

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.026

儿童化学发光免疫分析中稀释方法的探讨

顾凡磊 赵瑞芳 季志英 吴 哈[△] 李益卫

(复旦大学附属儿科医院核医学科 上海 201102)

摘要 目的:探讨儿童化学发光免疫分析中标本量过少时,用怎样的稀释介质以及稀释方法解决这个问题,分析不同的稀释介质产生的基质效应。**方法:**本实验以儿童常规筛查检测项目血清三碘甲状腺原氨酸(TT3)为例,选取血清样本 30 例,分别使用美国贝克曼库尔特公司 UniCel DXI800 Access 化学发光免疫分析仪测试药盒三碘甲状腺原氨酸(TT3)配套 TT3 定标液 S0(简称 TT3S0)、0.9%氯化钠、医用蒸馏水作为稀释介质进行手工 2 倍(1:1)及 4 倍(1:3)后测定。计算稀释测定结果与原始数据的差异,观察基质效应对检测结果的影响。寻找实际工作中可运用的稀释介质和稀释倍数。**结果:**不同稀释组与原始值之间比较,TT3S0 2 倍($t=0.7937$, $P>0.05$)、4 倍稀释($t=-0.2503$, $P>0.05$),以及蒸馏水 2 倍稀释($t=-0.2845$, $P>0.05$)差异均无统计学意义。而 0.9%氯化钠 2 倍($t=-6.4686$, $P<0.05$)、4 倍稀释($t=-3.9842$, $P<0.05$),以及医用蒸馏水 4 倍稀释($t=-1.9957$, $P<0.05$)差异有统计学意义。**结论:**三碘甲状腺原氨酸 TT3S0 定标液 2 倍、4 倍稀释方法及医用蒸馏水 2 倍稀释方法均可以得到较为满意的结果。三碘甲状腺原氨酸(TT3)配套 TT3 定标液 S0 可用于标本 2 倍及 4 倍稀释。当定标液获取困难,蒸馏水 2 倍稀释同样可以运用。

关键词:稀释;化学发光免疫分析;儿童

中图分类号:R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)01-114-03

The Discussion of Dilution Method in Children using Chemiluminescent Immunoassay

GU Fan-lei, ZHAO Rui-fang, JI Zhi-ying, WU Ha[△], LI Yi-wei

(Department of Nuclear Medicine, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai, 201102, China)

ABSTRACT Objective: To address the problem of undersampling in child chemiluminescence immunoassay by investigating the influence of dilution medium and method on detection of serum triiodothyronine(Total T3) concentration. **Methods:** Serum triiodothyronine (Total T3) concentration, a routinely screened indicator in children physical examinations, was tested. Serum samples were collected from 30 children. UniCel DXI800 appliance produced by Beckman Coulter Inc was used to test the concentration of serum triiodothyronine as diluted two and four times by Access Total T3 Calibrators S0 (TT3S0), 0.9% sodium chloride injection, and sterile water for injection respectively. By comparing the concentration test results before and after dilution, the matrix effect on test results was investigated. Based on the experimental results, the workable diluents and dilution multiples can be identified to be applied in medical tests. **Results:** Paired t-tests between before-and after-dilution groups showed that the difference is statistically insignificant in samples diluted by TT3S0 two times ($t=0.7937$, $P>0.05$), TT3S0 four times dilution ($t=-0.2503$, $P>0.05$), and sterile water two times dilution ($t=-0.2845$, $P>0.05$). The difference is statistically significant in samples diluted by 0.9% sodium chloride injection two times ($t=-6.4686$, $P<0.05$), 0.9% sodium chloride injection four times ($t=-3.9842$, $P<0.05$) and sterile water four times ($t=-1.9957$, $P<0.05$). **Conclusion:** TT3S0 two times and four times dilution, as well as sterile water two times dilution can work as satisfactory dilution method. TT3S0 can be diluted 2 or 4 times to be applied as dilution medium. When it is difficult to get access to the above dilution medium, sterile water two times dilution can also be used.

