

Paratormone intatto intero bioattivo: le problematiche emergenti dal confronto fra metodi

M. Marangella¹, M. Migliardi², F. Dutto³, G. Mengozzi⁴, D. Marrassa², C. Bagnis¹, S. Berutti¹, G. Gallone², G. Aimo⁴, A. Ramello¹, D. Fonzo²

¹ UU.OO. Nefrologia Dialisi e Centro Calcolosi Renale

² Endocrinologia e Laboratorio di Ormonologia

³ Laboratorio di Medicina Nucleare Ospedale Mauriziano Umberto I

⁴ Laboratorio Centrale "Baldi e Riberi", Ospedale Molinette, Torino

Intact whole bioactive parathormone: problems arising from comparing different methods

Background. Parathyroid hormone (PTH) has important applications in the nephrological clinical practice. Because assays of Intact PTH (I-PTH) are liable to interferences by N-truncated fragments, a novel method for whole-(1-84) PTH has been proposed. This study is aimed at comparing the latter with some of the previous I-PTH assays. For each method the results are referred to pertinent markers of mineral metabolism.

Methods. We enrolled 171 subjects, including 56 healthy controls (C), 65 calcium stone-formers (CaSF), 40 haemodialysis patients (HD), 10 with primary hyperparathyroidism (PHP). On blood samples we measured: I-PTH by four methods (N-Tact, Advantage, Elecsys, Scantibodies), whole-(1-84) PTH, defined as CAP (Cyclase Activating PTH), total and ionised calcium, phosphate, vitamin D, osteocalcin and Crosslaps. The difference between I-PTH and CAP Scantibodies is defined as CIP (Cyclase Inhibiting PTH).

Results. Despite relating to each other ($r > 0.97$) PTH values varied remarkably among methods. For all methods, the reference intervals differed from those provided by the producer. Assuming these new ranges, 10 CaSF had over-range values not always associated with abnormalities of mineral metabolism. One of the PHP patients was normal for I-PTH with 2/4 methods. In HD the differences among methods were even greater, there were inverse ($p < 0.05$) and direct ($p < 0.001$) relationships with ionised calcium and osteocalcin-crosslaps, respectively. The CAP/CIP ratio was lower in low bone turnover patients, but the two subgroups widely overlapped.

Conclusions. This study indicates that the reliability of I-PTH assays is still unsatisfactory, and none of the four methods emerged as the best. Assay for CAP only improves diagnostic efficiency, whereas the CAP/CIP ratio does not exhibit powerful discriminating capacity. Our suggestion is that each Centre should establish its own reference ranges. PTH assay should always be coupled with measurements of other markers of mineral metabolism as well as renal function. (G Ital Nefrol 2002; 19: 467-75)

KEY WORDS: Parathormone, Mineral metabolism, Nephrolithiasis, Primary hyperparathyroidism, Uremia, Immunometric methods

PAROLE CHIAVE: Paratormone, Metabolismo minerale, Nefrolitiasi, Iperparatiroidismo primitivo, Uremia, Metodi immunometrici

Introduzione

Il nefrologo è uno dei maggiori utilizzatori del dosaggio del paratormone (PTH) circolante, poiché molte delle situazioni cliniche caratterizzate da un'alterata regolazione dell'attività paratiroidea, primitiva o secondaria, sono cau-

sate o causano situazioni patologiche coinvolgenti il rene. Nel caso degli iperparatiroidismi primitivi (PHP), in cui la ghiandola sviluppa un grado anomalo di autonomia dai fattori che la controllano, le conseguenze renali sono costituite dalla nefrolitiasi-nefrocalcosi, a volte associate ad insufficienza funzionale renale. L'iperparatiroidismo

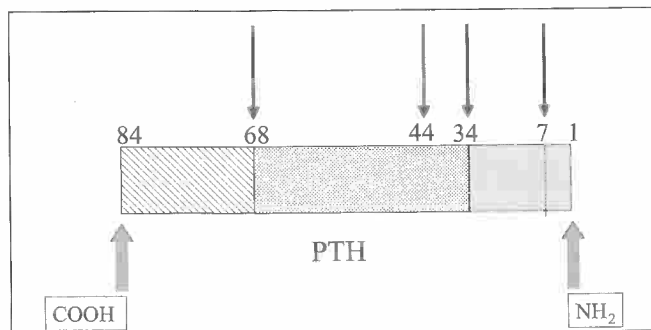


Fig. 1 - Rappresentazione schematica dei frammenti di PTH circolanti: 1-84, molecola intatta, definita anche CAP (cyclase activating PTH); 7-84, principale frammento PTH-like non-(1-84), definito (cyclase inhibiting PTH); 44-68, frammento media-molecola; 1-34, PTH N-terminale. I dosaggi del PTH intatto impiegano metodiche sandwich che utilizzano un doppio anticorpo, rivolto verso peptidi compresi fra 1 e 34 (tracer) e compresi fra 39 e 84 (catcher) (vedi anche Tabella I).

secondario (SHP), situazione in cui l'aumento di funzione configura un tentativo di compenso fisiologico, è un evento quasi costante in corso di insufficienza renale. Pertanto, nella gestione dei pazienti con nefrolitiasi calcica o con insufficienza renale, la valutazione della funzionalità paratiroidea rientra nella prassi clinica consolidata e formalizzata nelle linee guida della SIN (1, 2).

Il dosaggio del PTH è stato introdotto nella pratica clinica da alcuni decenni, ma fin dai primi studi è apparsa la difficoltà nella messa a punto di metodi analitici sensibili e specifici, e questo a causa della grande eterogeneità molecolare (ed immunologica) del PTH circolante (3-5), ben evidenziata dallo schema in Figura 1. Dai problemi metodologici sono originate appassionanti dispute in ambito scientifico fra gli addetti ai lavori. Ad esempio, i primi studi sulla ipercalciuria idiopatica verso la fine degli anni '70 riportavano valori di PTH spesso elevati in questi pazienti (6), mentre lavori successivi trovarono valori depressi (7), e questo si tradusse in una profonda revisione nella interpretazione patogenetica di questa sindrome. In ambito di sindrome uremica, sono ancora attuali le estenuanti discussioni sui valori di PTH da ritenere ottimali nella gestione del paziente in emodialisi (8-10).

