

C反应蛋白测定两种检测系统间结果的比较^{*}

汪怀周, 陈燕, 岳展伊, 朱荣荣, 邓安梅

(第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433)

摘要:目的 对两种不同检测系统测定C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的结果进行比对和偏倚分析, 以评价不同检测系统CRP测定结果的可比性。方法 参照美国临床实验室标准研究所(CLSI)EP9-A2文件要求, 收集长海医院急诊患者乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血50例, 同时使用全自动免疫分析仪(Beckman Immage 800)和免疫荧光分析仪(i-CHROMA™ Reader)检测待测样本中的CRP浓度, 评价两种方法检测结果的相关性。结果 使用血浆标本时, 两方法相关性良好, 回归方程为 $Y=1.0765X-3.0315$, $R^2=0.986$ 。全血测定的回归方程为 $Y=0.8826X-1.1808$, $R^2=0.9311$ 。对于红细胞压积(HCT)较低的标本(<30.45%)使用纠正公式: 全血CRP(纠正后)=全血CRP结果(纠正前)/(1-HCT)。Y(纠正后)= $1.0068X-3.6122$, $R^2=0.9509$ 。结论 两种检测系统血浆CRP的测定结果具有可比性, 适合临床应用。遇HCT较低的标本时, 通过校正公式校正, 可提高全血结果的可比性。

关键词:床旁即时检测; C反应蛋白; 红细胞压积; 评价研究

中图分类号: R446.112 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)03-127-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.036

Comparison of Different Assay System for C-reactive Protein Detection

WANG Huai-zhou, CHEN Yan, YUE Zhan-yi, ZHU Rong-rong, DENG An-mei

(Department of Laboratory Diagnosis,

Changhai Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To evaluate comparability of two different assay system for detecting CRP. **Methods** Following the profile of Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) document EP9-A2, 50 blood samples with anti-coagulant EDTA-2K were collected from emergency patients at Changhai Hospital. The test result of samples by the i-CHROMA Reader was compared and evaluated with those by Beckman Immage 800. **Results** The linear regression equation for plasma CRP was: $Y=1.0765X-3.0315$, $R^2=0.986$. The linear regression equation for whole blood CRP was: $Y=0.8826X-1.1808$, $R^2=0.9311$. For whole blood samples with low HCT (<30.45%). Used correction equation: CRP (after corrected)=CRP (before corrected)/(1-HCT). The regression equation (after corrected) was: $Y=1.0068X-3.6122$, $R^2=0.9509$. **Conclusion** CRP concentration detected by i-CHROMA showed good correlation and comparability compared to laboratory reference system by using plasma samples. Results from whole blood samples with low HCT should be corrected to improve comparability.

Keywords: POCT; C-reactive protein; HCT; evaluation studies

C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)为一种急性时相反应蛋白, 是炎症和组织损伤的敏感标志物。CRP的检测被广泛应用于各种急性炎症、感染、手术创伤等方面的辅助诊断和病情监测^[1,2]。目前临床上常用的定量检测CRP的方法主要有免疫透射比浊法、免疫散射比浊法和免疫荧光分析法等。随着检测技术的不断发展, 具有体积小、使用简便、快速获得结果且采血量少的检测仪器不断涌现^[3]。这类仪器往往可以检测不同类型的标本, 包括血清/血浆或全血, 更适合于急诊检验的使用。

本研究中, 我们使用乳胶免疫散射比浊法(Beckman Coulter, Immage 800)检测血浆CRP浓度作为参比方法, 使用荧光免疫分析法(Med Inc, i-CHROMA™ Reader)进行快速CRP分析作为实验方法, 评价其检测结果的准确性。

1 材料与方法

1.1 标本 收集长海医院临床血清标本, 按CRP低、中、高3个水平制成混合血清, 以每支0.5 ml分装后于-20℃储存, 用于精密度测定。选取一高浓度EDTA-K₂抗凝标本用于线性分析。选择50

* 基金项目: 国家自然科学基金(81471605, 8273282, 81202353), 上海市申康基金(CHDC22014014), 长海医院基金(CH125530300)。

