



海纳百川 有容乃大

临床免疫实验质量管理及 临床分子实验室建立

四川大学华西第二医院 检验科
石华





乙肝五项、梅毒检测方法学

- 胶体金
- **ELISA**
- 化学发光
- **TRUST**





方法学选择

- 1、胶体金：
 - 优点：快速，简单，可单份检测
 - 缺点：假阴性率高（灵敏度低，低滴度的阳性检测不出来；钩状效应：太高滴度的阳性检测不出来）
 - 用途：急诊手术，规避医务人员院感风险
- 2、ELISA：
 - 优点：钩状效应远远低于胶体金
 - 缺点：速度较慢
 - 用途：辅助诊断，适合批量检测
- 3、TRUST：
 - 用途：检测梅毒非特异性抗体，用于梅毒活动期、疗效及先天性梅毒的判断



ELISA实验检测注意事项

- 一、分析前控制：
 - 1. 血样保存：在采血后尽快完成检测，如需等待较长时间应置于**2-8度**保存，超过**48**小时需分离血清后置**-20度**冻存，实验前一夜将冻存血清转至**2-8度**。实验前将血清取出置室温平衡，避免反复冻存，**溶血标本不可用**。
 - 2. 血样及试剂从**2-8度**取出后置于室温平衡，尽量平衡一小时左右。



ELISA实验检测注意事项

- 二、分析中控制：
 - 1 加样：加样前应将试剂反复颠倒混匀，使用加样器加样，加样后应振荡充分混匀。
 - 2 孵育：保证水浴箱温度在**36.5-37.5**度。应使板架漂浮于水面，不可放于箱内试管架上。
 - 3 洗板：洗液应使用蒸馏水配制，每孔洗液不可溢流，避免交叉污染，加入洗液后静置**20**秒。每次均轻拍干，最后一次彻底拍干。
 - 4 实验结束后剩余孔条应及时密封以防止包被抗体失活，尽快将试剂盒放回冰箱。
 - 5 质控品结果应在规定范围内。



ELISA实验检测注意事项

- 三、结果解释：
 - 1 由于个体差异或不明干扰因素的存在，不可避免的会有少数病例结果与临床状态不符，此时应首先排除操作失误，仪器故障，试剂失活等因素，之后在复检或建议重新送样。
 - 2 某些项目的检测结果会受到服用药物以及其他基础疾病的干扰，因此必须及时与临床医生沟通，作出正确判断。



乙肝两对半的检测及应用

一、乙肝两对半检测结果常见模式：

- 1. -----：过去和现在未感染过HBV.
- 2. ----+：既往感染未能测出抗-HBs；恢复期HBsAg已消失，但抗-HBs尚未出现；无症状HBsAg携带者
- 3. ---++：既往感染过HBV；急性HBV感染恢复期；少数标本仍有传染性
- 4. -+---：注射过乙肝疫苗有免疫；既往感染；假阳性
- 5. -++-+：急性HBV感染后康复
- 6. +---+：急性HBV感染；慢性HBsAg携带者；传染性弱
- 7. -+---+：既往感染过HBV，先病毒已基本清除，身体在康复。
- 8. +---++：急性HBV感染趋向恢复；慢性HBsAg携带者；传染性弱。俗称“小三阳”
- 9. +-++-+：急性或慢性HBV感染。提示HBV复制传染性强。俗称“大三阳”



乙肝两对半的检测及应用

二、乙肝两对半检测结果少见模式：

- 1. +----: 急性HBV感染早期，急性HBV感染潜伏期；慢性HBV携带者，传染性弱。
- 2. +--+ : 慢性HBsAg携带者，易转阴；急性HBV感染趋向恢复
- 3. +-+--: 急性HBV感染早期；慢性携带者，传染性强
- 4. +-+++ : 急性HBV感染趋向恢复；慢性携带者
- 5. ++---: 亚临床型HBV感染早期；不同亚型HBV二次感染
- 6. ++--+ : 亚临床型HBV感染早期；不同亚型HBV二次感染
- 7. ++-+-: 亚临床型或非典型性感染
- 8. +++-+-: 亚临床型或非典型性感染



