

# 酶联免疫吸附试验检测影响因素探讨

杨 娜(甘肃省天水市第三人民医院 741000)

【关键词】 酶联免疫吸附试验; 影响因素; 质量控制

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.22.081

中图分类号:R446.61

文献标志码:B

文章编号:1672-9455(2010)22-2558-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)是目前临床免疫学检验领域的主流检测技术之一,而且其反应中各组分的成本较为低廉,特别是对肝炎病毒的监测,最基层的医院也在开展。因其操作简单,灵敏度高,特异性好,达 ng 水平,经济安全,不需要特殊设备等特点而在临床上广泛应用。但是由于其操作步骤复杂,一般包括试剂准备、样本收集、加样、温育、洗涤、显色、比色、结果判定等,其中任何一项操作不当都可造成实验误(漏)诊的发生。因此,必须加强 ELISA 检测的全面质量控制,保证其结果的准确可靠。现将影响因素做以分析。

## 1 试 剂

目前各种 ELISA 试验均有商品化的专用试剂盒。优质的试剂是保证检验质量的基础。选择质量好的试剂,在了解某种试剂的组成基础上选择多家试剂盒进行比较,应选择灵敏度高,特异性好,精密度(CV)好(批内 CV 值小于 15%),稳定性和安全性好,且简便经济的试剂。不同批次的试剂在制作过程中很难保证质量完全一致,因此必须选择和订购长效批号的试剂,并保证保存条件,严格执行这一标准可以避免试剂批号改变而重建质控体系及重新评估试剂的复杂过程,并且能够保证结果的稳定性。在试剂使用前应先将试剂放置于 37℃ 下平衡 30 min 以上。

## 2 标 本

血清是最常用的标本。患者标本中有可能含有干扰试验的免疫物质,导致假阳性或假阴性的结果,干扰因素一般可分为两类,即内源性和外源性干扰因素。

内源性干扰因素一般包括类风湿因子、补体、高浓度的非特异性免疫球蛋白、异嗜性抗体及某些自身抗体等,避免内源性干扰因素主要通过选择合适的试剂。

外源性干扰因素包括标本溶血、标本被细菌污染、标本贮存时间过长及标本凝固等。

**2.1 标本溶血** 红细胞破坏溶解时释放出大量具有过氧化物酶活性的血红蛋白,因此,在以辣根过氧化物酶(HRP)为标记的 ELISA 测定试验中,容易在温育过程中吸附于固相,从而与加入的底物反应显色,干扰测定结果。

**2.2 标本在低温下保存时间过长**,IgG 可聚合成多聚体,在间接法 ELISA 测定中会导致本底加深,甚至出现假阳性结果。通常血清标本可在 2~8℃ 保存,如样品在 7 d 内不测定,需将血清或血浆和血细胞分离后,置-20℃ 保存。冷冻保存标本避免反复冻融,标本的反复冻融会因其所产生的机械剪切力对标本中的蛋白等分子产生破坏作用,使抗体效价下降从而引起假阴性结果。

**2.3 血清标本应充分离心**,否则可因残留的纤维蛋白原非特异吸附于微孔而造成假阳性结果。

**2.4 标本污染** 生化与免疫标本的混用,可能造成免疫检测标本的污染。其原因是免疫指标是定性检测,标本的待测物质含量差异极大,标本在检测生化试验时极微量的交叉污染都可能造成免疫测定结果的不准确。此外,全自动酶免疫分析仪的

加样针或加样吸头清洗力度不够,造成阳性标本和其他标本的污染。

## 3 操作因素

**3.1 加样** 加样器是一种比较精密的工具,其在长时间使用时会因机械磨损或推动杆内附着的血痂等原因造成加样不准,因此必须定期对加液器进行维护和校准。每次加不同的标本均需更换吸嘴,以免发生交叉污染;加样速度不可太快,以免将标本加在孔壁上部,并注意不要溅出或产生气泡,加样时还应注意操作时差对结果的影响,标本加样较多时应分批操作,防止加样后温育前等待时间过长。尤其对竞争法检测结果影响更大。

**3.2 温育** 37℃ 是实验室中最常用的温育温度。温育方式常采用温箱法、微波辐射法和热水浴法。其中热水浴法能较好解决因受热不均衡所致的周围孔与中央孔结果的吸光度差异(即“边缘效应”)可将 ELISA 板置于热水浴箱中,温育时要加封贴封纸,这样可以防止孔内液体成分蒸发或水珠等杂质滴入孔内影响检测结果,封片不能重复使用。

