

Sedimentacija eritrocita i C-reaktivni protein: analitička osjetljivost i dijagnostička primjena

Jagečić, Denis

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:481778>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



zir.nsk.hr



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

DENIS JAGEČIĆ

**SEDIMENTACIJA ERITROCITA I C- REAKTIVNI PROTEIN
ANALITIČKA OSJETLJIVOST I DIJAGNOSTIČKA
PRIMJENA**

Završni rad

Split, 2015.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Denis Jagečić

SEDIMENTACIJA ERITROCITA I C- REAKTIVNI

PROTEIN: ANALITIČKA OSJETLJIVOST I

DIJAGNOSTIČKA PRIMJENA

**ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE AND C –
REACTIVE PROTEIN : ANALYTICAL SENSITIVITY AND**

DIAGNOSTIC USE

Završni rad / Bachelor thesis

Mentor :

doc.dr.sc. Ilza Salamunić

Split, 2015

1. UVOD	5
1.1. SEDIMENTACIJA ERITROCITA	6
1.1.1. OSOBITOSTI TESTA SEDIMENTACIJE ERITROCITA.....	7
1.1.2. PRIMJENA SEDIMENTACIJE ERITROCITA.....	9
1.2. C- REAKTIVNI PROTEIN	9
1.2.1. OSOBITOSTI DJELOVANJA C- REAKTIVNOG PROTEINA	9
1.2.2. PRIMJENA C- REAKTIVNOG PROTEINA	11
2. TEHNIKE I METODE ODREĐIVANJA SE I CRP- A	12
2.1. LABORATORIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE SE.....	12
2.1.1. TIJEK REAKCIJE SEDIMENTIRANJA ERITROCITA	12
2.1.2. MANUALNE METODE ZA ODREĐIVANJE SE	14
2.1.2.1. Westergrenova metode	14
2.1.2.2. Wintrobeova metoda	16
2.1.2.3. Zeta Sedimentacija	17
2.1.3. ODREĐIVANJE SE AUTOMATIZIRANIM METODAMA	18
2.1.3.1. Analizator Ves-Matic Cube 200.....	19
2.1.3.2. Analizator Streck ESR – auto plus	21
2.1.4. USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE SE.....	22
2.2. METODE ZA ODREĐIVANJE C – REAKTIVNOG PROTEINA	23
2.2.1. IMUNOKEMIJSKE METODE.....	23
2.2.1.1. Neobilježene ili izravne metode	23
2.2.1.2. Imunokemijske tehnike u otopini	24
2.2.2. AUTOMATIZIRANE METODE ZA ODREĐIVANJE CRP-a.....	25
2.2.3 USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE CRP-a	26
3. STANDARDIZACIJA METODA U LABORATORIJSKOJ	28
3. 1. STANDARDIZACIJA ODREĐIVANJA SEDIMENTACIJE.....	28
3.1.1. REFERENTI INTERVALI I PREPORUČENE VRIJEDNOSTI ZA C-.....	29
3.2. STANDARDIZACIJA ODREĐIVANJA CRP-A.....	29
3.2.1. Referentni intervali i preporučene vrijednosti za C reaktivni protein.....	30
4. PRIMJENA U DIJAGNOSTICI	32
5. ZAKLJUČAK	34

6. LITERATURA	35
7. SAŽETAK.....	37
8. SUMMARY.....	39
9. ŽIVOTOPIS.....	41

1. UVOD

Laboratorijske pretrage obuhvaćaju mjerenje različitih sastojaka krvi i drugog biološkog materijala, a razlozi traženja laboratorijskih pretraga su brojni, od prepoznavanja ranih znakova bolesti, postupaka postavljanja dijagnoze i procjene jačine bolesti, praćenja razvoja bolesti i učinka liječenja. (1)

Sedimentacija eritrocita (SE) i C-reaktivni protein (CRP) su jednostavne, brze i neinvazivne laboratorijske pretrage, primjenjuju se za otkrivanje ili praćenje pacijenata sa sumnjom na upalnu bolest. Odabir jedne ili druge pretrage u dijagnostičkom procesu ovisiti o tome jeli njihova dijagnostička vrijednost u određenom slučaju podjednaka. (1)

SE je jedna od najstarijih laboratorijskih pretraga kod koje brzina sedimentiranja ovisi o obliku i broju eritrocita, te sastavu plazme. SE je povišena u nekim fiziološkim stanjima kao u trudnoći, a u brojnim patološkim stanjima povezana je najčešće s upalom, anemijom, paraproteinemijom, povećanom koncentracijom fibrinogena, prisustvom hladnih aglutinina. Referentni interval za SE varira ovisno o dobi, spolu i godinama a kreće se od < 15 mm/h do < 49 mm/h. (2)

Molekularni mehanizam koji vodi do promjena u procesu sedimentiranja eritrocita u krvi nije u potpunosti razjašnjen, ali povećane vrijednosti SE su povezane s infektivnim bolestima, upalnim bolestima, reumatodnim artritismom, autoimunim bolestima, nekrozi tkiva. (2)

CRP je najznačajniji biljeg akutnoga upalnoga odgovora, osjetljiviji je od SE, u dobroj je korelaciji s težinom i opsegom upale. Referentne vrijednosti kod zdrave populacije imaju „skewed“ , tj. iskrivljenu distribuciju, a ne Gausovu, a kao i kod SE vrijednosti rastu s godinama. (3)

Otkriće i potvrda dijagnostičkog značaja CRP-a, kao markera upale, i razvoj automatiziranih analitičkih postupaka u početku istiskuju SE, kao jednu od najstarijih laboratorijskih pretraga u dijagnostičkom postupku, ali s vremenom se ponovno uočava značaj određivanja SE u brojnim stanjima i bolestima. (1) CRP brže reagira u akutnoj upali a prikladna je pretraga za praćenje odgovora na terapiju. Unatoč mišljenju da promjene vrijednosti SE i CRP u podlozi imaju sličnu patofiziološku osnovu, poznate su razlike u vrijednostima između ova dva analita za istu bolest. Razlikama doprinose djelomično serumski albumin, bubrežne bolesti, anemija, upalne bolesti. (4)

Visoko osjetljiva metoda određivanja CRP-a (engl. „*high-sensitivity CRP*“, hs-CRP), primijenjena u nisko rizičnim skupinama (osobe bez povijesti hiperlipidemije, hipertenzije, familijarne bolesti koronarne bolesti srca, šećerne bolesti, nepušači) upućuje na potrebu određivanja ovog analita kod određivanja relativnog rizika budućih kardiovaskularnih događaja. (5)

Među proteinima akutne faze upale koji se u laboratorijskoj dijagnostici ubrajaju u rutinske pretrage, mjerenje koncentracije, CRP je najčešće. SE nije specifična za akutnu fazu upale a na rezultat utječu hematokrit, oblik i veličina eritrocita, proteini koji nisu odgovor akutne faze, kao npr. imunoglobulini. Ipak, brojne studije su dokazale značaj određivanja SE kao markera bolesti u odnosu na CRP, a u pozitivne osobine se ubrajaju i dodatna saznanja o anemiji, imunom statusu, upali. (6)

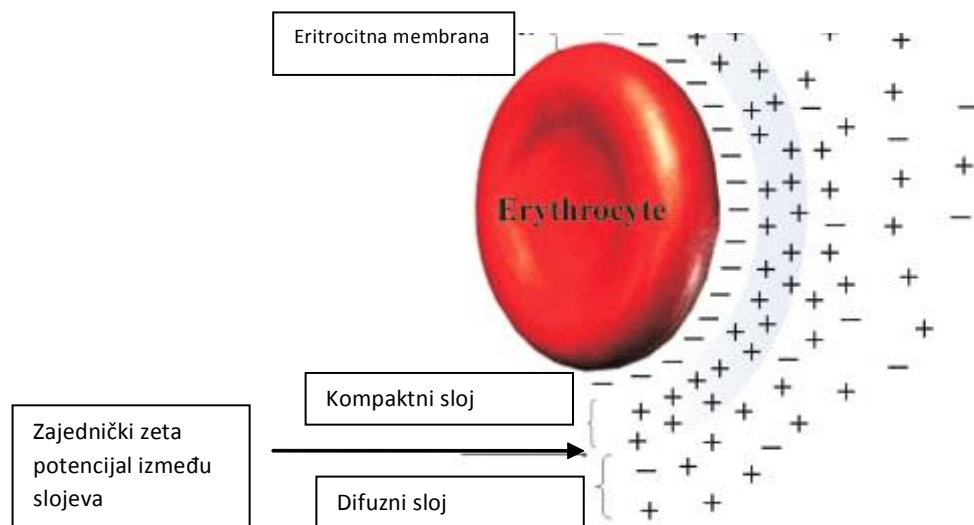
U laboratorijskoj dijagnostici poznavanje značajki metoda za određivanje SE i CRP-a podrazumijeva odabir prikladnog uzorka i metode te poznavanje prednosti i nedostataka različitih metoda. Dostupnost brojnih metoda i tehnika određivanja otežava usporedbu rezultata. Standardizacija nije u potpunosti provedena tako da i referentni intervali variraju među laboratorijima. (6)

1.1. SEDIMENTACIJA ERITROCITA

Sedimentaciju eritrocita prvi je opisao i upozorio na kliničku važnost poljski liječnik Edmund Faustyn Biernacki 1897. godine, međutim, otkriće je ostalo nepoznato široj javnosti (2). Metodu je znanstvenom svijetu predstavio švedski hematolog i patolog Robert Sanno Fåhræus tek 1918. godine koji je ovu tehniku u početku koristio kao test za trudnoću. Švedski liječnik Alf Vilhelm Albertsson Westergren pratio je promjene kod pacijenata s tuberkulozom pluća, i slično kao i njegovi prethodnici opisao je fenomen sedimentacije eritrocita, te primijenio test koristeći natrijev citrat kao antikoagulans. Westergren je definirao standardni test za određivanje SE. Sedimentacija eritrocita je i danas jedna od najčešće upotrebljivanih pretraga u laboratoriju za mjerenje aktivnosti bolesti, te praćenje upalnih stanja u kliničkoj medicini. (2)