Le difficoltà metodologiche, in particolare in termini di specificità analitica, derivanti dall'impiego di metodi radioimmunologici (RIA) avvalentisi di anticorpi diretti verso i frammenti C-terminali, N-terminali e mediomolecolari (11, 12), sono state in parte superate dal diffondersi dei metodi immunometrici *sandwich* per la determinazione del PTH cosiddetto intatto (I-PTH); tali metodi, teoricamente, sono in grado di misurare la concentrazione della sola molecola intatta, attiva dal punto di vista biologico (13). Tuttavia, negli anni recenti è stato notato che, a volte, l'andamento di alcuni marcatori (biochimici ed istopatologici) di metabolismo minerale non è quello prevedibile sulla base dei livelli plasmatici di I-PTH. Questa osservazione si applica a casi di SHP in corso di insufficienza

renale cronica, in cui l'entità del turnover scheletrico e le alterazioni istologiche dell'osso sono a volte diverse da quelle attese sulla base dei valori di I-PTH (8), tanto che ancora recentemente Goodman et al. hanno sottolineato che i saggi immunoradiometrici (IRMA) o immunochemiluminometrici (ICMA) necessitano di validazione mediante istomorfometria ossea (14). Analogamente, in corso di PHP, soprattutto nei casi cosiddetti *mild* o normocalcemici, esiste una *zona grigia* in cui le prestazioni diagnostiche del dosaggio di I-PTH sono spesso insoddisfacenti.

Secondo alcuni Autori parte di questi problemi è da ascrivere alla presenza in circolo di frammenti in cui la parte N-terminale è troncata a livello dei residui da 3 a 7. Tali forme molecolari non-(1-84) di PTH risultano infatti biologicamente inattive e tuttavia presentano reazioni crociate rilevanti (comprese fra il 50 ed il 60%) con gli anticorpi normalmente utilizzati per i saggi di I-PTH (15, 16). Inoltre, poiché sia la molecola intera che i frammenti inattivi PTH-like non-(1-84) vengono eliminati soprattutto per filtrazione glomerulare, l'insufficienza renale può accentuare l'inaccuratezza dei dosaggi (17).

È stato di recente proposto un nuovo metodo IRMA, specifico per la molecola intera del PTH e realmente esente da reazioni crociate nei confronti dei frammenti N-troncati (18). L'utilizzo di questa nuova metodica, denominata "PTH intero" o "CAP" (Cyclase Activating PTH) per differenziarla dai precedenti metodi di misura di I-PTH, eliminerebbe i problemi di inaccuratezza dei metodi stessi, soprattutto nel caso di pazienti con insufficienza renale. Inoltre, la differenza fra il valore di I-PTH e quello del PTH CAP consentirebbe una misura indiretta dei frammenti non-(1-84) i quali avrebbero implicazioni nella resistenza scheletrica all'azione degli ormoni calciotropi in corso di uremia (19). Per queste caratteristiche di inibizione nei confronti dell'azione del PTH questi frammenti sono definiti "CIP" (Cyclase Inhibiting PTH), ed il rapporto CAP/CIP è stato proposto come indicatore del tipo di osteodistrofia renale, ove un rapporto uguale ad 1 sarebbe discriminante fra basso o alto turnover scheletrico.

Accanto al continuo miglioramento del dosaggio del PTH, la diagnostica degli iperparatiroidismi dispone oggi di altri indicatori di metabolismo minerale, il cui impiego si è diffuso nella pratica clinica (1, 20).

Scopo di questo lavoro è il confronto dei risultati ottenuti mediante quattro diverse metodiche, di tipo classico, per il PTH intatto con quelli ottenuti per mezzo del nuovo metodo PTH CAP. La valutazione clinica dei diversi metodi è stata effettuata mediante la loro applicazione ad una casistica comprendente pazienti affetti da uremia in emodialisi, da nefrolitiasi calcica, da iperparatiroidismo primitivo e soggetti normali. In tutti i soggetti arruolati sono stati anche dosati alcuni marcatori di metabolismo minerale che, al fine di unificare e semplificare le procedure di prelievo e stoccaggio dei campioni, sono stati scelti fra quelli adatti alla determinazione su siero o plasma.

Materiali e Metodi

Soggetti Studiati

Sono stati arruolati in tutto 171 soggetti, suddivisi in 4 gruppi: 56 controlli sani (23 maschi e 33 femmine, età media 40.9 ± 9.5 anni), 65 pazienti affetti da nefrolitiasi calcica idiopatica (38 maschi e 27 femmine, età 47.7 ± 15.6 anni), 40 uremici in emodialisi (21 maschi e 19 femmine, età 67.8 ± 10 anni), 10 pazienti affetti da iperparatiroidismo primitivo provato istologicamente (2 maschi e 8 femmine, età 59.2 ± 12 anni).

Raccolta e Conservazione dei Campioni

In tutti i soggetti arruolati, il prelievo ematico è stato effettuato a digiuno. I campioni per il dosaggio del calcio ionizzato sono stati prelevati direttamente in siringhe contenenti eparina ridotta, mantenuti a freddo e processati entro un'ora. Per gli altri analiti si è proceduto al prelievo con provette contenenti gel separatore, per il siero, e con provette contenenti K_3 -EDTA, per il plasma. I campioni sono stati mantenuti in ghiaccio fondente, centrifugati a 4°C entro un'ora dal prelievo e conservati in aliquote a -20°C fino al momento dell'analisi. Tutti gli analiti sono stati testati entro quattro mesi dal prelievo; i dosaggi sono stati effettuati entro un'ora dallo scongelamento dei campioni.

