

Article original

Estudi de l'estabilitat de la concentració de substància de paratirina en el sèrum en mostres centrifugades cinc hores després de la seva extracció

Raül Rigo Bonnin¹, Magda Macià Montserrat², Pedro Alía Ramos¹

¹ Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, Laboratori Clínic, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat

² Laboratori Clínic Clínic Territorial Metropolitana Sud, Laboratori Clínic de l'Hospitalet-Atenció Primària, L'Hospitalet de Llobregat

1. Introducció

L'estabilitat d'una magnitud biològica es pot definir com el període de temps en el qual la magnitud manté el seu valor dins d'uns límits establerts i en unes condicions especificades (1).

Els principals factors que poden influir en l'estabilitat d'una magnitud biològica són el sistema i procediment de mesura utilitzat, el temps i les condicions en què s'emmagatzema la mostra (temperatura; intensitat lluminosa —llum o foscor—; tipus de recipient—tub amb additius o sense, amb presència o no de gel separador, amb o sense tap, entre altres—; tipus de material del recipient—vidre o plàstic—; centrifugació i separació prèvia de la

mostra). La influència d'algun o varis d'aquests factors, conjuntament amb el criteri utilitzat per a establir els diferents límits d'estabilitat (criteri estadístic, criteri metrològic, criteri basat en la variabilitat biològica, entre altres), poden donar lloc a valors d'estabilitat molt diferents per a una mateixa magnitud (1, 2).

Als laboratoris clínics existeixen diversos motius pels quals les mostres biològiques s'han d'emmagatzemar en unes condicions que garanteixin l'estabilitat de les magnituds que en aquestes es mesuren. Aquests motius poden ser deguts a la necessitat de repetir algun mesurament, d'afegir un mesurament no sol·licitat inicialment o de realitzar sèries de

mesuraments més llargues quan s'utilitzen sistemes o procediments de mesura d'ús poc freqüent. Per altra banda, l'estabilitat de les magnituds biològiques durant el transport de les mostres és un problema general dels laboratoris clínics ja que aquestes poden necessitar ser processades diverses hores després de la seva extracció. Aquest fet s'accentua quan les mostres són obtingudes en centres d'extracció allunyats del lloc de processament de les mateixes, necessiten ser centrifugades o aliquidades i aquest procés no es realitza immediatament.

El Laboratori Clínic de l'Hospitalet rep mostres per al mesurament de la concentració de substància de paratirina en el sèrum de diferents centres perifèrics d'extracció, les quals triguen unes cinc hores en ser centrifugades i processades. Per aquest motiu, l'objectiu del present treball és estudiar l'estabilitat d'aquesta magnitud biològica en les esmentades condicions.

2. Material i mètodes

2.1. Procediment i sistema de mesura

Per al mesurament de la concentració de paratirina¹ s'utilitza l'analitzador Immulite 2000 XPi (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Alemanya). Aquest sistema de mesura emprava un mètode basat en l'enzimoinmunoanàlisi quimioluminiscent no competitiva en fase sòlida amb dos anticossos policlonals dirigits enfront a la paratirina. Un d'ells es troba enllaçat a una esfera de poliestirè i reconeix el fragment carboxi-terminal 44–84 i l'altre anticòs, està marcat amb fosfatasa alcalina i reconeix el fragment amino-terminal 1–34.

¹ A no ser que s'especifiqui el contrari, quan es faci referència a "la concentració de paratirina", sempre indicarà la magnitud específica, és a dir, la concentració de substància de paratirina en el sèrum.

2.2. Obtenció i preparació de les mostres

Per al present estudi s'empren un total de 166 mostres de sèrum que corresponen a 83 pacients arribats al Laboratori Clínic de l'Hospitalet. Les mostres dels pacients es recullen durant 15 dies no consecutius i amb un número de mostres per dia que oscil·la entre 2 i 9. A cada un dels pacients se li realitzen dues extraccions sanguínies en tubs de plàstic de 8,5 mL amb gel separador Vacutainer[®] SST-II Advance (Becton Dickinson, Nova Jersey, Estats Units). Una de les mostres obtingudes se centrifuga immediatament, prèvia retracció del coàgul, a 2000 g durant 10 minuts a temperatura ambient, s'aliquota en un tub de plàstic de 5 mL i s'emmagatzema a -20 °C fins al seu transport a l'Hospital de Bellvitge per al seu processament. L'altra mostra es deixa a temperatura ambient sense centrifugar durant cinc hores i, passat aquest temps, es realitza el mateix procediment esmentat per a la primera mostra.

