

Análisis de la variabilidad en la determinación de la hormona paratiroidea intacta (PTH-i) según el método empleado para procesar la muestra

A.I. Morales García¹, J.L. Górriz Teruel¹, M.C. Plancha Mansanet², V. Escudero Quesada¹, L.M. Pallardó Mateu¹

¹Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia. ²Servicio de Medicina Nuclear. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia

Nefrología 2009;29(4):331-335.

RESUMEN

Introducción: Las alteraciones del metabolismo óseo-mineral presentan una alta prevalencia en los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), siendo mayor conforme avanza el estadio de enfermedad. El diagnóstico de dichas alteraciones se basa fundamentalmente en la determinación de niveles de hormona paratiroide (PTH-i). Sin embargo, la determinación de esta hormona no es sencilla y está sometida a gran variabilidad. Los métodos para procesar las muestras de PTH-i no están estandarizados, hecho que podría ser una fuente importante de variabilidad preanalítica. **Objetivo:** Analizar la variabilidad en los resultados de la determinación de la PTH-i comparando distintas formas de procesar la misma muestra de plasma tratado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en pacientes con ERC. **Material y métodos:** Se han analizado 294 muestras, correspondientes a 49 pacientes con ERC, 18 procedentes de la Consulta de Trasplante Renal (36,7%) y 31 del programa de Hemodiálisis Crónica de nuestro Centro (63,3%). Se ha procesado la misma muestra de cada uno de nuestros pacientes de seis maneras distintas, comparando las medias entre el grupo de referencia o gold standard y los otros grupos a estudio. Las muestras se procesaron con diferentes condiciones de temperatura y tiempo antes de ser congeladas, constituyendo seis grupos: centrifugación y congelación inmediata (grupo 1, de referencia); muestra a temperatura ambiente una hora, centrifugación y mantenimiento en nevera (2-8 °C) durante 0, 8 o 24 horas (grupos 2A, 2B y 2C, respectivamente); mantenimiento de sangre a temperatura ambiente 3 horas, mantenimiento en nevera (2-8 °C) durante 0 y 8 horas (grupos 3A y 3B). La PTH-i se ha determinado mediante Inmuno-radiometría (IRMA Total Intact Scantibodies assay). Se ha realizado el

test de homogeneidad de varianzas y normalidad, y después comparaciones por pares con el t-test con la corrección de Bonferroni. **Resultados:** La PTH-intacta media en el grupo de referencia fue $202,5 \pm 199,72$ pg/ml. Las medias de PTH-intacta en distintos grupos analizados fueron $196 \pm 203,23$ pg/ml, $202,8 \pm 200,2$ pg/ml, $200,06 \pm 194,87$ pg/ml, $204,08 \pm 204,073$ pg/ml, $197,94 \pm 182,31$ pg/ml. Los resultados fueron prácticamente superponibles, no encontrando diferencias significativas respecto al grupo de referencia ($p = 0,87$, $p = 0,99$, $p = 0,95$, $p = 0,96$, $p = 0,90$ al comparar con grupos 2A, 2B, 2C, 3A y 3B, respectivamente). **Conclusiones:** La utilización de EDTA como conservante en el procesamiento de las muestras analíticas para la determinación sanguínea de PTH-i permite un mayor tiempo de procesamiento de la misma, sin la exigencia de su congelación inmediata, mostrando una mínima variabilidad en los resultados obtenidos según diferentes formas de procesamiento. Estos resultados pueden ayudar a establecer estrategias logísticas para el procesamiento de muestras sanguíneas en los pacientes con ERC.

Palabras clave: Variabilidad. Estabilidad. PTH. Procesamiento muestras.

