

干式时间分辨荧光免疫层析法检测血清抗链球菌溶血素“O”的方法学性能验证

王玲萍¹, 许中², 陆茜莹¹, 陆仁伟¹, 周伟³, 刘琴¹

(1. 苏州市相城区漕湖人民医院检验科, 江苏苏州 215144; 2. 苏州市立医院东区检验科, 江苏苏州 215001; 3. 上海捷门生物技术有限公司, 上海 201806)

摘要: 目的 验证时间分辨荧光免疫层析法抗链球菌溶血素“O”(ASO)检测试剂的方法学性能。方法 参照CLSI对上海捷门生物技术有限公司生产的干式时间分辨荧光分析仪(FIT-1000)ASO荧光免疫层析法检测的精密度、正确度、线性及参考范围进行验证。并以贝克曼IMMAGE800免疫散射速率法作为参考系统,对临床标本进行比对实验。结果 正确度试验,检测ASO浓度分别为83.2, 136和269 IU/ml的校准品,相对偏倚分别为-1.03%, -0.99%和-2.70%。检测低、高两个浓度血清标本的ASO精密度, CV分别为8.32%, 6.39%。ASO浓度范围46.37~868.13 IU/ml时,线性方程为 $Y=0.9588X-3.889$ ($r^2=0.9985$)。临床标本($n=61$)比对实验, Deming回归方程 $Y=1.256X-6.51$, $r=0.9506$ 。性能评价项目结果均达到厂商声明标准。结论 应用干式时间分辨荧光分析仪(FIT-1000)及配套试剂检测ASO,其正确性、重复性良好,可满足临床尤其是基层医疗单位的要求。

关键词: 抗链球菌溶血素“O”; 精密度; 正确度; 线性试验; 参考范围

中图分类号: R446.62 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)05-131-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.05.034

Validation of Dry Time -Resolved Fluorescence Immunochromatography for Detection of Serum Anti Streptolysin “O”

WANG Ling-ping¹, XU Zhong², LU Qian-ying¹, LU Ren-wei¹, ZHOU Wei³, LIU Qin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Caohu People's Hospital of Xiangcheng District in Suzhou, Jiangsu Suzhou 215144, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Eastern District of Suzhou Municipal Hospital, Jiangsu Suzhou 215001, China; 3. Shanghai Jiemen Biotechnology Co. Ltd, Shanghai 201806, China)

Abstract: Objective To verify the methodological performance of anti streptolysin “O” (ASO) detection reagent by time-resolved fluorescence immunochromatography TRFIC. **Methods** According to CLSI, the precision, accuracy, linearity and reference range of ASO fluorescence immunochromatography (FIT-1000) produced by Shanghai Jiemen Biotechnology Co. Ltd were verified. Beckman IMMAGE800 was used as the reference system to compare the clinical samples. **Results** In the accuracy test, the relative bias was -1.03%, -0.99% and -2.70%, when the ASO concentration was 83.2, 136 and 269 IU/ml, respectively. The precision of ASO was 8.32% and 6.39% respectively. When the concentration of ASO ranged from 46.37 to 868.13 IU/ml, the linear equation was $Y=0.9588X-3.889$ ($r^2=0.9985$). The Deming regression equation $Y=1.256X-6.51$, $r=0.9506$. The results of performance evaluation items all meet the manufacturer's declaration standard. **Conclusion** The accuracy and repeatability of dry TRFIC analyzer (FIT-1000) and related reagents for ASO detection are good, which can meet the requirements of clinical, especially primary medical units.

Keywords: anti-streptococcus hemolysin “O”; precision; accuracy; linear test; reference range

抗链球菌溶血素O(antistreptolysin O, ASO)的定量检测可作为临床链球菌感染后引发变态反应性疾病(风湿热、肾小球肾炎等)的辅助诊断指标^[1]。传统的ELISA法操作复杂且特异度和重复性不理想而应用甚少。免疫透射比浊法虽常用,但有灵敏度低,检测范围较窄。免疫散射速率法结果准确,但仪器试剂进口价格昂贵,基层单位尚难普

