

• 论 著 •

新型量子点荧光免疫层析法测定血清淀粉样蛋白 A 的应用研究

张仙娜, 玄光善[△]

青岛科技大学化工学院, 山东青岛 266042

摘要:目的 探讨新型量子点荧光免疫层析法测定血清淀粉样蛋白 A(SAA)的应用。方法 采用双抗夹心法结合量子点荧光免疫层析技术制备以二硝基苯酚(DNP)-牛血清白蛋白(BSA)系统为质控线的 SAA 检测试剂盒。通过鸡 IgY-羊抗鸡 IgY 系统作为对照评价了 DNP-BSA 系统作为质控线的可行性,并通过优化量子点微球与抗体的偶联条件,进一步提高试剂盒的性能,并对试剂盒的空白限、检出限、线性范围、精密度、准确度、特异度、稳定性,以及临床实际样本测定等方面进行了评价。结果 以 DNP-BSA 系统作为质控线的 SAA 试剂盒受干扰成分浓度的影响小,稳定性高,热稳定性好。量子点微球与 SAA 抗体偶联比例为 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$,偶联反应液浓度为 25 mmol/L 3-吗啉丙磺酸 pH 7.4,与 DNP-BSA 偶联比例为 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$,偶联反应液浓度为 25 mmol/L 吗啉乙磺酸 pH 6.0 时偶联效果最佳。试剂盒最低检出限为 0.5 mg/L;线性范围为 1~200 mg/L, $R^2 \geq 0.99$;批内精密度变异系数(CV%) $\leq 5.31\%$,批间精密度 CV% $\leq 15\%$;在低、高浓度的回收率分别为 101.42%、98.83%;在血红蛋白浓度 ≤ 5 g/L,胆红素浓度 ≤ 0.15 g/L,胆固醇浓度 ≤ 15 g/L,甘油三酯浓度 10 g/L 时,SAA 的检测结果无干扰;试剂盒在 50 $^{\circ}\text{C}$ 放置 21 d,稳定性良好;试剂盒与 Roche 的 SAA 电化学发光试剂盒同步检测 67 例样本结果具有高度一致性。结论 研制的 SAA 检测试剂盒灵敏度、线性、精密度、准确度、特异度及加速稳定性都满足试剂盒的要求,与鸡 IgY-羊抗鸡 IgY 系统相比 DNP-BSA 系统作为质控线独立性好,测定临床样本准确度和热稳定性更佳。

关键词:二硝基苯酚; 牛血清白蛋白; 量子点; 荧光免疫层析; 血清淀粉样蛋白 A

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.16.017

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2024)16-2010-08

文献标志码:A

Application study of novel quantum dot fluorescence immunochromatography for the determination of serum amyloid A

ZHANG Xianna, XUAN Guangshan[△]

College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042, China

Abstract: Objective To investigate the application of novel quantum dot fluorescence immunochromatography for the determination of serum amyloid A(SAA). **Methods** Using the principle of double antibody sandwich method and quantum dots fluorescence immunochromatography technology to prepare SAA detection kit with Dinitrophenol (DNP)-Bovine serum albumin (BSA) system as the control line. The feasibility of using the DNP-BSA system as a quality control line was evaluated using the chicken IgY-sheep anti-chicken IgY system as a control, and further improve the performance of the reagent kit by optimizing the coupling conditions between quantum dot microspheres and antibodies. Evaluated the blank limit, detection limit, linear range precision, accuracy, specificity, stability, as well as clinical samples determination of the kit. **Results** The SAA kit using DNP-BSA system as the quality control line was less affected by the concentration of interfering components, had high stability, and good thermal stability. The optimal coupling effect was achieved when the coupling ratio between quantum dots and SAA antibodies was 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$, and the coupling reaction solution was 25 mmol/L 3-morpholine propyl sulfonate pH 7.4, and the coupling ratio with DNP-BSA was 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and the coupling reaction solution was 25 mmol/L morpholine ethanesulfonate pH 6.0. The detection limit of SAA kit was 0.5 mg/L; the linear range was 1–200 mg/L, $R^2 \geq 0.99$; the intra assay precision variation coefficient (CV%) $\leq 5.31\%$, and the inter assay precision CV% $\leq 15\%$; the recoveries in the low, and high concentrations were 101.42% and 98.83%, respectively. When hemoglobin concentration ≤ 5 g/L, bilirubin concentration ≤ 0.15 g/L, cholesterol concentration ≤ 15 g/L, triglyceride concentration ≤ 10 g/L, SAA detection results had no interference. The stability of the kit was good when it was stored at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 21

days. The kit is highly consistent with that of Roche's SAA electrochemiluminescence kit in the simultaneous detection of 67 samples. **Conclusion** The sensitivity, linearity, precision, accuracy, specificity and accelerated stability of the SAA detection kit can meet the requirements of the kit. Compared with Chicken IgY-sheep anti-chicken IgY, DNP-BSA system has better independence as quality control line, and has better accuracy and thermal stability.