1.1.1. OSOBITOSTI TESTA SEDIMENTACIJE ERITROCITA

Eritrociti se u normalnim uvjetima međusobno odbijaju. Sijalinska kiselina se nalazi na membrani eritrocita i štiti stanicu od ubrzane agregacije. Djelovanju odbojnih sila doprinosi negativan naboj koji nastaje zbog prisutnosti karboksilne grupe sijalinske kiseline u staničnoj membrani. Naboj stvara odbojni električni zeta potencijal između stanica (Slika 1.1.). (7)

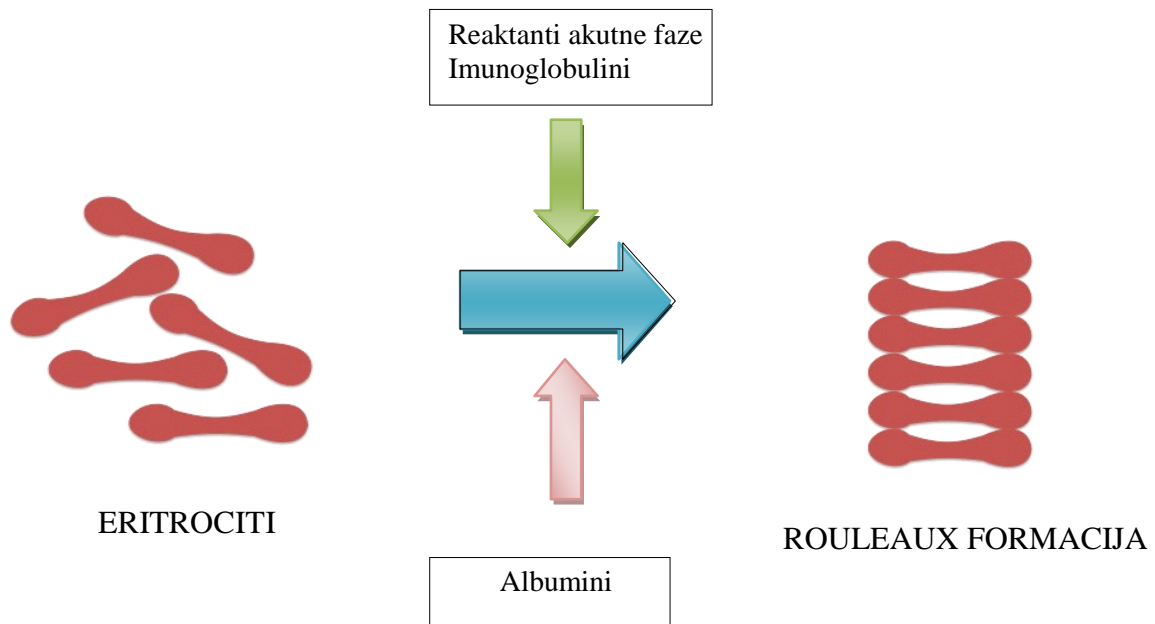


Slika 1.1. Shematski prikaz zeta potencijala. Eritrociti (negativni naboj) u otopini preraspodjelom naboja stvaraju ionski dvosloj s razlikom potencijala označenom kao zeta potencijal (osjenčano).

U upalnim stanjima se pojačano sintetiziraju proteini akutnog odgovora upale, te fibrinogen i/ili imunoglobulini. Te bjelančevine inhibiraju zaštitno djelovanje sijalinske kiseline na površini eritrocita, pa oni brže sedimentiraju u *in vitro* postupku. (7)

Proteini velike molekularne mase povećavaju viskoznost krvi, te ubrzavaju proces „sljepljivanja“ eritrocita. Novonastali agregati ubrzano sedimentiraju. Takvi agregati eritrocita opisani su kao „rouleaux“ oblici eritrocita (Slika 1.2.). Fibrinogen kao najzastupljeniji reaktant akutne faze ima najveći učinak na povećanje SE. U patološkim stanjima kao što su multipli mijelom ili Waldenstromova makroglobulinemija paraproteini (pozitivno nabijene molekule) su prisutni u većini, ubrzano stvaraju „rouleaux“ formacije,

raste sedimentacija i povećava se viskoznost krvi. Uloga albumina, najzastupljenijeg proteina plazme na sedimentaciju i agregaciju eritrocita je i dalje kontroverzna. (7)



Slika 1.2. Nastajanje „rouleaux“ oblika eritrocita potiču proteini akutne faze i imunoglobulini a ometa albumin. O brzini nastajanja „rouleaux“ oblika ovisi SE

O utjecaju humanog albumina na brzinu sedimentacije eritrocita učinjena su brojna *in vitro* istraživanja. Tako su Reinhart i suradnici u svom eksperimentu koristili plazmu obogaćenu fibrinogenom, plazmu pacijenta s hipoalbuminemijom, plazmu s otopinom dextransa 70 u puferu, te mješavinu plazme fibrinogena, imunoglobulina i albumina u puferu. SE su određivali Westergren metodom. Rezultati istraživanja su pokazala da se SE dodatkom albumina ili otopine dextransa u puferu smanjuje, dok dodatak mješavine fibrinogena, imunoglobulina i albumina povećava sedimentaciju eritrocita (7).

1.1.2. PRIMJENA SEDIMENTACIJE ERITROCITA

Ograničena analitička specifičnost i osjetljivosti te nepotpuna standardizacija metoda određivanja otežavaju usporedbu rezultata u praćenju rezultata različitih laboratorija. Uvođenjem automatizirane sedimentacije, mogu se standardizirati uvjeti određivanja (temperatura, vrijeme), ali primjena različitih tehnika mjerenja brojnih proizvođača onemogućava potpunu standardizaciju metoda(8). Unatoč ograničenoj dijagnostičkoj osjetljivosti određivanje SE i dalje nalazi primjenu u dijagnostici upalnih stanja. Istraživanja pokazuju da se povišena razina SE zadržava sve dok traje upalni proces (2,9).

1.2. C- REAKTIVNI PROTEIN

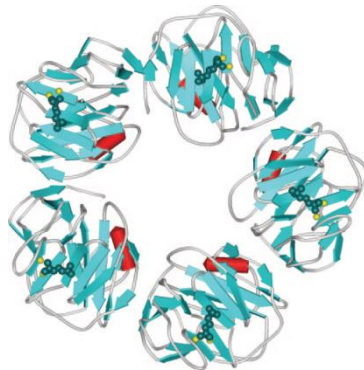
C-reaktivni protein (CRP) je filogenetski dobro očuvan protein plazme koji sudjeluje u sistemskom odgovoru organizma na upalu kod kralježnjaka i bezkralježnjaka (3).

CRP su otkrili 1930. godine William Tillett i Thomas Francis u serumu pacijenta oboljelog od pneumonije, a CRP je izoliran 1941. godine (5). Naziv C-reaktivni protein nastaje zbog njegove sposobnosti reagiranja sa C-polisaharidom izoliranim iz stanične stijenke *Pneumococca* (5). Prve laboratorijske metode određivanja CRP-a su bile kvalitativne i primjenjivale su se do 1970. godine kada je dostupnost metode za izolaciju i identifikaciju C- reaktivnog proteina, omogućila širu primjenu kvantitativnog mjerenja koncentracije CRP-a. (1). Značajno povećanje vrijednosti CRP-a u krvi, ako je riječ o akutnoj upali, iznosi oko 6-12 (10) sati, a vrijednosti mogu biti povećane do 2000 puta (4, 10).

1.2.1. OSOBITOSTI DJELOVANJA C- REAKTIVNOG PROTEINA

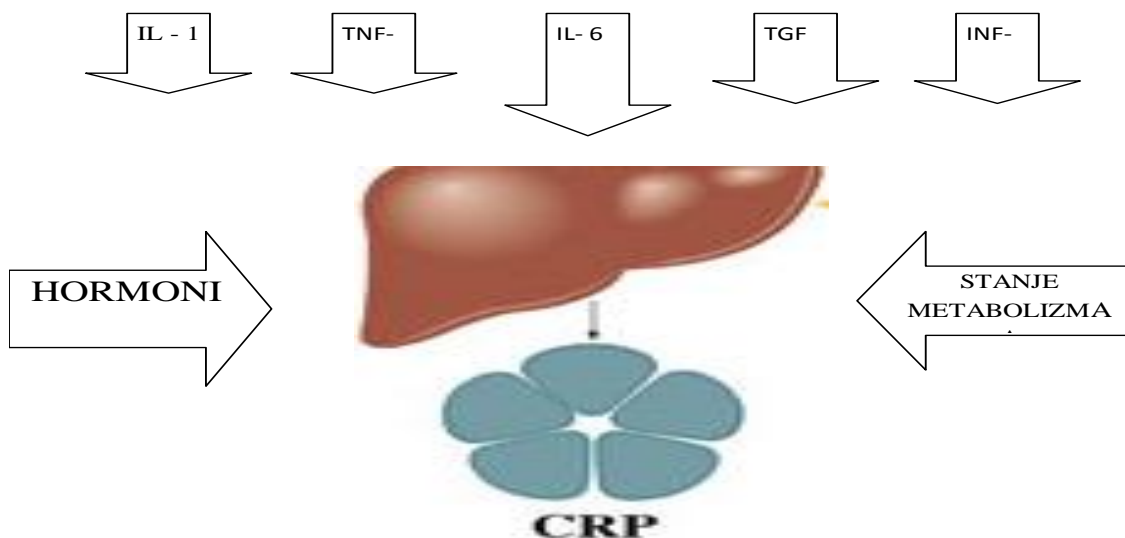
CRP je građen je od 5 identičnih, neglikoziliranih podjedinica sastavljenih od jedinstvenog polipeptidnog lanca od 206 aminokiselina (Slika 1.3.) (4).

Molekularna masa CRP-a je 118 kDa. Sintetizira se u jetri (u normalnim fiziološkim uvjetima 1-10 mg/dan, a u akutnoj fazi upale > 1g / dan) nakon indukcije citokina, te interleukina 6 (IL 6). (Slika 1.4.).



