

朗道血清质控品作为 ELISA 法检测血清可溶性 ST2 室内质控物的可行性探讨

李全双, 许靖, 吴燕, 王书安, 杨艳君 (徐州市中心医院 / 徐州市医学科学研究所, 江苏徐州 221006)

摘要: **目的** 探讨朗道血清质控品作为酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测血清可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白 (soluble growth stimulation expressed gene 2 protein, sST2) 室内质控物的可行性。**方法** 连续性倍比稀释试剂盒中的 sST2 标准品来确定标准值和空白。使用双抗体夹心 ELISA 法检测 sST2 浓度, 结果用线性回归拟合, 建立标准曲线并计算相关系数 (r), 确定线性范围。取朗道血清质控品中值 Level 2 和高值 Level3 进行纯水复溶, 分别混合均匀后用无菌 EP 管分装, -20°C 冷冻保存。参照中国合格评定国家认可委员会发布的《CNAS-GL03 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》, 首先进行均匀性验证, 从分装的中值 Level 2 质控品中随机抽取 10 管, 重复检测两次, 用单因素方差分析比较两次测量值; 然后进行稳定性验证, 随机取中值 Level 2 质控品 6 管, 每管重复检测两次, 将所得均值作为初始均值, 分别于第 3, 6, 9 和 12 个月随机抽取 6 管, 同样方法获得均值并分别与初始均值进行 t 检验比较。高值 Level 3 评价方法与 Level 2 相同。**结果** 在 $3.125 \sim 200.0 \text{ ng/ml}$ 范围区间, 按标准品 sST2 的结果建立标准曲线 ($r=0.99$)。在均匀性检验中, 中值 Level 2 和高值 Level3 中的 F 值分别为 1.932, 0.519, P 值分别为 0.181, 0.481, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。在中值 Level 2 和高值 Level 3 中 sST2 的初始均值分别是 20.03 ng/ml , 22.01 ng/ml 。在中值 Level 2 中, 第 3, 6, 9 和 12 个月的均值分别与初始均值进行 t 检验 ($t=0.857, 0.506, 0.683, 1.144$; $P=0.412, 0.624, 0.510, 0.279$), 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 同样在 Level 3 中, t 值分别为 0.260, 0.639, 0.660, 1.372; P 值分别为 0.800, 0.537, 0.524, 0.200, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。**结论** 在朗道血清质控品中值 Level 2 和高值 Level 3 中, sST2 的浓度均较低且均匀性和稳定性好, 因此二者均可以作为 sST2 低值质控品。

关键词: 可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白 (sST2); 质控品; 室内质控 (IQC)

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 05-190-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.038

Feasibility Study on RANDOX Serum Quality Control Products as ELISA Method to Detect Serum Soluble ST2 Internal Quality Control Materials

LI Quan-shuang, XU Jing, WU Yan, WANG Shu-an, YANG Yan-jun

(Xuzhou Central Hospital/Xuzhou Institute of Medical Sciences, Jiangsu Xuzhou 221006, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of Randox serum quality control products as soluble growth stimulation expressed gene 2 protein (sST2) internal quality control materials. **Methods** The standard values and blank were determined by diluting the sST2 standard in the kit by serial dilutions. Double-antibody sandwich enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) was used to detect the concentration of sST2, the results were fitted with linear regression. The standard curve was established and the correlation coefficient (r) was calculated to determine the linear range. The median-value Level 2 and high-value Level3 of RANDOX serum quality control products were reconstituted with pure water, mixed them evenly, sub pack them with sterile EP tube and freeze them at -20°C . According to the "CNAS-GL03 Guidelines for the Evaluation of Homogeneity and Stability of Proficiency Testing Samples" issued by the China National Accreditation Service for Conformity Assessment, 10 tubes were randomly selected from the Level 2 quality control materials for homogeneity verification firstly, repeated the test twice, and used one-way analysis of variance for homogeneity test. Then 6 tubes of Level 2 quality control were randomly selected for stability verification, each tube was tested twice, and the average value obtained was used as the initial monthly average, and 6 tubes were randomly selected at the 3rd, 6th, 9th and 12th months. Finally, these average values were obtained by the same method and compared with the initial average value by t test. The evaluation method of Level 3 was the same as that of Level 2. **Results** In the range of 3.125 ng/ml to 200.0 ng/ml , the standard curve established by the results of the standard sST2 ($r=0.99$). In the homogeneity test, values of Level 2 and level 3 were 1.932, 0.519 respectively, and the difference was not

