

论著·临床研究

血清抗可提取性核抗原抗体检测质控品的制备及评价^{*}李荣海,张鹏,郭慧娟,高洁,王雅平,刘文娟,尚晓泓,李琦[△]

(中国中医科学院西苑医院检验科,北京 100091)

摘要:目的 自制抗可提取性核抗原(ENA)抗体弱阳性及阴性质控品,确保常规检测工作结果的质量。**方法** 将抗核抗体(ANA)谱阳性结果的患者血清置于56℃30 min条件下灭活,离心去除沉淀后血清(结果为RNP++, Sm++, SS-A++, SS-B++, dsDNA++)与ANA及ANA谱全部阴性献血员血清按照1:N比例混匀,配置成ENA弱阳性质控品(结果为RNP±, Sm±, SS-A±, SS-B±, dsDNA±),采用免疫印迹法和酶联免疫吸附法检测ENA弱阳性质控品,然后进行均一性、稳定性、破坏性实验验证。结果 均一性、稳定性、破坏性实验验证均通过,ENA阴性质控品所有阴性的靶抗原都能够检测出阴性,所有阳性的靶抗原都能够检测出阳性。**结论** 经过验证,ENA自制质控品符合该科要求,可以应用于常规检测工作。**关键词:**可提取性核抗原; 自制质控品; 制备及评价**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.20.010**中图法分类号:**R446.6**文章编号:**1673-4130(2018)20-2504-04**文献标识码:**A**Preparation and evaluation of quality control of serum anti-extractable nuclear antigen antibody^{*}**

LI Ronghai, ZHANG Peng, GUO Huijuan, GAO Jie, WANG Yaping,

LIU Wenjuan, SHANG Xiaohong, LI Qi[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective Homemade weakly positive and negative quality control of ENA so as to ensure quality work routine testing results. **Methods** The serum ANA spectrum of positive results (RNP ++, Sm ++, SS-A ++, SS-B ++ and dsDNA ++) and ANA and ANA spectrum of all negative serum according to 1:N ratio of mixing, arranged ENA weak positive control materials (RNP ±, Sm ±, SS-A ±, SS-B ± and dsDNA ±). ENA weak positive control materials was detected by both Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay, and then the homogeneity test, stability test and destructive experiments were conducted. **Results** Homogeneity test, stability test and destructive experiments have been verified by experiments. ENA negative quality controls of all the negative target antigens were detected negative and all positive target antigens were detected positive. **Conclusion** ENA homemade quality control products is coincide with experimental demands, which can be used for the laboratory routine testing.**Key words:** extractable nuclear antigen antibody; homemade quality control; preparation and evaluation

抗可溶性抗原(ENA)抗体是抗可提取性核抗原的总称,也是自身免疫性疾病(AID)的重要特征,对系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、进行性全身性硬化症、皮肌炎等多种风湿免疫性疾病的诊断和鉴别诊断、病情评估、病程转归与预后判断等都具有重要的临床应用价值^[1-2]。目前,临幊上开展的ENA抗体检测方法主要有间接荧光免疫法、酶联免疫吸附法(ELISA

法)、免疫印迹法、免疫斑点法等,其中多数检测方法仍以手工操作为主,以肉眼观察判断检测结果,所以ENA抗体检测的质量控制是保证实验结果准确性的关键环节^[3],也是ISO15189相关文件《CNAS-CL39实验室质量和能力的认可准则在免疫学检验领域的应用》中的具体要求^[4]。但是目前国内商品化ENA抗体室内质控品还未普及使用,所以多数实验室需要

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81671618)。

作者简介:李荣海,男,主管技师,主要从事临幊生化和免疫学检验方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:yourslq@126.com。

本文引用格式:李荣海,张鹏,郭慧娟,等.血清抗可提取性核抗原抗体检测质控品的制备及评价[J].国际检验医学杂志,2018,39(20):2504-2506.