Slika 1.3. Kristalografska struktura kompleksa C-reaktivnog proteina

Nedavna istraživanja su pokazala da se CRP može sintetizirati i u nehepatičnom tkivu. Dva provedena istraživanja su pokazala da se CRP sintetizira u epitelnim stanicama respiratornog trakta, te u stanicama bubrežnog epitela. Neuralne stanice također imaju sposobnost sinteze C- reaktivnog proteina u patološkim neurodegenerativnim promjena kao što je Alzheimerova bolest (5).



Slika 1.4. Utjecaj citokina na sintezu CRP-a

U odsutnosti IL-6 sinteza CRP-a se smanjuje na fiziološku vrijednost za 2-4 sata .
Koncentracija IL-6 je povećana u plazmi u upali. (4)

1.2.2. PRIMJENA C- REAKTIVNOG PROTEINA

CRP djeluje u neadaptacijskom obrambenom mehanizmu, opsonizacijom napada mikroorganizme i potpomaže fagocitozu. U prisutnosti kalcijevih iona CRP može vezati polisaharide iz većine bakterija, gljivica i parazita kao i raspadne produkte nekrotiziranih stanica. Veže se za fosforilkolin i fosforiletanolamin te polisaharide bakterija iz oštećenog tkiva, aktivira klasični put komplementa koji počinje sa C1q komponentom komplementa. Veže se na receptore limfocita. U organizmu ga na mjestu upale razgrađuju proteaze. Biološki je poluvjek 19 sati , ali nakon vezanja s ligandom, poluvijek se skraćuje. (4)

2. TEHNIKE I METODE ODREĐIVANJA SE i CRP- a U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI

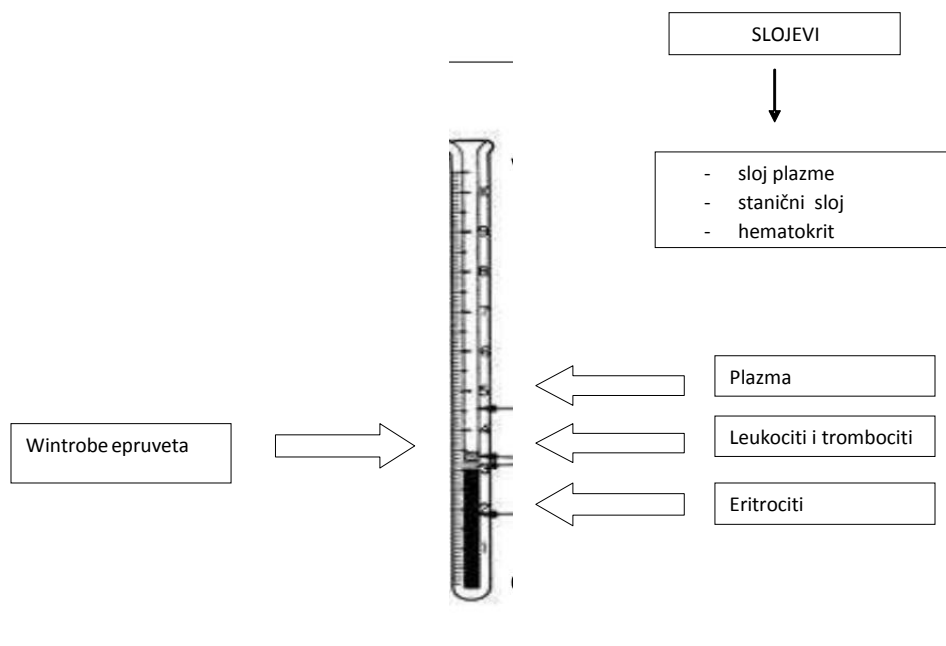
Tehnološki napredak i znanstvena otkrića u području bioloških znanosti, unaprijedili su sva područja laboratorijske dijagnostike. Uvođenjem automatizacije, kroz upravljanje strojevima, procesom ili sustavom koji zamjenjuje ljudski rad, pacijent do laboratorijskoga nalaza dolazi u vrlo kratkom vremenu, a u analitičkom postupku se primjenjuju pretrage s visokom analitičkom i dijagnostičkom osjetljivošću i specifičnošću. Na taj se način osigurava pravovremena zdravstvena zaštita svim pacijentima. (6)

2.1. LABORATORIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE SE

U prošlosti, dvije najčešće upotrebljavane metode za mjerenje sedimentacije eritrocita su bile Westergren-ova i Wintrobe-ova metoda, koje su za uzorak koristile krv sa citratom kao antikoagulantom. Proces sedimentiranja stanica se odvija u graduiranoj staklenoj epruveti u okomitom položaju. Nakon jednog sata očita se stupac sedimentiranih eritrocita i izrazi se kao visina sedimentiranih eritrocita (mm/h). S vremenom, metode su se razvijale i usavršavale, tako da danas u laboratorijskoj dijagnostici koristimo preporučenu Westergrenovu metodu i automatiziranu sedimentaciju. Automatizirane metode, najčešće koriste laserski princip mjerenja, tj. očitavanja rezultata, koji bilježi promjene u optičkoj gustoći uzorka, te ih pretvara u rezultat. (6)

2.1.1. TIJEK REAKCIJE SEDIMENTIRANJA ERITROCITA

SE je direktno proporcionalna težini staničnih agregata U prvih 10 minuta od početka mjerenja stvaraju se „rolueaux“ oblici eritrocita i sedimentiranje se odvija sporije. Sljedećih 40 minuta nastavlja se kontinuirano proces sedimentiranja agregata, a zadnjih 10 minuta sedimentiranje se usporava. Po isteku vremena u graduiranoj epruveti se vide razdjeljeni slojevi plazme i stanica (leukocita, trombocita, eritrocita) kao što je prikazano na slici 2.1. (11)



Slika 2.1. Prikaz razdjeljenih slojeva u procesu sedimentacije

Na rezultate se SE utječu brojni čimbenici koje možemo grupirati prema fiziološkim osobitostima i laboratorijskim analitičkim specifičnostima (Tablica 2.1.). (12)

Tablica 2.1. Utjecaj različitih čimbenika na laboratorijski nalaz

Fiziološki čimbenici	Laboratorijski učinci
plazmatski čimbenici	Temperatura
učinak eritrocita	Vrijeme
„rouleaux“ oblici	Antikoagulans
Dob	učinak epruvete za sedimentaciju
Spol	Vibracija
trudnoća	izloženost svjetlosti

Metode za određivanje sedimentacije djelimo na manualne i automatizirane. (12)

2.1.2. MANUALNE METODE ZA ODREĐIVANJE SE

Uzima se uzorak venske krvi sa antikoagulansom EDTA, te se razrjeđuje sa natrij citratom u omjeru 4:1. Zatim se uzorak prenese u staklenu epruvetu debljine 200 mm s unutarnjim promjerom od 2,5 mm u okomiti položaj, na sobnu temperaturu, zaštićenu od sunčeve svjetlosti. Po isteku jednog sata kao SE se mjeri udaljenost od meniskusa do vrha stupca eritrocita, te se izražava u mm na sat (12).

Sustav Internacionalnih jedinica preporuča izražavanje SE u mm/ks

2.1.2.1. Westergrenova metode

Referentna metoda za određivanje sedimentacije eritrocita je Westergrenova metoda, ustanovljena 1973. godine od strane Internacionalnog odbora za standardizaciju u hematologiji, (engl. *International Council for Standardisation in Haematology*, ICSH) Westergren metoda zahtjeva prikupljanje venske krvi pacijenta. Uzorak krvi na sobnoj temperaturi može stajati 2 sata, a na temperaturi od + 4 °C i do 6 sati. U ovom slučaju govorimo o mjerenju eritrocita pod utjecajem gravitacije. Dosadašnja iskustva i istraživanja su pokazala da na određivanje SE utječu brojni čimbenici:

1. temperatura
2. razrijeđenje (ukoliko se kao antikoagulans koristi Na citrat)
3. niži hematokrit, < 0,35
4. neodgovarajući materijal od kojeg su napravljene epruvete
5. vibracije
6. direktna izloženost sunčevoj svjetlosti
7. unutrašnji čimbenici (karakteristike uzorka)
8. nepravilan položaj epruvete
9. nejednak promjer epruvete (mijenja sedimentaciju)

Westergren metoda podrazumijeva upotrebu staklenih epruveta, dužine 200 mm, promjera 2.65 +/- 0.15 mm. (12)

1. Porast temperature uzrokuje smanjenje viskoznosti, što dovodi do povećanja sedimentacije eritrocita. Porast temperature za jedan stupanj smanjuje viskoznost krvi za 3 % . (12)

2. Westergren metoda podrazumijeva upotrebu isključivo EDTA kao antikoagulansa te se tako izbjegava učinak razrjeđenja na rezultat, dok upotreba natrij citrata kao antikoagulansa za pripremu uzorka, dovodi do učinka razrjeđenja uzorka, što direktno utječe na rezultat. (12)
3. Visoka vrijednost hematokrita podrazumijeva nižu razinu sedimentacije eritrocita i obratno, niska vrijednost hematokrita podrazumijeva visoku. Po preporuci Instituta za klinički i laboratorijski standard (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) za vrijednost hematokrita $\leq 35\%$ vrši se korekcija rezultata prema Fabry-ovoj formuli:

