

流式微球检测超敏 C 反应蛋白方法学的建立及性能评价*

田 禾¹, 黄 山^{1△}, 张 程³, 陈 艳³, 令狐颖¹, 刘志琴² (贵州省人民医院: 1. 临床检验中心; 2. 心内科, 贵阳 550002; 2. 贵州省贵阳医学院 550002)

【摘要】 目的 建立流式微球分析技术(CBA)检测人血清中超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)的方法并对其进行系统性评价。方法 将 hs-CRP 鼠抗人单克隆抗体包被在已激活的羧基化聚苯乙烯微球上,用正交试验对试验条件进行优化选择,并应用美国临床实验室标准化协会的有关规则进行方法学评价。结果 试验选择 hs-CRP 鼠抗人单克隆抗体的加入量为 10 μg,生物素标记的羊抗人单克隆抗体的稀释倍数为 1:540,第一次反应时间为 2 h,洗涤 2 次,PE 标记亲和素的稀释倍数为 1:1 000,第 2 次反应 1 h 洗涤 1 次。方法学评价显示,CBA 检测 hs-CRP 的分析灵敏度为 0.03 ng/mL,线性范围为 0.03~333.33 ng/mL,批内变异系数为 2.70%~4.44%,批间变异系数为 4.99%~9.52%,准确度相对偏倚为 2.17%~4.39%,回收率为 98.31%~104.60%。高浓度的三酰甘油、胆固醇和胆红素对 3 种因子有一定的干扰率,低浓度的三酰甘油、胆固醇和胆红素对 3 种因子干扰较小。分别与免疫荧光方法比较差异无统计学意义。结论 自建的 hs-CRP 流式微球检测技术性能指标满足公认的质量指标,可拓展流式细胞分析技术,值得临床推广使用。

【关键词】 流式微球分析技术; 超敏 C 反应蛋白; 方法学评价

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.10.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)10-1153-02

Development and evaluation of flow cytometric bead assay detection method for the detection of hs CRP* TIAN He¹, HUANG Shan^{1△}, ZHANG Cheng³, CHEN Yan³, LING Hu-ying¹, LIU Zhi-qin² (1. Center of Clinical Laboratory; 2. Department of Internal Medicine Cardiovascular, Peoples Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, China; 3. Medical College of Guiyang, Guizhou 550002, China)

【Abstract】 Objective To develop and systematically evaluate the flow cytometric bead analysis technique for the detection of high sensitivity C reactive protein. **Methods** The mouse anti human hs CRP monoclonal antibody was coated on the activated carboxylated polystyrene beads. According to the orthogonal experiment, the best test conditions was selectand and the relevant rules of CLSI was applied for methodology evaluation. **Results** In the reaction, the best quantity of mouse anti human hs CRP monoclonal antibody was 10 μg, the best dilution of biotin labeled monoclonal antibody was 1:540. The first incubation time was 2 hours with twice of washing. The best dilution of streptavidin PE was 1:1 000, and the second incubation time of streptavidin PE was 1 hours with one times of washing. According the methodology evaluation, the sensitivity of hs-CRP was 0.03 ng/mL, the linear range was from 0.03 to 333.33 ng/mL, the intra assay of variation was from 2.70% to 4.44%, the inter assay of variation was from 4.99% to 9.52%, the relative bias was from 2.17% to 4.39%, and the recovery was from 98.31% to 104.60%. High levels of triglyceride, cholesterol and bilirubin had a certain interference to detection, but low levels of triglyceride, cholesterol and bilirubin had a minor disturbance. There was no significant difference with immunofluorescence.

Conclusion The performance indicators of cytometric bead assay of detecting hs CRP meet the recognized quality indicators, and the method could extend flow cytometry analysis, worthy of clinical use.

