

• 临床研究 •

干式荧光免疫分析仪检测 C 反应蛋白的临床性能评价*

刘献文, 赵 盛

(美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104)

摘 要:**目的** 评价干式荧光免疫分析仪检测 C 反应蛋白(CRP, 荧光免疫层析法)的临床性能。**方法** 参考美国 CLSI 系列文件, 对干式荧光免疫分析仪检测血清 CRP 的灵敏度、精密度、相关性、线性、抗干扰能力等分析性能进行验证和评价, 并将实验结果与公认的检测方法进行比较。**结果** 干式荧光免疫分析仪检测 CRP 的灵敏度为 0.5 mg/L, 低值和高值质控的精密度分别为 7.5% 和 6.5%, 线性范围为 0.33~162.60 mg/L。与美康生物科技股份有限公司的全量程 CRP 检测试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)检测结果的线性良好, 决定系数 $R^2=0.991$ 。非结合胆红素、结合胆红素、三酰甘油、血红蛋白对检测结果的影响在可接受范围内。**结论** 干式荧光免疫分析仪检测血清 CRP(荧光免疫层析法)的各项性能指标均符合要求, 与全量程 CRP 检测试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)在生化仪上的结果线性良好, 适合各急诊、门诊等床旁检测。

关键词:干式荧光免疫分析仪; 免疫层析法; C 反应蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.036 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)18-2600-03

1930 年, Tillett 和 Francis 首次在急性大叶性肺炎患者的血清中发现一种特殊物质, 这种物质能在钙离子存在时, 与肺炎球菌细胞壁中的 C-多糖磷酸胆碱(PC)残基结合, 产生沉淀反应, 且这种沉淀反应是特异性的^[1]。1941 年, Abernethy 等^[2]发现这种物质是一种蛋白质, 因此将这种物质称为 C 反应蛋白(CRP)。1944 年, Jones 将 CRP 作为诊断临床风湿热疾病的诊断指标^[3]。后来, 研究人员又在感染性和非感染性疾病患者的急性期血清中都测到了 CRP, 于是认为 CRP 是与组织损伤有密切关系的一种非特异性反应蛋白^[4-5]。随后进一步研究发现, 在组织损伤的急性期, 肝脏细胞合成急性时相蛋白的速度显著增加, 导致其在血液中的浓度快速升高, 其中, 这些蛋白中浓度水平变化最大的是 CRP。随着研究的不断深入, 人们发现 CRP 在机体防御功能以及心血管、自身免疫病等疾病中均扮演着非常重要的角色^[6-7]。当前 CRP 在临床上已经被认为是组织炎症感染筛查的敏感指标(如区分细菌和病毒感染, 指导抗菌药物治疗、系统性红斑狼疮等), 以及预测心血管疾病、自身免疫疾病等严重和慢性疾病的重要指标^[8-10]。床旁检测(POCT)可及时快速得到检测结果, 保证了医生及时了解患者状况及快速确认治疗方案^[11-12]。为了保证患者检验结果的可靠性, 根据美国 CLSI 的有关规定, 对干式荧光免疫分析仪检测 CRP 的方法学进行了评价。

1 材料与方法

1.1 样本来源 本研究所测样本均为宁波李惠利医院分离胶分离的新鲜血清。

1.2 仪器与试剂 干式荧光免疫分析仪及配套 CRP 荧光免疫层析检测试剂均为美康生物科技股份有限公司生产(以下简称美康生物)。CRP 特种蛋白质控品为朗道公司生产。日本日立 7180 全自动生化分析仪, 用于生化分析仪的全量程 CRP 检测试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)为美康生物生产。

1.3 方法

1.3.1 灵敏度 根据 EP10-A2 设计, 对空白样本重复测定 20 次, 计算均值($\bar{x}$)和标准差(SD), 空白限为 $\bar{x}+2SD$ 。

1.3.2 精密度试验 根据 EP10-A2 设计, 以稀释液为空白样

品, 分别对空白样品和 CRP 低值校准品进行 10 次检测。

1.3.3 线性试验 根据 EP6-A2 文件方法, 以稀释液空白代替低浓度样本, CRP 高浓度患者标本和稀释液按照 20/0、19/1、18/2、16/4、12/8、8/12、4/16、2/18、1/19、0/20 的比例配制系列浓度样本, 每个标本重复测定 2 次, 记录结果, 以实测值为横坐标, 以理论值为纵坐标, 绘图并进行线性回归。

