

不同酶联免疫吸附试验检测系统评价方法探讨^{*}

杨俊鸿, 彭 楷, 刘加伟, 骆展鹏[△], 邹晓萍, 王娟娟(重庆市血液中心 400015)

【摘要】 目的 探讨不同酶联免疫吸附试验(ELISA)检测系统的评价方法,以保证同一采供血机构实验室内多套检测系统检测结果的稳定性、准确性和一致性。**方法** 稳定性评价,采用 A、B 两套 ELISA 检测系统同时检测同一个弱阳性标本,连续 20 次,比较两套系统变异系数(CV 值)大小。准确性和一致性评价,A、B 两套系统同时检测室间质评阳性样本,根据本试剂组反馈结果的吸光度/临界值比值(S/CO 值)均值($\bar{x}$)、标准差(SD),以 $\bar{x}$ 作为参考结果分别计算每个样本 A、B 系统结果的 S/CO 值标准差指数 SDI1、SDI2;分析两套系统检测结果之间的差异。**结果** A、B 检测系统 CV 值分别为 6.5%和 5.3%;A 系统结果中有 3 个标本 |SDI1| 大于 2,其他结果均小于 2,且无趋势性偏移;B 系统结果 |SDI2| 均小于 2,且无趋势性偏移;两套系统检测结果之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 两套检测系统稳定性较好,检测结果均处于可受控状态,且具有较好的一致性。

【关键词】 酶联免疫吸附试验; 检测系统; 评价方法; 稳定性; 准确性; 一致性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.24.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)24-3409-02

Evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems* YANG Jun-hong, PENG Kai, LIU Jia-wei, LUO Zhan-peng[△], ZOU Xiao-ping, WANG Juan-juan (Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the performance of different enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) systems. **Methods** The same weak positive samples were detected by system A and B for continuous 20 times, and the ability evaluation was performed by compare the variation coefficient (CV) values. In order to evaluate the accuracy and consistency, system A and B were used to test the positive samples of external quality assessment at the same time. Taking the average value and standard deviation (SD) of S/CO, feed backed in this reagent group, as reference, SD index of S/CO value in system A (SDI1) and B (SDI2) were calculated respectively. The differences of test results were analyzed between the two systems. **Results** The CV value of system A and B were 6.5% and 5.3% respectively. The |SDI1| values of three samples in system A were greater than 2, and results of other samples were less than 2, without trend migration. All of the |SDI2| results in system B were less than 2, without trend migration. The test results of system A and B were in consistent, without statistically significant differences ($P>0.05$). **Conclusion** Both of system A and B could be with fine stability and consistency, and the test results could be in control.

【Key words】 enzyme-linked immunosorbent assay; detection system; evaluation method; stability; accuracy; consistency

实验室检测结果的质量,是保证血液安全的关键,是减少经血传播疾病的直接手段。通过对多套检测系统评价结果的分析,查找实验室存在的各种不稳定因素,实现实验室质量全面管理。一个采供血机构实验室内常常拥有多套针对同一检测项目的检测系统,而室间质评往往只要求上报检测其中一个检测系统的结果。因此,实验室内利用室间质评标本进行内部评价是保障不同检测系统检测结果准确性和一致性的重要手段。同时,血站实验室要通过实验室认可,也需要按照能力验证规则要求,当实验室采用不同型号设备、多台相同设备和(或)不同方法对于同一项目(或参数)出具数据时,其中应至少有一台设备或一种方法参加 1 次能力验证并在内部开展仪器设备比对或方法比对。

1 资料与方法

1.1 一般资料 4 NCU/mL 丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)标准物质(北京康彻思坦,批号 201204001),2013 年中国输血感染预防和控制项目(CITIC)室间质评阳性标本共 15 例,

2013 年卫生部临检中心室间质评阳性标本共 7 例。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 A 系统:Xiril 全自动加样仪、BEP III 全自动后处理系统;B 系统:20~200 μ L 移液器、ELX50/12 洗板机、37 $^{\circ}$ C 孵育箱、ELX808 酶标仪。

1.2.2 试剂 酶联免疫法抗-HCV 诊断试剂盒(美国强生,批号 EXE228)、蒸馏水。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 将标准物质和(或)室间质评血清盘标本平衡至室温后,充分混匀样本。

1.3.2 稳定性评价 将 4 NCU/mL 的标准物质与每天检测的标本一同检测,A、B 系统分别连续检测 20 次,得到每个系统各 20 个检测结果作为稳定性评价数据。