作者简介: 李全双 (1982-), 男, 本科, 医学学士, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断工作, E-mail: 182001824@qq.com。

许靖 (1993-), 女, 硕士, 检验技师, 主要从事临床检验诊断工作, 共同第一作者。

通讯作者: 杨艳君, 女, 主任医师。

statistically significant ($P = 0.181, 0.481$, all $P > 0.05$). The initial mean values of sST2 were 20.03 ng/ml and 22.01 ng/ml in Level 2 and Level 3, respectively. In the Level 2, the mean values of the 3rd, 6th, 9th, and 12th months were compared with the initial mean by t -test, the differences were not statistically significant ($t = 0.857, 0.506, 0.683, 1.144$; $P = 0.412, 0.624, 0.510, 0.279$, all $P > 0.05$). Also in Level 3, the t values were 0.260, 0.639, 0.660 and 1.372 respectively, and the differences were not statistically significant ($P = 0.800, 0.537, 0.524, 0.200$, all $P > 0.05$). **Conclusion** In the median-value Level 2 and high-level Level 3 of RANDOX serum quality control products, the concentration of sST2 were low and the homogeneity and stability were good, so both of them can be used as the low-value quality control product of sST2.

Keywords: soluble growth stimulation expressed gene 2 protein (sST2); quality control products; internal quality control (IQC)

可溶性生长刺激表达基因2蛋白(soluble growth stimulation expressed gene 2 protein, sST2)作为临床评价慢性心力衰竭患者预后的一种辅助手段,已在国内多家医院开展应用^[1-4]。目前临床实验室测定sST2主要采用酶联免疫技术,由于其手工操作步骤较多,因此在进行检测时,室内质量控制(internal quality control, IQC)尤为重要。然而目前的IQC工作尚存在不足,如该试剂盒是进口试剂盒,不配备质控品,进口的质控品(重组人ST2冻干粉),价格较昂贵;且该进口质控品的有效期不足一年,与临床生化项目所用的冻干粉质控品如朗道血清质控品(有效期四年)相比较,有效期较短;另外不同批号的进口质控品频繁更换使用,不利于IQC工作开展。目前国内尚未有sST2室内质量控制方面的文献报道。本实验室以方便IQC工作、简单易行、节省成本为原则,探索了朗道血清质控品作为sST2室内质控品的可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 朗道人基质血清定值质控品(冻干粉):中值Level 2,货号:HN1530,批号:1326 UN,规格:5ml;高值Level 3,货号:HE1532,批号:1006UE,规格:5ml,均由英国朗道实验诊断有限公司生产。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器:深圳汇松酶标仪MB580, MM-2微量震荡混合仪。

1.2.2 试剂:①sST2检测试剂盒:货号:BC-1065,批号:RN-61274,规格:96T/盒,由Critical Diagnostics公司生产;②sST2进口质控品:货号:BC-1066,批号:RN-60733,规格:0.80ml,由Critical Diagnostics公司提供。

1.3 方法

1.3.1 朗道血清质控品处理:按照操作说明复溶朗道中值Level 2和高值Level 3质控品各一瓶,分别混合均匀,用无菌EP管各分装100管,每管50 μ l,标记后于-20℃保存。每次取出后室温解冻30 min,待完全溶解,轻轻混匀后与样本同步检测。

