

Evaluación de un procedimiento inmunoquimioluminiscente para la determinación de procalcitonina en suero y orina

A. Enguix¹, P. Roura², I. Pinto¹, C. Rey³, M.^aA. Diéguez²

Resumen

La procalcitonina es un péptido de 116 aminoácidos que se comporta frente a la infección bacteriana como una proteína reactante de fase aguda. Para su cuantificación existe un procedimiento que se trata de un equipo comercial inmunoquimioluminiscente con doble anticuerpo monoclonal.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el procedimiento mencionado para la determinación de la procalcitonina en suero, su recuperación en orina, así como sus valores de referencia y utilidad clínica en pacientes pediátricos. Los resultados del estudio de repetibilidad mostraron coeficientes de variación intraserial entre 5,87% y 13,8% e interserial de 25,9% y 10,8% para concentraciones de 31,0 µg/L y 0,81 µg/L respectivamente. El límite de detección fue de 0,26 µg/L. Linealidad: lineal hasta 502 µg/L. Interferencias endógenas: no existe interferencia por bilirrubina hasta 352,3 µmol/L, hemoglobina hasta 6,13 g/L y triglicérido hasta 10,36 mmol/L. No se halló variación significativa entre los 3 lotes evaluados (*t*-Student; *P*>0,05). Recuperación en orina: es lineal de 0 a 85 µg/L (*r*=0,998). Valores de referencia: 0,26-0,45 µg/L (*n*=100). Utilidad clínica: sensibilidad diagnóstica del 100% y especificidad diagnóstica del 100% en el caso de sepsis pediátricas en el momento de ingreso hospitalario (*n*=77). Concluimos que el procedimiento evaluado, es satisfactorio para la cuantificación de la procalcitonina y clínicamente útil en el diagnóstico de sepsis pediátricas.

Introducción

La procalcitonina es una proteína de 116 aminoácidos con una masa molar 13 000 g/mol y es la prohormona de la calcitonina (la escisión enzimática de la procalcitonina dará lugar a tres péptidos: catacalcina, calcitonina y un fragmento N-terminal). Su sitio de producción, en casos de sepsis, no corresponde a las células C del tiroides y permanece aún desconocido. Se sabe que se sintetiza como respuesta a las endotoxinas bacterianas y es inducida por la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral α . Su función, en el contexto de una reacción inflamatoria aguda, sería el de modular la producción de eicosanoides e incluso, su acción sería similar a la de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos como los salicilatos; inhibiendo las ciclooxigenasas 1 y 2 (1,2).

Summary

Procalcitonin is a 116 aminoacid peptide which responds as an acute phase response protein to a bacterial infection. For its measurement only exist a luminometric immunassay with two monoclonal antibodies "sandwich" type.

The aim of the present work was to evaluate that procedure for procalcitonin quantification in serum, urine recovery, to assess their reference values and the clinical usefulness. The results showed an intraassay coefficients of variation of 13,8% and 5,87% in a range of concentration of 0,81 µg/ml and 31,0 µg/L respectively. The interassay coefficients were 25,9% and 10,8% for the same range. The detection limit was 0,26 µg/L. The method was linear up to 502 µg/L. There are no interferences due to bilirubin: up to 352,3 µmol/L, hemoglobin: up to 6,13 g/L and tryglicerides up to 10,36 mmol/L. There was not significantly differences between the 3 lots of reactivates evaluates. The urine recovery was linear from 0 to 85 µg/L. The reference values were 0,26-0,45 µg/L. Clinical usefulness: the sensitivity was 100% and specificity 100% in pediatric sepsis at the admission hospital time. We conclude that the procedure for procalcitonin quantification was suitable and usefull for diagnosis of pediatric sepsis.

