

ODREĐIVANJE VISOKO OSETLJIVOG C-REAKTIVNOG PROTEINA: KLINIČKI I ANALITIČKI KVALITET

Svetlana Ignjatović

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet
Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija i Crna Gora

Kratak sadržaj: Inflamacija ima ključnu ulogu u patofiziologiji aterosklerotskih oboljenja. Vršena su ispitivanja velikog broja u krvi merljivih inflamatornih markera u njihovoj mogućnosti predviđanja rizika za nastanak aterosklerotskih događaja u budućnosti. Određivanje visoko osetljivog (*high sensitivity*, hs) C-reaktivnog proteina (CRP) se odskora primenjuje kao marker aterosklerotskog rizika. CRP danas predstavlja inflamatorni marker izbora. Centri za kontrolu i prevenciju oboljenja (The Centers for Disease Control and Prevention, CCDC) i Američko udruženje za srce (American Heart Association, AHA) su dali preporuke za korišćenje ovog markera u primarnoj prevenciji pacijenata sa stabilnim koronarnim oboljenjima ili akutnim koronarnim sindromom. Preporuke uključuju laboratorijski aspekt vezan za CRP i definišu »cut-off« vrednosti u kliničkoj interpretaciji koncentracije CRP pri čemu vrednosti CRP < 1 mg/L govore o niskom, vrednosti od 1 do 3 mg/L o srednjem i vrednosti > 3 mg/L o visokom relativnom riziku. U radu je opisan veliki broj preanalitičkih i analitičkih faktora kao što su vrsta uzorka, stabilnost, nepreciznost određivanja, komercijalna dostupnost i standardizacija važnih za određivanje CRP. Bolja kontrola preanalitičkih i analitičkih izvora varijacija sigurno vodi poboljšanju određivanja CRP. Neophodna su dodatna ispitivanja vezana za definisanje karakteristika izvođenja testova za određivanje hsCRP. Ove karakteristike uključuju preporuke vezane za ukupnu analitičku grešku koja potiče od intra-individualne biološke varijacije CRP a koja mora da se uzme u obzir pri donošenju kliničkih odluka, kao i definisanje granica dozvoljene slučajne i sistematske greške. Takođe je neophodno da se izvrši validacija ovih preporuka u specifičnim kliničkim situacijama i završe započete aktivnosti vezane za standardizaciju određivanja.

Cljučne reči: koronarna srčana oboljenja, faktor rizika, visoko osetljivi C-reaktivni protein, preanalitičke i analitičke promenljive

Uvod

Napori koji se predeuzimaju pri unapređivanju predviđanja rizika nastanka kardiovaskularnih oboljenja na značajno mesto stavljaju C-reaktivni protein (CRP). CRP je inflamatorni marker za koga je u brojnim prospektivnim epidemiološkim studijama pokazano da predviđa nastanak infarkta miokarda (AIM), moždanog udara, perifernih arterijskih oboljenja i iznenadnu srčanu smrt kod naizgled zdravih ljudi (1). Ovi visoko konzistentni klinički podaci su u skladu sa laboratorijski i eksperimentalno potvrđenom činjenicom da aterotromboza kao bolest akumulacije hole-

sterola u arterijama predstavlja hronični inflamatorni proces (2).

Mada je CRP otkriven pre 70 godina kao protein koji se vezuje za C-polisaharid ćelijskog zida pneumokoka (otuda i naziv C-reaktivan protein) (3), njegova uloga u koronarnim oboljenjima je tek nedavno otkrivena. Razlog za ovo proističe iz činjenice da je CRP tradicionalno određivan za postavljanje dijagnoze i praćenje akutne inflamacije metodama čiji je detekcioni limit iznosio 3–5 mg/L. Koncentracija CRP koju je potrebno određivati da bi se procenila hronična inflamacija u aterosklerozi je značajno niža nego u akutnoj inflamaciji. Stoga, tek razvojem visoko osetljivih metoda za određivanje CRP (*high-sensitivity* CRP, hsCRP) sa detekcionim limitom od ~0,1 mg/L bilo je moguće određivati CRP u opsegu koji je niži od detekcionog limita konvencionalnih metoda (4, 5).

Da bi se razumeo prelaz CRP od proteina akutne faze ka najupotrebljivijem inflamatornom biomarkeru

Adresa autora:

Svetlana Ignjatović
Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije
i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu,
Višegradska 26, 11129 Beograd, Srbija i Crna Gora
e-mail: tana@eunet.yu

za prognozu kardiovaskularnih događaja neophodno je poznavanje uloge imunog sistema u patogenezi ateroskleroze. Ateroskleroza je danas opšte prihvaćena kao hronično inflamatorno oboljenje koje počinje vaskularnim oštećenjem koje izazivaju oksidovani LDL, reaktivne kiseonične vrste, dijabetes, infekcije i drugo (6, 7).

Struktura i fiziološka funkcija

CRP pripada familiji pentameričnih proteina poznatih kao pentraksini. Sastavljen je od pet identičnih, nekovalentno vezanih subjedinica. Svaka subjedinica sadrži 206 ostataka aminokiselina čija molekulska masa iznosi 23 017 kDa, tako da ukupna molekulska masa CRP iznosi ~ 118 000 kDa.