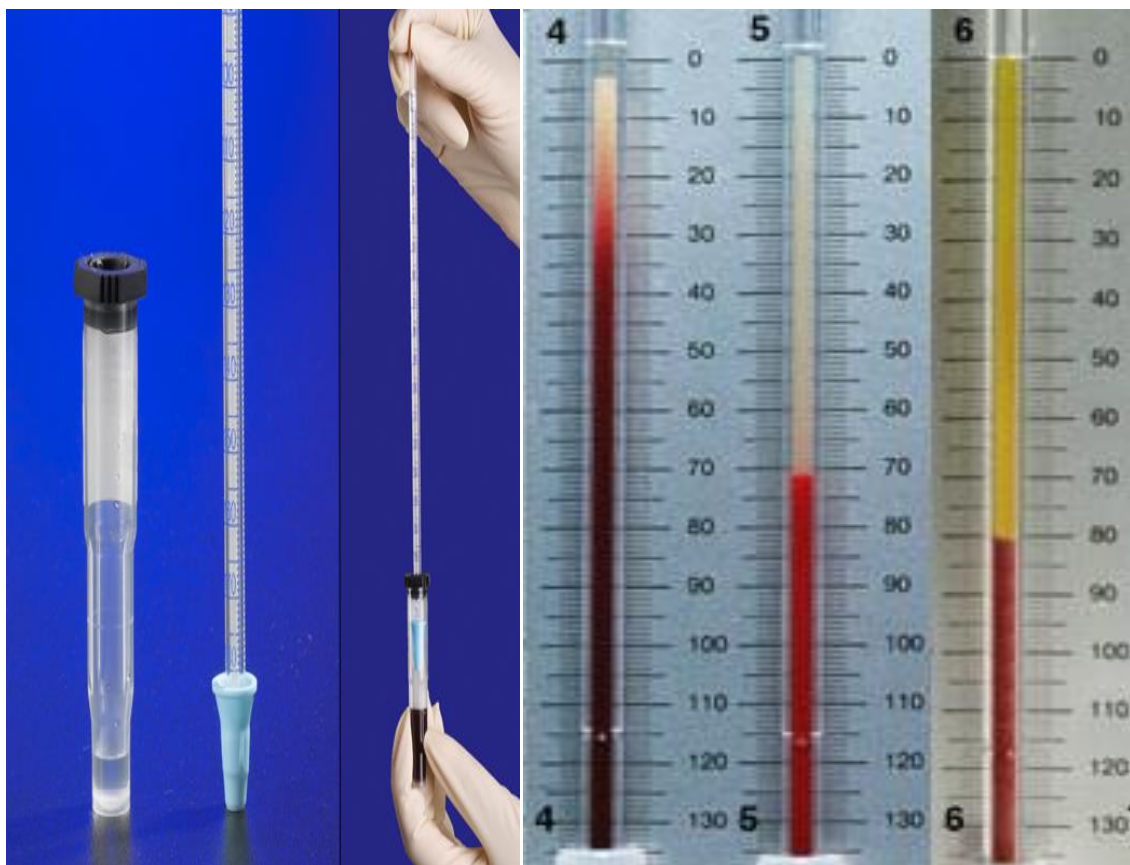
$$\frac{WG \times 15}{55-HCT} \qquad \frac{114 \times 15}{55-30.3} = 69,2$$

(WG - očitana vrijednost SE po Westergrenu; HCT – vrijednost hematokrita) (12)

Slika 2.2. Formula za izračunavanje korigirane vrijednosti sedimentacije eritrocita (primjer)

4. Upotreba plastičnih graduiranih epruveta umjesto staklenih, uzrokuje elektrostatičke interakcije između eritrocita. Plastika ima izraženu osobinu adhezije što utječu na proces sedimentacije eritrocita. (12)
5. Vibracija može ozbiljno poremetiti reproducibilnost rezultata. To je još više izraženo, ukoliko utjecaj vibracije nije stalan već povremen. (12)
6. Direktna utjecaj sunčeve svjetlosti na stalak sa epruvetama, dovodi do povećane vrijednosti sedimentacije eritrocita (utjecaj temperature). (12)

Pored nabrojanih čimbenika koji utječu na sami postupak rada značajno je izražen i problem kalibracije. Po ICSH-u Westergren metoda se ne može kalibrirati. Zbog svega gore navedenog, proizvođači komercijalnih epruveta i raznih sistema za određivanje sedimentacije, su ove proizvode okarakterizirali kao semikvantitativne (8, 9).



Slika 2.3. Postupak određivanja sedimentacije eritrocita manualnom metodom i prikaz rezultata kod 3 pacijenta (vizualno očitavanje može utjecati na rezultat)

2.1.2.2. Wintrobeova metoda

Wintrobeova metoda se koristi sličnim postupkom kao i Westergrenova. Osnovna razlika je u graduiranoj epruveti, koja je kraća i manjeg promjera. U epruvetu se stavlja krv sa EDTA antikoagulansom bez dodatnog razrjeđenja, te se nakon sat vremena u milimetrima mjeri razina sedimentiranih eritrocita. U stanjima kao što je anemija s smanjenom vrijednošću hematokrita, potrebno je korigirati rezultat jer ono može biti lažno povećan (razlike u epruveti). Wintrobe metoda je manje osjetljiva te se predlaže uporaba Westergren metode u standardnom laboratorijskom radu (9, 13).

Modificirana Westergren metoda se danas najčešće upotrebljava u laboratoriju. Primjenjuje se zatvoreni sustav sa automatskim punjenjem epruveta za jednokratnu uporabu i unaprijed pripremljenim diluentima. Na taj se način smanjuje mogućnost kontaminacije, te se ujedno

povećava sigurnost zdravstvenih djelatnika. Isto tako se koriste obilježene epruvete koje povećavaju točnost i reproducibilnost rezultata. (9)

2.1.2.3. Zeta Sedimentacija

Zeta sedimentacije je tehnika kojom se indirektno određuje reakcije akutne faze upale. Uzorak krvi se uzima u kapilarnu cjevčicu veličine 75×2 mm koja se smješta okomito u posebnu centrifugu, zetafugu. Centrifugiranje se provodi 45 sekundi na 400 rpm-a. Nakon svakog okretaja u centrifugi, cjevčica se rotira za 180° oko okomite osi. Nakon centrifugiranja, pod utjecajem gravitacijske i centrifugalne sile, na silaznom cik-cak putu sedimentiraju se eritrociti. Za provođenje testa je potrebno 5 minuta. Veličina zbijanja eritrocita izražava se kao zetakrit, a dobiva se dijeljenjem visine nastalog sedimenta sa visinom razine ukupne krvi. Također se mjeri i razina hematokrita, te se omjer hematokrita i zetakrita izražava kao razina zeta sedimentacije. Na razinu zeta sedimentacije ne utječu patološka stanja kao što je anemija.(6) Pokazana je dobra korelacija između vrijednosti zeta sedimentacije i istovremeno izvedene sedimentacije eritrocita. (13). Tablica 2.2. prikazuje usporedbu normalnih vrijednosti sedimentacije dobivenih Westergren, Wintrobe i metodom zeta sedimentacije. (6)

Tablica 2. 2. Sedimentacija eritrocita - usporedba metoda

Metoda	Spol	Rezultat
Westergren	muškarci	0 – 10 mm/h
	žene	3 – 25 mm/h
Wintrobe	muškarci	1 – 11 mm/h
	žene	6 – 24 mm/h
Zeta	muškarci	46 – 52 mm/h
	žene	46 – 34 mm/h

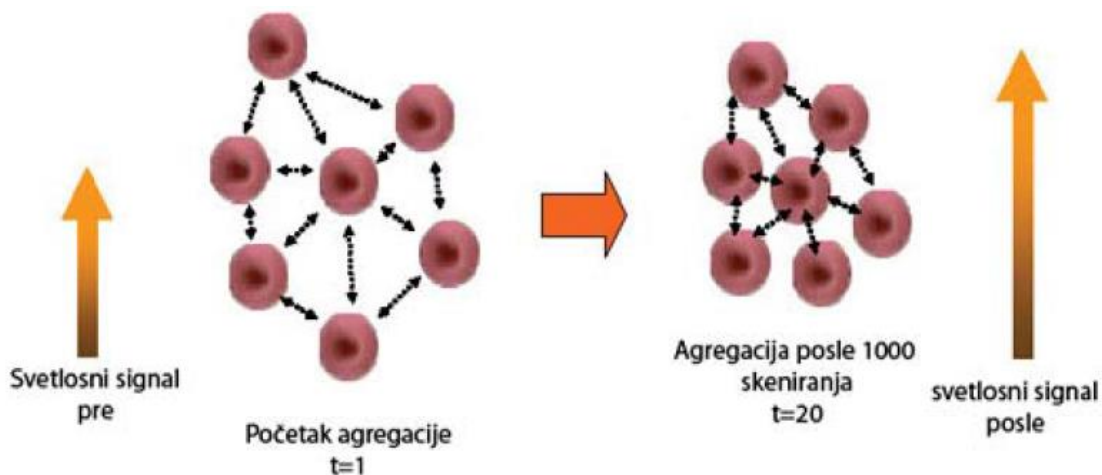
Izvor : Bucher, WC, Gall EP, Woodworth R. Am J Clin Pathhol 1975; 64:613-17.

Rezultati pokazuju sednje vrijednosti ± 1 SD kod 104 zdravih ispitanika, 55 žene u dobi od 21 do 60 godina,

2.1.3. ODREĐIVANJE SE AUTOMATIZIRANIM METODAMA

Primjena automatiziranih metoda za određivanje sedimentacije eritrocita povećava točnost i reproducibilnost rezultata, skraćuje vrijeme potrebno za izdavanje nalaza, omogućuje upotrebu istoga uzorka za određivanje SE i krvne slike. U posljednjem desetljeću, razvilo se nekoliko automatiziranih sustava za određivanje SE koji koriste različite metode očitavanja rezultata. Prednosti primjene automatizirane sedimentacije su : jednostavnost rada, ekonomičnost, te praktičnost. Sustavi su zatvoreni te smanjuju mogućnost direktnoga kontakta sa krvlju. Nedostaci novih analizatora su u primjeni različitosti metoda, neusporedivosti rezultata različitih proizvođača, razlike u osjetljivost i specifičnost. ICSH i CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) predlažu standardizaciju metoda. Standardizirane metode odobrene od ICSH-a, moraju biti direktno usporedive s referentnim metodama. Nadalje, te metode se mogu koristiti kao alternativne metode za verifikaciju kvalitete kontrole ili za verifikaciju metoda u rutinskom radu laboratorija. (14,15,16).