Key words: Dinitrophenol; Bovine serum albumin; quantum dot; fluorescence immunochromatography; serum amyloid A

人血清淀粉样蛋白 A(SAA)是一种急性时相反应蛋白,参与各种炎症反应,与白细胞计数、C 反应蛋白(CRP)、降钙素原等炎症因子相比在机体炎症反应前后变化非常明显^[1-2]。SAA 广泛应用于感染性疾病辅助诊断、冠心病风险预测、肿瘤患者的疗效及预后动态观察、移植排斥反应观察、类风湿性关节炎病情改善观察等方面^[3-4]。特别是 SAA 在新型冠状病毒感染中早期辅助诊断、感染轻重分型、病程进展及转归评估等方面起到了很大作用^[5-6]。目前, SAA 检测方法有电化学生物传感器法、化学发光法、免疫荧光层析法、免疫比浊法等^[7-10]。量子点作为一种新型的生物标记材料,因它具有发射波长窄而对称、极强的抗光漂白能力、较大的斯托克斯位移,较高的产率,以及很好的生物相容性等优点,进一步提高了检测的正确性和可重复性^[11-13]。目前,量子点荧光免疫层析法制备的血清淀粉样蛋白 A 检测试剂盒所采用的质控线多为羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG、鸡 IgY-羊抗鸡 IgY 系统。哺乳动物 IgG 作为质控线时,常因临床样本中含嗜异性抗体,以及和动物抗体的部分交叉反应,使得免疫反应中出现假阴或假阳的检测结果^[14]。禽类 IgY 特异度较高,但热稳定性欠佳^[15]。二硝基苯酚(DNP)是相对分子质量为 184.11 的小分子半抗原^[16], DNP-牛血清白蛋白(BSA)是 BSA 和 DNP 分子交联的复合物,可与抗 DNP 抗体在免疫层析法中作为独立质控系统使用。由于 DNP 在动植物代谢过程中不会产生,因此,此系统具有较强的抗干扰能力和稳定性。本研究利用量子点微球作为发光材料,采用荧光免疫层析技术制备以 DNP-BSA 系统为质控线的 SAA 检测试剂盒并评价其性能。

1 材料与方法

1.1 材料来源 量子点纳米球(粒径:160 nm,批号:121220XM),上海昆道生物技术有限公司;SAA 国际标准物质(冻干人血清,复溶后浓度:156 mg/L),英国国家生物制品检定所;SAA 抗原(浓度:5 mg/mL,批号:20220527)和 SAA 阴性血清,艾伟迪生物技术有限公司;SAA 包被抗体(浓度:2.72 mg/mL,批号:20220811)和 SAA 标记抗体(浓度:5.21 mg/mL,批号:20221009),北京开景基因技术有限公司;抗 DNP 抗体(浓度:5.0 mg/mL,批号:MY21M1509)和 DNP-BSA 偶联物(浓度:3.0 mg/mL,批号:AY22M1102)及人抗红细胞(RBC)抗体(浓度:11.33 mg/mL,批

号:MY21M0109),南京拂晓生物科技有限公司;鸡 IgY 抗体(浓度:8.3 mg/mL,批号:200325)和羊抗鸡 IgY 抗体(浓度:8.3 mg/mL,批号:SL500118-A),杭州索莱尔博奥生物技术有限公司;1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC·HCl,登记号:25952-53-8,货号:22980,批号:VC298292),赛默飞世尔科技公司;硝酸纤维素膜(型号:YN100B,批号:RH21Y-658),润和生物医药科技(汕头)有限公司;玻璃纤维素膜(型号:SB06,批号:20210503),上海捷宁生物科技有限公司;吸水纸(型号:CH27,批号:S021040487),上海金标生物科技有限公司。

1.2 仪器与试剂 上海金标生物科技有限公司提供 GTD300 型数控裁条机, ZQ2002 型微电脑自动斩切机, HM3030 型 XYZ 三维划膜喷金仪;杭州齐威仪器有限公司提供 WFH-203B 型暗箱式紫外分析仪;南京微测生物科技有限公司提供 MD-600 型荧光免疫层析分析仪;梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司提供 FE28 型 pH 计;赛多利斯科学仪器(北京)有限公司提供 BSA124S 型电子天平;安徽华美电器有限公司提供 HM990B 型华美工业除湿机;上海沪实业有限公司提供 Vortex-2 型旋涡混匀仪;深圳市洁盟清洗设备有限公司提供 JP-080S 型洁盟牌超声波清洗机;常州诺基仪器有限公司提供 NHWY-200 型恒温摇床;徕卡微系统有限公司提供 DM1000LED 型生物显微镜;湖南迈克实验仪器有限公司提供 TGL-16M 高速冷冻离心机;Sigma 公司提供牛血清白蛋白(BSA)、Proclin-300、吗啉乙磺酸(MES)、3-吗啉丙磺酸(MOPS)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl),其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 量子点标记抗体 100 μ L 量子点纳米球分散在 200 μ L 活化缓冲液 25 mmol/L MES pH 6.0 的溶液中,涡旋振荡混匀,显微镜下观察无聚集,加入用活化缓冲液配制为 20 g/L 的 EDC·HCl 溶液 6 μ L,振荡混匀,置于 25 $^{\circ}$ C 恒温摇床 150 r/min,活化 30 min。将活化的量子点微球分为 2 支,放入离心机 14 000 r/min 离心 20 min,移除上清液后分别加入适宜的 50 μ L 偶联缓冲液中,超声分散均匀;取适量 SAA 标记抗体,分散在 T 探针偶联缓冲液 100 μ L 中,形成 T 抗体溶液;取适量 DNP-BSA 复合物,分散在 C 探针偶

联缓冲液 100 μL 中,形成 C 抗体溶液;将活化分散后的 50 μL 量子点溶液分别分散在 T 抗体溶液和 C 抗体溶液中,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床,150 r/min 恒温孵育 2 h 偶联。将偶联产物在 10 000 r/min 离心 5 min,去除游离抗体,分别加入 100 μL 含有 2% BSA 的 pH 8.2 的 10 mmol/L 硼酸-硼砂缓冲液进行封闭,吹打混匀并充分超声分散,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床,150 r/min 下封闭 4 h。将封闭后的 T 探针和 C 探针放入离心机 10 000 r/min 离心 5 min,更换为 100 μL 的保存液,放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏柜中遮光保存,备用。