Gen za CRP je smešten na proksimalnom dugom kraku hromozoma 1 kao što su smešteni i inflamatorno povezani geni za komponentu serum amiloida P i Fc receptora. Postoji značajna povezanost između genotipova CRP i njegove koncentracije (8).

Precizna uloga CRP nije još uvek potpuno objašnjena, ali osobine su u skladu sa njegovom osnovnom nespecifično odbrambenom ulogom. Kao odgovor na povredu ili infekciju dolazi do sinteze CRP u hepatocitima, a čiju aktivnost stimulišu citokini, posebno interleukin (IL)-6, IL-1 β i faktor tumorske nekroze- α . U prisustvu jona kalcijuma CRP se vezuje za polisaharide velikog broja bakterija, gljivica i nekih parazita. Takođe, CRP se vezuje za fosforilholin, fosfatidilholin i nukleinske kiseline, a ispoljava i kalcijum nezavisno vezivanje za protamine, heparin i histone. Nedavno je utvrđeno da se CRP vezuje za lipidne strukture kao što su lipozomi i lipoproteini koji se posle agregacije inkorporiraju u LDL i VLDL. Jednom vezan, CRP predstavlja snažan aktivator klasičnog puta sistema komplementa i može da ubrza opsonizaciju i fagocitozu stranih supstanci. Predstavlja protein akutne faze koji se najčešće i najbrže povišava (biološki poluzivot iznosi 19 sati), a što ukazuje da je CRP deo prirodnog imunog odgovora. Posle oštećenja tkiva koncentracija CRP može da poraste i do 1000 puta u roku od 24 do 48 sati (9, 10).

Klinički značaj

Zahvaljujući brzini i stepenu u svome odgovoru, istorijski CRP se koristi u detekciji i predviđanju ishoda različitih infektivnih, inflamatornih i nekrotičnih procesa. Blaga inflamacija i virusna infekcija uzrokuju povećanje koncentracije CRP do ~ 10 do 50 mg/L, a aktivna inflamacija i bakterijska infekcija do koncentracija između 50 i 200 mg/L. Koncentracije koje su > 200 mg/L sreću se u težim infekcijama i u traumama. Kao osetljiv, ali nespecifičan marker inflamacije, CRP treba uvek posmatrati u kontekstu kliničke istorije pacijenta pri čemu je poželjno porediti trenutne vrednosti sa prethodnim.

Najnoviji dokazi jasno pokazuju da je povećanje koncentracije CRP u okviru referentnog intervala povezano sa budućim koronarnim događajima kod nazgled zdravih muškaraca i žena (11–16). Osobe čija se osnovna koncentracija CRP nalazi u najvišoj kvartili su dva do četiri puta pod većim rizikom od nastanka AIM, ishemijskog šloga, perifernih arterijskih oboljenja i iznenadne srčane smrti u budućnosti u poređenju sa onima čije se koncentracije nalaze u donjoj kvartili. U poređenju sa ostalim novim i tradicionalnim markerima koronarnih srčanih oboljenja, CRP je marker koji je na najbolji način povezan sa nastankom koronarnih događaja u budućnosti i kada se kombinuje sa ukupnim holesterolom, HDL-holesterolom i LDL-holesterolom još više se povećava mogućnost predviđanja nastanka ovih događaja (11–12, 17–18). Kao što je već napomenuto za procenu rizika za nastanak budućih koronarnih srčanih oboljenja kod zdravih, neophodno je da se koncentracija CRP određuje kao hsCRP. Najnovija studija koja je sprovedena na 27 937 zdravih žena (14) je pokazala ne samo da je CRP superiorniji u odnosu na LDL-holesterol, već i da su žene koje imaju visok CRP i nizak HDL-holesterol pod većim rizikom od nastanka koronarnih događaja od onih koje imaju visok LDL-holesterol i nizak CRP. U ovoj studiji je takođe pokazano da CRP povećava mogućnosti predviđanja rizika pri svakoj koncentraciji LDL-holesterola, kao i *Framingham* rizik skora (19) što ukazuje da ovaj marker ima mogućnost identifikacije grupe osoba sa povećanim rizikom koji se primenom tradicionalnih parametara mogu da propuste. Podaci koji su dobijeni ispitivanjem na istoj grupi žena su pokazali da CRP doprinosi klinički važnim prognostičkim informacijama u slučaju metaboličkog sindroma (16) koji prema radnoj definiciji uključuje prisustvo bar 3 od sledećih karakteristika: abdominalna gojaznost, povišeni trigliceridi, snižen nivo HDL-holesterola, visok krvni pritisak i povišenu koncentraciju glukoze na tašte (20). Rizik nastanka koronarnih oboljenja je dvostruko veći kod žena sa metaboličkim sindromom i povišenom koncentracijom CRP nego kod onih sa metaboličkim sindromom i sa niskom koncentracijom CRP.

Pokazano je da se kod osoba sa povišenim koncentracijama CRP, primenom aspirina ili statina može da smanji rizik budućih koronarnih događaja (11, 21). Takođe je pokazano da se CRP može koristiti kao prognostički marker kod bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom čak i u odsustvu nekroze miokarda pri čemu CRP odražava »ranjivost« plaka i verovatnoću njegove rupture (22, 23).

