

# Acil Laboratuvarda C-Reaktif Proteinin Saptanmasında İmmunoturbidimetrik Yöntemin Analitik Değerlendirilmesi

## Analytical Evaluation of Immunoturbidimetric Method of C-Reactive Protein Determination in the Emergency Laboratory

Güler Buğdaycı

Erdinç Serin

Fatih Özcan

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bolu

### ÖZET

**Amaç:** C-Reaktif Protein (CRP) düzeyinin kullanımı, farklı klinik durumların takibinde giderek önem kazanmaktadır. CRP düzeyinin, laboratuvarda hem immunonefelometrik hem de immunoturbidimetrik yöntemle ölçülmesi mümkündür. Laboratuvarın acil bölümü, acil servise ve yoğun bakım ünitesine hizmet vermektedir. Bu çalışmada, immunoturbidimetrik yöntemin analitik performansının immunonefelometrik yöntem referans alınarak karşılaştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Siemens Dade Behring BN ProSpec ve Abbott Architect C8000 sistemlerinde üç farklı düzeyde kontrol serumları ile gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik çalışıldı. Doğruluk tespiti için de 100 hastanın taze serumları kullanılarak regresyon analizi yapıldı.

**Bulgular:** CRP düzeyleri 3.02-170.00 mg/L aralıkta bulunan taze serum örnekleri ile yapılan doğruluk çalışmasında regresyon katsayısı  $r^2=0.997$ , regresyon eşitliği  $y=1.171x-1.084$  olarak belirlendi. Üç farklı düzeydeki kontrollerin (13.2 mg/L $\pm$ 1.33; 28.5 mg/L $\pm$ 2.85; 49.3 mg/L $\pm$ 4.93) varyasyon katsayıları %5'in altında saptandı (n=20).

**Sonuç:** Nefelometrik yöntemle göre daha ucuz ve acil laboratuvarda ek bir cihaza gerek duyulmamasını sağladığı için, acil servis ve yoğun bakıma hizmet veren laboratuvarlarda immunoturbidimetrik yöntemin kullanılabilmesi gösterildi.

**Anahtar Sözcükler:** : Acil Laboratuvar, C-Reaktif protein, immunonefelometri, immunoturbidimetri

### ABSTRACT

**Objective:** Use of C-Reactive protein in the follow-up of different clinical situations is getting more important. Levels of CRP can be detected by immunonephelometric and immunoturbidimetric methods in the clinical laboratories. The emergency department's laboratory renders service to the emergency department and the intensive care units. In this study the analytical performance of the immunoturbidimetric method is evaluated against the immunonephelometric method as the reference method.

**Materials and Methods:** Selected 100 patients' fresh sera were used to detect between-run and between-day precision and accuracy performance of the Siemens Dade Behring BN ProSpec ve Abbott Architect C8000 analysers. Statistical analysis was performed by using regression analysis method.

**Results:** Accuracy was evaluated in the selected fresh sera with CRP levels between 3.02-170.00 mg/L. Regression coefficient was  $r^2=0.997$  and the regression equation was  $y=1.171x-1.084$ . The coefficient of variations for three different levels of controls ( $13.2\pm 1.33$  mg/L;  $28.5\pm 2.85$  mg/L;  $49.3\pm 4.93$  mg/L) were below 5% ( $n=20$ ).

**Conclusion:** We showed that the cheaper immunoturbidimetric method can be used safely in the laboratories that renders service to emergency departments and intensive care units by eliminating the use of another analyser.

