

• 论 著 •

染色改进梅毒质控物的制备及其应用*

余 谨, 杨 茹, 付 荣, 毕 昊

(武汉血液中心 430030)

摘要:目的 目前大多数检测机构所使用的梅毒质控物其颜色与检测的血清标本一样,都为无色透明或微黄色,出现加错、漏加或者量不足的情况很难用肉眼分辨,为了避免这种现象,该实验采用染料将质控物颜色进行改进。**方法** 采用自制经染色剂改进的梅毒质控物的制备方法制备 0.125、0.250、0.500 NCU/mL 3 个浓度的染色质控物,使用上海科华和厦门英科新创梅毒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,但结果差异无统计学意义($P>0.05$),使用两种不同的试剂连续检测不同浓度的质控物 20 次,检测的变异系数(CV)范围分别为 11.7%~13.4%、9.3%~12.9%;使用两种不同的试剂检测不同浓度的染色质控物 30 d,检测的 CV 范围分别为 10.1%~13.4%、8.08%~12.8%。**结论** 通过柠檬黄染色并未影响梅毒质控物的性能,且该质控物在较长的时间内仍可以稳定的使用,在实际应用中也起到了较为满意的效果,适合临床实验室应用和推广。

关键词:梅毒; 质控物; 染色; 柠檬黄

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0018-03

Production and application of improvement of dyeing on syphilis quality control material*

YU Jin, YANG Ru, FU Rong, BI Hao

(Wuhan Blood Center, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective The color of the syphilis quality control material adopted by most detection institutes was the same with the detected serum sample and they were all colorless, transparent or light yellow. There were cases of wrong adding, missing adding or insufficient adding due to the color of quality control materials which was hard to distinguish with naked eyes. To avoid this phenomenon, a new method was established for the distinction of quality control materials. **Methods** A new method of syphilis quality control materials that had been improved three concentrations control materials; 0.125, 0.250 and 0.500 NCU/mL. The syphilis diagnostic kit that was created by Shanghai Kehua and Xiamen Yingke was adopted to conduct detection and compare results. **Results** The difference between stained quality control material and unstained quality control materials had no statistical significance ($P>0.05$). Two different reagents were used to detect quality control materials of different concentration for 20 times and the CV were 11.7%—13.4% and 9.3%—12.9% respectively. Two different reagents were used to detect quality control materials of different concentration for 30 days and the CV range were 10.1%—13.4% and 8.08%—12.8%. **Conclusion** Citric yellow staining does not influence the properties of syphilis control materials and it can be used stably for a long time. It is suitable for clinical lab application and promotion.

Key words: syphilis; quality control; dyeing; citric yellow

目前我国的采供血机构都普遍采用酶联免疫吸附实验(ELISA)来检测血液的传染性指标-梅毒螺旋体(TP)^[1-2]。而做 ELISA 试验时,必须与检测的血液标本一起做一孔或者多孔室内质控物来监测每次试验结果的有效性^[3]。梅毒室内质控品的基质来自于血清,因此,目前大多数检测机构所使用的梅毒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,很难用肉眼分辨^[4]。为了克服现有的抗-TP 质控物的颜色性状不足,本研究提供一种简单可靠的抗-TP 质控物的染色方法,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酶联免疫反应的过程,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样本区分开来,并方便将质控品随机设置在检测的血液样本中,使整个实验进程更加安全可靠,质控品的值更能准确的反应实验结果。并且该染色方法已申请获得国家发明专利《一种显色质控物及其应用》,并且已获得发明专利授权(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 资料与方法

1.1 仪器与试剂 两种抗-TP ELISA 试剂盒分别由上海科华生物工程股份有限公司(试剂批号为 201606021)和厦门英科新创科技有限公司(试剂批号为 2015117527)提供,以上试剂均为中国药品生物鉴定所批批检合格产品。待染色的质控物为康彻斯坦生物有限公司提供的抗-TP 标准物质,浓度:3 mU(0.500 NCU/mL),批号:201511003,有效期:20171110。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:避光于干燥器中保存,化学名称:1-4'-磺酸苯基-3-羧基-4-4'-磺酸苯基偶氮基-5-吡啶啉酮三钠盐。分子式 $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$,相对分子质量为 534.36。

* 基金项目:武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WX15D61)。

作者简介:余谨,女,主管技师,主要从事临床血液检验方向的研究。

1.2 方法

1.2.1 抗-TP 标准物质的稀释 以康彻斯坦生物有限公司提供的 0.500 NCU/mL 梅毒螺旋体标准物质作为参考品,用 10%小牛血清磷酸盐缓冲液作为稀释剂,按 1:1、1:2、1:4 等比例对其进行稀释至所需低、中、高 3 种浓度(0.125、0.250、0.500 NCU/mL),用 0.1%的硫柳汞防腐,充分混合,无菌分装于德国生产的 1.5 mL 的实验室微量离心管中,于-20℃保存。

