

616.002.07:576.8.077:616-018.54

VÝPOČET MNOŽSTVÍ C-REAKTIVNÍHO PROTEINU V SÉRU, KVANTITATIVNĚ STANOVENÉHO METODOU JEDNODUCHÉ RADIÁLNÍ DIFÚZE

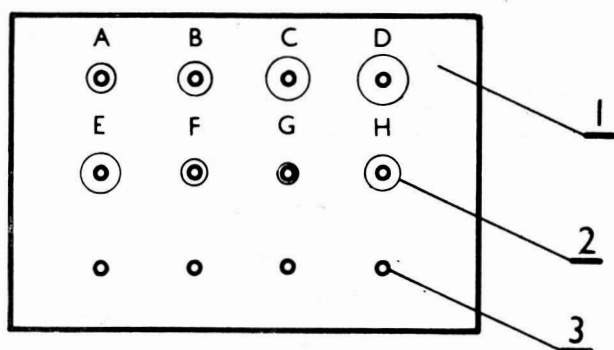
Čet. abs. MUDr. Rudolf FEUEREISL

Epidemiologicko-mikrobiologické oddělení OHEO České Budějovice

(náčelník oddělení: pplk. MUDr. Věnceslav Hušek)

C-reaktivní protein (dále CRP) je bílkovina, která se za fyziologických podmínek v lidské plazmě nevyskytuje. Její orientační, semikvantitativní nebo kvantitativní stanovení je v současné době neodmyslitelnou součástí diagnostiky a terapie zánětů a rozpadových tkáňových procesů. Provádí se různými sérologickými metodami, nejčastěji precipitací s antisérem.

Nejvýhodnější metodou pro kvantitativní stanovení CRP je jednoduchá radiální difúze, při níž antigen i protilátka volně prostupují polotuhým médiem. Protilátka — antisérum CRP (např. Sevatest ACRP, n. p., Šarišské Michaľany) je inkorporována na ploché vrstvě agarového gelu nalitého na skleněnou destičku. Z kruhového otvoru do něho difunduje antigen — vyšetřované nebo standardní sérum. Při reakci se vytváří okolo otvoru kruhový precipitát, tvořený komplexem antigen-protilátka, jehož čelo se po určité době zastaví. Průměr precipitačního prstence je přímo úměrný koncentraci CRP v séru.



Obr. 1. Skleněná destička s nalitým agarovým gelem s inkorporovaným antisérem (1). Do gelu jsou vyřezány otvory (2), do kterých je kápnuto sérum, které difunduje do gelu a reaguje s antisérem, čímž vytváří precipitační prstenec (3). A—D prstence vzestupné koncentrace standardního séra, E—H prstence sér pacientů.

Odečtením z kalibrační přímky sestrojené na milimetrovém, semilogaritmickém a v některých případech i logaritmickém papíře se určí koncentrace CRP. Přímka se konstruuje z hodnot dvojmočí průměrů precipitačních prstenců řady vzestupných ředění definovaného vzorku séra.

Přesnost výsledků této metody je určena řadou faktorů. Část jich vychází z vlastní technologie metody, ale část nepřesností může vznikat při grafickém řešení.

Vynášení hodnot je omezeno rozlišovacími možnostmi milimetrového papíru. Body, určující množství CRP v jednotlivých ředěních standardního séra, téměř nikdy neleží přesně v přímce. Kalibrační přímka se prokládá zkusmo a její přesnost je proto závislá na zkušenosti pracovníka. Dochází zde tedy k osobní chybě, která se ovšem podstatně mění, jakmile hodnocení provádí jiná osoba. Při zpětném odečítání množství CRP v séru pacienta může opět docházet ke zkreslení, které je dané rozlišovací možností milimetrového papíru. Tyto možné nepřesnosti jsme se snažili omezit použitím jednoduchého výpočtu.

Druhým, neméně důležitým důvodem, který nás vedl k zavedení této metody, byla velká časová úspora, které jsme tímto způsobem dosáhli.

Postupovali jsme metodou analýzy lineárního trendu, fixně naprogramované v minikalkulačce Texas Instruments 51 SR/II.

Vzhledem k tomu, že tyto kalkulačky se zabudovaným fixním programem nebo kalkulačky programovatelné ještě zdaleka nejsou běžným vybavením našich laboratorí, vypracovali jsme metodu pro nejjednodušší výpočetní minitechniku se základními funkcemi.

Vycházeli jsme při tom z vyrovnání kolísání závislosti druhé mocniny průměrů precipitačních prstenců na ředění standardního vzorku séra metodou nejmenších čtverců.