**Key Words:** Emergency laboratory, C-Reactive protein, immunonephelometry, immunoturbidimetry

## GİRİŞ

C-Reaktif protein (CRP), proinflamatuvar sitokinlerden Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), İnterlökin-6 (IL-6) ve IL-1 ile salınımı ile düzenlenen, ağırlıklı olarak karaciğerden sentezlenen pentamerik yapıda bir akut faz proteindir. Elektroforetik alanda immunglobulinlerle beraber gama ( $\gamma$ ) fraksiyonunda bulunur. Plazma yarı ömrü yaklaşık 19 saattir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 115.000 daltondur (1). Vücudumuzda, enfeksiyon ajanlarına veya hücrel debrislere karşı salınımı artan, nonspesifik savunma belirteci olarak kabul edilmektedir. Enfeksiyon, travma, cerrahi gibi klinik durumlarda 24-48 saat içinde düzeyleri 1000 kata hızla yükselebilir. Yaşları 20 ile 60 yaş arasında bulunan erişkinlerde, 5 mg/L'nin altı referans değer olarak kabul edilmektedir (2). Hafif derecede bakteriyel veya viral enfeksiyonlarda 10-50 mg/L arası kabul edilirken, bakteriyel enfeksiyonlarda 50-200 mg/L'e kadar yükselebilir. 200 mg/L'nin üzerinde travma veya ciddi enfeksiyon düşünülmelidir. İnflamasyonun nonspesifik bir belirteci olan CRP konsantrasyonları değerlendirilirken, hastanın klinik özgeçmiş ve önceki sonuçları mutlaka beraber yorumlanmalıdır (3). Son yıllarda "high sensitive"-CRP (hs-CRP), koroner ve serebrovasküler kalp hastalıkları risk tahmini ve değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (4).

CRP düzeyleri, immunnefelometri (IN), immunoturbidimetri (IT), immunluminometri (IL), radyal immun diffüzyon, radyo-immunoassay ve ELISA yöntemleri ile saptanabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yirmiden fazla ticari kiti bulunmaktadır (5). Saptama sınırı 3-5 mg/L olan otomatize metodlar

genelde klinik laboratuvarların rutin kullanım amacı için yeterlidir (6).

Laboratuvarımızda, rutin CRP analizlerini IN yöntemi ile Siemens Dade Behring BN Prospec nefelometre cihazı ile yapılmaktadır. Bununla birlikte 24 saat açık olan yoğun bakım ünitesi ve acil servise hizmet veren laboratuvarımızda ek bir nefelometre kurmanın getireceği maliyet açısından IT yönteminin kullanıldığı Abbott Architect C8000 cihazı ile CRP ölçümünün uygun olup olmayacağını incelenmesi amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntem karşılaştırması Klinik Laboratuvar Standartları için Ulusal Komite'nin (National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS) EP-9A kriterlerine uygun olarak yapıldı (7). Doğruluk çalışması için; Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'na kan vermeye gelen 100 kişi çalışmaya dahil edildi. Hastaların yaş aralığı 17-63 yıl ve yaş ortalamaları  $39\pm 12$  yıl idi. Hastaların 57'si kadın, 43 erkekti. Örnekler oturur pozisyonda, antekubital venden, pıhtı aktivatör içeren, antikoagülan içermeyen jelli tüplere (Beckton Dickonson, New Jersey, USA) alındı. Kanlar alındıktan sonra 30 dakika içerisinde her örnek 2000xg'de 15 dakika süre ile santrifüjde çevrildi, serumlar ayrıldı. Çalışma beş gün içinde bitirildi, her gün bu şekilde yirmi numune çalışıldı. Önce Siemens Dade Behring BN ProSpec sisteminde immunnefelometrik (Katalog No: G21 E0542) olarak çalışılan örnek aynı gün iki saat içinde Abbott Architect C8000 (Katalog No: 8G65-20) otoanalizöründe immunoturbidimetrik yöntemle çalışıldı. Bulunan sonuçlar, IN yöntemi refe-

rans olmak üzere regresyon analizi yapılarak doğruluk değerlendirilmesinde kullanıldı.

Geri kazanım çalışması için düzeyi 13 mg/L, 28 mg/L olan iki örneğe 6 mg/L CRP eklendi, her bir örnek dört kere ölçüldü. Geri kazanım, elde edilen verinin bulunması gereken veriye bölünmesi ile elde edildi. Yüzde geri kazanım ise hepsinin ortalamasının yüzdesini alarak hesaplandı. Interferans çalışması için hemoglobin (10 g/L ve 17 g/L) ve trigliserit (500 mg/dL ve 1000 mg/dL) eklenerek, beşer kere ölçüm yapıldı. Doğrusallık için imalatçı firmaların bildirdiği değerler; IN yöntemi için 3.02-240 mg/L arasında, IT için 5-300 mg/L arasında idi.