作者简介: 汪怀周(1978-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 临床检验, E-mail: whz_sh@163.com。

作者简介: 陈燕(1977-), 共同第一作者, 女, 主管技师, E-mail: chenyan770628@163.com。

通讯作者: 邓安梅, E-mail: amdeng70@163.com。

份不同 CRP 浓度的 EDTA-K₂ 抗凝血标本,同时用于全血 CRP 检测和血常规检测;剩余标本 3 500 r/min 离心 5 min 获取血浆,用于血浆 CRP 浓度的检测。本次研究的标本无需患者额外采集,并获得本院医学伦理委员会的批准。

1.2 仪器与试剂 全血 CRP 和血浆 CRP 测定采用韩国 Med Inc 公司 i-CHROMA™ Reader 为检测仪器和配套试剂(批号:CAKKC07A.1),其原理采用双抗体夹心免疫荧光分析法。血浆 CRP 测定参比系统为美国 Beckman Coulter 公司 Immage 800 全自动免疫分析仪和配套试剂(批号:M408168),其检测原理为免疫速率散射比浊法。

1.3 方法

1.3.1 精密度试验:用留取的低、中、高 3 种浓度标本进行评价试验,每个浓度连续测定 20 次,检测批内精密度,连续 20 天测定,检测批间精密度。

1.3.2 比对试验:按 EP9-A2 文件要求,在 i-CHROMA™ Reader 上使用全血、血浆检测 CRP,在 Immage 800 上使用血浆检测 CRP。每份标本 CRP 均做双份测定,测定顺序为 1~10,10~1,连续测定 5 天,共获得 100 个检测结果。全血标本的红细胞压积(HCT)在 SYSMEX XS-800i 全自动血细胞分析仪上检测。

1.3.3 线性试验:选取接近检出限低浓度标本(L)(本实验使用试剂盒缓冲液),另选取高值的全血标本(H),按比例配置成 10 个不同浓度标本(100%,90%,80%,70%,60%,50%,40%,30%,20%和 10%比例稀释),每个标本重复测定 2 次,计算均值。以实测值为 Y 轴,理论值为 X 轴作直线回归方程。

1.4 统计学分析 不同检测系统间和不同类型检测标本间测定结果的差异采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。比较两种方法的相关性采用线性回归分析。计算在不同医学决定水平处实验系统与参考测定系统的偏倚。统计软件采用 SPSS Statistics 19.0 Software (IBM, New York, USA)。卫计委临检中心室间质量评价 CRP 定量测定允许总误差(TEa)为 25%,以偏倚 $\leq 1/2$ TEa 为不同检测系统间或不同类型检测标本间的测定结果具有可比性。

2 结果

2.1 精密度试验 经统计学处理后不同浓度下的批内、批间精密度结果见表 1。变异系数(CV)的合格标准按卫计委临检中心室间质量评估允许 CRP 误差(25%)的 1/4 计算, $CV < 7.5\%$ 。从表 1 中可见 i-CHROMA 测定 CRP 时的精密度均符合要求。

表 1 不同浓度水平下批内、批间精密度(%)

标本	批 内		批 间	
	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV(%)	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV(%)
低值	5.44 ± 0.21	3.88	5.42 ± 0.37	6.75
中值	15.87 ± 0.41	2.56	15.50 ± 0.70	4.51
高值	99.40 ± 1.44	1.45	100.96 ± 2.23	2.21

2.2 比对试验 经配对 *t* 检验,i-CHROMA 血浆测定与 Beckman 血浆测定差异无统计学意义($P = 0.276$),测定结果见图 1,其回归方程为 $Y = 1.076 5X - 3.031 5$, $R^2 = 0.986$ 。在医学决定水平 50 mg/L 和 100 mg/L 时的偏倚分别为 1.59% 和 4.62%。比对试验使用的 50 份全血样本红细胞压积范围为 16.4%~47.5% ($36.2\% \pm 6.0\%$),i-CHROMA 全血测定与 Beckman 血浆测定结果的差异有统计学意义($P < 0.001$)。散点图(图 2)显示,i-CHROMA 全血测定结果与 Beckman 测定结果存在明显负偏差,其回归方程为 $Y = 0.882 6X - 1.180 8$, $R^2 = 0.931 1$ 。在医学决定水平 50 mg/L 和 100 mg/L 处分别存在 -14.70% 和 -13.22% 的偏倚,超出了可接受的范围。

