

酶联免疫吸附试验中即刻法质控图前三点分析

梅传亮¹ 刘奕宇¹ 陈晔¹

[摘要] **目的:**分析酶联免疫吸附试验(ELISA)即刻法存在质控图警告点偏多的问题,改进即刻法前两板次的检测条件,使绘制的质控图精准并更具监测意义。**方法:**ELISA 法进行乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和人类免疫缺陷病毒抗体(HIV Ab)检测,更换新的批号试剂盒时预做两个板次,然后进行常规标本的检测,依据前三板次的质控值绘制 ELISA 即刻法质控图。绘制 20 个点后对质控图进行数据处理分析,分别将去除预做两点和保留预做两点的手工加样与仪器加样两种操作方式绘制的即刻法质控图进行比较,验证 ELISA 即刻法质控图的影响因素。**结果:**HBsAg 和 HIV Ab 的检测结果显示仪器加样与手工加样绘制的去除预做两点的即刻法质控图差异有统计学意义($P < 0.01$),且仪器加样的稳定性均优于手工加样。不去除预做两点的仪器加样与手工加样检测 HIV Ab 所绘制的即刻法质控图差异无统计学意义($P > 0.05$),但检测 HBsAg 绘制的质控图仪器加样优于手工加样($P < 0.01$)。**结论:**仪器加样对检测 HBsAg 和 HIV Ab 均较手工法更稳定。预做两点可提高手工加样即刻法质控图的稳定性,减少警告点数量,降低操作方式对质控图造成的系统误差。

[关键词] 酶联免疫吸附试验;即刻法;质控数据

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2019.04.011

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Discussion on ELISA instant quality control chart

MEI Chuanliang LIU Yiyu CHEN Ye

(Ningbo Center Blood Station, Ningbo, 315010, China)

Corresponding author: CHEN Ye, E-mail: 296469662@qq.com

Abstract Objective: To analyze several problems in the instant method of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), such as multiple warning points in the quality control chart and how to improve the detection conditions of the instant method, so that the quality control chart we made can be more accurate. **Method:** We used ELISA to detect the titer of HBsAg and HIV Ab two times before replacing the new batch number, after that detected the routine sample. The ELISA "instant method" quality chart was made according to the quality control value of the first three times. After added 20 points into the chart, we processed and analyzed the data in the chart. We compared the difference between the chart that add samples by instrument or by handcraft, and verified the influence of the first two points in the chart. **Result:** The result of the detection of HBsAg and HIV Ab showed that the chart of added samples by instrument had significant differences between the chart of added samples by handcraft without put first two points in the chart ($P < 0.01$). While put first two points in the chart, we found that different methods to add sample had no significant difference in the detection of HIV Ab ($P > 0.05$). But in the detection of HBsAg, added samples by instrument was better than by handcraft ($P < 0.01$). **Conclusion:** In the detection of either HBsAg or HIV Ab, the instrument operation was more stable than handmade operation. Added first two points in quality chart could improve stability, reduce the number of warning points and system error caused by operating mode.

Key words enzyme-linked immunosorbent assays; instant method; quality control

由于酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)检测会受到许多因素的影响,结果相对不够稳定。传统 ELISA 检测的方法需要对样本进行 20 次检测后才能绘制质控图,而即刻法因简便实用,特别适合于 ELISA 检测初筛实验室。ELISA 即刻法是指在常规操作条件下检测样品时,通过检测 3~4 次质控血清的方式即可绘制质控图,判断检测过程中有无失控信息(失控点)的方法^[1]。但在应用过程中我们发现即刻法质控图的绘制会出现一些即刻法质控图警告

点偏多问题,现将 ELISA 即刻法对检测进行室内质控过程中遇到的问题分析及解决办法介绍如下。

1 材料与方法

1.1 试剂

新创乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)诊断试剂盒(货号:S10810148),万泰人类免疫缺陷病毒抗体(HIV Ab)诊断试剂盒(货号:S20000024)。

1.2 仪器和设备

EVO 加样仪(TEACAN), FAME24/20(瑞士哈美顿公司),加样枪(Dragonmed),Liswell 软件(6.01)。

¹宁波市中心血站(浙江宁波,315010)