乙肝两对半的检测及应用

二、乙肝两对半检测结果少见模式：

- **9. +++-+：** 亚临床型或非典型性感染早期；新的不同亚型感染
- **10.--+--：** 非典型性急性感染；见于抗-HBc 出现之前的感染早期，HBsAg滴度低而呈阴性
- **11.--+-+：** 非典型性急性感染
- **12.--+++：** 急性感染中期
- **13.-+--+：** 感染后已恢复
- **14.-++--：** 亚临床型或非典型性感染
- **15.-++-+：** 亚临床型或非典型性感染
- **16.----+：** 急性感染趋向恢复



乙肝两对半的检测及应用

- 三、乙肝两对半检测结果罕见模式：
 1. ++++++：一种亚型的HBsAg及异型的抗HBs；血清从HBsAg转化为抗HBs的过程





海纳百川 有容乃大



梅毒血清学试验的临床意义





一、人体感染梅毒螺旋体后抗体的出现

1、抗体出现的时间

感染梅毒螺旋体1~4周后出现抗体

2、抗体的分类

特异性抗体：抗梅毒螺旋体抗体

非特异性反应素抗体：抗类脂质抗体



二、梅毒血清学试验的分类

1、梅毒螺旋体抗原血清试验：

特异性抗体

2、非梅毒螺旋体抗原血清试验：

非特异性反应素抗体





三、梅毒螺旋体血清试验

- 这类试验是检测血清中特异的抗梅毒螺旋体抗体
- 该类抗体在患者经过足够治疗后仍能长期存在，甚至终身不消失，血清反应持续阳性，因此，它是诊断梅毒螺旋体感染或既往感染的依据，但不能用于观察疗效。





四、非梅毒螺旋体抗原血清试验

- 这类试验是检测抗类脂质抗体即反应素

反应素是机体对损伤细胞和梅毒螺旋体表面所释放的脂类物质的免疫反应所产生的非特异性抗体

该抗体经正规治疗后减少转成阴性。未经治疗可长期存在，部分病人到晚期也可能减少或消失。

目前一般作为观察疗效、复发及再感染的指标。



五、我们实验室的选择

- 1、特异性抗体检测：**TP-ELISA**，初步筛选出正在感染或既往感染梅毒的病人。不能判断梅毒疾病活动与否,所以不能作为疗效监测手段。
- 2、非特异性抗体检测：**TRUST**，该非特异性抗体可在治疗后转阴，可作为评价疗效、复发及再感染的指标。



六、结果报告模式：阴性

No	项 目	结 果 (S/CO)	定性结果	参考值
1	梅毒特异性抗体 (TP (ELISA))	-0.02	阴性(-)	阴性 结果<1.0
2	【梅毒抗体 (TRUST法)】 (TP (TRUST) 阴性(-))			阴性



六、结果报告模式：既往感染

No	项 目	结 果 (S/CO)	定性结果	参考值
1	梅毒特异性抗体 (TP (ELISA))	21.37	阳性 (+)	阴性 结果<1.0
2	【梅毒抗体 (TRUST法)】 (TP (TRUST) 阴性 (-))			阴性





六、结果报告模式：活动期

No	项 目	结 果 (S/CO)	定性结果	参 考 值
1	梅毒特异性抗体 (TP (ELISA))	21.38	阳性 (+)	阴性 结果 < 1.0
2	【梅毒抗体 (TRUST法)】 (TP (TRUST) 阳性 (+))			阴性
3	滴度原倍 (TP (TRUST))	阳性 (+)		阴性 (-)
4	滴度 1 : 2	阳性 (+)		阴性 (-)
5	滴度 1 : 4	阳性 (+)		阴性 (-)
6	滴度 1 : 8	阳性 (+)		阴性 (-)
7	滴度 1 : 16	阳性 (+)		阴性 (-)
8	滴度 1 : 32	阴性 (-)		阴性 (-)



七、检验结果的影响因素

- 1、梅毒螺旋体血清试验的假阳性反应：

系统性红斑狼疮

类风湿性关节炎

肝硬化

淋巴肉瘤

脑膜瘤

海洛因成瘾

结肠癌

麻风

自身免疫性溶血性贫血





七、检验结果的影响因素

- **2、非梅毒螺旋体血清试验的假阳性反应：**
- 反应素亦可在非密螺旋体患者血清中出现，例如风疹、水痘等病毒性感染，类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫病，麻风、疟疾，以及吸毒者，妊娠、甚至个别健康人也可呈生物学假阳性。这类假阳性一般滴度较低（1：8以下）。