1.3.2 NC 膜包被 将 SAA 包被抗体和抗 DNP 抗体用含有 3% 蔗糖的 pH 7.4 的 10 mmol/L PBS 溶液稀释至 1 g/L,制得 T 线包被液和 C 线包被液;将 NC 膜裁切粘贴于 PVC 大板上平衡 30 min 后,将配制好的 T 线包被液和 C 线包被液以 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的包被量包被于 NC 膜上,转移至烘箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 24 h(湿度 \leq 30%)。

1.3.3 量子点标记物的固定 玻璃纤维的处理:在 pH 8.2 的 10 mmol/L 硼酸-硼砂缓冲液中加入 2% BSA、1% PEG-4000、0.05% S9(环氧丙烷-环氧乙烷-乙烯基二元胺共聚物)、6% 蔗糖及 0.2% 抗 RBC 搅拌均匀,将玻纤浸泡在上述溶液 15 min,沥干后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干 16 h(湿度 \leq 30%)后取出,放入自封袋备用。量子点标记物的固定:用探针稀释液将 T 探针和 C 探针分别稀释为 0.625 g/L 和 0.025 g/L 的溶液,并按照体积进行 1:1 混匀,制得量子点标记物喷涂溶液。使用划膜喷金仪以 3 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 进行喷涂,使其固定在已处理的玻纤上,转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 24 h(湿度 \leq 30%)得到探针结合垫。

1.3.4 试剂条组装 将吸水纸和结合垫依次粘贴在已完成 NC 膜包被的 PVC 板上,将粘贴好的 PVC 大板用数控裁条机切为 3.97 mm 宽的检测条,放入塑料卡壳中扣紧压实,制得检测试剂条见图 1。

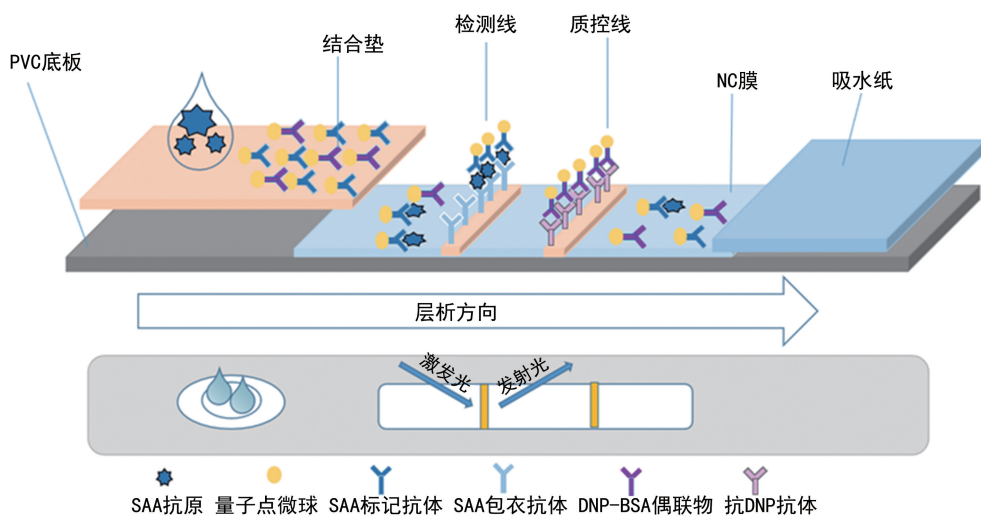


图 1 试剂条组装示意图

1.3.5 检测方法 取 5 μL 样本,用含有 1% Tween-20 和 1% BSA 的 10 mmol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液作为样本稀释液,将其稀释为 1 mL 的检测液。取 80 μL 检测液加样至试剂条的加样口,孵育 5 min 后插入荧光免疫分析仪中,经过荧光免疫分析仪的扫描,得到 T 线和 C 线荧光强度,计算 T/C 值,可定量反映出样本中的 SAA 浓度。

1.3.6 与 IgY 系统的对比试验 用量子点微球分别对 SAA 标记抗体、鸡 IgY、DNP-BSA 复合物进行标记。SAA 和鸡 IgY 作为对照组,对 SAA 包被抗体(T 线)和羊抗鸡 IgY(C 线)进行 NC 膜包被;SAA 和 DNP-BSA 复合物作为试验组,对 SAA 包被抗体(T 线)和抗 DNP 抗体(C 线)进行 NC 膜包被。对照组和实验组分别测定浓度为 1、5、10、50、100、200 mg/L 的 SAA 抗原样品,每个浓度点测定 3 个平行,得到 T 值、C 值和 T/C 值,根据 C 值平均值(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(CV%),考察不同浓度的影响;并分别置

于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下连续监测 4 周,测定上述 6 个浓度的热稳定性。

1.3.7 量子点微球与抗体偶联条件考察 分别对不同比例的 SAA 抗体对和 DNP-BSA 抗体对偶联体系进行考察。筛选最佳偶联比例。考察不同 pH 的磷酸缓冲溶液、硼砂缓冲溶液、MES 缓冲液、HEPES 缓冲液对偶联效果的影响,同时考察了缓冲溶液浓度的影响。偶联效果的考察方式为对每个实验组分别测定 SAA 抗原浓度为 0、1、5、10、50、100、200 mg/L 的样品,每个浓度点测定 3 个平行,得到 T 值、C 值和 T/C 值,T 探针根据 T 值荧光信号的高低、T/C 与 SAA 抗原梯度变化关系对其进行评价,C 探针根据 C 值荧光信号的高低 \bar{x} 、 s 、CV%及相对极差(R%)进行评价。R%公式如下所示:R%=[(最大值-最小值)/平均值 \times 100%]。