Key words: Dilution; Chemiluminescent Immunoassay; Children

Chinese Library Classification(CLC): R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-114-03

前言

化学发光免疫分析技术(Chemi-luminescence Immunoassay, CLIA)^[1-2]根据放射免疫分析的基本原理,将高灵敏的化学发光技术与高特异性的免疫反应结合起来,建立了化学发光免疫分

析法。CLIA 具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作简便、无辐射、标记物有效期长并可实现全自动化等优点^[3]。

化学发光免疫分析技术广泛用于儿童内分泌类激素,以及生长发育、代谢类激素方面的检测。大部分全自动化学发光免疫仪器标本的需要量由测试需要量,反应管死腔量,探针多吸量以及样本容器死腔量构成,一个检测项目就需要大量的标本。但在儿童临床检验实际工作中,常常遇到 1、血液样本采集困难尤其是新生儿、早产儿、血球压积过高血清量少。2、当检测结果出现疑问需要复查。3、出现无法预计的机器故障导致标本浪费等各种原因,致使血清样本量难以满足检测需要。为解决

作者简介:顾凡磊(1981-),男,本科,技师,主要从事儿童化学发光免疫分析方面的研究,电话:13681963953,
E-mail:389593702@qq.com

[△] 通讯作者:吴哈,主治医师,主要从事核医学影像

(收稿日期:2013-05-21 接受日期:2013-06-15)

工作中的实际问题,将剩余少量的标本进行稀释再检测,如果要得出与原始数据相近的结果,适当的稀释液及稀释方法就尤为关键,从而减少病人为某一个检测项目再次抽血,缓解了病孩抽血困难及反复抽血的医患矛盾。本文作者通过对稀释试验的阐述并进行可行性探讨。通过对稀释液产生基质效应的分析,为检测项目选择适当的稀释介质、稀释方式提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器设备

检测设备为美国贝克曼库尔特公司 UniCel DXI800 Access 化学发光免疫分析仪。

1.2 试剂

试剂为该仪器配套检测试剂三碘甲状腺原氨酸(TT3)。批号 118056。

采用 BIO-RAD 质控品(批号 40250)对本实验检测项目三碘甲状腺原氨酸(TT3)试剂盒进行批内质控检测,低、中、高 3 个浓度水平 CV 均 < 5 %。

1.3 原料及样本

三碘甲状腺原氨酸(TT3)S0 定标液批号 116972(美国贝克曼库尔特公司)、0.9 % 氯化钠(成都平原药业有限公司)、医用蒸馏水(上海长征富民金山制药有限公司)。

样本采自本院 2012 年 1 月至 3 月间住院和门诊血清三碘甲状腺原氨酸(TT3)检测病人血清样本 30 例,均在检测线性范围内(13.02-800.78 ng/dl)。

1.4 稀释试验

将收集到的 30 例血清样本分别使用三碘甲状腺原氨酸(TT3)S0 定标液、0.9 % 氯化钠、医用蒸馏水作为稀释介质进行手工 2 倍(1:1)及 4 倍(1:3)稀释进行测定。

1.5 数据处理

所有数据采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用配对 t 检验;计算不同稀释组与原始值之间的相对偏移;使用 Pearson 相关分析法计算不同稀释组与原始组的相关系数,并拟合线性回归方程。数据分析采用 STATA11 统计分析软件,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

经配对 t 检验比较不同稀释组与原始值之间的差异,TT3S0 标准品 2 倍稀释 ($t = 0.7937, P > 0.05$)、4 倍稀释 ($t = -0.2503, P > 0.05$),以及医用蒸馏水 2 倍稀释($t = -0.2845, P > 0.05$),差异均无统计学意义。而 0.9 %氯化钠 2 倍稀释($t = -6.4686, P < 0.05$)、4 倍稀释($t = -3.9842, P < 0.05$),以及蒸馏水 4 倍稀释($t = -1.9957, P < 0.05$)差异有统计学意义。各稀释组结果与原始值之间的差值、Pearson 相关系数与直线回归方程如表 1 所示。

3 讨论

化学发光免疫分析原理可知,检测过程包含 4 个环节:加样—孵育—洗涤—光检^[4],对加样环节精度提出了更高的要求,其中病人血清的加注量直接影响待测物浓度的计算,在儿童化学发光免疫分析的实际工作中遇到的问题与成人不同,在加样环节会遇到标本量无法满足仪器检测需要量的问题,主要由于

表 1 稀释测定值与原始值的相关系数与回归方程(n=30)

Table 1 Correlation and Regression Analysis of the Relationship between Test Results before and after Dilution(n=30)