Metodi di Dosaggio

Sono state effettuate le seguenti determinazioni: calcemia totale e fosforemia con metodiche di routine; calcio ionizzato in potenziometria con elettrodo ione-selettivo; le vitamine D, $25(\text{OH})\text{D}_3$ con metodo RIA (DiaSorin - Stillwater, Minnesota USA) e la $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con metodo radiorecettoriale (DiaSorin - Stillwater, Minnesota USA). I parametri di metabolismo scheletrico sono stati scelti fra quelli misurabili su sangue e pertanto utilizzabili nel confronto fra i diversi gruppi di pazienti, compresi quelli anurici in emodialisi. Come indicatore di *bone formation* è stata dosata l'osteocalcina con metodo RIA (Bouty, Milano), mentre per il *bone resorption* è stato dosato il telopeptide C-terminale del collagene di tipo I, Crosslaps (21), con metodo ELISA (Osteometer BioTech - A/S Herley, Denmark).

Come metodiche di tipo classico per la determinazione del PTH intatto sono state impiegate quelle in uso e ampiamente sperimentate presso due laboratori dei maggiori ospedali torinesi: N-Tact (Diasorin) e Advantage (Nichols); inoltre sono stati utilizzati i metodi Elecsys (Roche) e Total PTH (Scantibodies). Quest'ultimo costituisce parte integrante del Duo PTH Kit (Scantibodies) insieme al metodo CAP, oggetto dello studio. La differenza fra i valori ottenuti, sullo stesso campione, con i due metodi (Total - CAP) viene attribuita ai frammenti PTH-

TABELLA I - SPECIFICHE DEI METODI DI DOSAGGIO DEL PTH

Denominazione	Principio del Metodo	Anticorpo Catcher	Anticorpo Tracer	Sensibilità Analitica (pg/mL)	Valori di Riferimento (pg/mL)
N-Tact	IRMA	39-84 °	1-34 °	0.7	15-65
Advantage	ICMA	39-84 °	1-34 °	1.0	10-65
Elecsys 2010	ECLIA	55-64 *	26-32 *	1.2	10-65
Total	IRMA	39-84 °	7-34 °	1.2	9-63
CAP	IRMA	39-84 °	1-4 °	1.0	5-39

° Anticorpo policlonale

* Anticorpo monoclonale

like non-(1-84), denominati nel loro insieme CIP (*Cyclase Inhibiting PTH*). Per entrambe le metodiche Scantibodies il dosaggio è stato effettuato su plasma (come raccomandato dall'azienda produttrice), mentre per tutti gli altri metodi è stato impiegato il siero. In Tabella I sono riportate le specifiche dei singoli metodi, insieme ai dati di sensibilità ed ai valori di riferimento forniti dalle aziende.

I coefficienti di variazione intra-assay ed inter-assay sono stati misurati, per ciascuna metodica, a concentrazioni di PTH variabili fra 25 e 780 pg/mL, ottenendo valori oscillanti fra il 4% ed il 10%. Nell'ambito di ogni kit le prove di recupero davano risultati compresi fra il 94% e 108% per concentrazioni comprese fra 50 e 450 pg/mL. Si noti tuttavia che, prove di recupero effettuate aggiungendo ad un pool di sieri normali una identica preparazione di PTH sintetico (hPTH 1-84, Bachem) o di hPTH ricombinante (NIBSC 95/646) davano percentuali variabili dal 77% per N-Tact al 185% per Advantage: il significato di questi dati verrà discusso sotto.

Metodi Statistici

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. I confronti fra medie sono stati effettuati con il test t di Student. La comparazione fra metodi è stata effettuata mediante analisi di regressione lineare e calcolo del coefficiente di correlazione secondo Pearson.

Risultati

La Tabella II riassume i risultati di tutte le indagini eseguite nei gruppi in esame. Per ragioni di semplicità le differenze statistiche indicate in Tabella sono rapportate ai valori da noi ottenuti nei soggetti normali. Come atteso i pazienti uremici differiscono dalla popolazione normale per tutti i parametri di metabolismo minerale. Nell'ambito del piccolo gruppo di soggetti iperparatiroidici le differenze sono meno rilevanti, e coinvolgono i livelli di calcemia, soprattutto il calcio ionizzato, e quelli di PTH. Fra i vari

TABELLA II - RISULTATI COMPLESSIVI DELLE INDAGINI ESEGUITE NEI 4 GRUPPI DI SOGGETTI CON DIVERSA FUNZIONALITÀ PARATIROIDEA

Parametro	Normali	Nefrolitiasi	PHP	Uremia
Numero pazienti	56	65	10	40
Ca tot (mg/dL)	9,64 ± 0,41	9,77 ± 0,6	10,63 ± 0,65 ^b	9,53 ± 1,17
Ca Ionizzato (mmol/L)	1,24 ± 0,05	1,30 ± 0,04	1,42 ± 0,10*	1,19 ± 0,07
Fosforo (mg/dL)	3,50 ± 0,52	3,36 ± 0,58	3,04 ± 0,36 ^c	5,21 ± 1,51 ^a
25(OH) vit D ₃ (ng/mL)	14,9 ± 5,7	19,2 ± 10,2	5,68 ± 3,14	9,01 ± 7,73 ^a
1.25(OH) ₂ -vitD ₃ (pg/mL)	37,3 ± 13,7	35,70 ± 6,50	52,7 ± 18,9 ^d	7,24 ± 4,38 ^a
BGP (ng/mL)	6,0 ± 2,1	8,2 ± 4,5	14,0 ± 4,3 ^c	81,8 ± 73,0 ^a
Crosslaps (nmol/L)	2,69 ± 1,83	4,50 ± 2,63	6,82 ± 3,32 ^c	27,9 ± 13,8 ^a
N-tact (pg/mL)	27,71 ± 11,8	31,71 ± 15,80	69,5 ± 40,3 ^d	163,3 ± 149,1 ^a
Advantage (pg/mL)	51,2 ± 18,6	59,6 ± 30,8	138,1 ± 78,8 ^c	239,8 ± 214,0 ^a
Elecsys (pg/mL)	43,4 ± 14,9	46,6 ± 21,4	109,8 ± 69,6 ^d	252,5 ± 226,6 ^a
Total (pg/mL)	41,5 ± 14,2	41,6 ± 22,1	96,3 ± 49,4 ^d	194,5 ± 167,6 ^a
CAP (pg/mL)	30,0 ± 12,1	26,4 ± 15,7	70,3 ± 27,7 ^c	130,6 ± 118,1 ^a
CIP (Total-CAP, pg/mL)	12 ± 6	15 ± 9	26 ± 26 ^c	64 ± 55 ^a

La significatività delle differenze è calcolata rispetto ai soggetti normali.