ABSTRACT

Background: The measurement of i-PTH circulating is not easy due to its analytical variability. Variability that appears in the process that goes from the sample collection to the final result determination. There are several important aspects that can influence within the pre-test variability: type of sample (serum or plasma), temperature, time elapses from blood extraction to freezing and from freezing to i-PTH quantification. Blood coming from centres far from our laboratory do not always meet the required processing conditions. Our aim was to study the stability of i-PTH with varying conditions of temperature and time until freezing in patients with chronic kidney disease (CKD). **Methods:** We have analyzed 294 blood samples of 49 patients with chronic kidney

Correspondencia: Ana Isabel Morales García
Servicio de Nefrología.
Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia.
amoralesg@senefro.org

disease (18 transplanted patients (36.7%) and 31 patients in haemodialysis (63.3%)). The blood samples were collected using tubes treated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); these samples were subjected to different conditions of temperature and time before they were frozen, constituting 6 groups: blood centrifuged and plasma immediately frozen (group A or reference group); blood maintained 1 hour at room temperature and plasma stored at 2-8 °C during 0, 8 and 24 hours (groups B,C,D); blood maintained 3 hours at room temperature and plasma stored at 2-8 °C during 0 and 8 hours (groups E,F). The intact PTH (i-PTH) was measured using the immunoradiometric assay (IRMA Total Intact Scantibodies assay). We have analyzed the differences between the PTH-i mean values in the referenced group and the others. We have applied the tests of homogeneity variance and normality and we have performed a comparison by pairs with the t-test including the Bonferroni correction. **Results:** The mean value of intact-PTH in the reference Group was 202.5±199.72 pg/ml. The mean values of intact-PTH in the other groups were 196 ± 203.23 pg/ml, 202.8 ± 200.2 pg/ml, 200.06 ± 194.87 pg/ml, 204.08 ± 204.073 pg/ml, 197.94 ± 182.31 pg/ml. The results were practically identical for each group. We did not find important differences with respect to the reference group ($p = 0.87$, $p = 0.99$, $p = 0.95$, $p = 0.96$, $p = 0.90$ when comparing with groups 2a, 2b, 2c, 3a y 3b). **Conclusions:** The use of EDTA maintain the PTH stability during a longer period without the necessity of freezing the samples immediately. These results can help to state strategies to management the samples in patients with ERC.

Key words: Variability, PTH stability, processing conditions samples.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones del metabolismo calcio-fósforo son un problema muy prevalente y de gran importancia en los pacientes con ERC¹⁻⁸. Su valoración adecuada y precoz, así como su tratamiento, son cruciales para un óptimo control de nuestros enfermos.

El método ideal para diagnosticar el grado y el tipo de osteodistrofia renal sigue siendo la biopsia de cresta ilíaca tras el doble marcaje con tetraciclinas⁹⁻²⁵, pero, debido a que es invasivo y laborioso, es de difícil aplicación en la práctica clínica diaria²⁶. Actualmente, el diagnóstico y el tratamiento de dichas alteraciones se basan fundamentalmente en la determinación de los niveles plasmáticos de hormona paratiroide intacta (PTH-i)^{10,17,27-31}. Sin embargo, la determinación de esta hormona no es sencilla y está sometida a gran variabilidad³²⁻³⁴. Además, los métodos para procesar las muestras de PTH-i no están estandarizados, hecho que podría ser una fuente importante de variabilidad preanalítica.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Analizar la variabilidad en los resultados de la determinación de la PTH-i comparando distintas formas de procesar la misma muestra de plasma tratado con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en pacientes con ERC en distintos estadios evolutivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro estudio, se han analizado 294 muestras correspondientes a 49 pacientes con ERC en distintos estadios evolutivos, 18 de ellos procedentes de la Consulta de Trasplante Renal (36,7%) y 31 del programa de Hemodiálisis Crónica de nuestro Centro (63,3%).

Todas las muestras se han extraído por la mañana (entre las 8.00-9.00 horas) tras un ayuno de al menos ocho horas y prediálisis en los pacientes en tratamiento sustitutivo renal. Las extracciones se han realizado en la Unidad de Hemodiálisis de nuestro Hospital. De cada paciente se han obtenido tres tubos de EDTA: dos de 5 ml y uno de 10 ml. Inmediatamente después de la extracción, han sido enviados en nevera al Servicio de Medicina Nuclear, donde cada uno se ha procesado de manera distinta, tal como se explica a continuación.

Grupo de referencia o grupo 1 (tubo EDTA de 5 ml):

- Extracción muestra (y rápidamente derivación al Servicio de Medicina Nuclear en nevera).
- Centrifugación en refrigeración.
- Separación y congelación inmediata.