1.3.8 标准曲线的绘制 测定不同浓度的抗原,得到其 T 值、C 值及 T/C 值。3 次 T/C 值的 \bar{x} 和浓度

用四参数法进行拟合,得到标准曲线写入 IC 卡中。检测样本时,通过 IC 卡将标准曲线导入至荧光免疫分析中,仪器读取的 T/C 值代入标准曲线中,即可计算出该样本的浓度值。

1.3.9 试剂盒性能评价 空白限:采用 3 批试剂条测定零浓度的空白样本,重复测试 10 次,计算其浓度 \bar{x} 及 s ,根据统计分析,确定空白限(LoB)。检出限:将 SAA 抗原 1 mg/L 的校准品用阴性基质稀释为 0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/L 的 5 个低浓度的样本,每个浓度采用 3 批试剂条重复测定 10 次,根据统计分析,确定检出限 LoD。线性范围:在 1~260 mg/L 范围内选择 1.0、3.6、6.2、11.4、26.9、52.8、87.0、130.5、173.7、208.2、260.0 mg/L 的 11 个浓度确定线性区间。用定值后的线性区间上限浓度的高值样本(200 mg/L)和接近线性区间下限浓度的低值样本(1 mg/L)进行混合,混合成 1、10、50、100、200 mg/L 的 5 个浓度的样品。对 3 批试剂盒进行测试,每个混合后的样品测定 3 次,分别求出测定结果的均值。以样品浓度(X)为自变量,以测定结果均值(Y)为因变量求出线性回归方程,计算线性回归的相关系数(R)。精密度:选取在线性区间内的 10 mg/L 和 50 mg/L 的样品,测试 3 批两个浓度的参考品各 10 次,分别计算各测量值的平均值和标准差,并计算 $CV\%$ 、3 批 \bar{x} 及批间 $R\%$ 。准确度:将 SAA 国际标准物质稀释为 10 mg/L 和 50 mg/L 的准确度参考品,并采用 3 个批次的试剂盒对高低两个浓度的参考品各测定 3 次,计算相对偏差($B\%$)的和回收率进行分析。 $B\%$ 公式和回收率公式如下所示: $B\% = [(\text{标示值} - \text{测定值}) \div \text{标示值}] \times 100\%$;回收率($\%$) = 测定值 \div 标示值 $\times 100\%$ 。

干扰试验及特异度分析:参照美国临床实验室标准化委员会的 EP7-A2 文件进行干扰实验评价,使用自制检测试剂盒,选择 SAA 高低两个浓度水平(即 10、50 mg/L),分别检测在胆红素、血红蛋白、胆固醇、甘油三酯干扰物存在时的检测值。干扰物高值样本(5 号样本)和低值样本(1 号样本)按 3 : 1、1 : 1 和 1 : 3 混合配制成 2、3、4 号样本。上述共 5 个系列浓

度的干扰物检测样本的组成成分见表 1。

表 1 干扰成分组成

干扰物	1 号样本	2 号样本	3 号样本	4 号样本	5 号样本
血红蛋白(g/L)	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
胆红素(g/L)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20
甘油三酯(g/L)	0.00	5.00	10.00	15.00	20.00
胆固醇(g/L)	0.00	5.00	10.00	15.00	20.00

其中 1 号样本重复测定 20 次,以 1 号样本的检测 \bar{x} 为靶值 XC ,计算 $XC \pm 1.96s$,即 95% 的置信区间(CI)。2、3、4、5 号干扰物浓度的检测样本分别重复测定 5 次,分别计算这 4 种干扰物不同浓度时的检测均值。观察 2、3、4、5 号样本随着干扰物浓度的增加,检测结果均值是否超出 $XC \pm 1.96s$,如未超出 $XC \pm 1.96s$,则证明无明显干扰。加速稳定性:将试剂盒分别置于常温和 50 °C 恒温培养箱中,于第 0、7、14、21 天各取原装未开封试剂盒进行检测,每组试剂盒对 6 个浓度点重复测定 2 次,得到 T/C 值,与常温放置相比较,计算加速条件下的 $B\%$,初步评价其加速稳定性。方法学对比:选择 67 例临床样本,采用本文研制的 SAA 试剂盒与 Roche 的 SAA 电化学发光试剂盒同步检测,对检测结果进行统计分析,计算线性相关系数比较二者的相关性。

1.4 统计学处理 采用统计软件 SPSS21.0 软件、Origin pro 软件和 Excel 软件进行数据分析。每组实验重复 3 次以上,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 验证 DNP-BSA 系统性能结果 对照组(鸡 IgY-羊抗鸡 IgY 系统)和实验组(DNP-BSA 系统)一同测定结果,对照组 C 值荧光信号 \bar{x} 为 2 700, s 为 412.58, $CV\%$ 为 15.28%;实验组 C 值荧光信号 \bar{x} 为 2 866, s 为 242.51, $CV\%$ 为 8.46%。对照组和实验组置于 50 °C 加速破坏条件下连续监测 4 周结果见表 2,对照组 C 值荧光信号 \bar{x} 在 2 200~3 600,且 $CV\% \geq 15\%$;实验组 C 值荧光信号 \bar{x} 在 3 100~3 200,且 $CV\% \leq 10\%$ 。

表 2 50 °C 两组试剂盒热储稳定性结果

组别	第 1 周		第 2 周		第 3 周		第 4 周	
	\bar{x}	$CV\%$	\bar{x}	$CV\%$	\bar{x}	$CV\%$	\bar{x}	$CV\%$
对照组	3 616.57	15.69	2 577.79	16.49	2 254.50	21.23	2 839.00	17.97
实验组	3 180.50	4.72	3 197.29	9.76	3 131.29	8.77	3 106.07	9.03

