

AGNIESZKA KORDEK¹, STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA², BEATA PAWLUS¹, BEATA ŁONIEWSKA¹,
ELŻBIETA BARTKOWIAK³, JACEK RUDNICKI¹, ZBIGNIEW SZYCH⁴, RYSZARD CZAJKA¹

Porównanie ilościowej (LUMItest) i półilościowej (Brahms PCT-Q) metody oznaczania stężenia prokalcytoniny w surowicy krwi noworodków

Comparison of Quantitative (LUMItest) and Semi-Quantitative (Brahms PCT-Q) Tests for PCT Concentration Measurements in the Newborn Infants' Blood

¹ Katedra i Klinika Położnictwa i Perinatologii PAM w Szczecinie

² Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii PAM w Szczecinie

³ Zakład Medycyny Nuklearnej PAM w Szczecinie

⁴ Zakład Higieny i Epidemiologii PAM w Szczecinie

Streszczenie

Wprowadzenie. Prokalcytonina (PCT) jest białkiem wykorzystywanym w ostatnich latach w diagnostyce zakażeń, którego stężenie we krwi wzrasta znacząco, głównie w poważnych zakażeniach bakteryjnych, we wszystkich grupach wiekowych.

Cel pracy. Porównanie zgodności wyników pomiarów stężenia PCT we krwi noworodków oznaczanych metodą półilościową i ilościową.

Materiał i metody. Analizie porównawczej poddano 230 wyników oznaczeń stężenia PCT w 115 próbkach surowicy krwi pępowinowej i żyłnej noworodków. Do wykonania oznaczeń wykorzystano komercyjne metody: półilościową BRAHMS PCT-Q i ilościową LUMItest. Porównania dokonano za pomocą statystyki Cohen's κ .

Wyniki. Całkowitą zgodność metody półilościowej i ilościowej uzyskano jedynie w 25,2%. Przy uwzględnieniu odchylenia o jedną sąsiadującą kategorię (niższą lub wyższą) zgodność ta wyniosła 86,9%. W 13,1% ($n = 15$) przypadków uzyskano całkowicie odmienne wyniki (fałszywie ujemne lub dodatnie) oznaczenia stężenia PCT uniemożliwiające właściwą interpretację. Wartość κ nieważona wyniosła w badanym materiale 0,073, co wskazuje na słabą zgodność porównywanych metod.

Wnioski. Metoda półilościowa oznaczania stężenia PCT w surowicy wykazuje dobrą zgodność z metodą ilościową dopiero po uwzględnieniu błędu odczytu w zakresie jednej kategorii (przedział niżej lub wyżej). Metoda półilościowa jest szybka, łatwa do wykonania w każdych warunkach i może być stosowana wstępnie we wszystkich przypadkach, gdy metoda ilościowa jest niedostępna (Adv Clin Exp Med 2004, 13, 6, 945–948).

Słowa kluczowe: prokalcytonina, noworodek, Brahms PCT-Q, LUMItest.

Abstract

Background. Procalcitonin (PCT) is the protein recently used in the diagnosis of the infections. Serum PCT concentration significantly increases in cases of bacterial infections.

Objectives. Comparison of two methods, quantitative and semi-quantitative of PCT measurements in the neonates' blood was the aim of the study.

Material and Methods. 115 umbilical cord or venous blood samples were examined using both semi-quantitative BRAHMS PCT-Q test and quantitative immuno-luminometric assay LUMItest (BRAHMS Diagnostica GmbH, Germany). The Cohen's κ statistic was used for calculations.

Results. Only 25.2% tests revealed complete concordance, 13.1% tests show total disagreement. 86.9% concordance one can achieve within next lower or higher category. Unweighted κ value was 0.073 – slight agreement both methods.

Conclusions. Semi-quantitative test is easy to use, rapid, simple and shows good agreement with quantitative method when taking into consideration next lower or higher category. PCT-Q test should be used as a diagnosis supportive one when quantitative assay is not available (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 6, 945–948).

Key words: procalcitonin, newborn infant, Brahms PCT-Q, LUMItest.

Prokalcytonina (PCT) jest białkiem wykorzystywanym w ostatnich latach w diagnostyce zakażeń [1]. Stężenie PCT we krwi wzrasta znacząco, głównie w poważnych zakażeniach bakteryjnych zarówno u dorosłych, jak i u noworodków, niemowląt i dzieci [2–4].

