

• 论 著 •

## 探讨冷藏期间实验室反复使用 HIV 质控血清对其稳定性的影响

谢 明

(广西医科大学第三附属医院检验科,广西南宁 530031)

**摘要:**目的 基于冷冻质控血清复溶后在冷藏期间多次反复使用,对人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体质控血清稳定性的影响进行探讨及寻找应对措施。**方法** 将 10 支 HIV 质控血清从  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰柜取出,室温平衡 30 min 使其完全融化,随机排列到病例样本之中,按常规样本进行加样检测,加样完毕后及时保存至  $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱;次日起,上述质控品从  $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱取出室温平衡 30 min 后,随机排列到病患样本之中,按常规样本进行加样检测,加样完毕后及时保存至  $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱,重复以上活动至第 7 天;采用单因素重复测量资料的方差分析进行统计分析,同时,把同一天的 10 支质控品检测值取平均值作为一个“检测点”与日常质控图进行比较,观察变化情况。**结果** 单因素重复测量资料的方差分析,说明在不同测量天数上差异有统计学意义( $F=48.515, P<0.01$ ),结合质控图发现,从第 4 天开始质控值开始出现“告警”状态,且呈漂移式的下降至失控状态。**结论** HIV 质控血清复溶后置于  $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冷藏,期间反复多次使用,3 d 后稳定性受到影响,质控图出现漂移、甚至失控的变化。

**关键词:**酶联免疫吸附试验; 质控血清; 稳定性; 人类免疫缺陷病毒; 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)04-0499-03

Discussed the influence of the stability that laboratory repeated use the HIV quality control serum during the cold storage

Xie Ming

(Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530031, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of repeated use on the stability of HIV quality control serum during cold storage, and put forward measures to deal with. **Methods** Ten HIV serum from  $-20$  degrees celsius freezer room temperature balance out, 30 minutes to make it completely melted, randomly arranged in the patient sample, added sample testing according to the normal sample, after the end of time to save 2 to 8 degrees celsius refrigerator. The next day, the above quality control products from 2 to 8 degrees celsius refrigerator, after 30 minutes at room temperature, randomly arranged in the patient sample, add sample testing according to the normal sample, after the end of time to save 2 to 8 degrees celsius refrigerator, repeat the above activities to seventh days. Using repeated measure, at the same time, took the average 10 quality control of product values on the same day as a "check-point" compared with daily quality control chart, observe changes. **Results** It suggested that in different measurement on the number of days the difference was statistically significant( $F=48.515, P<0.01$ ), combined with the quality control chart found, which was starting from the fourth day quality value "warning" status, began to appear and the drift of fell out of control. **Conclusion** HIV quality-control serum at 2 to 8 degrees celsius refrigerator, used repeatedly during 3 days late stability is affected, the change of quality control diagram appear drift, even is out of control.

**Key words:** enzyme-linked immunosorbent assay; quality control serum; stability; human immunodeficiency virus; antibody

人类免疫缺陷病毒(HIV)主要经血液以及性传播途径传播,其抗体检测分为筛查试验(包括初筛和复检)和确证试验。筛查方法包含酶联免疫吸附试验(ELISA)、化学发光或免疫荧光试验、快速检测(RT)及其他检测试验。ELISA 检测 HIV 抗体具有特异度高、灵敏度高、操作方便等优点,是筛查常用方法,但易受到多种因素的影响,造成假阳性或假阴性,因此室内质控对提高 ELISA 检测抗-HIV 的准确度起着关键的作用,每一次实验必须使用室内质控品,以便监控实验的重复性,提高筛查实验的可靠性<sup>[1-3]</sup>。全国艾滋病检测技术规范(2009 修订版)中规定,弱阳性质控以该试剂盒临界值(cut-off)的  $2\sim 3$  倍为宜,最常用的质控图是 Levey-Jennings 质控图,该图使用累计技术或趋势分析技术的图形提供系统偏移和漂移的状况。本文对冷藏期间反复使用对质控血清稳定性的影响进行研究,为质控样品的正确保存、使用以及质控数据分析提供一些数据支持,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 病例样本来源于每天门诊送检的标本,弱阳性 HIV 质控品 10 支。