1.3.3 准确性和一致性评价 将 22 例阳性标本严格按照试剂说明书要求,用 A 系统检测样本,采用 Xiril 全自动加样仪加样,BEP III 全自动后处理系统检测。同时,将以上样本采用 B

* 基金项目:重庆市卫生局面上项目(2011-1-112)。

作者简介:杨俊鸿,男,本科,初级检验师,主要从事输血安全方面的研究。 [△] 通讯作者,E-mail:19741644@qq.com。

系统检测,采用移液器加样,37℃孵育箱孵育,ELX50/12 洗板机按说明书要求洗板,最后使用 ELX808 酶标仪在 490/630 nm 波长下读板。

1.3.4 检测系统评价比较方法 根据本试剂组室间质评结果的吸光度/临界值比值(S/CO 值)均值($\bar{x}$)、标准差(SD),以本试剂组 S/CO 值均值作为参考结果计算每个样本 A 系统结果的 S/CO 值标准差指数(SDI1),同时计算 B 系统检测结果 S/CO 值与参考结果之间的标准差指数(SDI2),SDI1 和 SDI2 分别作为 A、B 系统准确性的判定参数;计算实验室内两套酶联免疫吸附试验(ELISA)检测系统检测结果之间的差异是否具有统计学意义,作为两系统一致性的判定依据。

1.4 统计学处理

1.4.1 标准差指数计算公式为 $SDI = \frac{x - \bar{X}}{SD}$, x 为被评价结果, $\bar{X}$ 为参考结果,SD 为本试剂组标准差。

1.4.2 采用 SPSS18.0 统计学软件进行数据分析,采用配对 t 检验分析实验室内两套系统检测结果之间的差异;以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 稳定性评价结果 A、B 检测系统连续 20 次检测结果 CV 值分别为 6.5%和 5.3%。

2.2 准确性评价结果 通过对本试剂组参考 S/CO 值均值($\bar{x}$)与 A 系统结果 S/CO 值(x_1)和 B 系统检测结果 S/CO 值(x_2)之间的分析比较,A 系统结果中有 3 个标本 |SDI1| 为 2~3,其他结果均小于 2;B 系统 |SDI2| 均小于 2,且无趋势性偏移。见表 1。

表 1 两套检测系统检测结果

样本号	$\bar{X}$	SD	x_1	x_2	SDI1	SDI2
1	4.5	0.88	3.9	4.3	-0.68	-0.23
2	4.3	0.95	4.0	3.8	-0.32	-0.53
3	4.8	1.11	3.5	3.8	-1.17	-0.90
4	3.8	1.07	2.3	3.0	-1.40	-0.75
5	5.8	2.86	4.7	5.3	-0.38	-0.17
6	6.3	3.85	5.1	5.5	-0.31	-0.21
7	2.9	0.94	2.6	2.2	-0.32	-0.74
8	5.5	1.04	6.3	6.3	0.77	0.77
9	5.4	0.99	5.5	5.7	0.10	0.30
10	5.4	0.87	5.4	6.0	0.00	0.69
11	5.4	0.78	6.2	5.7	1.03	0.38
12	5.3	0.96	4.4	5.0	-0.94	-0.31
13	5.1	0.81	6.0	5.8	1.11	0.86
14	5.1	0.92	5.6	5.8	0.54	0.76
15	4.9	0.92	6.2	5.5	1.41	0.65
16	4.9	0.74	5.3	5.5	0.54	0.81
17	5.2	1.22	5.7	6.0	0.41	0.66
18	5.1	0.78	5.5	5.5	0.51	0.51
19	5.0	0.75	5.1	5.7	0.13	0.93
20	5.2	0.93	5.5	6.0	0.32	0.86
21	5.1	0.85	5.4	5.2	0.35	0.12
22	5.1	0.85	4.9	5.2	-0.24	0.12

2.3 一致性评价结果 A、B 两套检测系统的检测结果(x_1 、

x_2)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

实验室拥有多套相同或不同型号的检测系统是目前采供血机构的需求,并且医疗机构和采供血机构采用的 ELISA 检测系统越来越多样化,自动化程度越来越高。由于不同的系统使用人员、校准状态、日常维护等方面可能存在差异,使得这些检测系统的检测结果的稳定性、准确性和一致性之间可能存在一定差异,实验室需要采取一定的措施来保证这些检测系统之间的差异性降到最低^[1]。本文介绍的方法同样适用于不同自动化程度的方法、仪器以及不同厂家试剂的性能进行对比评价。