1.2.2 不同浓度梅毒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 的转速离心 1 min,待用。图 1 显示不同浓度柠檬黄溶液的显色情况,按照实际情况,本实验选择 0.1 g/mL 的柠檬黄溶液备用。吸取 1 μL 0.1 g/mL 已溶解的柠檬黄染料分别加入 1 mL/支的 3 种浓度(0.125、0.250、0.500 NCU/mL)抗-TP 质控物中,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 0.5 h,备用。

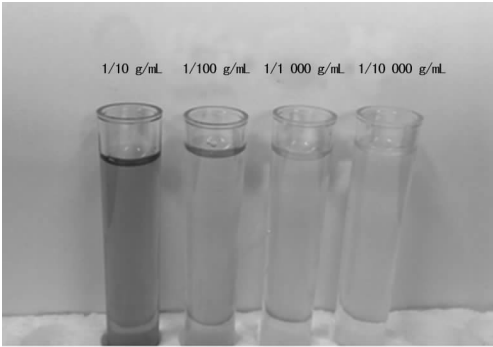


图 1 不同浓度柠檬黄溶液显色情况

1.2.3 检测方法 使用上海科华和厦门英科新创两种不同品牌的抗-TP ELISA 检测试剂盒分别检测 3 种不同浓度的染色及未染色的抗-TP 标准物质,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 3 种不同浓度的染色及未染色的抗-TP 标准物质,连续检测 30 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,抗-TP 标准物质检测结果比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同品牌试剂染色抗-TP 质控物检测结果 使用上海科华和厦门英科新创两种不同品牌的抗-TP ELISA 检测试剂盒分别检测 3 种不同浓度的染色及未染色的抗-TP 标准物质,连续检测 20 次,检测结果见表 1。图 2 显示未染色质控物以及染色质控物加入到酶标板中不同的显色情况。A1~H3 为未染色质控物加入到酶标板中情况,几乎为透明色肉眼不易观察加样量的情况,A5~E7 为染色质控物加入到酶标板中情况,柠檬黄染色效果明显,肉眼辨识度很强。

2.2 染色 TP 质控物应用效果 使用上海科华和厦门英科新创两种不同品牌的抗-TP ELISA 检测试剂盒分别检测 3 种不同浓度的染色及未染色的抗-TP 标准物质,每天随常规标本一起检测 5 孔,每个酶标板 1 孔,连续检测 20 d,检测结果见表 2。在 20 d 双试剂检测中,3 种浓度的染色质控物变异系数

(CV)值均小于 15%,体现出了较好的稳定性,并且通过 CV 值发现 0.500 NCU/mL 的染色质控物稳定性最好。图 3 所示,0.500 NCU/mL 的染色质控物采用新创试剂每天检测 5 孔,连续监测 20 d,共 100 个点的 S/CO 数据图,所有的点均在 $\bar{x} \pm 3s$ 范围之内,且 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 SPSS19.0 数据分析软件做配对样本 t 检验,染色组与未染色组两种试剂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梅毒质控的性能,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抗-TP 质控物检测结果

质控物	浓度 (NCU/mL)	新创			科华		
		\bar{x}	s	CV1(%)	\bar{x}	s	CV2(%)
柠檬黄染色 改良质控物	0.125	1.04	0.14	13.4	1.28	0.17	12.9
	0.250	2.17	0.28	12.6	2.60	0.32	12.3
	0.500	4.26	0.49	11.7	5.30	0.49	9.3
未染色改良 质控物	0.125	1.02	0.11	10.5	1.30	0.17	13.0
	0.250	2.23	0.28	12.7	2.93	0.34	11.7
	0.500	4.14	0.38	9.0	5.25	0.45	8.6

注:CV1 为新创试剂的 CV, CV2 为科华试剂的 CV;均值为吸光度值/临界值(S/CO)的均值。

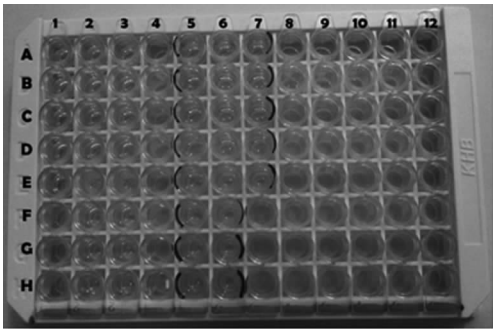


图 2 染色质控物与未染色质控物加样情况比较

表 2 两种品牌试剂染色与非染色抗-TP 质控物检测结果

质控物	浓度 (NCU/mL)	新创			科华		
		\bar{x}	s	CV1(%)	\bar{x}	s	CV2(%)
柠檬黄染色 改良质控物	0.125	1.04	0.14	13.4	1.30	0.17	12.8
	0.250	2.18	0.24	11.2	2.65	0.34	12.8
	0.500	4.25	0.42	10.1	5.32	0.43	8.1
未染色改良 质控物	0.125	1.01	0.12	11.7	1.27	0.16	13.3
	0.250	2.21	0.24	10.6	2.87	0.31	10.6
	0.500	4.11	0.35	8.6	5.24	0.40	7.7