**1.2 仪器与试剂** Rayto 酶标分析仪(RT-2100C)、手工移液器、水浴箱温育、洗板机洗板、振荡仪、某国产人类免疫缺陷病毒抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)、室内质控血清、去离子水、量筒、微量加样器配套吸头、一次性手套等。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验前质量控制** (1)检测试剂使用前必须经过质量确认,保证符合预期使用要求;(2)质控品使用前必须经过质量检查,管间或瓶间变异必须小于监测系统预期的变异( $CV<20\%$ ),弱阳性质控以该试剂盒临界值(cut-off)的  $2\sim 3$  倍为宜,并且质控品应稳定、无菌,且不含有影响试剂反应的防腐剂;(3)检测仪器设备按使用操作规程规定进行校准、维护;保证检测时仪器设备状态良好,符合实验要求;(4)人员经过专业

培训,具有医学检验专业知识和技能,具备检验技术人员资格。  
**1.3.2 样品检测** 将 10 支 HIV 质控血清从 -20 °C 冰柜取出,室温平衡 30 min 使其完全融化,随机排列到病例样本之中,按常规样本进行加样检测,加样完毕后及时保存至 2~8 °C 冰箱,次日,上述质控品从 2~8 °C 冰箱取出室温平衡 30 min 后,随机排列到病患样本之中,按常规样本进行加样检测,加样完毕后及时保存至 2~8 °C 冰箱,重复以上活动至第 7 天;采用单因素重复测量资料的方差分析进行统计分析,同时,把同一天的 10 支质控品检测值取平均值作为一个“检测点”与日常质控图进行比较,观察变化情况。

**1.3.3 室内质控图的绘制及规则应用**<sup>[4]</sup> 每一次实验必须使用室内质控品,以便监控实验的重复性,使用常规的 Levey-Jennings 质控图及新修改的 Westgard 多规则质控方法,(1)1<sub>2s</sub> 质控规则:当质控品的 S/CO 值超出  $\bar{x} \pm 2s$  质控限时,作为“告警”;(2)1<sub>3s</sub> 质控规则:当质控品的 S/CO 值超出  $\bar{x} \pm 3s$  质控限时,判为“失控”,本次实验结果不能被接受,可能是系统误差、随机误差或外部质控品稳定性下降所致;(3)4<sub>1s</sub> 质控规则:连续 4 次质控品的 S/CO 值同时超出  $\bar{x} - 1s$  或  $\bar{x} + 1s$  质控限,解释为“预防性维护的警告”(修改前的 Westgard 多规则质控规则判为“失控”);(4)10<sub>x</sub> 质控规则:连续 10 次质控品的 S/CO 值落在均值的同一侧,解释为“预防性维护的警告”(修改前的 Westgard 多规则质控规则判为“失控”)。

**1.4 统计学处理** 运用 MedCalc 11.4.2.0 质控图绘制及分析;运用 SPSS18.0 进行单因素重复测量资料的方差分析进行统计分析,当 Mauchly 检验  $P > 0.05$  时,认为协方差球形性质满足,不需要校准模式,否则需要 Geenhouse-Geisser 或 Huynh-Feldt 调整系数, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 HIV 室内质控图** 室内质控均值  $\bar{x} = 2.36, s = 0.18, CV\% = 7.54\%, \bar{x} - 1s = 2.18, \bar{x} - 2s = 2.00, \bar{x} - 3s = 1.82, \bar{x} + 1s = 2.53, \bar{x} + 2s = 2.27, \bar{x} + 3s = 2.90$ ,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

**2.2 不同测量天数上的差异** 质控品在不同时间的检测值通过单因素重复测量资料的方差分析:球形检验  $P = 0.042 < 0.05$ ,Geenhouse-Geisser 校正后  $F = 48.515, P < 0.01$ ,Huynh-Feldt 校正后  $F = 48.515, P < 0.01$ ,说明在不同测量天数上差异有统计学意义。

