

作;同时也要重视检验前质量控制。

综上所述,STAR Evolution 检测 FIB 具有良好的方法学性能,可为临床提供可靠、准确的检验结果,很好地满足临床需要。

## 参考文献

- [1] 何洁静,李林海,全静雯,等. STA-R Evolution 全自动凝血分析仪常见故障处理和维护保养[J]. 中国误诊学杂志,2009,9(31):7637-7638.
- [2] 陆红兵,孙文旦,王妍,等. STA-Compact 型全自动血凝仪的性能评价[J]. 血栓与止血学,2005,11(4):174-175.
- [3] NCCLS. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[S]. Approved guideline-second edition, PA: NCCLS, 2004.
- [4] NCCLS. EP6-A Evaluation of the Linearity of quantitative measurement procedures[S]. Statistecal approved guide-

## · 临床研究 ·

# 磁微粒-吖啶酯化学发光游离甲状腺素检测试剂的研制及应用

张建锋

(英科新创/厦门科技有限公司,福建厦门 361022)

**摘要:**目的 研制定量检测游离甲状腺素的化学发光免疫试剂。方法 制备吖啶酯-T4 结合物作为信号标记物质,制备链霉亲和素-磁性微球作为固相载体,结合生物素标记的甲状腺素(T4)抗体,建立小分子竞争法免疫分析体系,分析其灵敏度、准确度和线性范围等性能指标。结果 灵敏度为 1.5 pmol/L,线性范围 2~75 pmol/L,批内不精密度 CV 为 5.62%~8.24%,批间不精密度 CV 为 7.08%~9.82%,与 T3 和 rT3 无交叉反应,37 °C 6 d 后发光值降幅为 10.7%~14.6%,检测 100 例临床血清标本,测定结果与进口试剂的相关性 r 值等于 0.9245。结论 该试剂具有灵敏度高、线性范围广、稳定性好、受环境影响小、检测结果准确等特点,可配套全自动化学发光免疫分析系统,应用于临床检测。

**关键词:**游离甲状腺素; 化学发光; 叩啶酯; 磁性微球

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.052

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)19-2773-03

甲状腺素(T4)是甲状腺滤泡细胞合成及分泌的激素。体内游离的甲状腺素(FT4)通过维持体温及刺激热量生成来调节正常生长与发育,其含量与甲状腺功能状态密切有关。检测 FT4 水平并结合其他甲状腺检验和临床表现,可对甲状腺功能亢进和甲状腺功能减退作出诊断<sup>[1]</sup>。血清 FT4 检测方法有平衡透析法、放射免疫测定法、酶免疫测定法、时间分辨荧光免疫法和化学发光免疫分析法等<sup>[2-6]</sup>。其中化学发光免疫分析法是最具发展前景的新型非放射性免疫标记技术。本研究成功制备小分子-吖啶酯结合物,基于小分子物质的竞争法检测原理,研制定量检测 FT4 的磁性微球-吖啶酯标记-化学发光免疫分析试剂。报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** LB960 型化学发光读数仪(Berthold 公司),2695-2696 液相色谱仪(Waters 公司),DXI800 全自动免疫分析系统(Beckman 公司)。T4 单抗、链霉亲和素(SA)购自罗氏公司;生物素、脱盐柱购自 Thermo fisher 公司;NSP-DMAE-NHS 购自上海迈拓公司;T4 标准品购自中国药品生物制品检定所;T4 纯品、BSA 购自 Sigma 公司,临床标本来自福建医科大学附属协和医院。其他试剂均购自阿拉丁试剂公司。

## 1.2 试剂组分制备

**1.2.1 SA 磁性微球制备** 按照摩尔比 2:1 称取适量氯化铁

line, PA: NCCLS, 2003.

- [5] NCCLS. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[S]. Approved guideline second edition, PA: NCCLS, 2000.
- [6] 杨春生,梁金山,刘艳梅,等.缓冲液在全自动血凝仪内摆放位置对纤维蛋白原测定的影响[J].国际检验医学杂志,2013,34(8):1055.
- [7] 何艳,洪流. STA-R 全自动血凝仪应用性能评价[J]. 河北医学,2011,17(2):263-266.
- [8] 陆明洋,邓海峰,李敏,等.肿瘤标志物室间质评结果的评价[J].标记免疫分析与临床,2011,18(2):135-136.
- [9] 许小英,于海涛,周存敏,等.某型号全自动血凝分析仪的性能评价[J].国际检验医学杂志,2012,33(11):1361-1362.

