

Reproducibilidad de los análisis de proteína C reactiva

Javier Llorca^a, Magdalena González Quirós^b, Isabel Sampredo^c, María T. García Unzueta^b y José R. Berrazueta^d

^aMedicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. España. ^bServicios de Bioquímica, ^cHospital de Día y ^dCardiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

El objetivo de este estudio es medir la reproducibilidad de diferentes técnicas nefelométricas para la determinación de la proteína C reactiva (PCR). Se obtuvieron 120 muestras de 40 pacientes. Cada muestra fue dividida en tres alícuotas y se determinó la PCR por tres procedimientos diferentes. La reproducibilidad se midió mediante el índice kappa y el coeficiente de correlación intraclase. El coeficiente de correlación intraclase varió entre 0,78 y 0,94. El índice kappa ponderado obtuvo valores entre 75 y 86% y el porcentaje de acuerdo entre las técnicas varió entre 95 y 97%. Al dicotomizar la PCR, el índice kappa varió entre 73 y 78% y el porcentaje de acuerdo entre 86 y 89%. Se concluye que la determinación de la PCR es muy reproducible con diferentes técnicas nefelométricas. Sólo si el objetivo del clínico es medir la PCR por debajo del límite de 0,3 mg/dl, sería necesario emplear técnicas ultrasensibles.

Palabras clave: *Enfermedad vascular periférica. Proteína C reactiva. Síndrome coronario agudo.*

Reproducibility of C-Reactive Protein Analyses

The aim of this study was to measure the reliability of different nephelometric techniques for measuring C-reactive protein (CRP). One hundred and twenty samples were obtained from 40 patients. All 120 samples were divided in three parts to measure CRP using three different methods. Reliability was determined by the kappa index and intraclass correlation coefficient. The intraclass correlation coefficient ranged from 0.78 to 0.94. When CRP values were categorized in four groups, the kappa index reached 75-86% and percentage of agreement varied from 95% to 97%. When CRP values were divided into two groups, the kappa index was 73% to 78% and the percentage of agreement was 86% to 89%. We found that CRP determinations with different nephelometric methods were highly reproducible, even when different analysts were involved. Ultrasensitive techniques are needed only if the clinical objective is to obtain a CRP measurement under 0.3 mg/dl.

Key words: *Peripheral artery disease. C-reactive protein. Acute coronary syndrome.*

Full English text available at: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

Un gran número de estudios ha relacionado los valores elevados de proteína C reactiva (PCR) con el riesgo de infarto agudo de miocardio o muerte por causa cardíaca^{1,2}, accidente cerebrovascular¹ y el pronóstico en la angina estable e inestable^{3,4}. Otros trabajos muestran que los pacientes con PCR elevada tienen mayor prevalencia de enfermedad arteriosclerótica⁵,

riesgo aumentado de trombosis del ventrículo izquierdo en pacientes con infarto⁶ y mayor grado de evolución de arteriosclerosis carotídea⁷. Por esto se ha propuesto el uso de la PCR en la estratificación pronóstica de los pacientes con síndrome coronario agudo⁸. El papel de la PCR y otros marcadores de inflamación como indicadores de riesgo cardiovascular fue revisado por García-Moll y Kaski⁹.

El objetivo de este trabajo es medir la reproducibilidad de la medición de PCR, comparando las determinaciones de PCR obtenidas por tres procedimientos en las mismas muestras procedentes de un grupo de pacientes con arteriopatía periférica.

MÉTODOS

Cuarenta pacientes seguidos en el Hospital de Día con el diagnóstico de arteriopatía periférica fueron se-

Correspondencia: Dr. J. Llorca.
Medicina Preventiva y Salud Pública.
Facultad de Medicina.
Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011 Santander.
Correo electrónico: llorcaj@unican.es

Recibido el 11 de febrero de 2002.
Aceptado para su publicación el 28 de mayo de 2002.

ABREVIATURAS

PCR: proteína C reactiva.

AL1: alícuota 1 (determinación en el Servicio de Bioquímica con un equipo Dade Behring NII).

AL2: alícuota 2 (determinación en el Servicio de Inmunología con un equipo Dade Behring NII).

AL3: Alícuota 3 (determinación en el Servicio de Bioquímica con un equipo Dade Behring DN).

leccionados para la realización de un ensayo clínico controlado sobre el efecto de la nitroglicerina por vía transdérmica. Se excluyeron a aquellos pacientes que requerían técnica quirúrgica o radiología intervencionista, estaban diagnosticados de diabetes mellitus, recibían tratamiento con nitritos o antiinflamatorios, o tenían alteraciones hepáticas graves o antecedentes de infarto agudo de miocardio o de accidente cerebrovascular reciente. La edad media de los pacientes fue de 63,3 años (desviación estándar [DE]: 9,4 años; rango: 43-78). Treinta y ocho pacientes eran varones.

