

PRACE ORYGINALNE • ORIGINAL PAPERS

Ocena porównawcza wyników stężenia CRP u dzieci oznaczanych za pomocą aparatu NycoCard Reader II i Array 360

Comparative assessment of the results of serum CRP concentration measurements using NycoCard Reader II and Array 360 in children

WIEŚŁAWA KRÓL^{B, E, F}, BARBARA GAŁĄZKA^{A, G}, MARIA WĄSIK^{C, D}

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Akademii Medycznej w Warszawie
Samodzielny Publiczny Dziecięcy Szpital Kliniczny przy ul. Marszałkowskiej 24 w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. Maria Wąsik

A – przygotowanie projektu badania, **B** – zbieranie danych, **C** – analiza statystyczna, **D** – interpretacja danych, **E** – przygotowanie maszynopisu, **F** – opracowanie piśmiennictwa, **G** – pozyskanie funduszy

Streszczenie **Wstęp.** Stężenie białka C-reaktywnego (CRP) w populacji ludzi zdrowych wynosi około 2 mg/l i nie przekracza 10 mg/l. W ostrej infekcji stężenie CRP wzrasta 100-, a nawet 1000-krotnie. Wartości podwyższone CRP występują m.in. w zakażeniach bakteryjnych. Pomiar CRP z zastosowaniem metod o niskiej czułości pozwalających wykryć stężenia w granicach 5–10 mg/l znalazł zastosowanie w rutynowej diagnostyce, szczególnie w pediatrii. Wysokie stężenie CRP upoważnia np. do włączenia antybiotykoterapii.

Cel pracy. Ocena przydatności aparatu NycoCard Reader II do pomiaru CRP w materiale biologicznym pobieranym od dzieci.

Materiał i metody. Do badania pobierano krew z żyły łokciowej, nie dodając antykoagulantu. Po wytworzeniu skrzepu krew wirowano w celu zebrania surowicy. Do badań stężenia CRP w pełnej krwi i w osoczu używano krwi pozostałej po oznaczeniu OB.

Pomiary stężenia były wykonane dwiema metodami: metodą nefelometrii oraz stosując test immunometryczny NycoCard Reader II.

Wyniki. Aparat NycoCard Reader II daje wyniki powtarzalne i ściśle porównywalne z metodą nefelometryczną.

Wnioski. Zaletą aparatu jest prosta obsługa oraz bardzo prosta metoda wykonania badania. Zaletą jest również mała objętość materiału potrzebna do wykonania badania (5 µl). Ma to bardzo istotne znaczenie, gdy badanie należy wykonać u noworodka lub niemowlęcia. Aparat może być bardzo przydatny dla lekarza praktyka wykonującego badanie przy łóżku chorego, w małych poradniach, małych laboratoriach diagnostycznych, jak również w dużych laboratoriach.

Słowa kluczowe: białko C-reaktywne (CRP), stężenie CRP we krwi, aparat NycoCard Reader II.

Summary **Background.** Serum C-reactive protein (CRP) concentration is about 2 mg/l to 10 mg/l in normal population. In acute infections CRP concentrations increase by 100- and even 1000-folds. Increased CRP concentrations are observed, among other things, in bacterial infections. CRP concentration measurements using low sensitivity methods enabling concentrations between 5 and 10 mg/l detection are performed in routine diagnostic test, particularly in pediatrics. High CRP concentration in blood entitles, for example, to introduce antibiotic therapy.

Objectives. Evaluation of NycoCard Reader II usefulness in CRP concentration measurements in biological materials collected from children.

Material and methods. Blood from forearm vein (antecubital vein) was collected into the test tube with no anticoagulant added. After a blood clot has formed the blood was centrifuged to obtain serum. Blood that remained after ESR measurement was used to determine CRP concentrations in the whole blood and serum. CRP concentration were determined using two evaluation methods: nephelometry and immunometric test with NycoCard Reader II.