Novija automatizirana tehnika za određivanje sedimentacije eritrocita, mjeri brzinu agregacije eritrocita i koristi promjenu optičke gustoće venske krvi za izražavanje rezultata. Svaki uzorak se u vremenskom intervalu od 20 sekundi skenira 1000 puta (12). Na slici 2.4. shematski je prikazano nastajanje agregata tijekom sedimentiranja eritrocita u odnosu na promjenu optičke gustoće.

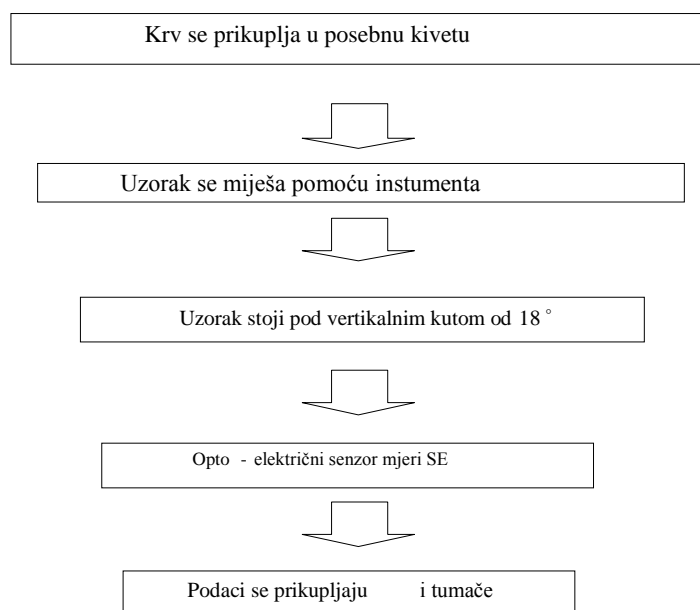


Slika 2.4. Načelo mjerenja gustoće sedimentiranih eritrocita tijekom odvijanja reakcije

Razvijen je matematički model za preračunavanje rezultate mjerenja optičke gustoće u sedimentaciji eritrocita i izražavanje rezultata u mm/ h (12).

Automatizirane metode imaju slične postupke u pripremi i procesu rada kao što je prikazano na slici 2.5.

PROCES RADA



Slika 2.5. Odvijanje radnoga procesa u automatiziranim metodama za određivanje sedimentacije eritrocita

2.1.3.1. *Analizator Ves-Matic Cube 200*

Ves- Matic Cube 200 (Diesse Diagnostica Senese, Siena, Italy) je zatvoreni automatski sustav za određivanje sedimentacije eritrocita. Za analizu, koristi vensku krv sa EDTA antikoagulansom. Mjerenje sedimentacije eritrocita se provodi koristeći optičko- elektroničke elemente (bijelo svjetlo, snažni LED), i analogni foto senzor, pri temperaturi od 18 °C. (14)

Provedeno je istraživanje koje se baziralo na usporedbi Westergren metode i automatizirane metode za određivanje sedimentacije eritrocita Ves- Matic Cube 200 (12). Određivala se

točnosti i preciznost, a istraživanje je pokazalo da nema značajne razlike u pogreškama u radu između tih dvije metode (Tablica 2.3.) (14)

Tablica 2.3. Rezultati usporednih vrijednosti sedimentacije eritrocita mjerene Westergren metodom i automatskim analizatorom Ves- Matic Cube 200

Izvor: British medical journal , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2070843/>

Metoda	n	SE (mm/h)	Raspon (mm/h)	CV (%)
niske vrijednosti (9 mm/h)				
Ves-Matic Cube 200	10	8,7 ± 0,8	7 – 10	9,19
Westergren	10	8,6 ± 0,8	7 - 10	9,13
srednje vrijednosti (42 mm/h)				
Ves-Matic Cube 200	10	42,5 ± 5,9	36 – 50	13,88
Westergren	10	58,8 ± 8,4	47 - 74	14,29
visoke vrijednosti (95 mm/h)				
Ves-Matic Cube 200	10	95,4 ± 5,4	87 – 104	5,66
Westergren	10	89,8 ± 5,3	81 - 100	5,99

Vrijednosti SE su izražene kao srednja vrijednost ± 1 SD, u području normalne, srednje i visoke vrijednosti kod 10 uzastopnih određivanja, nepreciznost unutar serije izražena je kao koeficijent varijacije (CV%)

Stabilnost uzorka se odredila nakon 24 satne pohrane na temperaturi od + 4°C , te na sobnoj temperaturi. Rezultati su pokazali da nema statistički značajnih razlika između uzoraka pohranjenih na + 4°C (P = 0.2003), ali su dokazane statistički značajnih razlika kod uzoraka pohranjenih na sobnoj temperaturi 24 sata u odnosu na standardno mjerenje SE (P < 0. 0001) (Tablica 2.4.) . Rezultati istraživanja nam govore da je automatski analizator Ves- Matic Cube 200 pouzdaniji sistem za određivanje sedimentacije eritrocita pri sobnoj temperaturi, te da se preporuča njegova primjena u kliničkim laboratorijima. (13)

Tablica 2.4. Stabilnost uzoraka utječe na razlike u vrijednostima sedimentacije

Izvor : British medical journal , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2070843/>

uzorak	n	Srednja	Raspon	CV%	Md	95% CI	p
--------	---	---------	--------	-----	----	--------	---

	(mm/h)	(mm/h)	(mm/h)	(mm/h)	(mm/h)	(mm/h)	(mm/h)
svježi	68	15,1	1-92	1,21			
24 sata na	68	2,6	1-36	1,71	12,49	-16,6-8,39	<0,001
Svježa s.t.	65	9,6	1-60	1,04			
24 h na 4°C	65	7,7	1-57	2,20	-1,97	-4,85-1,03	0,2003

Mjerenje SE na VesMatic Cube 200 unutar 4 sata od uzorkovanja i nakon 24 sata

Nakon provjere stabilnosti, i prosječne pogreške u radu istraživana je korelacija dobivenih rezultata sedimentacije eritrocita na 251 pacijentu između Westergren metode i metode na Ves-Matic Cube 200. Prosječna vrijednost sedimentacije eritrocita koristeći Ves-Matic Cube 200 je iznosila 18.90 mm/h pri intervalu pouzdanosti od 95% . Rezultat dobiven Westergren metodom je iznosio 19.38 mm/h, te je istraživanje pokazalo da nema značajne razlike između dobivenih rezultata. Rezultat analize linearne regresije pokazuje jako dobar stupanj korelacije ($r = 0,946$; $P < 0.001$) (14)

2.1.3.2. Analizator Streck ESR – auto plus

Analizator Streck ESR – auto plus (Streck, Omaha, NE) je automatski analizator za mjerenje sedimentacije eritrocita koji koristi metodu mjerenja pomoću infracrvenog zračenja čime se povećava točnost. Rezultati se automatski dobivaju neposredno po završetku mjerenja. Vennapusa B i sur. proveli su validaciju analizatora Streck ESR – auto plus i u usporedbi sa referentnom Westergren metodom (Sediplast Westergren metoda) koristili su uzorke EDTA krvi 113 ispitanika (14). Tablica 2.5 prikazuje razliku u vrijednosti sedimentacije eritrocita koristeći standardnu Westergren metodu i automatiziranu StreckESR-auto plus metodu.(15)

Tablica 2.5. Prikaz referentnih intervala različitih dobnih skupina dobivenih različitim metodama

Izvor : Journal of clinical pathology , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350092>

Muškarci, ≤ 50 g.		Muškarci, ≥ 50 g.		Žene, ≤ 50 g.		Žene, ≥ 50 g.	
ručno	auto	ručno	Auto	ručno	auto	ručno	Auto

S. V.	4	9	5	11	7	13	10	18
SD	3,6	5,6	5,5	7,8	5,7	7,5	5,8	7,7
S V+2 SD	11,2	29,	16	26,6	18,4	28	21,2	33,4
Ref. Ras.								
Sediplqast	0-15	-	0-20	-	0-20	-	0-30	-
Stareck	-	0-21	-	0-25	-	0-28	-	0-33

Istraživanje je pokazalo da vrijednost SE dobivena analizatorom Streck ESR- Auto plus znatno veća od one dobivene Sediplast Westergren metodom.(Tablica 2.5). Iako, usporedba metoda daje visoku korelaciju (95%), y- odsječak pravca regresije je 6.5 što ukazuje na značajnu razliku između metoda. Stoga su se, modificirali referentni intervali različitih dobnih grupa za StreckESR analizator. Razlike u vrijednosti SE su jače izražene kod viših vrijednosti SE (Tablica 2.5.). Povećane vrijednostima SE u odnosu na referentnu Westergrenovu metodu dokazane su i kod drugih proizvođača stoga i dalje treba automatske metode usavršavati (16)

2.1.4. USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE SE

Raspoloživost različitih tehnika i metoda za određivanje sedimentacije eritrocita od laboratorija zahtjeva pored poznavanje analitičkih karakteristika testa i poznavanje biokemijskih mehanizama kliničke osjetljivosti i specifičnosti pretrage. Prije odluke o primjeni određene metode potrebno je izvršiti opsežnu evaluaciju testa, a uspoređivanjem metoda procjenjuje se prihvatljivost određene metode za rutinski rad. (8)

Provedena su brojna istraživanja usporedba metoda i kao što je prethodno u tekstu prikazano postoje razlike među testovima i metodama. Stručna udruženja za medicinsku (kliničku) biokemiju i laboratorijsku medicinu preporučuju primjenu standardiziranih metoda kako bi se postigla harmonizacija u radu laboratorija. (8)

2.2. METODE ZA ODREĐIVANJE C – REAKTIVNOG PROTEINA

Razvoj imunokemijskih metoda unaprijedio je laboratorijsku medicinu. Osnovno svojstvo imunokemijskih metoda od imunoprecipitacije do biočip metoda jest reakcija između antigena i protutijela. (6)