Test Groups	TT3S0	0.9 %sodium chloride injection	Sterile Water
		(2 times dilution)	(2 times dilution)
n	(2 times dilution)	30	30
T value (paired t-test)(p value)	30	-6.4686(p<0.05)	-0.2845(p>0.05)
Relative difference ^a	0.7937(P>0.05)	19.00%	0.62%
Correlation (r)	6.80%	0.989	0.985
Regression equation ^b	0.970	Y=7.5734+1.0865X	Y=-0.9706+1.0122X
R ²	Y=22.6037+0.8247X	0.9780	0.9710
Test Groups	0.9416	0.9 %sodium chloride injection	Sterile Water
	TT3S0 (4 times dilution)	(4 times dilution)	(4 times dilution)
n	30	30	30
T value (paired t-test)(p value)	-0.2503(p>0.05)	-3.9842(p<0.05)	-1.9957(p<0.05)
Relative difference ^a	3.57%	20.89%	3.97%
Correlation (r)	0.893	0.964	0.975
Regression equation ^b	Y=27.3630+0.8305X	Y=-8.1505+1.2474X	Y=-25.2194+1.2559X
R ²	0.7982	0.9300	0.9510

注: a 相对差值计算公式为: (测定值 - 原始值)/ 原始值 $\times$ 100 %; b 回归方程 Y 为测定值, X 为原始值。

Note: a Relative difference is calculated as: (test result after dilution - test result before dilution)/ test result before dilution $\times$ 100 %; b Regression equation Y= test result after dilution X= test result before dilution.

1、血液样本采集困难尤其是新生儿、早产儿、血球压积过高血清量少。2、当检测结果出现疑问需要复查。3、无法预计的机器故障导致标本浪费等各种原因。当出现以上情况为避免小儿反复抽血,抽血困难等因素,需要将个别标本稀释满足仪器检测的需要量,为了解决这个问题必须寻找合适的稀释介质和方法。通过大量关于稀释文献的阅读,发现文献中关于标本稀释的问题主要是讨论当检测结果超出仪器线性范围^[5-13],不能准确检测出浓度,从而将标本稀释再进行测定。而在大量的儿童检测结果中发现超出线性范围的结果很少,那何种稀释介质和方法可以用于线性范围内检测结果的稀释,从而解决实际工作中的问题。免疫化学分析中普遍存在基质效应影响测定准确性的问题^[13],不同稀释介质产生的基质效应对检测结果存在影响^[14,15]。选取原始数值在线性范围内的血清标本进行稀释实验,从结果中找出合适的稀释介质和方法。

本实验结果表明,通过配对 t 检验血清三碘甲状腺原氨酸(TT3)定标液 S0,2 倍、4 倍稀释以及医用蒸馏水 2 倍稀释结果与原始结数据最为接近,无统计学意义,可用于稀释。0.9 % 氯化钠和医用蒸馏水 4 倍稀释不可用。分析原因,TT3S0 定标液的主要成分是人血清含有零浓度的三碘甲状腺原氨酸。零浓度三碘甲状腺原氨酸人血清成份与样品血清基本相近,二者互相混合稀释力强。零浓度人血清胶体稳定性好,另外零浓度三碘甲状腺原氨酸人血清成分单一,排除了其它成分对样本血清的干扰,减少了基质效应对结果的影响。因此 TT3S0 作为稀释液无论是 2 倍还是 4 倍稀释结果相对偏差较小。医用蒸馏水不含杂质,基质效应影响相对较小。可用于稀释。当 4 倍稀释时可能是因为同一种稀释液随着稀释倍数的增加偏差也增大。故待测样本量太少不能用医用蒸馏水 4 倍稀释。结果同样显示 0.9 % 氯化钠不能用于稀释,0.9 % 氯化钠作为稀释液无蛋白质和血清成份,对样品血清稀释则缺少胶体稳定性,吸光度范围波动大,则稀释结果相对偏差增大。

化学发光免疫分析测定的稀释液和稀释方法在工作中经常会用到,直接影响到检测的结果是否准确。稀释液的选择既要简单方便,同时不影响结果的准确性^[16]。本文以三碘甲状腺原氨酸为例,发现试剂配套的 S0 定标液作为稀释液最好,而每一种检测项目的 S0 定标液的成分都是该试剂的零浓度人血清。所以其它检测项目的标本稀释同样可以借鉴。但是,是否可以用于超过 4 倍以上的标本稀释还需要探讨。医用蒸馏水是比较容易得到的稀释液,但试验显示只限于 2 倍稀释。0.9 % 氯化钠无法作为稀释液。

在儿童化学发光免疫分析的工作中,标本不够是经常遇到的问题,本文的意义在于对工作中遇到的实际问题进行了针对性的探讨以及用现有的资源进行解决,标本不够最好的方法是重新抽血再检测,如果在一定范围内可以用稀释的方法避免小孩反复抽血和抽血困难产生的医生与患者之间的矛盾,也是必不可少的。

参考文献(References)