Populaciona distribucija CRP vrednosti

Kada se određuje kao hsCRP, raspodela u populaciji je generalno konzistentna i ne zavisi od pola i etničke pripadnosti i vrednosti od 0,3, 0,6, 1,5, 3,5 i 6,6 mg/L odgovaraju 10-oj, 25-oj, 50-oj, 75-oj i 90-oj

»cut-off« percentilnim vrednostima u američkoj populaciji srednjih godina (14). U studijama koje su sprovedene u SAD (11–12, 14, 21, 25) na muškarcima, kao i na ženama koje nisu uzimale hormonsku supstitucionu terapiju (HRT) dobijene su slične vrednosti distribucije CRP i preporučene kvintilne »cut-off« vrednosti u kliničkoj praksi iznose < 5; 0,5–1,0; 1,0–2,0; 2,0–4,0 i > 4 mg/L. U pojednostavljenom pristupu, vrednosti koje su < 1, od 1 do 3 i > 3 mg/L odgovaraju grupama sa **niskim, srednjim i visokim** rizikom. Mada se kod žena koje uzimaju HRT očekuju više vrednosti CRP, rezultati sprovedenih studija (12, 14, 25) su pokazali da ne postoji potreba primene različitih »cut-off« vrednosti za ovu populacionu grupu s obzirom da je vaskularni rizik približno isti i kod žena koje uzimaju i kod onih koje ne uzimaju HRT.

Interpretacija CRP vrednosti

U većini kliničkih situacija dovoljna je samo jedna procena CRP vrednosti i to u periodu u kome se ona održava do koncentracije manje od 10 mg/L. U slučaju jačih infekcija, trauma ili akutne hospitalizacije nivo može da se poveća i do 100 puta ili više, i u tom slučaju ukoliko je vrednost CRP veća od 10 mg/L treba je odbaciti i određivanje ponoviti kada osoba postane klinički stabilna. Za procenu vaskularnog rizika preporučuju se dva određivanja CRP pri čemu niža ili srednja vrednost oba određivanja mogu da se uzmu kao vrednosti za procenu. U retkim slučajevima kada je nivo CRP značajno povišen trebalo bi razmotriti da li su prisutna sistemska inflamatorna oboljenja kao što su lupus, inflamatorna gastrointestinalna oboljenja ili endokarditis. U ovim slučajevima povećanje CRP je udruženo sa povišenom brzinom sedimentacije. U grupi nehospitalizovanih bolesnika ovakve situacije nisu tako česte.

S obzirom da je nivo CRP stabilan u dužem vremenskom intervalu, da na njegovu koncentraciju ne utiče unošenje hrane i da ne postoji cirkardijalni ritam, nije neophodno da uzorak bude uzet na tašte (1). Međutim, ukoliko određivanje zavisi od optičke bistrine kao što su turbidimetrija ili nefelometrija, u tom slučaju neophodno je da uzorak bude uzet na tašte (9).

Posmatrano iz ugla produženja životnog veka i odnosa cena/korist, pokazana je visoka efektivnost CRP »skrininga« (26). U većini slučajeva, najefikasnije je da se određivanju LDL-holesterola pridoda određivanje CRP u pogledu negativne prediktivne vrednosti, kao i izbegavanja naknadnih dodatnih kliničkih ispitivanja.

Poređenje CRP sa drugim novim faktorima rizika

CRP nije jedini biomarker za koga je pokazano da može da predvidi AIM i šlog. Kod osoba sa povišenim rizikom utvrđeno je povišenje nivoa aktivnosti interleukina-6, intercelijske adhezione molekule-1, citokin-1 inhibitora makrofaga i solubilnog liganda CD40 (27). Međutim, određivanje ovih biomarkera nije podesno za rutinsku kliničku primenu, kao i činjenica da neki imaju kratak poluživot što otežava kliničku evaluaciju.

U odabranoj grupi bolesnika sa preuranjenom i neobjašnjenom aterosklerozom može da bude od koristi određivanje lipoproteina(a) i homocisteina. Međutim, populaciono zasnovane studije su pokazale relativno malu važnost ovih biomarkera u poređenju sa CRP (12).

Ciljevi »skrininga«

Primarni cilj kardiovaskularnog »skrininga« treba da bude identifikacija osoba sa visokim rizikom koje treba da prestanu sa pušenjem, da primenjuju dijetu, vežbanje i kontrolišu krvni pritisak. Dodatak CRP standardnoj evaluaciji lipidnog statusa predstavlja unapređenje u proceni rizika.

Ne postoje konačni dokazi o tome da je za smanjenje stepena kardiovaskularnih događaja neophodno da se snizi nivo CRP. Međutim, mnogi postupci za koje se zna da snižavaju kardiovaskularni rizik su povezani sa sniženim nivoom CRP. Više farmakoloških agenasa za koje je dokazano da snižavaju vaskularni rizik utiču i na nivo CRP. Mnoge studije u kojima su korišćeni statini (pravastatin, lovastatin, cerivastatin, simvastatin i atorostatin) su pokazale da se snižava nivo CRP za 15% do 25% u proseku u toku od 6 nedelja od početka terapije (1).

