

临床检验

LINCHUANG JIANYAN

ELISA 指南

郑怀竞 韩 松 编 著

6.61

北京医科大学
中国协和医科大学

联合出版社

学图书馆

临床检验ELISA指南

郑怀竞 韩 松 编著

叶应妩 陶义训 审

北京医科大学联合出版社
中国协和医科大学

(京)新登字147号

图书在版编目(CIP)数据

临床检验ELISA指南/郑怀竞, 韩松编著. —北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994. 12

ISBN 7-81034-391-2

I. 临… II. ①郑…②韩… III. 实验及诊断-酶联接免疫吸附测定-手册 IV. R446.61-62

内 容 提 要

本书分六章。第一章至第四章讲述ELISA检验的原理和方法。第五、第六章介绍ELISA检验有关的质量控制方法及ELISA试剂的临床使用评价。本书系统地介绍了ELISA检验的原理、操作和质量评价, 对医学免疫学检验工作者有较大的实用参考价值, 也可供中、高等院校检验专业师生参考。

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版发行

(100083 北京学院路38号 北京医科大学院内)

北京密云华都印刷厂印刷 新华书店经销

开本: 787×1092 1/32 印张: 3.0625 字数: 69千字

1994年12月第1版 1994年12月北京第1次印刷 印数 1—4000册

定价: 3.60元

序 言

近年来,生物技术的不断发展,推动着医学检验的发展,酶联免疫技术现已广泛应用于医学检验的各个领域,成为医学检验的一个常规方法,特别是用于检测病毒性肝炎标志物的检验方法已普及到县以及县以下的医疗单位。

为了提高病毒性肝炎标志物的检验质量,自1988年起,卫生部临床检验中心即开展了该检验的质量评价活动。多年来的质评工作总结显示,ELISA检测质量有了明显的提高,这就要归功于检验人员和肝炎诊断试剂厂家的努力。但其中也还存在一些问题,为了进一步地普及酶联免疫ELISA技术,提高使用该技术的检测水平,特编写了这本临床检验ELISA指南,内容主要是论述ELISA技术的基本理论知识、操作要点、有关的质量控制方法和ELISA试剂的临床使用评价,以及几年来质量评价成绩改进的情况,供使用ELISA技术的有关技术人员参考,也可供培训基层检验人员使用。

卫生部临床检验中心顾问 叶应旻

1994年6月

目 录

1. 免疫测定的基础知识.....	(1)
1.1 抗原	(1)
1.2 抗体	(1)
1.3 抗原抗体反应	(5)
1.4 免疫测定在临床检验中的应用	(8)
1.5 标记的免疫测定	(8)
1.6 酶免疫测定	(9)
2. ELISA的原理和类型	(11)
2.1 ELISA的原理	(11)
2.2 ELISA的类型	(11)
3. ELISA的试剂	(23)
3.1 免疫吸附剂	(23)
3.2 结合物	(30)
3.3 酶的底物	(35)
3.4 洗涤液	(36)
3.5 酶反应终止液	(37)
3.6 阳性对照品和阴性对照品	(37)
3.7 参考标准品	(38)
4. ELISA的操作要点	(39)
4.1 标本的采取和保存	(39)
4.2 试剂的准备	(40)

1. 免疫测定的基础知识

ELISA是一种免疫测定。免疫测定 (immunoassay, IA) 是应用免疫学技术测定标本中微量物质的方法。在临床检验中主要通过抗原抗体反应检测体液中的抗体或抗原性物质。

1.1 抗原 (antigen, Ag)

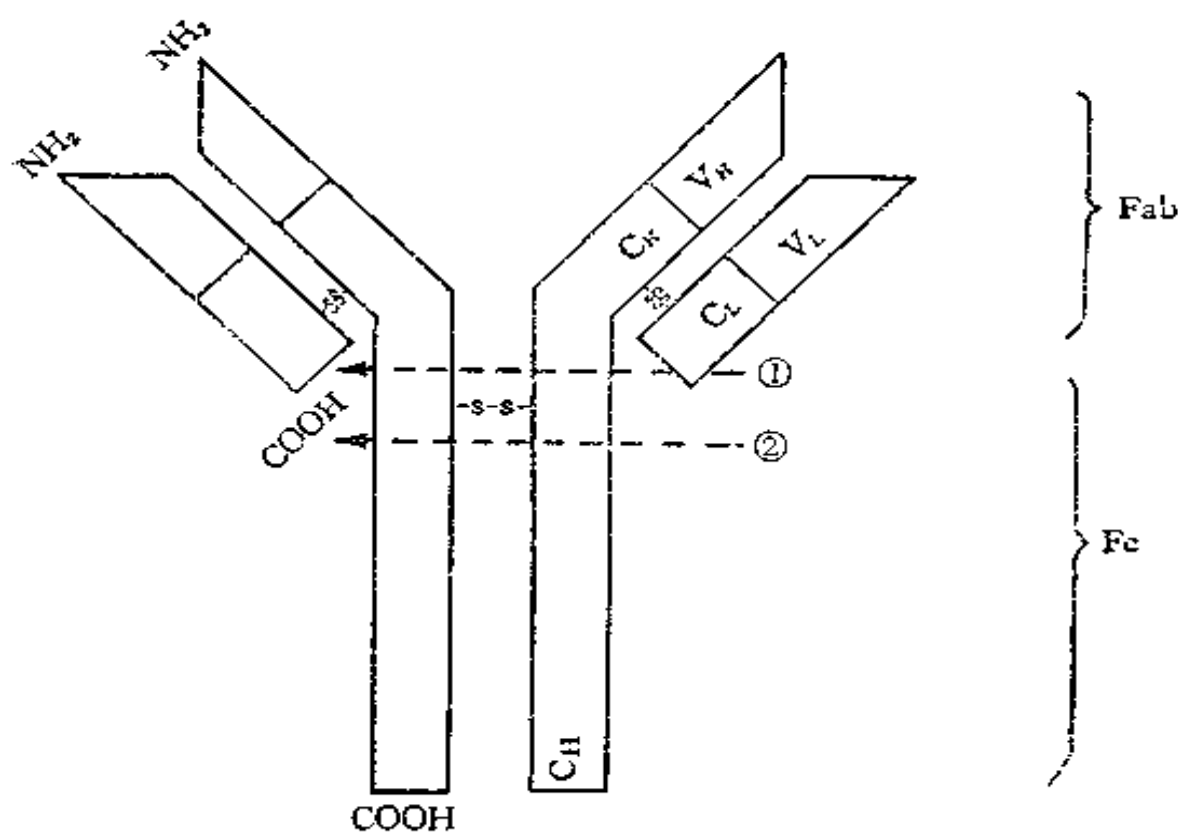
抗原是能在机体中引起特异性免疫应答的物质。抗原进入机体后, 可刺激机体产生抗体和引起细胞免疫。在免疫测定中, 抗原是指能与抗体结合的物质。能在机体中引起抗体产生的抗原多为分子量大于5 000的蛋白质, 例如乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、甲胎蛋白(AFP)等。小分子化合物在与大分子蛋白质结合后能引起机体产生特异性抗体的, 称为半抗原(hapten), 例如某些激素、药物等。抗原的反应性取决于抗原决定簇(antigenic determinant), 或称为表位(epitope)。一个抗原分子可带有不同的决定簇, 例如HBsAg中可带有a、d、y、w、r等决定簇。

1.2 抗体

1.2.1 抗体的结构

抗体是能与抗原特异性结合的免疫球蛋白 (immunog-

lobulin, Ig)。Ig 分五类，即 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE。与免疫测定有关的 Ig 主要为 IgG 和 IgM。Ig 由两个轻链(L)和两个重链(H)的单体组成。Ig 的轻链是相同的，有 κ (kappa) 和 λ (Lambda) 两种型别。五类 Ig 的重链结构不同，这决定了它们的抗原性也不同。IgG 和 IgM 的重链分别称为 γ (gamma) 链和 μ (mu) 链。IgG 的结构见图1-1。



① 木瓜酶裂解部位 ② 胃蛋白酶裂解部位

图1-1 IgG结构示意图

重链和轻链的N端的氨基酸排列顺序因各种抗体而异，称为可变区，分别用 V_H 和 V_L 表示。两者构成抗体的抗原结

合部位，只与相应的抗原决定簇匹配，发生特异性结合（见图1-2），是抗体专一性结合抗原的结构基础。

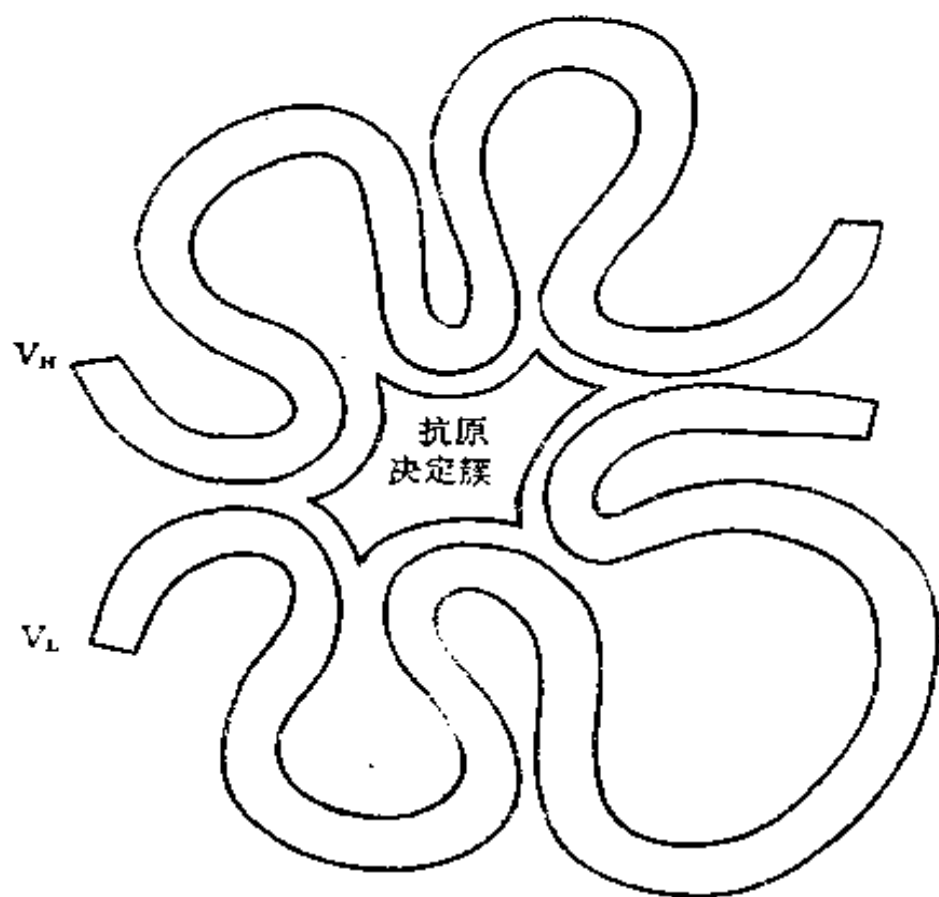


图1-2 可变区抗原结合部位示意图

IgG可被木瓜蛋白酶分解为三个区段，其中两个相同的区段称抗原结合片段(F_{ab})。每个F_{ab}都保存结合抗原的能力，但只有一个抗原结合位点，是单价的，与抗原结合后不出现凝集或沉淀。另一区段称F_c段，无抗体活性，但具有IgG特有的抗原性。

IgG可被胃蛋白酶分解为两个片段，一个 F_{ab} 双体，称

$F(ab')_2$ ，能和两个相同的抗原结合；另一片段类似 F_c ，随后被分解成小分子多肽，无生物活性。

IgM是由五个单体组成的五聚体，含10个重链和10个轻链，具有10个抗原结合价，由于空间位置的影响，只表现为五个抗原结合价。IgM分子量约为900 000，IgG分子量约为150 000。

机体被微生物感染后，先产生IgM抗体，然后产生IgG抗体。经过一段时期，IgM抗体量逐渐减少而趋消失，而IgG抗体可长期存在，在疾病痊愈后可持续数年之久。IgM抗体一般为保护性抗体，具有免疫性。因此IgM抗体的测定，对某些传染病如甲型肝炎有较高的临床诊断价值。图1-3为甲型肝炎病人血清中IgM抗体和IgG抗体出现的时间和水平。

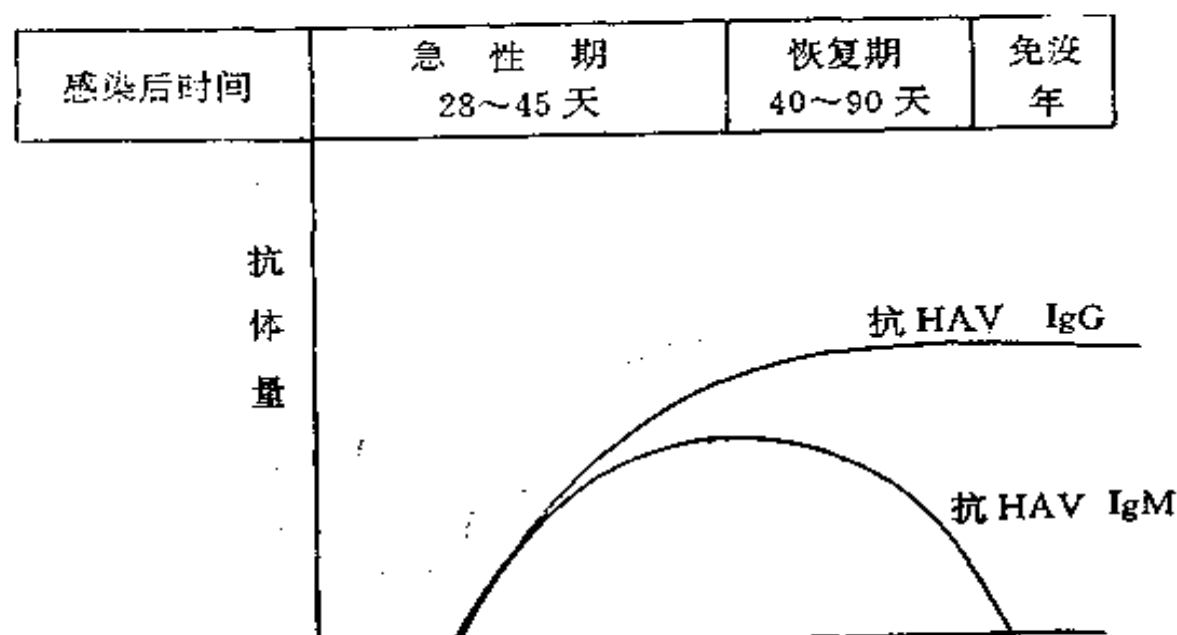


图1-3 甲型肝炎病人血清中IgG抗体和IgM抗体水平的变化

1.2.2 抗体的产生

机体受抗原刺激后，B淋巴细胞产生与抗原相应的抗体。含有抗体的血清称为抗血清(antiserum)。每一系B细胞只产生针对某一抗原决定簇的抗体。如将多种抗原或含有多个抗原决定簇的抗原注入机体，则将由多系的B细胞产生相应的多种抗体，这些抗体均存在于免疫血清中。免疫测定中所用的抗血清一般用抗原免疫兔、羊或马制得。产生抗体的B细胞可在体外与繁殖力强的肿瘤细胞融合成杂交瘤细胞。将单个杂交瘤细胞分离，在体内或体外培养而分泌的抗体称单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb或MAb)。单克隆抗体仅针对一种抗原决定簇，具有很高的特异性。单克隆抗体通常用抗原免疫小鼠制备。将免疫鼠的脾细胞(含产生抗体的B细胞)与小鼠肿瘤细胞融合，分离杂交瘤细胞，接种于小鼠腹腔，产生的腹水中含有浓度很高的单克隆抗体。

1.3 抗原抗体反应

1.3.1 可逆性

抗原与抗体结合形成抗原抗体复合物的过程是一种动态平衡，其反应式为：



抗体的亲和力(affinity)是抗原抗体间的固有结合力，可用平衡常数K表示：

$$K = \frac{[Ag \cdot Ab]}{[Ag][Ab]}$$

Ag·Ab的解离程度与K值有关。高亲和力抗体的抗原结合点与抗原的决定簇在空间构型上非常适合,两者结合牢固,不易解离。解离后的抗原或抗体均能保持原有的结构和活性,因此可用亲和层析法来提纯抗原或抗体。在抗血清中,特异性的IgG抗体仅占总IgG中的极小部分。用亲和层析法提取的特异性抗体,称为亲和层析纯抗体,应用于免疫测定中可得到更好的效果。

1.3.2 最适比例

在恒定量的抗体中加入递增量的抗原形成抗原抗体复合物(沉淀)的量见图1-4。曲线的高峰部分是抗原抗体比例最合适的范围,称为等价带(zone of equivalence)。在等价带前后分别为抗体过剩带和抗原过剩带。如果抗原或抗体极度过剩,则无沉淀物形成,在免疫测定中称为带现象(zone phenomenon)。抗体过量称为前带(prezone),抗原过量称为后带(postzone)。在用免疫学方法测定抗原时,应使反

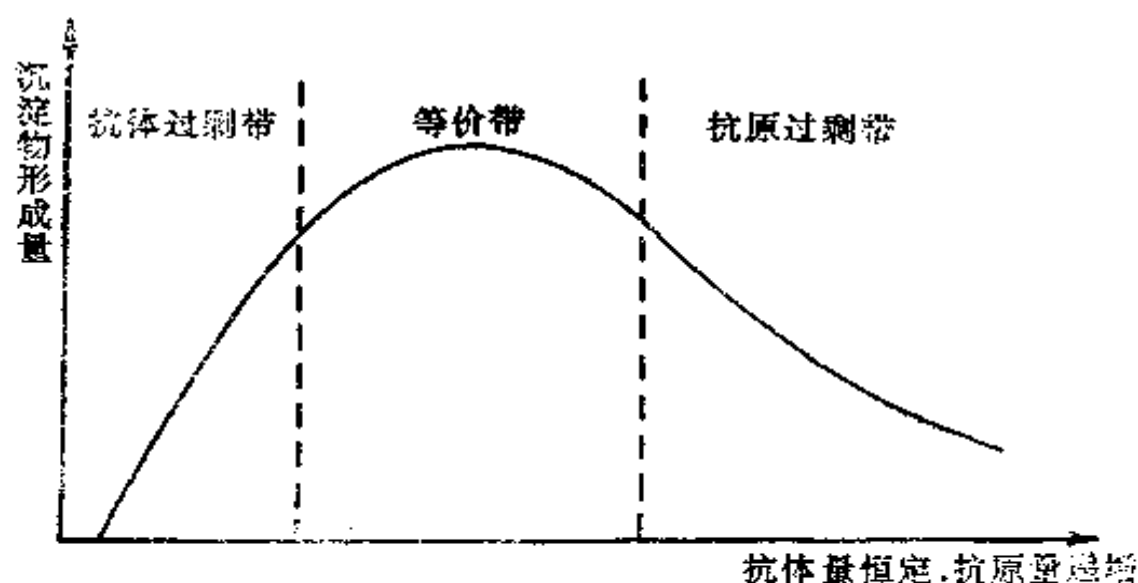


图1-4 抗原抗体反应中沉淀物形成量与抗原、抗体的比例关系

应系统中有足够的抗体量，否则测得的量会小于实际含量，甚至出现假阴性。

1.3.3 特异性

抗原抗体的结合实质上只发生在抗原的抗原决定簇与抗体的抗原结合位点之间。由于两者在化学结构和空间构型上呈互补关系，所以抗原抗体反应具有高度的特异性。例如乙肝病毒中的表面抗原(HBsAg)、e抗原(HBeAg)和核心抗原(HBcAg)，虽来源于同一病毒，但仅与其相应的抗体结合，而不与另外两种抗体反应。抗原抗体反应的这种特异性使免疫测定能在一非常复杂的蛋白质化合物(例如血清)中测定某一特定的物质，而不需先分离待检物。