Results. Results obtained with NycoCard Reader II are reproducible and closely comparable to nephelometry.

Conclusions. NycoCard Reader II is easy to operate and the test method is very easy to perform. Small amount of biological material required for measurements (5 µl) is also an advantage of the method. It is very important when the test has to be performed in newborns or infants. The instrument can be very useful for health professionals who perform the test at the patient's bed, in small clinics, and both in small and large diagnostic laboratories.

Key words: C-reactive protein (CRP), serum CRP concentration, NycoCard Reader II.

Wprowadzenie

Białko C-reaktywne (CRP) należy do nieswoistych białek ostrej fazy. Masa cząsteczkowa białka CRP wynosi 120 kDa. Jest to pentamer pięciu pozornie identycznych polipeptydowych podjednostek o znanej sekwencji, połączonych wiązaniami niekowalencyjnymi. Białko to wiąże specyficznie fosfocholinę w obecności jonów wapnia. Miejscem jego syntezy są hepatocyty wątroby [5].

Syntezę CRP w wątrobie indukują: IL-6, IL-1 i TNF- α . Cytokiny te nasilają ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę białek ostrej fazy. Krótki okres półtrwania (5–7 godz.) powoduje, że stężenie tego białka zależy wyłącznie od jego syntezy *de novo* i nie zależy od szybkości usuwania [4]. Po ustaniu działania czynnika zapalnego indukującego syntezę cytokin prozapalnych stężenie CRP szybko wraca do wartości prawidłowych. W związku z tym uważa się, że jest to bardzo czuły wskaźnik stanu zapalnego [4, 5].

Przyjmuje się, że stężenie białka CRP w populacji ludzi zdrowych wynosi około 2 mg/l i nie przekracza na ogół stężenia 10 mg/l. W ostrej infekcji stężenie CRP wzrasta 100-, a nawet 1000-krotnie. Przyjęto, że wartości poniżej 10 mg/l nie mają znaczenia klinicznego.

Podwyższone wartości białka C-reaktywnego występują głównie w zakażeniach bakteryjnych, powikłaniach pooperacyjnych, chorobie reumatycznej, toczniu rumieniowatym trzewnym, przewlekłych chorobach zapalnych jelit, w złośliwych nowotworach, odrzuceniu przeszczepu nerki oraz ostrym zawałe mięśnia sercowego [2]. CRP ma zdolność aktywacji dopełniacza drogą klasyczną, przez co ułatwia opsonizację i fagocytozę. Ponieważ jego stężenie nie zawsze koreluje z odczynem opadania krwinek, jego pomiar może dostarczyć dodatkowych ważnych informacji [1].

Pomiar CRP z zastosowaniem metod o niskiej czułości pozwalających wykryć stężenia w granicach 5–10 mg/l znalazł zastosowanie w rutynowej diagnostyce, szczególnie w pediatrii. Wysokie stężenie CRP upoważnia do włączenia antybiotykoterapii. Podobnie jak we wszystkich badaniach laboratoryjnych, tak i w przypadku stężenia CRP, tylko nieznacznie przekraczającego 10 mg/l, napotyka się trudności interpretacyjne, które pomaga czasami rozwikłać znajomość współczynnika zmienności dla danej metody i materiału.

Cel pracy

Celem pracy była ocena przydatności aparatu Nycocard Reader II do pomiaru białka C-reak-

tywnego w materiale biologicznym pobieranym od dzieci i porównanie uzyskanych wyników z wynikami oznaczeń metodą nefelometryczną w aparacie Array 360. Postanowiono również porównać współczynniki zmienności dla oznaczeń uzyskiwanych w tych dwóch aparatach z uwzględnieniem rodzaju materiału (surowica, osocze i krew) oraz ocenić zmianę wartości wyniku w zależności od czasu, jaki upłynął między wywołaniem reakcji a odczytem próbki.

