

· 基础研究 ·

胎盘生长因子荧光免疫层析法检测的临床性能评估

马锦琪¹, 李 鹰¹, 黄建荣², 薛一峰², 许亚丰², 王春新^{2*}¹南京医科大学附属无锡人民医院产科, ²医学检验科, 江苏 无锡 214023

[摘要] 目的:建立胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)荧光免疫层析的检测方法,在此基础上进行分析性能与临床性能评价。方法:鼠抗人PIGF单抗荧光标记、羊抗人PIGF多抗包被硝酸纤维素膜,建立PIGF的荧光免疫层析检测方法,并对其线性范围、准确度、重复性等分析性能进行评价;以电化学发光法为对照,采用136例孕妇血清进行临床性能评价。结果:荧光免疫层析检测方法的线性范围为20.0~9 000.0 pg/mL,准确度为97.98%,重复性、变异系数CV为3.14%(500.0 pg/mL)和2.98%(5 000.0 pg/mL);与电化学发光法具有良好的线性相关性: $y=1.032x-5.002$ ($r=0.991$);Bland-Altman统计分析显示,荧光免疫层析法检测结果的平均值略高于电化学发光法,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:PIGF荧光免疫层析检测方法的分析性能与临床性能较佳,适合临床应用。

[关键词] 胎盘生长因子;荧光免疫层析;子痫前期**[中图分类号]** R446.6**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2021)01-054-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20210110

Performance evaluation of placental growth factor by fluorescence immunochromatography

MA Jinqi¹, LI Ying¹, HUANG Jianrong², XUE Yifeng², XU Yafeng², WANG Chunxin^{2*}¹Department of Gynecology and Obstetrics, ²Department of Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China

[Abstract] **Objective:** To establish a fluorescence immunochromatography for placental growth factor (PIGF), evaluate the analysis performance and clinical performance. **Methods:** Using fluorescent microsphere conjugated - mouse - anti - human PIGF monoclonal antibody, sheep anti - human PIGF polyclonal antibody coated on NC membrane, to establish a fluorescence immunochromatography assay for PIGF, and evaluate the analysis performance, such as linear range, accuracy, repeatability. Using serums of 136 pregnant women, electrochemiluminescence as control, to evaluate the clinical performance. **Results:** The linear range of fluorescence immunochromatography assay for PIGF was 20.0~9 000.0 pg/mL, accurate was 97.98%, repeatability CV was 3.14%(500.0 pg/mL) and 2.98%(5 000.0 pg/mL). The assay had good correlation with electrochemiluminescence: $y=1.032x-5.002$ ($r=0.991$). Bland-Altman statistical analysis showed that the average value of fluorescence immunochromatography was slightly higher than that of electrochemiluminescence, without significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** The fluorescence immunochromatography for PIGF has good analysis performance and clinical performance. The assay is suitable for clinical application.

[Key words] placental growth factor; fluorescence immunochromatography; pre-eclampsia

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(01):054-058, 064]

孕妇血清中的胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)是首个经过大规模临床验证的、可用于孕妇产前预测及诊断的生物标志物^[1-2], PIGF

[基金项目] 江苏省“333工程高层次人才培养工程”(PYJF201808)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangcx_wxph@163.com

浓度的变化与孕妇罹患子痫前期的风险密切相关。

目前,PIGF的检测技术有时间分辨荧光免疫分析、微流控、电化学发光法等^[3-4],这些技术都存在操作复杂或成本高昂等缺点。基于荧光免疫层析的检测方法操作便捷,成本低廉,可实现在临床门诊随到随诊,方便快速预测子痫前期的风险,具有较高的临床应用价值。

本研究建立了荧光免疫层析的PIGF检测方法,并对其分析性能与临床性能进行评价。

1 材料和方法

1.1 材料

鼠抗人PIGF单抗(克隆号:P616)和羊抗人PIGF多抗(货号:CSB-DA217)(无锡金泰格生物科技有限公司);重组人PIGF蛋白(货号:TP723367, OriGene公司,美国);荧光微球(货号:FCEU002,规格:0.19 μm)(Bangs公司,美国)。对照试剂:胎盘生长因子检测试剂盒(电化学发光法,批号:21906701, Roche公司,德国)。荧光分析仪(广州蓝勃生物科技有限公司,型号:AFS-1000);化学发光分析仪(Roche公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 反应体系的建立

