sample at a time. Requires high laboratory skills. Requires special equipment such as chromatography equipment.
Sucrose gradient ultracentrifugation	Separation based on molecular weight	24 h	Will find any type of antibody mediated interference. Many samples can be run simultaneously.	Slow and labor intensive. Not an established technique in most labs. Requires high laboratory skills. Requires special equipment such as fluorometer and ultracentrifuge.

Testing des macrotroponines



Par chromatographie d'affinité en traitant le plasma avec:
colonne de protéine G (HiTrap, Protein G HP, GE Healthcare)
anti-IgA (matrice d'affinité CaptureSelect® IgA, ThermoScientific)
anti-IgM (matrice d'affinité Poros® CaptureSelect® IgM, ThermoScientific).d'affinité Poros® CaptureSelect® IgM, ThermoScientific)

Poids du complexe: 200 KDa

Poids de la troponine libre 20 Kda

→ clearance ralentie

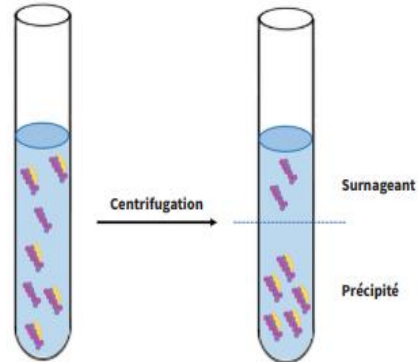
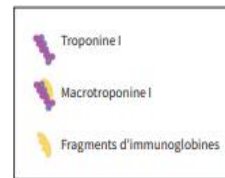
TNI= + immunogène

Méthodes d

B

ÉTAPES

1. Ajout de polyéthylène glycol
2. Incubation et centrifugation
3. Analyse du surnageant pour calculer le taux de récupération



PEG

Colonne anti-IgG (IgA et IgM)

- Colonne 'SPE' (*solid phase extraction*) :
medium = sepharose + IgG
recombinantes anti-fragment Fc
→ le filtre lie les IgG après avoir été
conditionné
- But : **purifier les IgG contenues dans
un liquide**
→ aussi les macro-TNI/macro-B12
sériques ?
- Caractéristiques :
 - ❖ Affinité avec IgG :
 - ✓ IgG humaines : strong (++++) pour IgG1/2/3/4
 - ✓ IgG animales : variable (+ à ++++)
 - ❖ Capacité de fixation : **ligand density = 2 mg
protein G/mL médium**
→ 1 mg protein G (0,5 mL médium)



Méthodes d



- Contexte : majoration aiguë TNI (*10J post-RVAo*)
→ pas de suspicion de macro-TNI
- Protocole : **sans dilution initiale**

	Incubation	Wash 1	Wash 2	Elution 1	Elution 2		Somme	Résultat dosage initial
TNI (ng/L)	279,6	13,3	< 2.55	142,9	46,6		482,4	442
Ferritine (ng/mL)	276,3	43,4	2	6,5	1,9			

→ Ferritine passe qu'au début (OK), TNI passe au début et à la fin

→ Mélange TNI libre et macro-TNI ?

Method	Advantages	Disadvantages
Protein A/G or other types of immunoglobulin depletion	<ul style="list-style-type: none"> - Analytically specific, minimal matrix alteration - Can be used across multiple platforms - Imprecision can be reduced by checking IgG (<0.5 g/L) after depletion - Potential for rapid turnaround in spin column format 	<ul style="list-style-type: none"> - Not available in real time - May have an indeterminate zone - May detect other antibody interferences
Size exclusion chromatography	<ul style="list-style-type: none"> - Analytically specific - Can visually observe presence of both immunoglobulin bound and unbound troponin - Robust method 	<ul style="list-style-type: none"> - Not available in real time - Multiple troponin repeats - High level operator skill
Sucrose gradient separation	<ul style="list-style-type: none"> - Analytically specific - Robust method 	<ul style="list-style-type: none"> - Not available in real time - High level operator skill
PEG precipitation	<ul style="list-style-type: none"> - Similar approach to macroprolactin - Potential for rapid turnaround 	<ul style="list-style-type: none"> - Not specific for macrotroponin, may detect other interferences - Assay dependent, matrix effect from PEG solution
Standard addition (mixing studies)	<ul style="list-style-type: none"> - Potential for rapid turnaround - Low complexity 	<ul style="list-style-type: none"> - May have an indeterminate zone - Reliable source of stable calibrating material required
Discrepant results between troponin assays	<ul style="list-style-type: none"> - Potential for rapid turnaround - Low complexity 	<ul style="list-style-type: none"> - Not specific for macrotroponin, may detect other interferences - Assay dependent
Specimen type/EDTA	<ul style="list-style-type: none"> - Potential for rapid turnaround - Low complexity 	<ul style="list-style-type: none"> - Not very well characterized - Not specific for macrotroponin, due to differing fragmentation and epitopes of cTn between specimen type
Serology based assay (detection of cTnAAb)	<ul style="list-style-type: none"> - Analytically specific - No automated assay available at this stage, but potentially rapid turnaround time 	<ul style="list-style-type: none"> - Cannot be used to determine the quantity of unbound troponin due to variable interference on different assays and heterogeneity of cTnAAbs between individuals