【Key words】 cytometric bead analysis technique; high sensitivity c-reactive protein; evaluation of methodology

C 反应蛋白(CRP)是一种由肝脏合成的典型的急性时相反应蛋白^[1],除了作为炎症反应感染因素和组织损伤的敏感指标外,其中的超敏 CRP(hs-CRP)还作为心血管事件的独立预测因子^[2],普遍应用于临床。近年来,流式细胞仪已广泛应用于临床^[3],并且应用前景不断扩大。本文建立了 hs-CRP 的流式微球检测分析技术,具有灵敏度高,特异性强,节约成本等特点。现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 血清标本采自 2010 年 9 月至 2011 年 3 月贵州省人民医院心内科住院患者和健康体检者。清晨空腹采血,

分离血清,-80 ℃保存待检。

1.2 材料 hs-CRP 标准品(1707-CR,美国 R&D 公司,200 μg/mL),鼠抗人 hs-CRP 单克隆抗体(MAB17071,美国 R&D 公司,浓度为 0.5 mg/mL),生物素标记的鼠抗人 hs-CRP 单克隆抗体(BAM17072,美国 R&D 公司,浓度为 0.5 mg/mL),异硫氰酸荧光素标记羊抗鼠 IgG(ab6785,abcam 公司,浓度为 2.000 mg/mL),荧光素 PE 标记的亲和素(12-4317, eBio-science 公司,浓度为 0.200 mg/mL),羧基化微球(171-506007 #,Bio-Rad 公司产品),三酰甘油标准品、胆红素标准品和胆固醇标准品(天津一方科技有限公司),韩国 i-chroma 免疫荧

* 基金项目:贵阳市科技局社会发展领域科技攻关项目[2010]筑科农合同字第 1-社-35 号和贵州省卫生厅立项资助项目[GZWKJ

2009-1-007]。△ 通讯作者,E-mail:huangshan263@sina.com。

光分析仪及 hs-CRP 配套试剂盒(批号:RFK6H10),BD Array 流式细胞仪等。

1.3 方法

1.3.1 方法学建立 取 100 μL 羧基化微球原液 6 管,参考文献[4]激活微球,分别加入 0、1.25、2.5、5、10、20 μg 的鼠抗人 hs-CRP 单克隆抗体,再加入 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FITC 标记羊抗鼠 IgG 50 μL ,反应后通过流式细胞仪检测荧光强度中位数(MFI),制作剂量反应曲线,选择适宜的鼠抗人单克隆抗体最佳连接量。按文献[4]的方法进行微球耦联。用正交试验对生物素标记抗体的释倍数、孵育时间、洗涤次数、荧光素 PE 标记的亲合素的稀释倍数、标记了亲和素后的第 2 次孵育时间和洗涤次数等条件进行优化。按优化的试验条件选择试验参数,即建立了 hs-CRP 的 CBA 检测技术。

1.3.2 方法学评价 应用美国临床实验室标准化协会的有关规则对流式微球分析技术检测 hs-CRP 的分析灵敏度、线性范围、精密密度、准确度、回收试验、干扰试验等分析性能进行系统性评价[5]。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件设计正交试验表和统计学分析,两组间比较以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式微球检测 hs-CRP 方法学的建立 经过试验发现,荧光强度中位数 MFI 随着鼠抗人单克隆抗体的增加而增加,考虑试剂成本及试验的有效性,hs-CRP 单克隆抗体的最佳连接量均为 10 μg 。根据正交试验结果,利用 SPSS3.0 软件分析,hs-CRP 流式微球检测条件优化为:试验体系中,生物素标记抗体的稀释倍数为 1:540,第 1 次孵育时间为 2 h,第 1 次洗涤次数是 2 次;PE 标记亲和素的稀释倍数选择 1:1 000,第 2 次孵育时间选择 1 h,第 2 次洗涤次数为 1 次。按优化的试验条件选择试验参数,按仪器说明书操作,即建立了流式微球检测 hs-CRP 的分析技术。