El interés clínico de la procalcitonina radica en el hecho de que, como respuesta a una infección bacteriana generalizada, incrementa su síntesis hasta cientos de veces sus valores basales, es decir, se comporta como una proteína reactante de fase aguda. Según diferentes autores, su sensibilidad y especificidad diagnósticas son mayores a las de otras proteínas reactantes de fase aguda utilizadas habitualmente para el diagnóstico y pronóstico de la sepsis bacteriana: proteína C reactiva y seroamiloides A. La sepsis bacteriana es una de las causas de mayor mortalidad en niños y neonatos, por tanto es importante disponer precozmente de una magnitud biológica que posea una sensibilidad y especificidad diagnósticas elevada (3-9).

Actualmente existe un procedimiento comercial disponible que corresponde a un procedimiento inmunoquimioluminiscente manual, que se está empleando en numerosos trabajos de investigación, pese a ello, no hemos encontrado ningún estudio evaluando de forma protocolizada dicho procedimiento.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el procedimiento mencionado para la determinación de la procalcitonina en suero, su recuperación en orina, así como sus valores de referencia y utilidad clínica en pacientes pediátricos.

¹Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Carmen y Severo Ochoa. Cangas del Narcea, Asturias

²Servicio de Inmunología. ³Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos, Oviedo, Asturias

Recibido: 22-9-99

Aceptado: 17-10-00

Material y métodos

Instrumentación

Luminómetro Lumat LB 9507 (EG & BETHOLD; 75312 Bad Wildbad, Alemania) BRAHMS con doble inyector. El software permite la obtención directa de unidades relativas de luminiscencia, calcular la curva de calibración con 6 calibradores o bien utilizar una curva patrón con 2 calibradores.

Reactivos y material de control

Todos los reactivos, calibradores y controles fueron suministrados por el fabricante en forma liofilizada para reconstituir con matriz sérica humana sin procalcitonina.

El material estándar que utiliza la casa comercial en la preparación de los calibradores y controles es un péptido de 47 aminoácidos calibrado respecto a la molécula intacta de procalcitonina (116 aminoácidos). Posteriormente, calibradores y controles son valorados en una serie de, al menos 20 determinaciones, con el mismo procedimiento aquí evaluado.

Dado que no existe ningún procedimiento de referencia para la cuantificación de procalcitonina, la exactitud y precisión del procedimiento, va a depender en cierta medida del lote del equipo de reactivos. En nuestro estudio, para la repetibilidad intraserial utilizamos el lote n.º.805407, para la imprecisión interserial el lote n.º.905402 y para la variación entre lotes (lotes n.º. 905402, n.º.905409 y n.º.005403) utilizando como material de control una mezcla de sueros de pacientes con sepsis. El trazador y el material de calibración y control fue congelado y descongelado hasta tres veces (la casa comercial dice que puede hacerse hasta 10 veces).

Principio de medida

Es un inmunoanálisis de doble anticuerpo monoclonal (tipo «sandwich») en el que un anticuerpo se dirige contra la región de la catacalcina y el otro de la calcitonina. Este último anticuerpo va unido al trazador éster de acridinio y el anterior va fijado a las paredes internas del tubo.

Tras un periodo de incubación de 2 horas, se hacen tres lavados con una solución amortiguadora apropiada, para eliminar el exceso de anticuerpo-trazador y se pasa a cuantificar el restante (unido a las paredes del tubo). Esto último se hace ya en el luminómetro, se inyectan secuencialmente 2 reactivos (H_2O_2 en medio ácido + NaOH) para hidrolizar el enlace éster, que a través de unas reacciones secundarias, producirá luminiscencia proporcionalmente a la concentración de procalcitonina.

Calibración

Para la calibración, empleamos 6 calibradores: de 0,08 $\mu\text{g/L}$ a 474 $\mu\text{g/L}$ ó 502 $\mu\text{g/L}$, dependiendo del lote de reactivos, por duplicado y una curva estándar con ajuste log/logit.

Procedimiento de evaluación

Se ha realizado, siguiendo siempre que fue posible, las recomendaciones de la SEQC (10-11).