根据实际工作情况,自制 ENA 弱阳性及阴性质控品,以保证检测结果的准确性。本实验室采用抗核抗体(ANA)和 ANA 谱均阴性的献血员的血清稀释 ENA 谱强阳性结果的患者血清,制备 ENA 弱阳性及阴性质控品,并采用免疫印迹法和 ELISA 法同时确认,对其进行均一性、稳定性、破坏性实验验证等。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器:HOB 公司全自动模条仪(设备编号:XYHL-JY-MY-06);帝肯 FREEDOM EVOLYZER-2 全自动酶免仪(设备编号:XYHL-JY-MY-05)。试剂:HOB 公司 ANA 谱检测试剂盒(批号:20141218),采用免疫印迹法。欧蒙公司抗 SS-A 抗体检测试剂盒(批号:E141010AE),抗 SS-B 抗体检测试剂盒(批号:E141010AC),抗 dsDNA 抗体检测试剂盒(批号:E141113CF),抗 Sm 抗体检测试剂盒(批号:E141008BA),抗 RNP 抗体检测试剂盒(批号:E151015AN),抗 Scl-70 抗体检测试剂盒(批号:E150206CP),抗 Jo-1 抗体检测试剂盒(批号:E150429BA),以上检测试剂采用 ELISA 法。

1.2 方法

1.2.1 血清标本来源 (1)收集无溶血、脂浊、黄疸及细菌污染,且自身抗体阴性的单一献血员血清,置于 56 ℃ 30 min 条件下灭活,3 000 r/min 离心 15 min,去除沉淀物;留取 ANA 谱强阳性结果的患者血清(结果为 RNP++, Sm++, SS-A++, SS-B++, dsDNA++)。所有留取的血清均无溶血、脂浊、黄疸及细菌污染,使用雅培 i2000 化学发光仪检测乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒抗体、人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体、梅毒螺旋体特异性抗体均为阴性。(2)ANA 谱强阳性和弱阳性的判断标准:免疫印迹法抗体滴度在 1:1 000 以上,ELISA 法测定的 OD 值大于 cut-off 值的 10 倍以上,确定为强阳性结果;免疫印迹法抗体滴度在 1:100~1:320,ELISA 法测定的 OD 值在 cut-off 值的 1~3 倍内,确定为弱阳性结果。

1.2.2 制备质控血清 按照 CNAS-CL39 要求^[4],免疫定性室内质控要求有质控品,质控品可以自制,每检测日或分析批,应使用弱阳性和阴性质控物进行质控。所以本实验室制备了弱阳性和阴性质控血清。(1)弱阳性质控血清制备:留取 ENA 强阳性结果(免疫印迹法抗体滴度在 1:1 000 以上,ELISA 方法测定的 OD 值大于 cut-off 值的 10 倍以上)的患者血清按照 1:N 比例与献血员阴性血清混匀,分别做 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 倍稀释,然后将充分混匀的血清无菌分装,每管应至少分装 50 μL,并储存于-20 ℃ 冰箱中。分别检测 5 种不同浓度室内质控血清,连续检测 20 次,对其结果差异性进行比较。在 1:16 倍稀释时配置成 ENA 弱阳性质控品(免疫印迹

法测定抗体滴度在 1:100~1:320,ELISA 法测定的 OD 值在 cut-off 值的 1~3 倍内)。(2)阴性质控血清制备:无溶血、脂浊、黄疸及细菌污染,且自身抗体阴性的单一献血员血清,然后将充分混匀的血清无菌分装,每管应至少分装 50 μL,并储存于-20 ℃ 冰箱中。