- [1] Arakawa H, Macda M, Tsuji A. Enzyme immunoassay of cortisol by chemiluminescence reaction of luminol-peroxidase [J]. Bunseki Kagaku, 1977, 26: 322-326
- [2] 韩佩珍. 化学发光免疫分析 [J]. 国外医学放射医学核医学分册, 2000, 24(5): 196-201
Han Pei-zhen, Chemiluminescence immunoassay[J]. Foreign Medical Sciences (Section of Radiation Medicine and Nuclear Medicine), 2000, 24(5): 196-201
- [3] 修雁, 孙晓光, 许开平, 等. 化学发光分析与放射免疫分析的对照研究[J]. 中国临床医学, 2002, 7(4): 390-391
Xiu Yan, Sun Xiao-guang, Xun Kai-ping, et al. The Comparison of Chemiluminescence and Radioimmunoassay[J]. Clinical Medical Journal of China, 2002, 7(4): 390-391
- [4] 赵建文, 陈艳宁, 路士州. 化学发光免疫检测仪涉及的关键技术[J]. 发光学报, 2012, 33(12): 1381-1388
Zhao Jian-wen, Chen Yan-ning, Lu Shi-zhou. Key Technologies of Chemiluminescence Immunoassay Analyzer [J]. Chinese Journal of Luminescence, 2012, 33(12): 1381-1388
- [5] 胡伟, 毕永春, 宋景秋, 等. 不同稀释液对血清中 HBsAg 定量测定的影响[J]. 东南大学学报, 2010, 29(4): 464-466
Hu Wei, Bi Yong-chun, Song Jing-qiu, et al. Research on the influence of the different diluents to hepatitis B surface antigen in human serum[J]. J Southeast Univ (Med Sci Ed), 2010, 29(4): 464-466
- [6] 黄莹, 黄敏葵. 化学发光法检测 HCG 最佳稀释液及可靠稀释倍数[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(34): 8361-8362
Huang Ying, Huang Min-kui. The best Dilution Medium and reliable Dilution Ratio of Chorionic Gonadotropin with Chemiluminescence Immunoassay[J]. Chinese Journal of Misdiagnosis, 2008, 8(34): 8361-8362
- [7] 包安裕, 李艳, 苏汉文. 稀释介质与稀释方式对化学发光免疫法测定血清雌二醇浓度的影响 [J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 18(4): 271-273
Bao An-yu, Li Yan, Su Han-wen. Influence of Dilution Medium and Method on the Determination of Serum Estradiol Level with Chemiluminescence Immunoassay[J]. Labeled Immunoassays Clinical Medicine, 2010, 18(4): 271-273
- [8] 龙宪和, 陈玉梅, 周安宇. 零值混合血清和生理盐水对 PSA 高浓度稀释的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2008, 15(40): 251-257
Long Xian-he, Chen Yu-mei, Zhou An-yu. Influence of Zero Rooled Serum and Normal Saline of High Concentration Prostate Specific Antigen[J]. Labeled Immunoassays Clinical Medicine, 2008, 15(40): 251-257
- [9] 朱爱萍, 吕秀英, 郭书云. 不同稀释介质对 15 个生化项目测定的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(3): 214-216
Zhu Ai-ping, Lv Xiu-ying, Guo Shu-yun. The influence of different diluents on measurement of 15 items of biochemical parameters [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2009, 30(3): 214-216
- [10] 丁忠旗, 李永培, 盛强. 不同稀释液对高浓度 HCG 测定值的影响 [J]. 中华核医学杂志, 2002, 22(1): 39
Ding Zhong-qi, Li Yong-pei, Sheng Qiang. Influence of sample diluents on high HCG[J]. Chin J Nucl Med, 2002, 22(1): 39
- [11] 高云朝, 杨亚东, 陆汉魁. 稀释介质对化学发光免疫分析检测血清 HCG 的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2007, 14(2): 121, 72
Gao Yun-cai, Yang Ya-dong, Lu Han-kui. Influence of different diluents Oil HCG by chemiluminescence immunoassay [J]. Labeled Immunoassays Clinical Medicine, 2007, 14(2): 121, 72

(下转第 107 页)