1.2.1.1 抗体标记条件

抗体标记按荧光微球说明书进行,每毫克微球标记80~100 μg抗体。将微球与抗体(鼠抗人PIGF单抗)混合于pH为5.0~7.5的5种MES缓冲液(0.1 mol/L)中,放置室温,200 r/min摇床上反应2 h后于13 000 r/min 4 ℃离心30 min,取上清液测定残余抗体的量。

1.2.1.2 标记抗体与包被抗体用量

线性范围预设:20.0~9 000.0 pg/mL,按照表1的棋盘法,设置不同的标记抗体以及包被抗体(羊抗人PIGF多抗)用量;组装PIGF检测卡,采用0~10 000.0 pg/mL的质控品进行检测,确立PIGF标记抗体与包被抗体的最佳用量。

表1 棋盘法选择最佳的标记抗体与包被抗体用量

Table 1 The optimal amounts of conjugated and coated antibody selected by checkerboard method

包被抗体 (μg/μL)	标记抗体(μL/cm)		
	5.0	2.5	1.0
2.00	配方1	配方2	配方3
1.00	配方4	配方5	配方6
0.50	配方7	配方8	配方9
0.25	配方10	配方11	配方12

1.2.1.3 反应时间

在确定上述参数的基础上,采用定值质控品(500.0 pg/mL)摸索反应完成时间。

1.2.2 分析性能评价

参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)EP06、EP15、EP07文件^[7-9]和《WS/T 420-2013 临床实验室对商品化定量试剂盒分析性能的验证》^[10-11]

要求,对本项目建立的PIGF荧光免疫层析检测方法的分析性能进行评价,具体方法如下。

1.2.2.1 空白限

用空白质控品重复测定10次,计算信号值的平均值和标准差,得出平均值+2×标准差所对应的信号值,代入定标曲线方程计算对应的浓度值,即为空白限。

1.2.2.2 灵敏度(检出限)

参照行业标准^[11]的方法,具体如下:预设灵敏度(检出限)为10.0 pg/mL,配制5份低值样本(10.0~20.0 pg/mL),每份样本检测5次,对检测结果按照大小进行排序并与空白限进行比较,至少2份样本的浓度高于空白限,则预设10.0 pg/mL即为PIGF检测方法的灵敏度(检出限)。

1.2.2.3 准确度(回收率)

将高浓度的PIGF样品A(11 045.0 pg/mL, 10 μL)加入到空白质控品B(100 μL)中;重复测试3次求平均值,根据以下公式计算回收率: $(R)=[C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0] / (V \times C_s) \times 100\%$,式中R为回收率;V为样品A液的体积;V₀为样品B液的体积;C为样品B液加入A液后的检测浓度;C₀为样品B液的浓度;C_s为样品A液的浓度。参照行业标准^[11]的要求,回收率应在85%~115%。

1.2.2.4 线性范围

参照行业标准^[11]的方法,确立本项目PIGF荧光免疫层析检测方法的线性范围,具体方法如下:预设线性范围为20.0~9 000.0 pg/mL;将高浓度质控品(9 354.0 pg/mL)稀释至5个浓度,最低浓度应接近线性范围下限(20.0 pg/mL),每个浓度重复检测3次,计算平均值;计算检测浓度的均值与理论值的线性相关性,线性相关系数r应不低于0.990。

1.2.2.5 重复性

浓度分别为500.0、5 000.0 pg/mL的PIGF质控品各重复检测10次,计算10次测量结果的平均值和标准差,根据以下公式计算变异系数:CV(%)=标准差/平均值×100%。

1.2.2.6 干扰试验

交叉反应(特异性):取重组血管内皮生长因子(VEGF)和重组表皮生长因子(EGF),加入至空白质控品及PIGF高值血清,终浓度分别为200.0 ng/L和3.0 μg/L,重复测定3次计算均值。