2.3. Procediment experimental

Cadascuna de les mostres en estudi és transportada, en un recipient apropiat que les manté congelades, al Laboratori Clínic de l'Hospital de Bellvitge per al seu processament. Una vegada arriben al laboratori, aquestes es descongelen, s'agiten mitjançant inversió i es processen simultàniament per l'analitzador Immulite 2000 XPi.

Amb cada sèrie de mesura, es processen dos materials de control de matriu sèrica Liphochek[®] Immunoassay Plus Control (BioRad Laboratories, Hercules, Califòrnia, Estats Units) per tal de garantir el correcte funcionament del sistema de mesura. A més, aquests materials de control s'empren per estimar la imprecisió interdiària del sistema de mesura en ús.

2.4. Estudi de l'estabilitat

L'estudi de l'estabilitat es porta a terme seguint les recomanacions de la Societat Espanyola de Bioquímica Clínica i Patologia Molecular (SEQC) (3, 4). Els límits d'estabilitat es calculen seguint un criteri metrològic, utilitzant la imprecisió interdiària (CV) del sistema de mesura en ús ($\pm 1,65 \cdot CV$), i l'estabilitat s'avalua calculant el percentatge de desviació (PD) a partir dels valors mesurats de la magnitud obtinguts en les mostres centrifugades immediatament després de la seva extracció (X_i), i els valors obtinguts en les mostres que són centrifugades a les cinc hores posteriors a la seva extracció (Y_i), utilitzant la següent equació:

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y_i}{X_i} \right)$$

on n , és el nombre de parelles de mostres emprades en l'estudi.

Es considera que la magnitud en estudi és estable si el valor del PD es troba dins de l'interval $[-1,65 \cdot CV, 1,65 \cdot CV]$.

3. Resultats i discussió

Quaranta-dues de les parelles de mostres utilitzades presenten valors fisiològics de la magnitud en estudi (interval de referència comprès entre 1,30 i 7,11 pmol/L) i 41 d'elles, valors patològics.

Les mitjanes més menys les desviacions estàndards obtingudes en les mostres centrifugades immediatament després de la seva extracció i les centrifugades a les cinc hores posteriors són $(9,09 \pm 6,32)$ pmol/L i $(8,69 \pm 5,71)$ pmol/L, respectivament.

Els coeficients de variació obtinguts a partir dels materials de control, en el període en estudi, són 5,2 % i 4,2 % a uns valors mitjans de 6,10 i 35,5 pmol/L, respectivament. Donada la semblança entre les mitjanes de X_i , Y_i i la del material de control a valors fisiològics, el coeficient de variació que s'empra per calcular els límits d'estabilitat és 5,2 %. A partir d'aquesta dada, l'interval d'estabilitat que resulta és $[-8,6, 8,6]$.

El percentatge de desviació obtingut és +2,1%. Donat que aquest valor està inclòs dins de l'interval comprès entre -8,6 i 8,6 % es pot afirmar que la concentració de paratirina és estable en les condicions estudiades. El signe positiu del percentatge de desviació indica que, en conjunt, els valors obtinguts per a la concentració de paratirina en les mostres centrifugades immediatament després de l'extracció són superiors als valors obtinguts en les mostres centrifugades cinc hores després de l'extracció.

A la bibliografia existeixen nombrosos articles que estudien l'estabilitat de la concentració de paratirina en diferents líquids biològics (5-23). Tot i això, només alguns (5, 9, 11, 14) estudien l'estabilitat de la concentració de paratirina en el sèrum en mostres centrifugades diverses hores després de la seva extracció. En dos d'aquests estudis (5, 9), la concentració de paratirina no és estable en mostres que han sigut centrifugades 5 hores després de la seva extracció degut a la utilització de sistemes i procediments de mesura diferents, així com al criteri utilitzat per establir els límits d'estabilitat. Per altra banda, els altres dos estudis (11,14) presenten valors d'estabilitat semblants als obtinguts al nostre estudi, tot i presentar condicions i criteris d'estabilitat diferents.

4. Conclusions

La concentració de paratirina és estable en mostres que són centrifugades cinc hores després de la seva extracció. Per tant, els valors mesurats obtinguts per aquesta magnitud en mostres que són transportades des de diferents centres d'extracció perifèrics serien fiables com a mínim 5 hores, fins i tot sense haver estat refrigerades ni centrifugades immediatament.

Per altra banda, cal concloure que els resultats d'estabilitat obtinguts en aquest treball únicament podrien ser aplicats per aquells laboratoris clínics que utilitzin les mateixes condicions de treball emprades en el present estudi, és a dir, les mateixes condicions d'emmagatzematge de la mostra, el mateix sistema i procediment de mesura i el mateix criteri metroològic emprat per establir els límits d'estabilitat.

