

## 论著·临床研究

## 可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1 荧光免疫层析法检测的临床性能评估

苏倩,管世鹤,张好<sup>△</sup>,周强,范懿隽,付娟娟,傅柳陶,黄才敏,

陆义红,张丽丽,张婉莹,储雯雯,韦玉,吴园园

(安徽医科大学第二附属医院,安徽合肥 230601)

**摘要:**目的 评估荧光免疫层析法的可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1(sFlt-1)检测试剂盒的临床性能。方法 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP6-A、EP7-A、EP15-A 文件对试剂盒的精密度、线性、方法学比对等临床性能进行评估。结果 试剂盒的高浓度和低浓度样本的变异系数(CV)分别为 3.63% 和 5.92%;线性为 40~85 000 pg/mL;与电化学发光法试剂盒对比结果显示,相关性  $r$  为 0.985,总体符合率为 96.71%。结论 荧光免疫层析法的 sFlt-1 检测试剂盒的精密度、线性、方法学比对等临床性能评价较好,满足临床应用的需求。

**关键词:**可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1; 荧光免疫层析法; 子痫前期**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.18.014 **中图法分类号:**R446.11**文章编号:**1673-4130(2019)18-2230-04**文献标识码:**A**Performance evaluation of soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1 assay by fluorescence-based lateral flow**

SU Qian, GUAN Shihe, ZHANG Yu<sup>△</sup>, ZHOU Qiang, FAN Yijun, FU Juanjuan, FU Liutao, HUANG Caimin, LU Yihong, ZHANG Lili, ZHANG Wanying, CHU Wenwen, WEI Yu, WU Yuanyuan  
(The Second Hospital of Anhui Medical University, HeFei, AnHui 230601, China)

**Abstract: Objective** To evaluate performance of the fluorescence-based lateral flow kit for sFlt-1 in pregnant women serum. **Methods** According to the Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) EP5-A, EP6-A, EP7-A, EP15-A, to evaluate the performance of the repeatability, linearity, and methodology comparison of the kit. **Results** The coefficients of variation(CV) of high and low concentration samples were 3.63% and 5.92%. Linearity was between 40 to 85 000 pg/mL. Compared with the Roche sFlt-1 kit(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA), correlation coefficient ( $r$ ) was 0.985, total consistency of the two diagnostic kit was 96.71%. **Conclusion** The fluorescence-based lateral flow sFlt-1 kit has good performance in precision, linearity, and methodology comparison, and matches the clinical requirement.

**Key words:**soluble fms-like tyrosine kinase receptor 1; fluorescence-based lateral flow; pre-eclampsia

孕妇血清中的可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1(sFlt-1)属于Ⅲ型受体酪氨酸激酶家族,分子量约为 63.6kD<sup>[1]</sup>;由细胞外区 1~6 个免疫球蛋白样结构域构成,不含酪氨酸激酶域,编码区与 fms 样酪氨酸激酶-1(Flt-1)的胞外区完全一致,能与膜表面受体竞争结合血管内皮生长因子(VEGF)。最初于类脐静脉内细胞上被发现 sFlt-1 作为 VEGF 和胎盘生长因子(PLGF)的直接抑制物,血清水平升高则可导致胎盘滋养细胞及血管生长不良,从而导致内细胞损伤。sFlt-1 主要通过与 VEGF 和 PLGF 结合,介导 VEGF 和 PLGF 的生物学功能,参与血管的形成、重塑和再植等作用。因而,sFlt-1 与子痫前期的预测已成为研究焦点<sup>[2]</sup>。sFlt-1 与 PLGF 是首个经过大规模临床试验验证的、可用于孕妇子痫前期预测及诊断的生化标志

物<sup>[3]</sup>,血清 sFlt-1 与 PLGF 浓度的变化与孕妇罹患子痫前期的风险密切相关。目前,PLGF 的检测已有酶联免疫吸附(ELISA)、时间分辨荧光免疫分析(TR-FIA)、微流控(Microfluidics)、电化学发光法(ECL)<sup>[4-5]</sup>等报道;而 sFlt-1 的检测报道较少,主要是罗氏的电化学发光法。考虑到荧光免疫层析技术成本低,准确性高,操作简便、快速,可实现随到随诊,方便临床应用,具有较高的临床应用价值,本研究对荧光免疫层析法的 sFlt-1 检测试剂盒进行分析性能评价,以了解该试剂盒是否满足临床应用的需求。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 收集 2018 年 2—9 月来本院就诊的孕妇(年龄:18~45 岁、孕周:20~34<sup>+6</sup> 周),共 152 例;经检测血清 sFlt-1 浓度覆盖待评估试剂盒的线性

**作者简介:**苏倩,女,主治医师,主要从事妇产科与临床检验相关的研究。 **△ 通信作者:**E-mail:25799514@qq.com。

**本文引用格式:**苏倩,管世鹤,张好,等.可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1 荧光免疫层析法检测的临床性能评估[J].国际检验医学杂志,2019,40(18):2230-2233.