1.3.2 sST2检测方法:sST2使用双抗体夹心ELISA法测定,每个测试样本用量为20 μ l。使用

试剂盒提供的sST2标准浓度为400.0 ng/ml标准品,使用连续性倍比稀释法,稀释后sST2标准值浓度(ng/ml)分别是空白(0), S7(3.125), S6(6.25), S5(12.5), S4(25.0), S3(50.0), S2(100.0)和S1(200.0)。按照试剂盒实验步骤进行操作,用酶标仪在450nm波长测量各孔吸光度值(A),将每个标准品的吸光度值与其对应的浓度值进行线性回归拟合,得到标准曲线及相关系数(r)。待测样本和质控品可从标准曲线中根据其吸光度值来查找对应的浓度值。

1.3.3 均匀性检验:参照中国合格评定国家认可委员发布的《CNAS-GL03能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》^[5],从分装的中值Level 2和高值Level 3质控品中随机各抽取10管用于均匀性检验,均按1~10编号,在重复条件下,检测两次。

1.3.4 稳定性评价:随机取中值Level 2和高值Level 3质控品各6管,每管重复检测2次,将所得均值作为初始均值。分别于第3, 6, 9, 12个月随机各抽取6管,按上述方法进行检测,分别取其均值,结果以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.4 统计学分析 均值(\bar{x})和标准差(s)用Excel计算,成组 t 检验和单因素方差分析用SPSS19.0软件统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sST2 ELISA法标准曲线的建立及确定检测的线性范围 在3.125~200.0 ng/ml标准区间,按照标准品sST2的测定结果建立的标准曲线, r 值为0.99,在200 ng/ml时未出现钩状效应,故线性范围在3.125~200.0 ng/ml可以确认是可靠的。

2.2 朗道血清质控品中sST2浓度的均匀性检验见表1。通过对中值和高值质控品的两次结果分别进行单因素方差分析, F 值分别是1.932, 0.519, P 值分别是0.181, 0.481,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),说明朗道质控品分装冷冻保存后均匀性很好。

2.3 朗道血清质控品中sST2含量的稳定性检验见表2。中值Level 2和高值Level 3中sST2的初始均值分别是 20.03 ± 1.23 ng/ml, 22.01 ± 2.04 ng/ml。第3, 6, 9, 12个月的均值分别与初始月均

值进行 t 检验比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 说明朗道血清质控品中 sST2 含量的稳定性好。

3 讨论

可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白 (sST2) 是白介素 1 受体 (IL-1R) 的家族成员之一。当 sST2 水平升高时, 可与 IL-33 竞争性结合, 使 IL-33 无法进入心脏保护的信号转导途径, 导致心脏持续承压, 从而出现细胞死亡和组织纤维化。因此定量检测 sST2 水平可以为临床辅助性评估慢性心力衰竭提供一个相对精确的工具^[6-8]。目前主要使用 ELISA 法测定 sST2, 该技术虽已成熟, 但在实际操作中仍会受到人工操作、实验环境等多因素的影响。该技术的 IQC 工作仍存在不足, 质控品尚未国产化, 室间质评 (external quality assessment, EQA) 工作也未统一开展。为了向临床提供可靠的检验结果, 开展好 sST2 检测的室内质控工作, 确保该检测系

统的稳定性是临床检验的必然要求^{[9]110-111}。

表 1 中值 Level 2 和高值 Level 3 分别检测两次的 sST2 结果 (ng/ml)

样本编号	中值 Level 2		高值 Level 3	
	初测	复测	初测	复测
1	20.67	20.02	22.14	21.98
2	20.16	19.46	20.04	20.86
3	20.02	21.12	19.98	21.18
4	21.63	20.25	24.72	22.01
5	18.61	22.17	21.04	19.79
6	18.72	20.43	24.15	21.32
7	19.34	19.98	24.01	22.79
8	18.61	19.76	23.46	24.21
9	18.89	18.34	22.67	20.45
10	19.45	20.89	21.21	23.74