八、临床提示

- 临床应该同时检测非特异性抗体和特异性抗体来确诊梅毒。
- 梅毒血清学检查是诊断梅毒的重要依据,但并非唯一依据,医生应在掌握了患者的个人生活史及体查的基础上,综合分析梅毒血清学检测结果,排除假阳性,假阴性情况,才能做出正确的诊断。





海纳百川 有容乃大



ELISA质量控制





- **ELISA**质量保证是一个复杂的过程，许多环节都影响到检测的质量。现分述如下：
 - 1、标本的影响：
 - 标本溶血，标本贮存时间过长
 - 标本凝固不全，标本反复冻融





- **2.仪器：**酶标仪的使用需强调仪器的维护和保养，酶标仪首先应放置通风处，避免机器内部尤其是滤光片发霉，在使用过程中避免酸等物质溢出腐蚀仪器，比色前应先用洁净的吸水纸或布拭干板底附着的液体。为使检测结果稳定，酶标仪在使用前应先预热**15~30**分钟。
- **灯泡的校准及更换：**每年需厂商维护及计量局校准检定，及时更换衰减的灯泡。





- **3、灰区的设置**
- 通常情况下，**ELISA**定性实验以“阳性”和“阴性”来报告结果，两者间有一条分界线被称为“阳性判断值”（**cut-off value, CO值**），这是定性免疫测定结果报告的依据。
- 由于**ELISA CO值**的设置不能区分所有正常和异常的人群，尤其是位于**CO值**附近的人群，并且**ELISA**检测具有以下几个特点：检测变异大（**18%~65%**）；不同试剂盒**CO值**存在差异；病毒感染存在窗口期；病毒变异后表达产物含量降低以及个体差异等，因此在**CO值**附近存在一个临床意义可疑的区域被称之为“灰区”。



- 3、灰区的设置
- 在国内的传染性病原体抗原和抗体检测的**ELISA**试剂盒中均未涉及“灰区”的设置，仅仅依靠**CO**值来决定感染的有无，尤其是对献血员的筛查具有较大的风险，因此对于检测结果位于“灰区”的病人可采用确认实验或追踪检测的办法加以确诊。
- 目前“灰区”的设置有三种方式：(1) $CO \times (1 \pm CV)$ ，**CV**为该试剂的批内**CV** (一般在**15-20%**)；(2) $CO \pm 2s$ ，**s**为实验室做室内质控**ROC** (常规条件下的变异) 的标准差；(3)根据实验数据。



- **4结果报告**
- 传统的**ELISA**结果只报告“阳性”或者“阴性”，但不能解决“灰区”的问题，因此引入“可疑”的报告方式是比较合理和科学的，同时对结果做必要的说明，如“结果已经复查，建议定期复查或定量检测”。



- **5 室内质控:**
- 定性测定的室内质控品，除了试剂盒附带的阴阳性对照外，实验室还应该选择至少**2**个室内质控品，其中一个为弱阳性质控品，接近**Cutoff**值，**S/Co**值应该为**2~4**之间；另一个为阴性质控品。
- 北京康彻斯坦



- **5 室内质控：**
- 质控图绘制：定性测定可采用弱阳性质控品的**S/Co**值作质控图。失控规则设置：**22S、13S**。
- 质控判断基本规则：定性测定为弱阳性的质控品不能测定为阴性；阴性质控品不能测定为阳性。



当得到失控信号时

重做同一质控物（人为差错、偶然误差）



新开一瓶质控物（质控物使用、保管）



进行仪器维护，更换试剂（仪器、试剂）



请专家帮助





卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

一、实验室设施和设备的基本要求

1.临床基因扩增检验实验室应具有四个独立的工作区域：试剂贮存和准备区、标本制备区、扩增区和产物分析区，每个区域都应设立缓冲区，最好有专用通道。

总面积不小于35平方米，应有足够的空间满足检测工作的正常进行。如使用全自动扩增检测仪，扩增区和产物分析区可合并。

工作区的气流、人流要单一流向。即试剂储存和准备区 → 标本制备区 → 扩增反应混合物配制和扩增区 → 扩增产物分析区。



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

一、实验室设施和设备的基本要求

2、各区域都必须有明确的标记，以避免设备物品如加样器或试剂等从其各自的区域内移出从而造成不同的工作区域间设备物品发生混淆。不同的实验区域应有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