及。国内近年推出的时间分辨荧光免疫层析法(time-resolved fluorescence immuno chromatography, TRFIC)相对而言其设备简单,操作便利,同时又兼具较好的灵敏度和准确度,是一种较易推广使用的方法学平台。为评价其在临床应用可行性,我们对荧光免疫层析法血清抗链球菌溶血素“O”检测试剂盒进行了临床实验室方法学性能验证,现报道如下。

作者简介: 王玲萍(1988-),女,大专,主管检验师,研究方向:临床检验, E-mail: 540280220@qq.com。

通讯作者: 刘琴,副主任技师,主要从事实验室管理及生化检验, E-mail: 2297779562@qq.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2019年5月份门诊及住院患者检测ASO的血清样本共61例,其中阳性标本33例,均由苏州市立医院东区提供。

1.2 仪器及试剂

1.2.1 试剂:实验所用ASO时间分辨荧光免疫层析法检测试剂及相应的校准品和质控品均由上海捷门生物技术有限公司提供。对比试验所用散射速率法试剂由美国贝克曼公司提供。

1.2.2 主要仪器:干式时间分辨荧光分析仪(FIT-1000)及配套ASO检测试剂由上海捷门生物技术有限公司提供。美国贝克曼公司IMMAGE800特定蛋白测定仪。

1.3 方法

1.3.1 方法学原理:固相双抗原夹心法免疫试验,待测样本中所含的ASO,首先与链球菌溶血素O(streptolysin O, SLO)-稀土离子螯合物荧光乳胶微球结合,通过层析分离作用被固定在硝酸纤维素膜上的SLO(T线)捕获,T线荧光信号被配套仪器定量测定,荧光强度与样本中ASO浓度呈正相关。

1.3.2 正确度评估试验:选用生产厂商提供的低(83.2 IU/ml)、中(136.0 IU/ml)和高(269.0 IU/ml)浓度ASO校准品。校准品复溶后连续测试3次。

1.3.3 精密度评估试验:采用简易精密度评估实验。随机测试ASO低、高两个浓度的临床血清样品,每个浓度标本连续测定4天,每天重复3次,共测试12次。

1.3.4 线性评估试验:参考CLSI EP6-A^[2]文件方案,将低浓度水平混合血清、高浓度水平混合血清,按照体积比制备成浓度分别为50, 180, 360, 540, 720和900 IU/ml。每个样本平行测试3次。

1.3.5 临床样本比对试验:收集临床样本61例,分别使用贝克曼IMMAGE800散射速率法[参考方法(X)]和荧光免疫层析法[实验方法(Y)]进行检测。

1.3.6 受试者工作曲线(ROC)测试评价:以临床推荐使用的美国贝克曼公司IMMAGE800散射速率法检测ASO作为参考标准,以该仪器检测ASO ≥ 116 IU/ml为诊断阳性(Pos.), < 116 IU/ml为阴性(Neg.),进行受试者工作曲线(ROC)测试评价。

1.4 统计学分析 使用EP Evaluator分析软件进行统计学分析。采用Pearson相关系数(r)和配对 t 检验分析两种方法之间的差异,当 $r > 0.95$ 时认为相关性好。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正确度评估结果 见表1。低、中、高3个浓度的ASO校准品相对偏倚分别为-1.24%、-0.99%及2.70%,均在行业标准所列相对偏倚范围内。

校准品	标准值 (IU/ml)	测定值 (IU/ml)	偏倚 (IU/ml)	相对偏倚 (%)
低浓度	83.2	82.2	-1.03	-1.24
中浓度	136.0	134.7	-1.35	-0.99
高浓度	269.0	261.8	-7.25	-2.7

2.2 精密度评估试验结果 低(18.6 IU/ml)、高(226.0 IU/ml)两个浓度样本的CV分别为8.32%和6.39%,均在厂商声明范围($\leq 10\%$)内。

2.3 线性评估试验结果 见图1。ASO浓度在46.37~868.13 IU/ml时检测呈线性,直线回归方程为 $Y=0.9588X-3.889$, $r^2=0.9985$ 。线性范围符合厂商声明区间(50~800 IU/ml)。