* p < 0,001; ^b p < 0,01; ^c p < 0,025; ^d p < 0,05

TABELLA III - COEFFICIENTI DI CORRELAZIONE (R) FRA I DIVERSI METODI PER IL DOSAGGIO DEL PTH

	N-Tact	Advantage	Elecsys	Total
Advantage	0,9779	-	-	-
Elecsys	0,9866	0,9877	-	-
Total	0,9932	0,9847	0,9937	-
CAP	0,9887	0,9706	0,9811	0,9897

p < 0,001 per tutte le correlazioni

TABELLA IV - PENDENZE DELLE RETTE DI REGRESSIONE FRA I DIVERSI METODI PER IL DOSAGGIO DEL PTH

x:	N-Tact	Advantage	Elecsys	Total
Advantage	0,685	-	-	-
Elecsys	0,653	1,05	-	-
Total	0,872	0,785	1,32	-
CAP	1,25	1,76	1,89	1,43

metodi il PTH Advantage e il CAP evidenziano differenze più significative (p < 0,025) rispetto agli altri metodi (p < 0,05).

I risultati relativi al PTH evidenziano notevoli differenze fra i diversi metodi, indipendentemente dal gruppo considerato. Tuttavia, considerando tutta la casistica studiata, le correlazioni fra i diversi metodi sono altamente significative, con valori di r > 0,97 in tutti i casi (Tab. III). Le diffe-

renze relative sono ben espresse dai coefficienti angolari, che esprimono la sopra o sottostima reciproche (Tab. IV): si noti come il PTH CAP, teoricamente specifico per i soli frammenti bioattivi, fornisce i valori più bassi rispetto ad Advantage ed Elecsys ed anche, seppure in modo meno accentuato, rispetto a Total Scantibodies ed N-Tact

Nella seguente trattazione dei risultati analizzeremo l'efficienza diagnostica dei PTH nell'ambito di ogni singolo gruppo, ad iniziare dai soggetti sani di controllo.

Controlli Sani

Per nessuno dei metodi esaminati abbiamo trovato correlazioni significative fra i valori di PTH e quelli di calcemia totale e ionizzata. La distribuzione dei valori nei 56 soggetti studiati non è stata esattamente sovrapponibile agli intervalli di riferimento *teorici* forniti dalle aziende produttrici. Infatti, vi erano diversi soggetti con valori di PTH al di sopra del limite superiore di norma teorico: 0% per N-Tact, 16% per Advantage, 3,6% per Elecsys, 1,8% per Total Scantibodies e 12,5% per CAP. In nessuno di questi vi erano anomalie degli altri parametri di metabolismo minerale. Pertanto abbiamo assunto come intervallo di riferimento *reale*, quello derivante dall'insieme dei valori ottenuti nei 56 soggetti studiati (Tab. V).

Nefrolitiasi Calcica

Come atteso i valori medi di PTH in questo gruppo non differivano in modo significativo rispetto ai normali, indipendentemente dal metodo di dosaggio utilizzato. Tuttavia la percentuale di pazienti con valori superiori all'intervallo

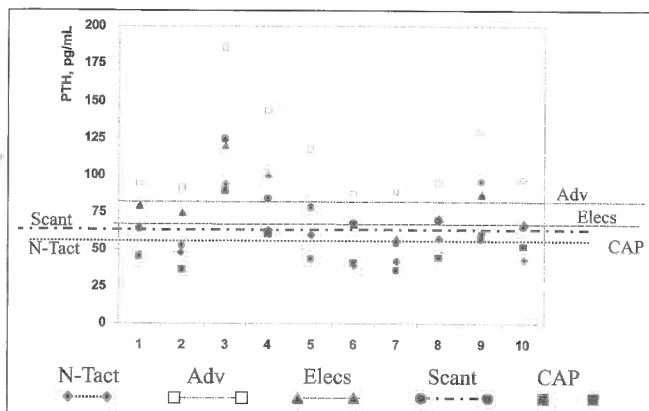


Fig. 2 - Confronto dei valori di PTH in 10 pazienti con NL calcica normocalcemici e con valori over range rispetto ad almeno una delle metodiche usate. Le linee orizzontali indicano il limite alto di norma per ciascun metodo.

di riferimento reale era significativa, con differenze percentuali a seconda del metodo considerato. Su 65 pazienti studiati 10 avevano almeno una misura di PTH al di sopra del range di norma: 2/10 con N-Tact, 10/10 con Advantage, 4/10 con Elecsys, 4/10 con Total Scantibodies, 3/10 con CAP. In Figura 2 risulta la notevole dispersione dei valori di PTH ottenuti con i diversi metodi. Tutti avevano normali livelli di calcemia sia totale (9.51 ± 0.54 mg/dL), che ionizzata (1.27 ± 0.05 mmol/L). Per individuare eventuali cause non paratiroidee di elevazione del PTH, abbiamo considerato gli altri parametri di metabolismo minerale. Da questa analisi si deduce che solo in 5/10 pazienti erano presenti anomalie di almeno un parametro associabili con l'aumento del PTH, in particolare: una riduzione della calcemia ed un aumento della osteocalcina nel paziente 1, fosforemia e calciuria ridotti nel paziente 3, aumento di osteocalcina e crosslaps nel paziente 7, riduzione del GFR e aumento dei parametri di bone turnover nel paziente 9, riduzione del GFR nel paziente 10. Negli altri 5 pazienti all'aumento del PTH non faceva riscontro alcuna anomalia dei parametri suddetti.