注:CV1 为新创试剂的 CV, CV2 为科华试剂的 CV;均值为吸光度值/临界值(S/CO)的均值。

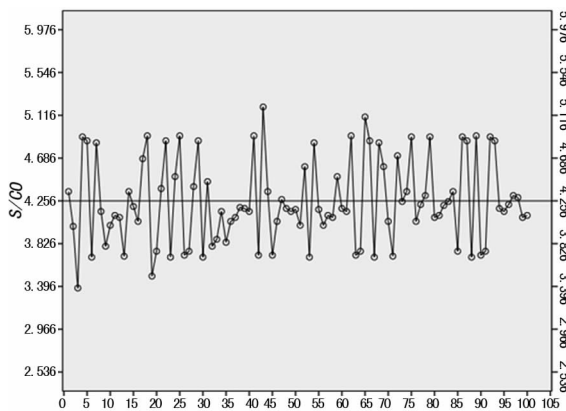


图 3 0.500 NCU/mL 染色质控物新创试剂检测应用

3 讨 论

目前,ELISA 是医学检验中常用的检测血液样品的方法,因其检测的灵敏度和特异性都较高,便于自动化管理,价格低等优势。我国的采供血机构都普遍采用 ELISA 来检测血液的传染性指标之一——TP^[1]。而做 ELISA 试验时,必须与检测的血液样本一起做一孔或者多孔室内质控物来监测每次试验结果的有效性。梅毒室内质控品的基质来自于人的血清,因此,目前大多数检测机构所使用的梅毒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)。在大批量检测血液标本时,采用全自动加样设备将 100 μ L TP 质控品加于 300 μ L 的酶标板孔内^[4-5]。由于其颜色与检测的血液标本很难分辨,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,而事实上做质控品的要求是必须随机分布于血液标本中间,与检测标本一起试验才能起到质控物的监测作用^[6-7]。且目前大多数试剂厂家生产的阴性对照、阳性对照与质控物的颜色十分相似,肉眼几乎不能辨别。因此,实验人员也很难区分阴阳性对照品和质控品是否有加错位置,或者混加的现象。质控品的试验结果直接关系到整批实验数据的有效性。试验结果无效常常会导致试验必须重做,给患者和工作人员带来不必要的麻烦和浪费^[8-9]。TP 是卫生部规定的所有采集的血液必须要检测的 4 项传染病指标之一^[1]。因质控品结果不合要求而导致试验重做,严重时可能会影响到患者及时输血,危及患者的生命。因此,对于 TP 质控物的颜色性状的改进尤为重要。

本研究提供一种简单可靠的抗-TP 质控物的染色方法,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酶联免疫反应的过程,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样本区分开来,并方便于将质控品随机设置在检测的血液样本中,使整个实验进程更加安全可靠,质控品的值更加能准确的反应试验结果。并且该染色方法已申请获得国家发明专利《一种显色质控物及其应用》,并且已获得发明专利授权(专利号:ZL201310351031.7),在实际应用中也起到了较为满意的效果。

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 范围分别为 11.7%~13.4%、9.3%~

12.9%;使用两种不同的试剂检测不同浓度的染色质控物 30 d,检测的 CV 范围分别为 10.1%~13.4%、8.1%~12.8%。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^[10-11]。另外,图 1 显示新创质控图 CV 为 10.1%,图 2 显示科华的质控图 CV 为 8.1%,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^[12-13]。总之,本研究自制的染色 TP 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 TP 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] 钱立琼,蹇志伟,廖秀云. 献血者梅毒检测不合格标本 TP-PA 确证分析[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(8): 845-846.
- [2] 张瑞,张括,王露楠,等. 2006—2011 年中国临床实验室检测自身抗体的室间质量评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(3): 648-652.
- [3] 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.
- [4] 梅静,郭祥萍. 酶联免疫实验质控物的选择[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(10): 1251-1252.
- [5] 刘云,高玲娟. 乙肝表面抗原室内弱阳性质控物的制备及其应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(14): 1994-1995.
- [6] 矫丽媛,才蕾,赵晓妮,等. 前列腺特异抗原质控品的制备与评价[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(1): 64-66.
- [7] 董莉,易青,杜肖彦. 自制质控品在化学发光仪上的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9): 1172-1174.
- [8] 张雪梅,黄珂,许茹,等. 广州献血人群抗-HCV ELISA 检测 S/CO 值与确证试验结果的相关性[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(1): 29-33.
- [9] Zhang K, Song CJ, 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.
- [10] 武丽娟. 3 种酶联免疫吸附试验试剂检测丙型肝炎抗体结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23): 3246-3248.
- [11] 肖海龙,赵凯,林赛君,等. 牛奶 β -酪蛋白和大豆 β -伴球蛋白双抗制备及夹心 ELISA 快速定性检测技术的建立[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2013, 39(2): 222-226.
- [12] 郭铮蕾,谷强,韩玥,等. 质量控制图在蓝舌病竞争 ELISA 检测中的应用[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(2): 77-81.
- [13] 杨亮,杜勇. ELISA 室内质控累积均值建立质控图框架的应用探讨[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(9): 821-822.