

· 临床探讨 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.22.022

# 酶联免疫吸附试验 0.5 倍临界值阴性质控物的自制与评价\*

李亚波, 马俊超, 刘 骥, 曹 艳, 李 蓉, 杜 娜<sup>△</sup>

云南省中医医院/云南中医药大学第一附属医院, 云南昆明 650021

**摘要:**目的 配制酶联免疫吸附试验(ELISA)测定的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗 HIV)、梅毒螺旋体抗体(抗 TP)、丙型肝炎病毒抗体(抗 HCV)0.5 倍临界值左右的阴性质控物,并对其均一性和稳定性进行评价。方法 对弱阳性质控物进行倍比稀释,取吸光度值/临界值(S/CO 值)在 0.5 倍临界值左右的稀释水平作为阴性质控物的目标水平,以此制作阴性质控物。阴性质控物均一性评价:每批次抽检 20 个质控物,均分为两组,对其 S/CO 值进行单因子方差分析。稳定性评价:将分装的自制质控物置于-70℃以下冰箱冻存 1、3、6 个月,按期随机取出 10 份进行检测,将其 S/CO 值与均一性评价结果进行比较。结果 阴性质控物的目标水平分别为 HbsAg 0.06 IU/mL、HbsAb 5 mIU/mL、HBeAg 0.3 NCU/mL、抗 HCV 0.1 NCU/mL、抗 HIV 0.05 NCU/mL、抗 TP 0.7 mIU/mL。均一性评价:两组 6 项阴性质控物检测数据比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),均一性评价通过。稳定性评价:6 项阴性质控物第 1、3、6 个月的 S/CO 值与均一性评价结果比较,第 1、6 个月的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),第 3 个月的差异有统计学意义( $P<0.05$ ),稳定性符合要求。结论 自制的 HbsAg、HbsAb、HBeAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP 阴性质控物的均一性和稳定性均符合 ISO15189:2012 质量管理体系 CNAS-CL02-A004《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明》要求,可用于临床实验室的质量控制。

**关键词:**酶联免疫吸附试验; 阴性质控物; 自制; 均一性; 稳定性

**中图法分类号:**R446.62

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9455(2021)22-3298-03

酶联免疫吸附试验(ELISA)已广泛应用于临床,其影响因素较多,除常见的标本状态、孵育温度、孵育时间、洗板等因素外,人员操作也存在一定差异。为保证检验结果的准确性,临床实验室需开展室内质量控制(简称质控)<sup>[1-4]</sup>,在 ISO15189:2012 质量体系 CNAS-CL02-A004《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明》中明确规定,必须选择水平为临界值 2~4 倍的弱阳性质控物及水平为临界值 0.5 倍左右的阴性质控物进行室内质控。弱阳性质控物已经有较成熟的第三方商业质控物,但阴性质控物由于要求严格,且不同厂家试剂盒的临界值不一、检出限不同、需求的阴性质控物水平也不一致,导致目前市面上暂无类似的质控物可供选择。本研究采用自制方案来制备乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗 HIV)、梅毒螺旋体抗体(抗 TP)、丙型肝炎病毒抗体(抗 HCV)6 个项目的阴性质控物,以满足临床检

测需求,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 患者阴性血清来自日常检测标本,筛选 HBsAg、HBsAb、HBeAg、抗 HIV、抗 TP、抗 HCV 均为阴性标本。

**1.2 仪器与试剂** 使用仪器为 TECAN Freedom Evolyzer-2200 全自动酶免分析仪,仪器按 ISO15189 质量体系要求进行校准。使用北京万泰生物有限公司的试剂盒及康彻思坦公司的标准物质,上述试剂盒及标准物质均按说明书要求保存,在有效期内使用。

## 1.3 方 法

**1.3.1 配制方案** 采用患者阴性血清来稀释弱阳性质控物<sup>[5-6]</sup>,筛选 HBsAg、HBsAb、HBeAg、抗 HIV、抗 TP、抗 HCV 均为阴性标本,混匀血清,高速离心去除剩余纤维蛋白原,56℃加热 30 min 灭活,备用。HBsAb、HBeAg、抗 HIV、抗 TP 用阴性血清作为阳性质控物稀释液,HBsAg、抗 HCV 则用配套标本稀释液进行稀释。对弱阳性质控物进行倍比稀释至吸

\* 基金项目:云南省基础研究计划中医联合青年项目[2019FF002(-081)]。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail:251956643@qq.com。

本文引用格式:李亚波,马俊超,刘骥,等.酶联免疫吸附试验 0.5 倍临界值阴性质控物的自制与评价[J].检验医学与临床,2021,18(22):

光度值/临界值(S/CO 值)为 0.5 倍临界值左右,将此时的稀释水平作为阴性质控物的目标水平。用冻存管将以上不同项目的质控物按每天用量分装、封口、标记, -70 °C 以下冷冻保存备用。