Uremici

I valori medi di PTH risultavano significativamente più alti rispetto ai normali, indipendentemente dal metodo utilizzato. Nell'ambito di questo gruppo vi erano correlazioni inverse, debolmente significative, con il calcio ionizzato, migliori per N-Tact ($r = -0.264$) e CAP ($r = -0.260$). Le correlazioni erano dirette e nettamente più significative con i due markers di bone-formation (osteocalcina) e bone-resorption (Crosslaps), come evidenziato in Tabella VI.

È noto che la popolazione uremica è costituita da pazienti con elevato e basso turnover osseo. Per valutare la capacità discriminante dei diversi tipi di dosaggio, abbiamo suddiviso i pazienti a seconda dei valori di PTH, considerando arbitrariamente ad alto turnover quelli con PTH

TABELLA V - INTERVALLI DI RIFERIMENTO PER I DIVERSI METODI DI DOSAGGIO DEL PTH OTTENUTI NEI 56 SOGGETTI SANI DA NOI STUDIATI

Denominazione	Principio del Metodo	Valori di Riferimento Teorici (pg/mL)	Valori di Riferimento Reali (pg/mL)
N-Tact	IRMA	15-65	13-55
Advantage	ICMA	10-65	23-80
Elecsys	ECLIA	10-65	17-66
Total	IRMA	9-63	15-63
CAP	IRMA	5-39	6-50

TABELLA VI - MATRICI DI CORRELAZIONE FRA PTH E PARAMETRI DI METABOLISMO SCHELETRICO IN 40 UREMICI IN EMODIALISI

PTH	Osteocalcina	Crosslaps
N-Tact	0.553	0.597
Advantage	0.553	0.597
Elecsys	0.580	0.564
Total	0.560	0.606
CAP	0.555	0.601

$p < 0.001$ per tutte le correlazioni analizzate

TABELLA VII - CONFRONTO FRA PAZIENTI A BASSO ED ALTO TURNOVER SCHELETRICO, CLASSIFICATI ASSUMENDO COME CUT-OFF UN VALORE DI PTH PARI A 2 VOLTE IL LIMITE SUPERIORE

Parametro	Normali (n=56)	Basso Turnover (n=19)	Alto Turnover (n=21)	p*
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.24 ± 0.05	1.22 ± 0.05	1.17 ± 0.08	0.01
Fosforemia (mg/dL)	3.50 ± 0.52	4.93 ± 1.65	5.47 ± 1.35	n.s.
25(OH) vit D ₃ (ng/mL)	14.9 ± 5.74	9.2 ± 9.8	8.8 ± 5.6	n.s.
1.25(OH) ₂ -vitD ₃ (pg/mL)	37.3 ± 13.7	8.1 ± 5.5	6.6 ± 3.2	n.s.
BGP (ng/mL)	6.0 ± 2.1	46.4 ± 22.9	114.0 ± 87.4	0.002
Crosslaps (nmol/L)	2.69 ± 1.83	20.7 ± 8.5	34.8 ± 14.6	0.001
N-tact (pg/mL)	27.71 ± 11.8	46.9 ± 27.5	269 ± 135	0.0001
Advantage (pg/mL)	51.2 ± 18.6	72.6 ± 36.9	391 ± 194	0.0001
Elecsys (pg/mL)	43.4 ± 14.9	77.6 ± 39.1	402 ± 212	0.0001
Total (pg/mL)	41.5 ± 14.2	61.8 ± 35.6	315 ± 148	0.0001
CAP (pg/mL)	30.0 ± 12.1	35.4 ± 21.1	217 ± 102	0.0001
CAP/CIP	2.8 ± 1.7	1.4 ± 0.8	2.4 ± 0.7	0.0001

*significatività delle differenze fra basso ed alto turnover

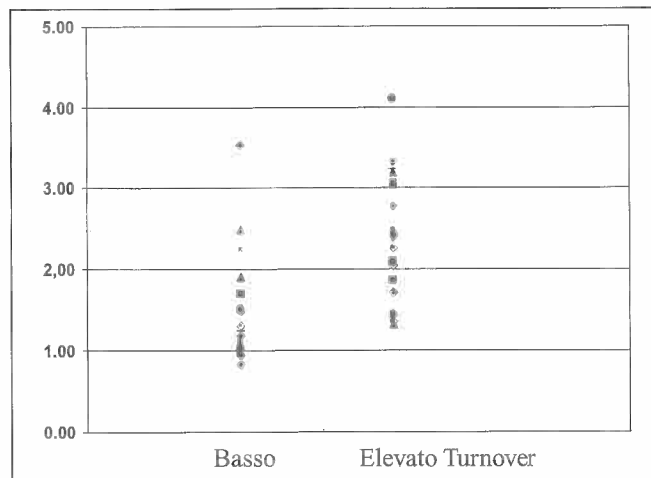


Fig. 3 - Confronto del rapporto CAP/CIP in pazienti uremici con elevato o basso turnover osseo, classificati arbitrariamente sulla base dei parametri biochimici pertinenti.

maggiore del doppio del limite superiore di norma (stabilito per ciascun metodo nella nostra popolazione normale), ed a basso turnover quelli al di sotto. Abbiamo in questo modo separato due sottogruppi, comprendenti 21 e 19 pazienti rispettivamente. Questi sono stati confrontati per tutti i parametri misurati ed i risultati sono esposti in Tabella VII.

Nell'allocazione dei pazienti in uno dei due sottogruppi di turnover scheletrico vi è stata concordanza fra tutti i dosaggi di PTH in 38/40 casi. In soli due casi, classificati ad alto turnover per 4/5 dosaggi del PTH, N-Tact (1 caso) ed Advantage (1 caso) davano una classificazione discordante, con livelli di PTH appena al di sotto del cut-off arbitrariamente stabilito. Entrambi sono stati collocati nel sottogruppo ad alto turnover.