区间 40~85 000 pg/mL;按照罗氏电化学发光分析系统的检测结果,152 例血清 sFlt-1 浓度分布为 sFlt-1 ≤3 000 pg/mL 共 97 例,>3 000 pg/mL 共 55 例(3 000 pg/mL 为 20 孕周以上的健康孕妇  $P_{95}$  百分位数的参考值)。样本来自于临床常规检测剩余血清。

**1.2 仪器与试剂** 罗氏全自动化学发光免疫分析仪(cobas6000 e601)及 sFlt-1 检测试剂盒(电化学发光法,批号:23042701);荧光分析仪(广州蓝勃生物科技有限公司,AFS-1000)及 sFlt-1 检测试剂盒(荧光免疫层析法,批号:20170417-01)为江苏凯基生物技术股份有限公司产品,sFlt-1 重组蛋白采购自无锡金泰格生物科技有限公司。

**1.3 方法** sFlt-1 电化学发光法的检测,是基于钌(Ru)标记和磁微珠法的双抗体夹心的原理,检测试剂与样本中的 sFlt-1 蛋白形成“抗体-抗原”复合物,施加电压后产生发光信号,采用电化学发光分析检测信号的强度,样本中的 sFlt-1 蛋白浓度成正相关。

sFlt-1 荧光免疫层析法的检测,同样是基于双抗体夹心法的原理,将鼠抗人 sFlt-1 抗体作为标记抗体(用荧光微球标记),另一鼠抗人 sFlt-1F 单克隆抗体划在载体膜(硝酸纤维素膜)作为检测线抗体,制备成检测卡;检测时,将 80 μL 样本加入检测卡中的样品孔中,样本中的 sFlt-1 蛋白首先与荧光微球标记的抗体结合,然后经过载体膜的层析泳动作用,再被检测线上的鼠抗人 sFlt-1 单克隆抗体吸附;加样 15 min 后通过荧光分析仪检测对应条带的荧光强度,结合标准曲线,计算出样本中 sFlt-1 的浓度。

参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)EP5-A、EP6-A、EP7-A、EP15-A 文件<sup>[6-9]</sup>要求,以罗氏的 sFlt-1 电化学发光试剂盒的检测结果为准,对 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒的分析性能进行评价,具体方法如下。

**1.3.1 空白限** 荧光免疫层析法检测试剂盒用零浓度质控品作为样本进行检测,重复测定 20 次,得出 20 次测量结果的信号值;根据荧光免疫层析检测试剂盒所用定标曲线方程,将  $\bar{x}+2s$  所对应的信号值代入上述方程中,求出对应的浓度值;计算其平均值( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ ),得出  $\bar{x}+2s$  所对应的浓度值,即为空白限。

**1.3.2 精密度** 以罗氏的 sFlt-1 电化学发光试剂盒的检测结果为准,选取 500.0 pg/mL 左右及 5 000 pg/mL 的样本作为测试样本;荧光免疫层析法检测试剂盒用上述样本各重复检测 20 次,计算 20 次测量结果的  $\bar{x}$  和  $s$ ,根据以下公式计算变异系数( $CV$ )。 $CV=s/\bar{x} \times 100\%$ 。

**1.3.3 线性范围** 收集高值样本(H,即线性范围上限)和低值样本(L,即线性范围下限),样本无溶血、脂血及黄疸等干扰因素;将 H 与 L 按照 0:10、1:9、2:8……9:1、10:0 的比例混合,形成 11 个水平浓度系列测试样本;每个浓度样本测试 4 次,记录测定结

果并计算  $\bar{x}$ ;以测定的  $\bar{x}$  为实测值,与所计算的理论值进行比较;并作直线回归分析对数据进行处理,计算回归方程。

**1.3.4 回收实验** 将高浓度的 sFlt-1 质控品 A(10 μL)分别加入到基质 B(100 μL)中,各测试 1 次,计算回收率 R,应在 85%~115%。

**1.3.5 干扰试验** 取 sFlt-1 高值血清,分别加入不同浓度的血红蛋白、总胆红素、三酰甘油、类风湿因子、阿司匹林、维生素 C、肝素等可能的干扰物质,每个样本分别重复检测 3 次,计算  $\bar{x}$ ,并计算干扰率,干扰率(%)=(干扰样本测定浓度-基础样本测定浓度)/基础样本测定浓度×100%。