干扰物质:取PIGF高值血清,分别加入不同浓度的血红蛋白、总胆红素等可能的干扰物质,每个样本分别重复检测3次,计算平均值及干扰率,干扰

率(%)=(干扰样本实测浓度-样本理论浓度)/样本理论浓度×100%。

1.2.3 临床性能评价

收集2018年2—9月来南京医科大学附属无锡人民医院就诊的136例孕妇(年龄18~45岁、孕周20~34⁺⁶周)的血清样本(不少于0.5 mL);采集的血清在-20℃条件下冷冻保存,1个月内进行检测。每份血清样本均采用荧光免疫层析法与电化学发光试剂法平行检测,考察两种检测方法的相关性。

1.3 统计学方法

用SPSS17.0和GraphPad Prism 5.0软件进行数据处理与分析;两种检测方法结果的差异分析采用Bland-Altman检验,采用线性回归进行相关性分析,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 反应体系的建立

2.1.1 抗体标记的最佳条件

实验结果显示,当pH为6.5~7.0时,残余抗体最少(表2);因此将抗体的标记pH确定为6.5~7.0。

表2 不同pH条件下抗体的标记效率

Table 2 Conjugated efficiency of antibody with different pH condition

标记条件(pH)	PIGF残余抗体(μg)					
	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	均值
5.0	15.8	13.7	12.9	15.6	15.9	14.8
5.5	4.9	3.9	4.7	3.6	4.4	4.3
6.0	1.6	1.3	1.8	0.9	1.2	1.4
6.5	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2
7.0	0.2	0.2	0.3	0.1	0.6	0.3
7.5	2.9	2.8	3.5	3.9	3.3	3.3

2.1.2 标记抗体与包被抗体用量

如图1所示,配方2、配方4、配方5符合线性范围的要求(即在20.0~9 000.0 pg/mL内,荧光信号值-浓度值的曲线接近于直线);因此确定标记抗体的喷点量为3.5 μL/cm,包被抗体的用量为1.5 μg/μL。

2.1.3 反应时间

取质控品(500.0 pg/mL)80 μL加入PIGF检测卡,分别于5、10、15 min检测,重复3次求平均值,结果显示,检测卡在10 min时已完成反应(表3);为确保反应充分,确立反应时间为15 min。

2.2 分析性能评价

2.2.1 空白限

空白质控品重复测定10次,信号的平均值为

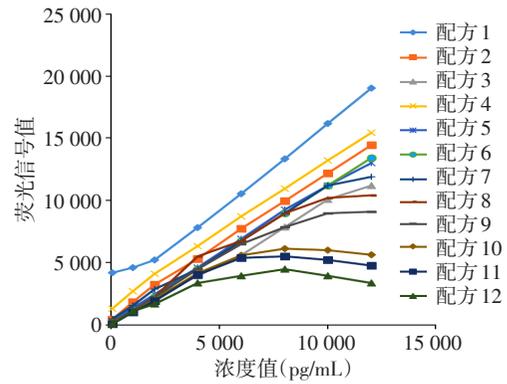


图1 不同配方与信号值的对应关系

Figure 1 Relation between different formulas and the signal value

表3 不同反应时间后的检测结果

Table 3 Test results after different reaction times (pg/mL)

检测时间(min)	检测结果			
	第1次	第2次	第3次	平均值
5	294.12	300.80	293.73	296.22
10	503.99	505.07	506.71	505.26
15	514.65	519.72	504.11	512.83

0.052 3,标准差为0.002 5,根据均值+2×标准差,代入定标曲线方程计算得到PIGF检测卡的空白限为6.08 pg/mL。

2.2.2 灵敏度(检测限)

根据实验结果,5个低值样本的检测结果均高于空白限(6.08 pg/mL),确定PIGF检测卡的灵敏度(检出限)为10.0 pg/mL(表4)。

2.2.3 准确度(回收率)

根据实验结果,确定PIGF检测卡的准确度(回收率)为97.98%(表5)。

2.2.4 线性范围

以理论浓度为x轴,以实际检测浓度为y轴,考察相关性。结果显示,PIGF检测卡在16.7~9 000.0 pg/mL的线性相关系数r=0.999 > 0.990,因此,确定PIGF检测卡的线性范围为20.0~9 000.0 pg/mL(表6、图2)。