U navedenoj studiji koja je sprovedena na 27 939 žena (14) ukupno preživljavanje je najgore kod onih sa povišenim CRP i LDL-holesterolom, a najbolje kod onih kod kojih su oba ova parametra snižena. Žene sa povišenim CRP a niskim LDL-holesterolom su pod većim vaskularnim rizikom u poređenju sa onima kod kojih je povišen LDL-holesterol a nizak CRP. CRP kao marker sistemske inflamacije je bolji prediktor budućih kardiovaskularnih događaja od LDL-holesterola. Međutim, postoji minimalna korelacija vrednosti CRP i LDL-holesterola. Iz ovih razloga, kombinovana evaluacija pomoću CRP i LDL-holesterola je mnogo bolja za detekciju rizika od oba ova biomarkera ponaosob. Razlog više za ovakav pristup leži u podacima koji govore da se kod 77% žena obuhvaćenih studijom prvi kardiovaskularni događaj desio kod onih kod kojih je koncentracija LDL-holesterola bila ispod 4,14 mmol/L, odnosno kod 46% kod kojih je ta vrednost bila ispod 3,36 mmol/L. Ako se uzmu u obzir podaci dati u tekućem vodiču nacio-

nalnog holesterol edukacionog programa (*National Cholesterol Education Program*) (28), najveći procenat prvog kardiovaskularnog događaja kod ispitivanih žena se desio pri nivou LDL-holesterola koji je niži od preporučene »cut-off« vrednosti za intervenciju i tretman.

Kliničke preporuke

Kao što je već navedeno, CRP je nezavisni prediktor budućih kardiovaskularnih događaja koji poboljšava prognostičke mogućnosti pri »skriningu« lipida, metaboličkog sindroma i *Framingham* rizik skor.

Kod nehospitalizovanih osoba bi trebalo istovremeno pri »skriningu« holesterola određivati i CRP kao dopunski test globalnoj proceni rizika (29). Kod osoba kod kojih je koncentracija LDL-holesterola viša od 4,14 mmol/L i koji prema ATP III protokolu (*Adult Treatment Panel III*) (28) treba da budu podvrgnuti terapiji, povišeni nivo CRP će naterati lekare i bolesnike na uvođenje farmakološke terapije ukoliko ona nije već uvedena, odnosno ukoliko je njena primena neodgovarajuća na njeno poboljšanje. Kod osoba čija se koncentracija LDL-holesterola nalazi između 3,36 mmol/L i 4,14 mmol/L, dodatni nalaz povećane koncentracije CRP ukazuje na povišen globalni rizik. U svakom slučaju, ova informacija doprinosi boljoj primeni terapije prema ATP III protokolu. Ukoliko je nivo LDL-holesterola manji od 3,36 mmol/L, povišen nalaz CRP suštinski ukazuje na veći rizik nego što to može da se predvidi samo na osnovu koncentracije LDL-holesterola. Ove osobe su pod istim rizikom kao i one sa očevidnom hiperlipidemijom. Ovaj profil bolesnika treba pažljivo da se pridržava ATP III životnog stila uprkos »niskom« nivou LDL-holesterola. Osobe sa niski LDL/visok CRP profilom su pod većim rizikom da imaju metabolički sindrom i trebalo bi da određuju koncentraciju glukoze na tašte. Primena statina kod ovih bolesnika zahteva dodatne dokaze koji bi se dobili kliničkim ispitivanjem (30).

Alternativni prilaz u primarnoj prevenciji podrazumeva određivanje CRP samo kod osoba sa intermedijarnim rizikom, kako je to definisano *Framingham* rizik skorom. Mada je ova strategija epidemiološki privlačna, ovaj prilaz zahteva ponovni dolazak kod lekara, ponovno vađenje krvi što ga čini manje efikasnim i skupljim.

Moguća primena CRP u sekundarnoj prevenciji je manje pouzdana s obzirom da je agresivna terapija kod ove grupe bolesnika već uvedena i određivanjem LDL-holesterola se dobijaju relevantniji podaci o efikasnosti terapije statinima.

Uloga CRP u akutnoj koronarnoj ishemiji i nestabilnoj angini je u značajnom porastu. Veliki broj studija je pokazao da se na osnovu nivoa CRP može da predvidi rani i kasni mortalitet u akutnoj koronarnoj ishemiji, kao i povećana prediktivna vrednost srča-

nih troponina (22, 31–36). Osim toga, poznavanje inflamatornog statusa omogućava razdvajanje bolesnika u subgrupe prema tome da li je za njih korisniji agresivniji ili konzervativni pristup u terapiji (33). Međutim, još uvek nisu klinički poznate »cut-off« vrednosti za CRP u akutnoj ishemiji, kao i vreme evaluacije u odnosu na početak ishemije. U hitnim prijemnim odeljenjima najveću mogućnost predviđanja CRP ima u grupi troponin negativnih bolesnika. U ovoj grupi bolesnika povišena vrednost CRP je povezana sa kratkoročnim, kao i sa dugoročnim rizikom što omogućava primenu i drugih dodatnih načina u tretmanu. Nasuprot ovome, kod bolesnika na prijemu u hitno odeljenje koji su i troponin i CRP negativni je malo verovatno da se radi o prisustvu koronarnog oboljenja (1).