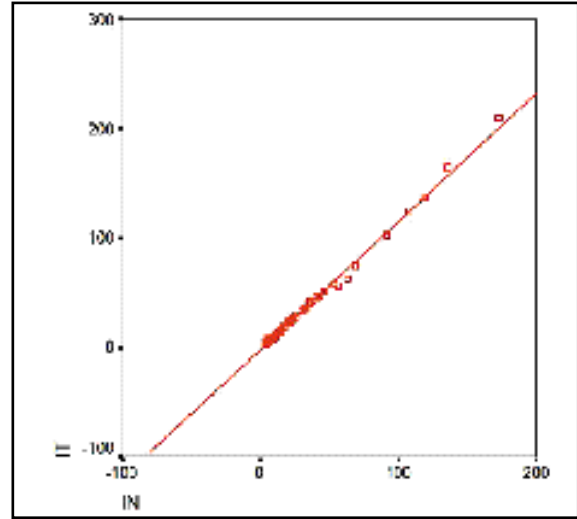
Tekrarlanabilirlik çalışmasında Biorad İmmunoloji Kontrol Serum (Lot No: 52271-72-73) kullanıldı. Üç farklı düzeydeki kontrol serumlarının içerdiği CRP miktarları Düzey 1 (D1), Düzey 2 (D2) ve Düzey 3 (D3) için sırasıyla 13.2 mg/L ± 1.33; 28.5 mg/L ± 2.85; 49.3 mg/L ± 4.93 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda gün-içi tekrarlanabilirlik çalışması için aynı örnekten her iki yöntemle de 20'şer kere CRP ölçümü yapıldı. Günler-arası tekrarlanabilirlik için -20°C'de saklanan aynı düzeydeki kontrolerin ardışık yirmi gün boyunca CRP değerleri çalışıldı.

İstatistiksel değerlendirme için aritmetik ortalama (AO), standard sapma (SD), yüzde varyasyon katsayısı (%CV) hesaplandı. Bland Altman, ortalamalar ve ± 2SD içinde ve farklar grafiği çizildi. Hastaların sonuçları, regresyon analizi yapılarak regresyon eğrisi, eşitliği ( $y=a+bx$ ) ve Standard hatası (Syx) hesaplandı.

## BULGULAR

Siemens Dade Behring BN ProSpec ve Abbott Architect C8000 sistemlerini karşılaştırmak

amacıyla yapılan doğruluk, kesinlik, interferans, geri kazanım çalışmaları sonuçları belirlenmiştir. CRP değerleri 3.02-170.00 mg/L arasında bulunan taze serum örneklerinde doğruluk çalışması yapıldı. Regresyon katsayısı  $r^2=0.997$ ,  $y=1.171x - 1.084$ ,  $Syx=2.006$  olarak belirlendi (Şekil 1). Üç farklı seviyedeki kontrollerin (13.2 mg/L ± 1.33; 28.5 mg/L ± 2.85; 49.3 mg/L ± 4.93) varyasyon katsayıları %5'in altında saptandı (n=20). Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları Tablo 1'de verilmektedir. İnterferans çalışması sonucunda hemoglobin 10 g/L için %96.4, 17 g/L için %95.2 ve 500 mg/dl için %98.8, 1000



Şekil 1. İmmunonefelometrik (IN)- Dade Behring BN II ve İmmunoturbidimetrik (IN)- Abbott Architect C8000) Yöntemlerin Regresyon Analiz Grafiği.

Tablo 2. Geri kazanım sonuçları.

Bulunması gereken değerler	IT	IN
13+6=19 (mg/L)	19,19,18,18	19,19,18,20
28+6=34 (mg/L)	35,33,34,33	34,34,33,34
% Geri kazanım	98.3	99.6

Tablo 1. Kontrol serumlarının gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik sonuçları.

