文章编号:1000-5404(2012)03-0201-05

论著

应用FITC系统建立非均衡竞争游离三碘甲腺原氨酸(FT_3)化学发光法

孔海霞[1],刘 萍[1,2],田云霞[2],宋启超[2],王世鑫[1,3],翁亚光[1] (400016 重庆,重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室[1];300162 天津,博奥赛斯(天津)生物科技有限公司[2];天津市东丽区东丽医院院长室[3])

[摘要] **目的** 制备抗人T_3多克隆抗体,应用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanat,FITC)系统开发新型非均衡竞争技术,建立一种能广泛应用于临床检测游离三碘甲腺原氨酸(free triiodothyronine,FT_3)的方法。**方法** 以T_3-牛血清白蛋白(bovin serum albumin,BSA)为抗原免疫新西兰大白兔,制备抗人T_3多克隆抗体,亲和层析法纯化并联接辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)。用FITC标记T_3-类似物。采用抗FITC抗体包被发光板,FITC-T_3类似物与抗FITC抗体结合形成固相抗原,通过非均衡竞争法原理,固相抗原与血清中FT_3竞争结合抗T_3抗体-HRP,通过标准曲线计算FT_3浓度,建立方法学评价并与直接用T_3-牛血清γ球蛋白(Bovine serum gamma globulin,BGG)包被(非FITC系统)的检测系统相比较。将本方法应用于临床120份血清标本的检测,定量结果与德国罗氏2010电化学发光全自动免疫分析系统(Elecsys 2010)定量结果进行比较。**结果** 抗体经酶联免疫吸附实验证明对T_3、具有高度特异性。应用FITC系统建立的非均衡竞争化学发光免疫分析标准曲线的线性$R>0.99$,线性范围0.25~50 pg/ml,分析灵敏度为0.25 pg/ml,精密度测试批内、批间变异系数$CV<5\%$,检测结果优于非FITC系统的检测。对于临床血清标本的检测,其定量结果与德国Elecsys 2010定量试剂盒的定量结果具有很好的相关性,相关系数$r=0.962\ 2$,两者的测定值无显著性差异。**结论** 制备的抗人T_3多克隆抗体特异性强,以FITC系统为平台建立的非均衡竞争FT_3检测化学发光法具有精密性好、灵敏度高、稳定性强,有良好的准确性,达到临床测定的需求,可代替进口化学发光产品用于临床样本的检测。

[关键词] 异硫氰酸荧光素;非均衡竞争;游离三碘甲腺原氨酸;类似物;多克隆抗体;化学发光分析法
[中图法分类号] R392-33; R392.11 [文献标志码] A

Detection of free triiodothyronine in human serum by non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay using FITC system

Kong Haixia[1], Liu Ping[1,2], Tian Yunxia[2], Song Qichao[2], Wang Shixin[1,3], Weng Yaguang[1] ([1]Key laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Peteck Biotechnology Co., Ltd., Tianjin, 300162, [3]Tianjin Dongli Hospital, Tianjin, 300162, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare a polyclonal antibody (mAb) against human triiodothyronine (T_3) and to establish a new method of non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay (CLIA) with FITC system for clinical determination of serum free triiodothyronine (FT_3). **Methods** Polyclonal antibody of T_3 was prepared by immunizing New Zealand rabbits with human T_3-bovine serum albumin (BSA), purified by affinity chromatography, and labeled with horse radish peroxidase (HRP). FITC was conjugated to T_3-analogue, and microwell was coated by anti-FITC antibody. FITC-T_3 analogue would combine to anti-FITC antibody to form solid phase T_3-analogue on microwell. FT_3, if existed in sample, would combine to T_3 antibody-HRP and compete with solid phase T_3-analogue. The amount of the complex would be measured through enzymatic chemiluminescence immunoassay reaction. Compared with those of the method coating by T_3-bovine serum gamma globulin (BGG) (non-FITC system), the sensitivity, precision, stability and clinic correlation of this method were evaluated. This method as well as Roche Elecsys 2010 System was used in 120 clinical serum samples for FT_3 determination. **Results** ELISA showed the prepared antibody had a high specificity to T_3. The linear range and sensitivity of human serum FT_3 detected by chemiluminescence immunoassay with FITC system were 0.25 to 50 pg/ml ($R>0.99$) and 0.25 pg/ml, respectively, and the coefficients of variability

