Biološka varijacija i hemodijaliza – važna lekcija PTH

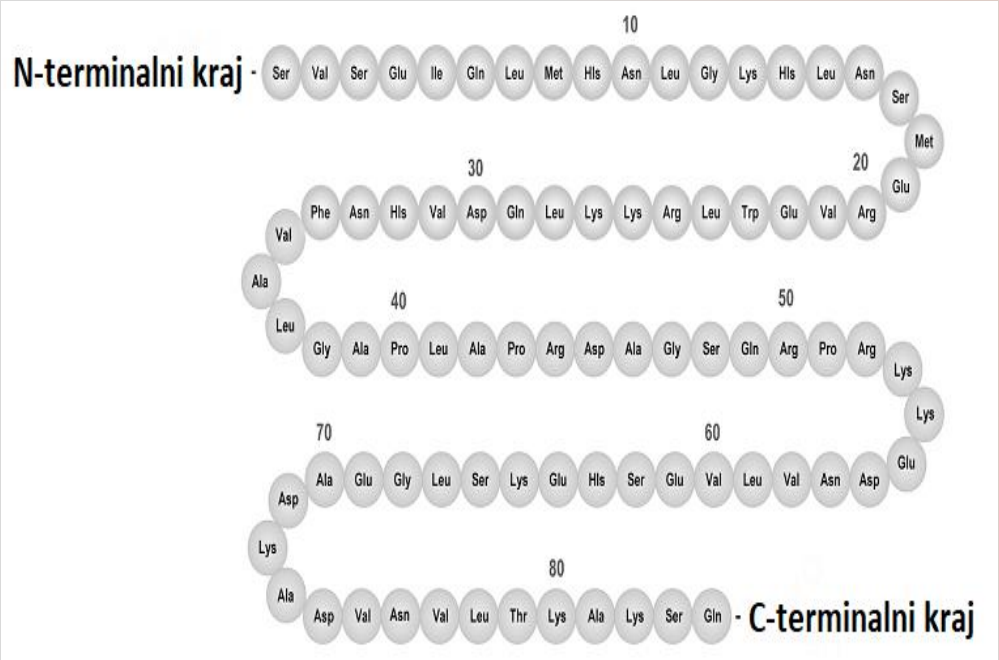
Ena Matišić, mag.med.biochem.,

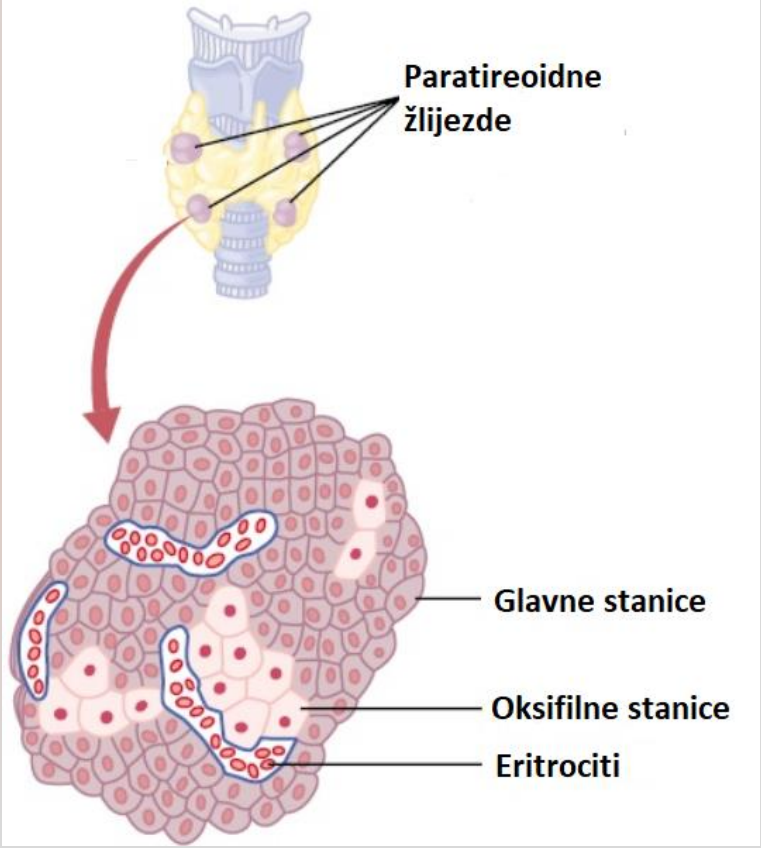
Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu
Kliničke bolnice Merkur – HRN EN ISO 15189:2012 akreditiran

Referentni centar Ministarstva zdravstva RH za izradu i primjenu bioloških referentnih intervala medicinskobiokemijskih pretraga

Paratireoidni hormon (PTH)