2.2.1. IMUNOKEMIJSKE METODE

Imunokemijske metode se primjenjuju za otkrivanje, razlikovanje i mjerenje koncentracije različitih antigena i protutijela prisutnih u serumu i drugim tjelesnim tekućinama. Zbog izuzetne specifičnosti reakcije između antigena i protutijela, sve imunokemijske tehnike odlikuju se osjetljivošću, reproducibilnošću i jednostavnošću. (6)

2.2.1.1. Neobilježene ili izravne metode

Radialna imunodifuzija

Radialna imunodifuzija osniva se na pasivnoj difuziji antigena u agarozni gel koji sadrži jednolično raspoređena protutijela. Pri prvom dodiru s protutijelima, antigen je u velikom suvišku pa nastaju kompleksi Ag-At. Daljnje difundiranje antigena uzrokuje pad koncentracije antigena, dok koncentracija raspoloživih protutijela raste. Kad se postigne optimalan koncentracijski odnos između antigena i protutijela, nastaje netopljiv i nepokretan precipitacijski prsten koji se može mjeriti. Površina precipitacijskog prstena razmjerna je koncentraciji antigena. Uspoređivanjem s površinama precipitacijskih prstena poznatih koncentracija antigena može se mjeriti nepoznata koncentracija antigena u ispitivanom uzorku. Ovom tehnikom određuju se i koncentracije imunoglobulina, lipoproteina, hemoglobina kao i mnogih drugih specifičnih proteina. (17)



Slika 2. 6. Površina precipitacijskog prstena razmjerna je koncentraciji CRP-a

2.2.1.2. *Imunokemijske tehnike u otopini*

Imunokemijske tehnike u otopini razlikuju se s obzirom na način mjerenja između antigena i protutijela. U jednim se mjerenje provodi u zoni ekvivalencije (tzv. neobilježene ili izravne imunokemijske tehnike) dok druge mjere primarnu reakciju između antigena i protutijela (tzv. obilježene imunokemijske reakcije). (17)

Za mjerenje reakcije između antigena i protutijela u zoni ekvivalencije, kad je postignuta maksimalna koncentracija kompleksa antigen-protutijelo (*end-point method*) primjenjuje se imunoturbidimetrija ili imunonefelometrija. (17)

Svaki uzorak antigena pomiješa se sa stalnom koncentracijom protutijela u prisutnosti polietilenglikola koji pojačava reakciju vezanja, pomiče točku ekvivalencije prema višim koncentracijam antigena i održava homogenost kompleksa antigen-protutijelo. Nakon inkubacije od 45 do 75 minuta, svaka se otopina promiješa i mjeri se apsorpcija (turbidimetrija) ili rasap svjetla (nefelometrija). Standardna krivulja apsorpcije ili rasapa svjetla dobije se mjerenjem poznatih koncentracija antigena. (17)

Obje se imunokemijske tehnike mogu primijeniti za mjerenje koncentracije antigena s pomoću automatiziranih mjernih instrumenata. (17)

Osjetljivost imunonefelometrije je nešto veća od imunoturbidimetrije i iznosi 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$.

Turbidimetrija

Turbidimetrija je optička metoda koja se zasniva na mjerenju smanjenja intenziteta rasapa zračenja nakon prolaza svjetlosne zrake kroz otopinu s prisutnim česticama, emulziju ili suspenziju. Svaka čestica (atom, molekula, koloidna suspenzija) zajedno s medijem u kojem se nalazi je heterogeni sustav, zbog čega se nakon kontakta s česticama svjetlost rasipa. Ovo

zračenje se mjeri pod kutom od 180° u odnosu na smjer ulazne zrake. U kombinaciji s imunokemijskim reakcijama u otopini imunoturbidimetrija se često koristi za određivanje koncentracije specifičnih proteina (antigena). (17)

Kod primjene turbidimetrijskih mjerenja posebno je važno odrediti područje mjerenja u kojem vrijedi Lambert-Beerov zakon za tvar koja se mjeri, jer je to mjerno područje u kojem je baždarni pravac linearan. (17)

Važno je da se analiza otopina standarda, kontrolnih uzoraka, slijepe probe i uzorka seruma obavlja pod istim uvjetima. Na automatskim analizatorima primjenjuje se metoda završne točke. (17)

Nefelometrija

Nefelometrija mjeri rasap svjetlosti pod određenim kutom, nakon ekscitacije otopine. Idealno mjerenje rasapa svjetlosti podrazumijeva razrijeđenu suspenziju uzorka kako bi se smanjile apsorpcija i refleksija svjetlosti. Čestice kompleksa analit-protutijelo više raspršuju svjetlo pri manjem kutu s obzirom na smjer ulazne svjetlosti. O konstrukciji nefelometra ovisi hoće li mjerenje raspršene svjetlosti biti pod kutem od 90° ili 30° . (17)

Nefelometrijske metode mogu se primijeniti kao pojedinačne pretrage ili kao automatizirane pretrage. Koncentracija analita očitava se interpolacijom iz baždarne krivulje.(17)

2.2.2. AUTOMATIZIRANE METODE ZA ODREĐIVANJE CRP-a

Primjenom automatskih analizatora u određivanju koncentracija CRP-a znatno se ubrzao dijagnostički proces. Automatski analizatori koriste uglavnom metode turbidimetrije i nefelometrije. (18)

Razvoj tehnologija mikro-elektro-mehaničkog sistema (MEMS) pruža mogućnost uporabe u mnogim područjima biotehnologije, komunikacije, optičkih sustava.. Temelji se na integriranju minijaturnih senzora, pokretača i elektronike u jedan čip koristeći mikro tehnologiju. Korištenje MEMS tehnologije u području molekularne biologije, biomedicine i analitičke kemije privlači sve veći interes znanstvenika i tehnologa diljem svijeta. Minijaturni biomedicinski sustavi obično imaju nekoliko prednosti u odnosu na „veće“ sustave kao što su: niža proizvodna cijena, veća raspoloživost, manja uporaba radnih reagenasa i uzoraka, te manja potrošnja energije i vremena. Nedavno je uspješno predstavljen niz integriranih

mikrouređaja i sustava za pripremu uzoraka, reakciju i detekciju. Primjerice, mikrotekućinski uređaj sastavljen od mikropumpe i mikroventila se koristi za automatsko izvođenje cijelog ELISA procesa. Brza detekcija i kvantifikacija proteina je od velike važnosti u dijagnostičkom procesu. (18)

Razina osjetljivosti metode (detekcijski limit) za CRP se stalno smanjuje, tako da tehnologija mikročip metode može sa pouzdanošću mjeriti vrijednosti CRP-a od 0.0125 mg/L. Istraživanje je pokazalo da se uz pouzdanu razinu točnosti u niskim područjima koncentracija mikročipovi mogu primijeniti i za kontinuirano praćenje CRP-a, što je značajno za rano otkrivanje rizika kardiovaskularnih bolesti (18,19).

2.2.3 USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE CRP-a

Tradicionalne semikvantitativne metode mjerenja CRP-a su 1968. godine zamijenile kvantitativne metode mjerenja, Uvođenje novih metoda u rutinski rad kliničkog laboratorija zahtjeva provedbu usporedba metoda. Brojni radovi bilježe analitičke i dijagnostičke karakteristike metoda, te uspoređuje rezultate koji pomažu u odabiru metoda za rutinski rad. Svaki proizvođač reagensa i analitičkih sustava prolazi rigorozne kontrole kako bi dokazao da udovoljava traženim analitičkim uvjetima. Tablica 2.6. prikazuje usporedbu kliničkih karakteristika između CRP-a i hsCRP-a. (19)

Tablica 2.6. Usporedba metoda za određivanje CRP-a

	CRP	HsCRP
Primjena	Za procjenu infekcija ,ozljeda tkiva i dijagnostiku upalnih stanja. Omogućuje informacije za dijagnostiku, terapiju i praćenje upalnih poremećaja.	Za procjenu stanja za koja se smatra da su povezana sa upalom kod inače zdravih pacijenata.
Klinička „cutoff“ vrijednost	„Cutoff“ približno 10 mg/L.	Cutoff : ≤ 1 mg / L.

Naizgled zdravi
 pojedinci : manje ili
 jednako od 5 mg/ L
 Akutni raspon : 20 –
 500 mg/ L.

Prikladan raspon assay vrijednosti	Veći ili jednaki od 5 mg / L.	< 1.0 mg/L to ≥ 10.0 mg/L.
Informacija analitičke osjetljivosti	Opisuje rad pri nižoj vrijednosti assay raspona.	Opisuje kvantitativni limit (funkcionalna osjetljivost).
Usporedba informacija različitih metoda	Usporedba novog uređaja sa referentnim.	Usporedba novog uređaja sa referentnim.
Standardizacija novih uređaja	Opisuje standardizaciju ili praćenje assaya.	Opisuje standardizaciju ili praćenje assaya. Assay bi minimalno trebao pratiti normu IFCC/BCR/CAP CRM 470.

