

• 论 著 •

## 染色改进艾滋病质控物的制备及其应用\*

余 谨<sup>1</sup>, 杨 茹<sup>1</sup>, 付 荣<sup>1</sup>, 凌 青<sup>2△</sup>

(1. 武汉血液中心 430030; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科, 武汉 430030)

**摘要:**目的 为了改进艾滋病质控物颜色与检测的血清标本难用肉眼分辨而导致的加错、漏加或者量不足的问题。方法 研制了 0.5、4.0 NCU/mL 两种浓度的经染色剂改进的艾滋病质控物, 使用 Bio-Rad 和北京万泰艾滋病诊断试剂盒对其进行检测, 并比较结果。结果 染色质控物与未染色质控同时采用两种试剂检测  $t$  值分别为 1.306、1.136, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 使用两种不同的试剂连续检测不同浓度的质控物 20 次, 检测的 CV 分别为 11.8%、10.7%; 使用两种不同的试剂检测不同浓度的染色质控物 20 d, 检测的 CV 分别为 11.5%、9.8%。结论 通过柠檬黄染色并未影响艾滋病质控物的性能, 并且在较长的时间内可以稳定地使用, 适合临床实验室应用和推广。

**关键词:** 艾滋病; 质控物; 染色; 柠檬黄**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.015 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)12-1723-03

## Preparation and application of dyeing improvement of HIV quality control material\*

YU Jin<sup>1</sup>, YANG Ru<sup>1</sup>, FU Rong<sup>1</sup>, LING Qing<sup>2△</sup>

(1. Wuhan Blood Center, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. Department of Urological Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science &amp; Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

**Abstract:** **Objective** To improve the color of HIV quality control material and detected serum sample which is hard to distinguish with the naked eye, thus cause wrong adding, missed adding or insufficient adding. **Methods** The HIV quality control material with 2 concentrations of 0.5, 4.0 NCU/mL improved by coloring agent was researched and prepared, which was detected by using the Bio-Rad and Beijing Wantai AIDS diagnostic reagent kits. The detection results were compared. **Results** The two kinds of reagent were adopted to simultaneously detect the stained quality control material and unstained quality control material, the  $t$  values were 1.306 and 1.136 respectively, the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Different concentrations of quality control materials were detected for 20 times by using the two kinds of reagent, the detected CV values were 11.8% and 10.7% respectively; using the two different reagents to detect different concentrations of stained quality control materials, the detected CV values were 11.5% and 9.8% respectively. **Conclusion** Citric yellow staining does not influence the properties of HIV quality control materials, which can be stably used for a long time and is suitable for the application and promotion in clinical laboratory.

**Key words:** HIV; quality control; dyeing; tartrazine

目前中国的采供血机构都普遍采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 来检测人类免疫缺陷病毒 (HIV)<sup>[1-3]</sup>。由于艾滋病室内质控品的基质来自于小牛血清, 因此其颜色与检测的血清标本相似, 均为无色透明或微黄色<sup>[4]</sup>。若将其和血清加于同一块酶标板内则很难用肉眼分辨两孔间的差异, 更难判断加样量是否充足。

为了克服现有的艾滋病质控物的颜色性状不足, 本研究提供了一种简单、可靠的艾滋病质控物的染色改进方法, 通过该方法染色的质控物不仅能依旧保持其原本的生物化学性状监测 ELISA 的过程, 而且能轻易通过肉眼将其与阳性对照品、阴性对照品及检测的血液标本区分开来, 并方便于将质控品随机设置在检测的血液标本中, 使整个实验进程更加安全、可靠, 质控品的值更加能准确地反映试验结果。并且该染色方法已申请获得中国国家发明专利《一种显色质控物及其应用》, 并且已获得中国发明专利授权 (专利号: ZL 201310351031.7), 在实际应用中也起到了较为满意的效果, 并期望得到更为广泛的推广与应用。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** 两种艾滋病 ELISA 试剂盒: Bio-Rad Laboratories (USA, 以下简称 Bio-Rad 试剂), 试剂批号: 5H0336; 北京万泰科技有限公司 (以下简称万泰试剂), 试剂批号: H20151210。以上试剂均为中国药品生物鉴定所批批检合格产品。待染色的两种浓度质控物为康彻斯坦生物有限公司提供的艾滋病标准物质, 浓度水平: 0.5 NCU/mL, 批号: 201501001; 浓度水平: 4.0 NCU/mL, 批号: 201504002。STAR 全自动加样系统和 FAME 全自动酶联检测系统 (瑞士 Hamilton 公司), 所有仪器均按要求定期维护和校准。柠檬黄标准物质 (北京世纪奥科生物技术有限公司), 特征形态: 固态, 纯度: 99.3%, 保存条件: 避光保存于干燥器中, 化学名称: 1-4'-磺酸基苯基-3-羧基-4-4'-磺酸苯基偶氮基-5-吡啶啉酮三钠盐, 分子式  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ , 分子量 534.36。