De cada paciente se obtuvieron tres muestras de sangre en diferentes días para realizar las determinaciones establecidas en el protocolo del ensayo, entre ellas la PCR. Cada muestra de sangre fue repartida en tres alícuotas que se procesaron de la siguiente forma:

– Alícuota 1 (AL1): Remitida al Servicio de Bioquímica para la determinación de PCR mediante nefelometría en el equipo Dade Behring BNII. Ésta es la determinación habitual del hospital. El valor mínimo que este equipo puede detectar es de 0,3 mg/dl.

– Alícuota 2 (AL2): Remitida al Laboratorio de Inmunología para la determinación de PCR mediante nefelometría en el equipo Dade Behring BNII. El valor mínimo detectable es de 0,03 mg/dl.

– Alícuota 3 (AL3): Remitida al Servicio de Bioquímica para la determinación de PCR mediante nefelometría en el equipo Dade Behring BN. El valor mínimo detectable era de 0,32 mg/dl.

Cada una de las alícuotas fue procesada por un analista diferente que desconocía el objeto del estudio y la realización de las otras dos determinaciones. No pu-

dieron procesarse siete muestras de AL1, seis de AL2 y cuatro de AL3.

Para la reproducibilidad de la PCR como variable continua se utilizó el coeficiente de correlación intraclassa mediante la introducción doble de los datos¹⁰. El coeficiente de correlación intraclassa toma valores entre 0 y 1. Valores próximos a 1 indican mayor reproducibilidad.

Para la reproducibilidad de la PCR como variable discreta, se categorizó en cuatro grupos: < 0,50; 0,50-0,99; 1,00-1,49; y $\geq 1,50$ mg/dl. A continuación se estimó el coeficiente kappa ponderado con pesos cuadráticos.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Stata Intercooled versión 6 (Stata Corporation, College Station, Tx, EE.UU.).

RESULTADOS

Las AL1 tuvieron una media de 0,745 mg/dl (DE: 0,558), y la mediana fue de 0,6 mg/dl (rango: 0,3-3,0 mg/dl). Para las AL2 la media fue de 0,528 mg/dl (0,466), la mediana de 0,416 mg/dl (rango: 0,045-2,608 mg/dl). Para las AL3 la media resultó ser de 0,648 mg/dl (0,464) y 0,44 mg/dl para la mediana (rango: 0,32-2,54 mg/dl).

Los coeficientes de correlación intraclassa oscilan entre 0,78 (AL1 y AL2) y 0,94 (AL1 y AL3) (tabla 1). En las tres comparaciones el intervalo de confianza (IC) del 95% excluye al 0 y la reproducibilidad en el punto medio es mayor del 86%. Las figuras 1-3 muestran la relación entre cada dos técnicas presentando el promedio en abscisas y la diferencia en ordenadas (en las tres figuras, el eje vertical está sobredimensionado para mostrar con mayor claridad las diferencias entre las técnicas)¹¹. AL1 sobrestima ligeramente las determinaciones obtenidas por AL2 (fig. 1) y AL3 (fig. 2); esta sobrestimación tiende a crecer con el nivel de PCR.

Las tablas 2-4 muestran la reproducibilidad si se toma la PCR como variable discreta; el porcentaje de acuerdo varía entre el 95,20 y el 97,05%; el índice kappa ponderado entre 0,7524 y 0,8610 ($p < 0,0001$). Al clasificar la PCR en sólo dos grupos (< 0,5 mg/dl o $\geq 0,5$ mg/dl) el índice kappa alcanzó valores entre 0,7321 (entre AL1 y AL2), 0,7697 (entre AL1 y AL3)

TABLA 1. Reproducibilidad de las determinaciones de PCR como variable continua: coeficiente de correlación intraclassa y su IC del 95%

Procedimiento analítico 1	Procedimiento analítico 2	Coefficiente de correlación intraclassa	IC del 95%	Reproducibilidad en el punto medio
AL1	AL2	0,77712	0,67041-0,88383	0,86136
AL1	AL3	0,93841	0,90033-0,97650	0,98020
AL2	AL3	0,83594	0,76141-0,91047	0,88212

IC: intervalo de confianza.