Materiał i metody

Do badania pobierano krew z żyły łokciowej, nie dodając antykoagulantu. Po wytworzeniu skrzepu krew wirowano w celu zebrania surowicy. W ten sposób otrzymano 96 próbek surowic pochodzących od dzieci, którym lekarz zlecił wykonanie badania CRP. Do badań stężenia CRP w pełnej krwi i w osoczu używano krwi pozostałej po oznaczeniu OB, które było zlecone przez lekarza jako badanie diagnostyczne. Aby uzyskać osocze, krew cytrynianową wirowano i odciągnano osocze.

Pomiary stężenia były wykonane dwiema następującymi metodami: metodą nefelometrii, która jest rutynowo stosowana w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Akademii Medycznej w Warszawie, oraz stosując test immunometryczny Nycocard Reader II CRP, Axix-Shield (MED-MESS). Do odczytów pomiaru stężenia z zastosowaniem metody nefelometrycznej użyto aparatu Array 360, firmy Beckman Instruments International S.A. Obie metody stosowano zgodnie z instrukcją producentów aparatów.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując test *t*-Studenta dla par wyników do porównania różnic między wynikami uzyskanymi dwiema metodami i test korelacji według Pearsona. Wyliczono również współczynniki zmienności dla wyników otrzymanych z surowic, krwi i osocza. Analizując zgodność wyników w zakresie niskich stężeń CRP, uwzględniono współczynniki zmienności, odejmując wartość odpowiadającą procentowi wartości współczynnika zmienności od wartości stężenia CRP przekraczającą 10 mg/l w jednym z oznaczeń i dodając odpowiednią wartość do wyników poniżej 10 mg/l.

Wyniki

Średnie stężenie CRP oznaczone aparatem Array 360 w 96 próbkach surowic (tab. 1) wynosiło $33,8 \pm 36,78$ mg/l (SD), natomiast aparatem Nycocard Reader II – $34,3 \pm 37,46$ mg/l. Otrzyma-

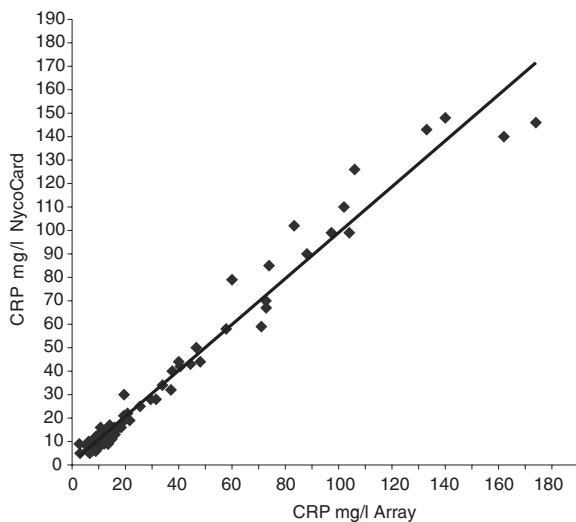
ne wyniki analizowane testem *t*-Studenta dla par wyników (wartość $t = 0,9913$) nie różnią się istotnie statystycznie.

Uzyskane wyniki wykazały wysoce istotną korelację $r = 0,9832$, $p > 0,001$ (ryc. 1).

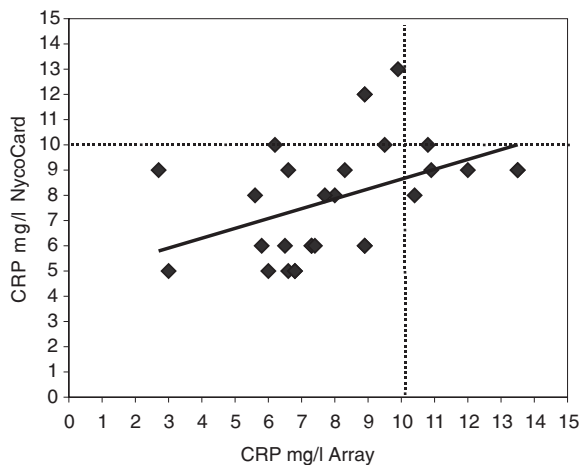
Z 96 wyników wybrano 29, które przynajmniej w jednym aparacie wykazały stężenie poniżej lub równe 10 mg/l. Stanowiły one 30% wszystkich wyników.