通信作者:陈晔, E-mail: 296469662@qq.com

1.3 实验方法

ELISA 进行 HBsAg 和 HIV Ab 检测(所使用试剂盒均在有效期内)。

1.3.1 ELISA 检测 HBsAg 使用新创 HBsAg 诊断试剂盒进行实验,实验方法依据试剂盒说明书步骤操作。将试剂盒中各组分取出后于室温平衡,并按去离子水:浓缩洗涤液=19:1的比例配制洗涤液备用。将微孔条固定并编号后,向对应孔中加入 20 μL 的样品稀释液或阴、阳性对照血清 100 μL 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,向各孔中加入酶标记抗体 50 μL 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 用洗涤液 200 μL /孔洗涤 5 次,进行显色。加入底物 A、B 各 50 μL /孔,轻柔混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。加入终止液 50 μL /孔终止显色,用酶标仪(Sunrise)于波长 450 nm 测定各孔的吸收度 A 值,并记录结果^[2-4]。

1.3.2 ELISA 检测 HIV Ab 使用万泰 HIV Ab 诊断试剂盒进行实验,实验方法依据试剂盒说明书步骤操作。按去离子水:浓缩洗涤液=19:1的比例配置洗涤液备用。将微孔板编号后向相应空中加入待测样品,阴性或阳性对照各 100 μL (每板设置阴性对照孔 3 孔,阳性对照 1 型、2 型孔各 1 孔,空白对照孔 1 孔),用封板模将微孔板封板后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。轻柔的揭掉封口膜后用洗涤液洗涤 5 次。扣干后加入酶标试剂 100 μL /孔,封板并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用洗涤液洗涤微孔板 5 次加入显色剂 A、B 各 50 μL ,轻柔混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。加入终止液 50 μL /孔终止显色,用酶标仪于双波长 450 nm/600~650 nm 测定各孔吸收度 A 值,并记录结果^[5-8]。

1.3.3 即刻法质控图绘制 每次试剂盒批号更换时预检测两个板次,然后进行常规标本的检测,依据前三板次的质控值绘制 ELISA 即刻法质控图。按照新创 HBsAg 试剂盒,万泰 HIV 试剂盒说明书要求,手工加样预做两个板次,后进入 FAME 24/20 进行后处理,EVO 加样仪加样预做两个板次,后进入 FAME 24/20 进行后处理预做,用 Liswell 软件对 ELISA 结果进行处理,绘制即刻法质控图。20 点后对质控图进行处理分析,去除预做前两点,用第三点、第四点和第五点作为前三点来画即刻法质控图,比对去除预做两点前后的即刻法质控图。

1.4 统计学分析

使用软件 HSWAR Liswell 6.01 进行数据的处理统计和分析。组间与组内数据统计分析根据是否符合 F 检验,选择使用 t 检验或者非参数 Mann-Whitney text 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 即刻法检测 HIV Ab,加样仪检测并去除预做两点绘制的质控图较手工检测去除预做

两点质控图更稳定

ELISA 即刻法检测 HIV Ab 绘制的质控图详见图 1。图 1a 为手工检测并预做两点后绘制的即刻法质控图(4.533 ± 0.772),图 1b 为手工检测并去除预做两点后绘制的即刻法质控图(4.622 ± 0.728)。图 1c 为加样仪检测并预做两点后绘制的即刻法质控图(4.494 ± 0.743),图 1d 为加样仪检测并去除预做两点后绘制的即刻法质控图(4.453 ± 0.755)。1a 与 1b、1c、1d 相比在均线上方的点数较多,检测结果的一致性较差,质控图较不稳定。1a 与 1c 比较,差异无统计学意义。1b 与 1d 比较绘制的质控图差异有统计学意义($P < 0.05$),手工加样去除预做两点的结果与常规仪器加样去除预做两点的结果差异有统计学意义,所以常规仪器加样法较手工法加样更稳定。