1.3.4 相关性试验 每日取 8 份血清样本, 浓度尽量分布在整个线性范围, 分别在干式荧光免疫分析仪和生化仪上测定 1 次, 再按倒序重测 1 次。连续测定 5 d。

1.3.5 干扰试验 根据 EP6-A2 文件, 分别将高值血红蛋白、结合胆红素、非结合胆红素、维生素 C、乳糜等干扰物和生理盐水按照 0/10、2.5/7.5、5/5、7.5/2.5、10/0 的比例混合, 制备系列浓度干扰物, 然后将系列浓度干扰物与待测血清按 1/19 比例混合, 在干式荧光免疫分析仪上用 CRP 试剂盒重复测定 3 次, 取平均值, 然后计算与生理盐水对照的相对偏差。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理, 符合正态分布的计量资料组间数据比较采用 *t* 检验, 计数资料两组间比较采用 χ^2 检验, 两变量间的相关关系采用线性回归, 回归决定系数取 R^2 , 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 批内精密度试验结果 对 CRP 3 个稀释浓度校准品进行精密度试验, 高、中、低值批内变异系数(CV%)分别为 6.27%、4.57%、1.76%, 符合要求。见表 1。

表 1 CRP 3 个稀释浓度校准品的精密度分析

项目	质控 T1	质控 T2
浓度(mg/L)	7.8	19.21
重复次数(<i>n</i>)	10	10
$\bar{x}$	8.18	19.95
SD	0.62	1.29
CV%	7.5	6.5

* 基金项目:宁波市鄞州区“重大科技创新专项”项目(201405)。

2.2 灵敏度试验结果 检测限是指检测方法可检测出的最低被测量浓度,也称检测低限或最小检出浓度,有时也称为分析灵敏度。随机抽取同批次的 CRP 检测卡 20 份,分别在荧光检测仪上对自制空白血清样本进行测定,重复 20 次,通过校准曲线拟合方程计算出样本浓度。批内 $\bar{x}$ 为 0.15,SD 为 0.09。结果,本研究制备的荧光定量检测卡检测限($\bar{x} \pm 2SD$)为 0.33 mg/L,能满足市场上超敏 CRP 检测的要求。见表 2。

表 2 检测限结果分析			
序号	测值(mg/L)	序号	测值(mg/L)
1	0.31	11	0.07
2	0.17	12	0.28
3	0.11	13	0.12
4	0.04	14	0.30
5	0.30	15	0.08
6	0.16	16	0.09
7	0.23	17	0.21
8	0.16	18	0.03
9	0.13	19	0.04
10	0.17	20	0.05

2.3 线性试验结果 以稀释液空白代替低浓度样本,与 CRP 浓度值为 162.60 mg/L 的高浓度患者标本和稀释液按 1.3.3 进行稀释得到 9 个浓度水平的系列样本,每个标本重复测 3 次,9 个线性评价样本的测定结果的范围为 0.16~162.60 mg/L。用统计学软件对结果进行多项式回归统计分析,各指标 b₂、b₃ 与 0 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),回归方程为线性,回归方程为 $Y=202.3X+2.616$, $R^2=0.997$ ($P<0.05$)。统计分析显示美康生物 CRP 荧光定量试剂盒在 0.16~162.60 mg/L 范围内呈显著线性关系。见图 1。

2.4 相关性试验 根据分别在干式荧光免疫分析仪和生化仪上连续 5 d 共 40 份血清样本的检测结果进行线性回归,回归方程为 $Y=0.998X+0.136$,决定系数 $R^2=0.991$ ($P<0.05$),线性回归的 Cusum 检验偏倚无统计学意义($P>0.05$)。相关性分析显示美康生物 CRP 荧光定量试剂盒的测定值与对比试