但是这种特异性也不是绝对的。假使两种化合物有着部分相同的结构，在抗原抗体反应中可出现交叉反应。例如，绒毛膜促性腺激素(hCG)和黄体生成激素(LH)均由 α 和 β 两个亚单位组成，其结构的不同处在 β 亚单位，而两者的 α 亚单位是类同的。用hCG免疫动物所得的抗血清中含有抗 α -hCG和抗 β -hCG两种抗体，抗 α -hCG抗体将与LH中的 α 亚单位发生交叉反应。在临床检验中，如用抗hCG抗血清作为妊娠诊断试剂测定尿液中hCG，只能用于hCG浓度较高的试验，否则妇女生理性排泄入尿液中的微量的LH将与之发生交叉反应。因此在作为早孕诊断(敏感度应达到50mIU/ml hCG)的试剂中必须应用只对hCG特异的抗 β -hCG抗体，这样即可避免再与 α 亚单位相同的其他激素(LH、FSH、TSH)发生交叉反应。

1.3.4 敏感性

在测定血清中某一物质的含量时，化学比色法的敏感度

为mg/ml水平，酶反应测定法的敏感度约为 $5\sim 10\mu\text{g/ml}$ ，免疫测定中凝胶扩散法和浊度法的敏感度与酶反应法相仿。标记的免疫测定的敏感度可提高数千倍，达ng/ml水平。例如，用放射免疫测定法或酶免疫测定法测定HBsAg，其敏感度可达 0.1ng/ml 。

1.4 免疫测定在临床检验中的应用

由于各种抗原成份，包括小分子的半抗原，均可用以制备特异性的抗血清或单克隆抗体，利用这种抗体作为试剂就可检测标本中相应的抗原，因此免疫测定的应用范围极广，在临床检验中可用于测定：

- (1) 体液中的各种蛋白质，包括含量极少的蛋白质如甲胎蛋白等。
- (2) 激素，包括小分子量的甾体激素等。
- (3) 抗生素和药物。
- (4) 病原体抗原，如HBsAg、HBeAg等。
- (5) 另外，也可利用纯化的抗原检测标本中的抗体，例如抗-HBs等。

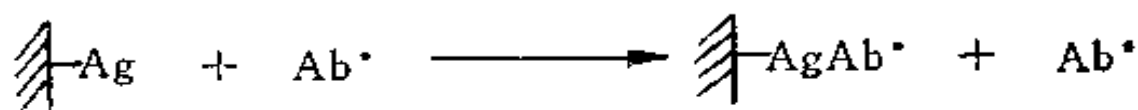
1.5 标记的免疫测定

如上所述，免疫测定是一种很敏感的测定方法，抗原抗体反应后直接测定形成的沉淀或浊度，敏感度可达 $5\sim 10\mu\text{g/ml}$ ，但在临床检验中，某些待测物在标本中的含量远低于这一水平，因此要寻找增加敏感度的方法。标记的免疫测定

是将检测试剂中的抗原或抗体用可微量测定的物质加以标记，通过测定标记物来提高敏感度。在放射免疫测定和酶免疫测定中，标记物分别为放射性核素和酶，最后用测定放射性和酶活力来计算待检物的量，敏感度可比直接测定沉淀物提高数百至数千倍。在标记免疫测定中，一般加入过量的标记试剂以保证与待测物彻底反应。以标记抗体(Ab^*)检测抗原(Ag)为例，反应式如下：



在反应产物中有与 Ag 结合的 Ab^* 和游离的 Ab^* ，如不将两者分离而测定标记物，测得的结果将为两者之和。因此，游离标记物与结合标记物的分离是标记免疫测定中的重要步骤。可采用多种手段，固相载体是其中之一。如将抗原或抗体包被在固相载体上，然后再与标记的抗原或抗体起反应，结合的标记物被固定在载体上，而游离的标记物留于溶液中。以固相抗原为例，反应式如下：



这样可以通过洗涤将游离的 Ab^* 除去，结合标记物的测定可在固相上进行。

1.6 酶免疫测定

酶免疫测定(enzyme immunoassay, EIA)可分为均相(homogenous)和非均相(heterogenous)两种类型。在

均相EIA中可不需进行游离的和结合的标记物的分离而直接测定标记物。例如在某种条件下，抗原抗体反应后形成的酶标记抗原抗体复合物中的酶失去其对底物作用的活力，因而测出的酶活力直接反映游离的酶标记物。均相EIA在临床检验中较少应用。非均相EIA需先进行游离的和结合的标记物的分离。如前所述，固相载体可用作一种分离手段。这种固相酶免疫测定方法在1971年最初建立时称为酶联免疫吸附剂测定(enzyme linked immunosorbent assay),简称ELISA，在国内有译作酶联免疫吸附试验的，虽然含义不完全确切，但已习用。

(韩 松)

2. ELISA的原理和类型

2.1 ELISA的原理

ELISA的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性；酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，使受检标本（测定其中的抗体或抗原）与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。

2.2 ELISA的类型

ELISA可用于测定抗原，也可用于测定抗体。在这种测定方法中有三个必要的试剂：（1）固相的抗原或抗体，即“免疫吸附剂”（immunosorbent）；（2）酶标记的抗原或抗体，称为“结合物”（conjugate）；（3）酶反应的底物。根

据试剂的来源和标本的情况以及检测的具体条件,可设计出各种不同类型的检测方法。用于临床检验的ELISA主要有以下几种类型。

2.2.1 双抗体夹心法测抗原

双抗体夹心法(见图2-1)是检测抗原最常用的方法,操作步骤如下:

(1) 将特异性抗体与固相载体联结,形成固相抗体。洗涤除去未结合的抗体及杂质。

(2) 加受检标本,保温反应。标本中的抗原与固相抗体结合,形成固相抗原抗体复合物。洗涤除去其他未结合物质。

(3) 加酶标抗体,保温反应。固相免疫复合物上的抗原与酶标抗体结合。彻底洗涤未结合的酶标抗体。此时固相载体上带有的酶量与标本中受检抗原的量相关。

(4) 加底物显色。固相上的酶催化底物成为有色产物。通过比色,测知标本中抗原的量。

在临床检验中,此法适用于检测各种蛋白质等大分子抗原,例如HBsAg、HBeAg、AFP、hCG等。只要获得针对受检抗原的特异性抗体,就可用于包被固相载体和制备酶结合物而建立此法。如抗体的来源为抗血清,包被和酶标用的抗体最好分别取自不同种属的动物。如应用单克隆抗体,一般选择两个针对抗原上不同决定簇的单抗,分别用于包被固相和制备酶结合物。这种双位点夹心法具有很高的特异性,而且可以将受检标本和酶标抗体一起保温反应,作一步检测。图2-2即为双位点一步法检测hCG的示意图。固相抗体为抗 α 亚单位单抗,酶标的抗体为抗 β 亚单位单抗,分别与

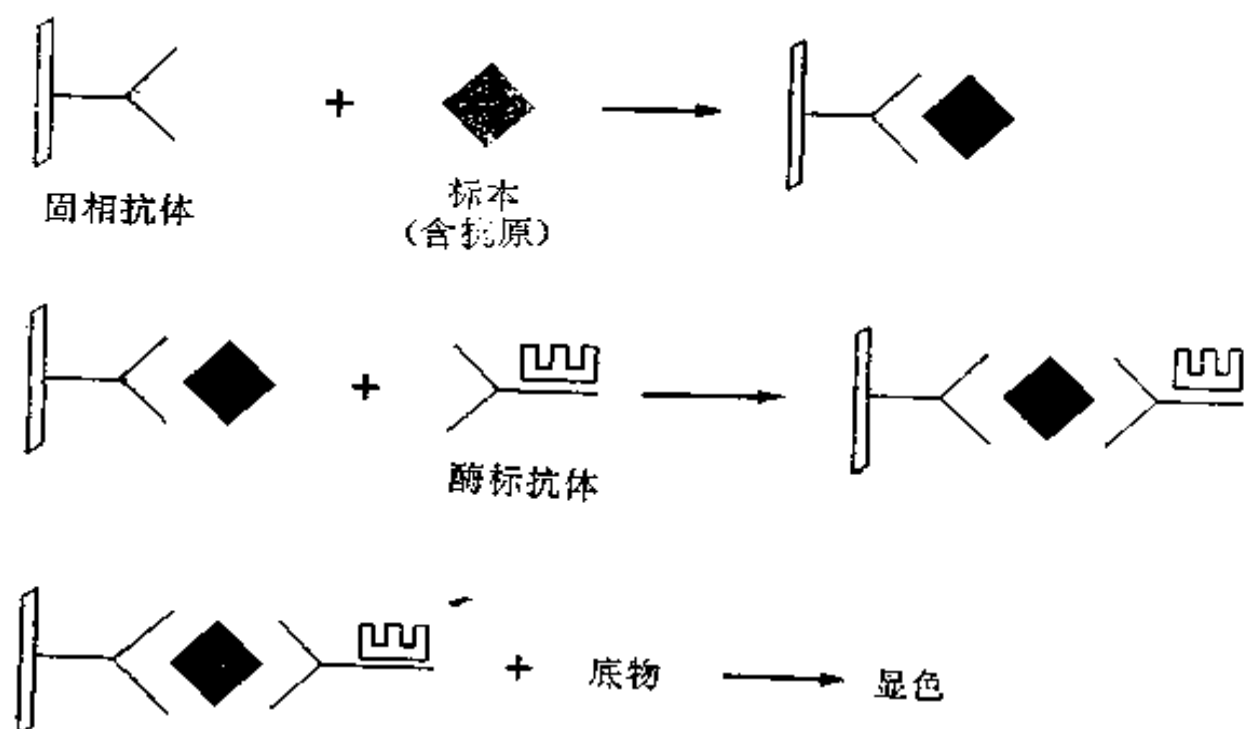


图2-1 双抗体夹心法测抗原

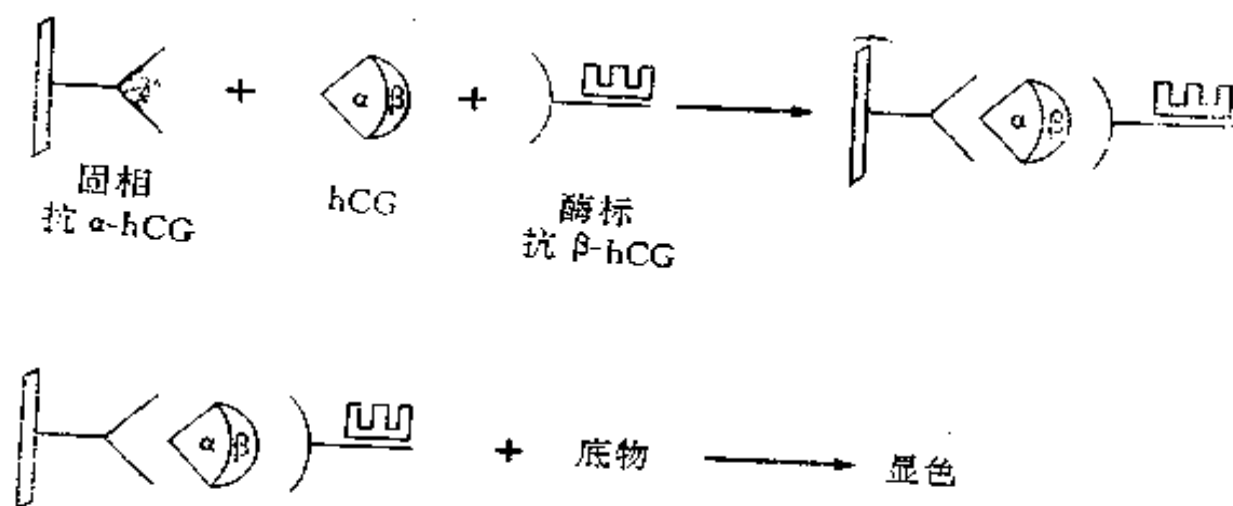


图2-2 双位点一步法ELISA测定hCG

hCG的 α 亚单位及 β 亚单位结合而形成夹心复合物。两种抗体

间无竞争作用，进行各自的结合反应，试验一步完成。

在一步法测定中，当标本中受检抗原的含量很高时，过量抗原分别和固相抗体及酶标抗体结合，而不再形成“夹心复合物”。类同于沉淀反应中抗原过剩的后带现象，此时反应后显色的吸光值(位于抗原过剩带上)与标准曲线(位于抗体过剩带上)某一抗原浓度的吸光值相同(参见1.3.2,图1-4)，如按常法测读，所得结果将低于实际的含量，这种现象被称为钩状效应(hook effect)，因为标准曲线到达高峰后呈钩状弯落。钩状效应严重时，反应甚至可不显色而出现假阴性结果。因此在使用一步法试剂测定标本中含量可异常增高的物质(例如血清中HBsAg、AFP和尿液hCG等)时，应注意可测范围的最高值。用高亲和力的单克隆抗体制备此类试剂可削弱钩状效应。

假使在被测分子的不同位点上含有多个相同的决定簇，例如HBsAg的a决定簇，也可用针对此决定簇的同一单抗分别包被固相和制备酶结合物。但在HBsAg的检测中应注意亚型问题，HBsAg有adr、adw、ayr、ayw4个亚型，虽然每种亚型均有相同的a决定簇的反应性，这也是用单抗作夹心法应注意的问题。

双抗体夹心法测抗原的另一注意点是类风湿因子(RF)的干扰。RF是一种自身抗体，多为IgM型，能和多种动物IgG的Fc段结合。用作双抗体夹心法检测的血清标本中如含有RF，它可充当抗原成份，同时与固相抗体和酶标抗体结合，表现出假阳性反应。采用F(ab')₂或Fab片段作酶结合物的试剂，由于去除了Fc段，从而消除RF的干扰。双抗体夹心法ELISA试剂是否受RF的影响，已被列为对这类试剂的一

项考核指标(参见6.2)。

双抗体夹心法适用于测定二价或二价以上的大分子抗原,但不适用于测定半抗原及小分子单价抗原,因其不能形成两位点夹心。

2.2.2 间接法测抗体

间接法是检测抗体常用的方法。其原理为利用酶标记的抗抗体(抗人免疫球蛋白抗体)以检测已与固相抗原结合的受检抗体,故称为间接法(见图2-3)。操作步骤如下:

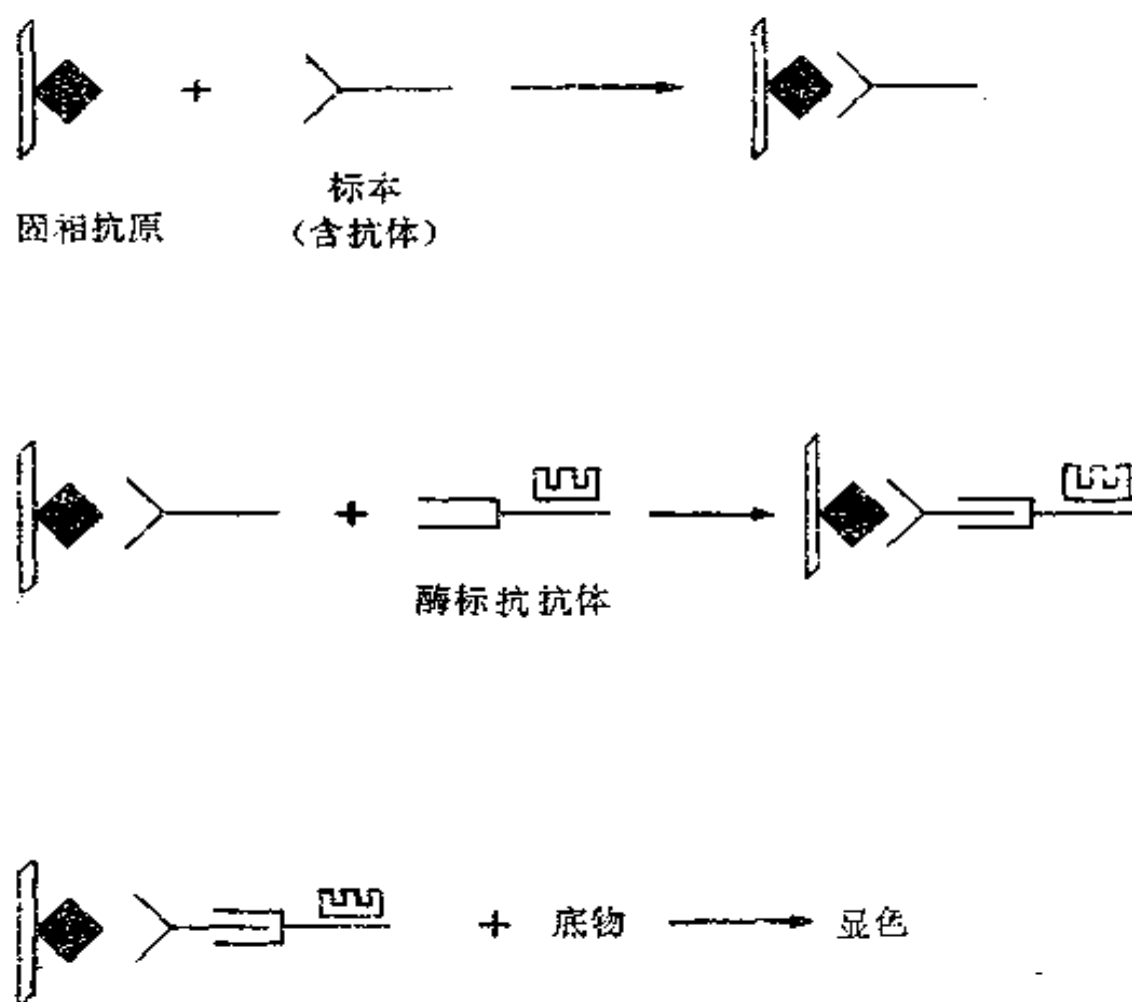


图2-3 间接法测抗体

(1) 将特异性抗原与固相载体联结，形成固相抗原。洗涤除去未结合的抗原及杂质。

(2) 加稀释的受检血清，保温反应。血清中的特异抗体与固相抗原结合，形成固相抗原抗体复合物。经洗涤后，固相载体上只留下特异性抗体，血清中的其他成份在洗涤过程中被洗去。

(3) 加酶标抗抗体。可用酶标抗人Ig以检测总抗体，但一般多用酶标抗人IgG检测IgG抗体。固相免疫复合物中的抗体与酶标抗抗体结合，从而间接地标记上酶。洗涤后，固相载体上的酶量与标本中受检抗体的量正相关。

(4) 加底物显色。

本法主要用于对病原体抗体的检测而进行传染病的诊断。间接法的优点是只要变换包被抗原，就可利用同一酶标抗抗体建立检测相应抗体的方法。

间接法成功的关键在于抗原的纯度。虽然有时用粗提抗原包被也能取得实际有效的结果，但应尽可能予以纯化，以提高试验的特异性。特别应注意除去能与一般健康人血清发生反应的杂质，例如以E.Coli为工程菌的重组抗原，如其中含有E.Coli成份，很可能与受过E.Coli感染者血清中的抗E.Coli抗体发生反应。抗原中也不能含有与酶标抗人Ig反应的物质，例如来自人血浆或人体组织的抗原，如不将其中的Ig去除，试验中也将发生假阳性反应。另外如抗原中含有无关蛋白，也会因竞争吸附而影响包被效果。

间接法中另一种干扰因素为正常血清中所含的高浓度的非特异性IgG。病人血清中受检的特异性IgG只占总IgG中的一小部分。IgG的吸附性很强，非特异性IgG可直接吸附

到固相载体上,有时也可吸附到包被抗原的表面。因此在间接法中,抗原包被后一般用无关蛋白质(例如牛血清白蛋白)再包被一次,以封闭(blocking)固相上的空余间隙。另外,在检测过程中标本须先行稀释(1:40~1:200),以避免过高的阴性本底影响结果的判断。

2.2.3 双抗原夹心法测抗体

反应模式与双抗体夹心法类似。用特异性抗原进行包被和制备酶结合物,以检测相应的抗体。与间接法测抗体的不同之处为以酶标抗原代替酶标抗抗体。此法中受检标本不需稀释,可直接用于测定,因此其敏感度相对高于间接法。乙肝标志物中抗HBs的检测常采用本法。本法的关键在于酶标抗原的制备,应根据抗原结构的不同,寻找合适的标记方法。

2.2.4 竞争法测抗体

当抗原材料中的干扰物质不易除去,或不易得到足够的纯化抗原时,可用此法检测特异性抗体。其原理为标本中的抗体和一定量的酶标抗体竞争与固相抗原结合。标本中抗体量越多,结合在固相上的酶标抗体愈少,因此阳性反应呈色浅于阴性反应。如抗原为高纯度的,可直接包被固相。如抗原中会有干扰物质,直接包被不易成功,可采用捕获包被法,即先包被与固相抗原相应的抗体,然后加入抗原,形成固相抗原。洗涤除去抗原中的杂质,然后再加标本和酶标抗体进行竞争结合反应。竞争法测抗体有多种模式,可将标本和酶标抗体与固相抗原竞争结合,抗HBc ELISA一般采用此法(见图2-4)。另一种模式为将标本与抗原一起加入到固相抗体中进行竞争结合,洗涤后再加入酶标抗体,与结合在固相

