

Hållbarhetsstudie på adrenokortikotropt hormon (ACTH) i blodprov från häst

Projektnummer: H1247096

Ulrika Falkenö¹, Sanna Truelsen-Lindåse², Johan Bröjer², Inger Lilliehöök^{1,2}

¹Klinisk kemiska laboratoriet, ²Inst för kliniska vetenskaper, Sveriges Lantbruksuniversitet.

Bakgrund

Equine pituitary pars intermedia dysfunction (PPID), även kallat Cushings syndrom hos häst, är en progressiv sjukdom i intermediära hypofysen som drabbar ca 15–25% av alla äldre hästar[1]. Vid PPID ses hyperplasi och adenom i hypofysens pars intermedia och troligen beror PPID i grund och botten på en förlust av dopaminerg innervation av hypofysen [2]. Dopamin har en inhiberande effekt på cellerna i hypofysens pars intermedia och förlusten leder således till en ökad produktion av peptidhormoner, bl.a. adrenokortikotropt hormon (ACTH), från det drabbade området. Detta kan leda till funktionsrubbnings i binjurebarken på grund av att ACTH stimulerar ökad produktion av kortisol. Detta leder till en mängd olika följsymtom [3] som t.ex. hirsutism (abnormal hårtillväxt), muskelatrofi, fång (inflammation i hovarna), opportunistiska infektioner och insulinresistens[4].

Vid misstanke om PPID har tidigare framförallt dexametasonhämningstest (ett 0-blodprov tas, sedan ges en injektion med dexametason och nytt prov tas dagen efter) använts som diagnostiskt test. Detta test har dock ganska låg säkerhet för att diagnostisera PPID och det finns viss risk för negativa effekter av dexametason om hästen har fång. Analys av ACTH-koncentration har visat sig vara ett enkelt och bra sätt att diagnostisera PPID [5, 6] och därför vore det önskvärt om det gick att analysera ACTH på dessa patienter. Många laboratorier kräver att blodprover för analys av ACTH ska centrifugeras och frysas direkt efter provtagning och att de ska skickas frysta till laboratoriet. Detta är svårt att lösa praktiskt för de flesta hästveterinärer. Analys av plasma-ACTH i prov från människa är problematiskt då ACTH bryts ned av proteolytiska enzymer i både helblod och plasma [7-10]. Studier på humant blod har visat att hemolys gör att den nedbrytande processen av ACTH går fort och att det därför är viktigt att provet förvaras på is och att analysen sker så snart som möjligt efter provtagningen. I en studie på hund kunde endast en liten skillnad i ACTH-nivåer ses mellan prover insamlade under kyllda förhållanden och prover insamlade vid rumstemperatur[11]. Att resultaten ser så olika ut indikerar att det kan finnas en skillnad i hållbarheten av ACTH mellan olika djurarter. Det har nyligen kommit några studier som talar för att ACTH i plasma har bättre hållbarhet än man tidigare trott [12, 13]. Möjligheten att analysera ACTH i blodprover från häst skulle underlätta och förbättra möjligheten att ställa diagnosen PPID. Det primära syftet med studien var att studera hållbarheten av ACTH i vanliga blodprov tagna från häst. Om blodproverna kan förvaras i rumstemperatur fram till analys skulle det göra denna analys tillgänglig för alla veterinärer. Dessutom ville vi göra en basal utvärdering av metodens precision/linjäritet, samt undersöka hur hemolys och olika provtagningsmaterial påverkar ACTH-koncentrationen

Material och metoder

Analysmetod

ACTH-koncentrationen i blodprover från häst analyserades på Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU med hjälp av Immulite 2000 Immunoassay System (Siemens)

Heathcare Diagnostics) som är ett automatiserat instrument för fast-fas kompetitiv kemiluminescent enzym-immunometri. Metoden har tidigare validerats för analys av ekvint ACTH [6]. Metodens precision undersöktes genom att två prover analyserades i triplikat fem dagar i rad, vilket ger ett värde för den totala imprecisionen (både variationen inom och mellan olika analyskörningar). Metodens reproducerbarhet vid spädning undersöktes genom spädning i 10 steg.