Fizjologicznie PCT jest wytwarzana w komórkach C tarczycy i jest prekursorem kalcytoniny. Swoista proteaza dzieli cząsteczkę PCT na kalcytoninę, katakalcynę i N-końcową resztkę [5]. W warunkach prawidłowych całość PCT jest wykorzystana jako prohormon i nie jest uwalniana do krążenia, stąd jej stężenie we krwi zdrowych ludzi jest zazwyczaj niewykrywalne ($< 0,1$ ng/ml). Podczas ciężkich uogólnionych zakażeń bakteryjnych prokalcytonina, której stężenie wzrasta znacznie we krwi, jest prawdopodobnie wytwarzana poza tarczycą, ale nie jest znane ani miejsce jej wytwarzania, ani mechanizm uwalniania, a także rola, jaką odgrywa w procesie zakażenia [6, 7]. Ostatnio prowadzone badania wskazują na działanie PCT nie tylko jako markera, ale i mediatora zakażenia, mającego swoje miejsce, na razie nieznane, w kaskadzie cytokin [8].

Stwierdzono, że PCT może być ważnym wskaźnikiem rokowniczym. U pacjentów, którzy zmarli z powodu ciężkiego zakażenia bakteryjnego jej duże stężenie utrzymywało się we krwi aż do zgonu. Obniżenie stężenia PCT podczas leczenia rokuję pomyślnie [9].

Celem pracy było porównanie zgodności wyników pomiarów stężenia PCT we krwi noworodków oznaczanych metodą półilościową i ilościową.

Material i metody

Analizie porównawczej poddano 230 wyników oznaczeń stężenia PCT w 115 próbkach surowicy krwi pępowinowej i żyłnej noworodków. Każdą próbkę krwi odwirowano po 30 minutach od pobrania (10 minut, 5000 obrotów) i uzyskaną surowicę podzielono na dwie części. Sześć kropeł wykorzystano natychmiast do wykonania oznaczenia półilościowego, a pozostałą część zamrożono w temperaturze -30°C do czasu wykonania oznaczeń ilościowych. Wykorzystano komercyjne metody: półilościową BRAHMS PCT-Q i ilościową LUMItest firmy BRAHMS Diagnostica GmbH (Germany).

BRAHMS PCT-Q jest szybkim testem immunochromatograficznym. W teście użyto monoklonalne, mysie przeciwciała przeciw katakalcynie połączone z koloidalnym złotem (znacznik) oraz poliklonalne owcze przeciwciała przeciw kalcytoninie (faza stała). Czas inkubacji wynosi 30 minut, nie jest wymagana żadna aparatura ani kalibracja. Po dodaniu surowicy lub osocza na płytkę testową znacznik łączy się z PCT obecną w badanej próbce, tworząc kompleks między znakowanym przeciwciałem i antygenem. Siłą ssącą kapilar kompleks ten przesuwają się przez system w kierunku prążka testowego. W tym miejscu, znakowany kompleks antygen–przeciwciało przylacza się do (unieruchomionego na fazie stałej) przeciwciała przeciw kalcytoninie, tworząc kompleks typu „sandwich”. Przy stężeniu $\geq 0,5$ ng/ml prążek przybiera kolor lekko różowy. Intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do koncentracji PCT w próbce. Im intensywniejsze zabarwienie, tym stężenie PCT w badanej surowicy większe.

Wynik stężenia PCT w badanej próbce może zawierać się w następujących przedziałach (kategoriach):

- 1) $< 0,5$ ng/ml,
- 2) $\geq 0,5$ ng/ml $< 2,0$ ng/ml,
- 3) ≥ 2 ng/ml $< 10,0$ ng/ml,
- 4) ≥ 10 ng/ml.

Niezwiązana część znacznika przesuwają się do przodu, tworząc pasek kontrolny o mocnym czerwonym zabarwieniu. Sprawność funkcjonalna testu jest określona za pomocą paska kontrolnego.

Test półilościowy jest używany jednorazowo, indywidualnie do każdego oznaczenia. Próbkę surowicy lub osocza przeznaczone do oznaczenia PCT należy wykorzystać w ciągu 4 godzin po pobraniu krwi lub przechowywać zamrożone w temp. -20°C . Do wykonania oznaczenia wystarczy 6 kropeł (około 200 μl) surowicy lub osocza. Po 30–45 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej odczytuje się wynik. Jeżeli obok paska kontrolnego jest widoczny pasek testowy, wynik jest odczytany jako dodatni, a intensywność zabarwienia uzyskanego paska porównana ze skalą barw na karcie referencyjnej pozwala ustalić przedział wartości, w jakim zawiera się otrzymany wynik.