2.2 量子点微球与抗体偶联条件考察结果 量子点微球:SAA 抗体的偶联比例为 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 时,T/C 值与 SAA 抗原具有较好的梯度变化关系,倍比最好,且线性范围最宽。见图 2。

量子点微球与 DNP-BSA 复合物随着偶联比例升高,C 值荧光信号值升高,但偶联比例 $\geq 150 \mu\text{g}/\text{mg}$ 时,C 值荧光信号值不再升高,因抗体过量在显微镜下观察发现探针聚集严重,很难超声分散均匀。因

此, C 探针最佳偶联比例为 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 见表 3。当 T 探针偶联缓冲液为 MOPS pH 7.4 时, T 值荧光信号最高值最高, 偶联效果最好; C 探针偶联缓冲液为 MES pH 6.0 时, C 值荧光信号值最高且 CV% 较低, 见图 3。

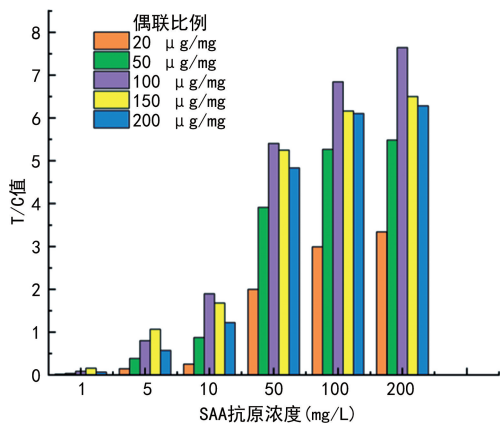


图 2 T 探针偶联比例考察结果

表 3 C 探针偶联比例考察

偶联比例	\bar{x}	s	CV%	R%
20 $\mu\text{g}/\text{mg}$	769	59	7.72	27
50 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1 290	87	6.76	24
100 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2 141	159	7.44	23
150 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2 474	365	14.76	61
200 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2 223	428	13.27	41

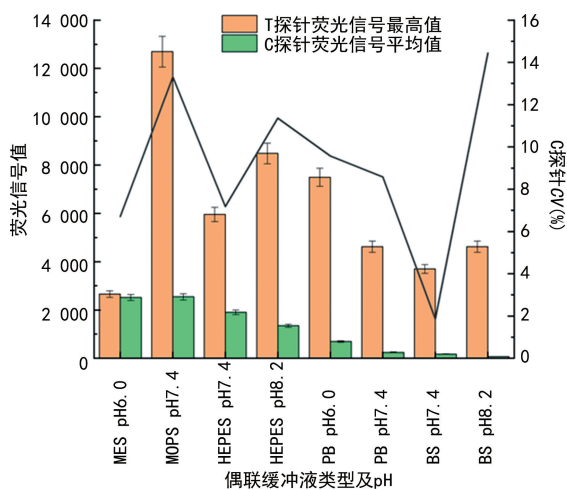


图 3 偶联液类型和 pH 考察结果

随着偶联液离子浓度升高, T 值和 C 值荧光信号最高值越来越高, 但当离子浓度超过 25 mmol/L 时, T 值荧光信号最高值和 C 值平均值不再升高(见图 4), 并且离子浓度 ≥ 35 mmol/L 时, T 探针和 C 探针在显微镜下观察聚集严重, 多次重复试验发现离子浓度过高会导致重复性变差, 因此最终选择 25 mmol/L MOPS pH 7.4 作为 T 探针偶联液, 选择 25 mmol/L MES pH 6.0 作为 C 探针偶联液。

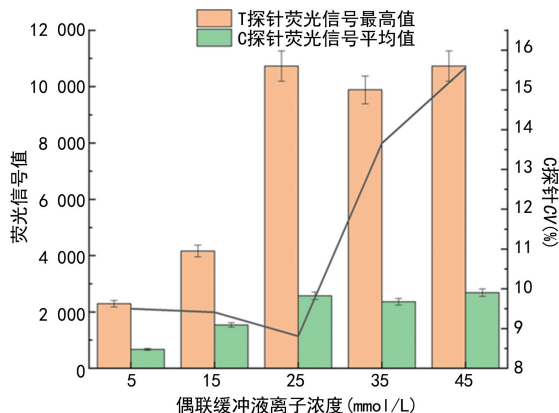


图 4 偶联液离子浓度考察结果

偶联液考察结果, T 探针偶联比例为 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 偶联反应液为 25 mmol/L MOPS pH 7.4; C 探针偶联比例为 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 偶联反应液为 25 mmol/L MES pH 6.0 时偶联效果最佳。

2.3 标准曲线的绘制 标准曲线见图 5, 曲线拟合方程为 $Y = -0.000 2X^2 + 0.082 1X - 0.035 3$, $R = 0.999 9$ 。

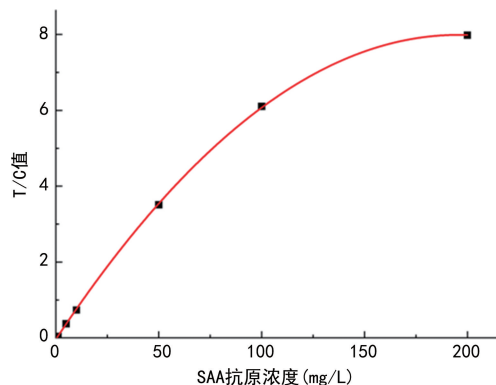


图 5 标准曲线绘制结果

2.4 试剂盒性能分析结果

2.4.1 空白限及检出限结果 测定空白限结果属于正态分布, 浓度为 (0.198 ± 0.042) mg/L, 故空白限 LoB 可确定为 0.282 mg/L。对 5 个低浓度样本检测结果见表 4, 对标定浓度为 0.5 mg/L 的样品连续重复测定结果, B% 在 $\pm 10\%$ 内, 且 $CV\% \leq 15\%$, 故检出限 LoD 为 0.5 mg/L。