	IT, Gün-içi	IT, G-arası	IN, Gün-içi	IN-G-arası
D1, ort±SD	13.16±0.37	13.11±0.46	13.16±0.5	13.05±0.4
D2, ort±SD	27.26±0.56	27.37±0.68	27.21±0.54	27.47±0.7
D3, ort±SD	44.00±1.67	44.42±2.12	43.95±1.47	44.26±2.08
D1,%CV	2.8	3.5	3.8	3.1
D2, %CV	2.1	2.5	2	2.5
D3, %CV	3.8	4.8	3.3	4.7

mg/dl için 96.4 olarak belirlendi. Geri kazanım çalışmasının sonuçları Tablo 2'de verilmektedir.

## TARTIŞMA

Acil ve yoğun bakım hastalarında CRP, enfeksiyon ve operasyon sonu iyileşme takip parametresi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, acil ve yoğun bakım hastalarının takibinde kullanılan CRP'nin ölçümü için acil laboratuvarında IT yönteminin IN yönteminin yerine kullanılıp kullanılmayacağına belirlenmesi amaçlandı.

IN yöntemi referans kabul edilerek, IT ve IL yöntemleri ile yapılmış çok sayıda karşılaştırma çalışması mevcuttur. Roberts ve arkadaşlarının yaptığı, IN yöntemi Abbott Imx (mikropartikül immunoassay), DPC Immulite (iki yönlü kemiluminesans) ve Immage (Beckman Coulter) nefelometre ve Dade Behring nefelometrenin kullanıldığı bir karşılaştırma çalışmada, 3.5 mg/L için %CV'ler sırasıyla 12, 9.8, 9.7 ve 7.6 olarak bulunmuştur. Imx ve Immulitenin 8 farklı serum havuzunda yapılan tekrarlanabilirlik deneylerindeki bu havuzlarda kullanılan 0.30 ve 9.79 mg/L arasında %CV değeri Imx ve Immulite %5 civarında bulunmuştur. Sadece Immage'de serum havuzlarda 3.46 mg/L'den büyük değerlerde olanlarda tekrarlanabilirlik BN II'ye yakın ve bulunmuştur. Yine 50 örnekte yapılan doğruluk çalışmasında, 0-200 mg/L arasında seçilen konsantrasyonlarda  $r=0.991$  olarak bulunmuştur (6). Immunoluminetik yöntemle IN yöntemini karşılaştıran bir çalışmada, CRP ortalama konsantrasyonları 0.02 ve 1.44 olan serum havuzlarının %CV'leri %5'in üzerinde iken, değerler kontrol materyalinde 11.04 mg/L'nin üzerinde çıktığında CV %4.2 olarak bulunmuştur. Günler-arası %CV'ler ise 0.02 mg/L'de %9.2, 1.44 mg/L'de %7, 11.04mg/L'de ise %6 olarak saptanmıştır (8). Dokuz farklı otomatize sistemin karşılaştırılmasında IN yöntem olarak Dade Behring, IL olarak DPC, IT yöntemle Hitachi 911 ve 917'ye uyarlanmış Denka,