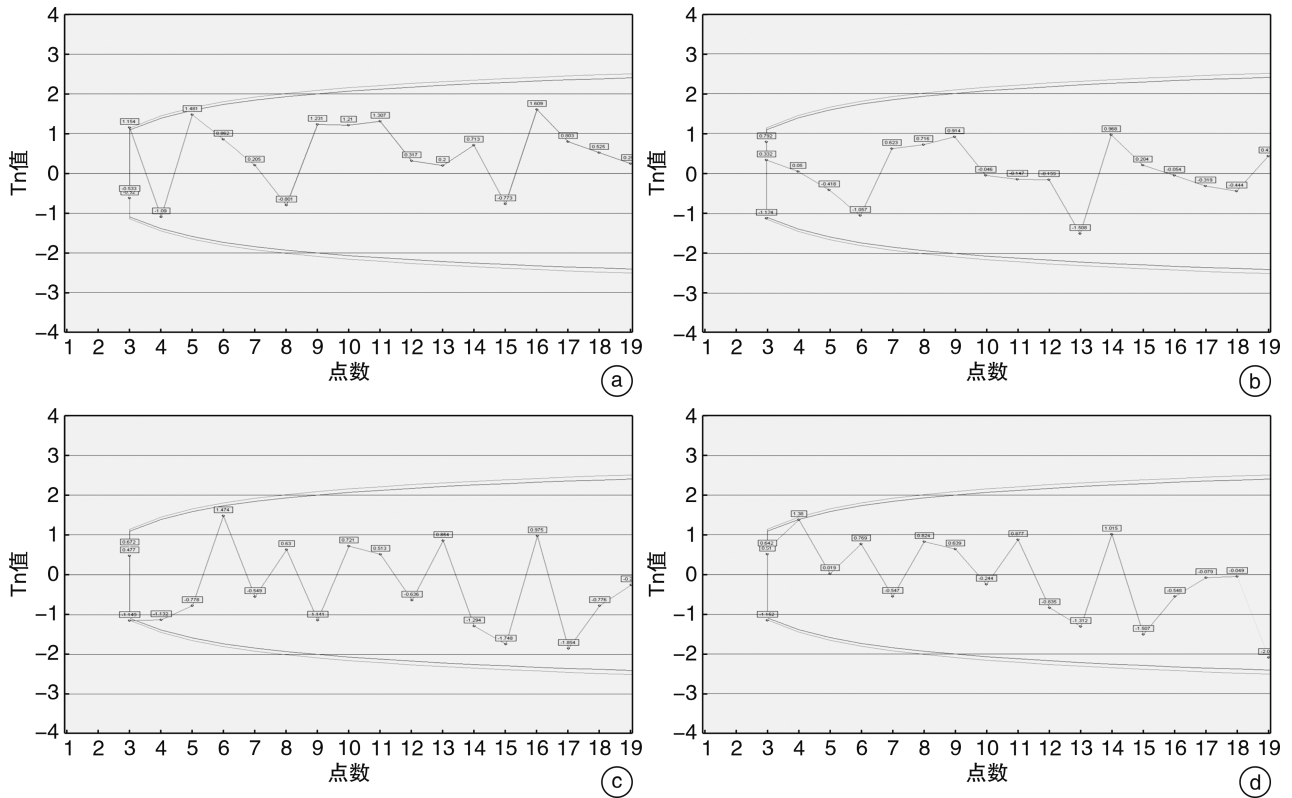
2.2 ELISA 即刻法检测 HBsAg,加样仪检测绘制的质控图较手工检测绘制的质控图更稳定

ELISA 即刻法检测 HBsAg 后绘制的质控图详见图 2。图 2a 为手工检测并预做两点后绘制的即刻法质控图(3.598 ± 0.523),图 2b 为手工检测并去除预做两点后绘制的即刻法质控图(3.683 ± 0.429)。图 2c 为加样仪检测并预做两点后绘制的即刻法质控图(2.341 ± 0.467),图 2d 为加样仪检测并去除预做两点后绘制的即刻法质控图(2.325 ± 0.474)。2a、2b 与 2c、2d 比较,2a、2b 图中在均线上方的点数较多,检测结果的一致性较差,质控图较不稳定。2a 与 2c 比较,绘制的质控图差异有统计学意义($P < 0.01$),即 2c 的方法绘制的即刻法质控图优于 2a 方法绘制的即刻法质控图。2b 与 2d 比较,绘制的质控图同样差异有统计学意义($P < 0.01$)。2d 绘制的即刻法质控图较 2b 更稳定。无论是否去除预做两点,常规仪器加样的结果均优于手工加样的结果,且比手工加样的结果更稳定。