表 4 试剂盒检出限测定结果

标示值(mg/L)	\bar{x} (mg/L)	s(mg/L)	CV%	B%
0.1	0.079	0.053	67.09	21.17
0.2	0.237	0.105	44.43	18.43
0.3	0.320	0.065	20.31	6.69
0.4	0.371	0.075	20.15	7.18
0.5	0.465	0.065	13.94	7.03

2.4.2 线性区间的建立及验证结果 线性区间加宽至 130% (1~260 mg/L) 测定 3 次的 Y 为 1.02、3.44、6.54、11.49、28.32、52.62、89.35、124.53、

180.75、206.09、264.74 mg/L, 线性方程 $Y = 1.0095X - 0.1405, R = 0.9994$ 。此结果确定了 SAA 的线性区间为 1~200 mg/L, 并进行线性区间的验证。对 3 批次的试剂盒验证线性区间的结果分别为 $Y = 1.0226X + 3.0882, R = 0.9973$; $Y = 0.9622X - 0.7006, R = 0.9977$; $Y = 0.9758X + 4.0813, R = 0.9985$ 。其结果可知, SAA 试剂盒的线性区间内, $R \geq 0.9900$ 。

2.4.3 精密度 对 SAA 检测试剂盒对低浓度(10 mg/L)水平样品检测结果, 浓度为 (10.27 ± 0.53) mg/L, CV% 为 5.31%、批间 R% 为 14.85%; 对高浓度(50 mg/L)水平样品检测结果, 浓度为 (54.06 ± 2.25) mg/L, CV% 为 4.17%、批间 R% 为 14.74%; 3 批试剂盒 CV% $\leq 10\%$ 、批间 R% $\leq 15\%$, 表明试剂精密密度较好。

2.4.4 准确度 3 批 SAA 试剂盒对高低两个浓度点的 B% 的 \bar{x} 均在 $\pm 15\%$, 且回收率均在 95% 及以上, 最低为 95.26%, 最高 105.91%, 平均回收率为 100.12%, 表明本文研制的试剂盒测值准确。见表 5。

表 5 回收率测定结果

浓度	批次	\bar{x} (mg/L)	B%	回收率(%)
低浓度 10 mg/L	第 1 批	9.770	-2.30	97.70
	第 2 批	10.395	-12.65	103.95
	第 3 批	10.261	2.61	102.61
高浓度 50 mg/L	第 1 批	47.765	-4.68	95.32
	第 2 批	52.953	-0.09	105.91
	第 3 批	47.628	-4.74	95.26

2.4.5 干扰试验及分析特异性 SAA 浓度为 10 mg/L 时, 测定 1 号样本重复测定 20 次的浓度为 (10.150 ± 0.419) mg/L, 即 $XC \pm 1.96s$ 为 (10.150 ± 0.821) mg/L; SAA 浓度为 50 mg/L 时, 测定 1 号样本重复测定 20 次的浓度为 (49.567 ± 2.604) mg/L,

即 $XC \pm 1.96s$ 为 (49.567 ± 5.104) mg/L。在血红蛋白浓度 ≤ 5 g/L, 胆红素浓度 ≤ 0.15 g/L, 胆固醇浓度 ≤ 10 g/L, 甘油三酯浓度 15 g/L 时, SAA 的检测结果未超出规定范围, 见表 6。

2.4.6 加速稳定性 常温放置和 50 °C 放置 21 d 的 B% 均不高于 $\pm 15\%$, 表明试剂盒具有较好的稳定性。见表 7。

2.4.7 临床性能验证 采用本文研制的 SAA 试剂盒与 Roche 的 SAA 电化学发光试剂盒同步检测 67 例临床样本结果, 见图 6, 线性拟合回归方程为 $Y = 1.0062X - 5.0026, R^2 = 0.9708, R = 0.9853$, 表明两种试剂盒具有较好的相关性。

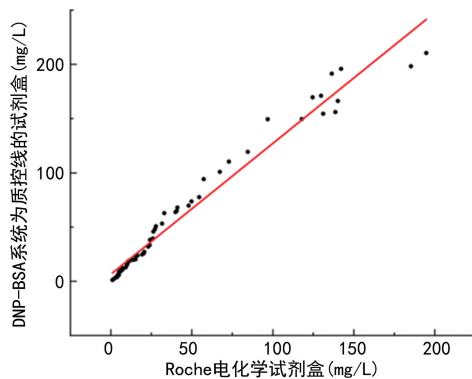


图 6 两种测试结果线性相关性图

表 6 不同样本干扰实验结果

干扰物	偏差	2号样本	3号样本	4号样本	5号样本
血红蛋白	与低浓度 XC 偏差	0.102	0.465	2.101	1.428
	与高浓度 XC 偏差	2.820	-4.843	-1.861	8.003
胆红素	与低浓度 XC 偏差	-0.144	0.499	0.571	0.494
	与高浓度 XC 偏差	1.586	3.227	3.414	11.776
甘油三酯	与低浓度 XC 偏差	0.391	0.382	0.280	-1.419
	与高浓度 XC 偏差	1.502	1.314	-5.071	-6.552
胆固醇	与低浓度 XC 偏差	0.484	0.795	-0.919	0.984
	与高浓度 XC 偏差	0.306	1.122	7.667	12.776