Prilagođeno: Izvor : FDA (USA Food and drug administration),
<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm077167.htm>

3. STANDARDIZACIJA METODA U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI

Standardizacija je postupak koji provode neovisna tijela a kojim se nastoji smanjiti ili potpuno ukloniti varijabilnost između različitih testova za određivanje nekog analita. (20)

3. 1. STANDARDIZACIJA ODREĐIVANJA SEDIMENTACIJE ERITROCITA

Veća mobilnost pacijenata, te veća suradnja između laboratorija je dovela do potrebe uvođenja referentne metode za određivanje sedimentacije eritrocita, u svrhu usporedbe dobivenih rezultata, te poboljšanja kvalitete zdravstvenog sustava. Internacionalni odbor za standardizaciju u hematologiji (ICSH) je zaključio da je moguće provesti standardizaciju uvođenjem metode koja će omogućiti točna i precizna mjerenja. ICSH je prvotno predložio Westergren metodu, koja se služi razrijeđenom krvi (4 volumena krvi i 1 volumen citrata kao antikoagulansa) u staklenoj epruveti dužine 300 mm koja mora biti u okomitom položaju. Stručno vijeće za krvnu reologiju pod djelovanjem ICSH-a je predložilo nove smjernice za provođenje standardizacije u mjerenju razine sedimentacije eritrocita u sljedećim kategorijama :

1. ICSH referentna metoda: ICSH predlaže korištenje EDTA – antikoagulansa, i nerazrijeđene krvi u tradicionalnoj Westergren epruveti za određivanje sedimentacije eritrocita (20)
2. ICSH standardna metoda: ICSH predlaže upute za novu standardiziranu metodu za SE baziranu na sedimentu EDTA antikoagulirane, nerazrijeđene krvi u epruvetama veličine 200 mm, koje su napravljene kako bi se izbjeglo prolijevanje krvi, te kako bi se samim time povećala sigurnost zdravstvenih djelatnika. Takva standardizirana metoda se može koristiti u verifikaciji nalaza ili provjeri kontrole kvalitete, te bi u budućnosti mogla u potpunosti zamijeniti referentnu metodu. (20)
3. ICSH odabrana metoda- ICSH predlaže upute za radnu metodu, koja se zasniva na korištenju razrijeđene ili nerazrijeđene krvi, te se može koristiti kao rutinska radna metoda. Izdan je protokol za evaluaciju nalaza, te njenu usporedbu sa prve dvije smjernice. (20)

3.1.1. REFERENTNI INTERVALI I PREPORUČENE VRIJEDNOSTI ZA C-REAKTIVNI PROTEIN

Vrijednost sedimentacije eritrocita kod zdravih ispitanika raste sa rastom godina, te se može izračunati pomoću formule. Vrijednost raste za 0,85 mm/h za svako razdoblje od 5 godina. Tu pojavu može uzrokovati povećana razina fibrinogena ili veća učestalost oboljenja kod starije populacije. Najveća normalna vrijednost sedimentacije eritrocita je zabilježena kod populacije ljudi starih između 65-74 godine. Povišena razina SE povećava rizik od oboljenja kod ljudi svih dobnih granica, iako su liječnici svjesni da je kod mnogih pacijenata nepoznat uzrok povećanja (Tablica 3.1.) (2)

Harmonizacija laboratorijskih nalaza omogućuje racionalnu primjenu i pravilnu transverzalnu procjenu rezultata laboratorijskih pretraga.

Tablica 3.1. Referentni intervali prema spolu i dobnim skupinama

Referentni interval			
spol	dob	interval	jedinice
muški, ženski	1 d. – 7 g.	0 -20	mm/3,6 ks
muški	8 - 14 g.	2 -21	
muški	15 - 19 g.	2 – 12	
muški	20 – 50 g.	2 – 13	
muški	> 50 g.	3 – 23	
ženski	8 – 19 g.	2 – 20	
ženski	20 – 50 g.	4 – 24	
ženski	> 50 g.	5 - 28	

3.2. STANDARDIZACIJA ODREĐIVANJA CRP-a

Trenutno, ne postoji certificirani referentni materijal za normalnu, te malo povišenu razinu CRP-a. To se primarno događa zbog nedostatka visoko tehnološke metode koja bi se koristila kao referentna. Nacionalni Institut za Standarde, (engl. *National Institute of Standards and Technology*, NIRST) je pokrenuo prvi korak ka razvoju referentne metode za mjerenje CRP-a, (18). U kliničkim laboratorijima se određuje CRP sa različitom osjetljivošću, a koji će se

test odabrati ovisi o kliničkoj slici pacijenta. hs CRP test ima bolju osjetljivost, te se primjenjuje u otkrivanju osoba sa povećanim rizikom za razvoj srčanih bolesti. Trenutni hs-CRP testovi su standardizirani po normi ER/ IFCC DA- 470, certificirane referentne metode za proteine u ljudskom serumu. Nova verzija ERM DA- 470 norme je izdana, ali i dalje nema certificiranu vrijednost za CRP. Obje referentne procedure za mjerenje kao i referentni materijali su potrebni kako bi se omogućile točne osnove za rutinsko mjerenje CRP-a. (19)

3.2.1. Referentni intervali i preporučene vrijednosti za C reaktivni protein

Tablica 3.2. Referentni interval prema spolu i dobnim skupinama

Referentni interval			
spol	dob	interval	jedinice
muški, ženski	1 – 20 d.	0,1 – 4,1	mg/L
	2 mj. – 15 g.	0,1 – 2,8	
	> 15 g.	< 5	

CDC i AHA preporučuju sljedeće vrijednosti CRP-a za procjenu rizika kardiovaskularne bolesti:

Tablica 3.3. Preporučene vrijednosti CRP-a za procjenu rizika od kardiovaskularnih bolesti (prema CDC i AHA)

Koncentracija CRP-a	Relativan rizik
< 1,0 mg/L	nizak
1 – 3.0 mg/L	srednji
> 3.,0 mg/L	visok

Tablica 3.4 . Preporučene vrijednosti CRP-a za procjenu rizika za AIM i moždani udar

Koncentracija	Relativni rizik za AIM ili moždani udar
< 0,55 mg/L	1,0 (niski)
1,15 – 2,10 mg/L	2,6 (srednji)
> 2,1 mg/L	2,9 (visoki)

Preuzeto iz: Physicians Health Study

4.PRIMJENA U DIJAGNOSTICI

Sedimentacija eritrocita je jednostavna i jeftina laboratorijska metoda, kojom se procjenjuje određeni upalni proces u tijelu. Test sedimentacije eritrocita se pokazao kao koristan pri dijagnostici ne- upalnih stanja kao što su : tumor prostate, bolest koronarnih arterija i srčanih udara. Stoga je sedimentacija eritrocita važna za otkrivanje upalnih stanja, te prognozu ne-upalnih procesa. Zbog široke primjene, test, iako relativno star i dalje je nezamjenjiv u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici. (2)

Kliničko značenje SE je višeznačno. (Tablica 4.1.)

Tablica 4.1 Primjena SE i kretanje vrijednosti u različitim bolestima

Povećane vrijednosti	Snižene vrijednosti
trudnoća	hiperviskoznost
anemija	smanjena koncentracija fibrinogena
rbc abnormalnosti	hipogamaglobulinemija
mikrocitoza	disprotenemija
makrocitoza	policitemija
upalne bolesti	anemija srpastih stanica
akutna i kronična upala	sferocitoza
multipli mijelom	mikrocitoza
reumatoidni artritis	
tuberkuloza	
Systemski lupus eritematodes	

Najčešće se koristi u dijagnostici:

- a) reumatoidnog artritisa i ostalih autoimunih bolesti
- b) temporalnog arteritisa i polymyalgiae rheumaticae
- c) multiplog myeloma i ostalih paraproteina

Koncentracija CRP-a se određuje zbog procjene upalnog procesa u organizmu. Visoku razinu C- reaktivnog proteina uzrokuje upala, ali i druga patološka stanja. Nedostatak testa je taj što CRP ne otkriva gdje je upalno središte u organizmu, te koje patološko stanje uzrokuje upalu (20,21).

C- reaktivni protein se koristi za :

- a) Otkrivanje infekcije u postoperativnom vremenu – razina CRP normalno poraste 2 do 6 sata nakon operacija , a u kontroliranim uvjetima se vraća na normalu do 3 dana od operacije. Ukoliko i nakon 3 dana ostaje povišena razina, postoji mogućnost da je došlo do infekcije. (1,3).
- b) Identifikaciju infekcija i bolesti koje uzrokuju upalu kao što su :
 - Tumor limfnih čvorova
 - Autoimune bolesti (npr. Lupus)
 - Bolne otekline krvnih žila u području glave i vrata (giant cell arteritis)
 - Bolne otekline tkiva oko zglobova (reumatoidni artritis)
 - Otekline i krvarenja crijeva (upalna bolest utrobe)
 - Upale kostiju (osteomyelitis)

Procjenu odgovara organizma na terapiju – razina CRP-a vrlo brzo poraste za vrijeme upale, ali se i vrlo brzo normalizira ukoliko terapija djeluje. (3)

5. ZAKLJUČAK

Sedimentacija eritrocita i C-reaktivni protein su danas opće prihvaćene i često korištene laboratorijske pretrage za otkrivanje upalnih bolesti. Brzina sedimentacije eritrocita ovisi o obliku i broju eritrocita, te sastavu plazme. Referentni raspon za SE varira ovisano o dobi, spolu i godinama a kreće se od < 15 mm/h do < 49 mm/h. Povišene vrijednosti SE su povezane s infekcijskim bolestima, upalnim bolestima, reumatodnim artritismom, autoimunim bolestima, te nekrozom tkiva. Referentna metoda za određivanje SE je Westergren metoda.

CRP je protein akutne faze koji nastaje u jetri kao odgovor na otpuštanje upalnih citokina. Osjetljiviji je od sedimentacije eritrocita. Visoko osjetljiva metoda određivanja CRP-a (engl. hs – CRP) se koristi u određivanju relativnog rizika od budućih kardiovaskularnih poremećaja. Značajno povećanje vrijednosti CRP-a u krvi, ako je riječ o akutnoj upali, iznosi oko 6-12 (10) sati, a vrijednosti mogu biti povećane do 2000 puta. Određuje se imunokemijskim metodama kao što su imunoturbidimetrija i imunonefelometrija.

6. LITERATURA

Husain T.M ,Kim D.H . C-Reactive Protein and Erythrocyte Sedimentation Rate in Orthopaedics. The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal 15: 13–16, 2002.

<http://www2.aaos.org/shoulder/OC/Mart/MartLinks/ESR%20in%20Orthopaedics.pdf>

Bochen K, Krasowska A, Milaniuk S, Kulczyńska M, Prystupa A, Dzida G. Erythrocyte sedimentation rate – an old marker with new applications. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, 2011, Vol 5, No 2, 50-55 C:\Users\Home\Downloads\fulltext-36.pdf

Black S, Kushnert I, Samolst D. C-reactive Protein. The Journal of Biological Chemist 2004;47(279):48487-90. doi:10.1074/jbc.R400025200

Čvorišćec D, Čepelak I. ur. .Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada Zagreb, 2009.

