

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.07.0759

• 专题报道 •

环境温度对 Luminex 流式荧光免疫分析法测定糖类抗原 242 结果的影响

贺琤雯[△], 邹雅如[△], 鲁琼, 薛苗, 汪怀周*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院实验诊断科, 上海 200433

[摘要] **目的** 分析定标和测定时不同环境温度下 Luminex 流式荧光免疫分析法测定糖类抗原 242 (CA242) 结果的差异, 评价环境温度对测定结果的影响。**方法** 选择高值和中值 2 个不同浓度的标本, 分别采用 Luminex 流式荧光免疫分析法在 11 个温度点 (18.3、20.1、21.5、22.2、24.1、25.0、25.4、26.5、27.4、28.5、30.0 °C) 重复测定 CA242 5 次, 以定标时环境温度 (25 °C) 下的检测结果的平均值为参比值, 计算不同环境温度下检测结果的偏倚。随机选择 49 例涵盖高、中、低值的标本, 分别采用 Luminex 流式荧光免疫分析法在 20、25 和 30 °C 下对 CA242 进行测定, 比较测定结果并分析其相关性。**结果** 中值标本和高值标本在 18.3 °C 下测定结果的偏倚分别为 -35.6% 和 -29.4%。49 例标本在 20 °C 下的测定结果与 25 °C 下的测定结果差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 并且二者具有相关性 (回归方程: $Y = 0.6769X + 0.3747$, $R^2 = 0.9905$); 在 30 °C 下的测定结果与 25 °C 下的测定结果差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 并且二者具有相关性 (回归方程: $Y = 0.8966X + 0.2270$, $R^2 = 0.9994$)。**结论** 环境温度过低或过高会对 Luminex 流式荧光免疫分析法测定 CA242 产生负性影响, 测定时应使环境温度保持相对恒定且控制在定标温度 ± 4 °C 范围内。

[关键词] 流式荧光免疫分析; 生物学肿瘤标志物; 糖类抗原 242; 环境温度

[中图分类号] R 446.112 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)07-0759-04

Effect of ambient temperature on determination of carbohydrate antigen 242 by Luminex flow cytometry fluorescence immunoassay

HE Cheng-wen[△], ZOU Ya-ru[△], LU Qiong, XUE Miao, WANG Huai-zhou*

Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To analyze the difference of the carbohydrate antigen 242 (CA242) results measured by Luminex flow cytometry fluorescence immunoassay with different calibrations and different ambient temperatures, so as to evaluate the effect of ambient temperature on the measurement results. **Methods** Two CA242 samples with different concentrations (median- and high-value) were selected and the determination was repeated at 11 temperature points (18.3, 20.1, 21.5, 22.2, 24.1, 25.0, 25.4, 26.5, 27.4, 28.5, and 30.0 °C) for 5 times by Luminex flow cytometry fluorescence immunoassay. The average value of the detection result at the calibration temperature (25 °C) was taken as the reference value, and the biases of the detection results at different ambient temperatures were calculated. Forty-nine CA242 specimens covering high-, median- and low-values were examined at 20, 25 and 30 °C by Luminex flow cytometry fluorescence immunoassay, and the results were compared and correlation analysis was carried out. **Results** The biases of the median- and high-value samples at 18.3 °C were -35.6% and -29.4%, respectively. The difference between the measurement results at 20 °C and 25 °C was significant for the 49 specimens ($P < 0.001$), and there was a linear correlation between them ($Y = 0.6769X + 0.3747$, $R^2 = 0.9905$). The difference of measurement results was significant between 30 °C and 25 °C ($P < 0.001$), and there was a linear correlation between them ($Y = 0.8966X + 0.2270$, $R^2 = 0.9994$). **Conclusion** Too low or too high ambient temperature has a negative effect on the determination of CA242 by Luminex flow cytometry fluorescence immunoassay. The ambient temperature should be kept relatively constant and controlled within the range of calibration temperature ± 4 °C.

[收稿日期] 2019-02-18 **[接受日期]** 2019-02-26

[作者简介] 贺琤雯, 硕士, 主管技师. E-mail: hezw107@163.com; 邹雅如, 硕士, 技师. E-mail: yarouzou@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162070, E-mail: whz_sh@163.com

[Key words] flow cytometry fluorescence immunoassay; biological tumor markers; carbohydrate antigen 242; ambient temperature

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(7): 759-762]