(收稿日期:2016-03-18 修回日期:2016-05-23)

和氯化亚铁,在超纯水中溶解混匀后加入氨水至终浓度为 0.5%,60 °C 搅拌反应 4 h,所得磁性微球用超纯水洗涤后,重新分散于 50% 乙醇中,再依次加入 0.5% 的 PEG4000、0.1% 的氨水和 0.1% 的正硅酸乙酯,60 °C 搅拌反应 16 h,获得改性的磁性微球用超纯水和无水乙醇交替洗涤后,重悬于 50% 乙醇中,再分别加入 0.05% 的氨水、0.5% 的四甲基氢氧化铵(TMA)和 2.5% 的 3-氨基三甲氧基硅烷,室温搅拌反应 16 h,即得表面修饰氨基的磁性微球。取适量该氨基磁性微球,用 PBS 缓冲液清洗并重悬,再加入 0.1% TMA 和 2.5% 的戊二醛,室温搅拌反应 30 min,之后用碳酸缓冲液清洗并重悬,超声分散后按 20 μg/mg 磁性微球加入 SA,37 °C 搅拌反应 16 h,然后分别加入 0.1% 的谷氨酸和 1% 的 BSA 继续反应 1 h, PBS 缓冲液(含 0.05% 的 tween-20)洗涤 3 次后,重悬于 1% BSA 中,超声分散,即得 SA 磁性微球。

**1.2.2 生物素化抗体制备** 取适量 Anti-T4 单抗,pH 7.4 的 PBS 缓冲液透析纯化后,加入 15 倍(摩尔比)已活化的长链碘化生物素 Sulfo-NHS-LC-Biotin,2~8 °C 反应 2 h,再转入室温继续反应 30 min,最后加入 100 倍(摩尔比)的赖氨酸反应 30 min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积甘油和 0.1% NaN<sub>3</sub>。

**1.2.3 叩啶酯-T4 结合物制备** 称取 T4 纯品适量,溶于 DMSO 中,配制浓度为 0.1 mmol/L 的溶液 A。再称取 NSP-

DMAE-NHS 适量,溶于无水 DMF 中,配制浓度为 10 mmol/L 的溶液 B。取溶液 B 5.0 mL,加入三乙胺(TEA)2 mg,再加入溶液 B 5.0 mL,最后用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至总体积 10 mL,室温搅拌反应 16 h,产物经制备色谱纯化,获得吖啶酯-T4 结合物。

**1.2.4 FT4 标准品配制** 称取适量 T4 标准品<sup>[7]</sup>,溶解于适量无激素血清中,配制成浓度为 0.1 mmol/L 的储备液,再用无激素血清将储备液稀释为 S0、S1、S2、S3、S4、S5 共 6 个校准点,浓度分别为 0、2、5、10、25、75 pmol/L。

**1.2.5 底物激发液配制** 激发液 A:0.1% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+0.1 mol/L 的 HNO<sub>3</sub>;激发液 B:0.2 mol/L NaOH+2% Triton X-100。

**1.3 方法及原理** 微孔中依次加入 50 μL 的标本、吖啶酯-T4 结合物、生物素化抗体和 SA 磁性微球,37 °C 温育 15 min,洗涤 5 次,加激发液 A 和 B 各 100 μL,读取相对发光值。反应原理为一步竞争法。标本中待测的游离 T4 抗原与吖啶酯标记的 T4 抗原相互竞争结合有限的生物素化抗体,最终吖啶酯所产生的发光值与标本中的 FT4 含量呈反向相关。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 灵敏度及线性范围** 重复测定零标准品 20 孔,计算 RLU 的均值( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ ),利用剂量-反应曲线计算发光值为( $\bar{x}-2s$ )时的浓度值,灵敏度为 1.5 pmol/L。将国家标准品稀释成不同浓度进行检测,通过 Log-Logit 数学模型拟合计算。标准品浓度为 2~75 pmol/L 的范围,线性相关系数( $r$ )较好。见图 1。

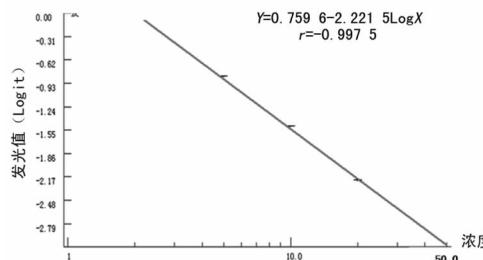


图 1 FT4 测定标准曲线(剂量-反应曲线)

**2.2 精密度** 在同一试验内和 3 个独立试验之间,测定 5 pmol/L 和 25 pmol/L 2 个质控品,每个质控重复 10 次。根据公式变异系数( $CV$ )= $s/\bar{x}$ ,计算其  $CV$ ,批内  $CV$  5.62%~8.24%[(5.15±0.29)~(24.86±2.05)],批间  $CV$  7.08%~9.82%[(5.06±0.36)~(25.30±2.48)]。