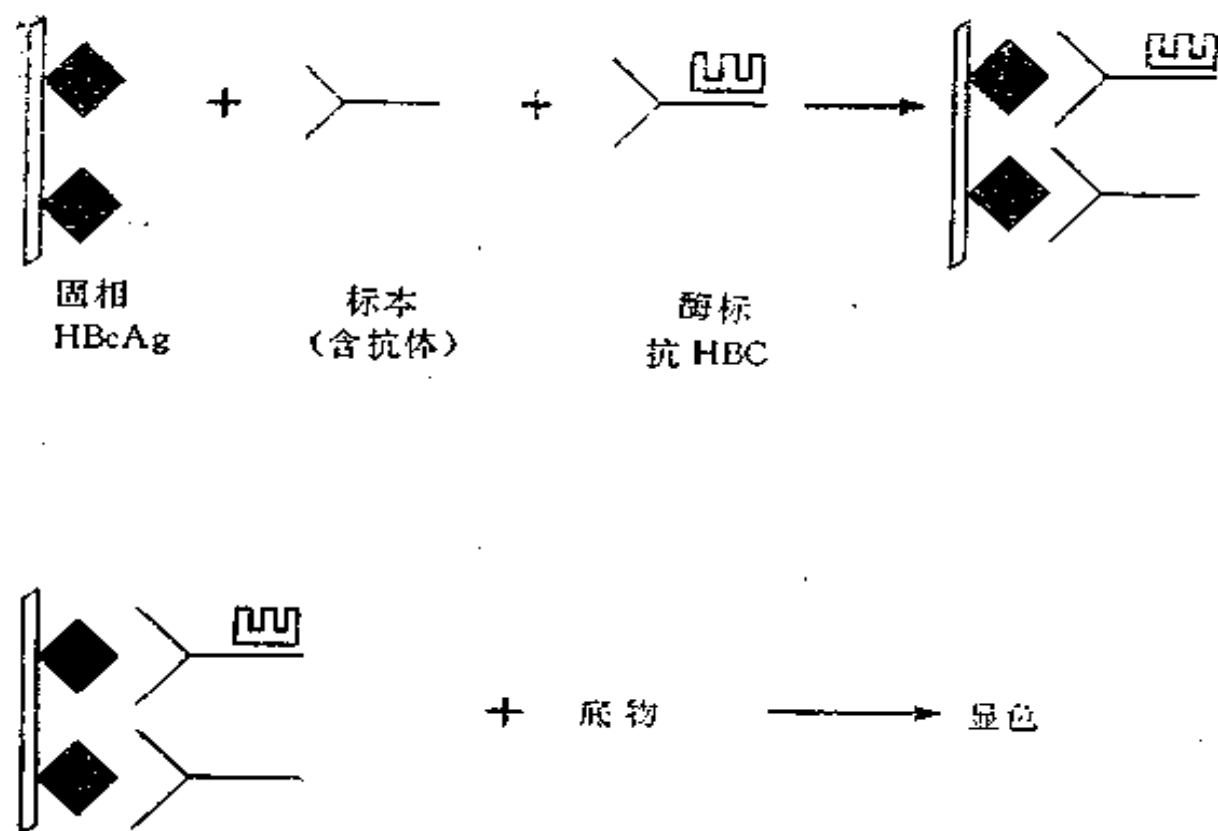


图2-4 竞争法检测抗HBc

上的抗原反应。抗HBc的检测一般采用此法(图2-5)。

2.2.5 竞争法测抗原

小分子抗原或半抗原因缺乏可作夹心的两个或两个以上的位点，因此不能用双抗体夹心法进行测定，可以采用竞争法模式。其原理是标本中的抗原和一定量的酶标抗原竞争与固相抗体结合。标本中抗原量愈多，结合在固相上的酶标抗原愈少，最后的显色也愈浅。小分子激素、药物等的ELISA

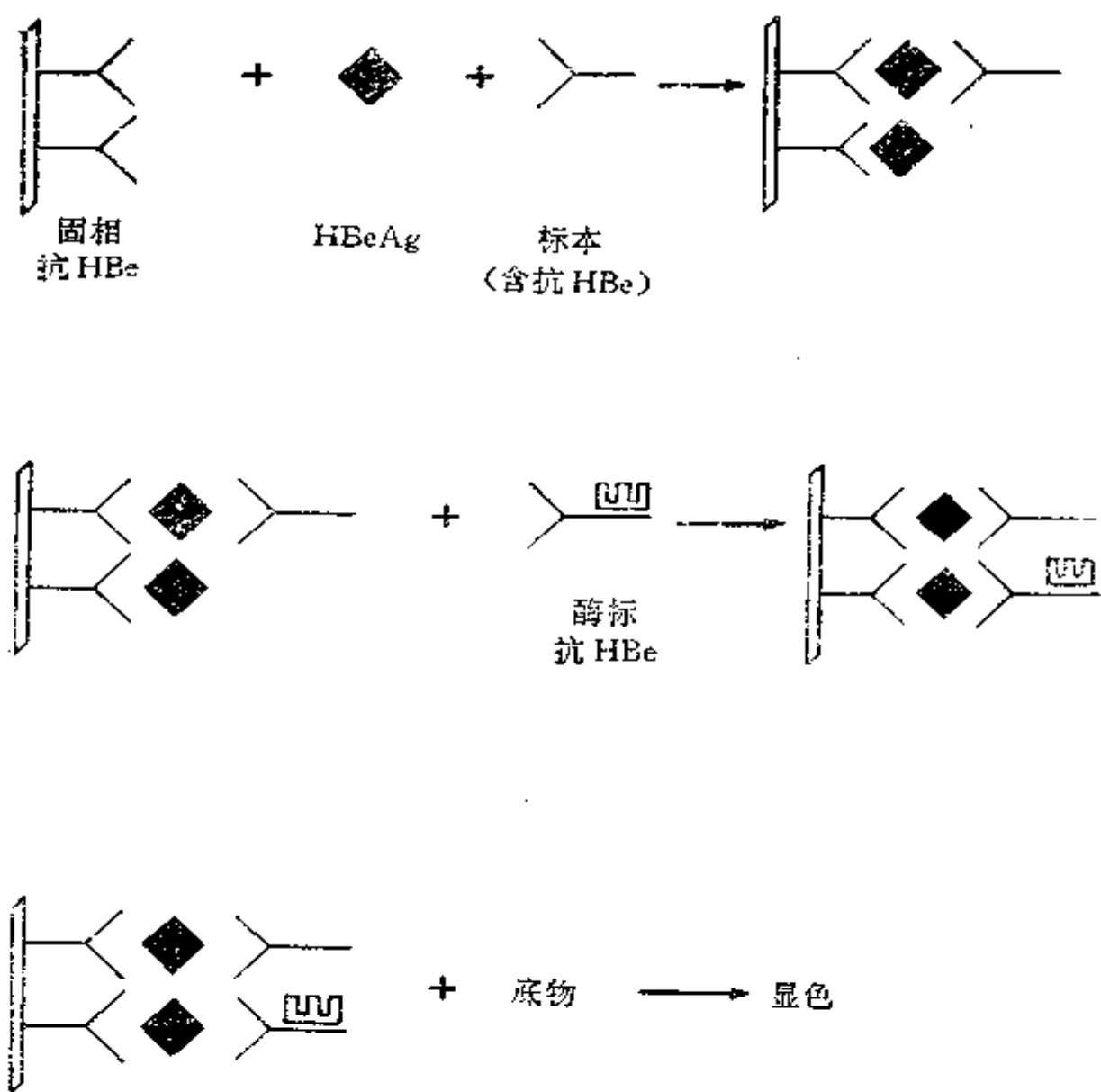


图2-5 竞争法检测抗HBe

测定多用此法。图2-6为竞争法测定雌二醇的模式。

2.2.6 捕获包被法测IgM抗体

IgM抗体的检测用于传染病的早期诊断中。间接法ELISA一般仅适用于检测总抗体或IgG抗体。如用抗原包被

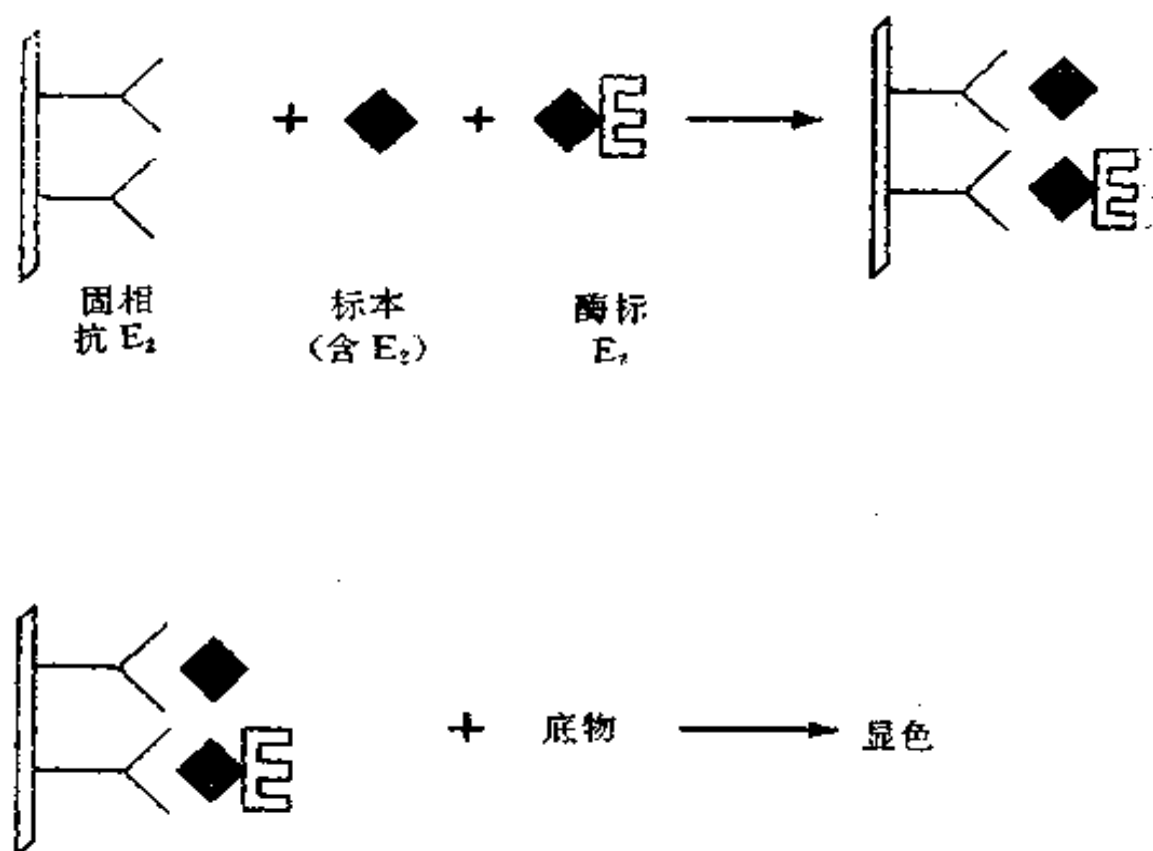


图2-6 竞争法测定雌二醇 (E₂)

的间接法直接测定IgM抗体，因标本中一般同时存在较高浓度的IgG抗体，后者将竞争结合固相抗原而使一部分IgM抗体不能结合到固相上。因此如用抗人IgM作为二抗，间接测定IgM抗体，必须先将标本用A蛋白或抗IgG抗体处理，以除去IgG的干扰。在临床检验中测定IgM抗体时多采用捕获包被法。先用抗人IgM抗体包被固相，以捕获血清标本中的IgM(其中包括针对抗原的特异性IgM抗体和非特异性的IgM)。然后加入抗原，此抗原仅与特异性IgM相结合。继而加酶标记针对抗原的特异性抗体。再与底物作用，呈色即

与标本中的IgM成正相关。此法常用于病毒性感染的早期诊断。甲型肝炎病毒(HAV)IgM抗体的检测模式见图2-7。

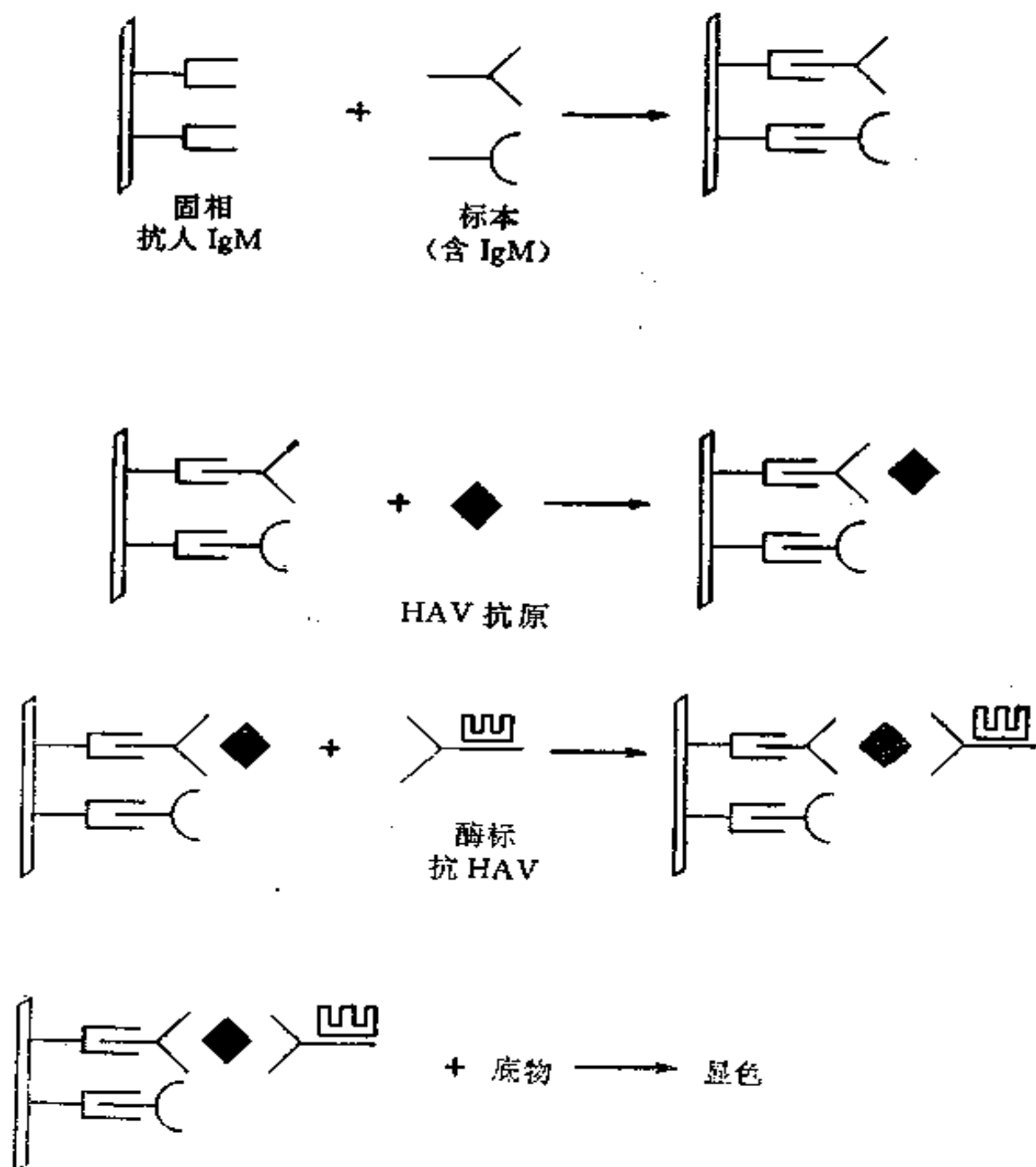


图2-7 捕获包被法检测抗HAV IgM抗体

类风湿因子(RF)同样能干扰捕获包被法测定IgM抗体,导致假阳性反应。因此中和IgG的间接法近来颇受青睐,用这类试剂检测抗CMV IgM抗体和抗弓形虫IgM抗体已获成功。

2.2.7 ABC-ELISA法

ABS为亲和素(avidin)生物素(biotin)系统(system)的略语。亲和素是一种糖蛋白,分子量 60 000,每个分子由4个能和生物素结合的亚基组成。生物素为小分子化合物,分子量244。用化学方法制成的衍生物生物素-羟基琥珀酰亚胺酯可与蛋白质和糖等多种类型的大小分子形成生物素标记产物,标记方法颇为简便。生物素与亲和素的结合具有很强的特异性,其亲和力较抗原抗体反应大得多,两者一经结合就极为稳定。由于一个亲和素可与4个生物素分子结合,因此如把ABS与ELISA偶联起来,就可再提高ELISA的灵敏度。ABS-ELISA法可分为酶标记亲和素-生物素(LAB)法和桥联亲和素-生物素(ABC)法两种类型。两者均以生物素标记的抗体(或抗原)代替原ELISA系统中的酶标抗体(或抗原)。在LAB中,固相生物素先与不标记的亲和素反应,然后再加酶标记的生物素以进一步提高敏感度。在早期,亲和素从蛋清中提取,这种卵亲和素为碱性糖蛋白,与聚苯乙烯载体的吸附性很强,用于ELISA中可使本底增高。从链霉菌中提取的链霉亲和素则无此缺点,在ELISA应用中有替代前者的趋势。由于ABS-ELISA较普通ELISA多用了两种试剂,增加了操作步骤,在临床检验中ABS-ELISA应用不多。

(韩松)

3. ELISA的试剂

在临床检验中一般采用商品试剂盒进行测定。前文(2.2)已述, ELISA中有三个必要的试剂: 免疫吸附剂、结合物和酶的底物。完整的ELISA试剂盒应包含以下各组分: (1) 已包被抗原或抗体的固相载体(免疫吸附剂); (2) 酶标记的抗原或抗体(结合物); (3) 酶的底物; (4) 阴性对照品和阳性对照品(定性测定中), 参考标准品和控制血清(定量测定中); (5) 结合物及标本的稀释液; (6) 洗涤液; (7) 酶反应终止液。

3.1 免疫吸附剂

已包被抗原或抗体的固相载体在低温($2\sim 8^{\circ}\text{C}$)干燥的条件下一般可保存6个月。有些不完整的试剂盒, 仅供应包被用抗原或抗体, 检测人员需自行包被。以下简述固相载体和包被过程。

3.1.1 固相载体

固相载体在ELISA测定过程中作为吸附剂和容器, 不参与化学反应。可作ELISA中载体的材料很多, 最常用的是聚苯乙烯。聚苯乙烯具有较强的吸附蛋白质的性能, 抗体或蛋白质抗原吸附其上后仍保留原来的免疫学活性, 加之它的价格低廉, 所以被普遍采用。聚苯乙烯为塑料, 可制成各种形式。

ELISA载体的形状主要有三种：微量滴定板、小球和小试管。以微量滴定板最为常用，专用于ELISA的产品称为ELISA板，国际上标准的微量滴定板为 8×12 的96孔式。为便于作少量标本的检测，有制成8联孔条或12联孔条的，放入座架后，大小与标准ELISA板相同。ELISA板的特点是可以同时进行大量标本的检测，并可在特制的比色计上迅速读出结果。现在已有多种自动化仪器用于微量滴定板型的ELISA检测，包括加样、洗涤、保温、比色等步骤，对操作的标准化极为有利。聚苯乙烯经射线照射后，其吸附性能特别是对免疫球蛋白的吸附性能增加，应用于双抗体夹心法可使固相上抗体量增多，但用于间接法测抗体时空白值较大。

良好的ELISA板应该是吸附性能好，空白值低，孔底透明度高，各板之间、同一板各孔之间性能相近。聚苯乙烯ELISA板由于原料的不同和制作工艺的差别，各种产品的质量差异很大，因此，每一批号的ELISA板在使用前须事先检查其性能。常用的检查方法为：以一定浓度的人IgG（一般为 10 ng/ml ）包被ELISA板各孔，洗涤后每孔内加入适当稀释度的酶标抗人IgG抗体，保温后洗涤，加底物显色，终止酶反应后，分别测每孔溶液的吸光度。控制反应条件，使各孔读数在吸光度0.8左右。计算全部读数的平均值。所有单个读数与全部读数的均数之差，应小于10%。