**1.3.6 方法学比对** 采用罗氏的 sFlt-1 试剂盒作为比对的参比方法。本次临床性能评价共检测样本 152 例,样本类型为血清;同一份临床样本采用本项目待评价的荧光免疫层析检测试剂盒与参比方法平行试验;考察本项目待评价的荧光免疫层析检测试剂盒与参比方法的相关性  $R^2$ ,应不低于 0.950。

以罗氏的 sFlt-1 试剂盒作为比对的参比,以 3 000 pg/mL 作为临界值,计算荧光免疫层析试剂盒的临床性能指标,包括相对灵敏度、相对特异性、总体符合率等。

## 2 结 果

**2.1 空白限** 分析 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒对零浓度质控品的 20 次重复检测的数据,  $\bar{x}$  为 9.09 pg/mL,  $s$  为 0.674 pg/mL,  $\bar{x}+2s$  为 10.44 pg/mL。根据实验结果,确定 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒的空白限为≤12 pg/mL。

**2.2 精密度** 分析 20 次高值样本和低值样本的检测数据,高值样本和低值样本的检测  $\bar{x}$  分别为 555.9、5 520.0 pg/mL;  $s$  分别为 32.93、200.54 pg/mL。sFlt-1 高值样本的  $CV$  为 3.63%,低值样本的  $CV$  为 5.92%;据此,确定 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒的精密度( $CV$ )≤15%。

**2.3 线性范围** 实验结果显示, sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒的线性范围为 40~85 000 pg/mL,见表 1。将结果实测值的  $\bar{x}$  和理论值进行直线拟合,以理论值为 X 轴,以实测值的  $\bar{x}$  为 Y 轴,并计算线性相关系数  $r$ ,见图 1。

**2.4 回收实验** sFlt-1 检测显示,原始浓度和检测浓度分别为 93 540、8 617 pg/mL,计算得到 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒的回收率为 101.33%。据此确定 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒的回收率在 85%~115% 的范围内。

**2.5 干扰物质** 实验结果显示,血红蛋白等干扰物质在生理高浓度的情况下,对 sFlt-1 临床样本的干扰率均在-8%~8% 的范围内,则认为血红蛋白等干扰物质在上述浓度条件下,对本研究的 sFlt-1 测定方法没有干扰作用,见表 2。

表 1 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒线性  
研究结果 (pg/mL)

稀释比例	理论值	$\bar{x}$	实测值			
			第1次	第2次	第3次	第4次
0L+10H	89 108	90 699	89 445	90 896	91 756	90 699
1L+9H	80 199	78 545	79 170	80 817	75 647	78 545
2L+8H	71 290	71 352	71 972	70 605	71 480	71 352
3L+7H	56 139	55 386	55 978	54 714	55 466	55 386
4L+6H	42 774	41 347	42 418	40 029	41 592	41 347
5L+5H	28 070	26 600	26 584	27 094	26 122	26 600
6L+4H	17 110	17 608	17 208	17 942	17 675	17 608
7L+3H	8 421	8 335	8 222	8 323	8 459	8 335
8L+2H	3 422	3 413	3 497	3 491	3 251	3 413
9L+1H	842	838	824	865	826	838
10L+0H	16	19	18	20	19	19

注:H为高值样本,L为低值样本

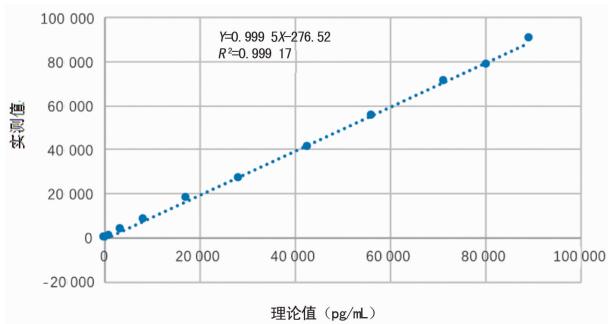


图 1 sFlt-1 荧光免疫层析法检测试剂盒的线性相关性

表 5 干扰物质对检测结果的影响(ng/mL)

干扰物质名称	浓度	原始浓度	添加后浓度	干扰率(%)
血红蛋白	3 mg/mL	43.3	41.5	-4.13
胆红素	2 mg/mL	43.3	41.8	-3.50
三酰甘油	10 mg/mL	43.3	40.0	-7.60
类风湿因子	2 200 U/mL	43.3	41.5	-4.18
维生素C	400 μg/mL	43.3	40.5	-6.44
肝素	8 U/mL	43.3	43.9	1.31
阿司匹林	10 mg/L	43.3	41.2	-4.77