3 讨论

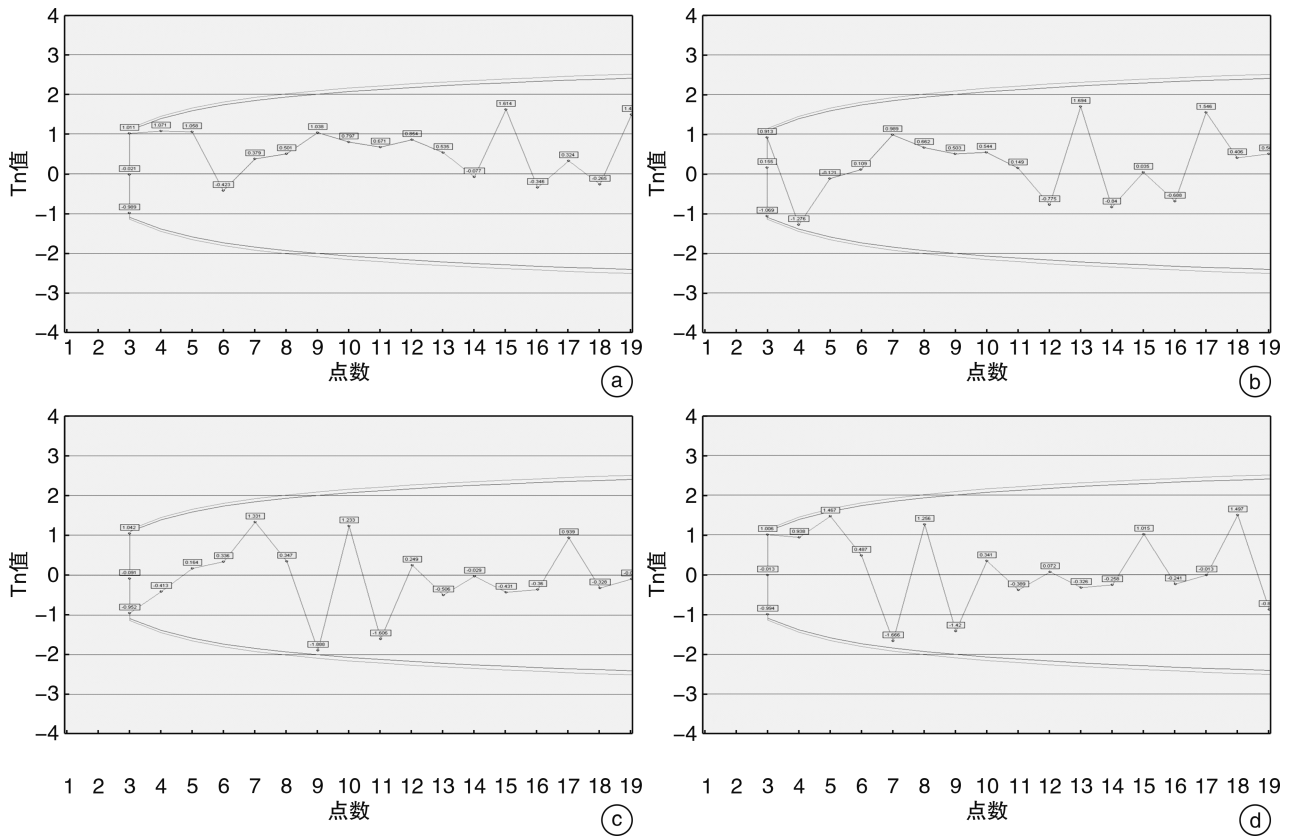
去除 ELISA 检测手工预做的两质控点前后的质控图与常规仪器加样的质控图存在明显差别,说明手工加样的结果与常规仪器加样的结果差异有统计学意义。常规的质控对加样的条件及加样的稳定性存在一定的要求。与采用常规仪器加样相比,人工加样缺乏稳定性,不同的人员及不同的加样仪器均会对结果造成一定的影响,造成了结果的不稳定性。本实验在证明 ELISA 即刻法质控图,常规仪器的加样操作优于人工法加样,同时也让我们对优化手工法加样方式进行了一定的思考。

不同的人员的操作方式具有一定的差异性,我们可以通过定期对操作人员进行规范化培训,规范统一操作步骤及注意事项来降低不同人员操作方式不同带来的不稳定性。不同品牌的加样枪与加样仪存在着显著的差异性,通过专套加样枪专项



a: 手工法预做两点的即刻法质控图; b: 手工绘制并去除预做两点的即刻法质控图; c: 加样仪法预做两点的即刻法质控图; d: 加样仪法绘制并去除预做两点的即刻法质控图。

图 1 即刻法检测 HIV 抗体质控图绘制结果



a: 手工法预做两点的即刻法质控图; b: 手工绘制并去除预做两点的即刻法质控图; c: 加样仪法预做两点的即刻法质控图; d: 加样仪法绘制并去除预做两点的即刻法质控图。

图 2 即刻法检测 HBsAg 质控图绘制结果

用,定期校准加样枪及指定加样仪器来减少仪器对质控图不稳定性的影响。同时预做两点能增强手工法加样的稳定性,即要求我们在每次更换试剂前用与日常检测完全相同的加样条件预先做两个批次,得出即刻法前两点,随后绘制出质控图。这样可以尽量减少人为的干预与变换条件引起的误差。经过调整之后,我们可以发现优化后的质控图警告点数量减少^[9]。

减少 ELISA 即刻法前三点人为干预试验,保持检测的一致性,有利于质控图的稳定性。从上述的情况说明,即刻法的前三点非常重要,它决定即刻法的图形走向,所以必须保持 ELISA 即刻法前三点的检测条件与后面的点数情况一致,这样才能最大程度的减少误差出现,保证即刻法质控图绘制的稳定性。