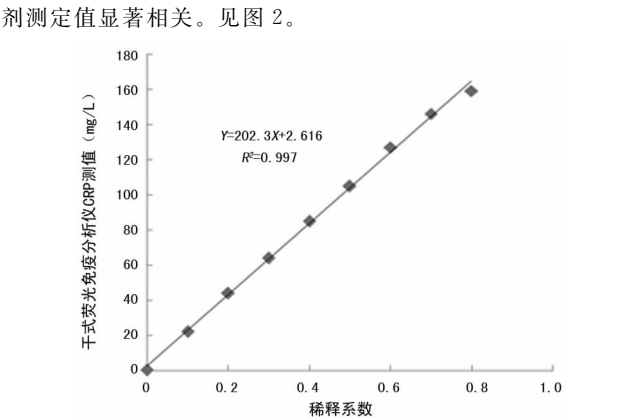


图 1 CRP 荧光定量检测试剂线性试验

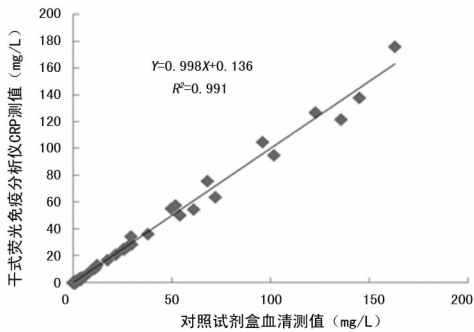


图 2 CRP 荧光定量试剂与对照试剂相关性

2.5 抗干扰试验结果 根据 EP6-A2 文件,分别将高值非结合胆红素(400 mg/dL)、结合胆红素(576 mg/dL)、血红蛋白(10 000 mg/dL)、三酰甘油(60 000 mg/dL)等干扰物和生理盐水按照 0/10、2.5/7.5、5/5、7.5/2.5、10/0 的比例混合,制备系列浓度干扰物,然后将系列浓度干扰物与待测血清按 1/19 比例混合,在干式荧光免疫分析仪上用 CRP 试剂盒重复测定 3 次,取平均值,然后计算与生理盐水对照的相对偏差。结果见表 3。非结合胆红素 ≤ 20 mg/dL、结合胆红素 ≤ 28.8 mg/dL、血红蛋白 ≤ 500 mg/dL、三酰甘油 $\leq 3\,000$ mg/dL 对检测结果无影响。

表 3 抗干扰试验结果

非结合胆红素			结合胆红素			血红蛋白			三酰甘油		
干扰物 (mg/dL)	测定值 (mg/L)	相对偏差 (%)	干扰物 (mg/dL)	测定值 (mg/L)	相对偏差 (%)	干扰物 (mg/dL)	测定值 (mg/L)	相对偏差 (%)	干扰物 (mg/dL)	测定值 (mg/L)	相对偏差 (%)
0	48.17	—	0.0	47.30	—	0	48.0	—	0	45.4	—
5	48.37	0.4	7.2	48.53	2.6	125	48.1	0.2	750	45.6	0.5
10	48.27	0.2	14.4	48.00	1.5	250	48.4	0.8	1 500	45.6	0.4
15	48.13	-0.1	21.6	48.73	3.0	375	48.6	1.2	2 250	46.2	1.8
20	47.83	-0.7	28.8	47.77	1.0	500	48.3	0.6	3 000	45.5	0.2

注:—表示无数据。

3 讨 论

本研究对美康生物的干式荧光免疫分析仪配套 CRP 试剂进行了性能评估。经评价,美康生物干式荧光免疫分析仪配套

CRP 试剂具有较好的精密度(批内低值 $<7.5\%$,高值 $<6.5\%$),检测灵敏度为 0.33 mg/L,在 0.33~162.60 mg/L 范围内呈线性关系,能够较好地满足临床需要。美康生物的干式

荧光免疫分析仪配套 CRP 试剂与美康生物全量程 CRP 胶乳增强免疫比浊法检测试剂的测定值之间具有高度的相关性, 决定系数 $R^2=0.991$ 。试剂具有良好的抗干扰性能, 非结合胆红素 ≤ 20 mg/dL、结合胆红素 ≤ 28.8 mg/dL、血红蛋白 ≤ 500 mg/dL、三酰甘油 $\leq 3\,000$ mg/dL 对检测结果无影响。随着 CRP 项目在国内临床检测中不断的开放, 检测量也会随之增长。美康生物 CRP 试剂配合美康干式荧光免疫分析仪, 操作简单便捷, 检测时间短, 更适合急诊、床旁检测以及基层社区医院检测, 可以广泛应用于临床。

参考文献

[1] Tillet WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a nor protein somatic fraction of the pneumococcus [J]. J Exp Med, 1930, 52(4): 561-571.