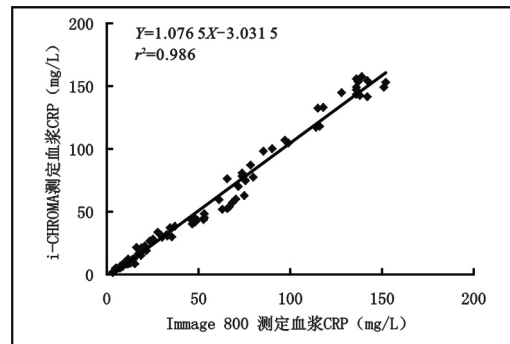


图 1 Immage 800 与 i-CHROMA 血浆测定散点图

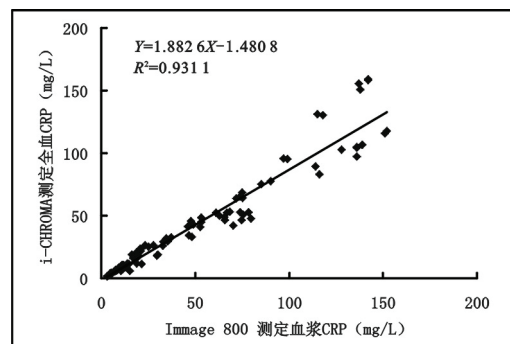


图 2 Immage 800 与 i-CHROMA 全血测定散点图

2.3 线性试验 试验结果显示,在使用稀释液对全血进行稀释时,与理论值存在较大偏差,见表 2。

考虑到红细胞压积在 CRP 测定时存在的影响,理论浓度=标本 CRP 含量/标本血浆体积。当红细

胞压积为 30.45%时,实测 CRP 浓度与理论值的偏差达到-24.36%。

表 2

全血 CRP 稀释线性

项 目	标本比例(%)									
	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
红细胞压积(%)	43.50	39.15	34.80	30.45	26.10	21.75	17.40	13.05	8.70	4.35
实测 CRP(mg/L)	94.44	81.50	75.45	40.62	33.45	25.24	21.33	15.84	11.35	5.56
理论值 CRP(mg/L)	94.44	78.92	65.47	53.70	43.32	34.09	25.84	18.41	11.69	5.58
与理论值偏倚(%)	0	3.27	15.24	-24.36	-22.80	-25.98	-17.45	-13.96	-2.93	-0.33

2.4 结果的纠正 对于红细胞压积低的标本,我们试使用以下公式进行纠正:纠正结果=全血 CRP 结果/(1-HCT)。线性试验经纠正后,统计分析回归方程为: $Y=1.0447X-0.1415$, $R^2=0.9904$ 。比对试验的 CRP 结果经纠正后,两者相关性良好,见图 3。回归方程: $Y=1.0068X-3.6122$, $R^2=0.9509$ 。重新计算在医学决定水平 50 mg/L 和 100 mg/L 处的偏倚分别为-7.16%和-3.14,符合临床的要求。