同时即刻法也存在一定的缺陷,由于即刻法是在当天以前(含当天)的所有测定值中找出最大值和最小值作为预做两点的值,因此采用即刻法进行室内质控时,在测定指数数量较少时有些失控的离群值不会显示为警告点,但随着测定指数的增加,测定值逐渐趋于稳定后,以前未显示的离群值将暴露出来显示为失控,我们将这些离群值称为“迟后异常值”,此为该方法的一大不足^[10-11]。即刻法作为质控方法的另外一个缺陷就是其结果易受前3个质控数据的影响:在统计学中样本量较少会出现抽样误差,当前3个质控的 CV 值在 10%~15%时,第4个质控 CV 值允许范围为<41%,不满足临床实验室要求 CV 值<20%,所以前3次质控结果对于即刻法就显得尤为重要^[12-13]。

为预防第二个缺陷,采用即刻法进行室内质控时,应采用控制变异系数的方法来减少假失控和假在控的结果,即刻法存在“迟后异常值”现象,即时的失控并非是当时的质控结果超标,而是由于前面均值远的离群值的偏差通过累积影响而造成的对该值的误判,因此即刻法通过结合累积的 L-J 质控图可直观质控结果和质控曲线^[14-5]。在应用即使累积的质控图上通过观察曲线的漂移、波动、趋势性变化及精密度等改变,考虑检测的试剂、质控物、操作人员及实验仪器设备等因素,及时有效的发现并减少系统误差^[16]。

参考文献

[1] Song Y, Li Y, Qin L. Volumetric Bar-Chart Chips for Biosensing[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1570: 105-115.

- [2] 孔巍. 论“即刻法”用于 ELISA 试验检测 HBsAg 室内质控分析[J]. *中国药物经济学*, 2015, 10(z1): 71-72.
- [3] 桂萍, 张婷, 汪德清. 即刻法和 Levey-Jennings 法在 HBsAg 中的比较[J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 4(23): 463-465.
- [4] 徐磊, 张文倩, 王琳. 血清蛋白质浓度对 ELISA 检测 HBsAg 的影响[J]. *临床血液学杂志*, 2017, 30(2): 83-86.
- [5] 余有彬. 质控“即刻法”在 HIV 抗体 ELISA 检测中的应用探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 12(34): 3388-3389.
- [6] 郭晓敏. ELISA 在检测 HIV 抗体采用即刻法质控的应用效果[J]. *临床医药文献杂志*, 2015, 11(2): 6525-6526.
- [7] 张静, 方静, 郑萍. ELISA 法检测 HIV 抗体的室内质控分析及处理[J]. *临床血液学杂志*, 2015, 28(10): 1067-1068.
- [8] 陈飞. 即刻法在手工在 ELISA 室内质控方法中的探讨和改良[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 11(32): 2242-2243.
- [9] Papadima D, Gauthier R, PrévotEAU du Clary F, et al. DEPIVH 2: Use of three HIV testing methods in French primary care settings-ELISA laboratory screening versus two rapid point-of-care HIV tests [J]. *Med Mal Infect*, 2018, 48: 122-129.
- [10] 王玲玲, 汪全民, 董玲凤. 探讨“即刻法”在 ELISA 室内质控应用中的局限性[J]. *实验与检验医学*, 2008, 12(26): 703-704.
- [11] 贾波, 卫明彦, 肖晓. 同源血清、血浆标本血液 4 项指标 ELISA 检测结果比较[J]. *临床血液学杂志*, 2014, 27(12): 1068-1071.
- [12] 海明, 潘婉仪. ELISA 定性实验“即刻法”室内质控的评价与应用[J]. *现代检验医学杂志*, 2009, 24(3): 28-30.
- [13] 沈菁, 徐如梅, 池春燕, 等. 即刻法用于酶联免疫吸附试验室内质控的探讨[J]. *海南医学*, 2009, 20(4): 11-17.
- [14] 王玉兰, 杨录魁, 付汝坤. 不同质控方法在 TP-ELISA 检测应用中的探讨[J]. *口岸卫生控制*, 2011, 16(6): 26-30.
- [15] 冯婧, 喻晓雯, 高洪燕, 等. 酶联免疫吸附试验室内质量控制方法探讨[J]. *实用医技杂志*, 2018, 2(25): 187-189.
- [16] 陈建辉, 俞丹青, 张君理. 酶联免疫吸附试验在丙型肝炎抗体检测中质量控制探讨[J]. *现代免疫学*, 2017, 6(37): 473-477.

(收稿日期: 2018-11-22)