表 7 试剂盒加速稳定性试验结果

浓度(mg/L)	0 d 起始 T/C	7 d			14 d			21 d		
		常温 T/C	高温 T/C	B%	常温 T/C	高温 T/C	B%	常温 T/C	高温 T/C	B%
1	0.068	0.060	0.058	-3.16	0.063	0.059	-6.51	0.062	0.063	0.64
5	0.590	0.544	0.507	-6.66	0.526	0.509	-3.25	0.524	0.527	0.65
10	1.034	0.969	0.960	-0.92	0.968	0.932	-3.74	0.902	0.963	6.75
50	3.472	3.394	3.334	-1.79	3.081	3.257	5.71	2.984	2.974	-0.33
100	5.079	5.461	5.421	-0.72	4.381	4.437	1.29	4.912	4.707	-4.17
200	6.300	6.046	6.021	-0.42	5.553	5.422	-2.35	6.145	5.799	-5.64

3 讨论

感染性疾病一直是全球公共卫生关注的重要焦点问题, 且往往伴随着较高的病死率^[17]。尤其是对于

临床症状不典型, 发展迅速, 危害较大的重症感染患者早期诊断显得尤为重要。新冠疫情过后, 对于细菌感染还是病毒感染的辨别要求急剧上升。SAA 相比

于临床应用最广泛的 CRP 对病毒性感染反应灵敏度更佳,特别是在流感患者早期诊断中具有高诊断价值^[18]。目前,临床上采用胶体金法、酶联免疫吸附试验、免疫比浊法、免疫荧光层析法、化学发光法检测 SAA。胶体金法只能给出定性或者半定量的结果,酶联免疫吸附试验灵敏度低,线性范围窄,免疫比浊法无法兼顾灵敏度和线性,化学发光法试剂造价高,不适用于基层或社区医疗机构床旁快速检测。荧光免疫层析法因其操作简单、灵敏度高、特异度强、线性范围宽、方便携带等优点,使其非常适用于在基层医疗机构广泛推广使用^[19]。

本研究选用了荧光强度高、稳定性好,抗漂白能力强的量子点作为标记物,并在质控线的选择上选用了 DNP-BSA 系统,进一步提升了试剂盒的性能。与吴萌等^[4]以时间分辨微球为标记物,以鸡 IgY-羊抗鸡 IgY 系统作为质控系统建立的 SAA 荧光免疫层析试剂盒相比,本文研制的试剂盒不仅显著提高了试剂盒的稳定性,即从 37 °C 放置 14 d 后 B% 的为 ±24.5%,提升至 50 °C 放置 21 d 的 B% 最高值为 ±7%,也大幅提升了试剂盒的灵敏度和特异度。数据结果表明,DNP-BSA 系统比鸡 IgY-羊抗鸡 IgY 系统受浓度影响更小,稳定性更好,DNP-BSA 系统作为质控线比鸡 IgY-羊抗鸡 IgY 系统热稳定性更好。对于定量检测的试剂条,质控线的稳定关乎着试剂条的特异度和稳定性。SAA 正常值一般是 2.33 mg/L,说明有充分的分辨能力。通过多次实验研究发现,DNP-BSA 系统在测定不同浓度的样品时,表现出优异的质控性能,主要是因为 DNP 本身没有诱导免疫应答的能力,不与样本中的干扰物质如嗜异性抗体、人抗动物抗体等产生非特异性反应,因此,试剂条的特异度也得到了极大的改善。这一举措,成功为后续制备其他项目的荧光免疫层析试剂盒提供了新的选择,也初步为试剂盒延长有效期提供了有力依据。

除了上述所用的生物材料以外,微球和抗体的偶联方法也对试剂条的性能也产生较大影响。偶联缓冲体系不合适会导致探针聚集或沉淀,这不仅会影响试剂条的灵敏度和线性范围,也会因为探针释放不完全而影响试剂条的检出限和稳定性。因此本文通过考察量子点标记抗体的偶联比例、缓冲溶液的种类、pH 和离子浓度确定了 SAA 标记抗体和 DNP-BSA 最适用的偶联缓冲条件。在最佳条件下制备的 SAA 检测试剂盒线性范围宽(1~200 mg/L),回收率为 95.26%~105.91%,重复性 CV% ≤ 5.31%,较 SUPI-ANTO 等^[20]建立的血清淀粉样蛋白 A 免疫层析法的回收率 90.98%~109.17% 和重复性 CV% < 8.46% 好。通过与罗氏的 SAA 电化学方法比较同步测定了 67 例临床全血样本,其结果验证了本文研制的自制检测试剂盒和参比试剂具有高度一致性。考虑到本方法验证的临床样本数量有限,后期需要大量样本重复

验证。

成功开发了以 DNP-BSA 系统为质控线的血清 SAA 量子点荧光免疫层析法试剂盒。实验结果表明本方法准确度和灵敏度高,重复性好,热稳定性和抗干扰能力强,为血清淀粉样蛋白 A 的快速检测提供了一种可靠、高效的方法,对临床诊断和治疗具有一定的意义。