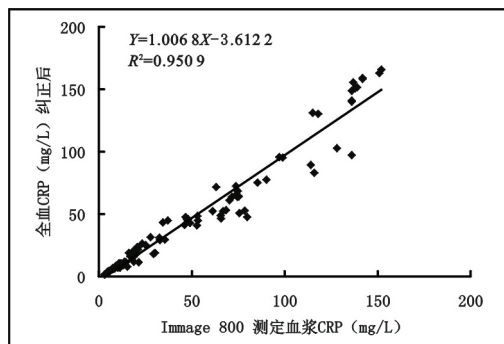


图 3 Immage 800 与 i-CHROMA
全血测定(纠正后)散点图

3 讨论 CRP 是一种能与肺炎球菌 C 多糖体结合,由 5 个相同亚单位以非共价键聚集形成的五聚体。主要在 IL-6 刺激下由肝脏产生,是一种急性时相反应蛋白^[4]。CRP 的检测由最初采用的凝集法、ELISA 法,之后更为精确的透射比浊法、散射比浊法以及荧光免疫分析、电化学阻抗法也一一面世^[5]。随着技术的发展,一批体积小、操作简便、快速、用量少的床旁即时检测(point-of-care testing, POCT)仪器也不断涌现,大大方便了临床的需要。POCT 带来方便性的同时,也存在质量控制体系不完善、检验成本偏高、易受操作者技术水平影响等问题^[3]。

按照 ISO15189 临床实验室质量管理要求,在使用一个新的检测系统前需进行性能评价。本研究按照 EP9-A2 文件要求,对韩国产 i-CHROMA

™ Reader 免疫荧光分析仪测定仪进行准确度的评价。而在此之前,已有多个研究者使用不同方法对 i-CHROMA 仪器进行了性能评价。Oh 等^[6]使用 150 例随机全血标本与 BN II 的比对结果证实两者在 0.5~50 mg/L 的范围内相关性良好。Ciftci 等^[7]使用 96 例随机血清标本与 Immage 800 的比对结果发现两者在 2.5~300 mg/L 的范围内相关性良好。邓芳梅等^[8,9]使用血清在不同仪器间进行了比对,都有较好的准确性。值得注意的是,以上的实验均未考虑红细胞压积对全血 CRP 测定的影响。

本研究发现 i-CHROMA 检测血浆时的结果与 Immage 800 的测定结果相符。但在进行全血进行比较时,部分结果差异较大,两者配对 t 检验结果 $P<0.001$ 。另外,我们的线性试验结果显示(表 2),在红细胞压积偏低的情况下($<30.45\%$),仪器测定值与预期值产生了较大的负性偏倚(-24.36%)。且从表中可见,在正常的红细胞压积由于稀释不断降低的过程中,34.85%~30.45%两点的 CRP 测定结果突然由正偏差变为负偏差,偏倚的变化幅度达到 39.6%。

由仪器说明书及相关文献^[10]所知,i-CHROMA 采用的是双抗体夹心法进行荧光免疫测定,测定的是血浆中的 CRP 抗原。而本批号试剂可同时进行全血或血浆的测定,并不需要特殊处理。结合仪器可以直接测定血浆的特点,我们推测在红细胞压积较低的情况下,仪器直接把得到的信号结果作为血浆结果报告。因此我们使用以下公式进行纠正:纠正结果=全血 CRP 结果/(1-HCT)。结果显示,在线性检测和方法学比对中都消除了这种负性偏倚,这也证实了我们的推测。

在已有的研究中,隆维东等^[11]人采用的纠正公式为:纠正结果=全血 CRP 结果 $\times 0.64/(1-HCT)$,与我们的研究不一致,这可能是仪器型号间的差异所致。隆维东等人使用的仪器使用 15 μ l 全血进行测定,使用 10 μ l 血浆进行测定,是通过

加样的不同来减少全血和血浆间的偏倚。2011年包安裕等^[12]人的研究结果显示,i-CHROMA结果与特种蛋白仪测定的结果也有显著差异。目前新改良的检测试剂虽然可同时用血浆或全血检测,临床使用更加方便,但却使严重贫血标本的分析误差大大增加。

临床上,各种原因引起的贫血可导致红细胞压积降低,全血检测时由于红细胞压积的变化引起的CRP测定结果的变异值得注意^[13~15]。我们随机调取急诊患者1 000份血常规结果进行分析,发现有11.5%的患者红细胞压积低于30.45%。这部分患者如直接使用i-CHROMA全血测定的CRP结果,将很容易造成漏诊或误诊。因此在检测红细胞压积异常的标本时,需通过公式进行纠正,本文提供了此方面的参考。不过由于实验所限,需用纠正公式的低红细胞压积样本的范围仍需进一步大样本的研究证实。另外,本文所发现的红细胞压积异常导致的结果变异,如在性能验证中使用血清、血浆或红细胞压积正常的全血时将不能发现。也提醒我们在使用新方法、新型号的仪器进行常规标本检测时,需充分考虑临床标本的实际使用情况进行性能验证。