2.2.5 重复性

根据实验结果(表7),PIGF浓度在500.00 pg/mL和5 000.0 pg/mL时,检测卡的重复性(CV)分别为3.14%和2.98%。

2.2.6 干扰试验

交叉反应(特异性)实验结果显示,VEGF、EGF与PIGF检测卡的交叉反应在-2.48%~3.95%,对检测结果无显著影响(表8)。

血红蛋白等干扰物质对检测结果的干扰率

表4 PIGF检测卡的灵敏度(检出限)

Table 4 Sensitivity (limit of detection) of PIGF card (pg/mL)

样本浓度 (pg/mL)	检测结果					
	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	均值
10.0	9.88	11.01	10.64	11.40	11.06	11.03
12.5	12.84	12.84	12.04	12.38	12.03	12.43
15.0	15.79	12.68	15.11	14.85	15.69	15.42
17.5	16.46	16.06	16.88	16.34	16.86	16.52
20.0	20.02	20.06	20.78	20.72	20.15	20.35

表5 PIGF检测卡的准确度

Table 5 Accuracy of PIGF card

	检测浓度 (pg/mL)	回收率 (%)
第1次	984.49	98.05
第2次	990.97	98.69
第3次	975.93	97.20
均值	983.80	97.98

表6 PIGF检测卡线性范围

Table 6 Linear range of PIGF card

浓度 梯度	PIGF (pg/mL)	
	理论浓度	实际检测浓度
1	16.70	25.85
2	167.00	159.80
3	1 169.00	1 560.00
4	2 338.00	2 527.00
5	9 354.00	9 198.00

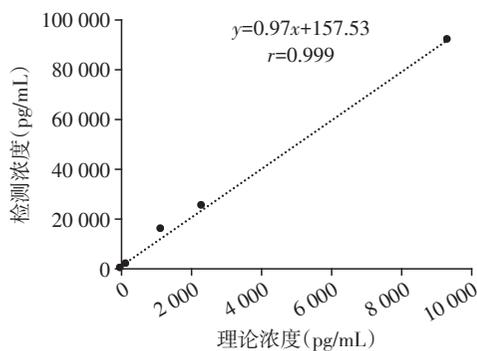


图2 PIGF检测卡的线性相关性

Figure 2 Linear correlation of PLGF card

在-7.11%~-0.79%,其中,胆红素、类风湿因子和维生素C的干扰率均超过-5%,需引起重视,可作为本研究PIGF检测方法后继改进的内容之一(表9)。

2.3 临床性能评价

2.3.1 两种检测方法的相关性分析

每个临床血清样本经荧光免疫层析法与对照方法平行测定,检测结果进行线性回归分析,结果如图3所示,两种PIGF检测方法具有良好的线性相

表7 PIGF检测卡重复性研究结果

Table 7 Repeatability of PIGF card

重复性检测	质控品浓度 (pg/mL)	
	500.0	5 000.0
第1次	479.12	4 931.10
第2次	515.71	5 312.73
第3次	519.22	5 260.57
第4次	486.19	5 370.38
第5次	489.12	5 117.29
第6次	517.26	5 155.16
第7次	504.12	5 323.67
第8次	501.37	5 107.82
第9次	527.18	4 982.88
第10次	502.21	5 021.04

表8 交叉反应对检测结果的影响

Table 8 Influence of cross reaction on detection

交叉物	PIGF (pg/mL)		交叉反 应 (%)
	原始浓度 (pg/mL)	实测均值 (pg/mL)	
VEGF	0	6.25	2.80
(200.0 ng/L)	316.72	308.87	-2.48
EGF	0	6.32	3.95
(3.0 μg/L)	316.72	313.95	-0.87