表 1 观察对象质控品在不同时间的检测值 S/CO 比较

序号	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
1	2.571	2.035	2.152	2.286	1.990	1.802	1.568
2	2.505	2.314	2.033	1.905	1.777	1.678	1.578
3	2.276	2.905	2.314	1.876	1.800	1.593	1.423
4	2.229	2.676	2.308	2.181	1.771	1.369	1.236
5	2.438	2.514	2.000	2.029	1.752	1.680	1.574
6	2.257	2.610	2.419	2.190	1.857	1.654	1.359
7	2.267	2.524	2.114	2.010	1.789	1.345	1.528
8	2.371	2.176	2.009	2.114	1.985	2.056	1.587
9	2.686	2.543	2.236	2.057	1.999	1.742	1.324
10	2.343	2.538	2.189	2.207	1.894	1.578	1.433

**2.3 差异在质控图中的体现** 通过实验发现,见表 1,第 1、2 天 10 支质控品的检测均值分别为 2.394、2.484,均大于室内质控均值;第 3 天 10 支质控品的检测均值 2.177,略微超  $\bar{x} -$

1s 质控限,第 4 天 10 支质控品的检测均值 2.086 超  $\bar{x} - 1s$  质控限,但还落在  $\bar{x} - 2s$  范围内,到第 5 天检测均值 1.861 开始超  $\bar{x} - 2s$  质控限,第 6 天检测均值 1.650、第 7 天 1.461 超出了  $\bar{x} - 3s$  范围。如果把“同一天”的 10 支质控品检测值取平均值作为一个“检测点”与日常质控图进行比较,从第 4 天开始质控值开始出现“告警”状态,且呈漂移式的下降至失控状态,见图 1 最后 7 个“检测点”。

**3 讨 论**

临床实验室,通常在控制图上画出单个控制测定值,并与已确定“控制限”进行比较,来判断分析是“在控”还是“失控”。为质控目的而制备的标本称为质控物或质控品,其本身的性能指标、正确使用与保存对于室内质控至关重要<sup>[4-6]</sup>。抗体质控血清不变化、稳定是因为在制备过程添加了防腐剂,好的质控品在 -20 °C 或在规定的保存条件下,至少稳定 1~2 年,冻融后置于 2~8 °C 冰箱冷藏也可以稳定 1 周,但是“规定的保存条件”的前提条件应该是保存期间不受到额外因素的干扰,有实验发现,连续冻融 7 次,OD 值下降 20% 左右,连续冻融 15 次,下降 26.1%<sup>[8]</sup>,按管间或瓶间变异必须小于监测系统预期的变异( $CV < 20\%$ )的要求,此质控品已经是不符合使用的要求;或是结合 Levey-Jennings 质控图进行分析,将是出现严重的失控状态。因此,反复冻融、保存条件、运输环境等因素对 ELISA 质控血清稳定性的影响,历来受到关注<sup>[7-9]</sup>,但是,冻融后置于 2~8 °C 冰箱冷藏,期间反复使用对质控血清稳定性的影响的观察或研究并不多见。

本文通过实验发现,冷藏的“规定的保存条件”的前提条件同样应该是保存期间不受到额外因素的干扰。质控品冻融后至 2~8 °C 冰箱冷藏并反复使用,前 3 d 的稳定性上能满足,其波动性较小,均为“在控”状态,但是第 4 天开始就出现“告警”,至第 5 天质控品检测值 S/CO 平均下降 22% [ $(2.394 - 1.861) / 2.394 \times 100\%$ ],见表 1,呈漂移式的态急剧下降导致“失控”。笔者认为,尽管说明书表明 2~8 °C 冰箱冷藏稳定一周,但在临床实际工作中,室内质控是一个连续性的工作,每次实验室都必须按要求从 2~8 °C 冰箱取出室温平衡 30 min 左右,如此反复平衡,必然导致保存温度的不稳定性;其次在每次加样过程中都会增加加样尖携带的细菌污染质控品的机会。