Tato metoda je založena na předpokladu, že součet čtverců odchylek vyrovnaných hodnot od hodnot skutečných je minimální. V našem případě se jedná o lineární závislost, proto trend počítáme z normální rovnice přímky ($y_i = a + bx$). To tedy v praxi znamená určit charakteristiky přímky. Použili jsme nejjednoduššího možného způsobu a vypočítali charakteristiky ze vztahů:

$$a = \frac{\sum y_i}{n} \quad b = \frac{\sum x_i \cdot y_i}{\sum x_i^2}$$

a, b = charakteristiky přímky

y_i = původní hodnoty dvojmocí průměrů precipitačních prstenců standardního vzorku

x_i = pořadí ředění

n = počet ředění.

Přitom jsme předpokládali, že $\sum x_i = 0$, čehož jsme dosáhli položením nuly do středu souboru vzestupných koncentrací vzorku definovaného séra. Protože máme sudý počet ředění (čtyři), jsou prostřední hodnoty dvě a značíme je tedy $-0,5$ a $+0,5$.

Pro vypočtení příslušných charakteristik vyrovnané přímky dosadíme tyto hodnoty společně s hodnotou dvojmocí průměru příslušného precipitačního prstence séra pacienta do rovnice odvozené ze základní rovnice přímky:

$$x_i' = \frac{y_i - a}{b}$$

Vypočtené hodnoty udávají pořadí koncentrace CRP séra pacienta v souboru hodnot lineárního trendu standardy. K těmto hodnotám najdeme v převodní tabulce odpovídající čísla, která udávají množství CRP v séru pacienta v procentech a mg/l. Pro lineární trend používáme jako standardu CRP-Standard-Serum, Behringwerke AG, Germany, se stálým obsahem CRP $8 \cdot 10^3$ mg/l, což je pro nás 100 %. Pro tuto standardu je také vypočtena převodní tabulka.

Pro další zjednodušení výpočtů a urychlení metody jsme sestrojili následující tabulku, kterou jsme rozmnožili.

Do této tabulky doplníme chybějící údaje, tj. druhé mocniny průměrů precipitačních prstenců, příslušejících jednotlivým ředěním základního vzorku (y_i). Sloupec y_i sečteme a dělíme čtyřmi (n), čímž dostaneme konstantu a .

V jednotlivých řádcích vynásobíme $y_i \cdot x_i$ a zapíšeme výsledky do posledního sloupce, který sečteme a dělíme pěti ($\sum x_i^2$). Tak získáme konstantu b .

Hodnoty druhých mocnin průměrů precipitačních prstenců sér pacientů dosazujeme do vztahu uvedeného pod tabulkou a vyhledáme v převodní tabulce odpovídající údaje. Používáme převodní tabulku vypočtenou na dvě desetinná místa, která je dost rozsáhlá a velmi

Tab. 1. Tabulka zjednodušující výpočet koncentrace CRP

%	y_i	x_i	$y_i \cdot x_i$
25		-1,5	
50		-0,5	
75		0,5	
100		1,5	
a		b	

$$x_i' = \frac{y_i - a}{b}$$

přesná. Pro stručnost zde uvádíme tabulku vypočtenou na jedno desetinné místo, pomocí které lze snadno spočítat i tabulku podrobnou, jejíž část je zde rovněž uvedena. (Tab. 3, 4 a 5.)

Příklad:

Ředění	stand. séra	Séra pacientů
25 %	4,5 mm	A: 6,1 mm
50 %	5,5 mm	B: 4,3 mm
75 %	6,4 mm	C: 3,8 mm
100 %	7,3 mm	D: 5,3 mm

Tab. 2. Tabulka zjednodušující výpočet koncentrace CRP s doplněnými hodnotami (viz text)

%	y_i	x_i	$y_i \cdot x_i$
25	20,25	-1,5	30,38
50	30,25	-0,5	15,13
75	40,96	0,5	20,48
100	53,29	1,5	79,94
a	36,19	b	10,98