Hållbarhetsstudien

Hållbarheten på ACTH i både EDTA-plasma och EDTA-helblod som förvarats i rumstemperatur, kyl och frys undersöktes i blodprov från fem hästar. Blodet togs med en 20ml spruta. Detta blod delades sedan direkt upp i 3 EDTA-rör

- Ett EDTA-rör (7ml) hanterades under optimala förhållanden, d.v.s. togs i kylt EDTA-rör, transporterades på is, centrifugerades i kylcentrifug och plasma analyserades direkt (inom 30 min från provtagning). Resterande plasma fördelades i 2 små rör och fryses in. Dessa tinades och analyserades efter 1 och 2 dygn.
- Ett EDTA-rör (7ml) togs, transporterades och centrifugerades i rumstemperatur. Provet analyserades därefter. Plasma delades upp i 2 rör. Det ena förvarades i rumstemperatur och det andra i kylskåp. De analyserades efter 1 och 2 dygn.
- Ett EDTA-rör (7ml) hanterades som EDTA-helblod, d.v.s. plasma avskildes inte från blodcellerna. Efter 1 och 2 dygn hölls 2 mL helblod av i ett nytt rör som centrifugerades och analyserades.

Effekt av hemolys

Cellpelleten i ett EDTA-rör med lite kvarlämnad plasma placerades i -80°C fryser över natten och EDTA-plasman från samma prov i -20°C. Dagen efter tinades bägge rören. Röret med cellpellet centrifugerades och den kraftigt hemolyserade plasman avskildes. En liten volym av detta hemolysat tillsattes ett rör med EDTA-plasman så hemolysgraden blev på kliniskt relevant nivå; måttlig till kraftig hemolys med hemoglobin mellan 3-8g/L. Sen analyserades både originalplasman och plasma med tillsatt hemolys. Detta upprepades efter 24 timmar i rumstemperatur.

Effekt av olika provtagningsmaterial

ACTH-koncentrationen i 19 blodprover tagna i både EDTA och heparinrör (natriumheparin) analyserade samtidigt.

Resultat

Metoden för analys av ACTH i blodprover från häst var linjär vid spädning (Figur 1) och totala mätosäkerheten var mellan 5-8% för två olika prover.

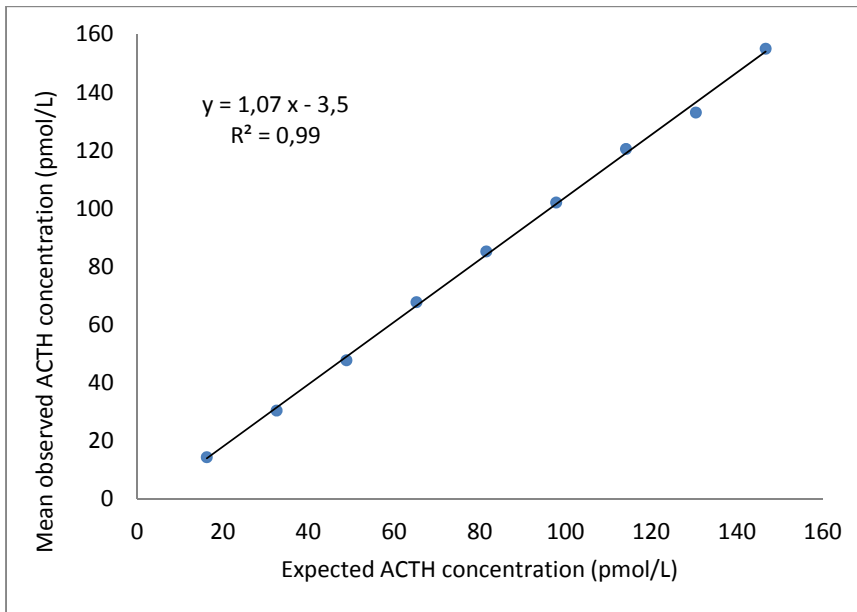
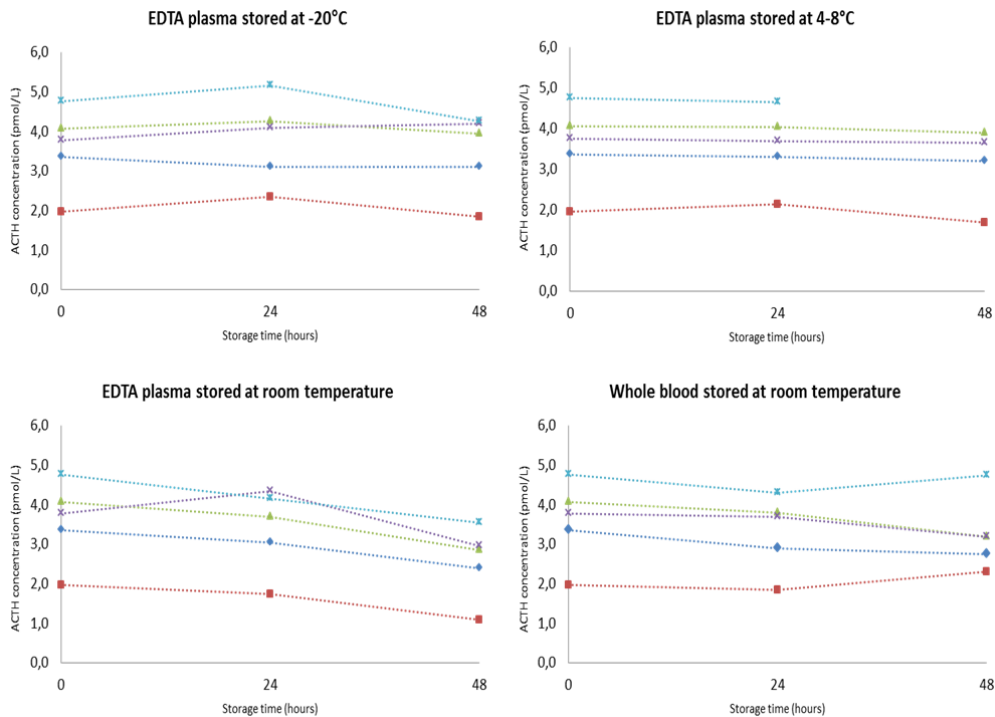