PTH (1-84) –struktura





Paratireoidni hormon (PTH) – biološka i klinička važnost

- regulacija homeostatske koncentracije izvanstaničnog kalcija i fosfata

Kost

↑koštana resorpcija

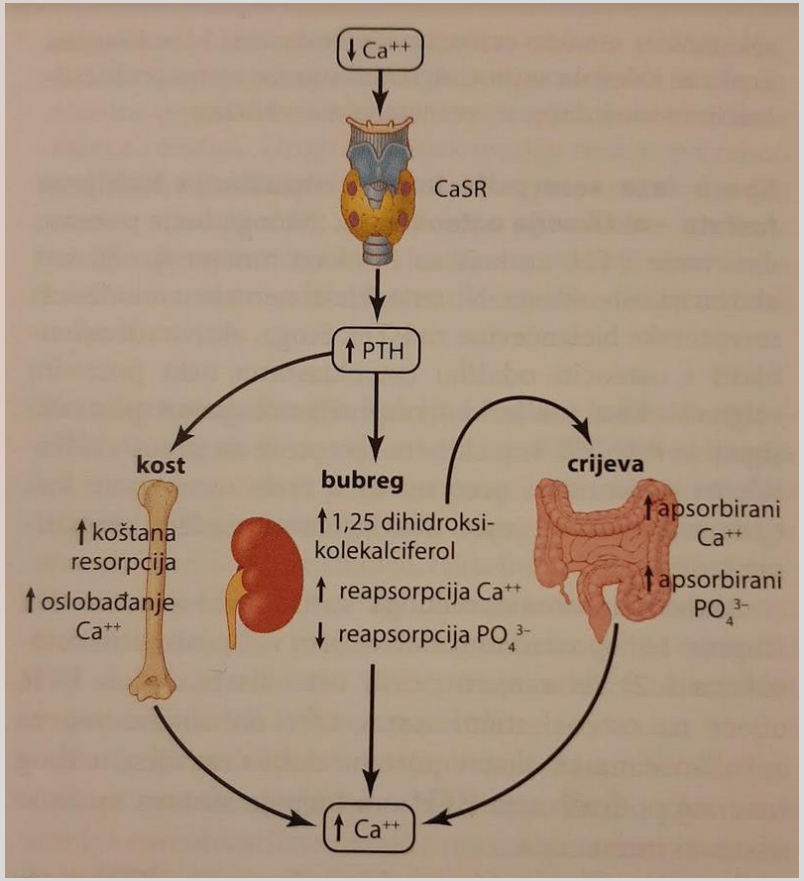
Bubreg

↑ reapsorpcija kalcija

↓ reapsorpcija fosfata

Crijevo

↑apsorpcija kacija i fosfata



Paratireoidni hormon (PTH) – biološka i klinička važnost

PTH

dijagnoza primarnog i sekundarnog hiperparatireoidizma i hipoparatireoidizma

intraoperativno praćenje praćenje paratireoidektomije

procjena i praćenje koštano-mineralnog metabolizma => posebice kod pacijenata s KBB i na hemodijalizi

laboratorijska evaluacija promjena u koštano-mineralnom metabolizmu kod osoba s kroničnim bubrežnim zatajenjem: ionizirani kalcij, fosfati, PTH, vitamin D

Biološka varijacija PTH

Intraindividualna varijacija

CV_I

Interindividualna varijacija

CV_G

→određivanje ciljeva analitičke kvalitete

→utvrđivanje stupnja primjenjivosti referentnih intervala i graničnih vrijednosti

→utvrđivanje optimalnog uzorka za analizu

→određivanje značajnosti promjena u uzastopnim određivanjima (RCV vrijednost)

→utvrđivanje kliničke korisnosti i primjenjivosti pretrage

Kvaliteta podataka o biološkoj varijabilnosti →kvaliteta studija: prikladan odabir populacije, vremenski period istraživanja, cjelokupni laboratorijski proces: prijeanalitička, analitička, poslijeanalitička faza

Prijeanalitička faza laboratorijskog procesa kod određivanja PTH

- **Standardizacija prijeanalitičkog procesa**
  - PTH nestabilna molekula => brzo se razgrađuje na manje fragmente
  - bimodalni biološki dnevni ritam PTH => uzorkovati natašte do 10 sati ujutro
  - uzimanje obroka bogatog kalcijem i/ili fosfatima => diferencijalna dijagnoza primarnog i sekundarnog hiperparatireoidizma

- Rezultat ovisi o:
  - vrsti uzorka (serum ili plazma)
  - vremenu uzorkovanja
  - pripremi pacijenta prije uzorkovanja

Prijeanalitička faza laboratorijskog procesa kod određivanja PTH

Prednosti plazme nad serumom

→skraćeno vrijeme dobivanja rezultata

→veći volumen uzorka

→izbjegavanje interferencija vezanih za naknadno zgrušavanje već centrifugiranih uzoraka

→veća stabilnost

Nedostatci plazme nad serumom

→interferencija EDTA antikoagulansa i fibrinogena kod nekih metoda

→kontaminacija kationima (npr. K^+)