Grupo 2 (tubo de EDTA de 10 ml):

- Extracción muestra.
- Dejar a temperatura ambiente una hora.
- Centrifugación normal.
- Separación de 3 tubos:
 - Un tubo se congela directamente. Grupo 2A.
 - Separar un tubo en la nevera durante ocho horas y después congelar. Grupo 2B.
 - Separar un tubo en la nevera durante >24 horas y después congelar. Grupo 2C.

Grupo 3 (tubo de EDTA de 5 ml):

- Extracción de la muestra.
- Dejar a temperatura ambiente durante >3 horas.
- Centrifugación normal.
- Separación en dos tubos:
 - Congelarlo directamente. Grupo 3A.
 - Separar un tubo en la nevera >8 horas y después congelarlo. Grupo 3B.

Las formas de procesamiento de las muestras empleadas en nuestro estudio son las habitualmente aplicadas en nuestro medio. La PTH-i se ha determinado mediante inmunoradiometría (IRMA Total Intact Scantibodies assay, 2.ª generación).

La variabilidad intraensayo que se ha obtenido es menor del 2,5%. Se ha considerado como referencia o *gold standard* al grupo 1, ya que son las condiciones generales recomendadas para este tipo de muestras, independientemente del método o conservante utilizado (EDTA o citrato).

Se ha realizado la comparación dos a dos entre las medias de la PTH en el grupo de referencia y en el resto de grupos. Para ello, primero se ha comprobado la normalidad de la distribución mediante el test de homogeneidad de varianzas y normalidad. Posteriormente, realizamos las comparaciones por pares con el t-test, al que le aplicamos la corrección de Bonferroni. El nivel de significación fue establecido con $p < 0,05$.

RESULTADOS

La edad media de la población es de 60 ± 17 años (rango: 26-29). Veincinco pacientes eran mujeres (51%) y 24 varones (49%). La principal causa de enfermedad renal crónica es la no filiada, seguida de la de origen vascular y glomerular. El resto de características de la población estudiada se muestra en la tabla 1.

El grupo de referencia presentó una media $202,5 \pm 199,72$ pg/ml. Las medias de PTH-i en los distintos grupos analizados, que se muestran en la tabla 2, fueron $196 \pm 203,23$ pg/ml, $202,8 \pm 200,2$ pg/ml, $200,06 \pm 194,87$ pg/ml, $204,08 \pm 204,073$ pg/ml, $197,94 \pm 182,31$ pg/ml. Como se puede observar en la figura 1, los resultados son prácticamente superponibles, no habiendo encontrado diferencias significativas de los grupos a estudio respecto del grupo de referencia ($p = 0,87$, $p = 0,99$, $p = 0,95$, $p = 0,96$, $p = 0,90$, al comparar con grupos 2A, 2B, 2C, 3A y 3B, respectivamente).

DISCUSIÓN

La determinación sérica de la parathormona es difícil de cuantificar debido a que es bastante inestable tanto en suero como en sangre⁴³⁻⁴⁵ (Vm 5 minutos). El método considerado como referencia se basa en centrifugar en refrigeración y congelar la muestra inmediatamente después de su extracción. Sin embargo, esta manera de proceder es muy difícil de conseguir en la clínica diaria, pues la actividad nefrológica no sólo se limita al ámbito hospitalario. Habitualmente,

Tabla 1. Características descriptivas de la población a estudio

Edad, años	60,88 \pm 17,65
Creatinina (mg/dl)	6,673 \pm 4,31
MDRD-4 (ml/min/1,73 m ²)	15,99 \pm 22,05
Cockcroft (ml/min)	18,04 \pm 25,90
Estadio K-DOQI (2/3/4/5)	8,2%/22,4%/6,1%/63,3%
Calcio (mg/dl)	9,23 \pm 0,90
Fósforo (mg/dl)	3,81 \pm 1,33
Albúmina (mg/dl)	3,56 \pm 0,31
Proteínas totales (mg/dl)	6,58 \pm 0,57
Etiología ERC	
*(Gn/Int/Vs/Nd/No filiada)	20,4%/12,2%/26,5%/6,1%/63,3%