与聚苯乙烯类似的塑料是聚氯乙烯。作为ELISA固相载体，聚氯乙烯的特点为质软板薄，可剪裁，价廉，但光洁度不如聚苯乙烯板，孔底亦不如聚苯乙烯板平整。聚氯乙烯对蛋白质的吸附性能比聚苯乙烯高，但空白值也略高。

为比较不同固相在某一ELISA测定中的优劣，可应用如下的试验：用其他免疫学测定方法选出一个典型的阳性标本和阴性标本，将它们进行一系列稀释后，在不同的固相载体上按预定的ELISA操作步骤进行测定，然后比较测定结果。在哪一种载体上阳性结果与阴性结果差别最大，这种载体就是这一ELISA测定项目的最合适的固相载体。

在ELISA中，用作固相载体的小珠一般为直径0.6cm的圆珠，表面经磨砂处理后吸附面积大大增加。ELISA板孔的吸附面积约为 200mm^2 ，小珠均为 1000mm^2 ，将近ELISA板孔的5倍。吸附面积的增大即意味着固相抗原或抗体量的增加。再者，球型小珠的表面弧度更有利于吸附的抗原决定簇或抗体结合位点的暴露而处于最佳反应状态，因此珠式ELISA的反应往往更为灵敏。小珠的另一特点是更易于使洗涤彻底，使用特殊的洗涤器，使小珠在洗涤过程中滚动淋洗，其洗涤效果远较板孔的浸泡式为好。但由于磨砂工艺的难度较大，小珠的均一性较差。

小试管作为固相载体也有较大的吸附表面，而且标本的反应量也相应增加。板式及珠式ELISA的标本量一般为 $100\sim 200\mu\text{l}$ ，而小试管可根据需要加大反应体积，标本反应量的增加有助于试验敏感性的提高。小试管还可以当作比色杯，最后直接放入分光光度计中比色。

也有应用聚苯乙烯胶乳或其他材料制成的微粒作为ELISA固相载体的。其优点是表面积极大，反应在悬液中进行，其速率与液相反应近似。以含铁的磁性微粒作载体，反应后用磁铁的吸引进行分离，洗涤方便，试剂盒一般均配以特殊仪器。

3.1.2 包被的方式

将抗原或抗体固定化的过程称为包被(coating)。换言之,包被即是抗原或抗体结合到固相载体表面的过程。蛋白质与聚苯乙烯固相载体是通过物理吸附结合的,靠的是蛋白质分子结构上的疏水基团与固相载体表面的疏水基团间的作用。这种物理吸附是非特异性的,受蛋白质的分子量、等电点、浓度等的影响。载体对不同蛋白质的吸附能力是不相同的,大分子蛋白质较小分子蛋白质通常含有更多的疏水基团,故更易吸附到固相载体表面。IgG对聚苯乙烯等固相具有较强的吸附力,其联结多发生在Fc段上,抗体结合点暴露于外,因此抗体的包被一般均采用直接吸附法。蛋白质抗原大多也可采用与抗体相似的方法包被。当抗原决定簇存在于或邻近于疏水区域时,抗原与固相载体的直接吸附可使抗原决定簇不能充分暴露,在这种情况下,直接包被效果不佳,可以采用间接的捕获包被法,即先将针对该抗原的特异抗体作预包被,其后通过抗原抗体反应使抗原固相化。此间接结合在固相上的抗原远离载体表面,其抗原决定簇也得以充分暴露。间接包被的抗原经固相抗体的亲和层析作用,包被在固相上的抗原纯度大大提高,因此含杂质较多的抗原也可采用捕获包被法(见2.2.4),试验的特异性、敏感性均由此得以改善,重复性亦佳。间接包被的另一优点是抗原用量少,仅为直接包被的1/10乃至1/100。

不易吸附在聚苯乙烯载体上的非蛋白质抗原可采用特殊的包被方式。例如,在检测抗DNA抗体时,需用DNA作为包被抗原,而普遍的固相载体一般不能直接与核酸结合。可将聚苯乙烯板先经紫外线照射(例如30W紫外灯,75cm照

射12小时),以增加其吸附性能。固相载体先用碱性蛋白质,如聚赖氨酸、鱼精蛋白等作预包被,也可提高核酸的结合力。也可用亲和素生物素系统作间接包被,即用亲和素先包被载体,然后加入生物素化的DNA,这种包被方法均匀、牢固,已扩大应用于各种抗原物质的定量测定。

脂类物质无法与固相载体结合,可将其在有机溶剂(例如乙醇)中溶解后加入ELISA板孔中,开盖置冰箱过夜或冷风吹干,待酒精挥发后,让脂质自然干固在固相表面。抗心磷脂抗体的ELISA试剂一般采用这种包被方式。

3.1.3 包被用抗原

用于包被固相载体的抗原按其来源不同可分为天然抗原、重组抗原和合成多肽抗原三大类。天然抗原可取自动物组织、微生物培养物等,须经提取纯化才能作包被用。如HBsAg可以从携带者的血清中提取,一般的细菌和病毒抗原可以从其培养物中提取,蛋白成份抗原可从富含此抗原的材料中提取等(例如AFP从脐血或胎肝中提取)。重组抗原是抗原基因在质粒体中表达的蛋白质抗原,多以大肠杆菌或酵母菌为质粒体。重组抗原的优点是除工程菌成份外,其他杂质少,而且无传染性,但纯化技术难度较大。以大肠杆菌为质粒体的重组抗原如不能充分去除大肠杆菌成份,用于ELISA,在反应中可出现假阳性,因不少受检者受大肠杆菌感染而在血清中存在抗大肠杆菌抗体。重组抗原的另一特点是能用基因工程制备某些无法从天然材料中分离的抗原物质。例如丙型肝炎病毒(HCV)尚不能培养成功,而且丙肝病人血清中HCV抗原含量极微。目前检测抗HCV ELISA中所用包被抗原大多为根据HCV的基因克隆表达而制备的重

组抗原。在传染病诊断中,不少重组抗原如HBsAg、HBc-Ag和HIV抗原等均在ELISA中取得应用。合成多肽抗原是根据蛋白质抗原分子的某一抗原决定簇的氨基酸序列人工合成的多肽片段。多肽抗原一般只含有一个抗原决定簇,纯度高,特异性也高,但由于分子量太小,往往难于直接吸附于固相上。多肽抗原的包被一般需先使其与无关蛋白质如牛血清白蛋白(BSA)等偶联,借助于偶联物与固相载体的吸附,间接地结合到固相载体表面。应用多肽抗原的另一注意点为它仅能检测与其相应的抗体。一种蛋白质抗原往往含有多个不同的能引起抗体产生的决定簇,因此在受检血清中的其他抗体就不能与该多肽抗原发生反应。另外,某些微生物发生变异时往往发生抗原结构的变化,在这种情况下,用个别多肽抗原进行包被可引起其他抗体的漏检。

3.1.4 包被用抗体

包被固相载体的抗体应具有高亲和力和高特异性,可取材于抗血清或含单克隆抗体的腹水或培养液。如免疫用抗原中含有杂质(即便是极微量的),在抗血清中将出现杂抗体,必须除去(可用吸收法)后才能用于ELISA,以保证试验的特异性。抗血清不能直接用于包被,应先提取IgG,通常采用硫酸铵盐析和Sephadex凝胶过滤法。一般经硫酸铵盐析粗提的IgG已可用于包被,高度纯化的IgG性质不稳定。如需高亲和力的抗体包被以提高试验的敏感性,则可采用亲和层析法以除去抗血清中含量较多的非特异性IgG。腹水中单抗的浓度较高,特异性亦较强,因此不需作吸收和亲和层析处理,一般可将腹水作适当稀释后直接包被,必要时也可用纯化的IgG。应用单抗包被时应注意,一种单抗仅针对一种

抗原决定簇，在某些情况下，用多种单抗混合包被，可取得更好的效果。

3.1.5 包被的条件

包被用抗原或抗体的浓度，包被的温度和时间，包被液的pH等应根据试验的特点和材料的性质而选定。抗体和蛋白质抗原一般采用pH9.6的碳酸盐缓冲液作为稀释液，也有用pH7.2的磷酸盐缓冲液及pH7~8的Tris-HCl缓冲液作为稀释液的。通常在ELISA板孔中加入包被液后，在4~8℃冰箱中放置过夜，37℃中保温2小时被认为具有同等的包被效果。包被的最适当浓度随载体和包被物的性质可有很大的变化，每批材料需通过实验与酶结合物的浓度协调选定。一般蛋白质的包被浓度为100ng/ml~20μg/ml。

3.1.6 封闭

封闭(blocking)是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程。抗原或抗体包被时所用的浓度较低，吸收后固相载体表面尚有未被占据的空隙，封闭就是让大量不相关的蛋白质充填这些空隙，从而排斥在ELISA其后的步骤中干扰物质的再吸附。封闭的手续与包被相类似。最常用的封闭剂是0.05%~0.5%的牛血清白蛋白，也有用10%的小牛血清或1%明胶作为封闭剂的。脱脂奶粉也是一种良好的封闭剂，其最大的特点是价廉，可以高浓度使用(5%)。高质量的速溶食用低脂奶粉即可直接当作封闭剂使用，但由于奶粉的成份复杂，而且封闭后的载体不易长期保存，因此在试剂盒的制备中较少应用。

封闭是否必要，取决于ELISA的模式及具体的实验条件。并非所有的ELISA固相均需封闭，封闭不当反而会使

阴性本底增高。一般说来，双抗体夹心法，只要酶标记物是高活性的，操作时洗涤彻底，不经封闭也可得到满意的结果。特别是用单抗腹水直接包被时，因其中大量非抗体蛋白在包被时同样也吸附在固相表面，业已起到了类似封闭剂的作用。但在间接法测定中，封闭一般是不可少的（见2.2.2）。包被好的ELISA板干燥后放入密封的塑料袋或锡袋中，在低温可保存数月。

3.2 结合物

结合物即酶标记的抗体(或抗原)，是ELISA中最关键的试剂。良好的结合物应该是既保有酶的催化活性，也保持了抗体(或抗原)的免疫活性。结合物中酶与抗体(或抗原)之间有恰当的分子比例，在结合试剂中应尽量不含有或少含有游离的(未结合的)酶或游离的抗体(或抗原)。此外，结合物尚要有良好的稳定性。

3.2.1 酶

用于ELISA的酶应符合以下要求：纯度高，催化反应的转化率高，专一性强，性质稳定，来源丰富，价格不贵，制备成酶结合物后仍继续保留它的活性部分和催化能力。最好在受检标本中不存在相同的酶。另外，它的相应底物应易于制备和保存，价格低廉，有色产物易于测定等。

在ELISA中，常用的酶为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)。在少数商品ELISA试剂中，应用的酶尚有葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶和脲酶等。

国产ELISA试剂一般都用HRP制备结合物。HRP是一种糖蛋白，含糖量约为18%，分子量为44 000，是一种复合酶，由主酶(酶蛋白)和辅基(亚铁血红素)结合而成，是一种卟啉蛋白质。主酶无色糖蛋白在275nm波长处有最高吸收峰，辅基是深棕色的含铁卟啉环，在403nm波长处有最高吸收峰。HRP的纯度用RZ (Reinheit Zahl, 德文, 意为纯度数)表示，是403nm的吸光度与280nm吸光度之比，高纯度的HRP的RZ ≥ 3.0 。

HRP除符合上述的作为ELISA中标记酶的要求外，更有价格低廉和性质较稳定的优点。值得注意的是，在选用酶制剂时，除其纯度RZ外，更应注意酶的活力。高纯度的酶如保存不当，活力也会降低。酶制剂的活力以所含的酶活力单位表示，可用对底物作用后生成产物量的测定进行试验。

国外很多ELISA试剂采用碱性磷酸酶(AP)作为标记酶。常用的AP有两个来源，分别从大肠杆菌和小牛肠粘膜中提取。不同来源的酶生化特性略不相同，从大肠杆菌中提取的AP分子量为80 000，酶作用的最适pH为8.0；用小牛肠粘膜提取的AP分子量为100 000，最适pH为9.6。在ELISA中，AP系统的敏感度一般高于HRP系统，空白值也较低，但AP价格昂贵，制备结合物所得率也较HRP低。

3.2.2 抗原和抗体

制备结合物时所用抗体一般均为纯度较高的IgG，以免在与酶联结时其他杂蛋白的干扰。最好用亲和层析纯的抗体，这样全部酶结合物均具有特异的免疫活性，可以在高稀释度进行反应，实验结果本底浅淡。如用F(ab')₂进行标记，则更可避免标本中RF的干扰。在ELISA中用酶标抗原

的模式不多，总的要求是抗原必须是高纯度的。

3.2.3 结合物的制备

酶标记抗体的制备方法主要有两种，即戊二醛交联法和过碘酸盐氧化法。

(1) 戊二醛交联法：戊二醛是一种双功能团试剂，它可以使酶与蛋白质的氨基通过它而联结。碱性磷酸酶一般用此法进行标记。交联方法分一步法、两步法两种。在一步法中，戊二醛直接加入酶与抗体的混合物中，反应后即得酶标记抗体。

ELISA中常用的酶一般都用此法交联。它具有操作简便、有效(结合率达60%~70%)和重复性好等优点。缺点是交联反应是随机的，酶与抗体交联时分子间的比例不严格，结合物的大小也不均一，酶与酶，抗体与抗体之间也有可能交联，影响效果。在两步法中，先将酶与戊二醛作用，透析除去多余的戊二醛后，再与抗体作用而形成酶标抗体。也可先将抗体与戊二醛作用，再与酶联结。两步法的产物中绝大部分的酶与蛋白质是以1:1的比例结合的，较一步法的酶结合物更有助于本底的改善以提高敏感度，但其偶联的有效率较一步法低。

(2) 过碘酸盐氧化法：本法只适用于含糖量较高的酶。辣根过氧化物酶的标记常用此法。反应时，过碘酸钠将HRP分子表面的多糖氧化为醛基和羧基，用硼氢化钠中和多余的过碘酸。酶上的醛基很活泼，可与蛋白质上的氨基形成Schiff氏碱而结合。酶标记物按克分子比例联结，其最佳比例为：酶/抗体 = 1~2/1。此法简便有效，一般认为是HRP最可取的标记方法，但也有人认为由于所用试剂较为强烈，

各批实验结果不易重演。

按以上方法制备的酶结合物一般都混有未结合的酶和抗体。理论上,结合物中混有的游离酶一般不影响ELISA中最后的酶活性测定,因经过彻底洗涤,游离酶可被除去,并不影响最终的显色。但游离的抗体则不同,它会与酶标抗体竞争相应的固相抗原,从而减少了结合到固相上的酶标抗体的量。因此制备的酶结合物应予以纯化,去除游离的酶和抗体后用于检测,效果更好。纯化的方法很多,分离大分子化合物的方法均可应用。硫酸铵盐析法最为简便,但效果并不理想,因为此法只能去除留在上清中的游离酶,但相当数量的游离抗体仍与酶结合物一起沉淀而不能分开。用离子交换层析或分子筛分离更为可取,高效液相层析法可将制备的结合物清晰地分成三个部分:游离酶、游离抗体和纯结合物而取得最佳的分离效果,但费用较贵。

结合物制得后,在用作ELISA试剂前尚需确定其适当的工作浓度。使用过浓的结合物,既不经济,又可使本底增高;结合物的浓度过低,则又影响检测的敏感性。所以必须对结合物的工作浓度予以选择。最适的工作浓度就是指结合物稀释至这一浓度时,能维持一个低的本底,并获得测定的最佳灵敏度,达到最合适的测定条件和测定费用的节省。就酶标抗体本身而言,它的有效工作浓度是指与其相应抗原包被的载体作试验时,能得到阳性反应的最高稀释度。例如某一HRP,抗人IgG制剂标明的工作浓度为1:5 000,表示该制剂经1:5 000稀释后,在与人IgG包被的固相作ELISA试验时,将发生阳性反应。但在用于具体的ELISA检测中,酶标抗体的最适工作浓度受到固相载体的性质、包被抗原或抗

体的纯度以及整个检测系统如标本、反应温度和时间等的影响，因此必须在实际测定条件下进行“滴配”选择能达到最高敏感度的最大稀释度作为试剂盒中的工作浓度。

3.2.4 结合物的保存

酶标抗体中的酶和抗体均为生物活性物质，保存不当，极易失活。高浓度的结合物较为稳定，冰冻干燥后可在普通冰箱中保存一年左右，但冻干过程中可引起活力的减低，而且使用时需经复溶，颇为不便。结合物溶液中加入等体积的甘油可在低温冰箱或普通冰箱的冰格中较长时间保存。早期的ELISA试剂盒中的结合物一般均按以上两种形式供应，配以稀释液(见3.2.5)，临用时按标明的稀释度稀释成工作液。现在较先进的ELISA试剂盒中结合物均已用合适的缓冲液配成工作液，使用时不需再行稀释，在4~8℃保存期可达6个月。由于蛋白浓度较低，结合物易失活，需加入蛋白保护剂。另外再加入抗生素(例如庆大霉素)和防腐剂(HRP结合物加硫柳泵，AP结合物可加叠氮钠)，以防止细菌生长。

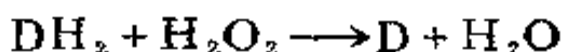
3.2.5 结合物的稀释液

用于稀释高浓度的结合物以配成工作液。为避免结合物在反应中直接吸附在固相载体上，在稀释缓冲液中常加入高浓度的无关蛋白质(例如1%牛血清白蛋白)，通过竞争以抑制结合物的吸附。一般还加入具有抑制蛋白质吸附于塑料表面的非离子型表面活性剂，如吐温20，0.05%的浓度较为适宜。在间接法测抗体时，血清标本需稀释后进行测定，也可应用这种稀释液。

3.3 酶的底物

3.3.1 HRP的底物

HRP催化过氧化物的氧化反应，最具代表性的过氧化物为 H_2O_2 ，其反应式如下：



上式中， DH_2 为供氢体， H_2O_2 为受氢体。在ELISA中， DH_2 一般为无色化合物，经酶作用后成为有色的产物，以便作比色测定。常用的供氢体有邻苯二胺(0-phenylenediamine, OPD)、四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)和ABTS[2, 2'-azino-di-(3-ethylbenziazobine sulfonate-6)]。

OPD氧化后的产物呈橙红色。用酸终止酶反应后，在492nm处有最高吸收峰，灵敏度高，比色方便，是HRP结合物最常用的底物。OPD本身难溶于水， $\text{OPD} \cdot 2\text{HCl}$ 为水溶性。曾有报道OPD有致突变性，操作时应予注意。OPD见光易变质，与过氧化氢混合成底物应用液后更不稳定，须现配现用。在试剂盒中，OPD和 H_2O_2 一般分成二个组分，OPD可制成一定量的粉剂或片剂形式，片剂中含有发泡助溶剂，使用更为方便。过氧化氢则配入底物缓冲液中，有制成易保存的浓缩液，使用时用蒸馏水稀释。先进的ELISA试剂盒中则直接配成含保护剂的工作浓度为0.02% H_2O_2 的应用液，只需加入OPD后即可作为底物应用液。

TMB经HRP作用后其产物显蓝色，目视对比鲜明。TMB性质较稳定，可配成溶液试剂，只需与 H_2O_2 溶液混和

即成应用液，可直接作底物使用。另外，TMB又有无致癌性等优点，因此在ELISA中应用日趋广泛。酶反应如用HCl或H₂SO₄终止后，TMB产物由蓝色转呈黄色，可在比色计中定量，最适吸收波长为405nm。

ABTS虽不如OPD和TMB敏感，但空白值极低，也为一些试剂盒所采用。

另一种HRP的底物为3-(4-羟基)苯丙酸[3-(4-hydroxy)phenyl propionic acid, HPPA]，经HRP作用后，产物显荧光，可用荧光光度计测量。用于ELISA的优点为可加宽定量测定的线性范围。

HRP对氢受体的专一性很高，仅作用于H₂O₂、小分醇的过氧化物和尿素过氧化物(urea peroxide)。H₂O₂应用最多，但尿素过氧化物为固体，作为试剂较H₂O₂方便、稳定。试剂盒供应尿素过氧化物片剂，用蒸馏水溶解后，在底物缓冲液中密闭、低温(2~8℃)可稳定1年。