## 1.2 方法

**1.2.1 艾滋病标准物质的保存** 以康彻斯坦生物有限公司提供的 0.5 NCU/mL 艾滋病标准物质以及 4.0 NCU/mL 艾滋

\* 基金项目: 湖北省武汉市卫生和计划生育委员会科研项目 (WX15D61); 中央高校基本科研业务费资助项目, HUST(0118540269)。

作者简介: 余谨, 女, 主管技师, 主要从事血液检验研究。△ 通信作者, E-mail: lingqing1985@163.com。

病标准物质作为参考品, 无菌分装于德国生产的 1.5 mL 实验室微量离心管中, 于-20℃保存。

**1.2.2 不同浓度艾滋病螺旋体标准物质的染色** 将柠檬黄固态粉末于(135±3)℃烘 4 h 后置于干燥器中, 冷却至室温, 用分析天平称量 0.1 g 充分溶解于 1 mL 去离子水中, 离心机 1 000 r/min 离心 1 min, 待用。吸取 1 μL 已溶解的柠檬黄染料分别加入两支艾滋病质控物中, 每支浓度分别为 4 NCU/mL 和 0.5 NCU/mL, 体积均为 1 mL, 盖上盖子, 来回颠倒混匀 1 min, 可见质控物很快均匀染色。染色质控物于-20℃条件下保存。使用之前放于 4℃冰箱内解冻 1 d 后再放于室温下平衡半小时备用。

**1.2.3 检测方法** 使用 Bio-Rad Laboratories(USA) ELISA 检测试剂盒检测 4.0 NCU/mL 的染色及未染色的艾滋病标准物质, 使用北京万泰艾滋病 ELISA 检测试剂盒检测 0.5 NCU/mL 的染色及未染色的艾滋病标准物质, 均连续检测 20 次, 对其结果差异性进行比较。再用两种品牌试剂每天与常规标本一起检测染色及未染色的艾滋病标准物质, 每天随常规标本一起检测 5 孔, 每个酶标板一孔, 连续检测 20 d, 评价质控结果。以上所有的实验均由专人按照室内质控的步骤和方法完成。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS15.0 软件分析数据, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 不同品牌试剂染色艾滋病质控物检测结果** 使用 Bio-Rad 试剂和万泰试剂分别检测 2 种不同浓度的染色及未染色的艾滋病标准物质, 连续检测 20 次, 结果见表 1。

**2.2 染色艾滋病质控物应用效果** 在 20 d 的双试剂检测中, 两种浓度的染色质控物 CV 值均小于 15%, 体现出了较好的稳

定性。且  $P > 0.05$ , 说明与未染色指控物检测性能差异无统计学意义。见表 2。图 1 所示 4.0 NCU/mL 的染色质控物采用 Bio-Rad 试剂每天检测 5 孔, 连续监测 20 d 共 100 个点 S/CO 数据图, 所有的点均在  $\pm 3s$  范围之内, 绝大多数点均在  $\pm 2s$  范围之内且 CV 值小于 15%, 体现了很好的稳定性。图 2 所示 0.5 NCU/mL 的染色质控物采用万泰试剂每天检测 5 孔, 连续监测 20 d 共 100 个点 S/CO 数据图, 所有的点均在  $\pm 3s$  范围之内, 同样 CV 值小于 15%, 体现了很好的稳定性。

将染色质控物与未染色质控物的检测值用 SPSS 数据分析软件做独立样本  $t$  检验, 检验结果见表 3, 染色组与未染色组的 S/CO 值做组间比较, 两种试剂检测检测结果差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 可见通过柠檬黄染色并未影响艾滋病质控物的性能, 并且在较长的时间内可以稳定的使用。

表 1 两种品牌试剂染色与非染色艾滋病质控物日内检测结果

| 试剂         | 柠檬黄染色改良质控物      |       | 未染色改良质控         |       |
|------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
|            | $\bar{x} \pm s$ | CV(%) | $\bar{x} \pm s$ | CV(%) |
| Bio-Rad 试剂 | 3.89±0.46       | 11.8  | 4.01±0.40*      | 9.9   |
| 万泰试剂       | 2.79±0.30       | 10.7  | 2.95±0.36*      | 12.2  |