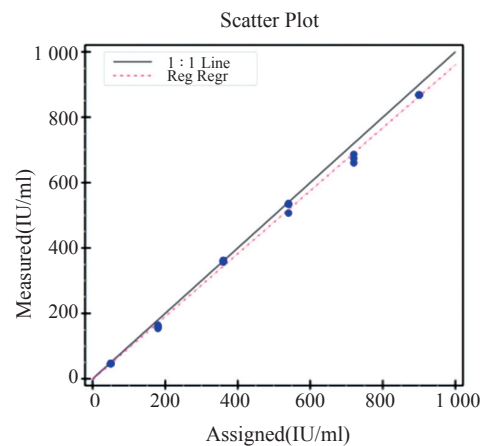


图1 ASO线性试验结果

2.4 临床样品比对试验结果 见图2。比对试验按照EP Evaluator软件中的两种仪器(方法)比对模式进行。Deming回归方程截距(intercept)和斜率(slope)分别为-6.51(95%CI:-28.28~15.25)和1.256(95%CI:1.154~1.359), r 为0.9506,相关性良好。

2.5 受试者工作曲线(ROC)评价结果 FIA-1000荧光免疫层析法检测ASO的ROC曲线见图3。曲线下面积(AUC)为0.942,标准误为0.03,最靠左上角的截割点即最佳临床诊断Cutoff值为150.8 IU/ml。以ASO ≥ 150.8 IU/ml为诊断Cutoff值,其灵敏度为90.9%(95%CI 76.4%~96.9%),特异度为89.3%(95%CI 72.8%~96.3%),阳性及阴性似然比分别为8.48和0.10,阳性及阴性预测值分别为90.9%和89.3%,有效率为90.2%。

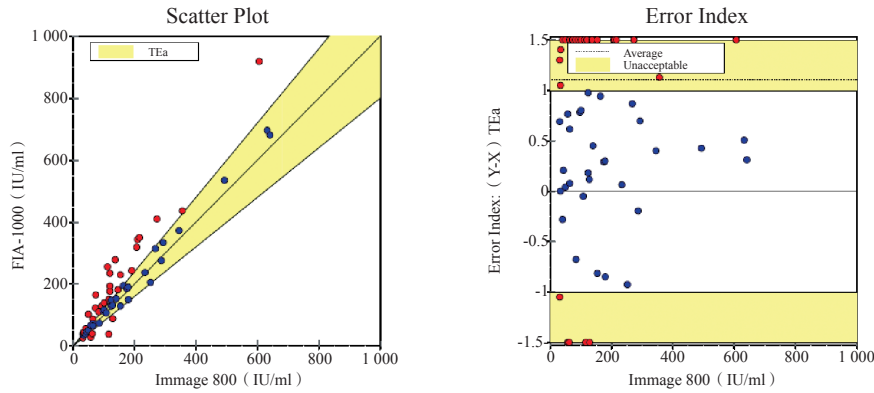


图2 两种ASO检测方法临床样品比对结果

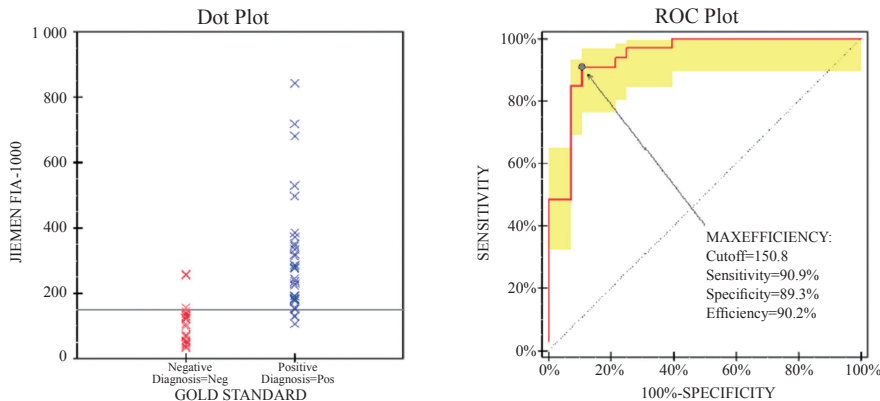


图3 荧光免疫层析法检测ASO的ROC曲线图

3 讨论

本研究结果显示，时间分辨荧光免疫层析法测定ASO具有良好的正确度和精密度，在845IU/ml浓度范围内线性良好，与免疫比浊法的线性范围接近^[3]。和参考方法相比也有较好的相关性。同时，本研究亦对确定该荧光免疫层析法的参考值范围进行了初步尝试，以ASO ≥ 150.8 IU/ml作为诊断的Cutoff值。但因观察例数尚少，故在开展ASO荧光免疫层析法定量的临床检测时，还需进行实验室的参考值调查。