Średnie stężenie CRP w tej grupie wyników wynosiło $8,1 \pm 2,59$ i $7,9 \pm 2,31$ uzyskane odpowiednio z aparatu Array i NycoCard. Wyniki te w teście *t*-Studenta dla par wyników nie różniły się istotnie statystycznie ($t = 0,8643$). Współczynnik korelacji między tymi wynikami wynosił $r = 0,44$ (ryc. 2).

W obu aparatach uzyskano 21 wyników zgodnych w obu metodach. Stanowi to 74% niskich wyników. Brak zgodności wykazało 8 wyników, w tym 5 wyników powyżej wartości 10 mg/l było tylko z aparatu Array i tylko 3 z NycoCard.



Ryc. 1. Korelacja między wynikami stężenia CRP oznaczonego aparatem Array i NycoCard, $r = 0,98$

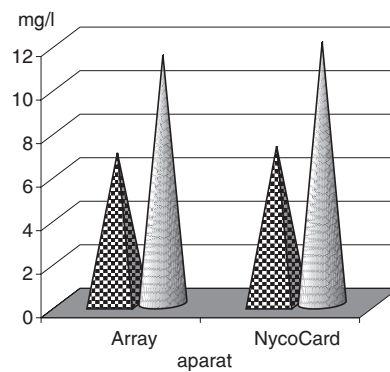


Ryc. 2. Korelacja między wynikami niskich stężeń CRP uzyskanymi w aparacie Array i NycoCard, $r = 0,44$

Rycina 3 ilustruje różnice w grupie wyników niskich stężeń CRP uzyskanych z obu porównywanych aparatów. Średnia wyników poniżej 10 mg/l z obu aparatów jest porównywalna, podobnie jak średnia wyników przekraczających 10 mg/l. Przekroczenie górnego zakresu wartości prawidłowych jest małe i średnio nie przekracza 2 mg/l (wyniki indywidualne wynoszą: 12, 12 i 13, odpowiednio w próbkach: 23, 24 i 60, por. tab. 1).

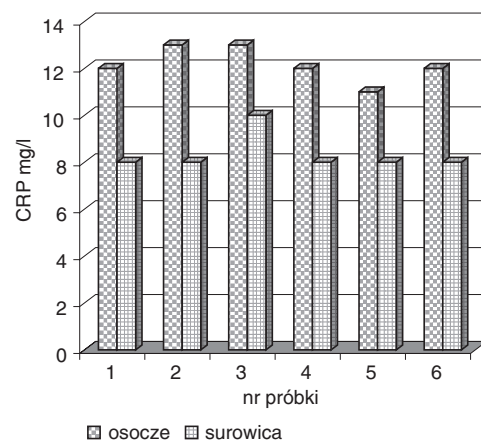
W tabeli 2 umieszczono współczynniki zmienności dla badań surowicy w aparacie Array i surowicy, osocza i krwi w aparacie NycoCard. Współczynniki zmienności dla wyników stężenia CRP w surowicy były podobne i nie przekraczały 5%, natomiast współczynniki dla oznaczeń CRP w osoczu i we krwi przekraczały 5%. Najwyższy współczynnik zmienności stwierdzono dla badań wykonanych w krwi pełnej aparatem NycoCard.