可移动紫外车、加样枪、拖布、白大衣……





卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

一、实验室设施和设备的基本要求

3.各工作区均须配置专用的实验所需仪器设备。按照卫生部《临床基因扩增检验实验室基本设置标准》进行配置，标本制备区需配置生物安全柜。

4.实验室的各个工作区域的设施、能源、照明、消毒（固定装置的紫外灯）、温控（不适合中央空调）、通风等应适用于检测工作的正常进行。



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

二、实验室检测的基本要求

- 1.严格按照卫生部《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》和《临床基因扩增检验实验室工作规范》的要求开展各项工作。人员取得基因扩增上岗证。
- 2.临床基因扩增检验实验室属于II级生物安全（BSL-2）实验室，应按照《二级病原微生物实验室生物安全管理规范》进行生物安全管理。
- 3.以科研为目的的基因扩增检验项目，不得向临床出具检验报告，不得向病人收取费用。



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

三、质量体系文件及检测的基本要求

- 1. 临床基因扩增检验实验室应编写的质量手册、程序性文件、标准操作程序及其相关记录表格，其内容至少应包括以下方面。
 - (1) 质量方针、目标、承诺。
 - (2) 实验室内务管理程序。
 - (3) 实验室人员配置及培训程序。
 - (4) 实验室质量控制管理程序。

•



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

三、质量体系文件及检测的基本要求

2.防止污染

- (1) 污染类型：最主要来源是扩增产物的污染。如果发生了污染，实验就必须停止，直到找到污染源为止，并且实验结果必须作废。
- (2) 污染源的分析：
- (3) 污染的避免：人流、气流的“单一流向”，严格遵守操作规程，持续的长波紫外灯照射。
- (4) 去除污染的措施：工作完后必须定期对实验室采取有效的去污染措施，如用10%(v/v)次氯酸钠清洁表面；试验后长时间（不低于2小时）的紫外照射实验操作台面和其他表面；实验设备如加样器的高压消毒；实验室的通风换气；稀盐酸擦拭污染的表面。



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

三、质量体系文件及检测的基本要求

3.实验室质量控制

(1) 室内质量控制：由于PCR测定的高敏感性，所以必须对DNA和RNA分析的各步进行质量控制，以避免假阳性和假阴性，保证测定结果的准确性。

试剂的选购、实验材料的准备、PCR本身等实验中的每一步都要求有质控。如对所用一次性耗材、试剂的质检验证。

每次实验时均需做室内质控，定性试验：阴性对照、试剂空白对照、弱阳性对照；定量试验：阴性对照、试剂空白对照、临界值对照、中（或高）值对照，同时，制定适宜的质控规则，绘制质控图并一个月进行一次相关分析。



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

三、质量体系文件及检测的基本要求

3.实验室质量控制

- (2) 室间质量评价：临床基因扩增检验实验室还应参加卫生部临床检验中心或/和四川省临床检验中心组织的室间质量评价活动。
- (3) 凡是向临床出具报告的检测项目均应开展室内质量控制，同时必须参加室间质量评价活动。其结果将作为其开展临床基因扩增检验的重要依据之一。对于卫生部或省上没有室间质评的项目，应该与高级别或同级别有资质的实验室进行室间比对。对于没有室间质评且其它实验室都没开展的项目，应该进行临床吻合度调查。



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

三、质量体系文件及检测的基本要求

4.对检测仪器的要求

(1) 实验室应分册建立主要仪器设备档案，做到一台仪器一个档案，档案至少应包括以下内容：

设备的名称；制造商名称、型号、序号或其它唯一性标识；接收日期和启用日期；

安装及培训记录；目前放置地点（临床基因扩增检验实验室的区域）；

接收时的状态（例如全新的、经改装的）；仪器使用说明书的复印件；

校准和 / 或检定的日期以及下次校准和 / 或检定的日期；

迄今所进行的维护和今后维护计划的细节；

损坏、故障、改装或修理的历史记录及验证的实验结果。



卫生部对临床基因扩增检验实验室的要求

三、质量体系文件及检测的基本要求

4.对检测仪器的要求

- (2) 任一设备如有问题应立即停止使用，并加上明显标识，如可能应将其移放在规定的地方直至修复。
- (3) 修复的设备应经校准和 / 或检定，满足检测要求后方可使用。
- (4) 实验室应检查由于上述缺陷对以前所进行的检测工作的影响，并记录相关分析、处理意见。
- (5) 每一台设备应有明显的标识，特别应标明其校准时间及下次校准时间，以及仪器的运行状态。



海纳百川 有容乃大

Thank you!