$$x_i' = \frac{y_i - b}{a}$$

Tab. 3

Převodní tabulka vypočtená na jedno desetinné místo — kladné hodnoty

	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	62,5 5,0	65,0 5,2	67,5 5,4	70,0 5,6	72,5 5,8	75,0 6,0	77,5 6,2	80,0 6,4	82,5 6,6	85,0 6,8
1	87,5 7,0	90,0 7,2	92,5 7,4	95,0 7,6	97,5 7,8	100,0 8,0	102,5 8,2	105,0 8,4	107,5 8,6	110,0 8,8
2	112,5 9,0	115,0 9,2	117,5 9,4	120,0 9,6	122,5 9,8	125,0 10,0	127,5 10,2	130,0 10,4	132,5 10,6	135,0 10,8
3	137,5 11,0	140,0 11,2	142,5 11,4	145,0 11,6	147,5 11,8	150,0 12,0	152,5 12,2	155,0 12,4	157,5 12,6	160,0 12,8
4	162,5 13,0	165,0 13,2	167,5 13,4	170,0 13,6	172,5 13,8	175,0 14,0	177,5 14,2	180,0 14,4	182,5 14,6	185,0 14,8
5	187,5 15,0	190,0 15,2	192,5 15,4	195,0 15,6	197,5 15,8	200,0 16,0	202,5 16,2	205,0 16,4	207,5 16,6	210,0 16,8
6	212,5 17,0	215,0 17,2	217,5 17,4	220,0 17,6	222,5 17,8	225,0 18,0	227,5 18,2	230,0 18,4	232,5 18,6	235,0 18,8
7	237,5 19,0	240,0 19,2	242,5 19,4	245,0 19,6	247,5 19,8	250,0 20,0	252,5 20,2	255,0 20,4	257,5 20,6	260,0 20,8
8	262,5 21,0	265,0 21,2	267,5 21,4	270,0 21,6	272,5 21,8	275,0 22,0	277,5 22,2	280,0 22,4	282,5 22,6	285,0 22,8
9	287,5 23,0	290,0 23,2	292,5 23,4	295,0 23,6	297,5 23,8	300,0 24,0	302,5 24,2	305,0 24,4	307,5 24,6	310,0 24,8
10	312,5 25,0	315,0 25,2	317,5 25,4	320,0 25,6	322,5 25,8					

Hodnoty prvního řádku udávají množství CRP v procentech.

Hodnoty druhého řádku udávají množství CRP v mg/ml a po vynásobení 10^3 v mg/l.

Převodní tabulka vypočtená na jedno desetinné místo — záporné hodnoty

	-0,0	-0,1	-0,2	-0,3	-0,4	-0,5	-0,6	-0,7	-0,8	-0,9
-2	12,5 1,0	10,0 0,8	7,5 0,6	5,0 0,4	2,5 0,2	0,0 0,0				
-1	37,5 3,0	35,0 2,8	32,5 2,6	30,0 2,4	27,5 2,2	25,0 2,0	22,5 1,8	20,0 1,6	17,5 1,4	15,0 1,2
0	62,5 5,0	60,0 4,8	57,5 4,6	55,0 4,4	52,5 4,2	50,0 4,0	47,5 3,8	45,0 3,6	42,5 3,4	40,0 3,2

Hodnota vypočtená
ze vztahu
pod tab. 2Hodnota vyhledaná
v převodní
tabulce

Pacient	A 0,09	64,75 %	$5,18 \cdot 10^3$ mg/l
B	-1,61	22,25 %	$1,78 \cdot 10^3$ mg/l
C	-1,98	13,00 %	$1,04 \cdot 10^3$ mg/l
D	-0,74	44,00 %	$3,52 \cdot 10^3$ mg/l

Použitý příklad je z běžné denní praxe.

Pro posouzení zjednodušené metody jsme testovali výsledky spočítané podle programu analýzy lineárního trendu minikalkulačky Texas Instruments 51 SR/II s výsledky této metody. Při použití převodní tabulky vypočtené na jedno desetinné místo jsme hodnotili modifikací párového t-testu pro malé soubory deset vyšetření po pěti pacientech na hladině významnosti $P = 0,01$. Ani v jednom případě nebyl rozdíl ve výsledcích obou metod statisticky významný.

Výpočet koncentrace CRP je jednoduchá

metoda, která je do značné míry objektivní, nenáročná na výpočetní techniku a přináší zároveň poměrně velkou časovou úsporu. Ve vhodné modifikaci ji lze použít u mnoha jiných laboratorních metod.

Souhrn

Práce se zabývá výpočtem množství C-reaktivního proteinu v séru stanoveného kvantitativně metodou jednoduché radiální difúze. Je navržena jednoduchá výpočetní metoda, která nahrazuje grafické řešení kalibrační přímky výpočtem lineárního trendu s minimálními nároky na výpočetní techniku. Dochází tak ke zpřesnění a objektivizaci metody i ke značné časové úspoře.

Literatura

Kout, M. - Májský, A. - Herzog, P.: Vyšetřovací metody v imunohematologii. Praha, SZdN 1975. 342 s.