参考文献

- [1] DUODUO Q, JIA L, LIHUA Z, et al. Association of serum amyloid A and prognosis in people with diabetes and COVID-19: a retrospective cohort study[J]. J Diabetes Investig, 2023, 15(1): 44-51.
- [2] 钱玉萍, 刘光辉, 赵钰玮, 等. 血小板/淋巴细胞比值联合血清降钙素原及淀粉样蛋白 A 检测在新生儿坏死性小肠结肠炎中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(3): 2561-2568.
- [3] 冉绍云, 余秉贤, 王一童. 降钙素原、C 反应蛋白与血浆游离 DNA 联合检测在烧伤患者脓毒症早期诊断中的价值探究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2023, 44(24): 2341-2344.
- [4] 吴萌, 魏治静. 人血清淀粉样蛋白 A 荧光免疫层析检测试剂盒的研制[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(14): 2170-2173.
- [5] LI H, XIANG X, REN H, et al. Serum amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus disease and poor prognosis [J]. Infect, 2020, 80(6): 646-655.
- [6] 于仁峰, 邹小仓, 邹大阳, 等. 基于量子点标记技术的免疫层析法检测新型冠状病毒 N 蛋白 IgG 抗体研究[J]. 中国全科医学, 2022, 25(14): 1741-1749.
- [7] BALAYAN S, CHAUHAN N, CHANDRA R, et al. Molecular imprinting based electrochemical biosensor for identification of serum amyloid A (SAA), a neonatal sepsis biomarker [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 195(1): 589-597.
- [8] TANG J S, WU L L, LIN J T, et al. Development of quantum dot-based fluorescednse lateral flow immunoassay strip for rapid and quantitative detection of serum inter-leukin-6[J]. Clin Lab Anal, 2021, 35(5): 23752.
- [9] ZHANG F Y, LIU B, ZHANG Y, et al. Application of CdTe/CdS/ZnS quantum dot in immunoassay for aflatoxin B1 and molecular modeling of antibody recognition[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1047(1): 139-149.
- [10] 宁兴旺, 苏敏, 钱纯, 等. PCT 和 SAA 检测在学龄前儿童早期细菌性感染中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(8): 925-928.
- [11] LV Y, XU H, WU R, et al. A quantum dot microspheres-based highly specific and sensitive three-dimensional microarray for multiplexed detection of inflammatory factors[J]. Nanotechnology, 2021, 32(48): 485101.
- [12] LIU J, WANG B, HUANG H, et al. Quantitative ciprofloxacin on-site rapid detections using quantum dot microsphere based immuno-chromatographic test strips [J]. Food Chem, 2021, 335(1): 127596.
- [13] 段宏. 量子点荧光微球在免疫层析方法中的应用研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019. (下转第 2022 页)

• 论 著 •

2022—2023 年上海某医学中心儿童流感流行病学分析

郑建新, 沈蕙颖[#], 丁 苗, 程 娟[△]

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心检验科, 上海 200127

摘要:目的 分析 2022—2023 年上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心收治的流感患者感染甲型、乙型流感病毒的状况, 及时为该地区的流感防控措施的调整提供科学依据。方法 分析研究对象甲型、乙型流感病毒抗原、核酸检测阳性情况, 明确 2022—2023 年流感流行情况及优势类型。分别通过抗原检测法和核酸检测法分析 2023 年甲型流感病毒感染高峰, 并比较不同性别、年龄患者甲型流感病毒的两种方法检测的阳性率。结果 2022、2023 年流感病毒抗原检测阳性患者中, 以甲型流感病毒感染患者为主。男性患者与女性患者甲型流感病毒抗原、核酸检测阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。不同年龄患者甲型流感病毒抗原、核酸检测阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与其他年龄段比较, $> 5 \sim 10$ 岁患者甲型流感病毒抗原、核酸检测阳性率最高。2023 年 2—12 月甲型流感病毒核酸检测阳性率 (50.91%) 明显高于甲型流感病毒抗原检测阳性率 (28.73%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 2022 年该地区未形成流感病毒感染高峰, 2023 年有 2 次甲型流感病毒感染高峰, 甲型流感病毒抗原及核酸检测阳性率因检测方法的不同而有所差异。

关键词: 甲型流感; 乙型流感; 流感病毒; 儿童

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.16.018

中图法分类号: R181.3; R725.1

文章编号: 1673-4130(2024)16-2017-06

文献标志码: A

Epidemiological analysis of pediatric influenza in a medical center in Shanghai from 2022 to 2023

ZHENG Jianxin, SHEN Huiying[#], DING Miao, CHENG Juan[△]

Department of Clinical Laboratory, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Abstract: **Objective** To analyze the status of influenza A and B virus infection in patients admitted to Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine from 2022 to 2023, and to provide scientific basis for the adjustment of influenza prevention and control measures in this area. **Methods** The positive status of influenza A and B virus antigen and nucleic acid were analyzed to determine the prevalence and dominant types of influenza in 2022—2023. The peak of influenza A virus infection in 2023 was analyzed by antigen detection and nucleic acid detection, and the positive rates of influenza A virus detection in patients with different genders and ages were compared. **Results** In 2022 and 2023, the majority of patients were infected with influenza A virus. There was no significant difference in the positive rate of influenza A virus antigen and nucleic acid detection between male and female patients ($P > 0.05$). The positive rates of influenza A virus antigen and nucleic acid detection in patients of different ages were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with other age range, the positive rate of influenza A virus antigen and nucleic acid detection was the highest in patients $> 5 \sim 10$ years old. From February to December 2023, the positive rate of influenza A virus nucleic acid detection (50.91%) was significantly higher than that of influenza A virus antigen detection (28.73%), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** There is no influenza virus infection peak in 2022, and there are two influenza A virus infection peaks in 2023. The positive rates of influenza A virus antigen and nucleic acid detection are different due to different detection methods.

Key words: influenza A; influenza B; influenza virus; children

流感是一种急性呼吸道传染病, 属于丙类传染病, 致病源为流感病毒, 是一种 RNA 病毒, 根据核蛋

白和基质蛋白的差异, 被分为甲、乙、丙、丁四型, 一般容易引起季节性流行的是甲型流感病毒和乙型流感

作者简介: 郑建新, 女, 主管技师, 主要从事临床基础检验研究。

[#] 共同第一作者: 沈蕙颖, 女, 主管技师, 主要从事临床基础检验研究。[△] 通信作者, E-mail: lwlppq@126.com。