流式荧光免疫分析(flow cytometry fluorescence immunoassay)又称悬浮阵列(suspension bead array)或液态芯片(liquid chip),是利用荧光编码微球作为载体,共价交联针对被检物的抗原、抗体或探针,通过两束激光分别识别编码微球和检测报告分子的荧光强度,可以检测同一样品中的多个不同分子^[1]。流式荧光免疫分析技术检测平台因具有高通量的优点,在肿瘤标志物、自身抗体、过敏原和病原微生物等方面的检测均得到广泛应用^[2]。糖类抗原 242(carbohydrate antigen 242, CA242)是一种唾液酸化的糖脂类抗原,在胰腺、结直肠组织的恶性肿瘤中常呈高表达,临床上被用作胰腺癌、结直肠癌的辅助诊断及预后判断^[3-4]。我们在对 Luminex 流式荧光免疫分析法测定血清 CA242 的性能评价过程中发现,测定时环境温度与定标时环境温度的差异会对检测结果造成较明显的影响,现分析报告如下。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 TesmiF3999 全自动加样仪(上海透景生命科技股份有限公司),Luminex-200 多功能流式点阵分析仪(美国 Luminex 公司)。CA242 定量检测试剂盒(流式荧光免疫分析法,上海透景生命科技股份有限公司),批号为 2018A001,线性范围为 6~500 U/mL。室内质控品(特殊肿瘤)购自上海市临床检验中心。

1.2 标本准备 按试剂说明书的参考范围(<20 U/mL),取 CA242 中值和高值血清标本各 1 例;随机选择涵盖检测线性范围的高、中、低值临床标本 49 例。上述标本来源于 51 例患者,其中男 26 例、女 25 例,年龄为 14~83 岁(中位年龄为 59 岁)。本研究经海军军医大学(第二军医大学)长海医院伦理委员会审批。

1.3 检测结果偏倚分析 按照 CA242 定量检测试剂盒的测定参数进行设置和检测,用试剂盒配套的定标品进行定标,定标通过(Luminex-200 多功能流式点阵分析仪检测温度为 25℃),室内质控在控。取临床 CA242 中值水平和高值水平标本各 1 例,作为检测标本。将 CA242 检测仪器定标时

的环境温度设定为 25℃,通过室内空调调节环境温度至 18.3、20.1、21.5、22.2、24.1、25.0、25.4、26.5、27.4、28.5、30.0℃(仪器说明书要求工作温度为 15~30℃),共 11 个环境温度进行检测,每例标本重复检测 5 次,检测结果以平均值表示。以中值和高值标本在环境温度为 25℃(定标时环境温度)时的测定平均值为参比值,分别将不同环境温度下检测结果的平均值与参比值进行比较,计算偏倚(%).按检测系统生产厂家说明书的要求偏倚不超过 10% 为通过,统计不合格情况。

1.4 临床标本测定 将 49 例临床标本在环境温度为 20、25 和 30℃ 时分别进行检测,检测方法同前,每例标本测定 1 次。以环境温度 25℃ 的测定结果为参比值,对 49 例临床标本在环境温度 20℃ 和 30℃ 下的测定结果进行比较。

1.5 精密度验证 将环境温度控制在(25±1)℃,参照国家卫生行业标准(WS/T 492-2016)要求^[5],使用 2 个浓度水平的质控品,每个浓度重复测定 3 次,连续测定 5 d,计算其精密度,用变异系数(coefficient of variation, CV)表示。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。重复测定的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。49 例临床标本在环境温度 20℃ 和 30℃ 下的测定结果与参比值的比较采用 Wilcoxon 秩和检验。两组变量之间的相关性分析采用一元线性回归分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 不同环境温度检测结果的偏倚 与定标时环境温度(25℃)的检测结果相比,高值标本和中值标本在环境温度 18.3℃ 和 20.1℃ 下的检测结果均出现不同程度的负偏倚,中值标本在 18.3℃ 和 20.1℃ 时测定结果的偏倚均超出 10%,高值标本在 18.3℃ 时测定结果的偏倚为 29.4%,超过了检测系统允许的偏倚范围;其余环境温度点测定的结果均显示了较好的重复性,偏倚均未超出 10%(表 1)。环境温度升高时对检测结果的影响较小,在温度升高 5℃ 时也同时产生负性偏倚,但均未超出 10%。

表 1 不同环境温度下中值和高值标本流式荧光免疫分析法测定 CA242 检测结果的偏倚

Tab 1 Biases of CA242 results of median- and high-value samples measured by flow cytometry fluorescence immunoassay at different ambient temperatures

Ambient temperature $\theta/^\circ\text{C}$	Median-value sample		High-value sample	
	Measured value $z_B/(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}), \bar{x} \pm s$	Bias (%)	Measured value $z_B/(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}), \bar{x} \pm s$	Bias (%)
18.3	17.9 \pm 5.2	-35.6	108.1 \pm 3.4	-29.4
20.1	24.9 \pm 1.1	-10.4	138.1 \pm 5.0	-9.9
21.5	28.2 \pm 1.8	1.4	159.9 \pm 1.3	4.4
22.2	27.2 \pm 1.6	-2.2	159.3 \pm 3.5	4.0
24.1	29.2 \pm 0.8	5.0	153.6 \pm 5.7	0.3
25.0	27.8 \pm 0.9		153.2 \pm 5.0	
25.4	29.4 \pm 0.4	5.8	151.3 \pm 3.5	-1.2
26.5	28.4 \pm 1.4	2.2	154.3 \pm 4.2	0.7
27.4	28.5 \pm 0.5	2.5	154.8 \pm 4.7	1.0
28.5	27.6 \pm 0.5	-0.7	151.0 \pm 2.8	-1.4
30.0	27.1 \pm 0.3	-2.5	146.1 \pm 1.7	-4.6