Klíčová slova: C-reaktivní protein; Kvantitativní stanovení; Radiální difúze

Tab. 4

Část převodní tabulky vypočtené na dvě desetinná místa — záporné hodnoty

	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,00	62,50 5,00	62,75 5,02	63,00 5,04	63,25 5,06	63,50 5,08	63,75 5,10	64,00 5,12	64,25 5,14	64,50 5,16	64,75 5,18
0,10	65,00 5,20	65,25 5,22	65,50 5,24	65,75 5,26	66,00 5,28	66,25 5,30	66,50 5,32	66,75 5,34	67,00 5,36	67,25 5,38
0,20	67,50 5,40	67,75 5,42	68,00 5,44	68,25 5,46	68,50 5,48	68,75 5,50	69,00 5,52	69,25 5,54	69,50 5,56	69,75 5,58
0,30	70,00 5,60	70,25 5,62	70,50 5,64	70,75 5,66	71,00 5,68	71,25 5,70	71,50 5,72	71,75 5,74	72,00 5,76	72,25 5,78
0,40	72,50 5,80	72,75 5,82	73,00 5,84	73,25 5,86	73,50 5,88	73,75 5,90	74,00 5,92	74,25 5,94	74,50 5,96	74,75 5,98
0,50	75,00 6,00	75,25 6,02	75,50 6,04	75,75 6,06	76,00 6,08	76,25 6,10	76,50 6,12	76,75 6,14	77,00 6,16	77,25 6,18
0,60	77,50 6,20	77,75 6,22	78,00 6,24	78,25 6,26	78,50 6,28	78,75 6,30	79,00 6,32	79,25 6,34	79,50 6,36	79,75 6,38
0,70	80,00 6,40	80,25 6,42	80,50 6,44	80,75 6,46	81,00 6,48	81,25 6,50	81,50 6,52	81,75 6,54	82,00 6,56	82,25 6,58
0,80	82,50 6,60	82,75 6,62	83,00 6,64	83,25 6,66	83,50 6,68	83,75 6,70	84,00 6,72	84,25 6,74	84,50 6,76	84,75 6,78
0,90	85,00 6,80	85,25 6,82	85,50 6,84	85,75 6,86	86,00 6,88	86,25 6,90	86,50 6,92	86,75 6,94	87,00 6,96	87,25 6,98
1,00	87,50 7,00	87,75 7,02	88,00 7,04	88,25 7,06	88,50 7,08	88,75 7,10	89,00 7,12	89,25 7,14	89,50 7,16	89,75 7,18

Hodnoty prvního řádku udávají množství CRP v procentech.

Hodnoty druhého řádku udávají množství CRP v mg/ml a po vynásobení 10^3 v mg/l.

Tab. 5

Část převodní tabulky vypočtené na dvě desetinná místa — kladné hodnoty

	—0,00	—0,01	—0,02	—0,03	—0,04	—0,05	—0,06	—0,07	—0,08	—0,09
—1,00	37,50 3,00	37,25 2,98	37,00 2,96	36,75 2,94	36,50 2,92	36,25 2,90	36,00 2,88	35,75 2,86	35,50 2,84	35,25 2,82
—0,90	40,00 3,20	39,75 3,18	39,50 3,16	39,25 3,14	39,00 3,12	38,75 3,10	38,50 3,08	38,25 3,06	38,00 3,04	37,75 3,02
—0,80	42,50 3,40	42,25 3,38	42,00 3,36	41,75 3,34	41,50 3,32	41,25 3,30	41,00 3,28	40,75 3,26	40,50 3,24	40,25 3,22
—0,70	45,00 3,60	44,75 3,58	44,50 3,56	44,25 3,54	44,00 3,52	43,75 3,50	43,50 3,48	43,25 3,46	43,00 3,44	42,75 3,42
—0,60	47,50 3,80	47,25 3,78	47,00 3,76	46,75 3,74	46,50 3,72	46,25 3,70	46,00 3,68	45,75 3,66	45,50 3,64	45,25 3,62
—0,50	50,00 4,00	49,75 3,98	49,50 3,96	49,25 3,94	49,00 3,92	48,75 3,90	48,50 3,88	48,25 3,86	48,00 3,84	47,75 3,82
—0,40	52,50 4,20	52,25 4,18	52,00 4,16	51,75 4,14	51,50 4,12	51,25 4,10	51,00 4,08	50,75 4,06	50,50 4,04	50,25 4,02
—0,30	55,00 4,40	54,75 4,38	54,50 4,36	54,25 4,34	54,00 4,32	53,75 4,30	53,50 4,28	53,25 4,26	53,00 4,24	52,75 4,22
—0,20	57,50 4,60	57,25 4,58	57,00 4,56	56,75 4,54	56,50 4,52	56,25 4,50	56,00 4,48	55,75 4,46	55,50 4,44	55,25 4,42
—0,10	60,00 4,80	59,75 4,78	59,50 4,76	59,25 4,74	59,00 4,72	58,75 4,70	58,50 4,68	58,25 4,66	58,00 4,64	57,75 4,62
—0,00	62,50 5,00	62,25 4,98	62,00 4,96	61,75 4,94	61,50 4,92	61,25 4,90	61,00 4,88	60,75 4,86	60,50 4,84	60,25 4,82

Hodnoty prvního řádku udávají množství CRP v procentech.

Hodnoty druhého řádku udávají množství CRP v mg/ml a po vynásobení 10^3 vmg/l.