

核抗体荧光免疫检测质量控制方法的建立和应用研究

徐吟亚(武汉市华润武钢总医院检验科 430081)

【摘要】 目的 研究核抗体荧光免疫检测质量控制的方法及临床应用。**方法** 质控品标准的确定,同批号质控品在常规抗核抗体检测时,与待检患者的血清标本分别平行检测 9 次,计算出各质控品的荧光强度值和变异系数,根据结果作为质控品标准进行分析。质控分析标准的确定,在 3 种不同荧光强度下,模拟实验室条件调整荧光图像的采集时间,分别测定 A 组 300 份待检测血清的荧光强度结果进行比较。针对检测方法在实施质量分析过程中,主要是通过血清稀释法以及荧光强度法完成 B 组(300 份)抗核抗体阳性血清标本的具体检测。其中荧光强度分析法主要指的是对荧光强度进行有效控制,使其有效确保在患者血清平行检测质控品需要控制的荧光强度的具体范围之内,检测血清标本中抗核抗体的滴度。血清稀释法,抗核抗体阳性的血清标本按照 100、1 000、10 000 稀释判断荧光可见的最高稀释滴度。**结果** 质控品标准:同一批号的质控品各 9 次检测荧光强度的平均值为 106.7 ± 10.2 ,变异系数的平均值为 4.5%。在质控有效控制的范围之内,常规组、强光组以及弱光组三种情况下测定的荧光强度值差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时采用荧光检测法和血清稀释法检测 B 组的 300 份血清标本,其中荧光强度分析法用质控品标准范围内的荧光强度 106.7 ± 10.2 ,两种方法测定抗核抗体的滴度符合率较高,均在 99% 以上。**结论** 荧光强度分析法在对血清标本进行检测的过程中表现了非常高的重复性,并且最终的结果也能有效完成测定。

【关键词】 抗核抗体; 荧光强度分析法; 质量控制
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.02.048 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)02-0245-02

自身免疫性疾病(AID)是机体对自身抗原发生的一系列免疫反应的疾病^[1]。抗核抗体在自身免疫性疾病的患者血清中可检出,检测血清中抗核抗体的水平是诊断自身免疫性疾病的重要手段,同时也可反映在治疗过程中疗效情况,也是自身免疫性疾病患者预后评估的重要指标^[2]。荧光免疫检测法(IIF)是检测抗核抗体最早应用于临床的方法,通常实验室都会采用荧光免疫检测法作为筛查试验。但是当前仍然没有有效的质量控制体系,在进行实验室的相关操作方面,都表现了显著的差异。本次研究主要采用荧光强度分析法针对荧光强度实施数字化处理,分析在进行荧光免疫检测质量控制的过程中,荧光强度对其产生的影响,以获得最有效的质量控制方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次研究对象为收集 2013 年 1~12 月来本院就诊的抗核抗体阳性的患者血清标本 600 份,入选标本均为荧光核型且为均质型、斑点型和均质型斑点混合型,每型标本 200 份;600 份标本分为 A 组、B 组两组,每组标本 300 份。采用不加附加剂的真空采血管抽取患者静脉血,低速离心机离心 15 min,提取 50 μ L 加入卵育缓冲液,所有标本在 -20 $^{\circ}$ C 环境中冷冻保存。

1.2 仪器与试剂 仪器为荧光显微镜由日本 NIKON 提供,连接荧光显微镜的电脑需安装数码成像系统和专用图像分析软件,数码成像系统由美国 SPOT32 提供。研究试剂为抗核抗体检测试剂盒为 ANA 检测试剂盒,批号为 T30222D,并采用同批号的 ANA 质控品,抗核抗体质控品。整个仪器和试剂操作均严格按照仪器和试剂说明书的要求进行。

1.3 研究方法 质控品标准的确定,同批号质控品在常规抗核抗体检测时,与待检患者的血清标本分别平行检测 9 次,计算出各质控品的荧光强度值和变异系数,根据结果作为质控品荧光强度标准进行分析。质控分析标准的确定,在 3 种不同荧