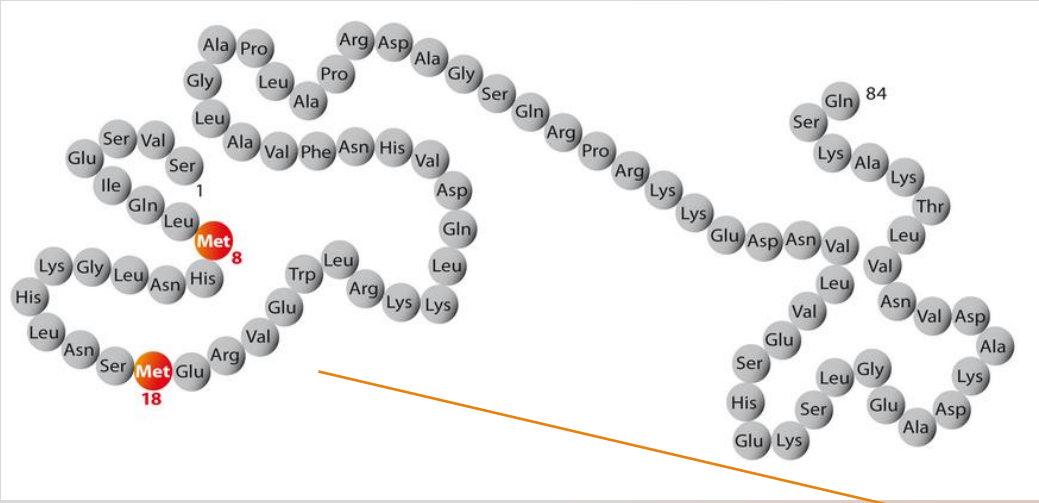
→u plazmi nije moguće odrediti pretrage koje je potrebno istovremeno određivati, npr. ionizirani kalcij, alkalna fosfataza

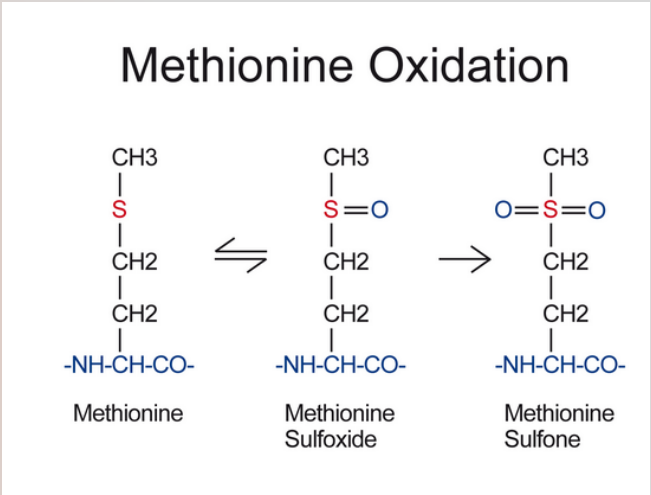
Analitička faza laboratorijskog procesa kod određivanja PTH

- primjena suvremene analitičke metodologije => IDEALAN TEST => detekcija **PTH 1-84**
- različiti imunokemijski testovi u različitoj mjeri prepoznaju fragmentirane oblike molekule PTH

Prva generacija imunokemijskih testova	Druga generacija imunokemijskih testova	Treća generacija imunokemijskih testova
• RIA	• *Intact PTH assay* • najčešće se koriste • PTH 1-84, drugi fragmentirani oblici, posebice PTH 7-84	• *Biointact PTH assay* • specifična za PTH 1-84

Oksidacija molekule PTH





- ni druga ni treća generacija imunokemijskih testova ne razlikuje oksidirani od neoksidiranog oblika molekule PTH
- mogu dati rezultate koje nije moguće jedinstveno interpretirati, a mogu utjecati na kliničku odluku → promjena terapije, paratireoidektomija

- česta kod pacijenata na hemodijalizi
- neoksidirani oblik PTH povezan je s boljim kliničkim ishodom

Analitička faza laboratorijskog procesa kod određivanja PTH

Clinica Chimica Acta 515 (2021) 44–51

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca

The path to the standardization of PTH: Is this a realistic possibility? a position paper of the IFCC C-BM

Etienne Cavalier [a,*], Samuel Vasikaran [b], Harjit P. Bhattoa [c], Annemieke C. Heijboer [d], Konstantinos Makris [e,f], Candice Z. Ulmer [g]