Kamiya, Wako, Daiichi, Iatron CRP kitleri kullanılmış ve yine IT yöntemle Olympus kiti kullanılarak Olympus AU 640 ile çalışılmıştır. 388 sağlıklı kan donoründe yapılan çalışmada Denka Seiken, DPC, Iatron ve Wako ve Dade Behring BN II nefelometrenin hasta sonuçlarıyla %95 olgunun %92'si aynı persentilde çıkmıştır. Kamiya, Olympus, Roche, Daiichi Denka, DPC, Iatron ve Dade Behring BN II nefelometrenin hasta sonuçları karşılaştırıldığında ise %68 ile 77'si aynı persentilde çıkmıştır. Aynı çalışmada beş farklı serum havuzu konsantrasyonda en düşük değer olan 0.15 mg/L için, %CV'ler Olympus, DPC, Wako, Kamiya'da sırasıyla 44, 12, 13, 11 olarak bulunmuştur. Diğer düzeylerdeki tekrarlanabilirlik çalışmalarında (Dade Behring ortalamaları 0.49, 0.54, 1.36, 1.90 mg/L) dokuz sistemin de % CV leri birbirine yakın ve makul sınırlarda bulunmuştur (9). Dimension RXL ve hsCRP karşılaştırılmasında Dade Behring BN II 7 farklı konsantrasyonda 0.28, 0.5, 1.02, 1.55, 2.31, 7.78, 28.25 mg/L olmak üzere çalışılmıştır. Sadece 7.78 ve 28.25 mg/L'deki konsantrasyonlar kabul edilebilir sınırlarda bulunmuştur. Diğer tüm kontrollerde, konsantrasyon azaldıkça % CV değerlerinin arttığı gözlenmektedir. Bu çalışmada, doğruluk çalışmasında 25, 75, 50, 90 persentillerde ortaya çıkan dağılım farklılığına araştırmacılar dikkat çekmişlerdir. Bu anlamda IT yönteminin düşük konsantrasyonlarda kardiyovasküler risk değerlendirmesi amacıyla kullanımı çok uygun görülmemektedir (10). IT (AU 2700 Olympus), IN (Behring) ve IN (Beckman) yöntemi ile yapılan karşılaştırma çalışmasında CRP düzeyleri 2.6 ile 180 mg/L arasında olan hastalar alınmıştır. Ayrıca 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 180 mg/L olarak 11 farklı konsantrasyonda tekrarlanabilirlik (n=10) çalışmışlardır. Günler-arası için 5 ardışık ölçüm yapmışlardır. Tekrarlanabilirlikte en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla Beckman, Olympus, Behring olarak değerlendirmişlerdir. Toplam 345 sonuç karşılaştırıldığında Behring-Olympus K-değeri %87.3

ile birbirine en yakın çıkmışlardır. Beckman-Olympus ve Behring-Beckman karşılaştırılmasında K-değerleri %50.1 ve %49.6 olarak bulunmuştur (11).

Şişman ve ark. (12), IT esasına dayalı iki yöntemi, Cobas Integra 400 Roche ve Tina-Quant yöntemlerini hsCRP için karşılaştırmışlardır. Konsantrasyonları 0.63, 6.94, 61.90, 215 mg/L olan dört farklı serum havuzunda yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında %CV değerlerini 0.63 mg/L de Cobas Integra'da %13.8 ve Tina Quant'ta %11.7 olarak saptamış ve uygun olmadığını göstermişlerdir. Diğer konsantrasyonlarda ise %CV değerleri 2.4'ün altında olarak saptamışlardır. Günler arası %CV'leri en düşük konsantrasyonlu havuzlarda yine yüksek, diğer konsantrasyonlarda %5'in altında bulmuşlardır. Doğruluk çalışması için aldıkları hasta aralığı 0.15 ve 290 mg/L'dir. İki yöntemin  $r=0.996$ ,  $y=1.067x-0.148$  olarak regresyon eşitliğini 268 hastada birbiriyle uygun olarak bulmuşlardır (12). Dade Behring Image, Beckman IT ve Synchron LX IT yöntemlerinin karşılaştırılmasında farklı konsantrasyonlarda serum havuzları ve ticari kontroller kullanılmıştır. Konsantrasyonu 14.40 ve 50.10 mg/L olan kontroller için bizim çalışmamızda olduğu gibi %CV değerleri %5'in altında, ancak düşük konsantrasyon olan 0.69 mg/L'de her üç yöntemle de %CV değerleri 5'in üzerinde bulunmuştur (13).

Toplam hata, sistematik hata (interferans, geri kazanım ve regresyon analizi deneyleri) ve rastgele hata (tekrarlanabilirlik)'nin toplamıdır. CRP için izin verilebilir, klinik karar konsantrasyonun analitik %CV 26.3, analitik bias %24.9 ve toplam hatası ( $TE_a$ ) %68.3 olarak bildirilmiştir (14).