 $n=5$

CA242: Carbohydrate antigen 242

2.2 不同环境温度对临床标本检测结果的影响 以 49 例临床标本在环境温度为 25 $^\circ\text{C}$ 时的检测结果为参比值, 将相同的标本分别在环境温度为 20 $^\circ\text{C}$ 和 30 $^\circ\text{C}$ 时的检测结果与参比值进行比较, 结果显示 20 $^\circ\text{C}$ 和 30 $^\circ\text{C}$ 下的检测结果与参比值相比均降低 ($Z=-6.093$, $P<0.001$; $Z=-6.093$, $P<0.001$)。分析环境温度为 20 $^\circ\text{C}$ 和 30 $^\circ\text{C}$ 时的检测结果与参比值的相关性, 结果显示环境温度为 20 $^\circ\text{C}$ 的检测结果与参比值有很好的相关性 (图 1A), 回归方程为 $Y=0.676\ 9X+0.374\ 7$ ($R^2=0.990\ 5$, $P<0.001$), 在医学决定水平处

(20 U/mL) 的偏倚为 -30.4%; 环境温度为 30 $^\circ\text{C}$ 时, 检测结果与参比值亦有很好的相关性 (图 1B), 回归方程为 $Y=0.896\ 6X+0.227\ 0$ ($R^2=0.999\ 4$, $P<0.001$), 在医学决定水平处 (20 U/mL) 的偏倚为 -9.2%, 但线性回归方程的斜率减小, 致 CA242 水平越高的标本负偏倚越明显。

2.3 精密验证结果 通过对环境温度的严格控制, 检测结果显示了较好的稳定性。浓度为 46.4 U/mL 的室内质控品批内 CV 为 2.19%, 批间 CV 为 3.75%; 浓度为 130.6 U/mL 的室内质控品批内 CV 为 1.32%, 批间 CV 为 2.12%。

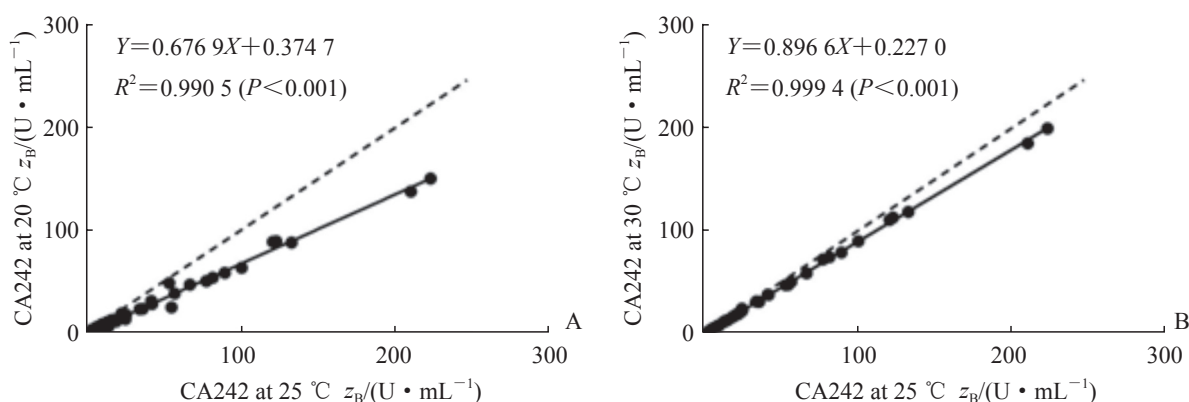


图 1 不同环境温度对 49 例临床标本检测结果的影响

Fig 1 Effect of different ambient temperatures on the test results of 49 clinical samples

A: Correlation of the measurement results at ambient temperature of 20 $^\circ\text{C}$ and 25 $^\circ\text{C}$; B: Correlation of the measurement results at ambient temperature of 30 $^\circ\text{C}$ and 25 $^\circ\text{C}$. CA242: Carbohydrate antigen 242

