

放免法测定地高辛血药浓度方法探讨

李开鑫 李文 于 阔 郑赞元 俞 丹 林月华 盛荣宗

(厦门市第一医院, 厦门 361003)

放免法测定地高辛(Digoxin)血药浓度是目前使用较广的方法, 尤其适于基层医院。由于体内存在内源性高辛样免疫活性物质(endogenous digoxinlike immunoreactive substances, DLIS)与地高辛抗体有交叉反应; 国外许多文献报道, 新生儿、妊娠妇女、肾衰、肝损害及心血管疾病等病人血清中 DLIS 水平显著高于正常人, 妨碍地高辛的准确测定^[1,2]。国外对 DLIS 研究较多, 消除 DLIS 干扰的方法不断涌现。国内研究较少, 由于人种和试剂盒不同, 我们进行了初步探索, 在注重选择具高特异性抗体试剂盒同时, 改变德普放免试剂盒测定条件以降低 DLIS 的干扰, 并从方法学上探讨可靠性。

实验材料和仪器

1.1 正常人血清 我院例行体检健康人群(近期未服用过洋地黄类药物及干扰测定药物, HBsAg⁻)中获得, 由检验科提供

1.2 脐带血清 我院妇产科顺产健康产妇(近期未服用过洋地黄类药物及干扰测定药物, HBsAg⁻)中获得, 由妇产科提供; 回收率实验的脐带血清由10例产妇脐带血清混合而成。

1.3 地高辛固相二抗放免试剂盒(由北京北方免疫试剂研究所提供, 产品代号: PK-8608)

1.4 地高辛包被抗体计数放免试剂盒(产品代号: TKDI₁)和质控血清(CON_R, Lot12)(均由德普生物和医学产品有限公司提供)

1.5 FJ-2011微机放免测量仪(西安国营二六二厂)

实验方法和结果

2 地高辛放免测定法

2.1 北方固相二抗法, 按说明书条件操作(37°C, 30 min)

2.2 德普包被抗体计数法(A法), 按说明书条件(37°C, 温育1 h)

2.3 德普包被抗体计数预温育法(B法), 所用标准品及各试剂用量同A法。将抗体和抗原混合, 37°C温育6 h后, 加标记进一步温育1 h, 以下操作同A法。

3 质量控制

3.1 与含 DLIS(“零” Digoxin)标本交叉活性结果见表1

表1 三种方法与正常人血清、脐带血清的交叉活性

方 法	类 别	例数	Digoxin相当量(ng/ml)			
			$\bar{x}$	s	$\bar{x} \pm t_{(n-1)} 0.05 S_{\bar{x}}$	
北方30'	正常人血清	21	0.55	0.20	0.55 ± 0.09	
	脐带血清	27	0.67	0.27	0.67 ± 0.11	
A 法	正常人血清	28	0.04	0.07	0.04 ± 0.03	
	脐带血清	22	0.05	0.07	0.05 ± 0.03	
B 法	正常人血清	9	0.02	0.06	0.02 ± 0.05	
	脐带血清	10	0.01	0.03	0.01 ± 0.02	

3.2 准确度(回收率实验)^[3]

将高值标准品用脐带混合血清和零血清分别双份系列稀释, 这样脐带血标本 Digoxin 浓度降低, DLIS 浓度升高, 所得各样本双管测定

表2 A法、B法脐带血清系列稀释回收率实验

稀释比例	A 法			B 法		
	观察值(ng/ml)	期待值(ng/ml)	回收率(%)	观察值(ng/ml)	期待值(ng/ml)	回收率(%)
4:8	2.60	2.42	107.4	2.97	2.89	102.8
2:8	1.41	1.26	111.9	1.20	1.25	96.0
1:8	0.78	0.67	116.4	0.66	0.69	95.7

3.3 灵敏度^{[3][4]}

A法灵敏度:说明书给定最小检出值 0.1 ng/ml

B法灵敏度:将10个零标准品(最大结合)连同一套非零标准品和质控用B法进行实验,算出10个零管的每分计数均值和标准偏差。然后以均值作为零点作出标准曲线(由电脑拟合自动打印),随SD增加 Digoxin 的表现浓度可由标准曲线推算出来