Figure 1: Linearitet vid spädning av poolad hästplasma med ACTH koncentration 163pmol/L. Spädning i tio steg 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 % med destillerat vatten.

Hållbarhet

Hållbarheten för ACTH-koncentrationen i EDTA-plasma som förvarats i -20°C and $4-8^{\circ}\text{C}$ upp till 2 dagar, samt i rumstemperatur i 1 dygn var godtagbar (Figur 2). Även EDTA-helblod förvarat i rumstemperatur i 24 timmar visade godtagbar hållbarhet, d.v.s. förändrades mindre än 15 % jämfört med provet som hanterats enligt alla rekommendationer (T0). Efter 48 timmar hade koncentrationen i EDTA-plasma sjunkit med 24-44 % jämfört med T0. Förändringen i helblod efter 48 timmar var mer varierande, från en ökning på 17 % till en minskning på 21 %.



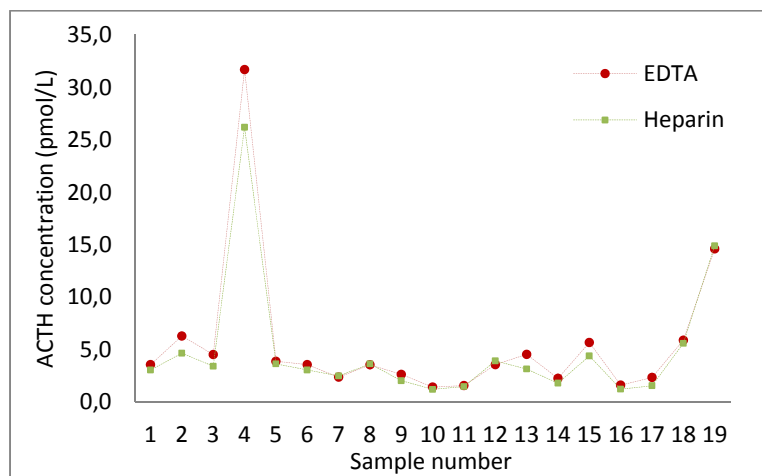
Figur 3: Förändringar i ACTH koncentration i fem hästprover förvarade som EDTA plasma i -20°C , $4-8^{\circ}\text{C}$ och rumstemperatur samt som EDTA-helblod i rumstemperatur i 48 timmar.

Effekt av hemolys

Hemolys påverkade analysen av ACTH med upp till 33 % redan vid analystillfället direkt efter tillsatsen. Efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur hade EDTA-plasma med hemolys lägre ACTH-koncentration än EDTA-plasma utan hemolys, dvs sjunkit mer än i originalplasma provet.

Effekt av olika provtagningsmaterial

ACTH-koncentrationen blev i genomsnitt 15 % lägre i heparinplasma jämfört med EDTA-plasma, men spridningen av resultaten var ganska stor (-34 till +10%) (Figur 3).



Figur 3: Jämförelse av ACTH koncentrationer uppmätt i EDTA och heparin plasma i prover från 19 hästar

Diskussion

Denna studie visar att hållbarheten av ACTH i EDTA-plasma var godtagbar vid förvaring i kyl i två dygn och i rumstemperatur i upp till ett dygn. Detta överensstämmer med tidigare studier [12, 13]. I vår studie studerade vi även hållbarhet på EDTA-helblod förvarat i rumstemperatur, vilket inte är beskrivet tidigare. Överraskande nog verkade det vara lite bättre hållbarhet på helblod jämfört med EDTA-plasma, men vid transport/förvaring som helblod är det större risk för hemolys, vilket verkade försämra hållbarheten.