1.2.3 质控血清的评价方法 (1)基质效应验证:质控品全部采取患者血清制备,该质控品基质与临床常规试验中的待测标本一致。(2)均一性验证:于质控品配制完成的第一周随机抽取分装好的质控品 10 管,复溶、混匀后进行 ENA 测定,要求 ENA 阴性质控品所有阴性靶抗原都能够检测出阴性,所有阳性靶抗原都能够检测出阳性,且每管质控品结果一致。(3)稳定性验证:在质控品完成制备后,分别于每周三随常规标本进行测定,检测前取出自制冰冻质控物 1 支,室温下融化,观察其外观(有无浑浊及沉淀),充分混匀后进行 ENA 测定,连续检测 3 个月,要求 ENA 阴性质控品所有阴性的靶抗原都能够检测出阴性,所有阳性的靶抗原都能够检测出阳性,且每管质控品结果一致。(4)破坏性实验验证:质控品配制完成的第一周随机抽取分装好的质控品的 10 管,分别于 37 ℃ 存放 7 d 进行破坏性实验,混匀后进行 ENA 测定,要求 ENA 阴性质控品所有阴性靶抗原都能够检测出阴性,所有阳性靶抗原都能够检测出阳性,且每管质控品结果一致。观察质控品在异常保存条件下的稳定性。

2 结 果

2.1 均一性验证结果 ELISA 法检测 10 管弱阳性质控品的靶抗原检测 S/CO 值为 1.5~3.0,变异系数(CV)均小于 5.0%,免疫印迹法检测 10 管弱阳性质控品的靶抗原抗体滴度均为 1:100~1:320 阳性,且每管检测出的靶抗原结果一致,2 种方法 10 管阴性质控品的靶抗原检测结果均为阴性,质控品均一性验证通过。见表 1。

表 1 ENA 弱阳性质控品均一性验证结果

检测项目	n	ELISA 法(S/CO 值)		免疫印迹法
		CV($\bar{x} \pm s$, %)	滴度	
RNP	10	2.19±0.09	4.11	1:100
Sm	10	2.68±0.12	4.48	1:320
SS-A	10	2.86±0.13	4.55	1:320
SS-B	10	2.11±0.08	3.39	1:100
dsDNA	10	2.20±0.09	4.09	1:100

2.2 稳定性验证结果 在质控品完成制备后,连续 3 个月的 12 次检测中 ELISA 法检测 10 管弱阳性质控品的靶抗原检测 S/CO 值为 1.5~3.0,CV 均小于 5.0%,免疫印迹法检测 10 管弱阳性质控品的靶抗原抗

体滴度均为 $1:100\sim1:320$ 阳性,且每管检测出的靶抗原结果一致,阴性质控品的靶抗原检测结果均为阴性。质控品3个月内的稳定性验证通过。见表2。

表2 ENA弱阳性质控品稳定性验证结果

检测项目	n	ELISA法(S/CO值)		免疫印迹法
		CV($\bar{x}\pm s$,%)	滴度	
RNP	12	2.25±0.11	4.89	1:100
Sm	12	2.77±0.12	4.33	1:320
SS-A	12	2.81±0.12	4.27	1:320
SS-B	12	2.23±0.09	4.03	1:100
dsDNA	12	2.33±0.10	4.29	1:100

2.3 破坏性实验验证结果 质控品 37°C 存放7 d后10管弱阳性质控品的靶抗原检测S/CO值为 $1.5\sim3.0$,CV均小于5.0%,免疫印迹法检测10管弱阳性质控品的靶抗原抗体滴度均为 $1:100\sim1:320$ 阳性,且每管检测出的靶抗原结果一致,阴性质控品的靶抗原检测结果均为阴性。 37°C 存放7 d的破坏性实验验证通过。见表3。

表3 ENA弱阳性质控品破坏性验证结果

检测项目	n	ELISA法(S/CO值)		免疫印迹法
		CV($\bar{x}\pm s$,%)	滴度	
RNP	10	2.05±0.09	4.39	1:100
Sm	10	2.97±0.14	4.71	1:320
SS-A	10	2.61±0.09	3.45	1:320
SS-B	10	2.01±0.09	4.48	1:100
dsDNA	10	2.18±0.10	4.59	1:100

