

• 论 著 •

倍比稀释法在医学实验室试剂筛选应用中的研究

王玉兰¹, 刘培海¹, 王远忠², 闫荣军², 付汝坤¹

(1. 日照出入境检验检疫局, 山东日照 276800; 2. 济南出入境检验检疫局 250000)

摘要:目的 探讨倍比稀释法在指导实验室筛选质量可靠检测试剂中的应用价值。方法 通过对丙型肝炎病毒阳性血清标本进行倍比稀释, 采用 3 种不同的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测结果比对, 并结合聚合酶链反应(PCR)检测结果实施验证。**结果** A、B 和 C 3 种 ELISA 试剂检测结果阳性率之间差异有统计学意义; ELISA 试剂检测出现全部阳性结果到全部阴性结果的梯度间均存在 1 个梯度差, PCR 试剂检测全部阳性结果最大稀释梯度与 ELISA(C)试剂检测结果具有较好的一致性。**结论** 倍比稀释法为实验室筛查与选用质量可靠的检测试剂提供了良好的技术方法。

关键词: 倍比稀释法; 医学实验室; 试剂筛选

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)11-1510-03

Application research for doubling dilution method in screening of medical laboratory reagents

WANG Yulan¹, LIU Peihai¹, WANG Yuanzhong², YAN Rongjun², FU Rukun¹

(1. Rizhao Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Rizhao, Shandong 276800, China;

2. Jinan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Jinan 250000, China)

Abstract: **Objective** To explore application value of doubling dilution method in screening of medical laboratory reagents. **Methods** By the method of doubling dilution, positive serum samples of the hepatitis C virus (HCV) were diluted. Three different enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (A, B and C) were used to detect the samples. PCR testing were used to verify the results. **Results** The differences of positive rate between three ELISA reagents had statistic significance ($P < 0.05$). There was a gradient interval for gradients from all positive results to all negative results for three ELISA reagents. The maximum dilution of positive results of PCR were commendably consist with the results of ELISA reagent C. **Conclusion** Doubling dilution method can be regarded as a kind of good technical approach for guiding medical laboratory on screening of reliable reagents.

Key words: doubling dilution method; medical laboratory; reagents screening

倍比稀释就是按照一定的比例对一定浓度的溶液进行稀释, 以得到浓度较低的溶液, 本方法广泛应用于血清免疫学、微生物学等临床和科学研究领域^[1-6]。为探索实验室试剂筛查与选用的有效方法, 本文以丙型肝炎病毒(HCV)阳性血清标本为试验研究对象, 采用倍比稀释法对其进行稀释后采用不同厂家的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测比对, 同时结合聚合酶链反应(PCR)检测结果实施验证, 论证倍比稀释法在实验室检测试剂筛选中的应用价值, 为指导实验室筛查与选用质量可靠的 ELISA 检测试剂提供一种有效的方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取健康人群传染病监测体检过程中查出的 HCV 阳性患者的血清标本, 样品编号为 1402170129。

1.2 试剂来源 HCV ELISA 检测试剂盒分别为 A、B 和 C 3 个厂家的检测试剂, HCV RNA 提取试剂盒和 HCV RNA 检测试剂盒均为广州维伯鑫厂家的检测试剂, 以上试剂均在有效期内使用。

1.3 仪器设备 ELISA 检测采用 1575 型洗板机和 680 型酶标仪; PCR 检测采用 Step one plus 型荧光定量 PCR 仪。

1.4 倍比稀释 将 HCV 阳性血清标本采用生理盐水进行 15 个梯度的倍比稀释, 终浓度分别为 1:1 原倍、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048、1:4096、1:8192 和 1:16384, 样品倍比稀释后的每个稀释梯度均作为 1 份独立的样品。采用 3 种 HCV ELISA 试剂和 1 种 HCV 荧光 PCR 试剂分别进行 ELISA 和 PCR 检测, ELISA 重复 10 次, PCR 重复 5 次。操作方法均按照试剂