方法学性能验证数据表明，FIA-1000时间分辨荧光免疫层析法检测ASO能满足临床常规检测应用，但也应看到该荧光免疫法既要注意时间、温度等影响因素，同时也需对溶血、黄疸、脂血进行干扰试验。有文献报道，在类风湿关节炎伴随有链球菌感染时，ASO亦有轻度升高，有较好的诊断价值^[4]。这些有待进一步的病例试验和研究。

在临床特种蛋白的检测实践中，ASO是一项不可或缺的常用指标，其检测方法学近20多年的发展演变，经过了从定性乳胶凝集到定量的免疫比浊法的进展^[5-6]，产生了为数不少的介绍和评价二者各自特点的文献^[7-10]。这些都是基于对经典的免疫复合物微粒的浓度检测。目前，国内规模医院均已使用进口免疫散射速率法来定量检测ASO^[11-12]。

尽管临床符合性较好，但因此类仪器设备昂贵，不少基层医院仍在使用传统的乳胶凝集法定性检测ASO，影响了临床诊断的准确性、及时性。FIA-1000时间分辨荧光免疫分析仪及配套试剂，使用一次性测试卡，采用了目前已广泛应用的现代免疫荧光标记技术^[13-14]，利用稀土元素铕的荧光效应，在机体本底荧光消退后实现免疫复合物荧光测定。在样本处理和测试操作上实现了随到随做，操作简单。报告结果时间耗时不超过30min，大大方便了病人，适于在各临床医疗机构尤其是中小医院开展。

参考文献:

- [1] 阎东莉, 白玉兰, 褚云卓, 等. A族β-溶血性链球菌咽部分离株临床耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016,26(21):4873-4875.
YAN Dongli, BAI Yulan, CHU Yunzhuo, et al. Drug resistance of group A β-hemolytic *Streptococcus* isolated from throat swab[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2016,26 (21): 4873-4875
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP6-A: Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; approved guideline [S]. Wayne:PA, CLSI EP6-A,2003.
- [3] 张淑琼, 王凡. 奥林巴斯AU5400检测血清抗链球菌溶血素O的测量范围评价[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(7): 929,931.

(下转第167页)

- QU Ying, TANG Sufang. Analysis and improvement of non conformance items in laboratory external audit [J]. Tianjin Pharm, 2017, 29(4):76-78.
- [9] 中国合格评审国家认可委员会. CNAS-CL36: 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL36: Guidance on the application of accreditation criteria for the medical laboratory quality and competence in the field of molecular diagnostics[S]. Beijing: China Standar Press, 2012.
- [10] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2020,27(3): 4-5.
- National Health Commission of the People's Republic of China. Laboratory Biosafety Guidelines of Novel Coronavirus(Second Edition) [J]. Chinese Practical Journal of Rural Doctor, 2020, 27(3): 4-5.
- [11] 上海市临床检验中心. 上海市临床检验中心组织开展新型冠状病毒核酸检测测量审核活动 [J]. 检验医学, 2020, 35(3): 223. Shanghai Center Clinical Laboratory. Novel coronavirus nucleic acid detection and measurement audit activity was carried out in Shanghai center for clinical laboratory[J]. Lab Med, 2020, 35(3): 223.
- 收稿日期: 2020-07-01
修回日期: 2020-08-01

(上接第133页)