Imprecisión: para evaluar la repetibilidad intraserial se ha procesado una serie de 30 determinaciones en dos días diferentes y a dos concentraciones. La repetibilidad interserial se ha evaluado en una serie de 20 determinaciones en diez días diferentes y también a dos concentraciones. Para la variación entre lotes se hizo una serie de 10 determinaciones para cada uno de los tres lotes ($n=30$).

Linealidad: se emplearon diluciones por triplicado del calibrador de mayor concentración (502 $\mu\text{g/L}$) en el calibrador cero (matriz sérica) a 6 concentraciones distintas.

Límite de detección: se calculó como el promedio del calibrador cero más 2,33 desviaciones típicas en dos series de 10 mediciones ($n=20$).

Interferencias: se analizaron mezclas de sueros con las sustancias interferentes y sin ellas por quintuplicado y se efectuó la prueba t-Student para muestras apareadas, si dicha prueba no resultara significativa ($P>0,05$), se considera que el constituyente estudiado, no produce interferencia (10-11)

– **Bilirrubina:** se preparó un estándar de bilirrubina de 4275 $\mu\text{mol/L}$ en solución amortiguadora alcalina (1% NaOH 5mol/L en solución PBS pH=7,4) con una concentración final de 388 $\mu\text{mol/L}$ de bilirrubina. A 1mL de la mezcla anterior se añadieron 100 μL de un calibrador de procalcitonina de concentración 474 $\mu\text{g/L}$ obteniéndose unas concentraciones finales de 352,3 $\mu\text{mol/L}$ de bilirrubina y 43,1 $\mu\text{g/L}$ de procalcitonina.

– **Hemoglobina:** se preparó un estándar primario de hemoglobina de 6,75 g/L en una mezcla de sueros de individuos presuntamente sanos. Posteriormente, se añadieron 200 μL de calibrador de procalcitonina de concentración: 474 $\mu\text{g/L}$ obteniéndose unas concentraciones finales de 6,13 g/L de hemoglobina y 43,1 $\mu\text{g/L}$ de procalcitonina.

– **Triglicérido:** como fuente de triglicérido, empleamos suero de alimentación parenteral INTRALIPID[®] (20% aceite de soja purificado). La concentración de triglicérido, para dicho compuesto, medida en un analizador CX DELTA mediante el método lipasa-glicerol cinasa a punto final sin corrección de glicerol fue de 310,75 mmol/L. La dilución empleada como interferente fue de 1/30 (10,36 mmol/L).

Exactitud: calculamos la desviación relativa de los valores medios de los controles usados en la repetibilidad interserial, respecto al valor diana suministrado por los fabricantes (11).

Recuperación en orina: dada la baja masa molar de la procalcitonina, existía la posibilidad de que se filtrase y excretase en orina, por tanto habría que saber si el equipo comercial pensado para cuantificarla en suero sería válido también para la orina. Para valorar la recuperación se añadieron diferentes cantidades del calibrador más alto de procalcitonina (502 $\mu\text{g/L}$) a una mezcla de orinas cuya concentración de procalcitonina estaba por debajo del límite de detección del procedimiento.

Pacientes

a) 100 niños sanos procedentes de revisiones escolares (4 a 16 años de edad). b) 45 pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos sin infección aguda o crónica. c) 32 pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos con sepsis probada mediante cultivo bacteriano y/o respuesta favorable al tratamiento antibiótico empírico. Las extracciones para la determinación de procalcitonina en los grupos b) y c) se llevaron a cabo en el momento del ingreso.

Resultados

Imprecisión: la tabla I muestra los coeficientes de variación intra e interserial, así como los valores medios (\bar{x}) y la desviación típica (s).