**1.3.2 均一性评价** 质控物配制完成后,应对其进行均一性评价。评价方案依据 CNAS-GL03:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》,每批次抽查 20 个质控物,均分为两组(第 1 组、第 2 组),按患者标本检测程序同时进行检测。比较两组检测的 S/CO 值,差异无统计学意义则均一性评价通过<sup>[7-8]</sup>。

**1.3.3 稳定性评价** 质控物应进行第 1、3、6 个月的稳定性评价。按时间段随机取出 10 份质控物,按患者标本检测程序同时进行检测,根据时间顺序分为 Y1 组(第 1 个月检测结果)、Y2 组(第 3 个月检测结果)、Y3 组(第 6 个月检测结果),分别与均一性评价结果(X 组)进行比较,差异无统计学意义则稳定性评价通过。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 弱阳性质控物水平** 本研究中弱阳性质控物水平为 HBsAg 0.2 IU/mL、HBsAb 30 mIU/mL、HBeAg 1 NCU/mL、抗 HIV 0.2 NCU/mL、抗 HCV 0.5 NCU/mL、抗 TP 3 mIU/mL。检出限为 HBsAg

0.14 IU/mL、HBsAb 11.0 mIU/mL、HBeAg 0.6 NCU/mL、抗 HIV 0.1 NCU/mL、抗 HCV 0.2 NCU/mL、抗 TP 1.5 mIU/mL。配制阴性质控物的目标水平为 HBsAg 0.06 IU/mL、HBsAb 5 mIU/mL、HBeAg 0.3 NCU/mL、抗 HIV 0.05 NCU/mL、抗 HCV 0.1 NCU/mL、抗 TP 0.7 mIU/mL。

**2.2 均一性评价** 6 项阴性质控物两组间检测结果比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),均一性评价通过。见表 1。

表 1 阴性质控物均一性评价结果( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目    | 第 1 组 S/CO 值<br>(n=10) | 第 2 组 S/CO 值<br>(n=10) | <i>t</i> | <i>P</i> |
|-------|------------------------|------------------------|----------|----------|
| HBsAg | 0.415±0.037            | 0.403±0.050            | 0.594    | 0.446    |
| HBsAb | 0.528±0.012            | 0.514±0.024            | 0.273    | 0.605    |
| HBeAg | 0.480±0.016            | 0.507±0.023            | 0.968    | 0.332    |
| 抗 HIV | 0.487±0.013            | 0.487±0.015            | 0.000    | 0.996    |
| 抗 HCV | 0.420±0.015            | 0.429±0.016            | 0.174    | 0.697    |
| 抗 TP  | 0.466±0.012            | 0.474±0.012            | 0.211    | 0.649    |

**2.3 稳定性评价** 6 项阴性质控物第 1 个月的 S/CO 值与均一性评价结果比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),第 3 个月的 S/CO 值与均一性评价结果比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),第 6 个月的 S/CO 值与均一性评价结果比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),稳定性符合要求。见表 2。

表 2 阴性质控物稳定性评价 S/CO 值( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | <i>n</i> | 抗 HIV        | HBsAg        | HBsAb        | HBeAg        | 抗 TP         | 抗 HCV        |
|------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| X 组  | 10       | 0.454±0.034  | 0.415±0.037  | 0.446±0.051  | 0.591±0.048  | 0.453±0.087  | 0.379±0.071  |
| Y1 组 | 10       | 0.437±0.060  | 0.402±0.051  | 0.443±0.043  | 0.543±0.058  | 0.413±0.064  | 0.361±0.069  |
| Y2 组 | 10       | 0.400±0.026* | 0.530±0.043* | 0.422±0.051* | 0.565±0.033* | 0.340±0.028* | 0.447±0.064* |
| Y3 组 | 10       | 0.446±0.069  | 0.464±0.085  | 0.423±0.030  | 0.554±0.054  | 0.494±0.045  | 0.347±0.146  |

注:与 X 组比较,\* $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

本地区传染病检测大多采用 ELISA,实际工作中,为保证检测质量,必须在检测过程中加入安全方便、性能可靠的室内质控物,在当前商业阴性质控物不足的情况下,自制的质控物可以起到很好的补充作用。ISO15189:2012 质量管理系 CNAS-CL02-A004《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明》对自制质控物的评价要求至少应包括均一性评价及稳定性评价。本文参考了 CNAS-GL03:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》中的单因子方差分析方案对自制阴性质控物的均一性及稳定性进行评价。需要说明的是,同一厂家的试剂也存在一定的批间差异<sup>[9]</sup>。质控物能够反

映出这些差异,当这些差异过大时,质控物的评价也会受到影响,本研究在进行稳定性评价时使用的是不同批号的试剂,在第 3 个月的稳定性评价中发现,HBsAg、抗 HIV、抗 TP、抗 HCV HBsAb、HBeAg 的 S/CO 值与均一性评价的结果差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),同样的质控物在第 6 个月的 S/CO 值与均一性评价结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),故考虑其统计学差异是由试剂批间差异导致,质控物的稳定性评价是通过的。

结合 CNAS-GL03:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》中的稳定性评价方案,要求其测试方法必须是“精密而灵敏的”,故考虑此方案并不适合评价精密度较低的 ELISA 定性试验,由于试剂批间