**3.3 洗涤** 洗涤是 ELISA 不同于均相免疫学检测技术的一大特征,洗涤在整个 ELISA 反应过程中虽不是一个反应步骤,却非常关键。其目的是去除反应体系中与反应无关的成分,包括未结合的酶结合物以及反应过程中非特异性吸附于固相载体的干扰物质。洗涤可采用洗板机或手工洗涤两种方式,一般认为洗板机比手工洗板效果要好。洗板机设置时间、间隔、次数要保持一致,不能过多或过少。洗板次数较少,造成残留,可引起假阳性结果;洗板次数过多,可造成抗原抗体结合物洗脱,造成假阴性结果<sup>[1]</sup>。洗板时注意各种试剂盒的洗液不能混用,且试剂盒中提供的洗液是浓缩的,应按规定的倍数稀释。洗涤要彻底,以去除实验中未参与的所有物质,加入洗涤液时,应防止在反应孔中形成气泡而造成洗涤不充分,也不可冲力过大,以防包被在固相载体表面的成分脱落而造成假阴性。酶结合物不耐干燥,特别在较高的温度下更易失活,加入底物前,甩干的反应板在空气中暴露的时间长短也会影响实验结果,时间越长,则 A 值越低<sup>[2]</sup>。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,操作者应严格按照要求洗涤,不得随意更改。

## 3.4 显色与比色

大多数情况下 ELISA 商品多选用 HRP。HRP 可催化的底物为过氧化氢,参加反应的显色供氢体有邻苯二胺(OPD)、邻联甲苯胺(OT)及四甲基联苯胺(TMB)等。操作时应注意各试剂盒显色剂不能混用,添加顺序不能颠倒,不能溅出孔外。ELISA 显色结果必须通过酶标仪进行检测,可减少实验误差,提高临界值样本的分析准确度。不可由肉眼判断结果,因为不同个体的色觉存在差异。加入终止液后应尽快比色,否则样本吸光度值会逐渐下降,显色越深下降越快,应在 2 min 内比色。酶标仪应采用双波长进行测定,这样可排除单波长检测时的测定干扰(标本的浓度、干扰色等)和电路干扰(噪音、漂移、电压

等),也可排除微孔反应板底部划痕的光干扰。

4 结果的判定与报告

严格依据试剂盒提供的阳性判定值(CO)进行结果判定。厂商提供试剂的同时,说明书上列出的 CO 值是建立在一系列科学试验及统计研究的基础上,不应随意更改。定量测定需要制备标准曲线,根据标准曲线计算结果。通常情况下 ELISA 结果报告方式为“阴性”或“阳性”,在二者之间有一条明确的分界线,也就是所谓的阳性判定值即 CO 值,对于样本的吸光度值(A)高于 CO 值就判断为阳性,相反则判断为阴性,然而在实际工作中经常会出现样本 A 值位于 CO 值附近的人群,即 ELISA 检测的“灰区”。在国内的传染性病原体抗原和抗体检测的 ELISA 试剂盒中均未涉及到“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风险。对可疑标本可采用多次数检验或结合其他方法如胶体金免疫检测等手段确诊。

5 质量控制

5.1 室内质量控制(IQC) 要保证检验结果的准确可靠,必须做好 IQC,首先要保证实验室的环境、仪器设备与硬件设施必须处于良好的状态,其次要对试剂及测定方法过程进行标准化,另外实验室技术人员必须经过良好的培训。目前国内实验室定性试验的质控规则还没有统一的标准,较多单位采用“即刻法”,结合 LeveyJennings 质控图的方法。在每块反应板中除

了试剂盒附带的阴阳性对照外,还要选择一个为弱阳性的室内质控品,其 S/CO 值应该为 2~4 之间。认真分析每次 IQC 失控的原因,定期对各项检测的均值、变异系数等进行比对分析,及时发现试剂盒检出能力的变化,采取适当的措施来提高检测的可靠性。

5.2 室间质量评价(EQA)

EQA 是一种回顾性评价,主要是控制实验室结果的准确性。其要点是保证同患者的标本一样对待室间质评物,必须强调的是 EQA 结果必须结合 IQC 一并分析,找出原因,改进工作中的不足,同时指导实验室选择合适的试剂盒。

综上所述,ELISA 检测操作步骤复杂,可能会影响测定结果的因素较多,分布在测定操作的各个步骤中,因此必须加强各环节的质量控制,才能得到准确可靠的检测结果。

参考文献

[1] 刘祖勇.增加洗板次数对 HbsAgELISA 检测影响[J].中国输血杂志,2006,19(2):135-136.  
[2] 彭黎明,王兰兰.检验医学自动化及临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2003:553.