3.3.2 AP的底物

AP为磷酸酯酶，一般采用对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate, p-NPP)作为底物，可制成片剂，使用方便。产物为黄色的对硝基酚，在405nm波长处有吸收峰。用NaOH终止酶反应后，黄色可稳定一段时间。

AP也有发荧光底物(磷酸4-甲基伞酮)，可用于ELISA作荧光测定，敏感度较高于用显色底物的比色法。

3.4 洗涤液

在板式ELISA中，常用的稀释液为含0.05%吐温20的磷

酸缓冲盐水。

3.5 酶反应终止液

常用的HRP反应终止液为硫酸，其浓度按加量及比色液的最终体积而异，在板式ELISA中一般采用2mol/L。

3.6 阳性对照品和阴性对照品

阳性对照品(positive control)和阴性对照品(negative control)是检验试验有效性的控制品，同时也作为判断结果的对照，因此对照品，特别是阴性对照品的基本组成应尽量与检测标本的组成相一致。以人血清为标本的测定，对照品最好也为人血清，因为正常人血清在各种ELISA模式中可产生不同程度的本底。由于大量正常人血清较难得到，国外试剂盒中的对照品多以复钙人血浆(recalcified human plasma)为原料，即在血浆中加入钙离子，使其中的纤维蛋白质凝固，除去凝块后所得的液体，其组成与血清相似。阴性对照品须先行检测，确定其中不含待测物质。例如检测HBsAg的阴性对照品中不可含HBsAg，最好抗HBs也是阴性。阳性对照品多以含蛋白保护剂的缓冲液为基质，其中加入一定量的待检物质，此量最好在试剂说明书中标明。加入的量应与试剂的敏感度相称，在测定中得到的吸光值与受检标本吸光值比较，可对标本中受检物质的量有一个粗略的估计。国外检测HBsAg的ELISA试剂盒检测敏感度约为0.5ng/ml，阳性对照品中HBsAg含量约为10ng/ml。在

对照品中一般加入抗生素和防腐剂，以利保存。

3.7 参考标准品

定量测定的ELISA试剂盒(例如甲胎蛋白及癌胚抗原测定等)应含有制作标准曲线用的参考标准品,应包括覆盖可检测范围的4~5个浓度,一般均配入含蛋白保护剂及防腐剂的缓冲液中。

(韩 松)

4. ELISA的操作要点

优质的试剂，良好的仪器和正确的操作是保证 ELISA 检测结果准确可靠的必要条件。ELISA 的操作因固相载体的形式不同而有所差异，国内医学检验一般均用板式 ELISA。本文将叙述板式 ELISA 各个操作步骤的注意要点，珠式、管式及磁性微球 ELISA，国外试剂均与特殊仪器配合应用，两者均有详细的使用说明，严格遵照规定操作，必能得出准确的结果。

4.1 标本的采取和保存

可用作 ELISA 测定的标本十分广泛，体液（如血清）、分泌物（如唾液）和排泄物（如尿液、粪便）等均可作标本以测定其中某种抗体或抗原成份。有些标本可直接进行测定（如血清、尿液），有些则需经预处理（如粪便和某些分泌物）。大部分 ELISA 检测均以血清作为测定标本。血浆中除尚含有纤维蛋白原和抗凝剂外，其他成份均同等于血清。制备血浆标本需借助于抗凝剂，而血清标本只要待血液自然凝固、血块收缩后即可取得。除特殊情况外，在医学检验中均以血清作为检测标本。在 ELISA 中血浆和血清可同等应用。血清标本可按常规方法采集，应注意避免溶血，红细胞溶解时会释放出具有过氧化物酶活性的物质，以 HRP 为标记

的ELISA测定中，溶血标本可能会增加非特异性显色。

血清标本宜在新鲜时检测。如有细菌污染，菌体中可能含有内源性HRP，也会产生假阳性反应。如在冰箱中保存过久，其中的IgG可发生聚合，在间接法ELISA中可使本底加深。一般说来，在5天内测定的血清标本可放置于4°C，超过一周测定的需低温冻存。冻结血清融解后，蛋白质局部浓缩，分布不均，应充分混匀后测定。混匀宜轻缓，避免气泡，可上下颠倒混和，不要在混匀器上强烈振荡。混浊或有沉淀的血清标本应先离心或过滤，澄清后再检测。反复冻融会使抗体效价跌落，所以测抗体的血清标本如需保存作多次检测，宜少量分装冻存。保存血清自采集时就应注意无菌操作，也可加入适当防腐剂（见3.2.4）

4.2 试剂的准备

按试剂盒说明书的要求准备实验中需用的试剂。ELISA中用的蒸馏水或去离子水，包括用于洗涤的，应为新鲜的和高质量的。自配的缓冲液应用pH计测量校正。从冰箱中取出的试验用试剂应待温度与室温平衡后使用。试剂盒中本次试验不需用的部分应及时放回冰箱保存。

4.3 加样

在ELISA中一般有3次加样步骤，即加标本，加酶结合物，加底物。加样时应将所加物加在ELISA板孔的底部，避免加在孔壁上，并注意不可溅出，不可产生气泡。

加标本一般用微量加样器，按规定的量加入板孔中。每次加标本应更换吸嘴，以免发生交叉污染，也可用一次性的定量塑料管加样。有些测定（如间接法ELISA）需用稀释的血清标本，可在试管中按规定的稀释度稀释后再加样。也可在板孔中先加入稀释液，再在其中加入血清标本，然后在微型震荡器上震荡1分钟以保证混和。加酶结合物应用液和底物应用液时可用定量多导加液器，使加液过程迅速完成。

4.4 保温

在ELISA中一般有两次抗原抗体反应，即加标本和加酶结合物后。抗原抗体反应的完成需要有一定的温度和时间，这一保温过程称为温育（incubation），有人称之为孵育，在ELISA中似不恰当。

ELISA属固相免疫测定，抗原、抗体的结合只在固相表面上发生。以抗体包被的夹心法为例，加入板孔中的标本，其中的抗原并不是都有均等的和固相抗体结合的机会，只有最贴近孔壁的一层溶液中的抗原直接与抗体接触发生反应，其余部分的抗原则需经扩散才能与固相接触。这是一个逐步平衡的过程，因此需经较长时间才能达到反应的终点。在其后加入的酶标记抗体与固相抗原的结合也同样如此。这就是为什么ELISA反应总是需要一定时间的温育。

温育常采用的温度有43°C、37°C、室温和4°C（冰箱温度）等。37°C是实验室中常用的保温温度，也是大多数抗原抗体结合合适温度。在建立ELISA方法作反应动力学研究时，实验表明，两次抗原抗体反应一般在37°C经1~2小时，

产物的生成可达顶峰。为加速反应，可提高反应的温度，有些试验在43℃进行，但不宜采用更高的温度。抗原抗体反应在4℃更为彻底，在放射免疫测定中多使反应在冰箱中过夜，以形成最多的沉淀。但因所需时间太长，在ELISA中一般不予采用。

保温的方式除有的ELISA仪器附有特制的电热块外，一般均采用水浴，可将ELISA板置于水浴箱中，ELISA板底应贴着水面，使温度迅速平衡。为避免蒸发，板上应加盖，也可用塑料贴封纸或保鲜膜覆盖板孔，此时可让反应板漂浮在水面上。若用保温箱，ELISA板应放在湿盒内，湿盒要选用传热性良好的材料如金属等，在盒底垫湿的纱布，最后将ELISA板放在湿纱布上。湿盒应先放在保温箱中预温至规定的温度，特别是在气温较低的时候更应如此。无论是水浴还是湿盒温育，反应板均不宜叠放，以保证各板的温度都能迅速平衡。室温温育的反应，操作时的室温应严格限制在规定的范围内，标准室温温度是指20~25℃，但具体操作时可根据说明书的要求控制温育。室温温育时，ELISA板只要平置于操作台上即可。应注意温育的温度和时间应按规定力求准确。为保证这一点，一个人操作时，一次不宜多于两块板同时测定。

4.5 洗涤

洗涤在ELISA过程中虽不是一个反应步骤，但却也决定着实验的成败。ELISA就是靠洗涤来达到分离游离的和结合的酶标记物的目的。通过洗涤以清除残留在板孔中没能与固

相抗原或抗体结合的物质，以及在反应过程中非特异性地吸附于固相载体的干扰物质。聚苯乙烯等塑料对蛋白质的吸附是普遍性的，因此在ELISA测定的反应过程中应尽量避免非特异性吸附，而在洗涤时又应把这种非特异性吸附的干扰物质洗涤下来。可以说在ELISA操作中，洗涤是最主要的关键技术，应引起操作者的高度重视，操作者应严格要求洗涤，不得马虎。

洗涤的方式除某些ELISA仪器配有特殊的自动洗涤仪之外，手工操作有浸泡式和流水冲洗式两种，过程如下。

(1) 浸泡式 a. 吸干或甩去孔内反应液；b. 用洗涤液过洗一遍（将洗涤液注满板孔后，即甩去）；c. 浸泡，即将洗涤液注满板孔，放置2~3分钟，间歇摇动，浸泡时间不可随意缩短；d. 吸干孔内液体。吸干应彻底，可用水泵或真空泵抽吸，也可甩去液体后在清洁毛巾或吸水纸上拍干；e. 重复操作c和d，洗涤3~4次（或按说明书规定）。在间接法中如本底较高，可增加洗涤次数或延长浸泡时间。

微量滴定板多采用浸泡式洗涤法。洗涤液多为含非离子型洗涤剂的中性缓冲液。聚苯乙烯载体与蛋白质的结合是疏水性的，非离子型洗涤剂既含疏水基团，也含亲水基团，其疏水基团与蛋白质的疏水基团借疏水键结合，从而削弱蛋白质与固相载体的结合，并借助于亲水基团和水分子的结合作用，使蛋白质回复到水溶液状态，从而脱离固相载体。洗涤液中的非离子型洗涤剂一般是吐温20，其浓度可在0.05%~0.2%之间，高于0.2%时，可使包被在固相上的抗原或抗体解吸附而减低试验的灵敏度。

(2) 流水冲洗式 流水冲洗法最初用于小珠载体的洗

涤，洗涤液仅为蒸馏水甚至可用自来水。洗涤时附接一特殊装置，使小珠在流水冲击下不断地滚动淋洗，持续冲洗2分钟后，吸干液体，再用蒸馏水浸泡2分钟，吸干即可。浸泡式犹如盆浴，流水冲洗式则好比淋浴，其洗涤效果更为彻底，且也简便、快速。已有实验表明，流水冲洗式同样也适用于微量滴定板的洗涤。洗涤时设法加大水流量或加大水压，让水流冲击板孔表面，洗涤效果更佳。

4.6 显色和比色

4.6.1 显色

显色是ELISA中的最后一步温育反应，此时酶催化无色的底物生成有色的产物。反应的温度和时间仍是影响显色的因素。在一定时间内，阴性孔可保持无色，而阳性孔则随着时间的延长而呈色加强。适当提高温度有助于加速显色进行。在定量测定中，加入底物后的反应温度和时间应按规定力求准确。定性测定的显色可在室温进行，时间一般不需要严格控制，有时可根据阳性对照孔和阴性对照孔的显色情况适当缩短或延长反应时间，及时判断。

OPD底物显色一般在室温或37℃反应20~30分钟后即不再加深，再延长反应时间，可使本底值增高。OPD底物液受光照会自行变色，显色反应应避光进行，显色反应结束时加入终止液终止反应。OPD产物用硫酸终止后，显色由橙黄色转向棕黄色。

TMB受光照的影响不大，可在室温中置于操作台上，边反应边观察结果。但为保证实验结果的稳定性，宜在规定的

适当时间阅读结果。TMB经HRP作用后,约40分钟显色达顶峰,随即逐渐减弱,至2小时后可完全消退至无色。TMB的终止液有多种,叠氮钠(NaN_3)和十二烷基硫酸钠(SDS)等酶抑制剂均可使反应终止。这类终止剂尚能使蓝色维持较长时间(12~24小时)不褪,是目视判断的良好终止剂。此外,各类酸性终止液则会使蓝色转变成黄色,此时可用特定的波长(450nm)测读吸光值。

4.6.2 比色

比色前应先用洁净的吸水纸拭干板底附着的液体,然后将板正确放入酶标比色仪的比色架中。以软板为载体的试验,需先将板置于标准96孔的座架中,才可进行比色。最好在加底物液显色前,先将软板边缘剪净,这样,此板就可完全平妥坐入座架中。

比色时应先以蒸馏水校零点,测读底物孔(未经任何反应仅加底物液的孔)和空白孔(以生理盐水或稀释液代替标本作全过程的孔),以记录本次试验的试剂状况。其后可用空白孔校零,测读标本孔、标准品孔和控制品孔的吸光度。如仍以蒸馏水校零点,以上各孔的吸光度需减去空白孔的吸光度,然后进行计算。

比色结果的表达以往通用光密度(optical density, OD),现按规定用吸光度(absorbence, A),两者含义相同。通常的表示方法是,将吸收波长写于A字母的右下角,如OPD的吸收波长为492nm,表示方法为“ $A_{492\text{nm}}$ ”或“ $OD_{492\text{nm}}$ ”。

4.6.3 酶标比色仪

酶标比色仪(ELISA reader)简称酶标仪,通常指专

用于测读ELISA结果吸光度的光度计。针对固相载体形式的不同，各有特制的适用于板、珠和小试管的设计。许多试剂公司配套供应酶标仪。酶标仪的主要性能指标有：测读速度、读数的准确性、重复性、精确度和可测范围、线性等等。优良的酶标仪的读数一般可精确到0.001，准确性为 $\pm 1\%$ ，重复性达0.5%。举例说，若某孔测得的A值为1.083，则该孔相对于空气的真实A值应为 1.083 ± 0.01 (1.073~1.093)，重复测定数次，其A值均应在 1.083 ± 0.005 (1.078~1.088)之间。酶标仪的可测范围视各酶标仪的性能而不同。普通的酶标仪在0.000~2.000，新型号的酶标仪上限拓宽达2.900，甚至更高。超出可测上限的A值常以“*”或“over”或其他符号表示。应注意可测范围与线性范围的不同，线性范围常小于可测范围，比如某一酶标仪的可测范围为0.000~2.900，而其线性范围仅0.000~2.000，这在定量ELISA中制作标准曲线时应予注意。

酶标仪不应安置在阳光或强光照射下，操作时室温宜在15~30℃，使用前先预热仪器15~30分钟，测读结果更稳定。

测读A值时，要选用产物的敏感吸收峰，如OPD用492nm波长。有的酶标仪可用双波长式测读，即每孔先后测读两次，第一次在最适波长(W_1)，第二次在不敏感波长(W_2)，两次测定间不移动ELISA板的位置。例如OPD用492nm为 W_1 ，630nm为 W_2 ，最终测得的A值为两者之差($W_1 - W_2$)。双波长式测读可减少由容器上的划痕或指印等造成的光干扰。

各种酶标仪性能有所不同，使用中应详细阅读说明书。

4.7 结果判断

4.7.1 定性测定

定性测定的结果判断是对受检标本中是否含有待测抗原或抗体作出“有”或“无”的简单回答，分别用“阳性”、“阴性”表示。“阳性”表示该标本在该测定系统中有反应性，“阴性”则为无反应性。用定性判断法也可得到半定量结果，即用滴度来表示反应的强度，其实质仍是一个定性试验。在这种半定量测定中，将标本作一系列稀释后进行试验，呈阳性反应的最高稀释度即为滴度。根据滴度的高低，可以判断标本反应性的强弱，这比观察不稀释标本呈色的深浅判断为强阳性、弱阳性更具定量意义。

在间接法和夹心法ELISA中，阳性孔呈色深于阴性孔。在竞争法ELISA中则相反，阴性孔呈色深于阳性孔。两类反应的结果判断方法不同，分述于下。

(1) 间接法和夹心法

这类反应的定性结果可以用肉眼判断。目视标本孔无色或近于无色者判为阴性，显色清晰者为阳性。但在ELISA中，正常人血清反应后常可出现呈色的本底，此本底的深浅因试剂的组成和实验的条件不同而异，因此实验中必须加测阴性对照。阴性对照的组成应为不含受检物的正常血清或类似物（见3.6）。在用肉眼判断结果时，更宜用显色深于阴性对照作为标本阳性的指标。

目视法简捷明了，但颇具主观性。在条件许可下，应该用比色计测定吸光值，这样可以得到客观的数据。先读出标

本 (S, sample的缩写)、阳性对照 (P) 和阴性对照 (N) 的吸光值, 然后进行计算。计算方法有多种, 大致可分为阳性判定值法和标本与阴性对照比值法两类。

a. 阳性判定值法

阳性判定值 (cut-off value) 一般为阴性对照A值加上一个特定的常数, 以此作为判断结果阳性或阴性的标准。

用此法判断结果要求实验条件十分恒定, 试剂的制备必须标准化, 阳性和阴性的对照品应符合一定的规格, 须配用精密的仪器, 并严格按照规定操作。阳性判定值公式中的常数是在这特定的系统中通过对大量标本的实验检测而得到的。现举某种检测HBsAg的试剂盒为例。试剂盒中的阴性对照品为不含HBsAg的复钙人血浆, 阳性对照品HBsAg的含量标明为 $P = 9 \pm 2 \text{ ng/ml}$ 。每次试验设2个阳性对照和3个阴性对照。测得A值后, 先计算阴性对照A值的平均数 ($NC_{\bar{x}}$) 和阳性对照A值的平均数 ($PC_{\bar{x}}$), 两个平均数的差 ($P-N$) 必须大于一个特定的数值 (例如0.400), 试验才有效。3个阴性对照A值均应 $\geq 0.5 \times NC_{\bar{x}}$, 并 $\leq 1.5 \times NC_{\bar{x}}$, 如其中之一超出此范围, 则弃去, 而以另两个阴性对照重新计算 $NC_{\bar{x}}$; 如有两个阴性对照A值超出以上范围, 则该次实验无效。阳性判定值按下式计算:

$$\text{阳性判定值} = NC_{\bar{x}} + 0.05$$

标本A值 $\geq$ 阳性判定值的为阳性, 小于阳性判定值的为阴性。应注意的是, 式中0.05为该试剂盒的常数, 只适合于该特定条件下, 而不是对各种试剂均可通用。

根据以上叙述可以看出, 在这种方法中阴性对照和阳性对照也起到试验的质控作用, 试剂变质和操作不当均会产

生“试验无效”的后果。

b. 标本/阴性对照比值法

在实验条件（包括试剂）较难保证恒定的情况下，这种判断法较为合适。在得出标本（S）和阴性对照（N）的A值后，计算S/N值。也有写作P/N的，这里的P不代表阳性（positive），而是病人（patient）的缩写，不应误解。为避免混淆，更宜用S/N表示。在早期的间接法ELISA中，有些作者定出 $S/N \geq 2.1$ 为阳性标准，现多为各种测定所沿用。实际上每一测定系统应该用实验求出各自的S/N的阈值。更应注意的是，N所代表的阴性对照是不含受检物质的人血清。有的试剂盒中所设阴性对照为不含蛋白质或蛋白质含量较低的缓冲液，以致反应后产生的本底可能较正常人血清的本底低得多。因此，这类试剂盒规定，如 $N < 0.05$ （或其他数值），则按0.05计算，否则将出现假阳性结果。

（2）竞争法

在竞争法ELISA中，阴性孔呈色深于阳性孔。阴性呈色的强度取决于反应中酶结合物的浓度和加入竞争抑制物的量，一般调节阴性对照的吸光度在1.0~1.5之间，此时反应最为敏感。