* Gn: glomerular; Int: nefropatía intersticial; Vs: vascular; Nd: nefropatía diabética.

te, las muestras son extraídas en los centros periféricos y remitidas posteriormente a los hospitales de referencia para ser analizadas. En algunas ocasiones, estos centros no se encuentran muy próximos a dichos hospitales. La mayoría de las muestras no son centrifugadas ni separadas en los centros de extracción porque no disponen de los medios necesarios para ello. Además, las muestras son centrifugadas a temperatura ambiente. De todo esto se deriva la importancia que presenta conocer y reducir al máximo la variabilidad en el manejo de las muestras.

Actualmente, no hay un método estandarizado sobre el procesamiento de las mismas. Existe controversia sobre la estabilidad de la parathormona en suero o en plasma tratado con EDTA. Hay varios estudios que reflejan que las determinaciones de la PTH en suero son menos estables que las obtenidas a partir de muestras de plasma y de sangre conservadas en tubos tratados con EDTA³⁵⁻⁴². Sin embargo, Omar et al.³⁸, en el año 2001, observaron que los niveles de PTH en EDTA decrecían un 14,8% a las 48 horas de permanecer a temperatura ambiente. Además, recientemente, Cavalier et al.⁴² demuestran que no siempre las muestras procesadas en EDTA son más estables que en suero. Ellos objetivan que la estabilidad de la PTH-i tras 24 horas a -20 °C es mayor en suero que en plasma tratado con EDTA.

En casi todos los estudios realizados hasta el momento se comparan suero y EDTA³⁵⁻⁴². Sin embargo, una de las limi-

Tabla 2. PTH-i media (pg/ml) en cada grupo a estudio

Grupo referencia	Grupo 2A	Grupo 2B	Grupo 2C	Grupo 3A	Grupo 3B
202,5 \pm 199,72	196 \pm 203,23	202,8 \pm 200,2	200,06 \pm 194,87	204,08 \pm 204,07	197,94 \pm 182,31

P = ns (t-test, test de Bonferroni).

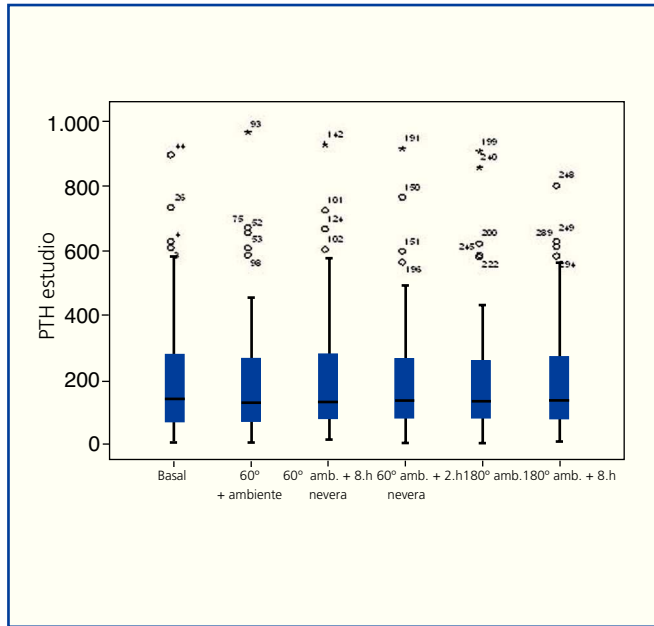


Figura 1. Medias de PTH-i en los distintos grupos a estudio (pg/ml).

taciones que presenta nuestro estudio es que no se ha establecido un grupo control con suero (citrato). Por tanto, no podemos valorar las determinaciones de la PTH-i en suero y plasma (EDTA) una vez congeladas a -20 °C, ni comparar los resultados con los obtenidos por Cavalier et al. Además, no hemos analizado qué pasa más allá de las 48 horas a temperatura ambiente para poder comparar los resultados con Omar et al.