Tabla I. Estudio de la imprecisión

$\mu\text{mol/L}$	Control I			Control II		
	\bar{x}	s	CV (%)	\bar{x}	s	CV (%)
Variación Intraserial ($\mu\text{g/l}$) $n = 30$	0,81	0,11	13,83	31,0	1,82	5,87
Variación Interserial ($\mu\text{g/l}$) $n = 20$	0,85	0,22	25,9	32,3	3,50	10,8

Tabla II. Variación entre lotes

	LOTE 905402	LOTE 95409	LOTE 005403
\bar{x} ($\mu\text{g/L}$)	43,4	44,7	45,6
s ($\mu\text{g/L}$)	2,97	3,31	3,22

Variación entre lotes: ver tabla II

Linealidad: la figura 1 muestra la recta obtenida. Las desviaciones de los valores medidos respecto a los esperados no exceden el 5%

Límite de detección: 0,26 $\mu\text{g/L}$

Interferencias:

- Bilirrubina. No hay interferencia hasta 352,3 $\mu\text{mol/L}$ para una concentración de procalcitonina de 43,5 $\mu\text{g/L}$; $P=0,785$.

- Hemoglobina. No hay interferencia por hemólisis hasta 6,13 g/L de hemoglobina para una concentración de procalcitonina de 45,6 $\mu\text{g/L}$; $P=0,566$.

- Triglicérido. No hay interferencia hasta 10,36 mmol/L para una concentración de procalcitonina de 43,5 $\mu\text{g/L}$; $P=0,087$.

Exactitud o error relativo: -16,8% en el control de valor diana 1,01 $\mu\text{g/L}$ y 7,48 % en el control de valor diana 29,4 $\mu\text{g/L}$.

Recuperación en orina: lineal de 0 a 85 $\mu\text{g/L}$. Ver figura 2.

Resultados obtenidos en individuos con diferentes situaciones clínicas: ver tabla III.

Tabla III. Concentraciones de procalcitonina en los pacientes estudiados

	n	Mediana ($\mu\text{g/L}$)	X 2,5 ($\mu\text{g/L}$)	X 97,5 ($\mu\text{g/L}$)
Individuos sanos	100	0,2	0,2	0,45
Pacientes con sepsis	32	45,1	7,3	491
Pacientes sin sepsis	45	0,41	0,3	5,2

Discusión

Dado que el procedimiento evaluado no está automatizado, era de esperar que los coeficientes de variación intra e interserial fueran elevados (tabla I), sobre todo a bajas concentraciones, pero como las medianas entre las muestras de individuos sin sepsis y con sepsis difieren significativamente ($P<0,01$; Mann-Whitney) esta circunstancia, en principio, podría soslayarse.

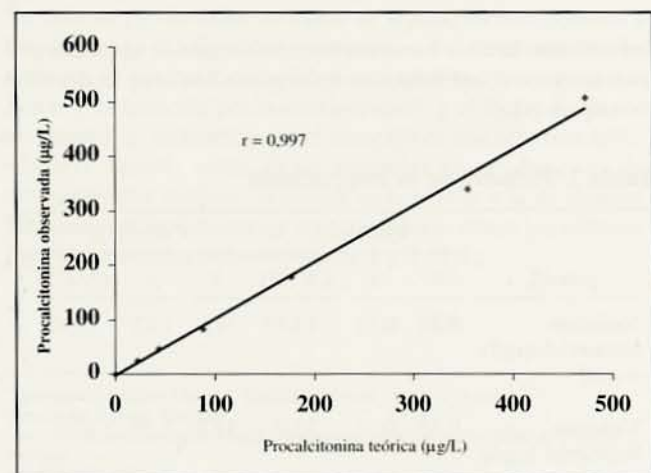


Figura 1. Estudio de la linealidad

La variación entre lotes no es significativa a la concentración estudiada ($P>0,05$; test *t*-Student para muestras apareadas).

El hecho de que el presente procedimiento sea lineal hasta 502 $\mu\text{g/L}$, evita el tener que hacer diluciones en la mayoría de los casos.

Es importante destacar que no existen interferencias significativas para la ictericia y la hemólisis, dado que es frecuente que las de muestras analizadas en neonatos tengan ictericia o están hemolizadas, sobre todo cuando se trata de pacientes con sepsis.

Aunque no se sabe si la cuantificación en orina tiene alguna relevancia clínica, hemos comprobado que el equipo de reactivos se comporta igual que en suero para dicho medio.