交叉反应=(添加交叉物后实测均值-原始浓度值)/原始浓度×100%;0 pg/mL样本浓度按照空白限6.08 pg/mL计算。

关性: $y=1.032x-5.002$ ($r=0.991 > 0.950$)。

2.3.2 两种检测方法的差异性分析

采用Bland-Altman检验分析两种方法检测结果的差异,结果如图4所示,荧光免疫层析法(考核系统)检测结果的平均值略高于电化学发光法(参比系统),但是两种检测方法的平均值差值仅为-8.98 pg/mL,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

先兆子痫是一种严重的妊娠并发症,通常发生在怀孕20周以后。PIGF浓度异常引起血管内皮功能障碍,是先兆子痫发生的重要原因^[12-13];检测血清

表9 干扰物质对检测结果的影响

干扰物质		PIGF(ng/mL)		干扰率 (%)
名称	浓度	理论浓度	实测浓度	
血红蛋白	3 mg/mL	21.87	21.70	-0.78
胆红素	2 mg/mL	21.87	20.31	-7.13
甘油三酯	10 mg/mL	21.87	21.69	-0.82
类风湿因子	2 200 U/mL	21.87	20.75	-5.12
维生素C	400 μg/mL	21.87	20.65	-5.58
肝素	8 U/mL	21.87	21.41	-2.10
阿司匹林	10 mg/L	21.87	20.97	-4.12

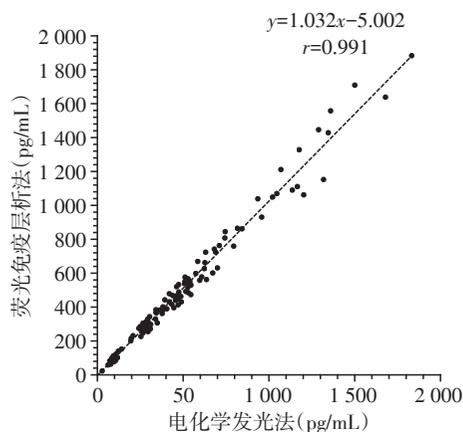


图3 荧光免疫层析法与电化学发光法的相关性

Figure 3 Correlation between fluorescence immunochromatography and electrochemiluminescence

中PIGF水平的变化可显著提高先兆子痫诊断的准确性。

PIGF现有的检测技术主要包括化学发光法、时间分辨免疫荧光法等;这些检测技术需要反复定标,依赖大型分析仪器,因此,往往是收集样本后集中检测,给临床诊疗带来了极大不便。2012年美国

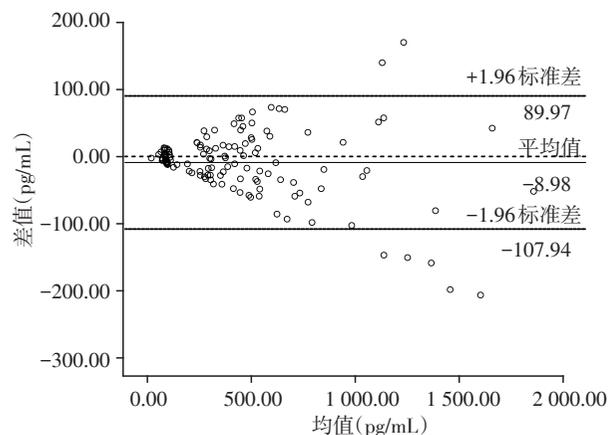


图4 荧光免疫层析法与电化学发光法的差异分析

Figure 4 Difference analysis of fluorescence immunochromatography and electrochemiluminescence

Alere公司推出了一款基于微流控技术的PIGF检测产品(Triage® PLGF),操作简便(滴加血清后15 min即可判读结果),性能优异,是目前临床应用最为广泛的PIGF检测技术^[14]。但微流控检测技术开发难度极大,全球实现量产的产品为数极少。近年来兴起的荧光免疫层析技术是一种快速免疫学检测方法^[15-16],具备与微流控相似的分析性能,灵敏度高,操作便捷,无需反复定标,综合成本更低,尤其适合现场检测,提高工作效率。

本研究基于荧光免疫层析技术建立PIGF检测方法,包括抗体标记、包被、反应时间等关键参数的优化;同时依据CLSI的EP6-A、EP15-A、EP7-A等规范性文件,对荧光免疫层析检测方法的分析性能,包括空白限、灵敏度、准确度、线性范围、重复性和干扰试验进行了评价;最后,通过136例临床样本的检测,证实本项目建立的PIGF荧光免疫层析检测方法