- ZHANG Shuqiong, WANG Fan. Evaluation of measurement range of olympus AU5400 for detection of serum anti *Streptolysin O* [J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2014, 11 (7): 929,931
- [4] 高明, 杨晓英, 毛晓莉. 抗 β_2 糖蛋白 I 抗体、糖膜蛋白 GP I b 及抗链球菌溶血素 O 检测在类风湿关节炎急性阶段的诊断价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5):575-578. GAO Ming, YANG Xiaoying, MAO Xiaoli. Diagnostic value of anti- β_2 glycoprotein I antibody, membrane glycoprotein GP I b and anti-streptolysin O in acute stage of rheumatoid arthritis [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40 (5) : 575-578.
- [5] 孙立芳, 赵静. 浅谈免疫比浊法技术优势 [J]. 中国民康医学, 2012, 24 (23) : 2870-2872. SUN Lifang, ZHAO Jing. Shallowly discusses immunity turbidimetric method technology superiority[J]. Medical Journal of Chinese People's Health, 2012, 24 (23): 2870-2872.
- [6] 冯景, 周有利. 免疫透射比浊法测定抗链球菌溶血素 O 和类风湿因子 [J]. 陕西医学检验, 2001, 16 (2) : 19-20. FENG Jing, ZHAO Youli. The method of determining anti streptolysin-O and rheumatoid factor with immunity transmission turbidity[J]. Shaanxi Medical Laboratory, 2001, 16 (2): 19-20
- [7] 彭凤, 应春妹, 徐晓萍, 等. 免疫透射比浊法与免疫散射比浊法检测特定蛋白的比较研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26 (1) : 45-47. PENG Feng, YING Chunmei, XU Xiaoping, et al. Study on analysing serum specific proteins by immunoturbidimetric assays and immunonephelometric assays[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26 (1) : 45-47.
- [8] 汤卫菊. 抗链球菌溶血素“O”试验定量与定性结果比较 [J]. 检验医学与临床, 2009, 6 (16) : 1376-1377. TANG Weiju. Comparison of quantitative and qualitative results of anti-streptococcal hemolysin “O” test [J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2009, 6 (16): 1376-1377.
- [9] 张会品, 张建春, 郭兰芳. 风湿热患者血清 ASO 滴度与 HDL 水平的相关性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33 (5) : 145-148. ZHANG Huipin, ZHANG Jianchun, GUO Lanfang. Clinical evaluation of high density lipoprotein in rheumatic fever[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 33 (5) : 145-148.
- [10] 肖群峰, 王飙, 赵和平, 等. 抗链球菌溶血素 O 和类风湿因子定量测定 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31 (9) : 1039-1040. XIAO Qunfeng, WANG Biao, ZHAO Heping, et al. Quantitative determination of anti streptolysin O and rheumatoid factor [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2010, 31 (9): 1039-1040.
- [11] 韩静, 胡梅, 杨桂花, 等. BN II 特种蛋白仪测定 IgG, IgA 和 IgM 性能评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(10): 1292-1294. HAN Jing, HU Mei, YANG Guihua, et al. Performance evaluation of the determination of IgG, IgA and IgM by BN II special protein analyzer [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013, 34 (10): 1292-1294.
- [12] 杨娟娟. 美国贝克曼库尔特 IMMAGE 800 特种蛋白仪性能评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(10): 1402-1404. YANG Juanjuan. Performance evaluation of IMMAGE 800 special protein analyzer in Beckman Coulter [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2016, 37 (10): 1402-1404.
- [13] 赵超芬. 用三种免疫检验法检测乙型肝炎标志物在诊断乙型肝炎中的价值 [J]. 当代医学论丛, 2020, 18 (7) : 183-184. ZHAO Chaofen. The value of detecting hepatitis B markers by three immunoassays in the diagnosis of hepatitis B [J]. Journal of Contemporary Medicine, 2020, 18 (7): 183-184.
- [14] 赖玉玲, 黄丽芳, 雷兴. 时间分辨荧光免疫法检测梅毒螺旋体抗体的临床应用研究 [J]. 中国医药科学, 2019, 9 (7) : 111-115. LAI Yuling, HUANG Lifen, LEI Xing. Research on clinical application of time-resolved fluorescence immunoassay for detection of treponema pallidum antibody[J]. China Medicine and Pharmacy, 2019, 9 (7): 111-115.
- 收稿日期: 2020-04-27 修回日期: 2020-07-31