质控品的稳定性好可以减少浪费是显而易见的,假如某批实验明明是在控的,但却是因为冷藏期间反复多次使用后导致质控品的不稳定性而导致了实验的“失控”,按要求,该批实验属于“无效”,必须重新实验,假设实验人员还是认为该值质控品尚在保存的有效期限内,没有意识到质控本身其实已经失效,那么可以想象到重新实验还是难于获得“在控”状态。李金明<sup>[10]</sup>研究员指出,室内质控(IQC)的目的是确保临床测定过程及结果在偏差和精密度方面达到预定的标准,IQC 主要包括 3 个方面,即测定前的质量控制、统计学质量控制、质量控制的评价。其中测定前的质量控制也包含三方面的内容:(1)实验室的环境、设施和设备;(2)理想的测定试剂和方法;(3)人员培训。因此就要求临床实验室必须制定一个详细的实验室室内质量控制规程,除了明确质控品质量检查和确认的要求外,对质控品的使用和保存也要非常详细的规定,比如室内质控品在使用完毕后,应即时放回 2~8 °C 冰箱冷藏,至于冷藏期间到底是要求 3 d 内或 4 d 内使用,建议实验室应自行评估后决定。同时,本文的观察结果也提示,具有自动化霜功能的冰箱或低温冰柜对质控品的稳定性是否影响,有待进一步研究。

GF 的作用,并提出干预 CTGF 的作用可能达到缓解和改善动脉粥样硬化的状态。本实验三酰甘油、总胆固醇、载脂蛋白 A1、高密度脂蛋白、脂蛋白 a、低密度脂蛋白、TGF-β1 和 CTGF 与健康对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明检测三酰甘油、总胆固醇、载脂蛋白 A1、高密度脂蛋白、脂蛋白 a、低密度脂蛋白并评价其严重程度对冠心病的预防和诊断有重要意义。

由表 2 结果可知年龄、吸烟、高血压、总胆固醇、低密度脂蛋白、脂蛋白 a、CTGF 和 TGF-β1 是冠心病的独立危险因素;高密度脂蛋白及其主要载体载脂蛋白 A1 是冠心病的保护因素。在冠状动脉狭窄的发展过程中,炎症和血脂谱的紊乱也是冠状动脉综合征患者冠状动脉狭窄的重要特征,CTGF 是 TGF-β1 的下游直接发生效应的介质,在形成瘢痕、修复损伤与病理状态下纤维化的形成方面起到重要作用。可以通过考察患者年龄、吸烟、高血压、总胆固醇、低密度脂蛋白、脂蛋白 a、CTGF 和 TGF-β1、高密度脂蛋白及其主要载体载脂蛋白 A1 的指标来预计罹患冠心病的可能性以及已患冠心病患者的严重程度。促纤维化导致动脉硬化与动脉粥样硬化<sup>[8-10]</sup>作用互相促进和影响,有学者<sup>[11]</sup>认为,基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达有赖于 CTGF 在血液中水平,可以通过调节其水平,继而干预动脉粥样硬化进程,从而影响冠心病的发生、发展及危险分层。冠心病患者及发病率近年来节节攀升,严重威胁人类健康,对其进行早发现、早治疗将变得越来越重要,CTGF 作为冠状动脉综合征的独立危险因素,研究认为 CTGF 对预防和早诊断早治疗冠心病患者有非常重要的意义。

CTGF 和 TGF-β1 在稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛和心肌梗死间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),而且水平随病情严重程度增加而逐步升高。说明检测 CTGF 和 TGF-β1 在判断不稳定型心绞痛、心肌梗死与稳定型心绞痛的疾病分型和其严重程度有重要意义。姜建国等<sup>[8]</sup>研究表明通过下调 CTGF 表达,抑制 MMP-2 和 MMP-9 在血管平滑肌细胞中的表达,CTGF 转染可显著增加胰腺癌细胞 MMP-9、血管内皮生长因子(VEGF)的表达并促进其细胞增殖。细胞的生长、分化和免疫功能都离不开 TGF-β1 的调节作用,其在体内发挥着广泛的生物学作用,TGF-β1 作为 CTGF 上游介质,在对 CTGF 的基因转录、翻译等发挥着重要的调控作用,是 CTGF 发挥生物学作用网络中的重要节点因子<sup>[9]</sup>。这方面 Chen 等<sup>[10]</sup>研究认为 CTGF 血清浓度急性心肌梗死组水平要高于不稳定型心绞痛