**2.6 方法学比对** 方法学比对试验共检测了 152 例血清样本,荧光免疫层析法 sFlt-1 检测试剂盒每个样本测定值与相对应的罗氏电化学发光法 sFlt-1 检测试剂盒测定值作散点图,以荧光免疫层析法 sFlt-1 检测试剂盒(考核系统)作 Y 轴,罗氏电化学发光法 sFlt-1 检测试剂盒(参比系统)作 X 轴,见图 2。线性回归方程:  $Y=1.023X-76.67$ ,  $R^2=0.970 (>0.950)$ , 斜率  $b=1.023$ , 95% CI = -163.684~10.344; 截距  $a=-76.67$ , 95% CI = 0.994~1.053; 两个系统之间的相关系数  $r=0.985$ , 表明两种检测方法一致性良好, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

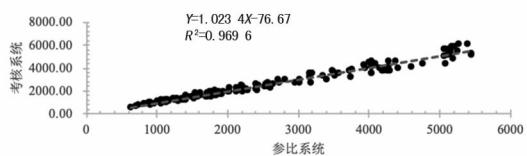


图 2 sFlt-1 回归分析

152 例样本的测定值以 3 000 pg/mL 作为临界值进行定性分析,结果显示,荧光免疫层析法 sFlt-1 检测试剂盒相对于罗氏电化学发光法 sFlt-1 检测试剂盒的检测灵敏度为 90.91%, 相对特异性为 100%, 相对总体符合率为 96.71%, 见表 6。

表 6 以 3 000 pg/mL 为临界值对试剂盒检测结果的定性分析( $n$ )

荧光免疫层析法	罗氏电化学发光法		合计
	阳性	阴性	
阳性	50	0	50
阴性	5	97	102
合计	55	97	152

### 3 讨论

sFlt-1 作为子痫前期发病机制、预测和诊断的重要生物标志物<sup>[10-13]</sup>,临床应用中一直缺乏合适的检测方法,目前仅有进口的试剂盒(瑞士罗氏的电化学发光法);该试剂盒成本高,依赖大型分析设备,存在较大的普及困难。

荧光免疫层析技术是近年来兴起的一种快速免疫学检测方法<sup>[14-15]</sup>,灵敏度高,操作便捷,综合成本低,适合在临床科室进行现场检测,同时也是检验科的一种重要辅助技术手段,适用于检测量不大的项目,节省成本,提高工作效率。

本研究评估了基于荧光免疫层析技术建立的血清中 sFlt-1 的检测试剂盒,包括依据 CLSI 的 EP5-A、EP6-A、EP7-A、EP15-A 等规范性文件,对荧光免疫层析检测试剂盒的分析性能,包括:空白限、回收实验、线性范围、精密度和干扰试验,进行了验证:空白限  $\leqslant 12 \text{ pg/mL}$ ,而线性范围为  $40\sim85\,000 \text{ pg/mL}$ ,两项技术参数达到了临床应用的要求;采用回收率作为回收实验评价的方法,经检测,回收率为 101.33%;荧光免疫层析检测试剂盒的精密度(CV):高值样本为 3.63%,低值样本为 5.92%,均符合荧光免疫层析检测试剂盒的技术要求;最后通过加入血红蛋白、类风湿因子等常见的干扰物质,证实在生理高浓度的情况下,不会对 sFlt-1 的检测结果造成干扰。最后,通过 152 例的临床样本,与罗氏的电化学发光法试剂盒进行对比研究,实验结果证实,本项目待评价的荧光免疫层析检测试剂盒与电化学发光法的符合率高,检测结果的相关性为 0.985 ( $>0.950$ ),证实本项目的 sFlt-1 荧光免疫层析检测试剂盒与电化学发光法试剂

盒具有良好的一致性。

## 4 结 论

本研究对基于荧光免疫层析技术的 sFlt-1 检测试剂盒的临床性能,如,精密度、线性范围、方法学比对等,进行了全面评估,证实其均能达到临床应用的需求,具有重要的临床意义。