盒说明书要求进行。

1.5 统计学处理 梯度统计至全部试剂出现全部阴性结果的梯度为止, 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计, 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各种检测试剂检测结果比较 见表 1。由表 1 可见, A、B 和 C 3 种 ELISA 试剂检测的阳性率分别为 69.17%、80.83% 和 87.50%, 阳性率之间经 χ^2 检验差异有统计学意义($\chi^2 = 12.53, P < 0.05$), 其中 ELISA(A)与 ELISA(B)试剂检测阳性率之间差异有统计学意义($\chi^2 = 4.36, P < 0.05$), ELISA(A)与 ELISA(C)试剂检测阳性率之间差异有统计学意义($\chi^2 = 11.88, P < 0.05$), 而 ELISA(B)与 ELISA(C)试剂检测阳性率之间差异无统计学意义($\chi^2 = 2.00, P > 0.05$)。PCR 检测阳性率为 83.33%, 拥有理想的实时与线性扩增曲线图, 见图 1 和图 2。PCR 与 ELISA 试剂检测阳性率比较结果显示, PCR 与 ELISA(A)试剂检测阳性率之间差异有统计学意义($\chi^2 = 4.16, P < 0.05$), 与 ELISA(B)试剂检测阳性率之间差异无统计学意义($\chi^2 = 0.17, P > 0.05$), 与 ELISA(C)试剂检测阳性率之间差异无统计学意义($\chi^2 = 0.58, P > 0.05$)。

2.2 各试剂检测结果梯度区间比较 见表 2。从梯度区间看, ELISA(A)、(B)和(C)3 种试剂出现全部阳性结果的最高稀释梯度分别为 1:128、1:256 和 1:512, 出现全部阴性结果的最低稀释梯度分别为 1:512、1:1024 和 1:2048。PCR 试剂全部阳性结果的最高稀释梯度和全部阴性结果的最低梯度分别为 1:512 和 1:1024。

表 1 HCV 样品倍比稀释不同试剂检测阳性结果比较[n(%)]

试剂	n	1 : 256		1 : 512		1 : 1 024		1 : 2 048		合计
		测试数	阳性结果	测试数	阳性结果	测试数	阳性结果	测试数	阳性结果	
ELISA(A)	120	10	3(30.00)	10	0(0.00)	10	0(0.00)	10	0(0.00)	83(69.17)
(B)	120	10	10(100.00)	10	7(70.00)	10	0(0.00)	10	0(0.00)	97(80.83)
(C)	120	10	10(100.00)	10	10(100.00)	10	5(50.00)	10	0(0.00)	105(87.50)
PCR	60	5	5(100.00)	5	5(100.00)	5	0(0.00)	5	0(0.00)	50(83.33)

注:1 : 1~1 : 128 稀释梯度间阳性率均为 100.00 % ,表中略去,合计栏含有关数据。

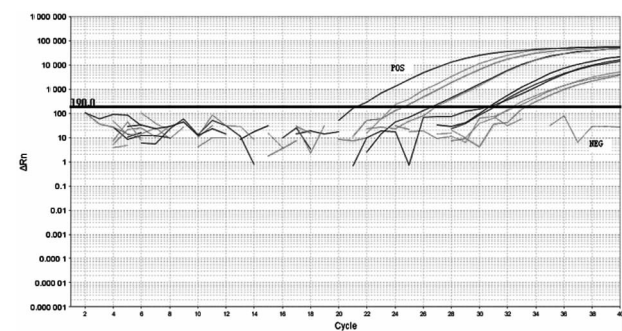


图 1 HCV 样品倍比稀释荧光 PCR 实时扩增曲线图

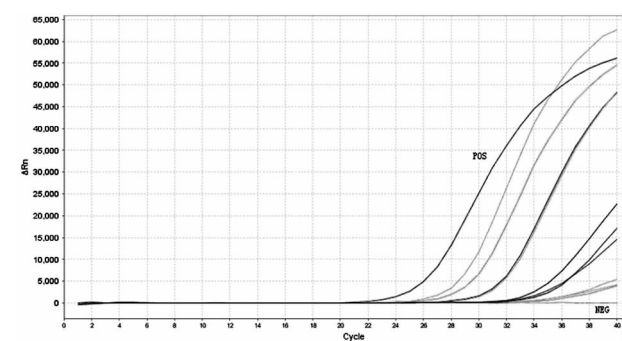


图 2 HCV 样品倍比稀释荧光 PCR 线性扩增曲线图

表 2 HCV 样品倍比稀释不同试剂梯度区间比较

倍比稀释梯度	ELISA(A)	ELISA(B)	ELISA(C)	PCR
全部阳性结果最高稀释梯度	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 512
全部阴性结果最低稀释梯度	1 : 512	1 : 1 024	1 : 2 048	1 : 1 024