[2] Abernethy TJ, Avery OT. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood; I. distribution for the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of pneumococcus [J]. J Exp Med, 1941, 73(2): 173-182.

[3] Jones TD. The diagnosis of rheumatic fever [J]. J Am Med Assoc, 1944, 126(8): 481-484.

[4] Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine [J]. Structure, 1999, 7(2): 169-177.

• 临床研究 •

[5] Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ, et al. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein [J]. J Immunol, 2001, 166(6): 3998-4004.

[6] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women [J]. N Engl J Med, 2000, 342(12): 836-843.

[7] 巫一中. C 反应蛋白临床应用研究近况 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2010, 18(10): 1558-1559.

[8] 姜帆, 胡琼, 姜船, 等. C 反应蛋白在临床医学中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 254-255.

[9] Li JJ, Feng CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular disease [J]. Med Hypo These, 2004, 62(4): 499-506.

[10] 王红. 血清 C 反应蛋白与心力衰竭相关性观察与分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(2): 156-157.

[11] 饶富顺, 李熙梁. 血清 C-反应蛋白鉴别诊断细菌性和病毒性感染中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(11): 1324-1325.

[12] 哈丽君, 杨金翘, 王宝珍, 等. 新生儿感染性疾病超敏 C-反应蛋白检测及其意义 [J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(5): 618-620.

(收稿日期: 2017-02-20 修回日期: 2017-04-19)

肺炎克雷伯菌整合子的分布及耐药基因携带情况*

李春红¹, 孙小轩², 王桂花³, 王林海¹, 姜丽丽⁴, 郭晓英¹

(烟台海港医院: 1. 检验科; 2. 医院感染管理科; 3. 药剂科; 4. 内科, 山东烟台 264000)

摘要:目的 了解该地区临床分离肺炎克雷伯菌 I 类整合子阳性率、产 ESBLs 阳性率及相关耐药基因的携带情况, 探讨整合子、ESBLs 阳性、耐药基因携带与其耐药表型的相关性。方法 收集临床分离的肺炎克雷伯菌 100 株, 使用 VITEK-2 Compact 细菌分析系统鉴定确认并做药敏试验, 采用聚合酶链反应 PCR 检测菌株的 I 类整合子以及常见耐药基因。结果 在 100 株肺炎克雷伯菌中有 54 株细菌检出 I 类整合子, 检出率为 54.0%; 药敏结果显示 I 类整合子阳性菌株对多数抗菌药物的耐药率高于 I 类整合子阴性菌株, ESBL 阳性的菌株耐药基因检出率为 blaTEM 78.6%、blaSHV 92.9%、blaCTX-M-1 42.9%、blaCTX-M-9 71.4%、blaNDM 0.0%、blaKPC 7.1%, 高于 ESBLs 阴性的菌株。结论 肺炎克雷伯菌的主要耐药机制与菌株携带产 ESBLs、I 类整合子及相关耐药基因有关。

关键词:肺炎克雷伯菌; 整合子; 耐药性; 耐药基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.037 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2017)18-2602-03

近年来医院内肺炎克雷伯菌的检出率呈逐年升高趋势, 对常用抗菌药物的耐药情况也越来越严重, 对肺炎克雷伯菌进行耐药机制的研究, 将会对控制耐药菌的传播和合理使用抗菌药物起到重要的指导作用, 因此本课题组对临床分离的 100 株肺炎克雷伯菌进行实验分析, 以了解本地区肺炎克雷伯菌临床分离株 I 类整合子阳性率、产超广谱酶 (ESBLs) 阳性率及相关耐

药基因的携带情况。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验菌株主要来源于烟台地区 4 所综合性医院的临床分离株, 共计 100 株。所有菌株均通过 VITEK-2 Compact 细菌分析系统进行菌种鉴定, 鉴定板型为 GN 卡, 药敏板型为 GN16 卡, 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜

* 基金项目: 烟台市科技计划项目 (2014WS055)。