组和稳定型心绞痛组,结果与本研究一致。

综上所述,冠心病是一个多种危险因素相互作用和影响的疾病过程,其中传统危险因素有年龄、性别、血脂异常和吸烟等,纤维化标志物中 TGF-β1 和 CTGF 是反应冠状动脉粥样硬化性心脏病的指标,检测 CTGF 可以更高效的预防和早诊断早治疗冠心病,在评价冠心病的危险分层方面也起到积极的作用。

### 参考文献

- [1] 曾庆鑫,张坤,王少斌,等. 血浆 CTGF 水平与急性动脉粥样硬化性脑梗死的相关性研究[J]. 包头医学院学报,2014,30(1):57-59.
- [2] 胡龙,黄政,章敬水,等. 多功能 5F tiger1 导管与 6F Judkins 导管在经桡动脉途径冠状动脉造影中的对比[J]. 安徽医药,2013,17(3):424-426.
- [3] 刘颖,蔡建华,鄢华,等. 青年男性急性心肌梗死的危险因素及介入治疗 1 年后随访分析[J]. 中国心血管杂志,2014,19(3):172-176.
- [4] 武海滨,胡如英,龚巍巍,等. 2010 至 2012 年浙江省 25 岁及以上居民急性冠心病事件监测[J]. 中华心血管病杂志,2015,43(2):179-184.
- [5] 王越越,汪琦瑛,韩国鑫,等. 青年冠心病患者临床特点及危险因素分析[J]. 中华急诊医学杂志,2015,24(4):386-391.
- [6] 顾秀峰,张寰,刘勇,等. 糖基化终产物对大鼠主动脉平滑肌细胞结缔组织生长因子表达的影响[J]. 中华老年医学杂志,2009,28(10):847-852.
- [7] Ponticos M. Connective tissue growth factor(CCN2) in blood vessels[J]. Vascul Pharmacol,2013,58(3):189-193.
- [8] 姜建国,焦霞,朱晓蔚,等. CTGF 基因转染对胰腺癌细胞 MMP-9、VEGF 表达及增殖的影响[J]. 江苏大学学报:医学版,2013,23(5):377-382.
- [9] 李玉,张言镇,周艳菊,等. 血清 TGF-β1 和 CTGF 水平与急性冠脉综合征的关系[J]. 现代医药卫生,2011,27(7):968-971.
- [10] Chen C,Wei L,Chen WJ,et al. Serum TGF-β1 and SMAD3 levels are closely associated with coronary artery disease[J]. BMC Cardiovascular Disorders,2014,14(3):18.
- [11] 罗俊生,冯旭,关宁,等. CTGF-siRNA 转染对血管平滑肌细胞 MMP-2、MMP-9 表达的影响[J]. 军医进修学院学报,2012,33(9):960-962.

(收稿日期:2015-11-18)

(上接第 500 页)

### 参考文献

- [1] 平竹仙,孙武,蒋红君,等. 自制凝血室内质控品的使用与评估[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(20):2841-2842.
- [2] 苏武钟,钟周琳,邱昌文,等. 四分位极差在血站 ELISA 质控的应用研究[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(6):735-736.
- [3] 张凤兰. 艾滋病抗体初筛室内质控分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(3):364-365.
- [4] 尚红,王毓三. 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2014:1028-1037.
- [5] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2008:189-203.
- [6] 郭志宏,张佳峰,夏燕,等. 艾滋病检测实验室 ELISA 室内质控图的评价[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(5):1236-1237.

- [7] 杨春晖,张容,郑鹏,等. 影响抗-HIV 弱阳性血清稳定性的几种因素探讨[J]. 中国输血杂志,2008,21(6):441-443.
- [8] 刘建礼,朱红,张昭福. HIV 质控血清稳定性的关键影响因素研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2011,34(1):4-6.
- [9] 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.
- [10] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京:人民军医出版社,2005:163-168.

(收稿日期:2015-10-08)