参考文献:

- [1] Sankar V, Webster NR. Clinical application of sepsis biomarkers[J]. Journal of Anesthesia, 2013, 27(2): 269-283.
- [2] 张婷,丁爽,李洪春,等.血清PCT,CRP及NEU%联合检测对细菌性血流感染的早期诊断价值[J].现代检验医学杂志,2014,29(3):75-77.
Zhang T, Ding S, Li HC, et al. Early diagnostic value of combined detection of serum PCT, CRP and NEU% in patients with bacterial bloodstream infection[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(3): 75-77.
- [3] 卓兰云,黎小琼,何敏,等. POCT仪器与全自动生化分析仪C反应蛋白检测结果的比对[J].广东医学,2014,35(1):110-111.
Zhuo LY, Li XQ, He M, et al. [J]. Guangdong Medical Journal, 2014, 35(1): 110-111.
- [4] Lelubre C, Anselin S, Boudjeltia ZK, et al. Interpretation of C-reactive protein concentrations in critically ill patients[J]. Bio Med Research International, 2013, 2013(7):124021.
- [5] Chandra P, Suman P, Airon H, et al. Prospects and advancements in C-reactive protein detection [J]. World Journal of Methodology, 2014, 4(1):1-5.
- [6] Oh SW, Moon JD, Park SY, et al. Evaluation of fluorescence hs-CRP immunoassay for point-of-care testing[J]. Clin Chim Acta, 2005, 356(1/2):172-177.
- [7] Ciftci IH, Koroglu M, Karakece E. Comparison of novel and familiar commercial kits for detection of C-reactive protein levels[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(8):2295-2298.
- [8] 邓芳梅,林晓文,李德发. i-CHROMATM READER免疫荧光分析仪性能评价[J].临床输血与检验, 2010, 12(2):107-109.
Deng FM, Lin XW, Li DF. Performance evaluation of the i-CHROMATM READER fluorescence immunoassay analyzer[J]. J Clin Transfus Lab Med, 2010, 12(2):107-109.
- [9] 金明超,任春云,王星. i-CHROMATM Reader免疫荧光分析仪测定超敏C反应蛋白性能评价[J].实验与检验医学, 2014, 32(2):227-229.
Jin MC, Ren CY, Wang X. [J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2014, 32(2):227-229.
- [10] Ahn JS, Choi S, Jang SH, et al. Development of a point-of-care assay system for high-sensitivity C-reactive protein in whole blood[J]. Clin Chim Acta, 2003, 332(1):51-59.
- [11] 隆维东,李坚,刘万彬.不同红细胞压积对全血CRP测定的影响及校正措施[J].国际检验医学杂志, 2012, 33(1):107-109.
Long WD, Li J, Liu WB. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(1):107-109.
- [12] 包安裕,李艳.床旁即时检测与检验科常规检测C反应蛋白的比较[J].现代检验医学杂志, 2011, 26(3):99-101.
Bao AY, Li Y. Comparison of C-reactive protein detection using point-of-care testing and routine analysis system in clinical laboratory [J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(3):99-101.
- [13] 苏霞.1 400例门诊患者末梢血与静脉血血常规和高敏C-反应蛋白检测方法及其检测仪器的评价[J].国际老年医学杂志, 2012, 33(6):246-248.
Su X. Evaluation of the detection method and detector of peripheral blood and venous blood WBC and hs-CRP [J]. International Journal of Geriatrics, 2012, 33(6):246-248.
- [14] 潘惠芬,顾文红,赵缜,等.急诊CRP检测方法的选择与临床应用[J].国际检验医学杂志, 2012, 33(7):849-851.
Pan HF, Gu WH, Zhao Z, et al. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(7):849-851.
- [15] 叶昌远,程晓玲.全血快速C反应蛋白检测的应用[J].中国社区医师:医学专业, 2012, 14(9):272.

收稿日期:2015-06-30

修回日期:2016-02-24