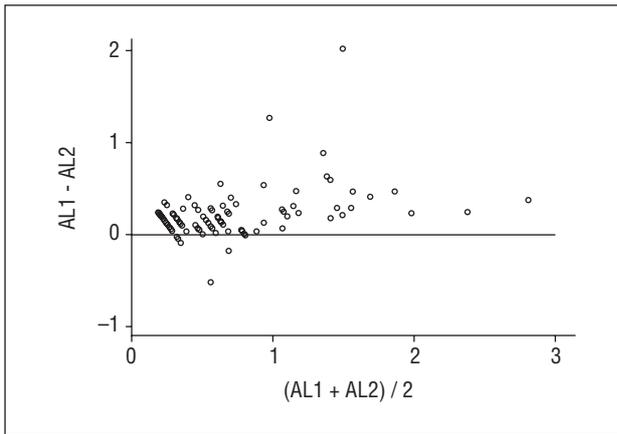


Fig. 1. Relación entre las determinaciones de proteína C reactiva en las alícuotas 1 (AL1) y 2 (AL2).

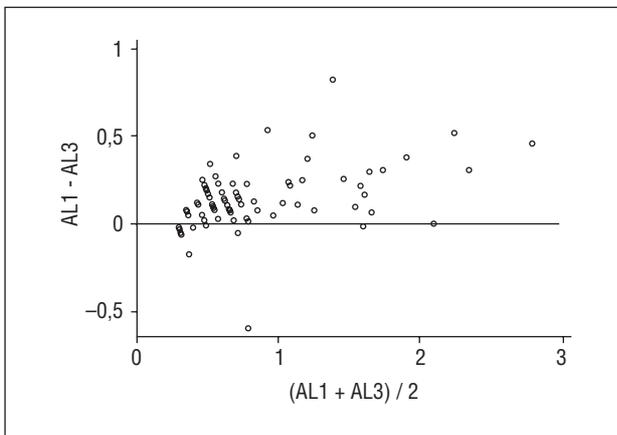


Fig. 2. Relación entre las determinaciones de proteína C reactiva en las alícuotas 1 (AL1) y 3 (AL3).

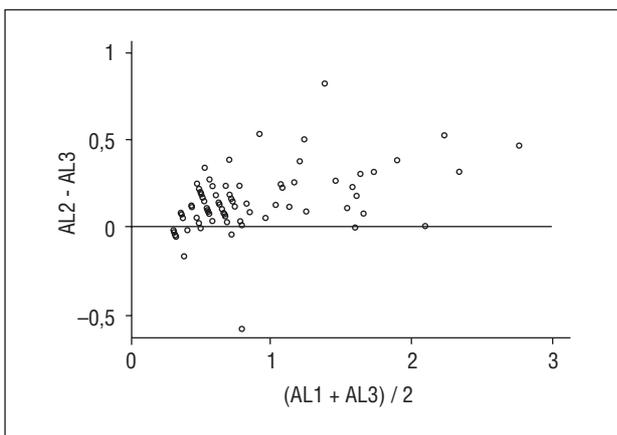


Fig. 3. Relación entre las determinaciones de proteína C reactiva en las alícuotas 2 (AL2) y 3 (AL3).

y 0,7849 (entre AL2 y AL3) ($p < 0,0001$ en los tres casos), y el porcentaje de acuerdo varió entre 86,49 y 89,47.

TABLA 2. Reproducibilidad entre AL1 y AL2 como variables categorizadas mediante el coeficiente kappa ponderado

	AL2				Total
	< 0,50	0,50-0,99	1,00-1,49	$\geq 1,50$	
AL1					
< 0,50	50	2	0	0	52
0,50-0,99	11	25	0	0	36
1,00-1,49	0	6	3	0	9
$\geq 1,50$	2	1	7	4	14
Total	63	34	10	4	111

Índice kappa: 0,7524.

TABLA 3. Reproducibilidad entre AL1 y AL3 como variables categorizadas mediante el coeficiente kappa ponderado

	AL2				Total
	< 0,50	0,50-0,99	1,00-1,49	$\geq 1,50$	
AL2					
< 0,50	51	1	1	0	53
0,50-0,99	12	25	0	0	37
1,00-1,49	0	5	4	0	9
$\geq 1,50$	0	1	4	9	14
Total	63	32	9	9	113

Índice kappa: 0,8610.

TABLA 4. Reproducibilidad entre AL2 y AL3 como variables categorizadas mediante el coeficiente kappa ponderado

	AL3				Total
	< 0,50	0,50-0,99	1,00-1,49	$\geq 1,50$	
AL3					
< 0,50	59	4	1	1	65
0,50-0,99	6	25	4	0	35
1,00-1,49	0	2	4	4	10
$\geq 1,50$	0	0	0	4	4
Total	65	31	9	9	114

Índice kappa: 0,8055.