2.2 分析灵敏度的确定 分析灵敏度或检测限是指检测系统可检测的最低分析物浓度[6]。按建立的检测方法,以磷酸盐缓冲液稀释液为空白样品,分别对 hs-CRP 空白样品和低值标准品(0.46 ng/mL)进行 20 次检测,记录每次检测的 MFI。CRP 的空白样本和低浓度样本的 MFI 均值分别为 15.62 和 27.96,标准差分别为 0.24 和 0.31,低浓度样本 MFI 值扣除空白样本 MFI 值后为 12.34,按照 99.7%的可信度,空白样本 3 倍标准差为 $0.24 \times 3 = 0.72$ 。因此,MFI 为 0.72 时相当于 hs-CRP 检测灵敏度为: $0.72/12.34 \times 0.46 = 0.03 \text{ ng}/\text{mL}$ 。

2.3 线性范围 按建立的方法检测 hs-CRP 标准品系列稀释浓度,hs-CRP 浓度 0.15~333.33 ng/mL 时其线性良好,经统计分析,曲线相关系数为 0.996,曲线方程为: $Y = 47.23X + 504.57$ 。结合灵敏度试验,hs-CRP 线性范围为 0.03~333.33 ng/mL。

2.4 精密密度试验 按建立的方法对 hs-CRP 低值和高值两种稀释浓度标准品(0.46 ng/mL 和 111.11 ng/mL)同批重复 20 次,计算批内精密密度,不同批重复检测 20 次,计算批间精密密度。试验结果为:低值和高值的批内变异系数分别为 4.44% 和 2.70%,批间变异系数分别为 9.52% 和 4.99%。

2.5 准确度试验 按建立的方法对 hs-CRP 低值和高值两种稀释浓度标准品(0.46 ng/mL 和 111.11 ng/mL)重复检测 20 次,计算均值。以标准品的稀释浓度为预期靶值,实际检测值的均值为验证值,将验证值与预期靶值进行比对,计算验证值与靶值的相对偏倚(%)。流式微球检测 hs-CRP 低值和高值

两种稀释浓度标准品的相对偏倚分别为 2.17% 和 4.39%。取 1 份患者血浆(稀释 250 倍),按照加入 hs-CRP 量约为原血浆中 hs-CRP 量的 50%、100%、150% 的原则,制备 3 种回收试验样品,进行回收试验,回收率为 98.31%~104.60%。

2.6 干扰试验 取患者血浆,加入不同浓度的三酰甘油、胆固醇和胆红素进行干扰试验,高浓度的三酰甘油(37 mmol/L)、胆固醇(13 mmol/L)和胆红素(0.34 mmol/L)混合干扰物对 hs-CRP 测定时的干扰率分别为 14.10%、9.65% 和 8.94%,对检测有一定的干扰。较低浓度的三酰甘油(18.5 mmol/L)、胆固醇(6.5 mmol/L)和胆红素(0.17 mmol/L)混合干扰物对 hs-CRP 测定时的干扰率分别为 8.07%、6.53% 和 4.76%,对检测干扰较小。

2.7 对比试验 用本文建立流式微球分析和韩国 i-chroma 免疫荧光分析仪及 hs-CRP 配套试剂盒分别对 20 份血浆标本进行 hs-CRP 检测,对结果进行配对 t 检验, $t = 0.44$, $P = 0.67$,二者差异无统计学意义($P > 0.05$)。对两组数据进行线性分析,相关性较好,相关系数为 0.997。

3 讨论

在 hs-CRP 的检验中,方法较多,常用的有酶联免疫吸附试验、放射免疫试验、免疫比浊法等。酶联免疫吸附试验法影响因素较多,而且存在着标准化问题[7-8]。放射免疫法由于存在放射性污染问题,在临床上的应用也逐渐减少。免疫比浊法对抗体和增浊剂的质量要求很高,试剂和仪器较贵[9]。