稳定性评价标本可以采用《血站技术操作规程》(2012 版)推荐的精密度确认时所使用的 S/CO 为 2~4 的标本,不适宜采用低值的阴性标本和高值阳性标本,因为此类标本距决定水平点即临界值(cutoff)的分析浓度相距较远。可接受标准可采用《血站技术操作规程》(2012 版)推荐的 CV 在 15%以内^[2]。

ELISA 检测方法虽是定性试验,但结果判断是通过具体 S/CO 值数据来判断阴阳性,因此,采用标准差指数判断检测系统是否受控是一个比较客观的参数。若 |SDI| ≤ 2 提示检测值在“均值 ± 2SD”以内,根据室间质评结果分析惯例,有 80%的标本结果落在此区间,表明检测系统受控;若超过 20%的标本结果 2 ≤ |SDI| 提示检测值系统处于预警状态,需要注意查找检测过程中可能存在的不足;若超过 20%的标本结果 |SDI| ≥ 3 则提示检测结果超过“均值 ± 3SD”,表明检测系统已处于失控状态^[3]。从本例抗-HCV 室间质评结果中可以看出,本实验室该项目评价结果比较理想,血清盘 22 个样本 A 系统结果 S/CO 值与参考结果符合率达到 100%,22 个样本 S/CO 值与本试剂组均值之间的标准差指数只有 3 个标本 SDI 值在 2~3 之间,其他结果均小于 2;B 系统结果 S/CO 值与参考结果符合率达到 100%,22 个样本 S/CO 值与本试剂组均值之间的标准差指数均小于 2,提示本实验室两套检测系统均处于受控状态,准确性满足预期。

将两套检测系统检测结果进行比对其意义在于,在某些极端情况下,两套检测系统的检测结果阴阳性与参考结果相符,SDI 值也都处于受控范围,但是一套系统结果偏高接近“均值 + 2SD”,另一套系统结果偏低接近“均值 - 2SD”,此时两者之间的差值已较大,如果遇到低值的弱阳性标本或高值阴性标本两套系统检测结果可能会不一致。低值弱阳性标本可能会引起假阴性从而造成漏检,高值阴性标本可能会引起假反应性,造成合格血液报废。本次抗-HCV 室间质评结果表明,两套 ELISA 检测系统之间的差异无统计学意义($P > 0.05$),提示本实验室两套检测系统具有较好的一致性^[4]。

虽然 ELISA 检测方法已经非常成熟,但是检测过程中有很多关键控制点需要注意控制,如:标本前处理不正确、样本污染、加样不准、不充分洗涤、洗液瓶中有异物、洗板机堵孔、试剂污染、不正确使用波长读数、测试过程反应孔干燥、检验方法学上的局限性等都是引起检测不准的常见原因^[5]。这就需要实验室检测人员在试验操作过程中,要严格遵守标准操作规程和试剂、仪器说明书要求进行操作。此外方法学上的缺陷而导致的检测结果出现的误差,需要试剂厂家不断改进试剂质量,实验室加强每批试剂使用前的质量控制^[6]。为了做好检测结果的全面质量控制,要选择合格的实验试剂以及灵敏度和特异性都较好的检测方法,尽可能减少和避免各种不利因素的干扰,以达到高效、快速、可靠、经济的检测;加强检测仪器的管理,定期校准,并且定时监测检测仪器的稳定性;加(下转第 3412 页)

比例为第 1 位,但其绝大部分对临床常用抗真菌药物敏感。光滑念珠菌与热带念珠菌所致的尿路感染所占比例较高,且其易对唑类药物产生耐药,故应引起临床的充分重视。见表 1。

表 1 临床常见抗真菌药物对尿路感染念珠菌的药物敏感性(%)

抗菌药物	白色念珠菌(267 株)			热带念珠菌(55 株)			光滑念珠菌(150 株)			其他念珠菌(35 株)		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
两性霉素	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
氟胞嘧啶	98.5	1.5	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	94.3	5.7	0.0
氟康唑	96.3	2.7	1.1	78.2	3.6	18.2	78.7	8.0	13.3	94.3	0.0	5.7
伊曲康唑	91.0	6.8	2.2	69.1	7.3	23.6	50.0	19.3	30.7	88.5	5.7	5.7
伏立康唑	99.3	0.0	0.7	76.4	1.8	21.8	80.0	4.0	16.0	97.0	0.0	2.9