Yeh E. T.H . A New Perspective on the Biology of C-Reactive Protein. American Hearth Association 2005; 97 : 609-611 DOI: 10.1161/01.RES.0000186188.38344.13

<http://circres.ahajournals.org/content/97/7/609.full.html>

Deborah A. Wilson. Immunologic Tests. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK275/>

Reinhart WH, Nagy C. Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. European journal of cinical investigation 1995 Jul;25(7):523-8. DOI: 10.1111/j.1365-2362.1995.tb01739.x <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556371>

Wiwanitkit V. Comparative study between the Westergren and automated method for determination of the erythrocyte sedimentation rate. Chiang Mai Med Bull 2001;40(3):139-141. http://www.medicine.cmu.ac.th/secret/edserv/journal/fulltext/Viroj40_3_1.pdf

Rogers K. B. . Methods of Measuring E.S.R. British medical journal 1952 Sep 6; 2(4783): 563. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2021244/?page=1>

Pai R. K, Philippides G. C- reactive protein. WebMD, 2014 Mar 12. <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/c-reactive-protein-crp>

Milles H. L, Sal H.B. Methods of Measuring E.S.R. British medical journal 1952 Sep 6; 2(4783): 563–564. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2021202/#reference-sec>

Ali –Fax Spa. Microtest 1. sedimentacija eritrocita\metode\microtest1m.pdf

Gilmour D, Sykes A. J. Westergren and Wintrobe Methods of Estimating E.S.R. Compared. British medical journal 1951 Dec 22; 2(4746): 1496–1497.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2070843/>

Curvers J, Kooren J, Laan M, van Lierop E, van de Kerkhof D, Scharnhorst, Herruer M. Evaluation of the Ves-Matic Cube 200 erythrocyte sedimentation method: comparison with Westergren-based methods. British Medical Journal 1951 Dec 22; 2(4746): 1496–1497.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2070843/>

Vennapusa B, De La Cruz L, Shah H, Michalski V, Zhang QY. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) measured by the Streck ESR-Auto Plus is higher than with the Sediplast Westergren method: a validation study. *Journal of clinical pathology* 2011 Mar;135(3):386-90. doi: 10.1309/AJCP48YXBDGTGXEV. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350092>

Patton W.N, Meyer P.J, Stuart J. Evaluation of sealed vacuum extraction method (Seditainer) for measurement of erythrocyte sedimentation rate. *Journal of clinical pathology* 1989 Mar; 42(3): 313–317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1141875/>

Koivunen M. E , Krogsrud R. L. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *LabMedicine*; 37, 490-497 . doi:10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F(2006). <http://labmed.ascpjournals.org/content/37/8/490.full.pdf+html>

Yang Y.N, Lin H.I, Wang J.H, Shiesh S.C, Lee G.B. An integrated microfluidic system for C-reactive protein measurement. *Biosens Bioelectron*. 2009. Jun 15;24(10):3091-6. doi: 10.1016/j.bios.2009.03.034. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403298>

Grützmeier S, von Schenck H. Four immunochemical methods for measuring C-reactive protein in plasma compared. *Clinical Chemistry*. Mar. 1989 vol. 35 no. 3 461-46 <http://www.clinchem.org/content/35/3/461.long>
<http://www.diesse.it/support/ves/vescube/documents/ICSH%20recommendations%20for%20measurement%20of%20ESR.pdf>

Bunk D. M , Camara J , Dodder N, Kilpatrick E. L, Phinney K. W, Turko I. V. Development of a Reference Measurement Procedure for C-Reactive Protein in Human Serum. National Institute of Standards and Technology, 2007. Oct 1. <http://www.nist.gov/mml/bmd/bioanalytical/creactiveprotein.cfm>

7. SAŽETAK

Sedimentacija eritrocita i C-reaktivni protein: analitička osjetljivost i dijagnostička primjena

Sedimentacija eritrocita (SE) i C reaktivni protein (CRP) su jednostavne, brze i neinvazivne laboratorijske pretrage, primjenjuju se za otkrivanje ili praćenje bolesnika sa sumnjom na upalnu bolest. Odabir SE ili CRP-a u procesu obrade i/ili liječenja bolesnika ovisi o dijagnostičkoj vrijednosti pretrage za određeno stanje ili bolest.

SE je jedna od najstarijih laboratorijskih pretraga, kod koje brzina sedimentiranja ovisi o obliku i broju eritrocita te sastavu plazme. SE je povišena u nekim fiziološkim stanjima kao u trudnoći, a u brojnim patološkim stanjima povezana je najčešće s upalom, anemijom, paraproteinemijom, povećanom koncentracijom fibrinogena, prisustvom hladnih aglutinina. Referentni raspon za SE varira ovisano o dobi i spolu a kreće se od < 15 mm/h do < 49 mm/h.

Eritrociti se u normalnim uvjetima međusobno odbijaju. Sijalinska kiselina se nalazi na membrani eritrocita i štiti stanice od ubrzane agregacije. U upalnim stanjima se pojačano sintetiziraju proteini akutnog odgovora organizma, fibrinogen ili imunoglobulini. Te bjelančevine inhibiraju zaštitno djelovanje sijalinske kiseline na površini eritrocita, pa oni brže sedimentiraju.

Za određivanje brzine sedimentacije eritrocita Internacionalni odbor za standardizaciju u hematologiji (engl. *International Council for Standardisation in Haematology*, ICSH) preporučujeje metodu po Westergreenu, kojom se mjeri brzina taloženja eritrocita u standardiziranoj graduiranoj pipeti u određenom vremenu (1 sat) na sobnoj temperaturi.

Posljednjih su se godina razvile nove, automatizirane metode od kojih su neke modifikacija klasične Westergreenove metode. Većina metoda za automatizirano određivanje sedimentacije koristi analizatore koji primjenjuju mikrofotometar sa infracrvenom zrakom za određivanje optičke gustoće uzorka. Metode su jednostavne i brze, ali nisu standardizirane.

CRP je najznačajniji biljeg akutnoga upalnoga odgovora, osjetljiviji je od SE, u dobroj je korelaciji s težinom i opsegom upale.

Unatoč mišljenju da promjene vrijednosti SE i CRP u podlozi imaju sličnu patofiziološku osnovu, poznate su razlike za istu bolest u vrijednostima među ova dva analita.

Među proteinima akutne faze koji se u laboratoriju mogu jednostavno mjeriti CRP-je jedan od osjetljivijih testova sa brzim odgovorom. SE nije specifična za odgovor akutne faze upale i na nju utječe hematokrit, oblik i veličina eritrocita ...

Preporučene metode za određivanje CRP-a su neobilježene ili izravne tehnike,
npr. imunonefelometrija, imunoturbidimetrija i radijalna imunodifuzija

U laboratorijskoj dijagnostici poznavanje značajki metoda za određivanje SE i CRP podrazumijeva , odabir prikladnog uzorka i metode, poznavanje ograničenja metode.

8. SUMMARY

Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein: analytical sensitivity and diagnostic use

Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) are simple, fast and non-invasive laboratory tests, and are used for the detection or monitoring of patients with suspected inflammatory disease. Selection of ESR or CRP in the processing and / or treatment of a patient depends on the diagnostic value of the test for a given condition or disease.

ESR is one of the oldest laboratory tests, in which the speed of the sedimentation depends on the shape and the number of red blood cells and plasma composition. ESR is elevated in some physiological states as in pregnancy, and in a number of pathological conditions it is associated with inflammation, anemia, paraproteinemia, increased concentration of fibrinogen, presence of cold agglutinins.

The reference range for ESR varies dependent on age and sex and ranges from • 15 mm / h to • 49 mm / h.

The red blood cells in normal conditions repel one another. Sialic acid is on the erythrocyte membrane and protects the cells of accelerated aggregation. In inflammatory conditions proteins of acute response are increasingly synthesized, fibrinogen or immunoglobulins. These proteins inhibit the protective effect of sialic acid on the surface of red blood cells, so they quickly settle down.

To determine the erythrocyte sedimentation speed International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommends a method by Westergren, which measures the speed of sedimentation of erythrocytes in a standardized graduated pipette in a given time (1 hour) at room temperature.

In recent years new, automated methods were developed of which some are modifications of classical Westergren method. Most methods for automated determination of sedimentation uses analyzers to apply microphotometer with infrared ray to determine the optical density of the sample. The methods are simple and fast, but they are not standardized.

CRP is the most important marker of acute inflammatory response, it is more sensitive than ESR, and it is in good correlation with the severity and extent of inflammation.

Despite the opinion that the value changes of ESR and CRP have similar pathophysiological basis in the background, there are differences in values between the two analytes for the same disease

Among the acute phase proteins that can easily be measured in the laboratory, CRP is one of the more sensitive tests with fast response. ESR is not specific for the acute phase inflammatory response and is affected by hematocrit, red cell size and shape

Recommended methods for the determination of CRP are unmarked or direct techniques, npr. immunonephelometry, immunoturbidimetry and radial immunodiffusion.

In the laboratory diagnostics knowledge of the features of methods for determining the SE and CPR means a selection of a suitable sample and method, and the knowledge of the limitations of the method.

9. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI :

Ime i prezime: Denis Jagečić

Datum rođenja : 24.8.1993. godine, Zagreb

Adresa stanovanja : Ptičekova 13-a, 49243 Oroslavje (Hrvatska)

Telefon : 049 / 285 – 976

Mobitel : 098/ 978 – 4508

e- mail : denis.jagecic @gmail.com

OBRAZOVANJE :

2000. - 2008. Osnovna škola Oroslavje, Oroslavje

2008. – 2012. Srednja škola Oroslavje, opća gimnazija , Oroslavje

2012. – 2015. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijske dijagnostike

JEZICI : engleski i njemački jezik

RAČUNALNE VJEŠTINE : korištenje Microsoft Office programima , korištenje internetom, dobro poznavanje Microsoft operacijskog sustava

STEČENA ISKUSTVA : Na studiju sam stekao teorijska i praktična znanja koja su me osposobila za samostalno i odgovorno uključivanje u rad dijagnostičkih laboratorija