近年来,流式细胞分析仪已广泛应用于临床,利用流式细胞仪发展流式微球分析技术(CBA),具有很大的应用前景。CBA 是近年发展起来的一种定量检测细胞分泌或裂解释放的细胞因子或其他可溶性蛋白的重要方法;是将聚苯乙烯微球、荧光染料标记系统、激光技术、应用流体学、数据分析软件及微球专用流式细胞仪有机地整合在一起而产生的一项新技术[10],其原理是利用有机高分子微球为载体,用抗原特异性单克隆抗体(捕获抗体)进行包被,再与标准品/或待检样本及荧光素标记的抗原特异性单克隆抗体(检测抗体)一起反应,然后用流式细胞仪对其进行定量检测。应用 CBA 进行检测,所需样本量少,并且大大缩短了操作时间,同时其特异性强,灵敏度高。对于一种检验方法或检测系统的建立,为保证检验质量,确保检测系统的有效性,必须对检测系统进行系统性评价,评价的主要内容包括几大性能,如分析灵敏度、线性、精密密度、准确度干扰试验及方法比对等。只有真正验证了检测系统的分析性能符合临床要求,或与公认的质量指标基本一致,才可以将检测系统用于临床常规检验。一种可靠、有效的检测系统的性能评价,是建立在临床检验全面质量管理基础上的,是临床检验全面质量管理的深化和提高。

本文通过对自建 hs-CRP 的流式微球联合检测方法进行评价,效果较为满意,这对拓展流式细胞分析技术,延伸流式细胞仪应用领域,都有积极的作用,值得临床推广使用。

参考文献

- [1] Reiss AB, Glass AD. Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects[J]. J Investigate Med, 2006, 54(3): 123-131.
- [2] Lowe GD. The association between elevated levels of inflammation biomarkers and coronary artery disease and death[J]. CMA J, 2006, 174(4): 479-480.
- [3] 王建中,王淑娟.当前临床流式细胞分(下转第 1157 页)

且几乎一半的患者因低血糖症所致的住院与药物相关,考虑除药物排泄减慢等因素外,还与以下因素有关:(1)糖尿病肾病患者常合并使用一些其他药物,如非选择性β受体阻滞剂等;(2)糖尿病肾病患者常需使用胰岛素治疗,增加了发生低血糖的危险;(3)病程长伴胰岛P细胞功能的减退,使胰岛细胞分泌胰高血糖素障碍,且糖尿病肾病患者常常合并自主神经病变,部分患者表现为对低血糖无感知性,因而应对低血糖的防御反向调节机制受损,以致发生严重低血糖,甚至死亡。

3.1.6 治疗方案与 2 型糖尿病低血糖 本研究结果发现,磺脲类药物及胰岛素(大于 5 年)治疗是 2 型糖尿病低血糖发生的危险因素^[10]。有研究报道,磺脲类药物导致低血糖症发生率为 5%~20%,胰岛素导致的发生率为 10%。

3.1.7 药物间的相互作用 本研究结果发现,合并使用拜阿司匹林药物,因药物间(与降糖药物)相互作用,会增强降糖的效果。此外,有研究报道,青霉素和心得安等药物也可增强降糖效果,联合应用时应多加注意^[11]。

3.2 其他危险因素

3.2.1 文化 本文中有 7 例患者学历为文盲,其中有 5 例发生了低血糖,其原因分析如下:患者不知道血糖水平及未监测血糖。糖尿病患者对糖尿病知识的缺乏也是导致低血糖反复发生的根本原因,香港一项研究显示,糖尿病及低血糖相关知识缺乏的糖尿病患者发生低血糖的概率明显增加。部分患者的糖尿病相关知识的贫乏,易造成不正确的医疗行为,包括对血糖的监测、药物的选择、低血糖的表现及防治不了解等,监测血糖的频率也较低,不明确自身血糖控制情况,且容易造成低血糖反应反复发作。

3.2.2 性别 本研究中,性别与低血糖差异无统计学意义。但是有文献报道,糖尿病患者男女反调节机制反应性略有不同,低血糖发病率女性略低于男性,原因之一在于女性受反复低血糖的影响较小,当血糖低于 2.8 mmol/L 再次发作时,女性反调节激素反应性下调 25%,而男性下调 30%~60%^[12]。