竞争法ELISA不易用目视判断结果，因肉眼很难辨别弱阳性反应与阴性对照的显色差异，一般均用比色计测定，读出S、P和N的吸光值。计算方法主要也有两种，即阳性判定值法和抑制率法。

a. 阳性判定值法

与间接法和夹心法中的阳性判定值法基本相同，但在计算公式中引入阳性对照A值，现举某种检测抗HBc的试剂盒

为例。试剂盒中的阴性对照为不含抗HBc的复钙人血浆，阳性对照中抗HBc的含量为 $125 \pm 100 \text{ u/ml}$ 。每次试验设2个阳性对照和3个阴性对照。测得A值后，先计算阴性对照A值的平均值($NC_{\bar{x}}$)和阳性对照A值的平均数($PC_{\bar{x}}$)，两个平均数的差(N-P)必须大于一个特定的数值(例如0.300)，试验才有效。3个阴性对照A值均应小于2.000，而且应 $\geq 0.5 \times NC_{\bar{x}}$ 并 $\leq 1.5 \times NC_{\bar{x}}$ ，如其中之一超出此范围，则弃去，而以另2个阴性对照重新计算 $NC_{\bar{x}}$ ；如有2个阴性对照A值超出以上范围，则该次实验无效。阳性判定值按下式计算：

$$\text{阳性判定值} = 0.4 \times NC_{\bar{x}} + 0.6 \times PC_{\bar{x}}$$

标本A值 $\leq$ 阳性判定值的反应为阳性，A $>$ 阳性判定值的反应为阴性。

也有用阳性对照及阴性对照的平均值作为阳性判定值的，例如某检测抗HBe的试剂盒中阳性判定值按下式计算：

$$\text{阳性判定值} = (NC_{\bar{x}} + PC_{\bar{x}}) \div 2$$

b. 抑制率法

抑制率表示标本在竞争结合中标本对阴性反应显色的抑制程度，按下式计算：

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{阴性对照A值} - \text{标本A值}}{\text{阴性对照A值}} \times 100\%$$

一般规定抑制率 $\geq 50\%$ 为阳性， $< 50\%$ 为阴性。

4.7.2 定量测定

ELISA操作步骤复杂，影响反应因素较多，特别是固相载体的包被很难达到各个体之间的一致，因此在定量测定中，每批测试均须用一系列不同浓度的参考标准品在相同的条件下制作标准曲线。测定大分子量物质的夹心法ELISA，

标准曲线的范围一般较宽,曲线最高点的吸光度可接近2.0,绘制时常用半对数纸,以检测物的浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,将各浓度的值逐点连接,所得曲线一般呈S形,其头、尾部曲线趋于平坦,中央较呈直线的部分是最理想的检测区域。甲胎蛋白ELISA测定的标准曲线示例见图4-1。

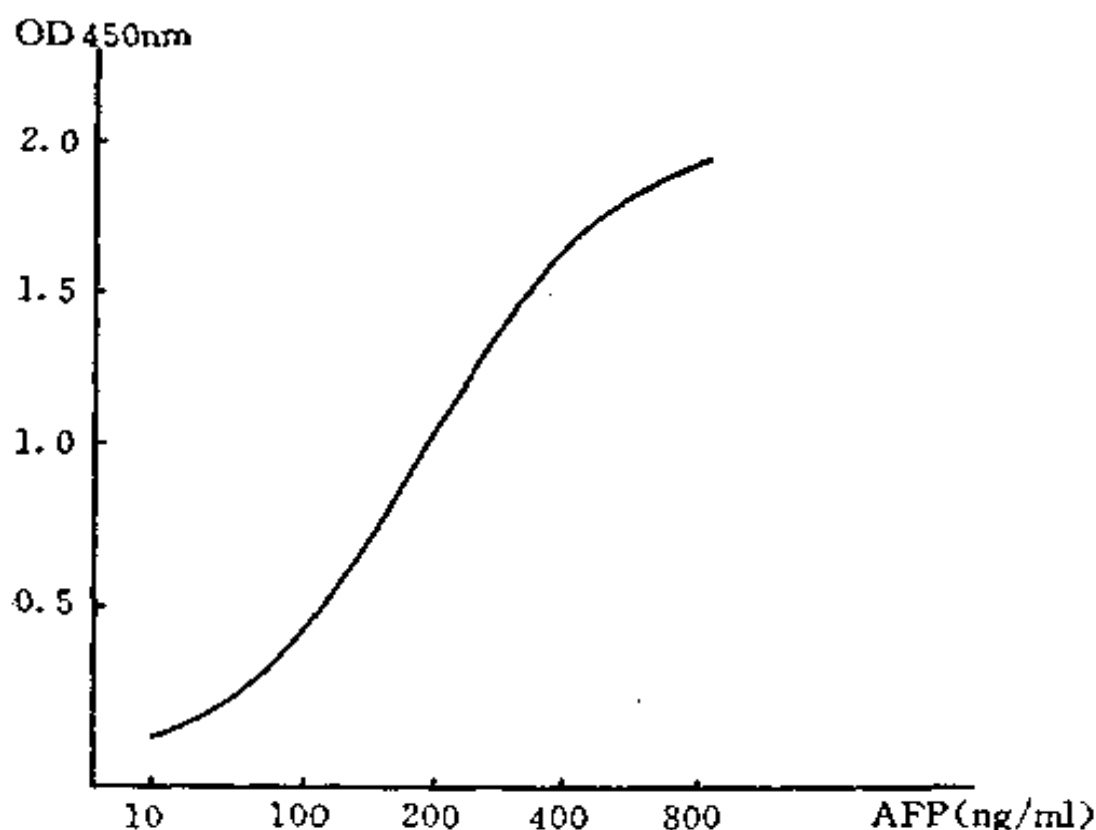


图4-1 甲胎蛋白ELISA测定的标准曲线示例

测定小分子量物质常用竞争法 (参见2.2.5), 其标准曲线中吸光度与受检物质的浓度呈负相关。标准曲线的形状因试剂盒所用模式的差别而略有不同。T₄ELISA测定的标准曲线示例见图4-2。注意图中横坐标为对数关系, 这更有利于测定系统的表达。

R446.61
ZHJ

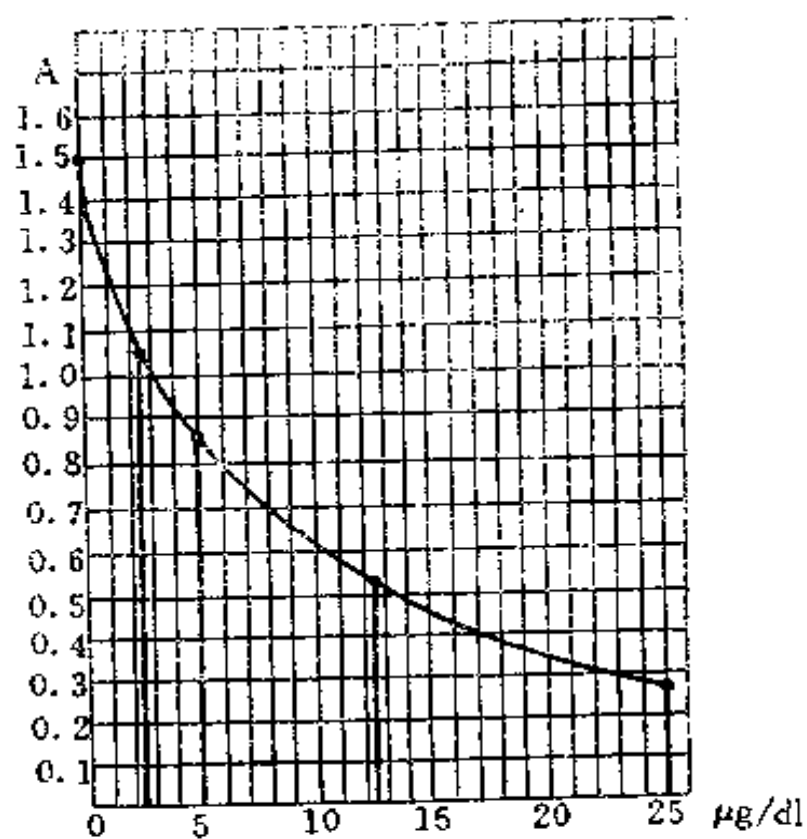


图4-2 T₄ELISA测定标准曲线示例

(韩 松)

5. 有关质量控制的问题

从1949年美国College of American Pathologists (简称CAP) 首先开始研究临床实验室室内质量控制(简称质控)问题, 美国学者Levey和Jenning于1950年发表第一篇关于使用质控图的实验室室内质控, 临床检验实验室的室内质控工作正式拉开序幕。

到70年代, 实验室质量控制进入一个新的阶段——全面质量管理, 推行Good Laboratory Practice(简称GLP)。进入80年代末期, GLP的统一标准产生了, 发展到“认证实验室”管理阶段。

全面质量管理的宗旨在于预防差错的产生。质控图的统计学质控的目的是检出差错。统计学的实验室室内质控是全面质量管理中的一个重要环节。

本章节主要介绍免疫学检验的统计学室内质控方法。因为ELISA是目前临床上最常用的一种免疫学检验方法, 就以ELISA检验为例, 介绍一下有关问题。

卫生部临床检验中心免疫质控室从1988年开始在全国范围内开展乙肝标志物检验的质量评价活动, 一直采用这一套质量评价方法, 并在实践中不断实践、提高和完善, 希望能找出一条适合中国国情的, 行之有效的质量管理的道路。

5.1 基本概念

5.1.1 质量控制(Quality Control, Q.C.)

质量控制是监视全过程，排除误差，防止变化，维持标准化现状的一个管理过程。这一过程是通过一个反馈环路进行的。

- (1) 确定控制对象；
- (2) 规定控制对象的标准(预期值)；
- (3) 制定或选择控制方法和手段；
- (4) 测量实际数据；
- (5) 比较或校对实际数据与预期值之间的差异，并说明产生这一差异的原因。超出预定误差范围，报警系统发出信号，反馈通道中断。
- (6) 采取行动，解决差异。恢复原状(原标准状态)的手段发挥作用。

质量控制主要采用质控图进行。质控图是把某一检验的性能数据与所计算出来的预期的“控制限”进行比较的图。这种性能数据是在按规程正常进行时，按时间顺序而抽选出来的，其目的是检测检验过程中变异的“可追查”性原因。

“可追查”性的误差原因，是指除去随机误差以外的其他原因。“控制限”是通过统计计算出来的。在后文我们将详细介绍(见5.3.室内质控程序)。

5.1.2 误差

实验误差分为三种：系统误差、随机误差和过失误差。

系统误差是指一系列测定结果与真值或靶值存在有同一

倾向的误差，有明显的规律性，可在一定条件下重复出现，是可以通过质控工作预防和校正的。

随机误差又称偶然误差，是一种偶然的、未能预料到的误差，是难以避免和校正的误差。检验工作中的随机误差的分布符合正态分布规律。

过失误差是人为的责任误差。通过加强实验室管理和开展质量控制工作是可以避免的。

5.1.3 正态分布及标准差

ELISA试验中，检验同一样本达20次以上时，就会发现这组数据(指测定结果的吸光值)分布在均值两侧，大部分集中在均值附近。如果以测定值为横坐标，以出现的频率为纵坐标作图，就可绘出一个呈钟形的曲线图。如图5-1，钟顶处为均值，其他值以均值为中心左右对称分布，这就是正态分布。

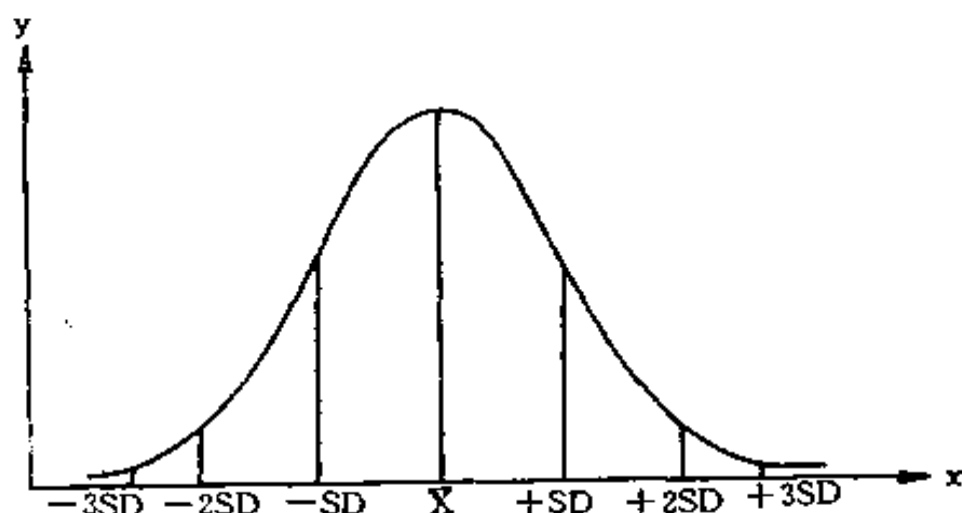


图5-1 正态分布图

正态曲线以下的面积称概率，常用样本的均数($\bar{x}$)和标

准差(SD)来表示, 其计算方法如下:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_n}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

均值、标准差和概率的关系如下:

$\bar{x} \pm 1SD$, 概率为0.68;

$\bar{x} \pm 2SD$, 概率为0.95;

$\bar{x} \pm 3SD$, 概率为0.99。

换言之, 当ELISA检测同一样本达一定次数后所得的一组数据, 其中靠近均值($\bar{x}$)的 $\pm 1SD$ 范围内的数据, 占该组数据的68%, 在 $\bar{x} \pm 2SD$ 范围内分布的数据占总体的95%, $\bar{x} \pm 3SD$ 范围内分布的数据占总体的99%。当我们要求检验结果在 $\bar{x} \pm 2SD$ 范围内为合格时, 将有95%的数据可能合格。

5.1.4 真值

用确切的、最理想的决定性方法测得的值, 称为真值。真值一般是测不到的。通过可靠的决定性方法测出的值, 称为靶值, 通常用靶值来表示真值的大小。

5.1.5 准确度(accuracy)

是指测定结果与真值(或靶值)接近的程度。准确度不能以数字表示, 往往用不准确度来衡量。测定结果与靶值的偏离程度称为偏差, 它表示该项检验的不准确度。

绝对偏差 = 检验的均值 - 真值(或靶值)

相对偏差 = 绝对偏差 ÷ 真值(或靶值) × 100%

5.1.6 精密度(precision)

是指对同一样本重复测定时,每次测定结果与平均值的接近程度,即重复测定值之间的符合程度。

5.1.7 标准品

(1) 国际标准品 由WHO或相应组织标定的,用肯定的、公认的、准确的物理或化学方法测定的定值材料。

(2) 国际生物学活性标准品 根据生物学反应由WHO或相应组织标定的国际活性单位的材料。

(3) 参考标准血清 国家标准化组织根据国际标准化生产的法定材料。可用于鉴定仪器和鉴定方法准确性。

5.1.8 临床决定性水平(clinical decision level)

当某个被测物的浓度达到某一水平时,临床医师必须采取医疗措施。被测物的这一浓度称为临床决定性水平。

5.2 质量控制血清

质控血清是已有靶值的血清,在每次的常规检验中加入一份或数份,通过所得结果来了解本次检验的情况。质控血清检验的结果如能控制其误差在一定范围内,就说明该检验没有发生不允许的误差。如果出现超过允许误差范围的异常结果,提示该检验不合格,应寻找原因,纠正后,重检待测标本。因此质控血清在质控工作中起重要作用。

5.2.1 质控血清的使用

卫生部临床检验中心制备的乙肝标志物质控血清,可以在 -20°C 保持半年定值不变。冰冻状态融化使用时,应先混匀,未用完部分可在 4°C 保存5天。不宜反复冻融或自行

分装。

开展某项检验的室内质控工作需要的质控血清，一般按3~6个月用量准备。自制的不定值质控血清，在—批质控血清将用完之前，需准备下一批质控血清。质控血清要求性能稳定，较长期内效价不变，其理化性质应与病人样本相近，这样才能有效地起到监测作用。

5.2.2 临界值质控血清

质控血清分定值和未定值两种。如只用一份质控血清定值，一般定在正常值与异常交界点上，定性测定时处于弱阳性水平，称为临界值。乙肝标志物临界值的制定，应按临床要求，为临床提供统一的判断弱阳性的标准。

临界值质控血清可以作为试剂盒中的阳性对照品和阴性对照品以外的第三个对照品，它可以灵敏地反映出试剂盒的检出水平，确保弱阳性反应的标本不漏检。

5.2.3 质控血清的制备

每个实验室可以根据自己的条件，选用临检中心提供的质控血清，或按以下方法自己制备本室使用的质控血清(以乙肝质控血清为例)。

(1) 收集新鲜的无溶血、无黄疸、无细菌污染的阳性血清。

(2) 56℃加热10小时灭活。

(3) 离心或过滤除去沉淀。

(4) 用10%的小牛血清或正常人血清(PBS缓冲液)将收集的血清稀释至所需的浓度。如能用正常的人血清稀释更好，因其成份更接近于检测标本。

(5) 抽滤除菌。按一次使用的量分装小安瓿，封口，

- 20℃保存备用。不可反复冻融。

被检物要求检出的水平常被认为是质控血清应选择的水准。如果该试验还有其他要求，则应加所要求浓度的质控物。

(6) 标定含量。20~30次测定结果删除 $> \pm 2SD$ 数据的均值作为靶值，并与已知定值血清对比测定。

5.3 室内质量控制程序

临床检验的检测结果，每次或每天之间不可能没有误差。决定允许的误差范围，以临床上不造成误诊与漏诊为准，通过以下步骤来确定质控范围。

(1) 最佳条件下的测定误差。

(2) 已知值的血清在常规检验条件下的误差。

(3) 未知值的血清在常规检验条件下的误差。

(4) 临床应用的要求。对任何一个试验都应确定一个允许的误差范围，前提是满足临床要求。如允许误差定得过小，在临床上不存在任何意义，但为了符合该规定却要花费很大人力、物力和时间。相反，如果将允许误差定得过大，将使监测系统察觉不到临床上要求检出的误差，失去质控的意义。

5.3.1 最佳条件下已知值质控血清变异 (optimal conditions variance, 简称OCV)的测定

在本实验室最佳条件下(包括操作者、试剂、仪器等)检测质控血清20~30次，将测得结果计算，求出该组数据的均值($\bar{x}$)和标准差(SD)表示该实验室的最佳工作质量。

现举例说明HBsAg ELISA法检测时OCV的测定。使用的质控血清为临界值血清，含HsBAg浓度为5ng/ml。在该实验室中选择素质最好、操作最熟练的技术员进行认真地专门测定，选用最佳的试剂盒，检测之前，将恒温箱、加样器等认真校正、调试，使用新的加样吸头等，即在最佳、最理想的条件下进行检测。除质控血清外同时测定阴性对照品和阳性对照品。并作双份测定，得出2个吸光值(A值)，求出 $\bar{x}_1$ 。连续作20次，求出20个 $\bar{x}$ ，即 $\bar{x}_1 \cdots \bar{x}_{20}$ 。从这20个数据中，求出OCV的 $\bar{x}$ 和SD。这组数据举例见表5-1。

5.3.2 常规条件下已知值质控血清变异(routine conditions variance-known value, 简称RCVK)的测定

做常规检验的技术人员，在常规检验的条件下，将质控血清放在常规检测样本中，进行20次检验，结果计算同OCV法。仍以HBsAg为例，检测5ng/ml的质控血清，结果和计算见表5-2。

这组数据中的SD值变异太大，SD为0.82已经3倍于OCV的SD 0.25。一般认为RCVK的SD在OCV的SD两倍范围内可以接受。若太大应该查找原因，使其向OCV的SD值靠近。

在改进实验条件后(例如校正加样器，纠正洗板操作，调正温育温度等)，重新进行RCVK的测定，其结果见表5-3。

通过这组数据可以看出，RCVK的SD值(0.29)有明显改善，已接近OCV的SD值(0.25)，符合要求。

如果RCVK的SD值比OCV的SD值更小，说明OCV

表5-1 HBsAg ELISA检测OCV数据计算示例

次数	质控血清 * 1 A值	阴性对照品 * 1 A值	cut-off值 阴性A值×2.1	S/CO * 2
1	0.180	0.050	0.105	1.71
2	0.190	0.050	0.105	1.81
3	0.180	0.050	0.105	1.71
4	0.185	0.050	0.105	1.76
5	0.195	0.050	0.105	1.86
6	0.205	0.050	0.105	1.95
7	0.215	0.050	0.105	2.05
8	0.170	0.050	0.105	1.62
9	0.473	0.100	0.210	2.25
10	0.140	0.050	0.105	1.33
11	0.215	0.050	0.105	2.05
12	0.205	0.050	0.105	1.95
13	0.180	0.050	0.105	1.71
14	0.170	0.050	0.105	1.62
15	0.116	0.050	0.105	1.10
16	0.185	0.050	0.105	1.76
17	0.205	0.050	0.105	1.95
18	0.170	0.050	0.105	1.62
19	0.190	0.050	0.105	1.81
20	0.200	0.050	0.105	1.90