Méthodes d



Complexité

Précision

TAT

Spécificité analytique

Cas cliniques

Cas 1



J0:

16 ans, triathlète, D+ rétrosternales atypiques

- ATCD RAS
- ~~Vaccin SARS Cov 2~~
- ECG N
- Tnl hs 872 ng/L (VN: 54 ng/L)
- Echo transthoracique N + TDM pulmonaire N
→ MYOCARDITE (AINS)

7 j +tard:

→ consultation, Tnl hs 490 ng/L

Cas 1



1 mois +tard:

- D+ rétrosternale atypique
- Tnl hs: 3165 ng/L + dyspnée effort fatigue
→ transfert pour diagnostic provisoire de
MYOCARDITE PERSISTANTE
- Surveillance 7j
- IRM, EBV? VIH? SARS-Cov2? FR? ANA?
Génétique? et CK!
- CK neg!

Cas 1



1 mois +tard:

- D+ rétrosternales atypiques
- Tnl hs: 3165 ng/L + dyspnée effort fatigue
→ transfert pour diagnostic provisoire de
MYOCARDITE PERSISTANTE
- Surveillance 7j
- IRM, EBV? VIH, SARS-Cov2, FR, ANA, génétique
et CK!
- CK neg!
- Suspicion de FP: macrotroponines->
récupération de 31% (seuil de positivité <40%)
- D+ musculosqueletique + anxiété

Cas 1



1 mois +tard:

- D+ rétrosternales atypiques
- TnI hs: 3165 ng/L + dyspnée effort fatigue
→ transfert pour diagnostic provisoire de
MYOCARDITE PERSISTANTE
- Surveillance 7j
- IRM, EBV? VIH, SARS-Cov2, FR, ANA, génétique
et CK!
- CK neg!
- Suspicion de FP: macrotroponines->
récupération de 31% (seuil de positivité <40%)
- D+ musculosqueletique + anxiété

1 an +tard:

- TnI hs: 130 ng/L

Cas 2



- Patiente de 36 ans, adressée au service des urgences pour des douleurs thoraciques et des épigastralgies évoluant depuis 10 jours.
- La douleur était ressentie comme une oppression, non liée à l'effort, non augmentée par une respiration profonde, ni lorsque la patiente se penchait en avant

Cas 2



Examens complémentaires

ECG → rythme sinusal régulier

Angioscanner thoracique → normal

Echographie cardiaque → normale

Cas 2



Examens complémentaires



	TnI HS	TnI HS	TnI HS	TnT HS	TnI HSafter PEG precipitation	TnI HSafter HAMA treatment
	Alinity	Vitros	Attelica	E411	Alinity	Alinity
	Abbott	Ortho Clinica	Siemens	Roche	Abbott	Abbott
	<15,6 ng/L	<1,5 ng/dL	<34 ng/L	<14 ng/L	<15,6 ng/L	<15,6 ng/L
Time 0	1317	3,72	65	7	15	1235
Time +3 hours	1199					
Time +24 hours	1176					

Présentation des cas de la littérature

Clinical Chemistry 68:8
1015–1021 (2022)

Clinical Case Study

Macrotroponin Complex as a Cause for Cardiac Troponin Increase after COVID-19 Vaccination and Infection

Anda Bularga ^a, Ellen Oskoui,^{a,b} Takeshi Fujisawa,^a Sara Jenks,^c Rachel Sutherland,^d Fred S. Apple,^e
Ola Hammarsten,^f and Nicholas L. Mills ^{a,g,*}

Cas 1

Femme caucasienne, 28 ans qui s'est présentée, après 4 jours de douleurs thoraciques, à l'unité de soins d'urgence de jour du Western General Hospital d'Édimbourg, en Écosse.

La patiente avait reçu une deuxième dose du vaccin mRNA-1273 (Moderna) contre le COVID-19 cinq jours auparavant.

Après la vaccination, elle s'est sentie mal, avec de la fièvre et une toux sèche. Peu de temps après, elle a développé une douleur thoracique. La patiente n'avait pas d'antécédents médicaux et son examen clinique

Clinical Chemistry 68:8
1015–1021 (2022)

Clinical Case Study

Macro-troponin Complex as a Cause
for Cardiac Troponin Increase after COVID-19
Vaccination and Infection

Anda Bularga,* Ellen Oskoui,^{ab} Takeshi Fujiwara,* Sara Jenks,* Rachel Sutherland,^d Fred S. Apple,*
Ola Hammarsten,^c and Nicholas L. Mills^{e,9,*}

Cas 2

Homme caucasien de 29 ans qui s'est présenté avec une douleur thoracique à l'hôpital universitaire Sahlgrenska de Göteborg, en Suède

Le patient avait reçu une deuxième dose du vaccin mRNA-1273 (Moderna) 3 semaines avant son admission.