光强度下,模拟实验室条件调整荧光图像的采集时间,分别测定 A 组 300 份待检测血清的荧光强度结果进行比较。常规组:激发滤光片 ND4 和 ND16,曝光时间 4 s。强光组:激发滤光片 ND16,曝光时间 1.5 s。弱光组:激发滤光片 ND4、ND8、ND16,曝光时间 6 s。检测方法的质量分析,采用血清稀释法和荧光强度分析法对 B 组(300 份)抗核抗体阳性血清标本完成相关的检测。荧光强度分析法,荧光强度控制在与待检血清平行检测的质控品的荧光强度范围内,检测血清标本中抗核抗体的滴度。在质控的环境下,对比在三种情况下完成测定后荧光强度值的情况,主要分为常规组、强光组以及弱光组,对三组的荧光强度进行系统分析。血清稀释法,抗核抗体阳性的血清标本按照 100、1 000、10 000 稀释判断荧光可见的最高稀释滴度。并比较荧光检测法和血清稀释法检测抗核抗体的滴度符合率。

1.4 统计学处理 本次研究数据录入 SPSS19.0 软件中进行统计学分析,荧光强度值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质控品标准 同一批号的质控品各 9 次检测荧光强度的平均值为 106.7 ± 10.2 ,变异系数的平均值为 4.5%。

表 1 各组荧光强度结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	常规	强光	弱光	<i>P</i>
A 组	300	106.5 $\pm$ 10.4	106.6 $\pm$ 10.2	107.0 $\pm$ 10.3	>0.05
B 组	300	105.7 $\pm$ 45.2	105.4 $\pm$ 47.3	105.3 $\pm$ 48.8	>0.05

2.2 荧光强度结果的比较 同时采用荧光检测法和血清稀释法对 B 组的血清标本进行相关检测,在实施荧光强度分析的

过程中,主要利用质控品荧光强度值 106.7 ± 10.2 范围内的荧光强度,A、B 两组在常规、强光、弱光情况下测定的荧光强度差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 荧光检测法和血清稀释法检测抗核抗体的滴度符合情况 见表 2,结果显示差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 荧光检测法和血清稀释法检测抗核抗体的滴度符合率

组别	份数	符合份数	符合率(%)
均质斑点型	200	199	99.5
均质型	200	199	99.5
斑点型	200	198	99.0

3 讨 论

自身免疫性疾病临床症状多种多样,且症状表现复杂,主要为感染性疾病和系统性疾病的相似性,该种疾病在诊断和鉴别上存在许多难点^[3]。抗核抗体在血清中的滴度成为诊断自身免疫性疾病的金标准,能否精准地检测抗核抗体滴度是检验学专家面临的重大问题。

抗核抗体是可识别的细胞核组分,其在某些特定疾病中具有特征性。抗核抗体过去被认为是抗细胞核抗原成分的自身抗体。有报道显示,抗核抗体通常可以分为下列几种类型(按细胞内):抗 DNA 抗体,具体包括抗单链以及抗双链 DNA 抗体;抗组蛋白抗体以及抗非组蛋白抗体,主要包括抗着丝点抗体、抗 ENA 抗体以及抗核仁抗体;其余细胞成分的抗体^[4]。抗核抗体血清阳性与多种自身免疫性疾病具有相关性^[5-6]。