3 讨论

流式荧光免疫分析法具有检测通量高、标本用量少、检测速度快、灵敏度高且线性范围广等优点^[6-7]。Luminex 技术平台作为流式荧光免疫分析技术的一个开放式平台,已有体外诊断研发公司基于此技术开发体外诊断试剂。研究显示,上海透景生命科技股份有限公司开发的 CA242 等检测试剂盒分析性能指标良好,具有较高的检测效率^[8]。TesmiF3999 全自动加样仪和配套 Luminex-100 系统实现了加样、孵育、检测的自动化,减少了人工操作的步骤。进行多点定标后,同一批号的试剂盒在较长时间内都可使用,比较稳定。

基于免疫学原理的检测方法可受多种因素影响,如异嗜性抗体、类风湿因子、“Hook 效应”等,Luminex 技术平台同样也有相关报道^[9-10],但环境温度的变化是否会对该检测系统的检测结果产生影响仍不明确。本研究在不同的环境温度条件下测定中值和高值血清标本 CA242 水平,以评价环境温度变化对检测结果的影响。结果发现,以定标时环境温度 25 °C 测定的结果为参比值,环境温度降低 4 °C 以上时,检测结果可出现明显的负偏倚,影响该检测系统的分析性能。对 49 例涵盖高、中、低值临床标本的检测结果也显示,环境温度为 20 °C 和 30 °C 条件下测定的结果与 25 °C 条件下测定的参比值相比产生了显著的负偏倚,检测结果的差异具有统计学意义。这些负偏倚可能使高于参考区间的检测报告出现假性降低甚至落入参考区间内,也可能使含有高水平靶抗原的标本检测结果显著负偏离实际水平,从而严重影响临床诊治。

环境温度的改变会对 Luminex 技术平台的检测结果产生明显的影响,究其原因,我们认为可能与以下两点有关:(1)不同温度下抗原和抗体结合的效率不同,低温时结合效率降低;(2)温度过低或过高时荧光测定值发生偏差。Luminex-200 系统作为开放的检测平台,仪器暴露于室温中,但 TesmiF3999 全自动加样仪具有独立的温浴模块,实时控制温度,因此在进行荧光检测前不受室温的影响,受环境温度影响的环节主要是最后的荧光检测。杨恩环和周宇琼^[8]使用流式荧光免疫分析法测定 CA242 等肿瘤标志物时,每批测定均进行标准品定标,这样可以使定标时环境温度与标本检测

时完全一致,避免环境温度对检测结果的影响。TesmiF3999 全自动加样系统一次定标后,定标曲线可供同批号试剂多批次临床标本检测使用,较为方便,且节约成本。然而,由于多批检测临床标本,检测时的环境温度如果不是人为控制,较难完全与定标时的环境温度一致,使用同一定标曲线就会产生较大的系统误差。Luminex-200 多功能流式点阵分析仪本身有较灵敏的温度检测系统,可实时显示荧光检测时的温度,仪器也能记录定标时温度。当我们将环境温度严格控制在定标时环境温度 ± 1 °C 范围内时,检测结果显示了较好的稳定性。因此,在使用此类技术平台检测临床标本测定时,应对环境温度严格控制,以获得稳定的检测结果。

[参考文献]

- [1] VIGNALI D A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays[J]. *J Immunol Methods*, 2000, 243(1/2): 243-255.
- [2] 张立营,刘国凤,李克峰. 液相芯片技术在医学检验诊断中的应用[J]. *实用医药杂志*, 2016, 33: 179-180.
- [3] DOU H, SUN G, ZHANG L. CA242 as a biomarker for pancreatic cancer and other diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 162: 229-239.
- [4] 于海涛,曲义坤,于海波,赵斌,李晶,赵晓莲. 外周血内基质金属蛋白酶-7、糖类抗原 242 在直肠癌诊断及术后评估中的价值[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38: 2098-2100.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证: WS/T 492-2016[S/OL]. (2016-07-07)[2019-02-16]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2016/07/20160719110237175.pdf>.
- [6] 徐京昕,鲁劲松,张宏印. 流式荧光免疫法检测多肿瘤标志物的方法学评价[J]. *检验医学*, 2010, 25: 167-170.
- [7] PARSA S F, VAFAJOO A, ROSTAMI A, SALARIAN R, RABIEE M, RABIEE N, et al. Early diagnosis of disease using microbead array technology: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1032: 1-17.
- [8] 杨恩环,周宇琼. 流式荧光法检测多肿瘤标志物性能评估及临床应用[J]. *临床检验杂志*, 2012, 30: 960-963.
- [9] 谢冲,唐群业,王国民. Luminex 液相芯片同时检测 tPSA 和 fPSA 方法的建立与评价[J]. *复旦学报(医学版)*, 2010, 37: 391-395.
- [10] JAIN D, CHOUDHURI J, CHAUHAN R, DORWAL P, SHARMA D, TIWARI A K, et al. False negative single antigen bead assay: is it always an effect of prozone?[J/OL]. *J Clin Lab Anal*, 2018, 32. doi: 10.1002/jcla.22237.

[本文编辑] 孙岩