**2.3 特异度** 将易发生交叉反应的物质 T3 和 rT3 分别稀释至 500 ng/mL 和 50 ng/mL,作为标本进行检测,高浓度 T3 和 rT3 对检测无明显干扰,其浓度均小于 1.5 pmol/L。

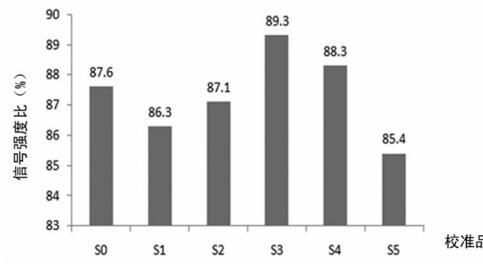


图 2 热稳定性试验结果

**2.4 热稳定性** 将全套试剂组分 37 °C 放置 6 d 后,分析其标准品测试性能,通过与放置前的信号强度比值,确定热稳定性变化幅度,均小于 15%。见图 2。

**2.5 准确度** 采用 FT4 标准品进行测试,使用 Log-Logit 数学模型拟合,分析实际测试值与理论值的偏差,准确度测试偏差小于 10%。见表 1。

表 1 准确度试验结果

标准品	S1	S2	S3	S4	S5
理论值(pmol/L)	2.00	5.00	10.00	25.00	75.00
实测值(pmol/L)	2.11	5.24	9.16	23.13	82.07
偏差(%)	5.50	4.80	8.40	7.48	9.43

**2.6 与其他厂家试剂的相关性** 用全套试剂对 100 例临床标本进行检测,高、中、低值标本分别为 21、29、50 例,与贝克曼 DXI800 全自动化学发光系统检测值进行比较,相关性较好( $r^2=0.8547$ )。见图 3。

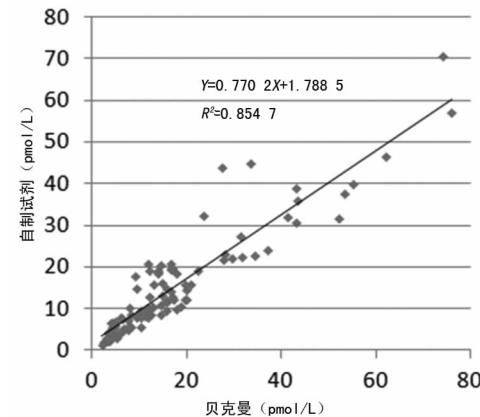


图 3 与贝克曼全自动化学发光免疫分析系统的相关性

## 3 讨 论

血液循环中绝大部分 T4 与载体蛋白相结合,只有 0.03% 的 T4 处于游离状态(FT4)。检测 FT4 不受甲状腺球蛋白影响,可特异地反映甲状腺的功能状态,因此在疾病诊断、病情评估、疗效监测等方面具有重要的临床应用价值,成为判断甲状腺功能最灵敏的一项参考指标<sup>[8]</sup>。

目前有研究报道,FT4 化学发光免疫检测方法的免疫固相载体主要有微孔和磁性微球 2 种<sup>[9-10]</sup>。磁性微球通过化学键偶联蛋白,具有结合牢固、重复性好、反应高效、易于储存和自动化等特点,是较为先进的固相载体。信号标记物主要是间接发光的酶标记,包括辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(ALP),而采用吖啶酯(AE)直接标记游离甲状腺素研究较少。AE 标记物背景信号低、发光效率高,且不需要酶催化,受环境因素干扰较小,且其底物比酶促系统底物更加稳定<sup>[11]</sup>。因此,吖啶类物质作为信号标记物,对试剂的灵敏度、精密度等都有很大提高。

本研究成功将吖啶酯作为信号物质与小分子甲状腺素进行标记,采用小分子竞争法原理,引入磁性微球作为固相载体,并结合链霉亲和素-生物素系统,开发出性能优良的 FT4 检测试剂,具有重要的临床应用价值,对相关科研也有一定的参考意义。

## 参 考 文 献

- [1] 刘冉,李振甲.游离甲状腺激素分析的现状与评价[J].标

- 记免疫分析与临床,2004,11(2):110-113.
- [2] Fang VS, Selenkov HA. Determination of free thyroxine in serum by low-temperature equilibrium dialysis[J]. Clin Chem, 1970, 16(3):185-190.
- [3] 陈创奇, 冯健明, 赵可辉, 等. 游离甲状腺素时间分辨荧光免疫试剂盒的研制[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(10): 1203-1205.
- [4] Frank LA, Petunin AI, Vysotski ES. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label[J]. Anal Biochem, 2004, 325(2):240-246.
- [5] Holm SS, Hansen SH, Faber J, et al. Reference methods for the measurement of free thyroid hormones in blood: evaluation of potential reference methods for free thyroxine [J]. Clin Biochem, 2004, 37(2):85-93.
- [6] 刘冉, 李振甲. 游离甲状腺激素分析的现状与评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2004, 11(2):110-113.