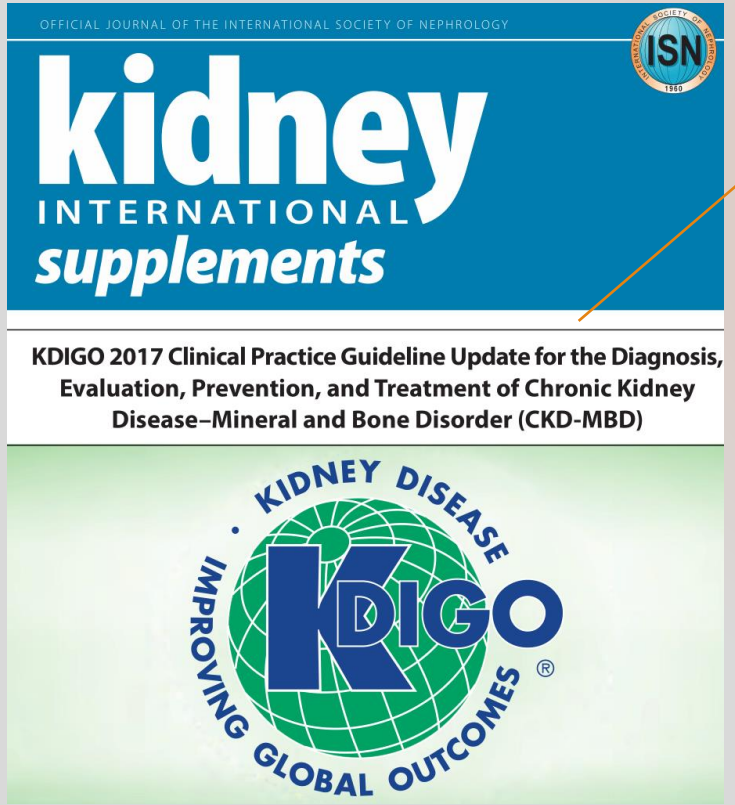
[a] Department of Clinical Chemistry, University of Liège, CHU de Liège, Domaine du Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium
[b] PathWest Laboratory Medicine, Fiona Stanley Hospital, Murdoch, WA, Australia
[c] Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen Hungary
[d] Department of Clinical Chemistry, Endocrine Laboratory, Amsterdam Gastroenterology & Metabolism, Vrije Universiteit Amsterdam and University of Amsterdam, Amsterdam UMC, Amsterdam, Netherlands
[e] Clinical Biochemistry Department, KAT General Hospital, 14561 Athens, Greece
[f] Laboratory for Research of the Musculoskeletal System "Th. Garofalidis", Medical School, University of Athens, Athens, Greece
[g] Clinical Chemistry Branch, Division of Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Buford, Atlanta, GA, USA

This group has since proposed the use of a single internationally-recognized standard for PTH assays calibration. The World Health Organization (WHO) Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) prepared a recombinant human PTH 1-84 standard (NIBSC 95/646) for the calibration of PTH assays. This recombinant material may be a good candidate. However, this standard cannot be imposed yet because its commutability must be formally assessed beforehand [33,34]. The first task of the IFCC C-BM will thus be to assess the commutability of this standard in a defined matrix. A study on this topic is underway with the collaboration of the UK-NEQAS (Edinburgh, Scotland) and the Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (Paris, France). Once the commutability of the NIBSC 95/646 material is determined, the standard will be proposed to manufacturers. The IFCC C-BM will then ask manufacturers to align their assays (either 2nd or 3rd generation versions) to the internationally-recognized, commutable standard. The second step will be to develop one or more candidate reference measurement procedures (RMPs) for PTH. Such RMPs are not available yet, but could reasonably be expected in the upcoming years due to advancements in mass spectrometry. With the help of these RMPs, it will be possible to certify the value of secondary reference materials and external controls. LC-MS/MS methods for PTH will also help to clarify the real impact of the large C-terminal fragments on the total PTH concentrations, as well as the real presence (or not) of oxidized PTH in samples from hemodialyzed patients [35–37]. Finally, once standardization is established, the IFCC C-BM will propose multi-ethnic, well-designed studies to establish common reference intervals for PTH assays [38].

- Internacionalna federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu za metabolizam kostiju (IFCC – C- MB) radi na standardizaciji metoda => još uvijek nije dostupan komutabilan materijal za kalibraciju metoda niti referentna metoda

Poslijeanalitička faza laboratorijskog procesa kod određivanja PTH

- točno izvještavanje rezultata PTH uz navođenje odgovarajuće mjerne jedinice, vrste uzorka u kojemu je izrađena analiza te prikladnih referentnih intervala ili graničnih vrijednosti



- optimalno održavanje kocentracije PTH u rasponu od 2 do 9 puta iznad gornje granice referentnog intervala kod pacijenata na hemodijalizi
- pravilno određeni referentni intervali (RI) od ključne su važnosti kod transverzalne procjene rezultata
- kod određivanja RI bitno je odabrati odgovarajuću populaciju => odgovarajuće kriterije uključenja i isključenja referentnih osoba
  - kriteriji isključenja: osobe s insuficijencijom vitamina D, smanjenom glomerularnom filtracijom
  - razmotriti ostale parametre kao što su indeks tjelesne mase, unos kalcija prehranom i etnička pripadnost =>ne postoje jedinstvene preporuke