3 讨 论

3.1 不同 ELISA 试剂检测结果比较 结果显示,ELISA(A)、(B)和(C)3 种试剂检测阳性率分别 69.17 %、80.83 % 和 87.50 % ,阳性率之间差异有统计学意义,由此说明 3 种试剂对上述样品检出率是不同的。由于本次试验是在同一检测系统条件下进行的,除了使用的试剂不同外,检测过程及条件是一致的。本文认为,这种检测结果差异的产生,可能与试剂内相应抗体包被的浓度有关。由于 ELISA 测试反映抗原与抗体的结合呈线性关系,随着样品中抗原浓度被梯度稀释,其浓度呈比例下降,当样品中抗原浓度低于试剂中抗体浓度时,抗原抗体复合物的形成也开始逐渐下降^[7]。由此可见,3 种试剂包被的抗体量(核心抗体与非核心抗体比例)可能存在差异,导致了不同试剂检测阳性率不同。在 3 种试剂检测结果中,出现全部阳性结果到全部阴性结果的梯度之间均存在 1 个梯度差的梯度区间,该梯度区间的产生可能是由于操作系统引起的,表明操作系统某环节存在操作误差。这种误差是否与加样过程有关,有待于进一步探讨。实验室可以通过对该梯度区间分析,

作为查找操作系统不同环节产生检测结果差异的有效方法和途径。文献[8-9]报道,ELISA 检测结果判断有一个灰度区间。本文认为这个灰度区间也可能是对样品倍比稀释后检测出现全阳性结果至全阴性结果产生梯度区间的重要原因。上述结果表明,在实验室检测系统一致的情况下,对相同样品进行倍比稀释后采用不同的 ELISA 试剂检测结果进行比较分析,可较好地对市售 ELISA 检测试剂进行有效筛查、选择,保证实验室检测结果的准确性和可靠性。

3.2 荧光 PCR 与不同 ELISA 试剂检测结果的比较分析 文献资料报道,荧光 PCR 可以较好地从分子生物学方面对细菌病毒核酸进行定性或定量检测,可以从实时和线性扩增曲线中看出有或无扩增,准确性和灵敏性高,假阳性率低,可广泛应用于临床领域对疾病的诊断和其他研究领域^[10-16]。本次荧光 PCR 试剂检测结果阳性率为 83.33 % ,与 ELISA(A)试剂检测阳性率比较差异有统计学意义,而与 ELISA(B)和 ELISA(C)试剂检测阳性率比较差异均无统计学意义。荧光 PCR 试剂检测未出现全部阳性结果至全部阴性结果的梯度区间,其检测结果最高稀释梯度(1 : 512)在 ELISA(B)与 ELISA(C)梯度区间内,由此表明这两种 ELISA 试剂,特别是 ELISA(C)试剂更接近于荧光 PCR 试剂的检测结果,因此认为 ELISA(C)试剂检测结果与 PCR 检测结果具有较好的一致性。

3.3 倍比稀释法用于医学实验室筛选检测试剂的有效性 分析采购并使用质量优良的检测试剂是保证实验室检测结果准确性和可靠性的重要保障措施。通常用于对试剂的质量评价指标也较多,有的操作及使用复杂,有的需要多项指标综合使用实施评价。本文使用阳性样品,通过采用倍比稀释法对实验室 ELISA 检测试剂的检测结果进行比对,比较不同试剂的阳性率和梯度区间指标,并采用 PCR 进行验证,比较不同试剂检测效率,可以较好地确定实验室需要采购的 ELISA 试剂的产品及其质量。将过去或阴或阳的静态样品用于检测试剂的验证、室间比对、能力验证等活动,通过该方法对阳性样品进行倍比稀释后,将样品靶物进行动态化,形成梯度变化,达到对试剂检测效能进行检验的目的。

本研究表明,倍比稀释法可为实验室筛查与选用质量可靠的检测试剂提供良好的技术方法,该方法同样也可以用于室间比对、能力验证等质量监控活动中,具有较高的实用性。

参考文献

[1] Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, et al. Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 137(5): 825-830.

[2] Kaur S, Khurana S, Bagga R, et al. Antitrichomonas IgG, IgM, IgA, and IgG subclass responses in human intravaginal trichomoniasis[J]. Parasitol Res, 2008, 103(2): 305-