Şimdiye kadar tartışmada yer verdiğimiz tüm bu araştırmaların ortak özelliği düşük konsantrasyonlarda %CV'lerin %5'in üzerinde kaldığı kontrol örneklerinde varyasyon katsayılarının yüksekliği nedeniyle rutin kullanımda bu yöntemin IN ölçüme tercihinin tartışmalı olduğu yönündedir. Özellikle kardiyolo-

vasküler risk değerlendirmede hsCRP ölçümünün IT yöntemi ile yapılması uygun görünmemektedir. Yine bu araştırmaların tamamında 5 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonlarda IN ve IT yöntemlerinin kesinlik değerleri oldukça uyumlu bulunmuştur (6,8-13). Bizim çalışmamızda, üç değerde yaptığımız kontrollerde %CV'lerin %5'in altında kaldığı ve kesinlik açısından bu düzeylerde iki metod arasında uyum olduğu gösterildi.

Sonuç olarak; IN ve IT yönteminin interferans, geri kazanım, doğruluk ve tekrarlanabilirlik karşılaştırmasının sonucu olarak, IN yönteme göre daha ucuz olduğu ve acil laboratuvarlarda ek bir cihaz aksamına gerek duyulmamasını sağladığı için, IT yönteminin acil servis ve yoğun bakıma hizmet veren laboratuvarlarda kullanılabilmesi gösterildi.

#### Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan tüm reaktif ve sarf malzemelerini sağlayan Abbott Diagnostics Bayisi Laborsan AŞ. ve Siemens Dade Behring Bayisi Neofarma AŞ. firmalarına teşekkürü bir borç biliriz

#### KAYNAKLAR

1. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. Clin Chem 2003; 49: 1258-71.
2. Johnson AM. Amino acids, peptides and proteins. In: Burtis CA, Ahswold ER; Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4 th ed, Elsevier Inc, USA; 2006; 533-595.
3. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. J Emerg Med 1999; 6: 1019-25.
4. Jovicic' S, Ignjatovic' S, Dajak M, Majkic'-Singh N Analytical performance and clinical efficacy for cardiovascular risk estimation of an Olympus immunoturbidimetric high-sensitivity C-reactive protein assay. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 228-31.
5. Roberts WL, CDC, AHA. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: laboratory tests available to assess inflammation-performance and standardization: a background paper. Circulation 2004; 21: 572-6.
6. Roberts WL, Sedrick R, Moluton L, Spencer A, Rifai N. Evaluation of four automated high-sensitivity

- C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Clin Chem 2000; 46:1-8.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standard. 'method comparison and bias estimation using patient samples. Approved guideline'. NCCLS document EP9-A. Villanova, PA: NCCLS Publications, 2002.
  8. Shiesh SC, Chou TC, Lin XZ, Kao PC. Determination of C-reactive protein with an ultra-sensitivity immunochemiluminometric assay. J Immunol Methods 2006; 311: 87-95.
  9. Roberts WL, Moulton L, Law TC, Farrow G, Cooper-Anderson M, Savory J, et al. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Clin Chem 2001; 47: 418-25.
  10. De BK, Smith LG, Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay on the Dimension RXL analyzer. Clin Chim Acta 2002; 323: 151-5.
  11. Maggiore U, Cristol JP, Canaud B, Dupuy AM, Formica M, Pozzato M, et al. Comparison of 3 automated assays for C-reactive protein in end-stage renal disease: clinical and epidemiological implications. J Lab Clin Med 2005; 145: 305-8.
  12. Sisman AR, Küme T, Taş G, Akan P, Tuncel P. Comparison and evaluation of two C-reactive protein assays based on particle-enhanced immunoturbidimetry. J Clin Lab Anal 2007; 21: 71-6.
  13. McWhorter VC, Ford LC, Butch AW. Analytical performance of the Synchron LX20 Pro, BN trade mark II and IMMAGE high sensitivity C-reactive protein assays and concordance in cardiovascular risk stratification. Clin Chim Acta 2004; 347: 71-9.
  14. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington, DC: AACC, 2001.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. Güler Buğdaycı  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Bolu Uygulama ve Araştırma Hastanesi,  
Biyokimya Laboratuvarı  
14280 Gökçöy, Bolu  
Tel : 0.374 253 46 56 / 3170 ve 3028  
Faks : 0.374 253 46 15  
GSM : 0.505 390 00 15  
E-posta: gbugdayci@yahoo.com

---