Do oznaczenia ilościowego stężenia PCT w badanej surowicy (do wykonania podwójnego oznaczenia wystarczy 40 μl surowicy lub osocza), wyko-

rzystano immunoluminometryczną metodę LUMItest PCT kit (Brahms Diagnostica GmbH, Berlin, Germany) z użyciem luminometru LIA-MAT System 300 (BYK-Sangtec Diagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany). Dolna granica wykrywalności PCT w tej metodzie wynosi 0,08 ng/ml. Stężenie PCT jest oznaczane po kalibracji opartej na syntetycznej PCT o znanej wartości. Analiza była przeprowadzona zgodnie z rekomendowaną procedurą. Wyniki uzyskano po 2 godzinach. Wartości referencyjne (normy) stężeń PCT:

osoby zdrowe	< 0,5 ng/ml,
przewlekłe zakażenia i choroba autoimmunologiczna	< 0,5 ng/ml,
zakażenia wirusowe	< 0,5 ng/ml,
zakażenia bakteryjne zlokalizowane	< 0,5 ng/ml,
zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, liczne urazy, oparzenia	< 0,5–2 ng/ml,
ostre zakażenia bakteryjne,	> 2 (zwykle
posocznica, niewydolność wielonarządowa	10–100).

Porównania metod dokonano stosując statystykę Cohen’s κ oraz odsetek zgodnych i fałszywych wyników [10].

Wyniki

W każdej ze 115 badanych próbek wykonano oznaczenie stężenia PCT metodą półilościową i ilościową. Całkowitą zgodność metody półilo-

ściowej BRAHMS PCT-Q i ilościowej LUMItest uzyskano jedynie w 25,2%. Przy uwzględnieniu odchylenia o jedną sąsiadującą kategorię (niższą lub wyższą) zgodność ta wyniosła 86,9%. W 13,1% (n = 15) przypadków uzyskano całkowicie odmienne wyniki (fałszywie ujemne lub dodatnie) oznaczenia stężenia PCT uniemożliwiające właściwą interpretację (tab. 1).

Wartość κ nieważona wyniosła w badanym materiale 0,073, co wskazuje na słabą zgodność porównywanych metod.

Omówienie

Trudności diagnostyczne we wczesnym rozpoznawaniu zakażeń u noworodków, związane z małą czułością i swoistością stosowanych testów oraz brakiem charakterystycznych objawów klinicznych, zmuszają do poszukiwania markera łatwego do zastosowania, taniego i pewnego [11]. Oznaczanie PCT nie jest tanie (zarówno metodą półilościową, jak i ilościową), ale wygodniejsze dla klinicysty niż na przykład oznaczanie stężeń cytokin prozapalnych będące przedmiotem wielu badań naukowych [8, 12, 13]. PCT jest białkiem stabilnym o dość długim czasie półtrwania (22 godz.) [14]. Półilościowa metoda oznaczania PCT budzi wielkie nadzieje ze względu na swoją prostotę, ale przeprowadzone przez autorów badania pokazują, że wiarygodność uzyskanych w ten sposób wyników nie jest pewna. Niewiele jest do-

Tabela 1. Zgodność wyników oznaczeń stężenia PCT w surowicy noworodków uzyskanych za pomocą BRAHMS PCT-Q i LUMItest

LUMItest PCT-Q	< 0,5 n (%)	≥ 0,5 < 2,0 n (%)	≥ 2,0 < 10 n (%)	≥ 10,0 n (%)	Razem (Total) n (%)
< 0,5 n (%)	1 (0,9%)	51 (44,3)	11 (9,6)	3 (2,6)	66 (57,4)
≥ 0,5 < 2,0 n (%)	1 (0,9%)	16 (13,9)	10 (8,7)	1 (0,9)	28 (24,3)
≥ 2,0 < 10 n (%)	–	1 (0,9)	7 (6,1)	5 (4,3)	13 (11,3)
≥10,0 n (%)	–	–	3 (2,6)	5 (4,3)	8 (7,0)
Razem (Total) n (%)	2 (1,7%)	68 (59,1)	31 (27,0)	14 (12,2)	115 (100)

Obserwowane prawdopodobieństwo zgodności wynosi $p_o = 0,252$ (25,2%).
Oczekiwane prawdopodobieństwo zgodności wynosi $p_e = 0,193$ (19,3%).
 κ nieważona obliczona ze wzoru $\kappa = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$ wynosi 0,073.