Uwzględniając współczynnik zmienności wyliczony dla pomiarów jednej próbki surowicy



■ seria 1 wyniki poniżej 10 mg/l (z Array lub NycoCard)
■ seria 2 wyniki powyżej 10 mg/l (z Array lub NycoCard)

Ryc. 3. Porównanie niskich wyników stężenia CRP uzyskanych z aparatu Array i NycoCard



Ryc. 4. Porównanie wyników stężenia CRP w pełnej krwi i osoczu uzyskanych z aparatu NycoCard

Tabela 1. Wyniki oznaczeń stężeń CRP w 96 próbkach surowic wykonanych na aparacie Array i NycoCard Reader II. Uwzględnione są tylko wyniki w zakresie czułości aparatu NycoCard powyżej 5 mg/l i poniżej 150 mg/l)

Lp.	Array	Nyco	Lp.	Array	Nyco	Lp.	Array	Nyco	Lp.	Array	Nyco
1.	2,7	9	26.	21,6	19	51.	13,5	9	76.	6,8	5
2.	71	59	27.	7,3	6	52.	15,9	16	77.	6,3	5
3.	6,2	10	28.	106	126	53.	14,9	11	78.	16,3	15
4.	10,2	13	29.	162	140	54.	17,5	16	79.	79,9	85
5.	133	143	30.	73,9	85	55.	14,1	15	80.	61,8	56
6.	3	5	31.	20,8	22	56.	8,9	6	81.	34,5	30
7.	174	146	32.	19,5	30	57.	25,5	25	82.	17,5	15
8.	14,1	17	33.	83,3	102	58.	48,1	44	83.	7,7	8
9.	104	99	34.	12,3	14	59.	16,1	13	84.	11,2	11
10.	102	110	35.	60	79	60.	9,9	13	85.	20,4	20
11.	40	44	36.	140	148	61.	40,6	42	86.	41,7	40
12.	9,5	10	37.	46,6	50	62.	19,4	21	87.	14,4	12
13.	31,5	28	38.	6,6	9	63.	18,7	18	88.	6	5
14.	33,9	34	39.	12,6	15	64.	88,1	90	89.	28,3	24
15.	10,9	11	40.	5,6	8	65.	12,2	12	90.	98,3	127
16.	37,6	40	41.	10,3	11	66.	10,9	9	91.	61	64
17.	57,8	58	42.	6,5	6	67.	11,3	12	92.	30	27
18.	7,3	6	43.	10,8	10	68.	8	8	93.	11	11
19.	10,4	8	44.	44,4	43	69.	6,6	5	94.	18	15
20.	12,2	13	45.	37,1	32	70.	18,4	16	95.	63	70
21.	5,8	6	46.	16,9	16	71.	8,3	9	96.	46	47
22.	10,7	16	47.	8,9	6	72.	14	13			
23.	8,9	12	48.	97,3	99	73.	29,5	28			
24.	8,9	12	49.	72,8	67	74.	72,7	70			
25.	12	9	50.	13,5	9	75.	7,4	6			

Tabela 2. Porównanie współczynników zmienności wyników stężenia CRP otrzymanych z aparatu Array i NycoCard

Wynik	Array	NycoCard		
	surowica n = 11	surowica n = 11	osocze n = 6	krw n = 6
Średnia	55,9	27,9	12,2	8,33
SD	1,91	1,22	0,75	0,812
Współcz. zmienności	3,41	4,26	6,15	9,79

Tabela 3. Porównanie wyników stężenia CRP w surowicy poniżej i powyżej progu czułości aparatu NycoCard z wynikami uzyskanymi z aparatu Array

Numer surowicy	Wynik z aparatu Array (mg/l)	Wynik z aparatu NycoCard (mg/l)
1.	1,7	<5
2.	1,8	<5
3.	4,0	<5
4.	3,6	<5
5.	2,7	<5
6.	210	>150
7.	153	>150

w aparacie NycoCard i Array, stwierdzono, że z 8 niezgodnych wyników niezgodność 4 była w granicach współczynnika zmienności. Zgodność wyników po uwzględnieniu współczynników zmienności wynosiła 86,2% (25/29).