与电化学发光法具有良好的 consistency。综上所述,本研究应用荧光免疫层析技术,建立了血清中PIGF的检测方法,操作简便、快速,分析性能与临床性能优异。今后,我们将进一步改进这一检测技术,如降低类风湿因子等物质的干扰,通过与自动分析仪的适配研究实现自动化操作,使之更适合应用于临床子痫前期风险的评估。

[参考文献]

- [1] HARALD Z, ELISA L, FREDERIC C, et al. Predictive value of the sFlt-1:PIGF ratio in women with suspected preeclampsia[J]. N Engl J Med, 2016, 374(1): 13-22
- [2] 洪音, 孟浩, 徐俊, 等. 血清sFlt-1、PLGF水平及比值变化预测孕妇轻度子痫前期发病的Meta分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(10): 1270-1276
- [3] KNUDSEN U B, KRONBORG C S, VON DADELSZEN P, 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
- [4] 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
- [5] 体外诊断医疗器械生物样品中量的测量校准品和控制物质赋值的计量学溯源性. 中华人民共和国医药行业标准 GB/T 21415-2008/ISO 17511:2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [6] 体外诊断医疗器械生物源性样品中量的测量参考物质的说明. 中华人民共和国医药行业标准 GB/T 19703-

(下转第64页)

病流行病学特征分析[J]. 现代预防医学, 2016, 43(21):3850-3854

[9] 魏崇崇,施超,葛桂芝. 无锡市手足口病流行特征和病原学分析[J]. 预防医学, 2019, 31(11):1156-1158

[10] 于栓宝,罗垵炜,周永红,等. 湖南省安化县2013—2016年手足口病住院负担估计[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(1):79-83

[11] 李平,庞燕,邝仕壮. 2014—2016年海口市手足口病流行特征及病原体分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(5):610-617

[12] 刘静文,耿进妹,陈纯,等. 2011—2015年广州市手足口病流行病学特征及病原学监测分析[J]. 现代预防医学, 2017, 44(5):772-777

[13] 樊欢,嵇红,霍翔,等. 2009—2018年江苏省EV71分子流行病学及其基因特征分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(9):686-692

[14] 刘小娟,李燕,沙小兰,等. 2008—2018年银川市肺结核流行特征调查分析及趋势预测[J]. 中国全科医学, 2019, 22(39):1-6

[15] 丁小萍,胡德英,万青,等. 综合医院非精神科住院病人自杀行为预测ARIMA模型的构建及其应用[J]. 护理研究, 2019, 33(19):3302-3307

[16] 刘芸男,彭荣荣,杨冬燕,等. ARIMA模型在临床红细胞需求预测中的应用[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(10):1611-1615

[17] 姚一泓,霍达,贾蕾,等. 手足口病预警模型及其应用现状[J]. 国际病毒学杂志, 2018, 25(2):136-139

[收稿日期] 2020-02-04

(上接第58页)

2005[S]. 北京:中国标准出版社, 2005

[7] Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. CLSI document EP06[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003

[8] Interference testing in clinical chemistry. CLSI document EP07[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018

[9] User demonstration of performance for precision and accuracy. CLSI document EP15[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014

[10] 临床实验室对商品化定量试剂盒分析性能的验证. 中华人民共和国卫生行业标准 WS/T 420-2013[S]. 北京:中国标准出版社, 2013

[11] 降钙素原测定试剂盒. 中华人民共和国医药行业标准 YY/T 1588-2018[S]. 北京:中国标准出版社, 2018

[12] 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

[13] 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

[14] SIBIUDE J, GUIBOURDENCHE J, DIONNE M D, et al. Placental growth factor for the prediction of adverse outcomes in patients with suspected preeclampsia or intra-uterine growth restriction [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50208

[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

[16] 权秋宁,武雅俐,张娟玲,等. 时间分辨荧光免疫层析法应用于中孕产前筛查的价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(1):52-53

[收稿日期] 2019-07-09