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30771788)
[通信作者] 王世鑫,E-mail:wshx-001@163.com
翁亚光,E-mail:yaguangweng@126.com

within and among batches were all under 5%, and these results were better than those of the non-FITC system. The results obtained from chemiluminescence immunoassay with FITC system were correlated with those of the Elecsys 2010 system, and the correlation coefficient was 0.962 2. **Conclusion** The antibody against human T_3 with high purity and specificity is successfully prepared. The quantitative diagnostic kit for FT_3 by non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay using FITC system provides a rapid, sensitive and accurate determination of FT_3 and is suitable for clinical diagnosis.

[**Key words**] fluorescein isothiocyanate; non-equilibrium competition; free triiodothyronine; analogue; polyclonal antibody; chemiluminesence immunoassay

Supported by General Program of the National Natural Science Foundation of China (30771788). Corresponding authors: Wang Shixin, E-mail: wshx-001@163.com; Weng Yaguang, E-mail: yaguangweng@126.com

游离三碘甲腺原氨酸(free triiodothyronine, FT_3)是血清中游离的三碘甲腺原氨酸,因浓度不受结合蛋白的影响,在临床上具有重大意义,测定血清中 FT_3 的浓度对诊断甲状腺功能亢进、甲状腺机能减退及针对此病症采取的治疗措施尤其重要[1-3]。临床检测 FT_3 的方法有放射免疫分析、酶免疫分析、免疫荧光分析、化学发光免疫分析和电化学发光免疫分析等[4-7]。其中,化学发光免疫分析具有灵敏度高、特异性强、检测范围宽,特别是无放射性危害等优势[8],在逐步取代放射免疫分析和酶免疫分析。但是,目前国内市场中,化学发光检测所用仪器和试剂90%以上依赖进口,价格昂贵,订货不便,因此,有必要开发国产高性能的化学发光检测试剂。

FITC 是分子量为389的荧光素分子,具有强抗原性,极易与免疫球蛋白形成稳定的结合物,并且不影响抗体结合抗原的活性[9-10]。在化学发光板上包被较高浓度的抗 FITC 抗体,可避免直接包被抗原引起的变异过大的问题,有更好的均一性。用 T_3-类似物取代 T_3 作为的竞争抗原[11-12],增加了 FT_3 校准品(或样品)与抗 T_3 抗体-HRP 抗体的结合力,使灵敏度大为提高。以此为基础本研究拟以 FITC 系统为平台建立非均衡竞争检测 FT_3 化学免疫发光方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

2.5 kg 左右的雄性新西兰大白兔,购自军事医学科学院实验动物中心。弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、T_3 类似物、T_3 纯品、L-甲状腺素(L-T_4)、D-甲状腺素(D-T_4)、二碘甲腺原氨酸(L-diiodotyrosine)、3,5-二碘-L-甲腺原氨酸(3,5-diiodo-L-tyrosine)、反三碘甲状腺原氨酸(rT_3)、FITC 均购自美国 Sigma 公司。抗 FITC 抗体购自美国 Fitzgerald 公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自北京博陵科为生物有限公司。羊抗兔 IgG-HRP 购自北京中杉公司。Hi Trap™ Protein A 亲和层析柱购自 Pharmacia 公司。Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪、BIOS-401 型微孔板脱水机由博奥赛斯(天津)生物科技有限公司提供。自动化酶免分析仪 SM-3 由美国 Thermo 公司提供。紫外分光光度计7252PC 由上海光谱仪器有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 抗原的合成 使用碳化二亚胺试剂将甲酯化-T_3 和 BSA、牛血清 γ 球蛋白(Bovine serum gamma globulin, BGG)偶联。

1.2.2 抗人 T_3 多克隆抗体的制备 取2只雄性新西兰兔(体质量2.2~2.4 kg,由军事医学科学院实验室动物中心提供),将200 μg/只 T_3-BSA(溶于0.9%生理盐水中)与等体积的弗氏完全佐剂充分混合乳化后,于家兔后肢及皮下多点注射,以后每2周免疫1次(以弗氏不完全佐剂取代弗氏完全佐剂,其余同上)。免疫接种4~5次,每次免疫后的第10~14天,从兔耳静脉采血,应用间接 ELISA 测定抗体效价,直至制备获得满意的抗体效价,制备相应的兔抗血清。