5. Bibliografia

- Cruz Carlos LM, Monge Azemar N, Valero Politi J, Fuentes Arderiu X. Estabilitat de les magnituds bioquímiques. *In vitro veritas* 2002;3:<<http://www.acclcat.com/continguts/ivv035.pdf>> (Accés 2014-07-14).
- Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular—Comité de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios. Definición del límite de estabilidad de las magnitudes en las muestras biológicas. *Quim Clin* 2006; 25(2):81-85.
- Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular—Comité de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios. Protocolo para el estudio de la estabilidad de las magnitudes biológicas. *Quim Clin* 2006; 25(2):86-89.
- Boletín informativo de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular 2009;165:7 <http://www.seqc.es/es/Publicaciones/1003/4/Boletin_Informativo_165/> (Accés 2014-07-14).
- Hanon EA, Sturgeon CM, Lamb EJ. Sampling and storage conditions influencing the measurement of parathyroid hormone in blood samples: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1925-41.
- Oddeze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem* 2012;45:464-9.
- Brinc D, Chan MK, Venner AA, Pasic MD, Colantonio D, Kyriakopoulou L, *et al.* Long-term stability of biochemical markers in pediatric serum specimens stored at -80 degrees C: a CALIPER substudy. *Clin Biochem* 2012;45:816-26.
- Cavalier E, Carlisi A, Bekaert AC, Rousselle O, Chapelle JP, Delanaye P. New insights on the stability of the parathyroid hormone as assayed by an automated 3rd generation PTH assay. *Clin Chim Acta* 2012;413:353-4.
- Stokes FJ, Ivanov P, Bailey LM, Fraser WD. The effects of sampling procedures and storage conditions on short-term stability of blood-based biochemical markers of bone metabolism. *Clin Chem* 2011;57:138-40.
- Cavalier E, Delanaye P, Hubert P, Krzesinski JM, Chapelle JP, Rozet E. Estimation of the stability of parathyroid hormone when stored at -80 degrees C for a long period. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1988-92.
- Zwart SR, Wolf M, Rogers A, Rodgers S, Gillman PL, Hitchcox K, *et al.* Stability of analytes related to clinical chemistry and bone metabolism in blood specimens after delayed processing. *Clin Biochem* 2009;42:907-10.
- Morales Garcia AI, Gorriz Teruel JL, Plancha Mansanet MC, Escudero Quesada V, Pallardo Mateu LM. Analysis of variability in determining intact parathyroid hormone (iPTH) according to the method used to process the sample. *Nefrologia* 2009;29:331-5.
- Parent X, Alenabi F, Brignon P, Souberbielle JC. Delayed measurement of PTH in patients with CKD: storage of the primary tube in the dialysis unit, which temperature? Which kind of tube? *Nephrol Ther* 2009;5:34-40.
- Morales Indiano C, Granada Ybern ML, Biosca Adzet C, Ventura Orriols E, Thomson Luque R, Corominas Vilardell A. Estudio de la estabilidad de insulina, testosterona y péptido C en suero y de paratirina en suero y plasma. *Rev Lab Clin* 2008;1:8-12.
- Tanner M, Kent N, Smith B, Fletcher S, Lewer M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Ann Clin Biochem* 2008;45:375-9.
- 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.

17. Scharnhorst V, Valkenburg J, Vosters C, Vader H. Influence of preanalytical factors on the immulite intact parathyroid hormone assay. *Clin Chem* 2004;50:974–5.
18. Anderson NR, Nicholas J, Holland MR, Gama R. Effect of a protease inhibitor on in vitro stability of intact parathyroid hormone. *Ann Clin Biochem* 2003;40:188–90.
19. Ellis MJ, Livesey JH, Evans MJ. Hormone stability in human whole blood. *Clin Biochem* 2003;36:109–12.
20. Glendenning P, Laffer LL, Weber HK, Musk AA, Vasikaran SD. Parathyroid hormone is more stable in EDTA plasma than in serum. *Clin Chem*. 2002;48:766–7.
21. Omar H, Chamberlin A, Walker V, 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.
22. Walker KS, Seth J. Stability of parathyroid hormone in blood from renal patients on haemodialysis. *Ann Clin Biochem* 2000;37:800–1.
23. Russell D, Henley R. The stability of parathyroid hormone in blood and serum samples at 4 degrees C and at room temperature. *Ann Clin Biochem* 1995;32:216–7.