#### · 临床研究 ·

- [7] 徐立根, 孙有香, 焦岩. 甲状腺素工作标准品的研制[J]. 标记免疫分析与临床, 2003, 10(1):25-28.
- [8] 靳辉. 化学发光免疫分析在游离甲状腺素测定中的应用研究[D]. 保定: 河北大学, 2009.
- [9] Wang X, Chen H, Lin JM, et al. Development of a highly sensitive and selective microplate chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of free thyroxine in human serum[J]. Int J Biol Sci, 2007, 3(5):274-280.
- [10] Jin H, Lin JM, Wang X, et al. Magnetic particle-based chemiluminescence enzyme immunoassay for free thyroxine in human serum[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50(5):891-896.
- [11] 林金明, 赵丽霞, 王栩. 化学发光免疫分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.

(收稿日期: 2016-03-20 修回日期: 2016-05-25)

## 医院与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学研究

万小涛, 钟方财, 叶帮芬, 张有辉, 袁 翊

(四川省内江市第一人民医院检验科 641000)

**摘要:** 目的 探讨医院与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)产生耐药的分子流行病学特征。方法 采用培养法分离出 MRSA, PCR 法检测 mecA 基因并分型。结果 189 株 MRSA 标本甲氧西林决定因子(mecA)基因检测有 178 株为阳性, 进行 mecA 基因分型, SCCmec II 型 24 株, SCCmec III 型 101 株, SCCmec IV 型 51 株, 其他 2 株未能分型, 分型结果存在差异。结论 MRSA 以 SCCmec III 型为主, MRSA 的产生与抗菌药物的使用具有相关性。

**关键词:** 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 甲氧西林决定因子 A; 医院感染; 社区感染

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.053

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2016)19-2775-02

金黄色葡萄球菌无芽胞、鞭毛, 大多数无荚膜, 革兰染色阳性, 是临床感染的主要病原菌, 并逐渐向社区扩展。采用传统细菌鉴定及分型方法不能对其进行基因分型, 尤其是对病原体溯源分析时, 无法找出病原体变异的主要原因。本研究对分离出的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)株进行基因分型, 探讨使用抗菌药物与 MRSA 产生的相关性, 为临床用药提供相关依据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2013~2015 年该院住院和门诊患者标本, 经培养为 MRSA 的菌株, 采集患者病历资料分析抗菌药物的使用情况。

**1.2 仪器与试剂** 低温高速离心机, 恒温仪, ABI7500 实时荧光定量扩增仪。甲氧西林决定因子(mecA)基因检测试剂使用泰普生物有限公司试剂, SCCmec 基因分型试剂由上海生工生物公司合成。

### 1.3 方法

**1.3.1 金黄色葡萄球菌分离后 mecA 基因检测** 使用特异性引物直接扩增金黄色葡萄球菌及 mecA 基因。

**1.3.2 葡萄球菌染色体盒(SCCmec)基因分型** 根据研究报告<sup>[1]</sup>, 选择 4 对 PCR 引物, PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 40 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环。见表 1、2。

**1.3.3 社区感染 MRSA 诊断标准** 参照美国疾病预防控制中心诊断标准, 患者在门诊或入院 48 h 之内分离 MRSA 菌株; 1 年内无住院或与医疗机构接触史; 无留置各种导管及其他穿透皮肤的医用装置。其他统计为医院感染 MRSA。

表 1 SCCmec 分型扩增引物序列表

目的基因	产物长度(bp)	核苷酸序列(5'~3')
mecA-IS431	359	F:TATACCAAACCGGACAACCTAC R:CGGCTACAGTGATAACATCC
IS1271	415	F:GCCACTCATAACATATGGAA R:CATCCGAGTGAAACCCAAA
CCrA2-B2	937	F:ATTCGCCTTGATAATAGCCTTCT R:TAAAGGCATCAATGCACAAACACT

表 2 特异性基因片段与各型 SCCmec 关系

SCCm	特异性基因片段			
	ec 基因型	mecA-IS431	IS1271	ccrA2-B2
II	—	+	—	
III	—	—	+	
IV	+	+	—	