检测抗核抗体的方法较多,目前实验室多采用的检验模式为先通过荧光免疫法进行筛选实验,再通过酶联免疫法和免疫印迹法完成二次的实验确认^[7]。荧光免疫检测法在检测抗核抗体中的应用是最早的也是临床应用最广泛的,但是由于每个实验室内的荧光显微镜、操作人员技术、结果判定等存在很多差异,会给荧光检测抗核抗体滴度的准确性带来许多困难,现急需解决的是建立和完善荧光检测抗核抗体滴度的质量控制体系,保证荧光免疫检测法检测抗核抗体在血清中滴度的结果准确性和可重复性。有国外学者曾经报道,可通过建立荧光强度分析针对荧光图像完成具体的定量分析,最终能够有效确定抗核抗体的滴度,在完成数字化处理的过程中站在荧光强度的角度,可以有效将质量控制系统具有的准确性以及重复性排除^[8]。实验室间结果可比性的基础被判定为质量控制标准,完成实验室标准的建立后,有效完成实验室间荧光免疫法的质量控制体系的建立,能够有效避免实验室中产生诸多的误差,将实验室间结果表现的差异有效缩小,最终成功将抗核抗体血清滴度检测结果表现出的准确性以及重复性提高^[9-10],从而有效将实验室之间具有的可比性增强,临床意义极其广泛。

本次研究通过质控品荧光强度值标准确定,同批号质控品在实施常规抗核抗体检测的过程中,同将要实施检测患者的血清标本完成检测 9 次(平行检测),最终准确计算出各质控品次检测荧光强度的平均值为 106.7 ± 10.2 ,变异系数的平均值为 4.5%,根据结果作为质控品标准进行分析。结果证实荧光强

度分析法在对血清标本进行检测的过程中,表现了较高的重复性,并且最终获得的结果表现了准确稳定的特点,利用质控品对荧光强度值进行控制的做法可在实验室间质量控制中大范围推广。使用不同的荧光显微镜造成了实验室间荧光免疫检测法结果的差异性,本次研究设计了不同荧光显微镜的条件,并且采用抗核抗体阳性的血清标本采用血清稀释法进行对比检测。本次研究结果证明,虽然实验室内的荧光显微镜在型号配置上存在差异,或者在同一实验室内荧光显微镜的使用寿命、激发光强弱存在差异。但检验人员可根据质控品的荧光强度调节具体的曝光时间,在质量控制标准的调整下荧光免疫法测定血清中抗核抗体滴度在不同实验室的结果应该是相同的。为了进一步验证质量控制方法的可行性,本次研究采用荧光分析法和血清稀释法分别检测抗核抗体血清滴度,结果显示同时采用荧光检测法和血清稀释法对 B 组血清标本(300 份)进行检测,其中荧光强度分析法用质控品荧光强度值 106.7 ± 10.2 范围内的荧光强度,两种方法测定抗核抗体的滴度符合率较高,均在 99% 以上。大量的标本检测证实采用质控品可以得到客观准确的结果。避免了重复检查导致过多的浪费资源,与此同时还能够有效将检查的经济费用降低,站在卫生经济学角度来看,表现了重要的意义。

参考文献

[1] 何铭珺,杨再兴,李畅.抗 SSA、SSB 抗体的荧光特点和临床意义[J].临床军医杂志,2012,40(5):1117-1120.

[2] 卢小岚,杜娟,王强.四种方法检测抗核抗体的对比分析[J].川北医学院学报,2013,28(4):305-309.

[3] 李琳芸.1 801 例抗核抗体检测结果及其临床分析[J].国际检验医学杂志,2013,33(10):1217-1219.

[4] 宁小晓,王蕾.间接免疫荧光及免疫印迹法检测抗核抗体的回顾性分析[J].现代免疫学,2012,32(2):159-164.

[5] 李炎梅,谭毅.抗核抗体的研究进展[J].中国临床新医学,2013,6(8):814-817.

[6] 林益强,曾燕丽,周建锋.抗核抗体与抗核抗体谱联合检测在自身免疫性疾病诊断上的应用[J].免疫学杂志,2012,28(10):892-895.

[7] 李艳,孙家祥,鄂建飞.1 725 例血清抗核抗体及抗核抗体谱检测结果分析[J].西部医学,2012,24(3):584-586.

[8] 王健,江超,李季青.166 例 ANA 阳性者血清线性免疫 ANA 谱的结果分析[J].中华全科医学,2012,10(3):343-345.

[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] 周仁芳,胡朝军,张蜀澜.102 651 例临床标本抗核抗体检测结果及分析[J].中华检验医学杂志,2009,32(12):1339-1343.