注:S 表示敏感,SDD 表示剂量依赖性敏感,R 表示耐药。

3 讨 论

尿路感染是临床常见感染性疾病,细菌性尿路感染已成为影响住院患者的主要危害之一。近年来,真菌所致尿路感染发病率逐年上升。真菌培养及药敏试验不但可以准确提供尿路感染的病原菌种类,还可为临床合理使用抗真菌药物提供实验室依据,对研究尿路感染的流行病学调查、治疗效果、疾病转归及院内感染的控制均有重要意义。

本研究发现,白色念珠菌是真菌性尿路感染的主要病原菌,且其对临床常用抗真菌药物敏感性较高;其中氟康唑虽然在临床用药时间较长,但目前仍保持良好的活性,对治疗白色念珠菌性尿路感染效果良好。其次为光滑念珠菌和热带念珠菌,二者对唑类抗真菌药物敏感性较白色念珠菌低,且存在剂量依赖,临床治疗时应注意剂量的调整^[5-6]。本研究未发现克柔念珠菌,故未对其敏感性进行分析。另外,分离到的 35 株其他念珠菌,在科玛嘉显色平板上显色不明确或显色为白色,后通过 Vitek-2 Compact 仪器鉴定分属于不同的菌种,文中未具体列出。

由于不同种念珠菌对抗真菌药物的敏感性差异很大,因此实验室对临床分离株鉴定到菌种就显得尤为重要。准确的菌种鉴定和药敏报告可为临床有效治疗,以及减少耐药菌株的产生提供重要的科学依据。

参考文献

[1] Fisher JF, Kavanagh K, Sobel JD, et al. Candida urinary tract infection; pathogenesis[J]. Clinical Infectious Disease-

ses, 2011, 52(Suppl 6): S437-S451.
[2] Gonzalez-Pedraza AA, Luis HR, Luna AJ, et al. Urinary tract infection by Candida species [J]. Aten Primaria, 2006, 38(3): 147-153.
[3] Osawa K, Shigemura K, Yoshida H, et al. Candida urinary tract infection and Candida species susceptibilities to anti-fungal agents[J]. J Antibiot (Tokyo), 2013, 66(11): 651-654.
[4] Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bustamante B, et al. Multi-center study of anidulafungin and micafungin MIC distributions and epidemiological cutoff values for eight Candida species and the CLSI M27-A3 broth microdilution method[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(2): 916-922.
[5] Costa C, Nunes J, Henriques A, et al. Candida glabrata drug: H + antiporter CgTpo3 (ORF CAGL0I0384g): role in azole drug resistance and polyamine homeostasis [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(7): 1767-1776.
[6] Forastiero A, Mesa-Arango AC, Alastruey-Izquierdo A, et al. Candida tropicalis antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(10): 4769-4781.

(收稿日期:2014-06-20 修回日期:2014-08-06)

(上接第 3410 页)

强实验人员的业务能力,严格地做好实验室内质控,才能取得好的实验室内质评成绩^[7]。利用室间质评结果及时调整检测策略,保证检测结果的准确性,保障输血安全^[8]。

综上所述,本研究中两套 ELASA 检测系统稳定性较好,检测结果均处于可受控状态,且具有较好的一致性。

参考文献

[1] 王丽,李洁.血站血液检测实验室参加室间质评体会[J].辽宁医学杂志,2007,21(2):143.
[2] 中华人民共和国卫生部.血站技术操作规程(2012 版)[M].北京:人民卫生出版社,2012.
[3] 王锐,魏平,朱绍纹.艾滋病筛查实验室室间质评结果分析[J].中国卫生质量管理,2010,17(5):84-87.

[4] 黄保荣,万金安,唐春莲.利用室间质评和室内质控室间比对的偏倚计算 σ 值的一致性[J].国际检验医学杂志,2013,34(11):1424-1425.
[5] 龙绍芬,黎铁斌.乙肝两对半定量检测结果分析[J].实验与检验医学,2012,30(2):187-188.
[6] 黄义强.2010~2012 年免疫室间质评(EQA)结果回顾性分析[J].中国实用医学,2013,8(6):258-258.
[7] 曹晓.临床免疫室间质量评价结果分析[J].数理医药学杂志,2009,22(6):688-689.
[8] 肖进,曹晓莉,赵晓华,等.2009~2012 年西安地区无偿献血者血液检测结果分析[J].中国输血杂志,2013,26(9):794-795.

(收稿日期:2014-04-10 修回日期:2014-07-21)