Rycina 4 ilustruje porównanie wyników uzyskanych z aparatu NycoCard z badań 6 próbek krwi i osocza pochodzących od tych samych pacjentów. U wszystkich 6 pacjentów wynik badania stężenia CRP w krwi pełnej był około 4 mg/l wyższy od wyniku otrzymanego w badaniu.

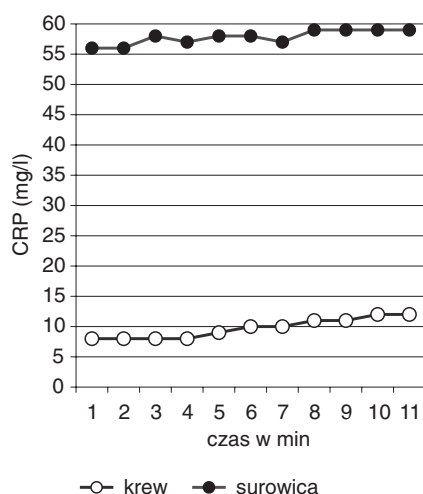
W tabeli 3 umieszczono ocenę porównawczą wyników poniżej 5 mg/l i 150 mg/l, tzn. progu czułości aparatu NycoCard z wynikami uzyskany-

mi z aparatu Array. We wszystkich pięciu badanych surowicach ze stężeniem w granicach 1,7–4,0 mg/l uzyskano wynik < 5 mg/l z aparatu NycoCard i w dwóch przypadkach wysokiego stężenia CRP oznaczonego w aparacie Array wynik z NycoCard informował o stężeniu > 150 mg/l.

Średnia wartość stężenia CRP we krwi wynosiła 12,2±0,75 SD i była wysoce istotna statystycznie ($p < 0,00005$) wyższa od średniego stężenia w osoczu (8,3±81SD).

Wykonując w odstępach co 1 minutę odczyty w aparacie NycoCard jednej próbki krwi i osocza pochodzących od różnych pacjentów stwierdzono, że po upływie 5 minut od zakończenia reak-

cji komory reakcyjnej odczyty powoli wzrastają (ryc. 5). W przypadku krwi wzrost wynosił 4 mg/l, a w osoczu 3 mg/l.



Ryc. 5. Zmiana odczytywanego wyniku w czasie

Dyskusja

Niepodważalną zaletą aparatu Nycocard Reader II jest jego prosta obsługa oraz bardzo prosta metoda wykonania badania. Uzyskane obserwacje zmiany wyniku w zależności od czasu, który upływa między dodaniem odczynników a odczytem, są zbieżne z wcześniej opisaną informacją zawartą w instrukcji dostarczanej przez producenta aparatu i odczynników. Do wykonania badania wystarcza 5 µl materiału. Fakt ten ma bardzo istotne znaczenie, gdy badanie należy wykonać u noworodka lub niemowlęcia.

Z przedstawionych wyników badań w tym opracowaniu wynika, że badanie najlepiej wykonywać w surowicy krwi, mimo że można go wykonać zarówno w pełnej krwi, jak i w osoczu. Badanie wykonane w osoczu, jak i we krwi charakteryzuje większy współczynnik zmienności, a więc należy się spodziewać, że liczba wyników przekraczających 10 mg/l, przyjęta za górną granicę wartości prawidłowej stężenia CRP, będzie większa niż obserwowana w badaniu surowicy. W przedstawionych badaniach tylko 8 z 29 wyników z niskim stężeniem CRP przekraczała wartość 10 mg/l w jednym z dwóch badań wykonanych dwiema różnymi metodami. Z 8 wyników niezgodnych różnice w 4 były w zakresie, które niwelowało uwzględnienie współczynników zmienności.