Uzroci varijabilnosti pri određivanju C-reaktivnog proteina

Dobijanje pouzdanih rezultata pri određivanju CRP zahteva dobro poznavanje svih preanalitičkih i analitičkih promenljivih koje mogu da utiču na vrednost CRP. U preanalitičke promenljive spadaju: fiziološki faktori (rasa, starost, pol, sezonske varijacije, biološke varijacije, način života, pušenje, gojaznost, unošenje alkohola, korišćenje lekova, primena hormonske terapije i druga stanja vezana za visinsku razliku ili trudnoću) i sakupljanje uzorka (gladovanje, vreme uzorkovanja, vrsta uzorka, vreme i temperatura čuvanja uzorka). U analitičke promenljive spadaju: metodologija, granica detekcije, preciznost, višak antigena, uticaj matriksa, kalibracija, korelacija metoda, referentni materijali i kontrola kvaliteta.

Preanalitičke promenljive

Rasa, starost i pol: Klinička istraživanja su pokazala da referentne vrednosti za CRP ne zavise od rase, pola i starosne dobi. Medijalne vrednosti koje su dobijene za CRP kod različitih etničkih grupa, kod oba pola, se kreću u opsegu od 1,5 do 1,7 mg/L. Primećeno je blago povećanje u koncentraciji CRP kod starijih osoba, ali kod njih je i učestalije prisustvo drugih faktora kao što su subklinička inflamacija i povećana telesna težina (37).

Sezonske varijacije: Trenutno postoji mali broj literaturnih podataka o uticaju sezonskih promena na koncentraciju CRP, a oni pokazuju da nije utvrđeno da postoji zavisnost (38).

Biološke varijacije: Koeficijenti varijacije unutar osoba, kao i između osoba su visoki (veći od 40%). Ovakvi podaci dovode u pitanje mogućnost pouzdane procene rizika za pojavu kardiovaskularnih bolesti korišćenjem kvartilnih, kvintilnih i drugih podela raspodele referentnih vrednosti hsCRP (39–41).

Način života: Ustanovljena je obrnuta povezanost između koncentracije CRP i stepena fizičke kon-

dicije organizma. Kod odraslih osoba preko 40 godina, povećana fizička aktivnost je udružena sa značajno manjim prisustvom viših koncentracija CRP, kada su isključeni i drugi faktori rizika.

Pušenje: Brojne studije su pokazale značajnu korelaciju između CRP i pušenja. Generalno koncentracije CRP rastu kod pušača s povećanjem potrošnje cigareta. Kod starijih osoba, vrednosti CRP su udružene sa dužinom izloženosti dimu cigareta.

Gojaznost: Više koncentracije CRP su pronađene kod pojedinaca sa povećanom vrednošću indeksa telesne mase i u vezi su sa *in vivo* oslobađanjem IL-6 iz adipoznog tkiva. Kod dece starosti 10–11 godina, pokazano je da je gojaznost bila glavni uzrok povišenih koncentracija CRP (42–43).

Unošenje alkohola: Umereno konzumiranje alkohola je udruženo sa nižim CRP koncentracijama, u poređenju sa nekonzumiranjem ili povremenim konzumiranjem, što ukazuje da alkohol može da smanji rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti, verovatno preko svojih antiinflamatornih mehanizama.

Korišćenje lekova i primena hormonske terapije: Mada je pokazano da aspirin značajno redukuje (skoro za 60%) nastanak infarkta miokarda kod osoba sa povišenim vrednostima hsCRP, njegov efekat na koncentraciju CRP zahteva dodatna ispitivanja (44). Hormonski preparati imaju različite efekte na pro- i anti-inflamatorne markere. Istraživanja pokazuju da žene u menopauzi koje su primale hormonsku supstitucionu terapiju imaju 2–3 puta veće vrednosti CRP u odnosu na žene koje nisu primale terapiju, kao i u odnosu na muškarce iste starosne dobi (45–46).

Druga stanja: Koncentracija CRP u serumu kod zdravih osoba povećava se za oko 65% posle promene nadmorske visine sa nivoa mora na 3600 m (47). Kod trudnica su pronađene nešto više koncentracije CRP u odnosu na negravidne žene, ali nije primećeno da se vrednosti CRP menjaju sa napredovanjem trudnoće.

Gladovanje: Nije utvrđeno da unošenje hrane utiče na koncentraciju hsCRP, međutim kod određivanja za koja je važna optička bistrina uzorka, kao što su turbidimetrija i nefelometrija, potrebno je uzorak uzeti na tašte.

Vreme uzorkovanja: Nije pokazano da postoje dnevne varijacije u koncentraciji CRP. Proinflamatorni citokini, kao što je IL-6, pokazuju cirkadijalni ritam, ali to ne utiče na vrednost CRP, verovatno zbog njegovog relativno dugog vremena poluživota (19 sati) koje maskira cirkadijalne efekte citokina (48).

Vrsta uzorka: Za većinu imunoodređivanja kao uzorak koriste se serum ili plazma. Po jednoj grupi podataka ne postoji značajna razlika između koncentracije CRP u serumu i hepariniziranoj i EDTA plazmi, dok drugi podaci pokazuju da korišćenje EDTA ili citratne plazme kao uzorka snižava vrednost hsCRP za

12% do 16%, što je verovatno posledica osmotskog efekta antikoagulanasa na eritrocite.