差异和操作误差等不确定的因素存在,导致 ELISA 的精密度较低。杨柳莹等<sup>[10]</sup>的研究中,弱阳性质控物稳定性的评价采用了变异系数(15.18%)来进行评估。目前国内较缺乏评价免疫定性试验自制室内质控物稳定性的标准文件。ELISA 定性试验的报告方法为有反应性(阳性)或无反应性(阴性),在 CNAS-CL02-A004《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明》中规定,定性试验的质控判定规则可以采用阴阳符合规则,即阴、阳性质控物的检测结果分别为阴性和阳性即表明在控<sup>[6]</sup>。故笔者提出想法:ELISA 质控物的稳定性评价符合上述规则即可。

**参考文献**

[1] 李金明. 感染性疾病免疫测定的室内质量控制[J]. 医学检验与临床杂志, 2007, 18(1): 3-6.  
 [2] 谭立明. ELISA 法检测的影响因素及其对策[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(4): 300-305.  
 [3] 缪希莉. 临床免疫检验质量影响因素分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(3): 396-397.  
 [4] 李延伟, 田庆华, 贾艳丽, 等. 两种不同温育方式对酶免试

剂检测结果的影响[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(7): 738-739.  
 [5] 陈慧英, 张锦锋, 岑小鹏, 等. ELISA 检测乙型肝炎 HBsAg 室内质控血清的试制和使用[J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15(4): 203-205.  
 [6] 周炳辉. ELISA 法检测 HIV 抗体弱阳性外部对照室内质控血清的制备和保存[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 8-9.  
 [7] 张括, 李金明, 张瑞. 梅毒螺旋体 IgG 和 IgM 抗体国家一级血清标准物质的研制[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(11): 1044-1049.  
 [8] 岑伟明, 梁越媚, 梁宝环. 酶联免疫吸附试验法的自配阴性质控物的均匀性和稳定性评价[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(3): 320-322.  
 [9] 高均翠. 抗 HCV ELISA 检测试剂质量抽检分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(6): 512-514.  
 [10] 杨柳莹, 孙黎, 赵仪, 等. ELISA 法检测囊尾蚴虫病 IgG 抗体中弱阳性质控血清的制备及应用[J]. 四川医学杂志, 2017, 38(1): 49-51.

(收稿日期: 2021-01-22 修回日期: 2021-06-12)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.22.023

## 列线图预测糖尿病肾病患者并发心血管疾病的研究\*

刘海波<sup>1,2</sup>, 胡晓卫<sup>2</sup>, 旦正尖措<sup>2</sup>, 欧妍<sup>3△</sup>

1. 西安交通大学第二附属医院, 陕西西安 710004; 2. 陕西省中医医院检验科, 陕西西安 710003; 3. 西安交通大学第二附属医院肾内科, 陕西西安 710004

**摘要:**目的 建立及验证预测糖尿病肾病(DN)患者并发心血管疾病的列线图模型。方法 选取 2019 年 1 月至 2021 年 4 月陕西省中医医院收治的 61 例 DN 患者作为研究对象, 其中确诊合并心血管疾病 38 例, 未合并心血管疾病 23 例, 收集患者的性别、年龄、血压、血常规指标、生化指标以及相关并发症等资料, 使用 LASO 回归筛选 DN 患者并发心血管疾病的独立危险因素, 将筛选出的独立危险因素建立列线图预测模型, 并对模型的预测性能进行验证。结果 在 42 个变量中筛选出了 10 个主要因素, 包括白细胞计数(WBC)、血红蛋白(Hb)、血细胞比容(HCT)、红细胞分布宽度(RDW)、总胆红素(TBIL)、清蛋白(ALB)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肌酐(CRE)、尿酸(UA)和合并糖尿病周围神经病变(DPN), 建立预测 DN 患者并发心血管疾病的列线图模型, 并对该模型进行验证, C 指数为 0.912(95%CI: 0.841~0.983), 校正曲线的实测曲线与理想曲线基本一致。结论 综合考虑 WBC、Hb、HCT、RDW、TBIL、ALB、LDL-C、CRE、UA 以及是否合并 DPN 能预测 DN 患者心血管疾病的发生风险, 列线图对 DN 患者并发心血管疾病的风险评估具有一定的临床价值。

**关键词:**糖尿病肾病; 心血管疾病; 列线图; 预测模型

中图分类号: R587.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)22-3300-05

糖尿病肾病(DN)是影响全世界数百万人健康的疾病, 也是导致终末期肾病(ESRD)的主要原因之一,

其特征是肾小球滤过率下降、系膜细胞增生、肾小球硬化等<sup>[1-3]</sup>。随着糖尿病发病率的持续上升, DN 的病

\* 基金项目: 陕西省科技攻关项目(2016SF-329)。

△ 通信作者, E-mail: oy1114@163.com。

本文引用格式: 刘海波, 胡晓卫, 旦正尖措, 等. 列线图预测糖尿病肾病患者并发心血管疾病的研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(22):