Los hallazgos obtenidos en este estudio muestran que no existen diferencias significativas entre el grupo de referencia y los diferentes grupos analizados. Se confirma que las muestras de plasma tratado con EDTA son estables y se recomienda su empleo cuando la centrifugación en frío y la congelación inmediata son difíciles de conseguir.

CONCLUSIÓN

La utilización de EDTA como conservante en el procesamiento de las muestras analíticas para la determinación sanguínea de PTH-i permite un mayor tiempo de procesamiento de la misma sin la exigencia de su congelación inmediata, mostrando una mínima variabilidad en los resultados obtenidos según diferentes formas de procesamiento. Estos resultados pueden ayudar a establecer estrategias logísticas para el procesamiento de muestras sanguíneas en los pacientes con ERC.

BIBLIOGRAFÍA

- Mann JFE, Gerstein HC, Pogue J, et al. Renal Insufficiency as a Predictor of Cardiovascular Outcomes and the Impact of Ramipril: The HOPE Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2001;134:629-36.

- Sarnak MJ, Levey As. Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *Am J Kidney Dis* 2000;35(4,1):117-31.
- Ganesh SK, Stack AG, Levin NW et al. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO (4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*.2001;12(10):2131-8.
- Block GA, Klassen PS, Lazarus JM et al. Mineral metabolism, mortality and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(8):2208-18.
- Young EW, Albert JM, Satayathum S, et al. Predictors and consequences of altered mineral metabolism: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int*2005;67(3):1179-87.
- Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, et al. Kesten Serum Phosphate Levels and Mortality Risk among People with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:520-8.
- Portolés J, Górriz JL, Martínez-Castelao A, et al. Chonic kidney disease mineral and bone disorder management in CKD stage 3-4. MERENA study. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:vi79 (abstract).
- Górriz JL, Bover J, Caravaca F, et al. Oserce Multicentre Spanish Study: Vitamin D levels in CKD stages 3-5 predialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:vi173 (abstract).
- Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure-An evolving disorder. *Kidney Int* 1993;43:436.
- Hutchison Aj, Whitehose RW, Boulton HF, et al. Correlation of bone histology with parathyroid hormone, vitamin D3 and radiology in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1993;44:1071.
- Malluche HH, Ritz E, Hodgson M, et al. Skeletal lesions and calcium metabolism in early renal failure. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1975;11:443.
- Llach F, Massry SG, Singer FR, et al. Skeletal resistance to endogenous parathyroid hormone in patients with early renal failure. A possible cause for secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41:339.
- Malluche HH, Ritz E, Lange HP, et al. Bone histology in incipient and advanced renal failure. *Kidney Int* 1976;9:355.
- Sherrard DJ, Baylink DJ, Wergedal JE, Maloney NA. Quantitative histological studies on the pathogenesis of uremia bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;39:119.
- Fournier A, Oprisiu R, Hottelart C et al. Renal osteodystrophy in dialysis patients: Diagnosis and treatment. *Artif Organs* 1998;22:530.
- Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, et al. Renal bone disease in 76 patients with varying degrees of predialysis chronic renal failure: A cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:813.
- Wang M, Hercz G, Sherrard DJ, et al. Relationship between intact 1-84 parathyroid hormone and bone histomorphometric parameters in dialysis patients without aluminum toxicity. *Am J Kidney Dis* 1995;26:836.
- Hernández D, Concepción MT, Lorenzo V, et al. Adynamic bone disease with negative aluminium staining in predialysis patients: prevalence and evolution alter maintenance dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:517.
- Andrés DL, Hercz G, COP JB, et al. Bone histomorphometry of renal osteodystrophy in diabetic patients. *J Bone Miner Res* 1987;2:525.
- Malluche HH, Monier-Faugere MC. The role of bone biopsy in the management of patients with renal osteodystrophy. *J Am Soc*