En el caso de pacientes estudiados (pediátricos ingresados en una unidad de cuidados intensivos), no existe solapamiento entre las concentraciones de pacientes con sepsis y los que tienen otro tipo de proceso inflamatorio no séptico como: politraumatizados, postquirúrgicos o insuficiencias respiratorias no infecciosas y mucho menos con los valores obtenidos en individuos presuntamente sanos cuyo intervalo de referencia fue de 0,26-0,45 $\mu\text{g/L}$. Creemos (de acuerdo con otros autores) que la procalcitonina, medida con el procedimiento evaluado, puede tener una sensibilidad y especificidad diagnóstica superiores a otras proteínas reactivas de fase aguda para el diagnóstico precoz de la sepsis bacteriana, siendo en nuestro estudio de un 100% ambas (intervalo de confianza del 95%) (3-9).

Correspondencia

A. Enguix
Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Carmen y Severo Ochoa
Ctra Leitariegos s/n.
33800 Cangas del Narcea, Asturias
e-mail: aenguix@heso.insalud.es

Bibliografía

1. Meisner M, Tschalkowsky K, Spießl Ch, Schtler J. Procalcitonin a marker or modulator of the acute immunoresponse?. *Intensive Care Med* 1996; 1:14
2. Wang KT, Vat ST, Nylsen ES, Muller B, Li Q et al. Procalcitonin and proinflammatory cytokine in interactions in sepsis. *Shock* 1999; 12:268-73
3. Póvoa P, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, Meahla R, Aragao A, et al. C-reactive-Protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med* 1998; 24: 1052-6
4. Chiesa C, Pacifico L, Mancuso G, Panero A. Procalcitonin in Pediatrics: Overview and Challenge. *Infection* 1998; 26: 38-42.
5. Chiesa C, Panero N, Rossi M, De Guisti J, Osborn F, Pacifico L. Reliability of Procalcitonin concentrations for diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998; 26:664-72
6. Raymond J, Assicot M, Moulin F, Iniguez JL, Lebou P. Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial and viral meningitis. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1240-2

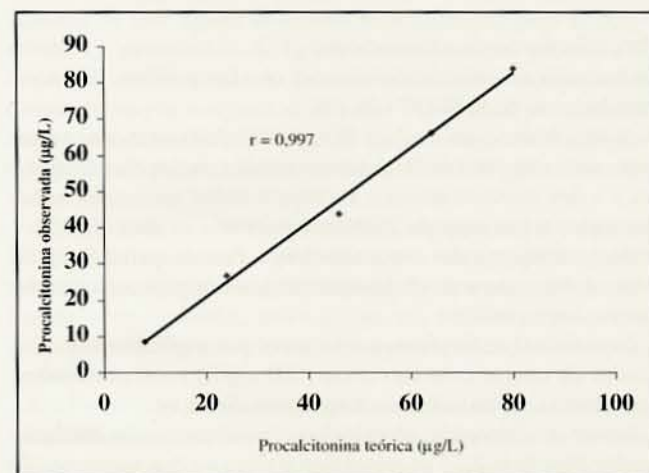


Figura 2. Estudio de recuperación en orina

7. Al Navas B, Kramer I, Shah PM. Procalcitonin in diagnosis of severe infections. *Eur J Med Res* 1996; 1:331-3

8. Ugarte H, Silva E, Mercan D, De Mendonça A, Vincent JL. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 1999; 27: 498-504

9. Moneret G, Labaune JM, Isaac C, Bienvenue F, Putet G, Bienvenue J.

Procalcitonin and C-Reactive levels in neonatal infections. *Acta Paediatr* 1997; 86:209-12

10. Antoja F, Gascón N, Galimany R. Interferencias Analíticas en Química Clínica. Barcelona: SEQC, 1993.p.21-4

11. Martínez M, Bertran N, Alumà A. Selección y Evaluación de Sistemas Analíticos. Barcelona:SEQC, 1994.p.47-8