表 2 中值 Level 2 和高值 Level 3 中初始月和其他月份均值结果 (ng/ml)

检测日期	中值 Level 2			高值 Level 3		
	$\bar{x} \pm s$	t	P	$\bar{x} \pm s$	t	P
初始日	20.03 \pm 1.23			22.01 \pm 2.04		
第 3 月	20.57 \pm 0.95	0.857	0.412	21.74 \pm 1.54	0.260	0.800
第 6 月	19.69 \pm 1.11	0.506	0.624	21.34 \pm 1.51	0.639	0.537
第 9 月	19.53 \pm 1.31	0.683	0.510	21.25 \pm 1.95	0.660	0.524
第 12 月	19.27 \pm 1.17	1.144	0.279	20.65 \pm 1.32	1.372	0.200

IQC 是临床实验室质量保证体系的重要组成部分。质控品是做好 IQC 的重要工具。适宜的质控品应满足以下要求: 稳定性好, 有效期长, 浓度符合检测项目需求, 质控血清尽可能减少基质效应, 反应速率尽量与人血清一致, 且价格适宜^[10]。本实验室临床生化常规项目使用的英国朗道公司生产的人基质定值血清冻干粉, 其基质效应小, 有高低值, 在 4℃ 左右保存有效期可达四年, 且价格适宜, 国内使用较为广泛。缺点是在使用之前必须溶解, 复溶后的血清稳定时间短, 必需分装冷冻保存。朗道人基质血清质控品提供的项目中未见有 sST2 项目, 本研究对其值 Level 2 和高值 Level 3 中 sST2 的浓度进行了探索。

本文参照中国合格评定国家认可委员发布的《CNAS-GL03 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》要求, 对分装保存的朗道质控品进行 sST2 浓度的均匀性和稳定性评价, 结果显示, 在分装冷冻保存的中值 Level 2 和高值 Level 3 中, sST2 浓度瓶间差异小, 差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 说明分装冷冻保存的朗道质控品中 sST2 均匀性

好; 经过一年的冷冻保存瓶间差异小, 差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 说明稳定性至少在 12 个月, 能够满足检测要求。临床关心检测项目的医学决定水平浓度的检验结果的质量, 临床实验室更关心的是检测系统性能的质量。检测中只做 1 个水平的质控品, 反应的质量是整个可报告范围的一个点, 若能同时做 2 个或者更多水平的质控品, 反应的质量是一个范围, 质控的效果更好, 因此在选择质控品时, 应该有几个浓度且浓度分布较宽, 最好接近该项目的医学决定水平^{[9]229-238, [10]}。在朗道中值 Level 2 和高值 Level 3 中 sST2 的初始均值分别是 20.03 ng/ml, 22.01 ng/ml。本试剂盒 sST2 在 3.125 ~ 200.0 ng/ml 范围内, 标准曲线中的 r 值为 0.99, 在 200 ng/ml 时未出现钩状效应, 故线性范围在 3.125 ~ 200.0 ng/ml 可以确认是可靠的。本试剂盒推荐的正常参考范围小于 35.0 ng/ml, 因此中值 Level 2, 高值 Level 3 均可作为 sST2 低值质控品, 可以监测标准曲线中 sST2 标准值 S4(25 ng/ml) 位点附近的检测质量。

下一步我们将利用检测剩余的患者血清样本自

制 sST2 高值质控品, 进一步探讨其应用的可行性, 据此研究结果, 逐步替代 sST2 的进口质控品。另外, 我们将继续探讨 sST2 参考范围^[11], 确定本实验室的参考值。本研究能够为开展 sST2 的临床实验室在 IQC 和 EQA 工作方面提供重要参考。

参考文献:

- [1] 宋丽颖, 袁慧. 可溶性 ST2 在心血管相关疾病排除诊断和治疗监测的应用前景 [J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(3):239-244.
SONG Liying, YUAN Hui. Soluble ST2 is promising in the diagnosis of cardiovascular disease exclusion and therapy monitoring[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2020, 43(3):239-244.
- [2] 贝雪艳, 李军, 曲忠慧, 等. 血浆 sST2 水平对老年心力衰竭患者死亡风险的评估价值 [J]. 山东医药, 2018, 58(1):51-53.
BEI Xueyan, LI Jun, QU Zhonghui, et al. Evaluation of the value of plasma sST2 level on the risk of death in elderly patients with heart failure[J]. Shandong Medical Journal, 2018, 58(1):51-53.
- [3] 罗年桑, 张海峰, 刘品明, 等. 血清 sST2 联合白细胞介素 -33 对射血分数保留的心力衰竭辅助诊断价值的初探 [J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45 (3) : 198-203.
LUO Niansang, ZHANG Haifeng, LIU Pinming, et al. Diagnostic value of combining serum soluble ST2 and interleukin-33 for heart failure patients with preserved left ventricular ejection fraction [J]. Chinese Journal of Cardiology, 2017, 45(3):198-203.
- [4] 何智余, 武锋超, 马兰虎, 等. H₂S 和 sST2 与射血分数降低的心力衰竭的相关性研究 [J]. 临床心血管病杂志, 2020, 36(10):930-935.
HE Zhiyu, WU Fengchao, MA Lanhu, et al. Correlation between H₂S, soluble ST2 and heart failure with reduced ejection fraction [J]. Journal of Clinical Cardiology, 2020, 36(10):930-935.
- [5] 蒋玲丽, 黄中强, 王雪亮, 等. 表皮生长因子受体 (EGFR) 基因突变检测质控品制备及应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(2):145-147, 152.
JIANG Lingli, HUANG Zhongqiang, WANG Xueliang, et al. Development and application of quality control materials for epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation determination [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(2):145-147, 152.
- [6] 王云平, 梁新妹, 郑笑荣, 等. 可溶性 ST2 在心力衰竭合并心房颤动患者中的水平及临床意义 [J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(11):933-941.
WANG Yunping, LIANG Xinmei, ZHENG Xiaorong, et al. The level and clinical significance of soluble ST2 in heart failure patients with atrial fibrillation [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2019, 42(11):933-941.
- [7] 闫福堂, 苏宝凤, 詹颖, 等. 血清 sST2 与血 BNP 在心力衰竭患者中的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(6):78-79, 83.
YAN Futang, SU Baofeng, ZHAN Jie, et al. Correlation between serum soluble ST2 and BNP in patients with heart failure [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(6):78-79, 83.
- [8] 胡晓飞, 许世佳, 孙红, 等. 三种生物学标志物在心力衰竭患者诊断中的应用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(2):161-163.
HU Xiaofei, XU Shijia, SUN Hong, et al. Application of three biomarkers in diagnosis of heart failure[J]. Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases, 2018, 20(2):161-163.
- [9] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003:110-111, 229-238.
FENG Renfeng. The Quality Management Technique Bases in Clinical Laboratory[M]. 2th Ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Literature Press, 2007:110-111, 229-238.
- [10] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [S]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006:47-99.
YE Yingwu, WANG Yusan, SHEN Ziyu. National guide to clinical laboratory procedures[S]. 3th Ed. Nanjing: Southeast University Press, 2006:47-99.
- [11] 王运红, 周琼, 安涛, 等. 中国社区人群可溶性 ST2 血浆水平的参考值范围及影响因素 [J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(10):900-903.
WANG Yunhong, ZHOU Qiong, AN Tao, et al. Reference value and clinical correlates of soluble ST2 in healthy community-based Chinese population [J]. Chinese Journal of Cardiology, 2015, 43(10): 900-903.

收稿日期: 2021-11-26

修回日期: 2022-01-30

欢迎来稿 欢迎订阅