表3 B法灵敏度

每分计数 均值±s	低于最大 结合数量	% B/B ₀	表观浓度	大约的灵敏度
10491±264	1.6s	95.8	0.09	0.1ng/ml
	2s	94.7	0.12	
	2.4s	93.7	0.14	

参照A法,本分析的最小检出值可定义为低于

最大结合计数两个s时的表观浓度,或B/B₀为95%的浓度。即B法的最小检出值为 0.1 ng/ml。

3.4 精密度^[5]

将质控标本分三管连续四批测定

$$\text{总批内 } s = \sqrt{(s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2)/4}$$

$$\text{总批内 } CV = \frac{\text{总批内 } s}{\text{每批均值 } \bar{x}}$$

$$\text{总批间 } s = \sqrt{(\text{各批 } \bar{x} \text{ 的 } s)^2 - \frac{(\text{总批内 } s)^2}{\text{管数}}}$$

$$\text{总批间 } CV = \frac{\text{总批间 } s}{\text{每批均值 } \bar{x}}$$

结果如表4

3.5 标准曲线的稳定性^[6]

以ED₂₅、ED₅₀、ED₇₅为指标比较10次测定的批间重复性,采用s作为警戒线作质控图,数值见表5

表4 A法B法批内精密度和批间精密度

方 法	质控种类	每批均值 $\bar{x}$ (ng/ml)	总批内 s (ng/ml)	总批间 s (ng/ml)	总批内CV (%)	总批间CV (%)
A 法	QC ₁	0.68	0.06	0.05	8.8	7.4
	QC ₂	1.55	0.05	0.18	3.2	11.6
	QC ₃	3.33	0.12	0.40	3.6	12.0
B 法	QC ₁	0.63	0.02	0.06	3.2	9.5
	QC ₂	1.43	0.09	0.21	6.3	14.7
	QC ₃	2.97	0.12	0.39	4.0	13.1

表5 以ED₂₅、ED₅₀、ED₇₅为指标的批间重复性

方法	测定次数 指 标	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均 值	标准差	批间CV
												(ng/ml)	(ng/ml)	(%)
A 法	ED ₂₅ (ng/ml)	3.73	3.81	3.69	3.33	3.84	3.37	3.09	4.38	3.86	4.14	3.72	0.38	10.2
	ED ₅₀ (ng/ml)	1.56	1.22	1.47	1.29	1.27	1.19	1.23	1.28	1.44	1.61	1.36	0.15	11.0
	ED ₇₅ (ng/ml)	0.42	0.63	0.59	0.56	0.50	0.46	0.51	0.51	0.56	0.44	0.52	0.07	13.5
B 法	ED ₂₅ (ng/ml)	3.77	3.14	3.28	3.39	3.58	3.14	4.21	2.67	3.38	3.59	3.41	0.42	12.3
	ED ₅₀ (ng/ml)	1.32	1.31	1.30	1.32	1.43	1.10	1.43	1.25	1.51	1.54	1.35	0.13	9.6
	ED ₇₅ (ng/ml)	0.51	0.55	0.52	0.53	0.59	0.46	0.54	0.53	0.58	0.63	0.54	0.05	9.3

讨 论

4 目前测定地高辛血药浓度的方法有RIA、EMIT、FPIA等, DLIS与地高辛抗体有交叉反应^[1], 干扰上述各种免疫法的准确测定。国外近年研究表明: 超滤^[7]和HPLC^[8]分离地高辛结合各种免疫测定能较好消除DLIS干扰, 但设备昂贵, 另外一些方法只能消除部分干扰, 试剂盒对交叉反应的程度也不同。因此, 我们在选择具高特异性抗体的试剂盒同时, 参阅文献^[9]并考虑到固相放射免疫温育时间较短的特点^[10], 拟将德普试剂盒预温育6 h, 以降低DLIS干扰。质控显示: 该法在方法学上对具高值DLIS患者准确测定地高辛血药浓度有一定探索意义。