3 讨论

近年来,国内外对自身抗体的认识不断深化和细化,国内开展自身抗体检测的实验室越来越多,卫生部临检中心也于近年开展了自身抗体的室间质评工作,取得了不少的成绩和经验^[5-6]。但是目前国内商品化ENA抗体室内质控品还未普及使用,如何得到实用、廉价、可靠的室内质控品,以保证检测结果的准确性,成为多数实验室面临的问题。

国内外文献中,关于自身抗体试验的质量控制多涉及外部标准品来验证试剂的灵敏度、特异度等指标,未提及如何进行室内质控^[7]。文献中的标准品大多数是针对具体类型的单一抗体,如抗dsDNA抗体、抗Jo-1抗体等^[8-9]。将单一抗体的标准品作为室内质控品成本较高,多数实验室难以接受。国内关于自制质控品的文献多着重于定量试验(如雌二醇、梅毒、丙型肝炎病毒、HIV、血脂等指标)^[10-13]和部分定性试验(如HIV抗体)^[14],较少涉及自身免疫类试验,很少涉及自身抗体类检测。陈良琼等^[15]使用检测试剂盒中

阳性对照制备自身抗体临界值质控血清,取得了较好的效果,但因为阳性对照基质不明确,需要研究者进行基质效应的验证,且该实验也未进行自制质控品均一性和破坏性试验的验证。

CANS-CL02:2008《医学实验室质量和能力认可准则》^[16]和CNAS-CL39《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学检验领域的应用》^[4]要求免疫定性室内质控要有质控品;质控品可以自制,但应有制备程序包括稳定性和瓶间差的评价方案及配制、评价记录。室内质控的频率应为每检测日或分析批,应使用弱阳性和阴性质控物进行质控。本实验室在严格按照CANS-CL02和CNAS-CL39要求的基础上,查阅大量涉及免疫定性试验,如特定蛋白、乙型肝炎病毒表面抗原、抗HIV抗体、抗丙型肝炎病毒抗体等自制临界值质控品文献^[13-14],制定出ENA抗体检测弱阳性及阴性质控品制备及评价标准操作规程,实际制备质控品并对其进行了均一性、稳定性、破坏性实验验证,在自制ENA室内质控品方面做了积极的探索和尝试。实践证明,该质控品满足ISO15189对免疫定性实验的要求。本实验室也顺利通过了ANA、dsDNA、ENA项目的现场评审。

本试验中用患者新鲜混合血清代替厂家质控物,患者混合新鲜血清具有收集容易、性质稳定、能排除基质效应的干扰并保证质控品与临床标本最大限度的一致,是自制多项目质控血清的理想来源。而且临床实验室每天有大量废弃的患者血清,采用患者血清自制室内质控品存在来源方便,成本低廉^[17]。从均一性、稳定性验证结果可以看出混合血清质控品在使用过程中非常均一和稳定, -20°C 保存条件下其稳定期能达到3个月,也基本满足了临床实验室的实用需求。破坏性实验结果也显示了该质控品在不利条件下(37°C 存放1周)的稳定性完全满足临床检测需要。

但是,在该质控品制备过程中,笔者也发现了一些问题需要解决。配置复合ENA质控品的难点在于找到多个靶抗原同时强阳性的患者血清,如果不能找到多靶抗原同时阳性的患者血清就只能考虑配置单独靶抗原的弱阳性质控品。另外,质控品稳定期虽能达到3个月,但还是比一般商品质控品稳定期短,可否通过降低储存温度延长质控品的稳定期?做均一性、稳定性、破坏性实验验证需要质控品过多(32管),是否可以减少验证过程中质控品的使用量?破坏性实验验证是否还要加做其他环境因素的影响(如湿度)?以上工作还需要进一步的探索和尝试。

4 结论

本研究中,均一性、稳定性验证结果显示,自制质控品在使用过程中非常均一和稳定,基本满足了临床实验室的实用需求,破坏性实验(下转第2510页)