Sastavnice biološke varijacije PTH: CV_I i CV_G

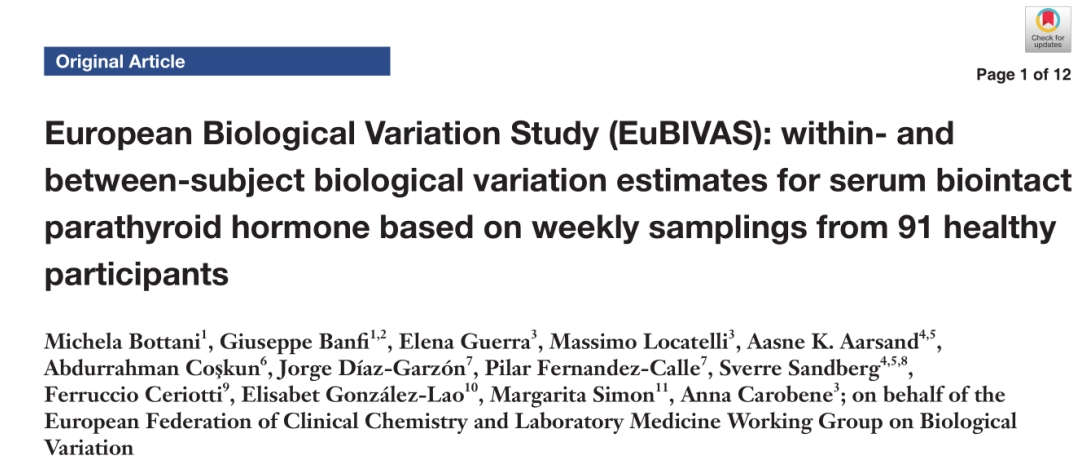
CV_I

- prosječno, ritmičko, dnevno, mjesečno, godišnje fluktuiranje koncentracije PTH pojedine osobe oko njene vlastite prosječne vrijednosti (homeostatske točke)

CV_G

- raspon variranja koncentracije PTH u istoj grupi (referentnih) osoba oko njihove prosječne vrijednosti (razlika između homeostatskih točaka pojedinaca)

- najnoviji podaci o biološkoj varijaciji PTH =>Radna grupa za biološku varijaciju Europske federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, EFLM)



Original Article

Page 1 of 12

European Biological Variation Study (EuBIVAS): within- and between-subject biological variation estimates for serum biointact parathyroid hormone based on weekly samplings from 91 healthy participants

Michela Bottani[1], Giuseppe Banfi[1,2], Elena Guerra[3], Massimo Locatelli[3], Aasne K. Aarsand[4,5], Abdurrahman Coşkun[6], Jorge Díaz-Garzón[7], Pilar Fernandez-Calle[7], Sverre Sandberg[4,5,8], Ferruccio Ceriotti[9], Elisabet González-Lao[10], Margarita Simon[11], Anna Carobene[3]; on behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Biological Variation

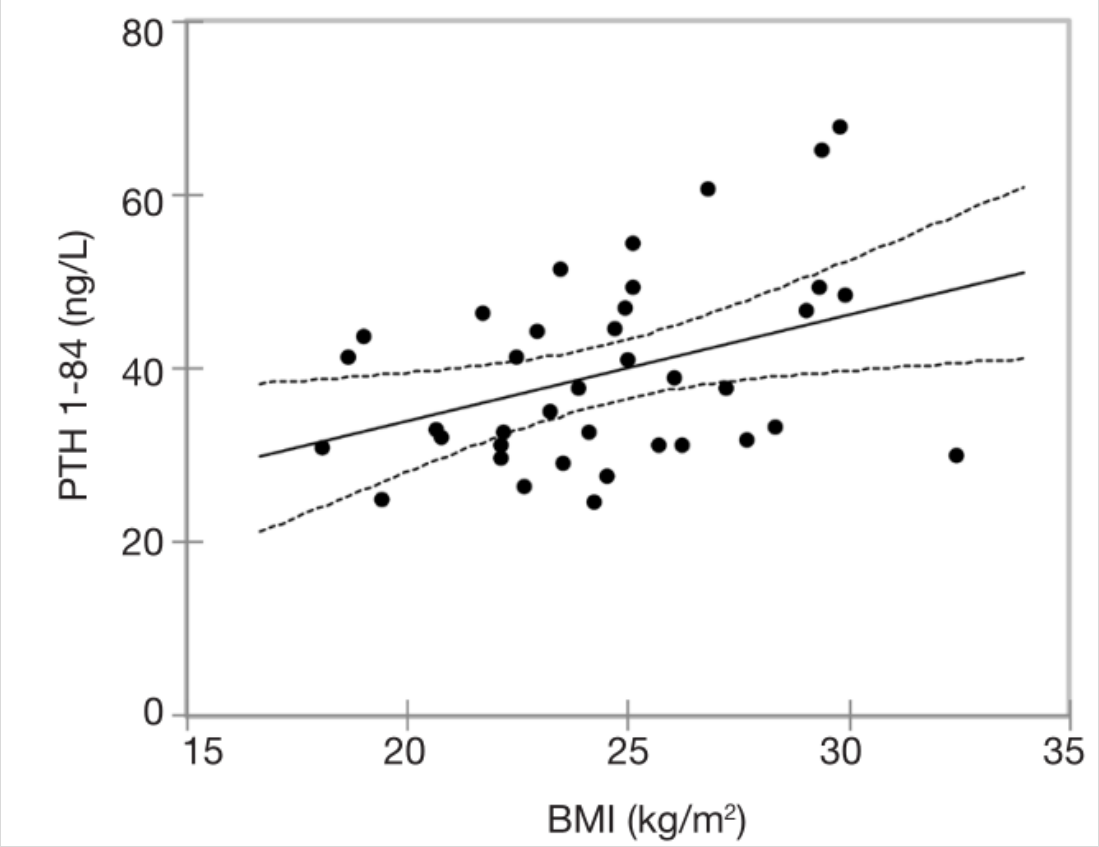
EuBIVAS podaci o biološkoj varijaciji PTH