Observed probability of agreement: $p_o = 0.252$ (25.2%).
Expected probability of agreement: $p_e = 0.193$ (19.3%).
Unweighted κ is calculated: $\kappa = (p_o - p_e) / (1 - p_e) = 0.073$.

niesień naukowych na temat metody półilościowej. Meisner et al. [15] w badaniach porównujących 237 oznaczeń PCT uzyskali wyniki całkowitej zgodności obu metod w 74,7%, a pozostałe wartości mieściły się w sąsiednich wyższych lub niższych kategoriach. Odmienne od naszych wyniki mogą być spowodowane większą liczbą porównywanych przypadków, a w pewnym stopniu subiektywnością oceny intensywności zabarwienia paska na karcie wyników.

Według producenta czułość diagnostyczna testu BRAHMS PCT-Q, w porównaniu z testem ilościowym LUMItest PCT (The Gold Standard for PCT measurement), kształtuje się na poziomie

90–92%, a swoistość 92–98%. Producent zaleca jednakże dokładne oznaczenie stężenia PCT w przypadku odczynów dodatnich z użyciem testu LUMItest PCT.

Zaletami testu BRAHMS PCT-Q są: łatwość wykonania o każdej porze w każdym szpitalu i izbie przyjęć bez konieczności angażowania laboratorium (metoda przyłóżkowa), krótki czas oczekiwania na wynik (30 minut), niewielka ilość surowicy potrzebna do wykonania oznaczenia (6 kropel), różnicowanie między prawidłowymi i podwyższonymi wartościami PCT (limit 0,5 ng/ml), możliwość szybkiego wykrycia wartości znacznie podwyższonych (> 2 ng/ml) [15].

Piśmiennictwo

- [1] Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C: High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993, 341, 515–518.
- [2] Gendrel D, Assicot M, Raymond J, Moulin F, Francoual Ch, Badoual J, Bohuon C: Procalcitonin as a marker for the early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996, 128, 570–573.
- [3] Hammer S, Meisner F, Dirschedl P, Hammer C: Procalcitonin: a new marker for diagnosis of acute rejection and bacterial infection in patients after heart and lung transplantation. *Transpl Immunol* 1998, 6, 235–241.
- [4] Gendrel D, Raymond J, Assicot M, Moulin F, Iniguez J-L, Lebon P, Bohuon C: Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clin Infect Dis* 1997, 24, 1240–1242.
- [5] Jacobs JW, Lund PK, Potts JT Jr, Bell NH, Habener JF: Procalcitonin is a glycoprotein. *J Biol Chem* 1981, 256, 2803–2807.
- [6] Brunkhorst FM, Eberhard OK, Brunkhorst R: Discrimination of infectious and noninfectious causes of early acute respiratory distress syndrome by procalcitonin. *Crit Care Med* 1999, 27, 2172–2176.
- [7] Nijsten MW, Olinga P, The TH, de Vries EG, Koops HS, Groothuis GM, Limburg PC, Duis HJ, Moshage H, Hoekstra HJ, Bijzet J, Zwaveling JH: Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein *in vivo* and *in vitro*. *Crit Care Med* 2000, 28, 458–461.
- [8] de Werra I, Jaccard C, Corradin SB, Chiolerio R, Yersin B, Gallati H, Assicot M, Bohuon C, Baumgartner JD, Glauser MP, Heumann D: Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* 1997, 25, 607–613.
- [9] Ugarte H, Silva E, Mercan D, de Mendonca A, Vincent J-L: Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 1999, 27, 498–504.
- [10] Cohen J: A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Measurement* 1960, 20, 37–46.
- [11] Marchini G, Berggren V, Djilali-Merzoug R, Hansson L-O: The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta Paediatr* 2000, 89, 1082–1086.
- [12] Panero A, Pacifico L, Rossi N, Mancuso G, Stegagno M, Chiesa C: Interleukin-6 in neonates with early and late onset infection. *Pediatr Infect Dis J* 1997, 16, 370–375.
- [13] Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati H, Matis J, Simeoni U: Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996, 129, 574–580.
- [14] Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, Bohuon C: Procalcitonin increase after endotoxin in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79, 1605–1608.
- [15] Meisner M, Brunkhorst FM, Reith HB, Schmidt J, Lestin HG, Reinhart K: Clinical Experiences with a New Semi-Quantitative Solid Phase Immunoassay for Rapid Measurement of Procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 2000, 38, 989–995.

Adres do korespondencji:

Agnieszka Kordek
ul. Mazowiecka 1/15
70-526 Szczecin

Praca wpłynęła do Redakcji: 26.11.2003 r.
Po recenzji: 26.01.2004 r.
Zaakceptowano do druku: 21.09.2004 r.

Received: 26.11.2003
Revised: 26.01.2004
Accepted: 21.09.2004