1.2.3 抗体的纯化和抗体浓度的测定 取含有抗 T_3 多克隆的家兔血清,用60%的硫酸铵分级沉淀,将沉淀溶解,用 Biogel P-10 柱除盐后,冻干浓缩。随后用 pH 7.4 的 0.1 mol/L Tris-HCl 溶解,采用 Hi Trap™ Protein A 亲和层析柱上样后分别以 pH 7.4 的 100 mmol/L 的 Tris-HCl 和 pH 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液为流动相洗脱,分步收集。收集到的 IgG 再用装有 L-T_4、D-T_4、L-diiodotyrosine、3,5-diiodo-L-tyrosine、rT_3 Sepharose4B 洗脱纯化,收集吸附后的多抗,经 ELISA 检测证明其是否与 L-T_4、D-T_4、L-diiodotyrosine、3,5-diiodo-L-tyrosine、rT_3 交叉反应,纯化的结果见 SDS-PAGE 图。用 BCA 蛋白定量试剂盒对抗体进行蛋白定量,抗 T_3 抗体浓度为2.34 mg/ml。

1.2.4 FT_3 化学发光免疫检测方法

1.2.4.1 包被板的制备 FITC 系统包被板的制备:将抗 FITC 抗体用包被缓冲液稀释成5 μg/ml 的溶液,每孔100 μl 加入微孔板中,37 ℃包被2 h 后,去除孔内液体,洗板3次,拍干后,按照每孔200 μl 加入封闭液,37 ℃封闭2 h,去除孔内液体,拍干后烘干,加入适量干燥剂,2~8 ℃密封保存。

非 FITC 系统包被板的制备:将 FT_3-BGG 用包被缓冲溶液稀释至2.5 μg/ml,其余步骤同 FITC 系统包被板的制备。

1.2.4.2 FITC-T_3 类似物的制备 参考改良 Marsshall 法,用 FITC 标记 T_3 类似物,游离的 FITC 经 PBS 充分透析除去,并用紫外分光光度计测定 D(495)及 D(280)值。

1.2.4.3 酶结合抗体的制备 采用常规高碘酸钠氧化法制备,制备后加入等体积甘油,混匀后 -20 ℃存放保存。

1.2.4.4 FT_3 化学发光检测方法 FITC 系统化学发光检测

方法(图 1):取包被抗 FITC 抗体的发光板,每孔加入 50 μl FITC-T_3类似物, 50 μl 校准品或样品,50 μl 酶结合抗体,混匀,37 ℃反应 1 h。洗板,加入发光液后,避光 5 min 后在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。

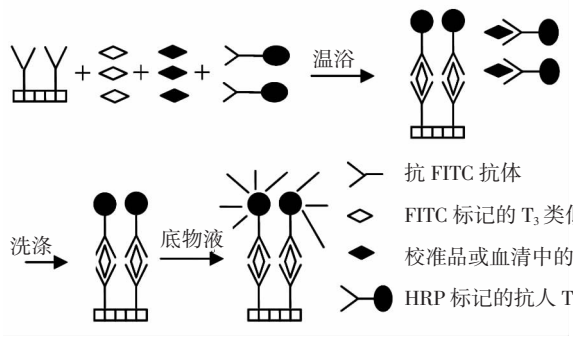


图 1　FITC 系统化学发光检测方法示意图

非 FITC 系统化学发光检测方法(图 2):取包被有 FT_3-BGG 的发光板,每孔加入 50 μl 校准品或样品,50 μl 酶结合抗体,混匀,37 ℃反应 1 h。洗板,加入发光液后,避光 5 min 后在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。

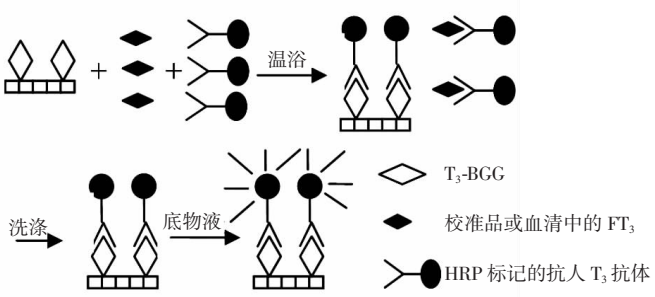


图 2　非 FITC 系统化学发光检测方法示意图

1.2.5　FT_3化学发光法方法学评价

1.2.5.1　线性范围　　用 Log(x)-Logit(Y)数学模型进行线性回归处理数据,得到校准品剂量-反应曲线的回归直线,样品中 FT_3 和由光学系统检测的相对光单位(relative light unit, RLU)之间的关系成反比,校准品线性相关系数绝对值不小于 0.990 0。