I dati esposti in Tabella mostrano un'ottima capacità discriminante di tutti i dosaggi del PTH, sovrapponibile a quella ottenuta con il dosaggio CAP. Il rapporto fra CAP/CIP, che secondo una recente segnalazione è quello che meglio descrive il turnover scheletrico nei pazienti in emodialisi (22), differiva significativamente fra i due gruppi, e nei pazienti con basso turnover era più basso, sia rispetto a quelli con alto turnover che rispetto ai normali. In Figura 3 sono riportati i dati relativi ai singoli pazienti uremici dai quali emerge comunque un'ampia sovrapposizione fra i due sottogruppi.

Iperparatiroidismo Primitivo

Date le caratteristiche prospettiche dello studio e la necessità di limitare la lunghezza del periodo di arruolamento, non è stato possibile ampliare il gruppo dei pazienti con questo tipo di patologia. Nonostante il numero esiguo di pazienti disponibili, la media dei valori di PTH in questo gruppo era significativamente più elevata rispetto

ai controlli (Tabella II). Le differenze ottenute con N-Tact e Total Scantibodies erano un po' meno significative rispetto agli altri metodi. Inoltre, con questi due metodi, un paziente aveva valori di PTH ancora in limiti di norma, e la diagnosi corretta è stata possibile grazie ai risultati ottenuti con gli altri metodi. Anche il valore calcolato di CIP differiva in modo significativo ($p < 0.025$) rispetto ai controlli sani.

Discussione

Dai risultati di questo studio prospettico si confermano problemi di affidabilità del dosaggio del PTH, e questi paiono indipendenti dal tipo di metodica usata, incluso il nuovo dosaggio di molecola cosiddetta intera (CAP).

Il dosaggio del PTH è soggetto a fattori di variabilità che possono influenzare in grande misura i risultati ottenibili con la maggior parte dei metodi. Vi è infatti una variabilità pre-analitica, soprattutto biologica, che può essere intra-individuale, dipendente dall'esistenza di una secrezione pulsatile (23) e di ritmi circadiani (24), ed inter-individuale, legata a differenze di sesso, età (25), familiarità (26).

Vi è poi una variabilità analitica, dipendente dalle caratteristiche chimiche del PTH circolante. Abbiamo già accennato al fatto che il PTH è un insieme eterogeneo di molecole circolanti, biologicamente attive, per quello che se ne sa, solo nella forma N-terminale o nella molecola intera (1-84). Gli altri frammenti, prodotti da proteasi già all'interno della ghiandola paratiroidea e nelle cellule del Kupffer epatiche, non hanno una significativa attività biologica. Questi ultimi tuttavia, possono causare interferenze importanti sul dosaggio immunometrico della molecola intatta. È stato infatti dimostrato che l'elevata concentrazione di frammenti C-terminali nell'insufficienza renale, può causare una sottostima del PTH Intatto (27). Più recente è l'osservazione che alcuni frammenti N-troncati in posizione da 3- a 7-, cross-reagiscono con la maggior parte dei metodi per il PTH intatto. Questo è stato verificato utilizzando un frammento sintetico (hPTH 7-84), il quale ha mostrato una reazione crociata per il PTH Intatto, variabile fra il 30% ed il 50-60%, a seconda del metodo (16). La cross-reattività è risultata pressoché nulla utilizzando il metodo Scantibodies per il PTH CAP (18).

Tuttavia, l'interferenza del PTH (7-84) rende conto solo di parte della variabilità fra i diversi metodi da noi osservata. Questo emerge chiaramente dalle prove di recupero effettuate aggiungendo ad un pool di sieri normali una preparazione di PTH sintetico (hPTH 1-84, Bachem) o di hPTH ricombinante (NIBSC 95/646). La percentuale dei recuperi variava dal 77% per N-Tact al 185% per Advantage (28): questo spiega la tendenza del primo a sottostimare e del secondo a sovrastimare (Tab. V) ed indica inoltre che i diversi metodi non sono calibrati in modo simile. In altre parole, la maggior parte della variabilità fra

metodi deriva dalla mancanza di uno Standard di Riferimento Internazionale a cui uniformare le calibrazioni dei metodi stessi. A fronte di questo, i valori di riferimento forniti dalle aziende per il PTH intatto sono per lo più simili.

Si tratta di una semplificazione che, nella pratica clinica, è fonte di potenziale confusione. Infatti, su una casistica di 56 soggetti sani la corrispondenza fra valori di riferimento teorici (delle aziende) e reali (del nostro laboratorio) non è stata soddisfacente, evidenziando una percentuale significativa e variabile da metodo a metodo, di valori over range. Pertanto, nell'analisi dei risultati relativi alla popolazione dei pazienti, abbiamo utilizzato i valori di riferimento da noi verificati e corretti.

Questo ha eliminato solo in parte le difficoltà nell'interpretazione ed utilizzazione clinica dei risultati. I problemi interpretativi coinvolgevano soprattutto pazienti con valori border-line elevati che, ad esempio nella popolazione calcolotica, erano classificati come eu- o iperparatiroidici, a seconda del metodo impiegato. Solo l'impiego di altri parametri pertinenti il metabolismo minerale ha consentito di migliorare l'efficienza del work-up diagnostico dell'iperparatiroidismo.