Pretraga (uzorak)	Spol [medijan dobi (CI)]	N	$\bar{x}$ (95 % CI), ng/L	CV_A (95% CI)	CV_I (95% CI)	CV_G (95% CI)
PTH (serum)	m,ž	91	37,9 (37,2-38,6)	3,3 (3,1-3,4)	14,7 (14,0-15,5)	/
	m [35 (22-59)]	38	39,3 (38,3-40,3)		13,0 (12,1–14,2)	26,8 (21,4–35,1)
	ž	53	36,7 (35,8-37,6)		15,2 (14,3–16,3)	/
	ž <50 godina u reproduktivnoj dobi [34(21-49)]	43	35,5 (34,6-36,4)		15,5 (14,4-16,7)	27,8 (22,7-36,1)
	ž >50 godina u menopauzi [60 (55-69)]	10	41,7 (39,4-43,9)		14,2 (12,3-16,6)	30,8 (21,3-62,3)

m-muškarci, ž-žene, N-broj ispitanika, $\bar{x}$- srednja vrijednost izmjerenih koncentracija PTH, CI-interval pouzdanosti, CV_A-analitički koeficijent varijacije, CV_I-intraindividualna varijacija, CV_G-interindividualna varijacija

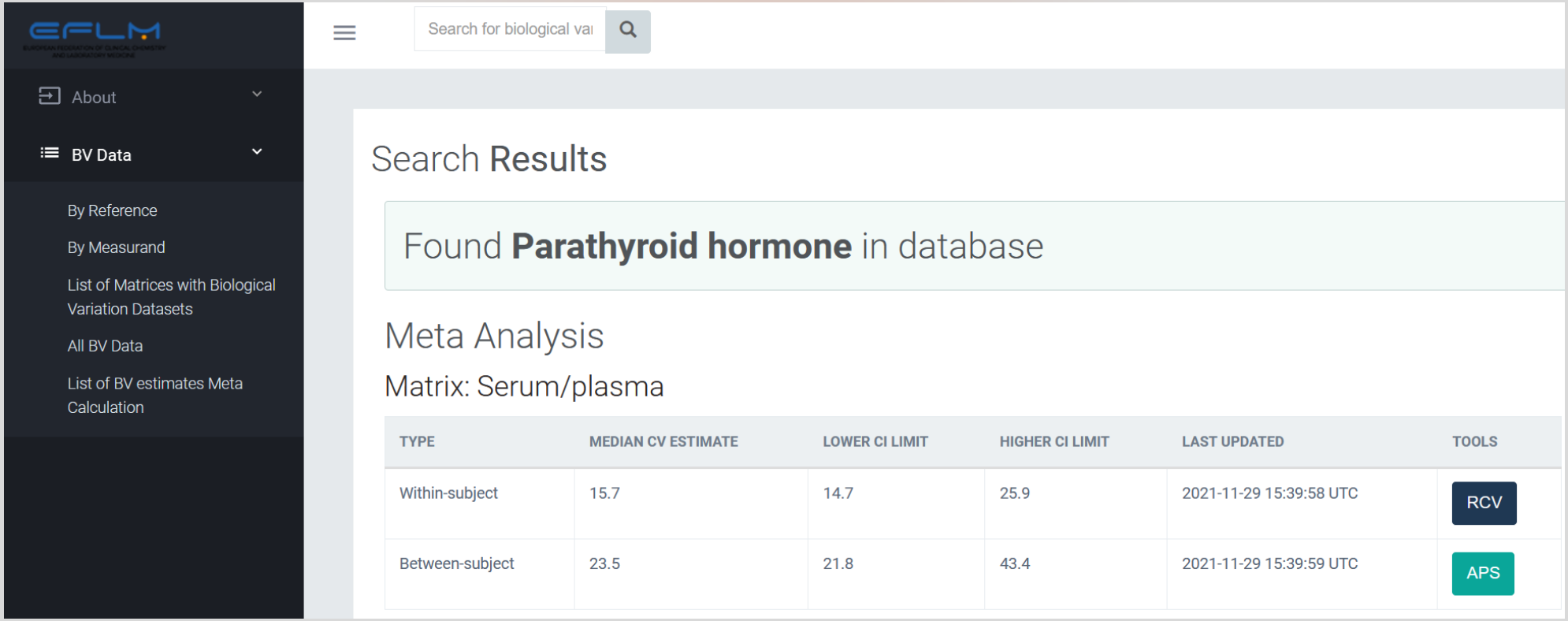
Bottani M, Banfi G, Guerra E, Locatelli M, Aarsand AK, Coşkun A, Díaz-Garzón J, Fernandez-Calle P, Sandberg S, Ceriotti F, González-Lao E, Simon M, Carobene A; European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Biological Variation. European Biological Variation Study (EuBIVAS): within- and between-subject biological variation estimates for serum biointact parathyroid hormone based on weekly samplings from 91 healthy participants. Ann Transl Med. 2020 Jul;8(14):855.