度不同种族人群上述基因多态性分布差异较大,不同纬度汉族人群上述基因多态性分布无差异性。

参考文献

- [1] MISASI S, MARTINI G, PAOLETTI O, et al. VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms related to adverse events in case-control cohort of anticoagulated patients[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(52):e5451.
- [2] 袁慧.心血管药物个体化用药指导的基因检测及临床意义[J].中华检验医学杂志,2015(7):442-444.
- [3] LACUT K, AYME-DIETRICH E, GOURHANT L A, et al. Impact of genetic factors (VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 and EPHX1) on the anticoagulation response to fluindione[J]. Br J Clin Pharmacol, 2012, 73(3):428-436.
- [4] NOWAK-GOETTL U, DIETRICH K, KRUEMPEL A, et al. The VKORC1 and CYP2C9 genotypes significantly effect Vitamin K antagonist dosing only in patients over the age of 20 years[J]. Blood Cells Mol Dis, 2017, 67(S1):S54-58.
- [5] IVASHCHENKO D, RUSIN I, SYCHEV D, et al. The frequency of CYP2C9, VKORC1, and CYP4F2 polymorphisms in Russian patients with high thrombotic risk[J]. Med Lith, 2013, 49(12):517-521.
- [6] MOLDEN E, OKKENHAUG C, EKKER SOLBERG E, et al. Increased frequency of CYP2C9 variant alleles and

(上接第 2506 页)

验证结果也显示了该质控品在不利条件下(37 ℃存放1周)的稳定性完全满足临床检测需要,提示自制质控品可以应用于实验室常规检测工作。

参考文献

- [1] 张毅,储以微. Th17 与自身免疫病[J]. 复旦学报(医学版),2008,35(01):145-147.
- [2] 李仕红,杨汉正. 以 T 细胞应答过程为靶治疗自身免疫性疾病策略进展[J]. 实用临床医药杂志,2007,11(9):165-168.
- [3] WIIK A S. Clinical use of serological tests for antineutrophil cytoplasmic antibodies. What do the studies say[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2001, 27(4):799-813.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学检验领域的应用说明:CNAS-CL39:2012[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012:7-9.
- [5] 王露楠,邓巍,李金明. 抗核抗体谱检测的室内质量评价[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(8):692-695.
- [6] 谢瑶,吴琨,彭清林,等. 2010 年全国自身抗体检测质量控制总结[J]. 中华风湿病学杂志,2011,15(12):811-815.
- [7] MERONI P L, BIGGIOGGERO M, PIERANGELI S S, et al. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheuma-

tol, 2014, 10(1):35-43.

- [8] 王国强. 自身免疫性疾病抗体检测芯片诊断产品开发研究[D]. 济南:山东省医学科学院,2008.
- [9] 李金明. 抗核抗体的检测程序与结果报告及解释[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(12):1325-1328.
- [10] 姜新华,赵燕飞,吴小明,等. 自制雌二醇性激素室内质控品及其性能评价[J]. 检验医学,2010,25(5):403-404.
- [11] 周志米,张晓燕. 自制梅毒、丙肝、艾滋病抗体复合质控品的稳定性评价[J]. 浙江实用医学,2012,17(4):301-302.
- [12] 唐立萍,张瑞镐,居漪,等. 复合血脂质控品的制备及性能评价[J]. 检验医学,2013,28(5):430-433.
- [13] 柏居林,何宏周. 自制人类免疫缺陷病毒抗体等质控血清及室内质控方法建立研究[J]. 检验医学与临床,2010,7(3):230-232.
- [14] 宫辉,高玲娟. 抗 HIV 抗体弱阳性质控血清的制备及应用评价[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(21):3092-3093.
- [15] 陈良琼,吉飞跃,崔益祥. 自身抗体临界值质控血清的制备及评价[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(10):1326.
- [16] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则:CNAS-CL02[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012:35-36.
- [17] 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.