Problemi analoghi coinvolgono anche la popolazione uremica, in cui il dosaggio del PTH dovrebbe rappresentare il metodo non invasivo più affidabile nella diagnostica della osteodistrofia uremica, orientando le decisioni terapeutiche. In questo caso abbiamo scelto di classificare i pazienti uremici non tanto in riferimento ad un range unico di PTH, quanto assumendo arbitrariamente come predittivi di basso o alto turnover, valori minori o maggiori del doppio del limite superiore della norma per ciascun metodo di dosaggio. In questo modo la concordanza fra metodi nell'allocatione in una delle due sottoclassi è stata quasi completa, e confortata dall'andamento degli altri parametri di metabolismo scheletrico. A questo riguardo il dosaggio del PTH CAP non sembra apportare un significativo vantaggio nell'efficienza diagnostica. Abbiamo anche analizzato la capacità predittiva del rapporto CAP/CIP in analogia a quanto proposto dal gruppo di Malluche (22). In effetti, il rapporto di concentrazione fra peptide attivante e peptide inibente era significativamente più elevato nei pazienti a turnover elevato rispetto a quelli a basso turnover, ma non diverso rispetto ai soggetti normali. Tuttavia, nella nostra casistica il cut-off di 1, assunto come discriminante fra 2 sottogruppi (22), risultava poco significativo poiché, mentre tutti i pazienti con alto turnover avevano CAP/CIP > 1, solo 5/19 (26%) di quelli con basso turnover aveva un rapporto CAP/CIP ≤ 1. La Figura 3 inoltre mostra un'ampia sovrapposizione dei valori fra i due sottogruppi studiati, tale da invalidare il potere discriminante di questo parametro. Non intendiamo enfatizzare queste differenze fra i nostri risultati e quelli di Moenier-Faugere et al (22), in quanto si tratta di un confronto fra due casistiche diverse, quella istomorfometrica e questa

"biochimica". In effetti, la mancanza di dati istomorfometrici in questo lavoro non consente di stabilire un gold-standard di riferimento fra PTH e stato dell'osso. Si noti tuttavia che la correlazione fra PTH e markers biochimici consente valutazioni non invasive ed anche longitudinali ed assicura un confronto più sincrono fra variazioni di PTH e suoi effetti metabolici sull'osso. Questi aspetti meritano ulteriori verifiche cliniche.

Conclusioni

I risultati emersi dal nostro studio evidenziano la persistenza di problemi di affidabilità del dosaggio del PTH con metodi per la molecola c.d. intatta. Dal confronto di 4 metodi diversi non pare emergere uno che sia classificabile come il migliore, stante anche l'ottima correlazione esistente fra metodi. Dai nostri dati l'utilizzazione del metodo per il PTH intero, che dovrebbe dosare solo il PTH-(1-84) senza cross-reazione con i frammenti N-troncati, migliora, ma non risolve l'efficienza diagnostica dei dosaggi. È da ricordare che fra i frammenti N-troncati non vi è solo il 7-84, ma anche altri, troncati in posizione fra 3 e 7. L'uso del rapporto CAP/CIP ha mostrato differenze correlabili con il turnover scheletrico, ma non una speciale capacità discriminante in caso di patologia uremica. La specificità del CAP potrebbe essere ulteriormente migliorata tenendo conto di tutti i frammenti e, ammesso il ruolo inibitorio di questi sul turnover scheletrico, potrebbe essere utile in futuro l'impiego di kit specifici per la loro determinazione, sostituendo pertanto l'attuale stima indiretta con la misura diretta degli stessi.

In attesa che le varie aziende produttrici provvedano ad una migliore standardizzazione dei metodi, è consigliabile che ciascun Centro stabilisca valori di riferimento interni, in base alle specifiche del metodo utilizzato. L'eventuale disponibilità di più di un metodo di dosaggio o l'istituzione di rapporti scambio con laboratori affini, può essere di aiuto nell'interpretazione di valori over-range altrimenti non spiegabili. Pur costituendo un progresso rispetto al PTH intatto in termini di specificità, il metodo per il PTH CAP dovrebbe essere integrato, soprattutto nei pazienti uremici, con il dosaggio diretto dei frammenti inattivi. Inoltre il dosaggio del PTH dovrebbe sempre essere associato con quello di altri parametri di metabolismo minerale e con una valutazione funzionale renale, specie in pazienti con valori *border-line* elevati di PTH.

Riassunto

Premesse. Il dosaggio del paratormone (PTH) ha importanti applicazioni in nefrologia e rientra nella prassi consolidata e formalizzata nelle linee guida SIN. Poiché il dosaggio del PTH Intatto (I-PTH) è soggetto ad interfe-

renze è stato proposto un nuovo metodo per il PTH intero (1-84). Questo studio confronta fra loro e con il PTH intero alcuni metodi per I-PTH. I risultati di ciascuno sono riferiti ad alcuni parametri di metabolismo minerale.

Metodi. Sono stati arruolati 171 soggetti, 56 controlli sani (C), 65 litiasici calcici (NL), 40 emodializzati (HD), 10 iperparatiroidei primitivi (PHP). Su campione ematico sono stati dosati: I-PTH con 4 metodi (N-Tact, Advantage, Elecsys, Scantibodies), PTH intero definito CAP (Cyclase Activating PTH), calcemia totale e ionizzata, fosforemia, vitamine D, osteocalcina e crosslaps. La differenza fra I-PTH Scantibodies e CAP è definita CIP (Cyclase Inhibiting PTH).

Risultati. Vi era notevole dispersione dei valori di PTH fra metodi, anche se tutti correlavano con $r > 0.97$. Per tutti, i valori di riferimento del PTH risultavano diversi da quelli forniti dalle aziende produttrici. Applicando questi range corretti risultava che 10 NL avevano valori over range non sempre associati con altre anomalie di metabolismo minerale. Uno dei pazienti con PHP aveva I-PTH normali con 2/4 metodi. Fra gli HD la dispersione di valori era anche maggiore, vi erano correlazioni inversa con il calcio ionizzato ($p < 0.05$) e diretta con osteocalcina e crosslaps ($p < 0.001$). Il rapporto CAP/CIP era più basso in HD con basso turnover, ma con ampia sovrapposizione fra i due sottogruppi.

Conclusioni. Dallo studio emerge la persistenza di problemi di affidabilità nel dosaggio I-PTH, e fra i 4 metodi testati non pare emergere uno migliore. Il dosaggio CAP migliora ma non risolve l'efficienza diagnostica, mentre il

rapporto CAP/CIP non ha un'accettabile capacità discriminante in HD. È pertanto consigliabile che ciascun Centro stabilisca valori di riferimento interni. Il dosaggio del PTH dovrebbe sempre essere affiancato da quello di altri parametri di metabolismo minerale e da una valutazione funzionale renale.

Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento ai colleghi chimici: Dr. Michele Petrarulo, del Laboratorio di Calcolosi Renale, e D.sse Caterina Zaffino e Lucrezia Gallo del Laboratorio Centrale dell'Ospedale Mauriziano, per la preziosa e fattiva collaborazione.

Indirizzo degli Autori:
Dr. Martino Marangella
Centro Calcolosi Renale
Ospedale Mauriziano
Largo Turati, 62
10128 Torino
e-mail: mmarangella@mauriziano.it

Bibliografia

1. Canavese C, Andriani M, Brancaccio D, et al. Linee guida sull'osteodistrofia renale. *G Ital Nefrol* 2000; 17 (suppl 2): S1-23.
2. Baggio B, Borghi L, Caudarella R, Gambaro G, Marangella M, Messa PG. Linee guida per la nefrolitiasi. *G Ital Nefrol* 2000; 17 (suppl 2): S59-64.
3. Berson SA, Yalow RS. Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1968; 28: 1037-47.
4. Segre GV, Niali HD, Habener JF, Potts JT Jr. Metabolism of parathyroid hormone: physiological and clinical significance. *Am J Med* 1974; 56: 774-84.
5. Segre GV. Heterogeneity and metabolism of parathyroid hormone. In: *Endocrinology*. LJ DeGroot et al. Grune & Stratton Inc. New York 1979; 613-9.
6. Pak CYC, Ohata M, Lawrence EC, Snyder W. The hypercalcemias: causes, parathyroid functions and diagnostic criteria. *J Clin Invest* 1974; 54: 387-400.
7. Hess B, Cazes JP, Takkinen R, Ackermann D, Jaeger P. Relative hypoparathyroidism and calcitriol up-regulation in hypercalcemic renal stone formers: Impact of nutrition. *Am J Nephrol* 1993; 13: 18-26.
8. Quarles LD, Lobaugh B, Murphy G. Intact parathyroid hormone overestimates the presence and severity of parathyroid-mediated osseous abnormalities in uremia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 145-50.
9. Qi Q, Moenier-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: 622-31.
10. Torres A, Lorenzo V, Hernandez D, et al. Bone disease in predialysis, hemodialysis and CAPD patients: evidence of a better response to PTH. *Kidney Int* 1995; 47: 1434-42.
11. Endres D, Brickman A, Goodman W, Maloney D, Sherrard D. N- and C-terminal PTH radioimmunoassays in assessment of renal osteodystrophy. *Kidney Int* 1982; 21: 132.
12. Mallette LE, Tuma SN, Berger RE, Kirkland JL. Radioimmunoassay for the middle region of human parathyroid hormone using an homologous antiserum with a carboxy-terminal fragment of bovine parathyroid hormone as radioligand. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 1017.
13. Nussbaum S, Zahradnik R, Lavigne J, et al. Development of a highly sensitive two site immunoradiometric assay for parathyroid hormone and its clinical utility in evaluation of patients with hypercalcemia. *Clin Chem* 1987; 33: 1364-7.
14. Goodman WG, John MR, Juppner H, Salusky IB. Parathyroid hormone-Immunoassays as noninvasive predictors of renal osteodystrophy: The need for bone histomorphometric

- validation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1841-2.
15. Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barre M, D'Amour P. Accumulation of a non-(1-84) molecular form of PTH detected by intact PTH assay in renal failure: Importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3823-9.
 16. Lepage R, Brossard JH, Rousseau L, Dorais C, Lazure C, D'Amour P. A non-(1-84) circulating PTH interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clin Chem* 1998; 44: 805-9.
 17. Martin KJ, Hruska KA, Lewis J, Anderson C, Slatopolsky E. Renal handling of parathyroid hormone. Role of peritubular uptake and glomerular filtration. *J Clin Invest* 1977; 60: 808-12.
 18. John MR, Goodman WG, Gao P, Saluski IB, Juppner H. A novel immunoradiometric assay detects full-length human PTH but not amino-terminally truncated fragments: implications for PTH measurements in renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4287-90.
 19. Slatopolsky E, Finch JL, Clay P, et al. A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney Int* 2000; 58: 753-61.
 20. Ferreira A. Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy: what do we have, what do we need? *Nephrol Dial Transplant* 1988; 18: 29-32.
 21. Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P, et al. Clinical evaluation of the serum Crosslaps™ one step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 1998; 44: 2290-300.
 22. Moenier-Faugere MC, Geng Z, et al. Improved assessment of bone turnover by the PTH-(1-84)/large C-PTH fragments ratio in ESRD patients. *Kidney Int* 2001; 60: 1460-8.
 23. Schmitt CP, Schaefer F, Bruch A, et al. Control of pulsatile and tonic parathyroid hormone secretion by ionized calcium. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4236-43.
 24. El-Hajj Fuleihan G, Klerman EB, Brown EN, Choe Y, Brown EM, Czeisler CA. The parathyroid hormone circadian rhythm is truly endogenous--a general clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 281-6.
 25. Sherman SS, Hollis BW, Tobin JD. Vitamin D status and related parameters in a healthy population: the effects of age, sex, and season. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 405-13.
 26. Otremski I, Karasik D, Livshits G. Genetic variation and covariation of parathyroid hormone levels and bone density in the human population. *Calcif Tissue Int* 2000; 66: 168-75.
 27. Blind E, Raue F, Reichel H, Schmidt-Gayk H. Validity of intact plasma parathyrin measurements in chronic renal failure as determined by two-site immunoradiometric assays with N- or C-terminal capture antibodies. (Letter) *Clin Chem* 1992; 38: 2345-47.
 28. Migliardi M, Marranca D. La misura del paratormone: fattori di variabilità e problemi di standardizzazione. *Ligand Assay* 2001; 6: 117-9.

Giunto in Redazione il 6.5.2002
Accettato il 20.7.2002