1.2.5.2　分析灵敏度　　做标准曲线,测定 10 孔零值发光值,取 10 孔零值发光值的平均值($\bar{x}$),并求出 10 孔零值发光值的标准差(s),用平均值减去 2 个 s,将此值代回标准曲线,所测得的浓度即为分析灵敏度,分别测出 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的分析灵敏度。

1.2.5.3　精密性　　每天测 10 孔高值质控品(Quality control materials of high value, QcH)和 10 孔低值质控品(Quality control materials of low value, QcL),分别计算出 QcH 和 QcL 的 10 孔的浓度 $\bar{x}$、s、变异系数(coefficient of variation, *CV*),算出的 *CV* 作为分析内精密度;每天不同操作者测 1 次,连续 3 d,3 d 所测 30 孔的值求出的 *CV* 作为分析间精密度,分别求出 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的批内、批间精密性。

1.2.5.4　特异性　　临床上 T_3的主要交叉反应因子是 L-T_4、D-T_4、L-diiodotyrosine、3,5-diiodo-L-tyrosine、rT_3,用不同的稀释液将其分别稀释至 200、1 000、10、1 000、230 ng/ml,用试剂盒检测分析交叉反应性。

1.2.5.5　临床参考区间的建立　　标本来自于中国人民武装警察部队医学院附属医院,有效标本 524 例,其中男 220 例,平均年龄 47.5 岁(16~87 岁),女 304 例,平均年龄 45.8 岁(14~86 岁),均为空腹静脉血自然凝固后,离心分离出血清,排除溶血、脂血或黄疸的血清标本,-20 ℃保存,分析前一次复融,充分摇匀使用。根据血样标本的检测结果确定本试剂盒的参考区间(95% 的可信区间)。

1.2.5.6　与进口发光免疫分析系统比较　　随机选取 120 份血清样本,采用本方法对血样标本进行检测,并使用进口罗氏试剂盒同日内对该批血样标本进行检测,将两种检测方法的结果进行相关性分析及检测值不一致性分析。

1.2.5.7　稳定性　　取同一批两个试剂盒,1 个放入 37 ℃烘箱,1 个放入 4 ℃冰箱,两个试剂盒各放置 7 d,然后拿出一起平衡至室温后做标准曲线,比较两个试剂盒的校准品或样品检测值的有无显著性差异。

1.2.6　统计学分析　　本检测系统与进口发光检测系统对比试验的结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计分析软件对两组数据进行配对 t 检验(检验水准 $\alpha = 0.05$)、线性相关和回归分析评价;采用配对资料的 χ^2 检验分析临床检测结果不一致的原因。

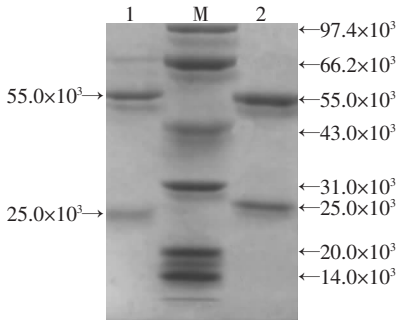
2　结果

2.1　抗体的效价

间接 ELISA 测得其效价为 1∶16 000。

2.2　抗体的纯化

SDS-PAGE 结果显示抗体蛋白在 55×10^3 及 25×10^3 有 1 条明显条带,说明制备的抗体纯度较高(图 3)。



1:纯化后的多抗;M:蛋白质标准;2:T_3 多克隆抗体(阳性对照)