DISCUSIÓN

La reproducibilidad de la determinación de PCR por nefelometría es muy elevada tanto si se analiza como variable continua o como variable discreta. Esta reproducibilidad es independiente del analista y de la técnica nefelométrica empleada.

La reproducibilidad de la PCR está limitada por la variabilidad de los niveles biológicos: el coeficiente de variación en el mismo individuo puede llegar al 30%, por lo que se ha sugerido que una sola determinación de PCR podría ser utilizada únicamente para clasificar

al paciente en dos grupos (PCR elevada/no elevada), pero no debería ser empleada para clasificaciones más detalladas (terciles o cuartiles)¹².

El único trabajo que hemos encontrado en el que se analiza la reproducibilidad de la PCR entre dos técnicas diferentes obtiene un índice kappa de 0,65 (inferior al encontrado en este trabajo) para una clasificación en dos categorías¹³.

Nuestro resultado tiene dos consecuencias relevantes; una, de carácter clínico, es la gran fiabilidad que este resultado aporta; la otra consecuencia es de tipo económico, ya que la elección de la técnica a realizar puede basarse en consideraciones ajenas a la clínica (coste económico, tiempo necesario para la determinación) porque el resultado que se obtendrá será muy similar con una u otra técnica.

Se pueden señalar tres limitaciones a este trabajo: 1) sólo se han utilizado muestras clínicas de concentración desconocida —es decir, no se han empleado patrones estandarizados—, por lo que sólo se pueden realizar estimaciones de reproducibilidad pero no de validez (sensibilidad y especificidad); 2) sólo una de las técnicas empleadas permite un nivel de detección muy bajo; si la finalidad del análisis fuera clasificar a los pacientes por debajo de 0,3 mg/dl, entonces sería necesario utilizar la técnica ultrasensible; 3) el estudio se limita a técnicas nefelométricas; otras técnicas han sido excluidas, como el ELISA.

Por otra parte, la selección de una muestra de pacientes con enfermedad vascular permite que los resultados obtenidos abarquen un amplio rango que no podría haberse cubierto sólo con sujetos procedentes de la población general; este hecho garantiza que los presentes resultados sean aplicables a situaciones clínicas reales. Por ejemplo, en pacientes con angina inestable se ha identificado mayor riesgo de infarto si los niveles de PCR están por encima de 0,36 (riesgo relativo [RR] = 2)³ o de muerte por encima de 1 mg/dl (RR = 3,4)⁴. En ambos casos, cualquiera de las técnicas empleadas en este estudio sería adecuada para clasificar adecuadamente a los pacientes. Se ha puesto un cuidado especial en evitar el sesgo del observador: los analistas desconocían la finalidad del estudio y durante todo su desarrollo permanecieron ciegos para el resto de las determinaciones. La distribución de las alícuotas tampoco pudo influir en el re-

sultado final ya que las tres alícuotas se obtenían en la misma extracción de sangre. Finalmente, el análisis estadístico se realizó de forma ciega respecto de las técnicas empleadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Russell PT, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently health men. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.
2. Chung MK, Martin DO, Sprecher D, Wazni O, Kanderian A, Carnes CA, et al. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;104:2886-91.
3. Havertake F, Thompson SG, Pyke SDM, Gallimore JR, Pepys MB, for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable patients. *Lancet* 1997;349:462-6.
4. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L, for the FRISC Study Group. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1997;96:4204-10.
5. Folsom AR, Pankow JS, Tracy RP, Arnett DK, Peacock JM, Hong Y, et al, for the NHBLI Family Heart Study. Association of C-reactive protein with markers of prevalent atherosclerotic disease. *Am J Cardiol* 2001;88:112-7.
6. Celik S, Baykan M, Erdol C, Kilinc K, Orem A, Orem C, et al. C-reactive protein as a risk factor for left ventricular thrombus in patients with acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* 2001;24:615-9.
7. Blackburn R, Giral P, Bruckert E, Andre JM, Gonbert S, Bernard M, et al. Elevated C-reactive protein constitutes an independent predictor of advanced carotid plaques in dyslipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1962-8.
8. Galvani M, Ferrini D, Ghezzi F, Ottani F. Cardiac markers and risk stratification: an integrated approach. *Clin Chim Acta* 2001;311:9-17.
9. García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 1999;52:990-1003.
10. Dunn G. *Design and Analysis of Reliability Studies*. London: Arnold Publishers, 1989.
11. Bland M, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-10.
12. Klufft C, De Maat MP. Determination of the habitual low blood level of C-reactive protein in individuals. *Ital Heart J* 2001;2:172-80.
13. Dinant GJ, Costongs R, Leclercq RM, Van Wersch JW. Reliability of C-reactive protein measurement in general practice in The Netherlands. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:113-7.