3.3 本文研究局限性 本文仅对 2 型糖尿病患者出现低血糖部分临床资料进行分析,在今后的研究中,对其他危险因素应给予更多关注。

综上所述,病程长、高龄、低体质量、低 HbA1c、肾功能异常、磺脲类药物及胰岛素(大于 5 年)治疗、合并使用拜阿司匹林等其他非降糖类药物、低文化及性别是住院 2 型糖尿病患者发生低血糖的独立危险因素,因此对于具有以上危险因素的人群应该加强 72 h 动态血糖监测,即连续动态血糖监测(CGMS)。血糖监测范围为 2.2~22.2 mmol/L,每 5 分钟记录一次血糖值,并获得 72 h 的血糖波动曲线图。CGMS 可以揭示常规检测方法所未能显示的血糖波动幅度以及波动趋势,

犹如血糖的“Hoher”检测仪^[13],及时预防、发现、纠正低血糖,减少因医源性低血糖导致的不良后果。

参考文献

[1] King H, Aubert RE, Herman WH. Globalburdenofdiabetes, 1995-2025: Prevence, numerical estimates and projections[J]. Diabetes Care, 1998, 21: 1414-1431.

[2] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 794-795.

[3] Schwartz NS, Clutter WE, Shah SD, et al. Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the thresholds for symptoms[J]. J Clin Invest, 1987, 79: 777-781.

[4] Zammio NN, Frier BM. Hypoglycemia in type 2 diabetes, pathophysiology, frequency, and effects of different treatment modalities[J]. Diabetes Care, 2005, 28 (12): 2948-2961.

[5] 宁毅军, 柴若楠, 王丽娜. 34 例老年糖尿病低血糖的预防与护理[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(17): 1687-1691.

[6] Gerstein HC, Miller ME. Action to control cardiovascular risk in diabetes study group[J]. N Engl J Med, 2008, 358 (24): 2545-2559.

[7] Duckworth W, Abraira C, Moritz T, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2009, 360(2): 129-139.

[8] Cryer PE, Davis SN, Shamon H. Hypoglycemia in diabetes[J]. Diabetes Care, 2003, 26(6): 1902-1912.

[9] Haviv YS, Sharkia M, Safardi R. Hypoglycemia in patients with renal failure[J]. Ren Fail, 2000, 22(2): 219-223.

[10] Banarer S, Cryer PE. hypoglycemia in type 2 diabetes[J]. Med Clin North Am, 2004, 88(4): 1107-1116.

[11] 梁慧, 傅一明. 糖尿病治疗中的低血糖现象探讨[J]. 临床医学, 2000, 20(6): 21-22.

[12] 彭宇辉, 潘时中. 警惕低血糖[J]. 医学综述, 2007, 13 (12): 916.

[13] Steil GM, Rebrin K, Mastmottaro J, et al. Determination of plasma glucose during rapid glucose excursion with a subcutaneous glucosesensor[J]. Diabetes Technol Ther, 2003, 5(1): 27-31.

(收稿日期: 2011-12-01)

(上接第 1154 页)

析的发展趋势[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(1): 5-7.

[4] 黄山, 郑金鼎. 流式微球分析技术检测人心肌钙蛋白 T 方法的建立[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(4): 659-661.

[5] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 53-58.

[6] 黄山, 许健, 令狐颖, 等. 流式细胞术检测 VCAM-1 的方法学性能评价[J]. 贵州医药, 2010, 34(10): 871-873.

[7] 谭爱华. ELISA 法检测中应注意的问题[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(19): 2496-2497.

[8] 张玉霞, 周杰钊. 浅谈 ELISA 的影响因素[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(18): 32.

[9] 田禾, 黄山, 许健, 等. 流式微球分析技术检测人心肌钙蛋白 T 的方法学性能评价[J]. 贵州医药, 2010, 34(9): 771-773.

[10] 吴亚玲, 励晓涛, 祝宏, 等. 液相芯片技术检测乙型肝炎病毒表面抗原[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(5): 378-381.

(收稿日期: 2011-12-21)