图 3　SDS-PAGE 检测纯化后的抗人 T_3 抗体

2.3　线性范围和灵敏度

应用 FITC 系统检测试剂的线性范围为 0.206~50 pg/ml,以 5 个系列浓度校准品和 1 个零值校准品建立标准曲线,线性相关系数的绝对值 $|R| = 0.999$,经计算得其分析灵敏度为 0.206 pg/ml。非 FITC 系统化学发光检测试剂的线性相关系数的绝对值 $|R| = 0.997\ 9$,分析灵敏度为 0.75 pg/ml。FITC 系统检测方法的分析灵敏度优于非 FITC 系统化学发光检测。

2.4　精密度

由表 1 可见应用 FITC 系统测定 FT_4精密度优于非 FITC 系统化学发光方法,其批内变异小于 5%,应用非 FITC 系统测定的批内变异在 10% 左右,两独立样本的 t 检验有显著性差异。

应用FITC系统测定FT_3的QcL、QcH批间变异分别为4.27%、4.49%,而应用非FITC系统测定的批间变异在11%左右。

表1 FITC系统化学发光法与非FITC系统化学发光法测定FT_3的批内精密度($n=10$)

指标	FITC系统		非FITC系统	
	浓度(pg/ml)	*CV*	浓度(pg/ml)	*CV*
QcL				
第1批	2.48±0.10	4.12	2.54±0.27[a]	10.76
第2批	2.50±0.11	4.45	2.55±0.27[a]	10.64
第3批	2.49±0.12	4.67	2.59±0.24[a]	9.27
QcH				
第1批	19.14±0.94	4.92	19.78±1.99[a]	10.04
第2批	19.71±0.70	3.57	19.16±1.8[a]	9.38
第3批	19.59±0.94	4.80	19.19±0.18[a]	9.36

a:$P<0.05$,与FITC系统组比较

2.5 特异性检测

临床上FT_3的主要干扰因子主要有L-diiodothyrone、3,5-diiodo-L-tyrosine、L-T_4、D-T_4、rT_3,应用建立的FITC系统化学发光方法测定的交叉反应的结果均小于0.01%。

2.6 临床参考区间的确定

选择524例健康人群血清标本,应用FITC系统检测建立的本法临床参考区间(95%可信区间)为0.87~4.42 pg/ml。

2.7 FITC系统检测与进口试剂系统(Elecscys2010)测定值的比较

应用建立的FITC系统与进口的罗氏公司Elecscys2010系统同时测定,Bioscience PETECK96-1测定值为(3.61±3.87)pg/ml,Elecsys2010测定值为(3.85±3.88)pg/ml。经配对资料t检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.8 FITC系统检测与进口试剂相关性比较

使用进口的罗氏公司试剂和FITC系统检测方法同时测定临床标本120例,以本方法测定FT_3含量为纵坐标,以进口试剂测定值为横坐标,利用EXCEL软件进行线性回归分析,计算出相关系数r和回归系数,并对相关系数进行t检验。所得直线方程为Y=1.186X−1.573,线性回归系数为1.186,相关系数为0.962 2。相关系数进行t显著性检验(检验水准$\alpha=0.05$),两种方法测定的FT_3值密切相关($P<0.001$)。回归系数为0.962 2,表明两种方法之间测定的FT_3值符合性良好,可推广临床应用。

2.9 FITC系统检测测定值不一致的分析

120例样本中有5例(占4.17%)测定值结果不一致,χ^2检验,$P=1.125$,无显著性差异。对不符合的标本,经罗氏公司和本研究检测系统重复检测,检测值没有明显改变。使用雅培产品进行重测,测得3例与罗氏结果一致,2例与本研究的结果一致,经分析没有规律性的偏差产生,多为临界偏差,所以考虑产生不一致的原因是由样本病例的个体差异、两种测定原理的差别及操作随机误差造成的。

2.10 FITC系统检测值稳定性分析

取同批生产两个试剂盒,一个在4 ℃储存,另一个置37 ℃烘箱储存,7 d后拿出同时进行试验,结果见表2,配对资料t检验无显著性差异。

表2 稳定性实验结果

校准品浓度(pg/ml)	4 ℃检测值(pg/ml)	37℃检测值(pg/ml)	4 ℃/37 ℃
0	0	0	
0.6	0.60	0.64	0.93
2.84	2.83	3.19	0.89
5	5.10	5.09	1.00
13.5	13.18	14.94	0.88
50	50.46	55.01	0.92
相关系数	0.999 95	0.999 39	
回归系数	2.41	2.42	