- Nephrol 1994;4:1631.
21. Faugere MC, Malluche HH. Stainable aluminium and not aluminium content reflects bone histology in dialyzed patients. *Kidney Int* 1986;30:717.
 22. Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *Hum Pathol* 1984;15:306.
 23. Malluche HH, Langub MC, Monier-Faugere MC. The role of bone biopsy in clinical practice and research. *Kidney Int Suppl* 1999;73:S20.
 24. Malluche HH, Langub MC, Monier-Faugere MC. Pathogenesis and histology of renal osteodystrophy. *Osteoporos Int* 1997;7(3):S184.
 25. Freemont T. Histological diagnosis of renal osteodystrophy. *Kidney Int Suppl* 1999;73:S26.
 26. Hodgson, SF. Skeletal remodelling and renal osteodystrophy. *Semin Nephrol* 1986;6:42.
 27. Qi Q, Monier-Faugere MC, Geng Z, Malluche HH. Predictive value of serum parathyroid hormone levels for bone turnover in patients on chronic maintenance dialysis. *Am J Kidney Dis* 1995;26:622.
 28. Sánchez C, Bajo MA, Selgas R, et al. Parathormone secretion in peritoneal dialysis patients with adynamic bonedisease. *Am J Kidney Dis* 2000;36:953.
 29. Gerakis A, Hutchison AJ, Apostolou T, et al. Biochemical markers for non-invasive diagnosis of hyperparathyroid bone disease and adynamic bone in patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:2430.
 30. Ziolkowska H, Paniczyk-Tomaszewska M, Debinski A, et al. Bone biopsy results and serum bone turnover parameters in uremia children. *Acta Paediatr* 2000;89:666.
 31. Solal ME, Sebert JL, Boudailliez B, et al. Comparison of intact, midregion and carboxy terminal assays of parathyroid hormone for the diagnosis of bone disease in hemodialyzed patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:516.
 32. Souberbielle JC, Boutten A, Carlier MC et al. Inter-method variability in PTH measurement: Implication for the care of CKD patients. *Kidney International* 2006;70:345-50.
 33. Cantor T, Yang Z, Caraianni N, Llamathi E. Lack of comparability of intact parathyroid hormone measurements among commercial assays for end-stage renal disease patients: Implication for treatment decisions. *Clinical Chemistry* 2006;52:1771-6.
 34. Ureña Torres P. The need for reliable serum parathyroid hormone measurements. *Kidney International* 2006;70:240-3.
 35. Inaba M, Nakatsuka K, Imanishi Y, et al. Technical and clinical characterization of the Bio-PTH (1-84) immunochemiluminometric assay and comparison with a second-generation assay for parathyroid hormone. *Clinical Chemistry* 2004;50:385-90.
 36. Levin GE, Nisbet JA. Stability of parathyroid hormone-related protein and parathyroid hormone at room temperature. *Ann Clin Biochem* 1994;31:497-500.
 37. Kay S, Walker and John Seth. Stability of parathyroid hormone in blood from renal patients on haemodialysis. *Ann Clin Biochem* 2000;37:800-1.
 38. Omar H, Chamberlin A, Walker V and Wood PJ. Immulite 2000 parathyroid hormone assay: stability of parathyroid hormone in EDTA blood kept at room temperature for 48 h. *Ann Clin Biochem* 2001;38:561-3.
 39. Glendenning P, Leonie LA, Hayley K et al. Parathyroid hormone is more stable in EDTA plasma than in serum. *Clinical Chemistry* 2002;48:766-7.
 40. Teal TK, Reed M, Stevens PE and Lamb EJ. Stability of parathyroid hormone ex vivo in haemodialysis patients. *Ann Clin Biochem* 2003;40:191-3.
 41. English E, McFarlane I, Taylor KP, Halsall DJ. The effect of potassium EDTA on the stability of parathyroid hormone in whole blood. *Ann Clin Biochem* 2007;44:297-9.
 42. Cavalier E, Delanaye P, Carlisi A et al. Stability of intact parathyroid hormone in samples from haemodialysis patients. *Kidney International* 2007;72:370-2.
 43. Wood PJ. The measurement of parathyroid hormone. *Ann Clin Biochem* 1992;29:11-21.
 44. Russell D and Henley R. The stability of parathyroid hormone in blood and serum samples at 4 °C and at room temperature. *Ann Clin Biochem* 1995;32:216-7.
 45. Newman PJ and Ashby JP. Clinical and laboratory evaluation of a two-site immunoradiometric assay for intact PTH. *Ann Clin Biochem* 1988;25:654-60.