Vreme i temperatura čuvanja uzorka: CRP je stabilan 60 dana na 4 °C, a vrednost se značajno ne menja i posle 20 godina ukoliko se uzorci čuvaju na –70 °C. Prilikom čuvanja, uzorke bi trebalo odvojiti u male epruvete sa minimalnim vazдушnim prostorom i zamrznuti na –20 °C ili na nižu temperaturu. Uzorke treba otapati postepeno, odnosno prebaciti ih prvo na –20 °C ili 4 °C, u zavisnosti od početne temperature čuvanja i pre upotrebe ih blago promešati (49–51).

Analitičke promenljive

Metode određivanja: Koncentracija CRP se određuje imunohemijskim metodama. U prošlosti CRP se merio pomoću semikvantitativne lateks aglutinacije. Danas se dosta koriste nefelometrija i turbidimetrija. Ove metode su potpuno automatizovane, brze i reproducibilne. Međutim, one uglavnom imaju granicu detekcije oko 5 mg/L, pa nisu pogodne kada se procenjuje rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti, gde su značajne promene koncentracija CRP u opsegu od 0,5–3,5 mg/L (11, 12). Upotreba fluorescentno, luminescentno ili radioaktivno obeleženih antitela poboljšava određivanje niskih koncentracija CRP. Ove metode su skupe, vremenski duge, kompleksnije za izvođenje i zahtevaju dodatnu laboratorijsku opremu. Primena kovalentno vezanih lateks čestica za specifična antitela je poboljšala svojstva antigen-antitelo kompleksa da rasipaju svetlost. Različiti imunoturbidimetrijski testovi koji se koriste na biohemijskim analizatorima zasnivaju se na ovom principu i pokazali su se kao veoma pouzdani za određivanje niskih koncentracija CRP (52, 53).

Granica detekcije određivanja: S obzirom da se na osnovu jako niskih koncentracija CRP vrši procena rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, neophodno je da primenjene metode daju pouzdane vrednosti pri koncentraciji od 1 mg/L. Za neka klinička istraživanja (populacione studije) potrebno je koristiti metode kojima se pouzdano određuju koncentracije hsCRP od 0,15 mg/L. Funkcionalna osetljivost većine metoda druge generacije iznosi ≤ 0,3 mg/L (54).

Preciznost metoda: Metode koje se primenjuju za određivanje hsCRP bi trebalo da imaju Kv za nepreciznost u seriji < 10% kroz ceo linearni opseg određivanja (9).

Višak antigena: Kod imunoturbidimetrijskih metoda kada koncentracija antigena poraste preko ekvivalentne tačke, formiraju se manji imuni kompleksi, što dovodi do smanjenja signala. Ovaj oslabljeni signal može odgovarati koncentraciji antigena u višku antitela, ili preko ekvivalentne tačke u višku antigena. Ovaj problem, tzv. »prozona« efekat, je uobičajen za parametre kao što je CRP, a za koje postoji veoma širok opseg patoloških koncentracija (9).

Uticaj matriksa: Različiti matriksi koji se koriste za pripremu kalibratora dovode do neslaganja rezultata među metodama. Pored toga, uticaji matriksa kao što su varijacije u optičkoj bistrini, proteinskoj strukturi (tj. monomerni proteini umesto nativnih pentamernih proteina), vezivanje za druge proteine, kao i varijacije u specifičnosti i reaktivnosti antitela, takođe doprinose neslaganju između izmerenih vrednosti (54).

Kalibracija: Kalibracija u više tačaka obezbeđuje tačnije i preciznije rezultate u odnosu na kalibraciju u jednoj ili dve tačke (55).

Korelacija metoda: Trenutno je u razvoju referentna metoda za određivanje CRP koja se zasniva na kombinaciji tačne hromatografije i masene spektrometrije, koja će u budućnosti služiti kao sigurna osnova za evaluaciju metoda.

Referentni materijali: Velika većina imunohemijskih metoda za određivanje hsCRP kalibriše se upotrebom dva postojeća referentna materijala: WHO IRP 85/506 (WHO 1st International Reference Preparation for C-reactive Protein Immunoassay) i CRM 470 (*Certified Reference Material*) koji je izveden iz WHO IRP 85/506 (56, 57).

Standardizacija određivanja: Slaganje između različitih hsCRP metodologija je važno s obzirom da se rezultati svakog pacijenta interpretiraju u kontekstu nacionalno utvrđenih granica odlučivanja za procenu rizika kardiovaskularnih bolesti. Jedan od mogućih razloga za nedovoljno slaganje koncentracija CRP među testovima različitih proizvođača je relativno visoka koncentracija dva primarna referentna materijala (39,3 mg/L za CRM 470 i 49 mg/L za WHO 85/506). CRM 470 je veoma stabilan, ne sadrži interferirajuće supstance (reumatoidni faktor, lipidi i monoklonalni proteini) i dostupan je u velikim količinama. Preporu-

ka je da se kod određivanja hsCRP za standardizaciju koristi razblaženje CRM 470 u diluentu proizvođača, dok se ne razviju drugi referentni materijali (58, 59).