Il a décrit un épisode similaire de gêne thoracique quelques jours après la vaccination. Le patient avait des antécédents d'asthme mais ne prenait pas de médicaments réguliers. Son examen clinique était n

Clinical Chemistry 68:8
1015–1021 (2022)

Clinical Case Study

Macrotroponin Complex as a Cause
for Cardiac Troponin Increase after COVID-19
Vaccination and Infection

Anda Bularga,¹ Ellen Oskoui,^{2,3} Takeshi Fujisawa,⁴ Sara Jenks,⁵ Rachel Sutherland,⁶ Fred S. Apple,⁷
Ola Hammarsten,¹ and Nicholas L. Mills^{1,8*}

Cas 3

Homme caucasien de 19 ans dont le COVID-19 a été confirmé par un test de transcription inverse-PCR. Il souffrait d'un léger essoufflement et de maux de tête et n'était généralement pas bien.

Six semaines après la confirmation de l'infection par le COVID-19, il a développé une douleur thoracique, qui a motivé son admission à l'hôpital universitaire Sahlgrenska de Göteborg, en Suède.

Le patient avait des antécédents d'asthme.

L'examen clinique é

Clinical Chemistry 68:8
1015–1021 (2022)

Clinical Case Study

Macroproponin Complex as a Cause
for Cardiac Troponin Increase after COVID-19
Vaccination and Infection

Anda Bularga¹, Ellen Oskoui,^{2,3} Takeshi Fujisawa,⁴ Sara Jenks,⁵ Rachel Sutherland,⁶ Fred S. Apple,⁷
Ola Hammarsten,⁸ and Nicholas L. Mills^{9,10}

Résultats de troponines

hs-cTnI assay platform	Abbott ARCHITECT _{STAT} (i2000)	Abbott Alinity (ci)	Abbott Alinity (ci)
hs-cTnT assay platform	Roche Elecsys (Cobas e801)	Roche Elecsys (Cobas e801)	Roche Elecsys (Cobas e801)
Laboratory investigation results			
hs-cTnI, ng/L (presentation)	31	750	280 000
hs-cTnT, ng/L (presentation)	4	33	11
hs-cTnI, ng/L (serial)	36 37	860 770	280000 180 000
hs-cTnT, ng/L (serial)	5	—	6
hs-cTnI, ng/L (follow-up) (6 semaines)	48	696	93 000
hs-cTnT, ng/L (follow-up)	5	—	10
Macro-troponin complex analysis			
Macro-troponin complex	IgG to hs-cTnI	IgG to hs-cTnI and to hs-cTnT	IgG and IgM to hs-cTnI
hs-cTnI concentration (ng/L) prior to immune complex removal*	58	860	180 000
hs-cTnI concentration (ng/L) after immune complex removal*	10	5	13
hs-cTnI recovery, %	16	3	<1
hs-cTnT concentration (ng/L) prior to immune complex removal	<3	33	11
hs-cTnT concentration (ng/L) after immune complex removal	<3	6	11
hs-cTnT recovery, %	—	3	—
Macro-troponin complex molecular weight, kDa	200	200	500
Suspected clinical diagnosis	Vaccine-associated myocarditis	Vaccine-associated myocarditis	COVID-19 myocarditis

Les différentes interférences



HAMA?

FR?

Anticorps anti-hétérophiles?

Un médicament?

Une IR?

Les différentes interférences



HAMA?

FR?

Anticorps anti-hétérophiles?

Un médicament?

Une IR?

Une vaccination Covid

Les différentes interférences



HAMA?

FR?

Anticorps anti-hétérophiles?

Un médicament?

Une IR?

Une vaccination Covid

Une infection Covid

Lien entre le Covid-19 et les macrotroponines



Événements auto-immuns décrits avec la vaccination Covid -19
Souvent augmentation des concentrations 2-3j après 2^{ème} dose vaccin ARNm
Réponse immunitaire due à la vaccination
Activation de voies dérégulées préexistantes → prolifération de cellules polyclonales B (production d autoAc) et donc développement de complexes immunitaires et d inflammation

Interférences autres

FP: 1/1000!!!

Anticorps hétérophiles

Facteur rhumatoïde

Anticorps humains anti-animaux en réponse aux anticorps utilisés pour la production d'agents thérapeutiques ou la vaccination

De + l'augmentation des concentrations de hs-cTnT peuvent être associées à une réexpression de la cTn dans le muscle squelettique en l'absence d'atteinte cardiaque (Skeletal muscle disorders: a noncardiac source of cardiac troponin T. Circulation 2022;145:1764-79)

Conclusions



- Considérer les différentes interférences
 - Quels mécanismes ?
 - Il y a-t-il une alternative pour le patient ?
 - Tenter de l'analyser correctement
- Discuter avec le cliniciens/ bonne interprétation!

Take Home message



- Une augmentation persistante des troponines doit faire penser à des macrotroponines!
- Il existe beaucoup de types d anticorps
- Les auto-anticorps comme la troponine I et T sont « communs » chez des personnes saines mais les interférences avec les dosages restent relativement faibles



Merci pour votre attention