* 1 表中所列A值为双份测定的均值。

* 2 S/CO, S为样本(或质控血清)A值 CO为cut-off值

S/CO ≥ 1.0, 样本判为阳性

S/CO < 1.0, 样本判为阴性

计算20个质控血清的S/CO值的均值($\bar{X}$),标准差(SD)和变异系数(CV),

$\bar{X} = 1.78$ SD = 0.25 CV = 14.3%

从而获得该实验室OCV测定数据

表5-2 RCVK数据计算示例

次数	质控血清 A值	阴性对照 A值	cut-off值 阴性A值 $\times 2.1$	S/CO
1	0.250	0.050	0.105	2.38
2	0.180	0.050	0.105	1.71
3	0.290	0.050	0.105	2.76
4	0.310	0.050	0.105	2.95
5	0.160	0.070	0.147	1.09
6	0.150	0.080	0.168	0.89
7	0.270	0.050	0.105	2.57
8	0.400	0.100	0.210	1.90
9	0.270	0.120	0.252	1.07
10	0.100	0.090	0.189	0.53
11	0.353	0.050	0.105	3.36
12	0.160	0.070	0.147	1.09
13	0.110	0.040	0.084	1.31
14	0.120	0.030	0.063	1.90
15	0.270	0.120	0.252	1.07
16	0.350	0.110	0.231	1.52
17	0.220	0.090	0.189	1.16
18	0.370	0.100	0.210	0.33
19	0.500	0.150	0.315	1.59
20	0.410	0.090	0.189	2.17

计算S/CO值的均值($\bar{X}$)，标准差(SD)和变异系数(CV)：

$$\bar{X} = 1.67$$

$$SD = 0.82 \quad CV = 49.1\%$$

本组RCVK数3倍于OCV数值，不予接受

表5-3 改进试验室条件后的RCVK数据计算示例

次数	质控血清 A值	阴性对照 A值	cut-off值 阴性A值×2.1	S/CO
1	0.180	0.050	0.105	1.71
2	0.130	0.050	0.105	1.81
3	0.200	0.050	0.105	1.90
4	0.228	0.060	0.126	1.81
5	0.137	0.060	0.126	1.09
6	0.221	0.050	0.105	2.10
7	0.150	0.050	0.105	1.43
8	0.170	0.050	0.105	1.62
9	0.180	0.040	0.084	2.14
10	0.150	0.050	0.105	1.43
11	0.200	0.050	0.105	1.90
12	0.142	0.050	0.105	1.35
13	0.210	0.050	0.105	2.00
14	0.221	0.050	0.105	1.52
15	0.180	0.050	0.105	1.71
16	0.190	0.050	0.105	1.81
17	0.160	0.050	0.105	1.52
18	0.221	0.050	0.105	2.10
19	0.210	0.050	0.105	2.00
20	0.150	0.050	0.105	1.43

计算S/CO值的均值($\bar{X}$), 标准差(SD)和变异系数(CV):

$$\bar{X} = 1.72$$

$$SD = 0.29 \quad CV = 16.9\%$$

改进后RCVK数据接近于OCV数值, 可以接受

不是最佳条件下测定的, 应重新再测OCV。

常规条件下, 由于工作量大, 操作者技术不熟练, 或者更换人员, RCVK肯定要比OCV大。通过质控控制各项条

件，使RCVK的数据尽可能接近OCV值。RCVK的数据反映该实验室日常工作的质量，用于作质控图，对室内检验的结果进行控制，判定每日检验的结果，报告能否发出。

5.3.3 常规条件下，未知值质控血清变异(routine conditions variancel-unknown value, 简称RCVU)的测定

有时为了避免主观性，再作RCVU测定。

测定步骤同RCVK，但检测的操作者不知质控血清的定值，或在操作者不知哪一份是质控血清的条件下进行常规检验，以排除操作者的主观性。在此不再举例说明。

5.3.4 质控图

通过以上三步骤，可以开始作室内质控图，根据表5-3 RCVK的 $\bar{x}$ 和SD作质控框架图，见图5-2。

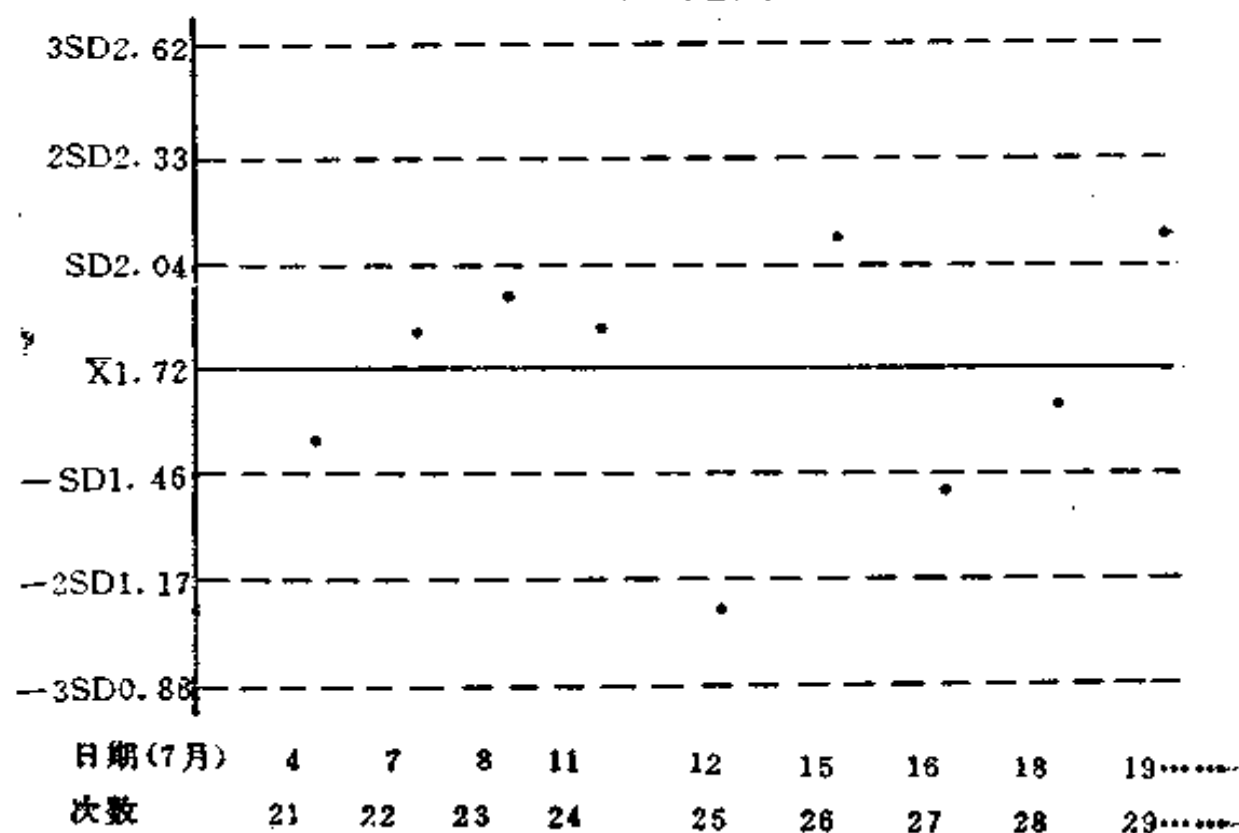


图5-2 室内质控图示例

利用质控图可以对每次检验的结果进行监测，举例见表5-4，并将表每次检验S/CO值点入质控图中。(见图5-2)。

表5-4 常规条件下质控血清检验数值举例

次数	日期 (月、日)	质控血清 A值	阴性对照 A值	cut-off值 阴性A值 $\times 2.1$	S/CO
21	7.4	0.160	0.050	0.105	1.52
22	7.7	0.190	0.050	0.105	1.81
23	7.8	0.200	0.050	0.105	1.90
24	7.11	0.228	0.060	0.126	1.81
25	7.12	0.139	0.060	0.126	1.10
26	7.15	0.221	0.050	0.105	2.10
27	7.16	0.150	0.050	0.105	1.43
28	7.18	0.170	0.050	0.105	1.62
29	7.19	0.225	0.050	0.105	2.14
.					.
.					.
.					.

当没有更换另一批号试剂盒和另一批号质控血清时，该质控图可以连续作下去。

从图5-2可以看出，第25次检测(7.12)质控血清的S/CO值低于 $-2SD$ 的范围，属“告警”，应寻找原因并在质控图上记录查出的原因。

ELISA试验中，各种检验项目的误差允许范围均有待在实践中得出结论，以上只是举例说明质控方法，不是定

论。2SD是一般公认的允许误差限度。每批测定放一份质控血清时，一次超出2SD应作为“告警”，二次超出2SD为“失控”。当质控过程中，出现失控时，应查找原因，通常是试剂盒或质控血清失效造成。更换试剂盒或更换质控血清，找出原因纠正后重新检验。如果检验结果仍不达要求或找不到原因时，应重复进行OCV的检验。如果OCV检验的结果仍是好的，说明常规操作出现问题。一般认为：①一次超出3SD；②连续二次超出2SD；③3~5次连续处于一侧的2SD之内；④5~7次连续偏向横轴的一侧，均为失控。第③、④种情况，单独依靠记录往往是不易察觉的，但在质控图上可以清晰地发现这种失控。

5.3.5 统计学计算方法——“即刻性”质控

以上介绍的质控方法基本上与临床化学测定的质控方法相同，但ELISA有其特殊性，最合适的质控方法尚待研究建立。有些实验室不是每天进行ELISA项目的检验，而ELISA试剂盒效期短，用一批号试剂盒连续常规测20次，难度较大。采用“即刻法”质控统计方法，只需连续测3次，即可对第3次检验结果进行质控。

“即刻法”的建立参见《中华医学检验杂志》1992年15卷1期37页，具体计算方法如下：

(1) 先将测定值从小到大排列

$$x_1, x_2, x_3 \cdots \cdots x_n$$

(x_1 为最小值， x_n 为最大值)

(2) 计算 $\bar{x}$ 和SD。

(3) 计算SDI上限值和SDI下限值。

$$SDI_{\text{上限}} = \frac{\bar{X}_{\text{最大值}} - \bar{X}}{SD}$$

$$SDI_{\text{下限}} = \frac{\bar{X} - \bar{X}_{\text{最小值}}}{SD}$$

(4) 将 $SDI_{\text{上限}}$ 、 $SDI_{\text{下限}}$ 值与 SDI 值表(表5-5)中的数字比较。

表5-5 SDI 值表

n	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n_{3SD}	1.15	1.49	1.75	1.94	2.10	2.22	2.32	2.41	2.48
n_{2SD}	1.15	1.46	1.67	1.82	1.94	2.03	2.11	2.18	2.23
n	12	13	14	15	16	17	18	19	20
n_{3SD}	2.65	2.61	2.66	2.71	2.75	2.79	2.82	2.85	2.88
n_{2SD}	2.29	2.33	2.37	2.41	2.44	2.47	2.50	2.53	2.56

当 $SDI_{\text{上限}}$ 值和 $SDI_{\text{下限}}$ 值 $< n_{2SD}$ 时,表示处于控制范围内,可以继续往下测定,继续重复以上各项计算;当 $SDI_{\text{上限}}$ 和 $SDI_{\text{下限}}$ 有一值处于 n_{2SD} 和 n_{3SD} 值之间时,说明该值在 $2SD \sim 3SD$ 范围,处于“告警”状态;当 $SDI_{\text{上限}}$ 和 $SDI_{\text{下限}}$ 有一值 $> n_{3SD}$ 值时,说明该值已在 $3SD$ 范围之外,属“失控”。数值处于“告警”和“失控”状态应舍去,重新测定该项质控血清和病人样本。舍去的只是失控的这次数值,其他次测定值仍可继续使用。

现举例说明，以常规检验(表5-3、5-4)的一组数据为例，列出S/CO值表(见表5-6)。试进行即刻法计算。

表5-6 20次质控血清检测S/CO值表

次 数	1	2	3	4	5	6	7
S/CO值	1.71	1.81	1.90	1.81	1.09	2.10	1.43
次 数	8	9	10	11	12	13	14
S/CO值	1.62	2.14	1.43	1.90	1.35	2.00	1.52
次 数	15	16	17	18	19	20	21
S/CO值	1.71	1.81	1.52	2.10	2.00	1.43	1.52

在第三次测定后按即刻法计算：

$n = 3$ ，三次S/CO值从小到大排列为：

1.71 1.81 1.90

求出 $\bar{X} = 1.81$ ， $SD = 0.10$

$$\text{计算： } SDI_{\text{下限}} = \frac{1.81 - 1.71}{0.1} = 1.0$$

$$SDI_{\text{上限}} = \frac{1.90 - 1.81}{0.1} = 0.9$$

查SDI值表： $n = 3$ 时， $n_{2SD} = 1.15$ ， $n_{3SD} = 1.15$ ， $SDI_{\text{上限}}$ 、 $SDI_{\text{下限}}$ 均小于 n_{2SD} 、 n_{3SD} ，因此该三次检测数据在控制范围内。

在第4次测定后，按上法计算：

$n = 4$

1.71 1.81 1.81 1.90

✓ $\bar{X} = 1.81$ ， $SD = 0.08$

$$SDI_{\text{下限}} = - \frac{1.81 - 1.71}{0.08} = 1.25$$

$$SDI_{\text{上限}} = \frac{1.90 - 1.81}{0.08} = 1.13$$

查SDI值表：n = 4时， $n_{2SD} = 1.46$ ， $n_{3SD} = 1.49$ 。 $SDI_{\text{上限}}$ 、 $SDI_{\text{下限}}$ 均小于 n_{2SD} 、 n_{3SD} ，数据在控制范围内。

在第5次测定后，按上法计算：

$$n = 5$$

$$1.09 \quad 1.71 \quad 1.81 \quad 1.81 \quad 1.90$$

$$\bar{X} = 1.66, SD = 0.33$$

$$SDI_{\text{下限}} = \frac{1.66 - 1.09}{0.33} = 1.73$$

$$SDI_{\text{上限}} = \frac{1.90 - 1.66}{0.33} = 0.73$$

查SDI值表：n = 5时， $n_{2SD} = 1.67$ ， $n_{3SD} = 1.75$ ， $n_{2SD}(1.67) < SDI_{\text{下限}}(1.73) < n_{3SD}(1.75)$ 。 $SDI_{\text{下限}}$ 值在 n_{2SD} 和 n_{3SD} 之间，说明该值在2SD~3SD范围，同时表示该数据是在下限(-2SD)之外，处于“告警”状态，本次数据弃去。

第6次检测，n仍为5进行计算：

$$n = 5$$

$$1.71 \quad 1.81 \quad 1.81 \quad 1.90 \quad 2.10$$

$$\bar{X} = 1.87, SD = 0.15$$

$$SDI_{\text{下限}} = \frac{1.87 - 1.71}{0.15} = 1.07$$

$$SDI_{\text{上限}} = \frac{2.10 - 1.87}{0.15} = 1.53$$

查表： $n_{2SD} = 1.67$ ， $n_{3SD} = 1.75$ ， $SDI_{\text{上限}}$ 、 $SDI_{\text{下限}}$ 均小于 n_{2SD} 、 n_{3SD} ，数据在控制范围内，……继续检测并计算。

当测定达到21次时，因舍去一个数据(第5个)， $n = 20$ ，排序如下：

1.35 1.43 1.43 1.43 1.52 1.52 1.62 1.71 1.71 1.81
1.81 1.81 1.90 1.90 1.90 2.00 2.00 2.10 2.10 2.14

$\bar{X} = 1.76$, $SD = 0.25$

$$SDI_{\text{下限}} = \frac{1.76 - 1.35}{0.25} = 1.64$$

$$SDI_{\text{上限}} = \frac{2.14 - 1.76}{0.25} = 1.52$$

查表： $n_{2SD} = 2.56$ ， $n_{3SD} = 2.88$ ， $SDI_{\text{上限}}$ 、 $SDI_{\text{下限}}$ 均小于 n_{2SD} 、

n_{3SD} ，数据在控制范围内。用20次数据的 $\bar{X}$ 和SD值($\bar{X} = 1.76$ ， $SD = 0.25$)作质控框架图。以后的检测数据不再计算，转用质控图。

从以上实例可看出，通过“即刻法”统计计算的 $\bar{X}$ 、SD值与前面介绍的测20次求 $\bar{X}$ 、SD是十分接近的。

即刻性质控统计方法，适于ELISA测定的质控。

当检测的数值超过20次以后，不必再使用“即刻法”质控统计计算，可以转入常规的质控图的质控。将前20次的数值求出的 $\bar{X}$ 和SD作质控框架图，第21次的数值，依次点入即可。

5.4 室间质量评价(external quality assessment, 简称EQA)

室间质量评价简称室间质评，是由质控中心采用一系列的办法连续地、客观地评价各实验室的试验结果，并发现室内质控不易发现的不准确性，了解各实验室之间结果的差异，并帮助校正，使具有可比性。各实验室试验结果报到质控中心，经过统计分析，得出相互比较的结果。这种评价不

能控制各实验室每天发出的检验报告，而是一种回顾性评价。室内质控主要监测试验结果的精密度，而室间质评主要控制试验结果的准确度，不能互相替代。参与质评的实验室应先做好室内质控。

5.4.1 室间质评的方法

(1) 发质控物进行调查

这是国内外室间质评的常用形式。部临检中心对乙肝标志物ELISA检验的室间质评采用定期发放质控物至各实验室，各实验室在规定的日期进行检验，并将检验结果报至部临检中心。部临检中心经统计分析，将评价结果寄回各实验室。通过评价，各实验室了解本室工作质量，发现差距，并设法改进，以不断提高检验质量。

这种评价方式有一定缺点，即各实验室常对质控物特殊对待，在检验时选用特殊试剂盒，选派特别的技术员进行检验，有的实验室互相核对结果并做修改。这就使EQA的结果不能反映该实验室日常工作水平。

(2) 派观察员到实验室进行实际调查

这种调查事先不通知，临时派观察员到实验室，指定采用常规方法，检验规定的一组标本，进行评价。

这种调查方式，容易发现该实验室存在的实际问题，可以直接给予指导和帮助，解决问题，提高检验质量。这种调查通常可以使用真实样本，避免采用质控物的一些缺点。实例可参见《中国输血杂志》1993年第1期40页“对15个血站HBsAg检验质量的调查”一文。

5.4.2 室间质评的组织形式

(1) 卫生部临床检验中心与各省、市、区临检中心互相

配合，对全国医院和血站实行分级管理，使全国的各级医院和血站都能参加入这个质控网络之中，共同提高。

(2) 另外，也将试剂生产单位结合入该质控网络中。ELISA试剂盒的质量直接影响各实验室检验水平。试剂生产单位的参与，可将临床实验室在质控中反映出试剂盒质量的问题反馈回试剂生产单位，使试剂质量同步提高。

(3) 举办学习班、学术会议，进行培训和交流。

(4) 编写有关质控的讲义和手册，为技术人员提供学习的资料。

5.4.3 室间质评成绩计算方法

以HBsAg的检测为例，卫生部临床检验中心一批寄发5支质控血清，其中有的为HBsAg阳性，有的为HBsAg阴性。实验室寄回的检验结果与预期结果比较，完全一致的得10分，一份错误扣2分，总计得出该实验室的得分。从全部参与者的得分中，求出该批全国的平均分($\bar{x}$)和标准差(SD)。再通过公式，计算出每一实验室的得分比值。

$$\text{实验室得分比值} = \frac{\text{实验室得分} - \text{全国平均分}(\bar{x})}{\text{全国平均分的标准差}(SD)} \quad (SDI)$$

如该实验室的得分大于全国平均分，则为正值，说明居于全国平均水平之上；相反，为负值者，说明居全国平均水平之下。

得分比值的大小表示该实验室的成绩居于全国平均成绩的SD段范围。得分比值为0.1~0.9，说明居于全国平均水平之上，且在1SD范围内；得分比值为1.1~1.9，说明居全国平均水平之上，处于1SD~2SD段范围内。得分比值数越

大，成绩越好；得分比值如为负值，数值越大，成绩越差。

以上是HBsAg ELISA检测的EQA评分办法，这是一种报告阴性和阳性检验结果的类型。

另一种ELISA的结果是以定量数字表示，如甲胎蛋白、IgE等的ELISA测定。这种检验结果的评分方法基本上与上述定性检测相同，主要区别在于将各实验室的测定值与全国预期值 $\bar{x}$ 和SD相比较，求SDI。每份标本的预期结果，即 $\bar{x}$ ，是根据参考实验室检验结果计算出来的。

$$\text{实验室SDI} = \frac{|\text{该室测定值} - \text{全国预期值}(\bar{x})|}{\text{全国预期值的标准差}}$$