注: 与同一试剂检测的柠檬黄染色改良质控物检测结果相比, \*  $P > 0.05$ 。

表 2 两种品牌试剂染色与非染色艾滋病质控物日间检测结果

| 试剂         | 柠檬黄染色改良质控物      |       | 未染色改良质控         |       |
|------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
|            | $\bar{x} \pm s$ | CV(%) | $\bar{x} \pm s$ | CV(%) |
| Bio-Rad 试剂 | 3.99±0.46       | 11.5  | 4.07±0.40*      | 9.8   |
| 万泰试剂       | 2.85±0.28       | 9.8   | 2.90±0.34*      | 11.7  |

注: 与同一试剂检测的柠檬黄染色改良质控物检测结果相比, \*  $P > 0.05$ 。

表 3 独立样本  $t$  检验

| Levene 的变异系数相等测试 |          |       |       | 针对平均值是否相等 $t$ 测试 |     |          |        |       |         |      |
|------------------|----------|-------|-------|------------------|-----|----------|--------|-------|---------|------|
| 试剂               |          | $F$   | 显著性   | $t$              | df  | 显著性 (双尾) | 平均差异   | 标准误差  | 95%可信区间 |      |
|                  |          |       |       |                  |     |          |        |       | 下限      | 上限   |
| Bio-Rad 试剂       | 采用相等变异数  | 4.106 | 0.044 | -1.306           | 198 | 0.193    | -0.079 | 0.061 | -0.20   | 0.04 |
|                  | 不采用相等变异数 |       |       | -1.306           | 194 | 0.193    | -0.079 | 0.061 | -0.20   | 0.04 |
| 万泰试剂             | 采用相等变异数  | 4.157 | 0.043 | -1.136           | 198 | 0.257    | -0.050 | 0.044 | -0.14   | 0.03 |
|                  | 不采用相等变异数 |       |       | -1.136           | 194 | 0.257    | -0.050 | 0.044 | -0.14   | 0.03 |

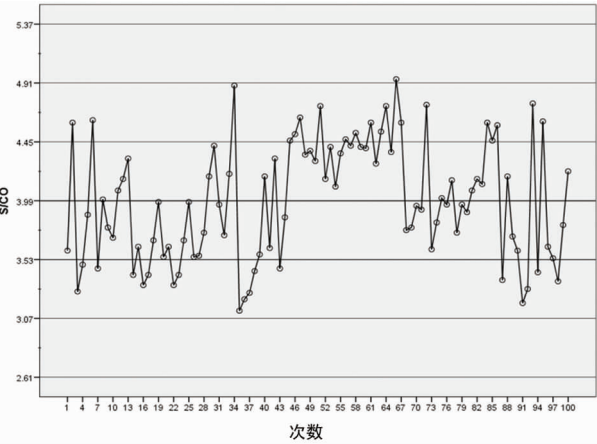


图 1 4.0 NCU/mL 染色质控物 Bio-Rad 试剂的检测应用

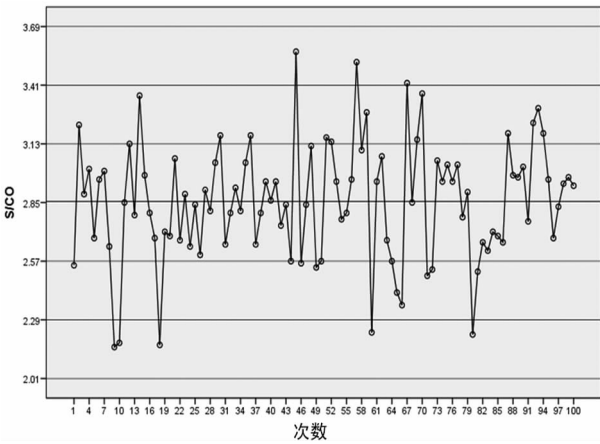


图 2 0.5 NCU/mL 染色质控物万泰试剂的检测应用

### 3 讨 论

艾滋病室内质控品的基质来自于小牛血清,目前大多数检测机构所使用的艾滋病质控品其颜色与检测的血清标本一样,都为无色透明或微黄色(无色透明为血清经过处理后)<sup>[5]</sup>。因此,由于颜色问题导致错加、漏加的现象难以用肉眼及时发现,并且若质控物与血清加于同一块酶标板时也很难区分两者的差异,故试验中只能固定孔位,检测者才能知道哪一孔做的是质控品。而质控品最好是随机分布于血液标本中间,与检测标本一起试验才能起更加有效的监测作用<sup>[6-7]</sup>。因此,对于艾滋病质控物颜色性状的改进尤为重要。