## 参考文献

- [1] MCKEEGAN G C, ARDILL J E, CALDWELL C M, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop [J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 191(4): 1240-1246.
- [2] 杨铧琦,蒋红.子痫前期患者血清 FN 及 sFlt-1 的水平及临床意义研究[J].医学研究杂志,2016,6(1):175-180.
- [3] ZEISLER H, LLURBA E, CHANTRAYE F, et al. Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia[J]. N Engl J Med, 2016, 374(1): 13-22.
- [4] KNUDSEN U B, KRONBORG C S, VON DAELSEN P A, et al. A single rapid point-of-care placental growth factor determination as an aid in the diagnosis of preeclampsia[J]. Pregnancy Hypertens, 2012, 2(1): 8-15.
- [5] ULLA S, FRANCESCA G, EMMA C, et al. Prediction of preeclampsia using the soluble fms-Like tyrosine kinase 1 to placental growth factor ratio[J]. Hypertension, 2017, 69(4): 731-738.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices: EP5-A[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2004.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach: EP6-A [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry: EP7-A [S]. Wayne, PA: CLSI, 2005.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory. User demonstration of performance for precision and accuracy: EP15-A [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2001.
- [10] LEVINE R J, MAYNARD S E, QIAN C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia[J]. N Engl J Med, 2004, 350(7): 672-683.
- [11] 张展,李鹤,张琳琳.胎盘因素、免疫因素、血管因素与子痫前期发病机制相关性探讨[J].临床检验杂志,2012,30(10):813-816.
- [12] 贾冬丽,方丽丽,司晓辉.血清 PDGF-BB、PIGF 和 sFlt-1 水平检测在预测子痫前期发生中的意义[J].安徽医药,2018,22(4):685-688.
- [13] 杨铧琦,卢宗杰.子痫前期患者血清可溶性 Endoglin 及可溶性 Fms 样酪氨酸激酶-1 水平及其临床意义[J].华西医学,2017,32(7):1000-1005.
- [14] 李阳,王云龙.免疫层析技术的研究进展[J].中国卫生检验杂志,2015,25(22):3978-3980.
- [15] 谢雪钦.免疫层析试纸条标记探针研究进展[J].食品安全质量检测学报,2014,5(7):2138-2145.

(收稿日期:2019-01-14 修回日期:2019-03-06)

(上接第 2229 页)

- 神科杂志,2001,34(3):184-188.
- [5] 周亚楠,翟金国,陈敏.首发精神分裂症精神病未治期对认知功能和社会功能的影响[J].中国神经精神疾病杂志,2018,44(1):41-46.
- [6] 赵晶,全亚萍,陈园桃.广泛性焦虑症中医药研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(4):210-212.
- [7] 刘军,姚晓燕,李珊珊,等.针灸治疗广泛性焦虑症临床思路探讨[J].中国中医药信息杂志,2016,23(11):107-109.
- [8] 钟书铭,肖垚南,陈妙扬,等.云浮市广泛性焦虑障碍流行病学调查[J].海南医学,2015,26(1):135-136.
- [9] REEVES J W, FISHER A J, NEWMAN M G, et al. Sympathetic and hypothalamic-pituitary-adrenal asymmetry in generalized anxiety disorder [J]. Psychophysiol, 2016, 53(6): 951-957.
- [10] 周晓莉,饶一武.应激状态下患者下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的变化[J].医学综述,2014,20(13):2439-2440.
- [11] 陈力,薛瑞,于能江,等.小补心汤总黄酮对获得性无助小鼠的抗抑郁作用及其对 HPA 轴功能的影响[J].中国药理学通报,2015,31(6):815-821.
- [12] 张敏,谭利军,谷伟,等.抑郁症患者血清甲状腺激素相关

因素分析[J].精神医学杂志,2014,27(1):27-29.

- [13] 陈淑燕,谢稚鹃,黄薛冰,等.集体认知行为治疗对广泛性焦虑障碍疗效的随机对照研究[J].中国心理卫生杂志,2017,31(3):177-182.
- [14] BECKER E S, RINCK M, MARGRAF J, et al. The emotional Stroop effect in anxiety disorders: General emotionality or disorder specificity[J]. J Anxiety Disord, 2001, 15(3): 147-159.
- [15] 李鸿磊,王纯,滕昌军,等.广泛性焦虑障碍患者认知监控网络异常的功能磁共振研究[J].临床精神医学杂志,2016,26(5):299-301.
- [16] 刘梅,周海松,许锦文,等.藜芦解郁胶囊的抗抑郁作用[J].中成药,2016,38(6):1383-1387.
- [17] 郭艳娥,王盼,周波,等.阿尔茨海默病及轻度认知功能障碍患者海马及海马旁回灰质体积与认知功能的相关性[J].中华老年心脑血管病杂志,2016,18(4):339-344.
- [18] 沈翔.运动干预和运动-认知干预对大学生压力应对及心理承受力的影响[J].武汉体育学院学报,2015,49(10):76-82.

(收稿日期:2019-01-24 修回日期:2019-03-16)