Kontrola kvaliteta: Podaci iz programa spoljašnje kontrole kvaliteta pokazuju da se koeficijenti varijacije tradicionalnih testova različitih proizvođača za određivanje CRP kreću u opsegu 30%–60%, a između laboratorija dostižu vrednosti od 160% (za koncentraciju CRP <6 mg/L). To praktično sprečava upotrebu većine ovih testova za procenu rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Koeficijenti varijacije za visoko osetljive metode su niži (Kv između metoda iznose: 21%–90%, 6%–23% i 5%–11%, za koncentracije CRP od 0,24 mg/L, 1,46 mg/L i 11,3 mg/L). Ovi podaci ukazuju na potrebu za boljom standardizacijom metoda za određivanje hsCRP (9).

Zaključci

Danas se u mnogim kliničkim i istraživačkim laboratorijama velika pažnja poklanja istraživanju u ispitivanju markera koji na najbolji način mogu da predvide nastanak koronarnih srčanih oboljenja u budućnosti. CRP je inflamatorni marker za koga je u brojnim prospektivnim epidemiološkim studijama pokazano da predviđa nastanak AIM, moždanog udara, perifernih arterijskih oboljenja i iznenadnu srčanu smrt kod naizgled zdravih ljudi. CDC/AHA preporučuju korišćenje CRP u primarnoj prevenciji pacijenata sa stabilnim koronarnim oboljenjima ili akutnim koronarnim sindromom pri čemu vrednosti CRP < 1 mg/L govore o niskom, vrednosti od 1 do 3 mg/L o srednjem i vrednosti > 3 mg/L o visokom relativnom riziku. Međutim, preispitivanje postojećih preporuka se i dalje nastavlja izvođenjem novih kliničkih studija (60–65) koje uključuju i klinički i analitički kvalitet određivanja CRP.

DETERMINATION OF HIGH SENSITIVITY C-REACTIVE PROTEIN: CLINICAL AND ANALYTICAL QUALITY

Svetlana Ignjatović

*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia and School of Pharmacy,
University of Belgrade, Belgrade, Serbia & Montenegro*

Summary: Inflammation plays a key role in the pathophysiology of atherosclerotic disease. A number of inflammatory markers that are measurable in blood have been investigated for their ability to predict the risk of future atherosclerotic events. High-sensitivity (hs) measurement of C-reactive protein (CRP) has received a great deal of attention recently for use as an atherosclerotic risk marker. For these reasons, CRP is currently the inflammatory marker of choice. The Centers for Disease Control and Prevention (CCDC) and the American Heart Association (AHA) issued guidelines for the utility of this marker in the primary prevention setting and in patients with stable coronary disease or acute coronary syndromes. The guidelines also included specific recommendations that pertain to the laboratory aspect of CRP and defined cut-points for clinical interpretation; CRP concentrations <1 mg/L are considered low, 1–3 mg/L average, and >3 mg/L high relative risk. A number of preanalytical and analytical factors including specimen type and stability, assay imprecision, commercial availability, and standardization are reviewed here. Better control of preanalytic and analytic sources of variations will undoubtedly lead to improvement in CRP measurements. Further research is required to better define the performance characteristics necessary for assays bearing the designation hsCRP. These characteristics include developing guidelines for total analytical error from a careful review of the intraindividual biological variability of the analyte under conditions that will be encountered in clinical practice, defining allowable random and systematic error limits based on this information, validating these guidelines in the clinical setting, and completing the standardization efforts.

Key words: coronary heart diseases, risk factor, high-sensitivity C-reactive protein, preanalytical and analytical variables

Literatura

1. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003; 107: 363–9.
2. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–26.
3. Tillet WS, Francis T Jr. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930; 52: 561–71.
4. Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clin Chem* 1999; 45: 2136–41.
5. Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease [Review]. *Clin Chem* 2001; 47: 403–11.
6. Yeh ETH, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation* 2003; 107: 370–372.
7. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135–43.
8. Zee RY, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentration of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis* 2002; 162: 217–9.
9. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. [Review]. *Clin Chem* 2003; 49: 1258–71.
10. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313–8.
11. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973–9.
12. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342: 836–43.
13. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz C, Wilson WF et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke* 2001; 32: 2575–9.
14. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347: 1557–65.
15. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease. *JAMA* 2003; 290: 932–40.

16. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; 107: 391–7.
17. Koenig W, Sund M, Froehlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999; 99: 237–42.
18. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97: 2007–11.
19. Wilson WF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel W. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97: 1837–47.
20. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 19: 2486–97.
21. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM., for the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 2001; 344: 1959–65.
22. Morrow DA, Rifai N, Antman EA, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. C-Reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1460–65.
23. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, et al. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation* 1999; 100: 96–102.
24. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107: 499–511.
25. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative Observational Study. *JAMA* 2002; 288: 980–7.
26. Blake GJ, Ridker PM, Kuntz KM. Project life-expectancy gains with statin therapy for individuals with elevated C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 49–55.
27. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001; 89: 763–71.
28. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486–97.
29. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001; 103: 1813–8.
30. Ridker PM. Should statin therapy be considered for patients with elevated C-reactive protein? The need for a definitive clinical trial. *Eur Heart J* 2001; 22: 2135–2137.
31. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, et al. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997; 349: 462–6.
32. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, et al. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 1139–47.
33. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, et al. Relationship between interleukin-6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA* 2001; 286: 2107–13.
34. Mueller C, Buettner HJ, Hodgson JD, et al. Inflammation and long-term mortality after non-ST-elevation acute coronary syndrome treated with a very early invasive strategy in 1042 consecutive patients. *Circulation* 2002; 105: 1412–5.
35. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, et al. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 105: 1760–3.
36. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Tracy RP. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 445–51.
37. Imhof A, Frohlich M, Loewel H, Helbecque N, Woodward M, Amouyel P, et al. Distributions of C-reactive protein measured by high-sensitivity assays in apparently healthy men and women from different populations in Europe [Technical Brief]. *Clin Chem* 2003; 49: 669–72.
38. Crawford VL, Sweeney O, Coyle PV, Halliday IM, Stout RW. The relationship between elevated fibrinogen and markers of infection: a comparison of seasonal cycles. *QJM* 2000; 93: 745–50.

39. Campbell B, Badrick T, Flatman R, Kanowski D. Limited clinical utility of high-sensitivity plasma C-reactive protein assays. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 85–8.
40. Fraser CG. Are »scientific statements« the scientific truth? <http://www.westgard.com/guest23.htm> (Accessed April 2003).
41. Westgard JO. Quintiles and quality: QC for hs-CRP. <http://westgard.com/quest15.htm> (Accessed April 2003).
42. Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999; 22: 1971–7.
43. Shea S, Aymong E, Zybert P, Shamoan H, Tracy RP, Deckelbaum RJ, et al. Obesity, fasting plasma insulin, and C-reactive protein levels in healthy children. *Obes Res* 2003; 11: 95–103.
44. Feng D, Tracy RP, Lipinska I, Murillo J, McKenna C, Tofler GH. Effect of short-term aspirin use on C-reactive protein. *J Thromb Thrombolysis* 2000; 9: 37–41.
45. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279: 1615–1622.
46. Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE. Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999; 100: 713–6.
47. Chakraborti S, Batabyal SK. Study of high altitude stress on some acute phase proteins in plasma of humans. *Clin Chim Acta* 1987; 169: 347–9.
48. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 2001; 47: 426–30.
49. Rothkrantz-Kos S, Schmitz MP, Bekers O, Menheere PP, van Diejen-Visser MP. High-sensitivity C-reactive protein methods examined. *Clin Chem* 2002; 48: 359–62.
50. Hamwi A, Vukovich T, Wagner O, Rumpold H, Spies R, Stich M, et al. Evaluation of turbidimetric high-sensitivity C-reactive protein assays for cardiovascular risk estimation. *Clin Chem* 2001; 47: 2044–6.
51. Dominici R, Luraschi P, Franzini C. Measurement of C-reactive protein: two high sensitivity methods compared. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2004; 18: 280–4.
52. Kaski JC, Garcia-Moll X. C-reactive protein as a clinical marker of risk. *Circulation* 2000; 102: 1–2.
53. Sakamoto M, Farrow G, Law T, Rifai N. Analytical evaluation of three second-generation high-sensitivity CRP assays. *Clin Chem* 2002; 48: A31.
54. 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. Part 2. *Clin Chem* 2001; 47: 418–25.
55. Devleeschouwer N, Libeer JC, Chapelle JP, Struway CL, Gyssels C, L'Hoir A, et al. Factors influencing between-laboratory variability of C-reactive protein results as evidenced by the Belgian External Quality Assessment (EQA) Scheme. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54: 435–40.
56. WHO Expert Committee on Biological Standardization 37th report. WHO Technical Report Series 760 1987: 21–22 WHO Geneva.
57. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlstrom A, Johnson AM, Ward AM, et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins. CRM 470 1993: 1–172 Community Bureau of Reference, Commission of the European Communities Brussels.
58. Baudner S, Haupt H, Hubner R. Manufacture and characterization of a new reference preparation for 14 plasma proteins/CRM 470 = RPPHS lot 5. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 177–90.
59. Kimberly MM, Vesper HW, Caudill SP, Cooper GR, Rifai N, Dati F, et al. Standardization of immunoassays for measurement of high-sensitivity C-reactive protein. Phase I: evaluation of secondary reference materials. *Clin Chem* 2003; 49: 611–6.
60. Danesh J, Phil D, Wheeler G, Hirschfield G, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe G, Pepys M, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 1387–97.
61. Tall AR. C-reactive protein reassessed. *N Engl J Med* 2004; 350: 1450–2.
62. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease. *JAMA* 2003; 290: 932–40.
63. Ajani UA, Ford ES, Mokdad AH. Prevalence of high C-reactive protein in persons with serum lipid concentrations within recommended values. *Clin Chem* 2004; 50: 1618–22.
64. Hackam DG, Shumak SI. C-reactive protein for the prediction of cardiovascular risk: ready for prime-time? *Cand Med Assoc J* 2004; 170: 1563–5.
65. Ridker P, Nancy C. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham risk scores. *Circulation* 2004; 109: 1955–9.

Rad primljen: 15. 02. 2005.

Prihvaćen za štampu: 2. 03. 2005.