本研究采用两种不同厂家的试剂分别检测经染色改进后的质控物与未染色质控物,不论是同一天检测 20 个点,还是 20 d 每天检测 5 个点,*t* 检验结果显示检测值差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),可见通过该染色方法改进的质控物在其质控性能上并无影响。使用两种不同的试剂连续检测不同浓度的质控物 20 次,检测的 CV 分别为 11.8%、10.7%;使用两种不同的试剂检测不同浓度的染色质控物 20 d,检测的 CV 范围分别为 11.5%、9.8%。以上染色质控物检测结果的 CV 均在 15% 以下,说明实验的精密性较好,染色质控物稳定性也较好。另外,图 1 显示 Bio-Rad 试剂质控图 CV 为 11.5%,图 2 显示万泰试剂的质控图 CV 为 9.8%,小于临床允许误差,100 次质控值均在范围内,并符合 Westgard 质控规则的 12s、13s、22s(2-2s)和 R4s 规则等,因此该染色质控物的质控图可用来判断当天检测的结果是否在控制限之内,以控制整个检验过程<sup>[8-9]</sup>。

总之,本研究自制的染色艾滋病质控物对系统误差、过失误差、偶然误差等方面起到了监控作用,对保证艾滋病检测质量有重要意义,在血液中心及其他实验室具有一定的推广价值。

### 参考文献

[1] 魏万惠,尹跃平,王红春,等. 全国性病防治诊疗机构实验

室梅毒血清学检测首次室间质评[J]. 中国输血杂志, 2010,23(2):116-118.

[2] 钟铭英,魏万惠,王红春,等. 2007 年全国首次沙眼衣原体实验室检测室间质量评价[J]. 中国艾滋病性病杂志, 2009,15(1):47-49.

[3] 尹跃平. 性传播疾病实验室诊断指南[M]. 上海:上海科学技术出版社,2007:117-121.

[4] 于磊,陈瑜,贾俊杰,等. 血站血液检测实验室设备性能比对方法探讨[J]. 中国输血杂志,2014,27(4):349-353.

[5] 王建中,汪润,袁家颖,等. 流式细胞术计数淋巴细胞亚群的全血质控品的研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(9):897-901.

[6] 郭大城,孙国清,王建丽,等. 支原体液体培养试剂冻干质控品制备研究[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(7):1734-1736.

[7] Coombes L, Tierney R, Rigsby P, et al. In vitro antigen ELISA for quality control of tetanus vaccines[J]. Biologics, 2012,40(6):466-472.

[8] Zhang K, Song C, Li Q, et al. The establishment of a highly sensitive ELISA for detecting bovine serum albumin (BSA) based on a specific pair of monoclonal antibodies (mAb) and its application in vaccine quality control[J]. Hum Vaccin, 2010,6(8):652-658.

[9] Charting methods for internal quality control of indirect ELISA[J]. Methods Mol Biol, 2009,516:381-429.

(收稿日期:2017-02-08 修回日期:2017-04-17)

(上接第 1722 页)

[2] 黄秀峰,李宛珊,张宗耀,等. 参附注射液治疗急性心衰患者临床疗效观察[J]. 中国中医急症,2014,23(5):935-936.

[3] 王征,刘芳艳,曹涛,等. 血清尿酸水平对老年急性心衰患者病情变化的临床预测价值[J]. 中国老年学杂志,2016,36(9):2130-2132.

[4] 冷文修,何昆仑,范利,等. BNP 和 NT-proBNP 在鉴别舒张性心力衰竭中的应用研究[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(4):328-332.

[5] 急性心力衰竭诊断和治疗指南专家组. 急性心力衰竭诊断和治疗指南[J]. 中国心血管病研究,2011,9(2):81-97.

[6] 江涛,王昌富,李军,等. NT-ProBNP 对伴肾功能不全老年患者急性心衰的诊断作用[J]. 微循环学杂志,2014,23(2):46-49.

[7] 王智明. 急性失代偿性心衰患者 NTpro-BNP/BNP 与 NTpro-BNP、BNP 对患者预后的预测价值比较[J]. 中国医药导报,2016,13(2):16-19.

[8] 刘小禾,李晨,柴艳芬. 急性左心衰患者肺部超声影像变化及其临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2014,7(2):183-186.

[9] 吴立松. 功能性二尖瓣返流的原因及外科处理[J]. 临床和实验医学杂志,2015,13(1):74-78.

[10] 2014 版《心衰诊疗指南》肯定 NT-proBNP 临床应用价值[J]. 中国心血管杂志,2014,41(4):320.

[11] 王瑾,赵森,曹平辉. NT-proBNP 判断高龄心衰急性失代偿期预后探讨[J]. 医药论坛杂志,2016,36(4):51-52.

(收稿日期:2017-02-06 修回日期:2017-04-15)