Utjecaj indeksa tjelesne mase na koncentraciju biointaktnog PTH kod muškaraca



Podaci o biološkoj varijaciji PTH iz baze podataka: EFLM BV Data

- EuBIVAS studija za PTH, analiza dosada objavljenih radova o biološkoj varijaciji PTH => baza biološke varijacije (EFLM BV Data)



Analitički kriteriji kvalitete

- ocjena prikladnosti metode za određivanje PTH

Minimalni kriteriji		
$\%bias = 0{,}375\ x \sqrt{{Cv_i}^2 + {Cv_G}^2}$	$\%CV_A = 0{,}75 \text{ x } CV_I$	$\%TE = 1{,}65 \text{ x } \%CV_A + \%bias$
10,6	**11,8**	**30**
Optimalni kriteriji		
$\%bias = 0{,}125\ x \sqrt{{Cv_i}^2 + {Cv_G}^2}$	$\%CV_A = 0{,}25 \text{ x } CV_I$	$\%TE = 1{,}65 \text{ x } \%CV_A + \%bias$
3,5	**3,9**	**10**
Poželjni kriteriji		
$\%bias = 0{,}25\ x \sqrt{{Cv_i}^2 + {Cv_G}^2}$	$\%CV_A = 0{,}50 \text{ x } CV_I$	$\%TE = 1{,}65 \text{ x } \%CV_A + \%bias$
7,1	**7,8**	**20**

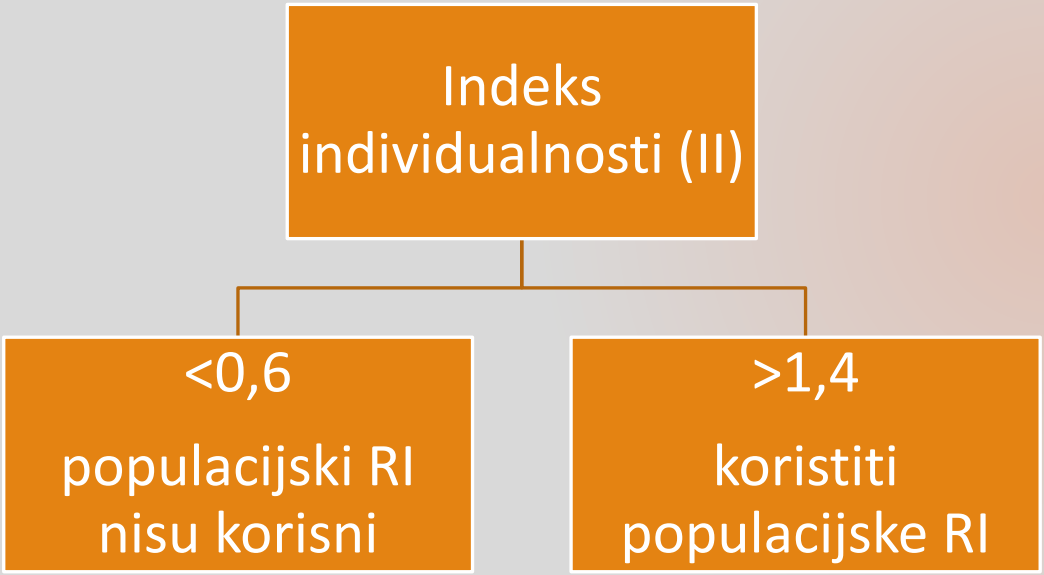
bias-odstupanje u odnosu na istinitu vrijednost, CV_A-analitički koeficijent varijacije, CV_I- intraindividualna varijacija, CV_G-interindividualna varijacija, TE-ukupna laboratorijska pogreška