(收稿日期:2010-06-21)

乙肝患者前 S1 抗原检测的临床意义

孟德宝<sup>1</sup>,宋玉平<sup>2</sup>(1.吉林省白城市医院检验科 137000;2.吉林省白城市疾病预防控制中心 137000)

【关键词】 前 S1 抗原; 乙型肝炎病毒; 酶联免疫吸附试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.22.082

中图分类号:R512.62 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2010)22-2559-02

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高发区,占全世界乙肝病毒总携带率的 50%<sup>[1]</sup>。HBV 在人体内的复制量,患者机体的免疫状态及治疗效果一直是临床医生和患者都十分关注的问题。以往大家都采用乙肝五项作为 HBV 感染的筛查指标,但是这些不足以筛查出乙肝病毒携带者的传染性强弱,近年来前 S1 抗原作为 HBV 血清学新的标志物逐渐显现出较高的临床应用价值。通过前 S1 抗原和乙肝五项的联合检测更能够敏感的反映出乙型肝炎患者是否有病毒复制、肝细胞损伤、抗病毒治疗效果等,对病情的预后及治疗判断具有广泛的临床意义。

1 乙肝前 S1 抗原

前 S1 抗原是 HBV 外膜蛋白的重要组成部分。HBV 基因组有 4 个开放读码框,分别为 S、C、P 和 X 区,其中编码 HBV 外壳蛋白的 S 区分为前 S1 抗原、前 S2 抗原和 S 区,分别编码包膜上的前 S1 抗原、前 S2 抗原和 HBsAg。前 S1 抗原抗原有 108 或 119 个氨基酸组成,其长度因亚型而异。前 S1 抗原抗原位于 Dane 颗粒的表面,具有高度的免疫原性,HBV 可通过前 S1 抗原区的氨基酸(AA)21-47 片段作为受体黏附于肝细胞上,从而侵入肝细胞。变异的病毒只要这一片段完好就存在着传染性<sup>[2]</sup>。

2 乙肝前 S1 抗原的作用

2.1 前 S1 抗原仅在 HBV-DNA 阳性血清中检出,在感染 1~2 周内(潜伏期)即可检出,然后滴度迅速达到高峰,恢复期后前 S1 抗原又很快转阴,提示病毒正在消除和病情好转。前 S1

抗原转阴越早,急性乙肝病程越短,预示急性乙肝的愈合良好。前 S1 抗原如持续阳性则提示病情的慢性化。其动态变化有助于判断急性乙型肝炎的愈后。由于前 S1 抗原出现在急性乙型肝炎感染的最早期,在转氨酶升高前即可查出,所以它可作为早期诊断 HBV 感染的指标。

2.2 HBV 是一种嗜肝细胞病毒,感染的第一步是需要侵入肝细胞,然后才能在肝细胞内复制繁殖。现在认为前 S1 抗原与 HBV 的复制密切相关,在附着和侵入肝细胞的机制中起着重要作用。前 S1 抗原是 HBV 侵入肝细胞的关键部位。前 S1 抗原氨基酸的(AA)24~47 片段作为肝细胞膜受体诱导 HBV 吸附于肝细胞表面,同时正常人肝细胞上也存有前 S1 抗原受体能直接吸附 HBV 促使 HBV 进入肝细胞。

2.3 近年来发现部分 HBeAg 阴性患者体内仍存在病毒复制现象,前 S1 抗原的检测可弥补因病毒变异或其他原因而造成 HBeAg 阴性给临床带来的误导。通过前 S1 抗原的检测即能了解 HBV 在体内的复制情况,又能了解是否携带 HBV 变异毒株,能对疾病的转归进行判断,为临床提供重要的信息。

3 前 S1 抗原与机体的免疫反应

HBV 感染后是否发病或病情的轻重转归依赖于机体对 HBV 的免疫反应,这其中就包括前 S1 抗原的免疫应答,前 S1 抗原的 21~47 片段具有很强的免疫原性,能刺激免疫细胞激活引发免疫损害,导致肝细胞变性坏死,转氨酶升高,出现一系列肝炎性反应和体征。