4.1 北方试剂盒对正常人血清和脐带血清(零地高辛)均提供了较高的伪Digoxin值, 见表1; 柯永胜^[11]同种试剂盒同法正常人血清测定值 $0.43 \pm 0.04 \text{ ng/ml} (\bar{x} \pm S\bar{x}, n=20)$ 。此外, 北方试剂盒未提供配套质控, 给临床操作带来一定困难。

4.2 德普试剂盒A法和B法质控表明: 小德普试剂盒在含DLIS(零Digoxin)的正常人血清和脐带血清测定值均近“0”, 见表1; 但A法在富含DLIS脐带血清中加入Digoxin回收分析仍显示“假”增高, 且随DLIS浓度增高干扰程度增高, 见表2, 这与国外报道一致; 因此, Graves^[7]认为除选择一种低交叉活性的抗体外还要分析地高辛回收率(2) Digoxin回收率B法比A法普遍降低, B法更接近100%, 见表2; (3)灵敏度^[3]: 二法最小检出值均为 0.1 ng/ml ; (4)二法精密密度^[6]: 低、中、高质控总批内 $CV < 10\%$, 总批间 $CV < 15\%$; (4)标准曲线的稳定性^[6]: 以 ED_{25} 、 ED_{50} 、 ED_{75} 为指标比较10次测定的批间重复性, 批间 $CV < 15\%$; 采用SD作为警戒线作质控图, 显示二法均能保持较好批间重复性。

5 放免法的质控是一个复杂而费时但十分重要的工作。一个新方法的建立, 需要经过同一实验室的连续性实验及不同实验室内严密质量控制^[6]。我们的实验次数不多, 质控指标也不尽完善, 尤其是回收率设计, 孕妇血中DLIS干扰并不能完全代替高DLIS病人干扰; 稳定性实验指标也不健全等。因

此, 我们希望国内临床药学工作者能密切配合, 共同探索一个具有普遍适用性的较好消除干扰的方法, 为临床提供较为正确的Digoxin值。

参 考 文 献

- 1 Valdes R. Endogenous digoxin-like immunoreactive factors: impact on digoxin measurements and potential physiological implications. Clinchem, 1985; 31, 1525~1532
- 2 Valdes R, Graves SW. Protein binding of endogenous digoxin-immunoreactive factors in human serum and its variation with clinical condition. J Clin Endocrinol Metab, 1985; 60, 1135~1143
- 3 德普包被抗体计数地高辛放射免疫检测试剂盒说明书, 由德普生物和医学产品有限公司提供
- 4 尹伯元主编, 邓尚平审校. 放射免疫分析在医学中的应用. 原子能出版社, 1991: 13
- 5 马寄晓, 刘秀杰主编, 王世真, 周前主审. 实用临床核医学. 原子能出版社, 1990: 76~77
- 6 苏学良, 罗·盖伦主编. 临床生物化学实验数据处理. 天津科学技术出版社, 1988: 164
- 7 Graves SW, Sharma K, Chandler AB. Methods for eliminating interferences in digoxin immunodssays caused by digoxin-like factors. Clin Chem, 1986; 32, 1506~1509
- 8 Gault MH, Longrich L, Dawe M, et al. Combined liquid Chromatography/radioimmunoassay with improved specificity for serum digoxin. Clin Chem, 1985; 31, 1272~1277
- 9 Morris R. Pudck, David W. Seccombe, Beryl E. Jacobson, et al. Effect of Assay Conditions on Cross Reactivity of Digoxin-like immunoreactive substance(s) with Radioimmunoassay Kits. Clin Chem, 1985; 31, 1806~1810
- 10 尹伯元编著. 放射免疫测定基础. 天津科学技术出版社, 1985: 451
- 11 柯永胜, 杨尚印, 严文魁等. 慢性充血性心衰血清内源性洋地黄因子浓度变化意义. 中华内科杂志, 1990, 29(1): 11