SDI表示该实验室测定值与靶值的距离。SDI值越小，就越靠近靶值，说明该实验室成绩越好。一般认为实验室SDI<2.0为合格。SDI值无正负之分。

(郑怀竞)

6. ELISA试剂的临床质量评价

ELISA试剂的评价(evaluation)分两个方面:一是试剂本身的质量评价,符合一定要求后才能生产供应;一是在临床应用中效果的评价。以肝炎ELISA诊断试剂为例,首先必须通过中国药品生物制品检定所的检定,以得到生产的许可。检定内容除包装、标签、说明书等外,对试剂的性能,如特异性、灵敏度、精密度和线性等均需逐项检定,通过对一系列参比品的检测,结果符合要求者为合格。ELISA试剂的临床质量评价是用该试剂对临床样本进行检测,以观察其实际应用价值。部临检中心对乙肝ELISA诊断试剂在这方面进行了工作,通过质量评价,促进了试剂质量的提高。

6.1 诊断试剂临床质量评价要点

从临床应用角度考核检验试剂的可靠性,是以其能否区分健康与疾病的能力作为依据的。目前还很难找到100%可靠的试验,任何试验都会出现假阳性或假阴性。判断试验的可靠性常以其灵敏度及特异性作为考核标准。临床应用的灵敏度用疾病患者试验阳性的百分率表示,特异性以无病者试验阴性的百分率表示。

进行这种评价,首先需要收集有关的病人血清,然后用公认的检测该项标志物最可靠的试剂进行测定,以确定其为

阳性或阴性。

这一组标明测定物为阳性或阴性的血清组成“血清盘”(panel)。被评价的试剂测定此血清盘所得结果与血清盘标明的结果的关系如下表:

表6-1 试剂评价关系表

		血 清 盘 结 果		
		+	-	合 计
受检试剂	+	a	b	a + b
结 果	-	c	d	c + d
合 计		a + c	b + d	a + b + c + d

表中a为真阳性, b为假阳性, c为假阴性, d为真阴性。
被评价试剂的各项性能指标按以下公式计算:

$$\text{灵敏度}(\%) = \frac{a}{a + c} \times 100\%$$

$$\text{特异性}(\%) = \frac{d}{b + d} \times 100\%$$

$$\text{符合率}(\%) = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100\%$$

一般认为灵敏度或特异性 $>90\%$ 为良好。符合率是综合灵敏度和特异性的指标。

举例说明如下:

HBsAg的血清盘共有200份血清,其中HBsAg(+)106份,HBsAg(-)94份,用某HBsAg ELISA试剂测定结果如下表:

表6-2 某HBsAg试剂评价表

血 清 盘 结 果				
		+	-	合 计
受检试剂	+	105	3	108
结 果	-	1	91	92
合 计		106	94	200

$$\text{灵敏度}(\%) = \frac{105}{106} \times 100\% = 99.06\%$$

$$\text{特异性}(\%) = \frac{91}{94} \times 100\% = 96.81\%$$

$$\text{符合率}(\%) = \frac{196}{200} \times 100\% = 98.00\%$$

结论: 该批试剂盒临床使用质量优秀。

6.2 临床考核血清盘的制备要求

- (1) 采用人的原血清;
- (2) 血清盘应具有相应的稳定性;
- (3) 血清盘中样本不含防腐剂, 或只含极微量的、不影

响检验结果的防腐剂;

(4) 血清盘中所包含的阴性样本和阳性样本数约各占一半;

(5) 阳性样本中,应有一定数量的强阳性和弱阳性样本;

(6) 血清盘中应有一定数量的临界值上、下含量的样品,以检验试剂的灵敏度。

(7) 血清盘中应包含与该项检验相关的病种样本和已知具有干扰物质(RF因子)的样本,以检验试剂的特异性。

6.3 临床考核血清盘的建立

以抗-HBc-IgM为例,部临检中心收集近百例临床肝炎病人的样本,经美国abbott公司抗-HBc-IgM试剂反复检验筛选。选出血清70份,其中阳性29份,阴性41份,组成抗-HBc-IgM临床考核血清盘。在70份样本中,除7份为无病史的质控血清外,抗-HBc-IgM阳性的22份样本中含临床诊断急性肝炎16例、慢性活动性肝炎5例、重症肝炎1例;抗HBcIgM阴性的40份样本中,含临床诊断慢性迁延性肝炎24例、急性肝炎8例(均为恢复期采的血样)、慢性活动性肝炎8例(其中5例为恢复期血样)。

因此,这套抗-HBc-IgM血清盘用于商品试剂的临床考核,可以将临床上乙肝急性期、慢性活动期病人与慢性期病人区分开,具有临床诊断意义。

卫生部临床检验中心于1993年3月20日使用该血清盘检验国内14家抗-HBc-IgM ELISA试剂产品,结果见表6-3。

表6-3 抗-HBc-IgM试剂评价表 (1983年)

批号: 931

项目名称: 抗-HBc-IgM

日期: 03/20/93

厂家 编号*	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) a/(a+c)	特异性(%) d/(b+d)	符合率(%) (a+d)/(a+b+c+d)
01	27	0	1	41	96.43	100.00	98.55
03	28	0	1	41	98.55	100.00	98.57
04	29	0	0	41	100.00	100.00	100.00
07	29	4	0	37	100.00	90.24	94.29
08	29	0	0	41	100.00	100.00	100.00
11	26	0	3	41	89.66	100.00	95.71
12	28	0	1	41	96.55	100.00	98.57
18	29	0	0	41	100.00	100.00	100.00
26	28	0	0	41	100.00	100.00	100.00
35	27	2	2	39	93.10	95.12	94.29
39	27	6	1	31	96.43	83.78	89.23
61	21	2	6	39	77.78	95.12	83.24
64	28	0	0	41	100.00	100.00	100.00
65	29	0	0	41	100.00	100.00	100.00

* 厂家编号: 卫生部临床检验中心将国内生产乙型肝炎试剂的厂家按序列编号,

表内号是接受抗-HBc-IgM血清盘作临床考核的厂家号。

6.4 对乙肝ELISA诊断试剂的临床质量评价

卫生部临床检验中心从1989年起采用临床考核血清盘，定期对国内生产的HBsAg、抗HBs、HBeAg、抗HBe和抗HBc五项乙肝标志物ELISA诊断试剂进行检评。表6-7~6-16为以上各标志物试剂1991年和1993年的评价结果，从中可以看出试剂质量的进步。

以HBsAg检测试剂为例(表6-4、6-5)，从血清盘的检测难度来看，1993年的血清盘比1991年的血清盘血清样本数量多、难度大。一般认为符合率 $\geq 90\%$ 为合格，1991年厂家的灵敏度不合格者较多，1993年则减少许多，说明商品试剂通过临床考核不断改进。再从个别厂家的结果来看，16号厂家，1991年HBsAg的灵敏度仅为50%，特异性89%，经改进后，1993年灵敏度为98.5%，特异性97.62%；与Abbott试剂的符合率从1991年的83%改进到1993年的98.16%。31号厂家类似，1991年灵敏度为95%，特异性87%，符合率为88%；1993年灵敏度94.74%，特异性96.43%，符合率为95.39%。但13号则在调整中出现問題，1991年灵敏度为76%，特异性100%，符合率97%；1993年灵敏度提高至96.99%，但特异性下降至70.73%，符合率也由97%降至86.98%。因此，临床考核既可观察到产品的应用质量，厂家也可以从中取得改进的依据。

其余各项标志物试剂的检测结果情况类似，不再列举，可以从各表中看出两年的进步程度。

表6-4 HBsAg试剂评价表(1991)年

批号: 911

项目名称: HBsAg

日期: 08/91

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) $a/(a+c)$	特异性(%) $d/(b+d)$	符合率(%) $(a+d)/(a+b+c+d)$
01	21	6	1	116	95	95	95
03	21	1	1	120	95	99	99
04	19	5	3	117	86	96	94
06	17	1	5	120	77	99	96
07	17	4	4	117	81	97	94
08	21	2	1	120	95	98	98
09	18	2	4	120	82	98	96
12	19	5	3	117	86	96	94
13	16	0	5	122	76	100	97
14	14	2	6	113	70	98	94
16	11	14	11	108	50	89	83
18	19	2	3	120	86	98	97
29	12	1	10	120	55	99	92
30	21	4	1	118	95	97	97
31	19	16	1	104	95	87	88
34	15	7	7	115	68	94	90
35	20	4	2	118	91	97	96

表6-5 HBsAg试剂评价表(1993年)

批号: 931

项目名称: HBsAg

日期: 05/93

厂家	真阳性	假阳性	假阴性	真阴性	灵敏度(%)	特异性(%)	符合率(%)
编号	a	b	c	d	a/(a+c)	d/(b+d)	(a+d)/(a+b+c+d)
01	130	3	3	81	97.74	96.43	97.24
03	129	3	4	81	96.99	96.43	96.77
04	130	2	3	82	97.74	97.62	97.70
06	129	6	4	78	96.99	92.86	95.39
07	131	3	2	81	98.50	96.43	97.70
08	130	1	3	83	97.74	98.81	98.16
09	123	4	9	80	93.18	95.24	93.98
12	132	11	1	73	99.25	86.90	94.47
13	129	24	2	58	96.99	70.73	86.98
14	130	3	3	81	97.74	96.43	97.24
16	131	2	2	82	98.50	97.62	98.16
18	130	2	3	82	97.74	97.62	97.70
29	118	7	1	69	93.16	90.79	95.90
30	130	0	3	83	97.74	100.00	98.61
31	126	3	7	81	94.74	96.43	95.32
34	132	5	1	76	99.25	93.75	97.18
35	130	7	3	76	97.74	91.57	95.37

表6-6 抗HBs试剂评价表(1991)年

批号: 911

项目名称: 抗HBs

日期: 08/91

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) $a/(a+c)$	特异性(%) $d/(b+d)$	符合率(%) $(a+d)/(a+b+c+d)$
01	50	0	13	81	79	100	91
03	61	4	1	77	98	95	97
04	54	2	9	79	86	98	92
06	34	1	20	80	63	99	84
07	59	7	1	67	98	91	94
08	53	0	10	81	84	100	93
09	53	0	10	81	84	100	93
12	62	4	1	77	98	95	97
16	60	2	3	79	95	98	97
18	56	3	7	78	89	96	93
30	38	0	20	30	66	100	86
34	62	18	1	62	98	78	87
35	56	4	7	77	89	95	92

表6-7 抗HBs试剂评价表(1993年)

批号: 931

项目名称: 抗HBs

日期: 95/33

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) $a/(a+c)$	特异性(%) $d/(b+d)$	符合率(%) $(a+d)/(a+b+c+d)$
01	37	0	5	181	88.10	100.00	97.76
03	41	2	1	179	97.62	98.90	98.65
04	39	1	3	180	92.86	99.45	98.21
06	27	0	15	181	64.29	100.00	93.27
07	41	2	1	178	97.62	98.89	98.65
08	42	5	0	176	100.00	97.24	97.76
09	21	5	21	176	50.00	97.24	88.34
12	41	8	1	173	97.62	95.58	95.93
16	42	0	0	181	100.00	100.00	100.00
18	42	4	0	177	100.00	97.79	98.21
30	35	5	3	175	92.11	97.22	96.33
34	42	6	0	171	100.00	96.61	97.26
35	40	3	2	178	95.24	98.34	97.76

表6-8 HBeAg试剂评价表(1991年)

批号: 911

项目名称: HBeAg

日期: 03/91

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) $a/(a+c)$	特异性(%) $d/(b+d)$	符合率(%) $(a+d)/(a+b+c+d)$
01	6	0	3	136	67	100	98
03	5	0	4	136	56	100	97
04	6	0	3	136	67	100	98
06	6	3	3	133	67	98	96
07	2	2	7	134	22	99	94
08	5	6	4	130	56	96	93
09	6	6	4	130	67	96	94
12	6	14	3	122	67	90	88
16	6	7	3	129	67	95	93
18	6	5	3	131	67	96	94
30	4	2	3	139	57	99	96
34	5	0	4	136	56	100	97
35	6	8	3	125	67	94	92

表6-9 HBeAg试剂评价表(1993年)

日期: 05/93

项目名称: HBeAg

批号: 931

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) a/(a+c)	特异性(%) d/(b+d)	符合率(%) (a+d)/(a+b+c+d)
01	103	0	3	118	97.17	100.00	98.66
02	98	0	8	118	92.45	100.00	96.43
04	106	2	0	116	100.00	93.31	99.11
05	103	1	3	117	97.17	99.15	98.21
07	99	0	7	117	93.40	100.00	96.88
08	102	0	4	118	96.23	100.00	98.21
09	104	4	2	114	98.11	96.61	97.32
12	99	2	7	116	93.40	98.31	95.98
16	102	0	3	115	97.14	100.00	98.64
18	102	2	4	116	96.23	98.31	97.32
30	103	1	2	117	98.10	99.15	98.65
34	100	0	6	118	94.34	100.00	97.32
35	100	8	5	109	94.34	93.16	93.72

表6-10 抗HBc试剂评价表(1991年)

批号: 911

项目名称: 抗HBc

日期: 02/91

厂家	真阳性	假阳性	假阴性	真阴性	灵敏度(%)	特异性(%)	符合率(%)
编号	a	b	c	d	$a/(a+c)$	$d/(b+d)$	$(a+d)/(a+b+c+d)$
01	28	7	2	109	93	94	94
03	29	18	1	97	97	84	87
04	29	8	1	108	97	93	94
06	24	1	5	115	83	99	96
07	26	5	2	108	93	96	95
08	25	2	5	114	83	98	95
09	24	1	6	113	80	99	95
12	22	10	8	106	73	91	88
16	27	6	3	110	90	95	94
18	18	4	12	112	60	97	89
30	7	1	19	112	27	99	86
34	17	2	13	114	57	98	90
35	28	7	2	109	93	94	94

表6-11 抗HBe试剂评价表(1993年)

批号: 931

项目名称: 抗HBe

日期: 05/93

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) $a/(a+c)$	特异性(%) $d/(b+d)$	符合率(%) $(a+d)/(a+b+c+d)$
01	21	0	21	179	50.00	100.00	90.50
03	33	0	9	178	78.57	100.00	95.91
04	36	0	5	179	87.80	100.00	97.73
06	29	0	13	179	69.05	100.00	94.12
07	38	1	4	178	90.48	99.44	97.74
08	40	1	2	178	95.24	99.44	98.64
09	31	0	10	179	75.61	100.00	95.45
12	40	5	2	174	95.24	97.21	96.83
16	36	1	6	177	85.71	99.44	96.82
18	29	3	13	176	69.05	98.32	92.76
30	26	0	13	179	66.67	100.00	94.04
34	37	4	5	173	88.10	97.74	95.89
35	31	4	11	174	73.81	97.75	93.18

表6-12 抗HBc试剂评价表(1991年)

批号: 911

项目名称: 抗HBc

日期: 08/91

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) $a/(a+c)$	特异性(%) $d/(b+d)$	符合率(%) $(a+d)/(a+b+c+d)$
01	59	8	8	72	88	90	89
03	66	34	1	46	99	57	76
04	62	13	5	66	93	84	88
06	64	8	1	67	98	89	94
07	46	6	15	72	75	92	85
08	67	36	0	44	100	55	76
09	67	54	0	26	100	33	63
12	56	8	9	72	87	90	88
16	65	11	2	69	97	86	91
18	45	17	22	63	82	79	73
30	62	7	5	69	93	91	92
34	61	6	6	74	91	93	92
35	65	20	2	60	97	75	85

表6-13 抗HBc试剂评价表(1993年)

批号: 931

项目名称: 抗HBc

日期: 05/93

厂家 编号	真阳性 a	假阳性 b	假阴性 c	真阴性 d	灵敏度(%) $a/(a+c)$	特异性(%) $d/(b+d)$	符合率(%) $(a+d)/(a+b+c+d)$
01	167	18	1	39	99.40	68.42	91.56
03	158	2	7	55	95.76	96.49	95.95
04	164	4	3	53	98.20	92.98	96.88
06	162	7	6	50	96.43	87.72	94.22
07	166	5	2	52	98.81	91.23	96.89
08	168	3	0	54	100.00	94.74	98.67
09	166	5	2	52	98.81	91.23	96.89
12	163	2	5	55	97.02	96.49	96.89
16	156	0	9	57	94.55	100.00	95.95
18	163	2	5	55	97.02	96.49	96.89
30	156	2	8	55	95.12	96.49	95.48
34	164	0	2	57	98.80	100.00	99.10
35	163	8	5	49	97.02	85.96	94.22

五项标志物总的符合率结果比较见表6-14,6-15。

表6-14 1991年与1993年试剂盒检评合格率

($\geq 90\%$) 的统计

项 目	1991年		1993年	
	合格数/总数	比例(%)	合格数/总数	比例(%)
HBsAg	15/17	88.2	16/17	94.1
抗HBs	10/13	76.9	12/13	92.3
HBeAg	12/13	92.3	13/13	100.0
抗HBe	9/13	69.2	13/13	100.0
抗HBc	3/13	23.2	13/13	100.0

表6-15 1991年与1993年试剂盒检评合格率

($\geq 95\%$)的统计

项 目	1991年		1993年	
	合格数/总数	比例(%)	合格数/总数	比例(%)
HBsAg	9/17	52.9	14/17	82.4
抗HBs	2/13	15.4	11/13	84.6
HBeAg	7/13	53.8	12/13	92.3
抗HBe	4/13	30.8	8/13	61.5
抗HBc	0/13	00.0	10/13	76.9

通过二年的检评比较,可以看出国内乙肝试剂的合格率有较大提高。

6.5 通过室间质量评价评价试剂质量

室间质评(见5.4)的成绩受到检测该项测定物各种条件

的影响，但试剂的质量是重要的因素。因此，通过每季度全国各单位定期的室内质评结果，也可评价各实验室所用试剂的质量。

现例举1989年和1992年室内质评结果中HBsAg ELISA试剂盒的检测结果，见表6-16、6-17，表内只列出部分试剂为例。

表6-16 HBsAgELISA室内质评试剂盒

漏检率统计表

日期03/80

质控样品号	8931(+)			8932(+)			8934(+)			总 数△			漏检率 (%)
结果	+	*	-	+	*	-	+	*	-	+	*	-	
试剂代号△△													
1	7	0	0	6	0	1	4	0	3	17	0	4	19
2	14	1	4	10	0	5	1	0	18	25	1	31	54
3	10	1	0	10	1	0	3	2	6	23	4	6	13.3
4	7	0	0	7	0	2	5	0	2	19	0	2	9.5
5	10	0	0	9	0	1	3	3	4	22	3	5	16.7
6	14	0	1	4	1	2	1	0	6	19	1	9	31
7	6	0	1	4	1	2	1	0	6	11	1	9	42.9
.	.												.
.	.												.

注：+、*、-栏下的数字为使用左侧编号试剂回报相应结果的实验室数。

*表示结果可疑。

△为3个样品相应回报数的总和。

△△为生产试剂厂家代号。

$$\text{漏检率}(\%) = \frac{\text{回报阴性实验室数}}{\text{回报实验室数总和}}$$

表6-17 HBsAg ELISA室间质评试剂盒漏检率

统计表

日期:02/92

样 品 号	9223(+)			9224(+)			9225(+)			总 数△			漏 检 率 (%)
结 果	+	*	-	+	*	-	+	*	-	+	*	-	
试剂代号△△													
1	15	1	0	16	0	0	16	0	0	47	1	0	0
2	37	2	0	39	0	0	39	0	0	115	2	0	0
3	11	1	2	12	0	2	13	0	1	36	1	5	11.9
4	8	1	2	11	0	0	11	0	0	30	1	2	6.1
5	72	5	4	75	4	2	77	3	1	224	12	7	2.9
6	8	0	1	9	0	0	9	0	0	26	0	1	3.7
7	21	1	1	22	0	1	22	0	1	65	1	3	4.3
.													.
.													.
.													.

通过这种评价,可以反映出试剂在用户市场上使用的情况,同时也看到,国产试剂漏检率1992年比1989年有较大降低。

(郑怀竞)