- 312.
- [3] Pridmore A, Burch D, Lees P. Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of tiamulin against field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 151 (3/4): 409-412.
 - [4] Kenny MT, Brackman MA. Comparison of agar dilution, tube dilution, and broth microdilution susceptibility tests for determination of ramoplanin MICs[J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32 (5): 1364-1365.
 - [5] 邱利锋. 倍比稀释定量法在乙肝五项检测中的应用[J]. *现代中西医结合杂志*, 2005, 14(17): 2318.
 - [6] 李攻君, 康琼英. 血清倍比稀释量的不同对检测 IgG 抗 A (B) 效价灵敏度的影响[J]. *广东医学*, 2012, 33(3): 390-391.
 - [7] Yatsushiro S, Akamine R, Yamamura S, et al. Quantitative analysis of serum procollagen type I C-terminal propeptide by immunoassay on microchip[J]. *PLoS One*, 2011, 6 (4): e18807.
 - [8] Peng J, Cheng L, Yin B, et al. Development of an economic and efficient strategy to detect HBsAg: application of "gray-zones" in ELISA and combined use of several detection assays [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412 (23/24): 2046-2051.
 - [9] Verweij PE, Erjavec Z, Sluiter W, et al. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and interlaboratory reproducibility. The Dutch Interuniversity Working Party for Invasive Mycoses [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(6): 1612-1616.
 - [10] McIntyre JB, Bose P, Klimowicz AC, et al. Specific and sensitive hydrolysis probe-based real-time PCR detection of epidermal growth factor receptor variant III in oral squamous cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (2): e31723.
 - [11] Thonur L, Maley M, Gilray J, et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3 [J]. *BMC Vet Res*, 2012, 28(8): 30-37.
 - [12] Yoshimoto K, Dang J, Zhu S, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 488-493.
 - [13] Wu Y, Du X, Xue C, et al. Quantification of serum SOX2 DNA with FQ-PCR potentially provides a diagnostic biomarker for lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 737-741.
 - [14] Liu H, Rodes B, Chen CY, et al. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene [J]. *Clin Microbiol*, 2001, 39(5): 1941-1946.
 - [15] 王振全, 罗保证, 薄情如, 等. TaqMan 探针荧光 PT-PCR 检测狂犬病病毒 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(6): 79-82.
 - [16] 郭文秀, 云华, 毛兰英, 等. 梅毒螺旋体荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2013, 36(5): 308-311.
-
- (收稿日期: 2016-01-11 修回日期: 2016-03-19)
- (上接第 1509 页)
- [4] Park JW, Park KH, Lee SY. Noninvasive prediction of intra-amniotic infection and/or inflammation in women with preterm labor: various cytokines in cervicovaginal fluid [J]. *Reprod Sci*, 2013, 20(3): 262-268.
 - [5] Sorokin Y, Romero R, Mele L, et al. Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth < 32 weeks and adverse neonatal outcomes [J]. *Am J Perinatol*, 2010, 27(8): 631-640.
 - [6] Kopyra P, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. Usefulness of PCT, IL-6, CRP measurement in the prediction of intraamniotic infection and newborn status in pregnant women with premature rupture of membranes [J]. *Ginek Pol*, 2010, 81(5): 336-341.
 - [7] 范建辉, 崔金晖, 滕奔琦, 等. MMP-9 和 iNOS 在胎膜早破胎膜组织中的表达及相关性研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(10): 2000-2004.
 - [8] 黄莺, 焦永慧, 李小英. 胎膜早破孕妇血清 IL-6、细胞黏附因子-1 与新生儿 Apgar 评分的相关性 [J]. *中国妇幼保健*, 2012, 27(35): 5794-5797.
 - [9] Canpolat FE, Yiğit S, Korkmaz A, et al. Procalcitonin versus CRP as an early indicator of fetal infection in preterm premature rupture of membranes [J]. *Turk J Pediatr*, 2011, 53(2): 180-186.
 - [10] Gomez-Lopez N, Laresgoiti-Servitje E, Olson DM, et al. The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: a review [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82 (5): 809-814.
 - [11] Gulati S, Bhatnagar S, Raghunandan C, et al. Interleukin-6 as a predictor of subclinical chorioamnionitis in preterm premature rupture of membranes [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 67(3): 235-240.
 - [12] Puchner K, Iavazzo C, Gourgiotis D, et al. Mid-trimester amniotic fluid interleukins (IL-1 β , IL-10 and IL-18) as possible predictors of preterm delivery [J]. *In Vivo*, 2011, 25(1): 141-148.
 - [13] 刘振红, 许茜, 靳钰. IL-6、MMP-9、TNF- α 在胎膜早破早产孕妇血清、羊水里的表达及意义 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2011, 19(6): 58-60.
 - [14] 付广红, 张桂芳, 喻惠萍. IL-6、IL-8 及 MMP-9 在胎膜早破者血清、羊水里的含量及意义 [J]. *东南国防医药*, 2014, 16(1): 52-54.
 - [15] 赵昊云, 张秦, 吴元赓. 胎膜早破合并绒毛膜羊膜炎的预测指标新进展 [J]. *东南国防医药*, 2014, 16(4): 397-400.
- (收稿日期: 2016-01-22 修回日期: 2016-03-25)