Te niskie wartości, nieznacznie przekraczające granicę zakresu prawidłowego, są szczególnie ważne dla lekarza, który musi podjąć decyzję

o włączeniu lub nie antybiotykoterapii. Jeśli jednak nie ma możliwości wykonania badania z surowicy lub osocza (np. badanie przyłóżkowe), wydaje się słuszną sugestią, że do monitorowania tego pacjenta badanie powinno być powtarzane we krwi z zastosowaniem tego samego aparatu, szczególnie gdy u pacjenta nie występuje silny wzrost stężenia CRP.

Jeżeli badanie jest wykonane w surowicy, to bez względu na zastosowaną metodę (nefelometryczna – Array 360 lub Nycocard Reader II) zgodność uzyskiwanych wyników jest bardzo duża, nawet w zakresie niskich stężeń. Pozwoli to na wymienne stosowanie tych dwóch metod w zależności od sytuacji w laboratorium.

Aparat Nycocard Reader II może być bardzo przydatny dla lekarza praktyka wykonującego badanie przy łóżku chorego, w małych poradniach, małych laboratoriach diagnostycznych, jak również w dużych laboratoriach do wykonywania pomiarów stężenia CRP na dyżurach.

Wnioski

Wyniki przedstawione w tym opracowaniu są w wielu punktach zgodne z wcześniej publikowanymi [3]. Potwierdził się wysoki współczynnik korelacji między dwiema stosowanymi przez nas metodami. Potwierdził się również zakres czułości aparatu Nycocard Reader II. Wszystkie bardzo niskie stężenia CRP uzyskane z aparatu Array były oznaczone jako wartości < 5 mg/l metodą Nycocard. Podobnie, stężenia bardzo wysokie były oznaczone jako > 150 mg/l. Obie te obserwacje są zgodne z informacją zawartą w przepisach dostarczonych przez producenta Nycocard Reader II.

Dwumiesięczne stosowanie aparatu Nycocard Reader II w naszym Zakładzie upoważnia do sugestii, że proste wykonanie kalibracji przed każdą serią i pojedynczym pomiarem zmniejsza ryzyko jakichkolwiek nieprawidłowości. W czasie dwumiesięcznego testowania aparatu nie wystąpiła żadna awaria. Odczynniki są gotowe do użycia i brak jest możliwości ich zanieczyszczenia. Duże znaczenie ma również fakt, że odpady medyczne po wykonaniu pomiarów mogą być spalone.

Stwierdzamy, że aparat Nycocard Reader II jest aparatem przydatnym w każdym laboratorium, daje wyniki powtarzalne i ściśle porównywalne z metodą nefelometryczną. Dodatkową zaletą jest mała objętość materiału potrzebna do wykonania badania i łatwość jego przeprowadzenia.

Piśmiennictwo

1. Dembińska-Kieć A, Nastalski JW, red. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*. Wrocław: Volumed; 1998: 151–152.
2. Neumeister B, Besenthal I, Liebich H, red. *Diagnostyka laboratoryjna*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner; 2001: 77–79.
3. Oremek GM, Bretchneider I. Comparison of two point-of-care C-reactive protein assays to Tina-quant^R CRP. *Diagnost Labor* 2004; 40: 247–253.
4. Piechota W, Piechota W. *Białko C-reaktywne o wysokiej czułości w ocenie zagrożenia chorobami układu krążenia*. Wyd. Biblioteka Naukowa Dade Behring; 2001; 1: 7–8.
5. Stefańska A. Wstępna ocena wartości diagnostycznej oznaczania białka C-reaktywnego metodą ultraczułą. *Twój Magazyn Medyczny Laboratorium* 2001; 49: 32–39.

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. med. Maria Wąsik

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego AM

Samodzielny Publiczny Dziecięcy Szpital Kliniczny

ul. Marszałkowska 24

00-576 Warszawa

Tel.: (022) 629-65-17

E-mail: wasik@litewska.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 12.10.2006 r.

Po recenzji: 30.11.2006 r.

Zaakceptowano do druku: 3.01.2007 r.