- vascular dementia[J]. Panminerva Med, 2012, 54(3): 179-188
- [4] Korczyn AD, Vakhapova V, Grinberg LT. Vascular dementia [J]. J Neurol Sci, 2012, 322(1): 2-10
- [5] Meguro K, Tanaka N, Nakatsuka M, Nakamura K, Satoh M. Vascular lesions in mixed dementia, vascular dementia, and Alzheimer disease with cerebrovascular disease: the Kurihara Project [J]. J Neurol Sci, 2012, 322(1): 157-160
- [6] Inzitari D. Age-related white matter changes and cognitive impairment [J]. Ann Neurol, 2000, 47(2): 141-143
- [7] Valdes Hernandez Mdel C, Morris Z, Dickie DA, et al. Close correlation between quantitative and qualitative assessments of white matter lesions [J]. Neuroepidemiology, 2013, 40(1): 13-22
- [8] Scheltens P, Barkhof F, Leys D, et al. A semiquantitative rating scale for the assessment of signal hyperintensities on magnetic resonance imaging[J]. J Neurol Sci 1993, 114(1): 7-12
- [9] Fazekas F, Kleinert R, Offenbacher H, et al. Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities [J]. Neurology, 1993, 43(9): 1683-1689
- [10] Delano-Wood L, Bondi MW, Jak AJ, et al. Stroke risk modifies regional white matter differences in mild cognitive impairment[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(10): 1721-1731
- [11] Thal DR, Grinberg LT, Attems J. Vascular dementia: different forms of vessel disorders contribute to the development of dementia in the elderly brain[J]. Exp Gerontol, 2012, 47(11): 816-824
- [12] Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment[J]. J Am Geriatr Soc, 2005, 53(4): 695-699
- [13] Freitas S, Simoes MR, Maroco J, et al. Construct Validity of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) [J]. J Int Neuropsychol Soc, 2012, 18(2): 242-250
- [14] Larner AJ. Screening utility of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA): in place of--or as well as--the MMSE [J]. Int Psychogeriatr, 2012, 24(3): 391-396
- [15] Can SS, Gencay-Can A, Gunendi Z. Validity and reliability of the clock drawing test as a screening tool for cognitive impairment in patients with fibromyalgia[J]. Compr Psychiatry, 2012, 53(1): 81-86
- [16] Korner EA, Lauritzen L, Nilsson FM, et al. Simple scoring of the Clock-Drawing test for dementia screening [J]. Dan Med J, 2012, 59(1): A4365
- [17] Van Dijk EJ, Breteler MM, Schmidt R, et al. The association between blood pressure, hypertension, and cerebral white matter lesions: cardiovascular determinants of dementia study[J]. Hypertension, 2004, 44(5): 625-630
- [18] Van den Heuvel DM, ten Dam VH, de Craen AJ, et al. Increase in periventricular white matter hyperintensities parallels decline in mental processing speed in a non-demented elderly population [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006, 77(2): 149-153
- [19] Soriano-Raya JJ, Miralbell J, Lopez-Cancio E, et al. Deep versus periventricular white matter lesions and cognitive function in a community sample of middle-aged participants [J]. J Int Neuropsychol Soc, 2012, 18(5): 874-885
- [20] Delano-Wood L, Abeles N, Sacco JM, et al. Regional white matter pathology in mild cognitive impairment: differential influence of lesion type on neuropsychological functioning[J]. Stroke, 2008, 39(3): 794-799

(上接第 116 页)

- [12] 郑荣, 高艳红, 董振南. 高值血清 CA19-9 稀释测定的影响因素研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 18(4): 265-267
- Zheng Rong, Gao Yan-hong, Dong Zhen-nan. Research on The Influencing Factor of High Serum CA19-9 Dilution Assay[J]. Labeled Immunoassays Clinical Medicine, 2010, 18(4): 265-267
- [13] 阿拉法特, 邢文革. 制备样品基质效应的评估及控制[J]. 中国医药导刊, 2007, 9(2): 158-159
- Arafat, Xing Wen-ge. Evaluation and control of matrix in sample preparation[J]. Chinese Journal of Medicinal Guide, 2007, 9(2): 158-159
- [14] 王毓三. 基质效应[J]. 临床检验杂志, 2002, 20(增): 112-115
- Wang Yu-san, Matrix effects [J]. Chinical Laboratory Journal, 2002, 20(add): 112-115
- [15] 赵敏, 笪宏华, 杨贤芳, 等. 甲功五项化学发光免疫分析的基质效应对临床测值的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(19): 3714-3718
- Zhao Min, Da Hong-hua, Yang Xian-fang, et al. Clinical Test Interference by Matrix Effect of Five Analytes of Thyroid Using Chemiluminescent Immunoassay[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(19): 3714-3718
- [16] 戴玉柱, 王国政, 吴遥遥, 等. 临床免疫学试验标本稀释液的实验评价及选择原则[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(5): 52-57
- Dai Yu-zhu, Wang Guo-zhen, Wu Yao-yao, et al. Experimental Evaluation and Selection Principles of Sample Diluents in Clinical Immunological Test [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(5): 52-57