3 讨论

血浆中游离三碘甲腺原氨酸(FT_3)是实际进入靶细胞与受体结合而发挥作用的激素物质[13]。1989年Hamburger[14]推荐以高灵敏度的FT_3、FT_4为甲状腺功能测定的首选方法被临床广泛采纳。

本研究是通过抗FITC-FITC系统将抗原间接包被在微孔板上,标记抗体的方法,与传统方法包被抗体标记抗原方法比较可有效避免了加样延迟时间对反应的影响。若采用传统方法在包被抗体的微孔板中依次加入校准品或样品和酶结合物,当加入校准品后反应即开始,微孔板中的抗体会先与校准品或样品中的抗原反应,再与酶结合物中的抗原反应,这样就会产生反应延迟时间,导致酶结合物中抗原竞争力度弱于先加入的样品或校准品中的抗原。而本方法则是将抗原间接包被在微孔板上,然后依次加入校准品或样品和酶结合物,当加入样品或校准品时,样品或校准品中的抗原不与板子上的抗原反应,只有当最后加入酶结合物时反应才开始,这样不会产生加样延迟时间对反应引起的影响。此外,用抗FITC抗体间接包被可以加大包被浓度,提高包被板的精密性,此法优于直接包被抗原,精密性大为提高,批内*CV*%最小可达到3.57%,最大为4.92%,批间*CV*%小于5%。引用抗FITC-FITC放大系统在CLIA中应用具有诸多优点:① FITC易与抗原结合,标记率高,标记物易于分离;② FITC标记物十分稳定,保证了FITC-抗FITC系统的稳定性。

由于T_3-类似物与抗T_3抗体结合的亲和性小于T_3抗原对抗T_3抗体结合的亲和性,本研究采用T_3-类似物取代T_3作为的竞争抗原增加了FT_3校准品(或样品)与抗T_3-HRP抗体的结合力,使灵敏度大为提高,从实验结果可以看出使用T_3-类似物作为固相抗原,灵敏度达到0.25 pg/ml,已达到进口试剂盒的灵敏度标准。更重要的是本研究建立FT_3化学发光检测方法在临床符合性方面大为提高,120份血清标本检测结果表明与使用进口试剂盒测定结果具有良好的相关性,相关系数为0.962 2。我们会进一步扩大样本量并与不同

进口试剂盒进行检测值的比对,对实验条件进行优化。

在试剂盒的研发过程中不可避免地要考虑成本问题,我们实验所用的校准品是以去激素血清将T_3纯品配制成浓缩液然后稀释成不同梯度,并以Abbott Axsym全自动化学发光系统对其进行标定,抗体是我们自己研发,可有效地降低研发成本。每人次的检测费用低于罗氏检测费用的1/2。

针对中小型医院样本量少,一个试剂盒要2次或多次使用,校准品点位浪费检测样本的问题,我们现在正在研究"两点定标"或"一点定标"来改善现在的"6点定标",从医院的角度进一步降低成本。

综上所述,本研究建立应用FITC系统建立的非均衡竞争FT_3化学发光检测方法已具备灵敏度高、测定范围广、精密性好、稳定性高、临床符合性佳的优点,适合临床应用。

参考文献:

[1] 倪旭东. 甲状腺功能亢进患者的检测分析[J]. 当代医学, 2011, 17(12): 92-93.
[2] 黄建荣, 薛一峰, 蒋华振. FT3、FT4化学发光免疫分析的方法学指标及评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(1): 55-56.
[3] Thienpont L M, Van-Uytfanghe K, Beastall G, *et al*. Report of the IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests; Part 2: free thyroxine and free triiodothyronine[J]. Clin Chem, 2010, 56(6): 912-920.
[4] 林英. 化学发光法与放射免疫法检测血清FT3、FT4及TSH的比较[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(5): 71-72.
[5] Ambrosio R, Sannino M L, Cortese L, *et al*. Validation and application of an immunofluorimetric assay for detection of serum free triiodothyronine and free thyroxine concentrations in buffalo (Bubalus bubalis) under various physiological conditions[J]. J Vet Diagn Invest, 2009, 21(5): 668-673.
[6] Semlitsch G, Buchinger W, Reiterer E, *et al*. Measurement of free triiodothyronine (FT3) using an electrochemiluminescence immunoassay in patients with autoantibodies to triiodothyronine[J]. Acta Med Austriaca, 2000, 27(2): 54-55.
[7] 谭晓武, 史宝玉, 孙晓琦, 等. 化学发光法快速检测FT3, FT4, TSH[J]. 临床军医杂志, 2005, 33(6): 736-737.
[8] 魏慧斌, 林金明, 吴丹凝, 等. 水体及人体液中的雌二醇的高灵敏度化学发光酶免疫分析[J]. 分析化学, 2007, 35(3): 320-324.
[9] Ghosh S, Howlett M, Boag D, *et al*. Interference in free thyroxine immunoassay[J]. Eur J Intern Med, 2008, 19(3): 221-222.
[10] Vira S, Mekhedov E, Humphrey G, *et al*. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling[J]. Anal Biochem, 2010, 402(2): 146-150.
[11] 周新, 涂值光. 临床生物化学和生物化学检测[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 385-386.
[12] 林珍, 王栩, 任世奇, 等. 化学发光酶免疫法测定游离三碘甲腺原氨酸[J]. 分析化学, 2008, 36(5): 609-613.
[13] Dong J, Liu W, Wang Y, *et al*. Developmental iodine deficiency resulting in hypothyroidism reduces hippocampal ERK1/2 and CREB in lactational and adolescent rats[J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 149.
[14] Harmer I J, Samuel D. The FITC-anti-FITC system is a sensitive alternative to biotin-streptavidin in ELISA[J]. J Immunol Methods, 1989, 122(1): 115-121.

(**收稿**:2011-09-26;**修回**:2011-11-11)
(编辑 邓强庭)

(上接191页)

这时根据患者情况采取气管内插管或行气管切开术。例如:若伤口处喉或气管暴露有裂口可由此处插入气管插管,但有时选择较为困难,盲目插管有可能插管不成功,进一步损伤呼吸道,并可能形成假道。但是遇到气管断裂严重,甚至气管下端回缩到胸腔内时,气管切开难度加大,此时找准气管下端并提起后迅速插入气管插管可及时解决患者的呼吸困难,究竟是选择气管插管或气管切开术目前仍有争论,但倾向气管切开术[1],应视患者喉损伤的严重性和条件。本组20例患者行气管切开术,解除呼吸困难,为抢救赢得了时间。对于咽喉气管开放性损伤或怀疑有喉软骨损伤时应首先选择气管切开术,保持呼吸道通畅。

开放性喉外伤一般都伴有颈部血管损伤,发生大出血,导致失血性休克。对于出严重伤者应首先压迫止血,采用纱布填塞止血同时找出损伤血管结扎止血[2],在压迫止血同时注意不要阻塞气道引起窒息。对于已不出血但有大量血块的伤者,应尽量准备完善后在全麻下探查颈部血管、甲状腺,清理血块后查看是否有继续出血点,彻底止血。同时接诊后应即刻建立静脉通道,输血、补液纠正休克。

及时探查和修复喉腔,保持喉支架完整性,最大程度恢复喉的生理功能,这是预防喉狭窄的关键。应遵循以下原则:①尽量多保留软组织,对于软组织缺损多者尽量用皮瓣修复。②对于污染伤口要仔细用双氧水和生理盐水冲洗,必要时放置引流。③仔细逐层缝合伤口,除对损伤血管结扎止血外,还应注意喉周围组织结构有无损伤,本组中有一伤者手术中修复喉腔后,由口腔中出血,仔细检查后发现咽腔损伤,给予重新打开伤口,缝合后血止。④喉软骨膜尽量保留,骨折软骨尽量复位固定。⑤喉软骨支架损伤严重者,修复后喉腔内放置扩张子以防喉狭窄[3]。

参考文献:

[1] Bell R B, Verschueren D S, Dierks E J. Management of laryngeal trauma[J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2008, 20(3): 415-430.
[2] 谢晞衷,崔志民,孟宏,等. 颈部大血管开放性损伤的急救与修复[J]. 中国危重病急救医学,2000,12(8):508.
[3] Hwang S Y, Yeak S C. Management dilemmas in laryngeal trauma[J]. J Laryngol Otol, 2004, 118(5): 325-328.

(**收稿**:2011-10-17;**修回**:2011-11-25)
(编辑 张 维)