Biološka varijacija kod pacijenata na hemodijalizi

Pretraga (uzorak)	Populacija	Spol [medijan dobi (CI)]	N	Metoda određivanja	CV_A (95% CI)	CV_I (95% CI)
PTH (plazma)	Pacijenti na hemodijalizi	m,ž [67,7 (42-90)]	22	intact PTH assay	3,6 (3,3-4,0)	25,6 (23,3-28,3)
				biointact PTH assay	6,3 (5,8-7,0)	30,2 (27,5-33,5)
	Pacijenti na hemodijalizi s izmjerenim koncentracijama PTH <300 ng/L	m,ž	13	intact PTH assay	3,5 (3,1-4,0)	31,2 (28,2-37,3)
	Pacijenti na hemodijalizi s izmjerenim koncentracijama PTH ≥300 ng/L	m,ž	9		3,9 (3,4-4,5)	13,9 (12,1-16,2)
	Pacijenti na hemodijalizi - ujutro	m,ž	9		3,5 (3,1-4,0)	32,1 (3,2-37,3)
	Pacijenti na hemodijalizi - poslijepodne	m,ž	13		3,7 (3,4-4,2)	19,8 (17,7-22,4)
	Zdravi ispitanici	m,ž [38,5 (24-61)]	12	intact PTH assay	3,5 (3,2-4,0)	19,2 (17,1-21,9)
				biointact PTH assay	4,2 (3,8-4,8)	23,8 (21,2-27,1)

Gardham C, Stevens PE, Delaney MP, LeRoux M, Coleman A, Lamb EJ. Variability of parathyroid hormone and other markers of bone mineral metabolism in patients receiving hemodialysis. Clin J Am Soc Nephrol. 2010 Jul;5(7):1261-7.

Indeks individualnosti (omjer intraindividualne i interindividualne varijacije)



- II (PTH)= 0,7 → velika individualnost, slabija vrijednost u transverzalnoj procjeni rezultata
- longitudinalnim praćenjem pacijenta razlika u rezultatima između 2 mjerenja može biti klinički značajna, međutim oba rezultata i dalje mogu biti unutar referentnog intervala

RCV - klinički značajna promjena kod serijskih određivanja (engl. *reference change value*)

- **RCV vrijednost→ opisuje promjenu rezultata koja nadilazi analitičku i biološku varijabilnost**

$$RCV = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{{Cv_A}^2 + {Cv_i}^2}$$; Z=1,65 (95%CI)

- biološka varijacija PTH značajno se razlikuje kod zdravih osoba i osoba na hemodijalizi => RCV vrijednost značajno se razlikuje

- prema istraživanju Gardhama i suradnika RCV vrijednost za pacijente na hemodijalizi iznosi 72%, a kod zdravih ispitanika 54%
  - kod praćenja pacijenata na hemodijalizi ukoliko je prva izmjerena vrijednost iznosila 300 ng/L, klinički značajna promjena u drugom određivanju značit će porast koncentracije za 72%, odnosno koncentraciju PTH >516 ng/L

- s obzirom na razlike u biološkoj varijaciji kod zdravih osoba i osoba na hemodijalizi nije moguća primjena jedinstvenih RCV vrijednosti, a vrijednost je ovisna i o analitičkom koeficijentu varijacije (CV_A) koji se razlikuje između različitih metoda određivanje PTH → svaki laboratorij prema vlastitom analitičkom koeficijentu varijacije za PTH te prikladnim odabirom podataka o CV_I, ovisno o populaciji pacijenata treba izračunati vlastite RCV vrijednosti

Zaključak

- preduvjet za pravilno tumačenje rezultata ispitivanja: poznavanje biološke varijacije (BV) PTH i cjelokupnog laboratorijskog procesa koji uključuje prijeanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku fazu

- EuBIVAS podaci o biološkoj varijaciji za PTH 1-84→ primjena najprikladnije i suvremene metodologije za procjenu BV →dostupni pouzdani podaci za CV_I i CV_G → određivanje analitičkih kriterija kvalitete, indeksa individualnosti i RCV vrijednosti

- indeks individualnosti za PTH=0,7 ukazuje na veliku individualnost i slabiju vrijednost u transverzalnoj procjeni rezultata, odnosno u kontekstu referentnih intervala → RCV vrijednost primjerenija prilikom tumačenja rezultata

- biološka varijacija PTH značajno se razlikuje kod zdravih osoba i onih liječenih hemodijalizom

- kod pacijenata na hemodijalizi intraindividualna varijacija je značajno veća nego u zdravih osoba→ pacijenti koji se dijaliziraju ujutro i pacijenti s koncentracijama PTH<300 ng/L imaju značajno veću intraindividualnu varijaciju

- pravilan izračun RCV vrijednosti→ uzeti u obzir postojanje razlika u CV_I kod različitih populacija pacijenata kako bi se pravilno definirala klinički značajna promjena, odnosno kako bi se osiguralo točno tumačenje rezultata u procesu dijagnostike, praćenja i liječenja poremećaja koštano-mineralnog metabolizma