Analys av ACTH i heparinplasma gav snarlika diagnostiska nivåer av ACTH, men de gav lite olika resultat. Därför bör rekommendationen kvarstå att alltid använda samma antikoagulantium och EDTA är det antikoagulantia som är mest utvärderat. Enligt information från reagenstillverkaren (Siemens Diagnostics) ger heparinplasma lägre ACTH-koncentration jämfört med EDTA-plasma även i prover från människor.

Analysmetoden för ACTH-koncentration i EDTA-prov som användes i denna studie var linjär och hade godtagbar precision. Mätområdet mellan 1 och 278 pmol/L täcker väl det diagnostisk relevanta området för hästar med misstänkt PPID.

Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)

Blodprover för diagnos av PPID hos häst kan tas, hanteras och skickas i rumstemperatur i åtminstone ett dygn. Om proverna förvaras i kyl eller fryses förbättras hållbarheten.

Blodkroppssönderfall (hemolys) i provröret försämrar hållbarheten på ACTH. Prover tagna i heparin ger inte samma resultat som prover tagna i EDTA-plasma.

Baserat på våra studier av prestanda för metoden och hållbarhet på ACTH, så analyseras numera ACTH på Klinisk kemiska laboratoriet, UDS, SLU. Analysen finns tillgänglig både för veterinärer inom SLU, men även inskickade prover. Under en lång period har ACTH-analys ingått som en del i Sanna Truelsens studier på en del hästar med ekvint metabolt syndrom (EMS), vilket möjliggör forskning på dessa data framöver.

Publikationer och Resultatförmedling till näringen

Ett manuskript finns, "Preanalytical aspects and stability of equine adrenocorticotrophic hormone (ACTH)", och det kommer att skickas till internationell vetenskaplig tidskrift inom kort. När manuskriptet är publicerat, så kommer vi även sammanfatta resultaten och publicera dem på Klinisk kemiska laboratoriet hemsida, SLUs nyhetsbrev, mm.

Referenser

1. McFarlane D, Paradis MR, Zimmel D, Sykes B, Brorsen BW, Sanchez A, Vainio K: **The effect of geographic location, breed, and pituitary dysfunction on seasonal adrenocorticotrophic and alpha-melanocyte-stimulating hormone plasma concentrations in horses.** *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 2011, **25**:872-881.
2. Schott HC, 2nd: **Pituitary pars intermedia dysfunction: equine Cushing's disease.** *The Veterinary clinics of North America Equine practice* 2002, **18**:237-270.
3. McCue PM: **Equine Cushing's disease.** *The Veterinary clinics of North America Equine practice* 2002, **18**:533-543, viii.
4. McFarlane D: **Equine pituitary pars intermedia dysfunction.** *The Veterinary clinics of North America Equine practice* 2011, **27**:93-113.
5. Couetil L, Paradis MR, Knoll J: **Plasma adrenocorticotrophic concentration in healthy horses and in horses with clinical signs of hyperadrenocorticism.** *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 1996, **10**:1-6.
6. Perkins GA, Lamb S, Erb HN, Schanbacher B, Nydam DV, Divers TJ: **Plasma adrenocorticotrophic (ACTH) concentrations and clinical response in horses treated for equine Cushing's disease with cyproheptadine or pergolide.** *Equine veterinary journal* 2002, **34**:679-685.
7. Evans MJ, Livesey JH, Ellis MJ, Yandle TG: **Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones.** *Clinical biochemistry* 2001, **34**:107-112.
8. Hogan P, Rees LH, Lowry PJ, Ratter S, Snitcher EJ: **Studies on the stability of human adrenocorticotrophic in blood and plasma.** *Journal of endocrinology* 1976, **71**:63-64.
9. Livesey JH, Dolamore B: **Stability of plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH): influence of hemolysis, rapid chilling, time, and the addition of a maleimide.** *Clinical biochemistry* 2010, **43**:1478-1480.
10. Reisch N, Reincke M, Bidlingmaier M: **Preanalytical stability of adrenocorticotrophic hormone depends on time to centrifugation rather than temperature.** *Clinical chemistry* 2007, **53**:358-359.
11. Scott-Moncrieff JC, Koshko MA, Brown JA, Hill K, Refsal KR: **Validation of a chemiluminescent enzyme immunometric assay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog.** *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 2003, **32**:180-187.
12. Prutton JS, Kass PH, Watson JL, Pusterla N: **Pre-analytical stability of adrenocorticotrophic hormone from healthy horses in whole blood, plasma and frozen plasma samples.** *Vet J* 2015, **204**:123-124.
13. Rendle DI, Litchfield E, Gough S, Cowling A, Hughes KJ: **The effects of sample handling and N-phenylmaleimide on concentration of adrenocorticotrophic hormone in equine plasma.** *Equine veterinary journal* 2015, **47**:587-591.