

异性 IgM 抗体,以后逐渐降低,几天后出现 IgG 抗体,且随着发病时间的延长,病原体不断地刺激免疫系统导致抗体效价呈上升趋势,因此 IgM 阳性是早期感染的标志,IgG 阳性是既往感染的标志,而 IgM 和 IgG 同时阳性则往往是急性感染的标志^[7]。而笔者在研究成人患者 MP-IgM 和 MP-IgG 亚型时发现,PPA 法阴性和 1:40、1:80 等不同 MP 抗体效价中,均有不同比例的患者 MP-IgM 或 MP-IgG 单阳性,到 1:640 以上的高效价后,才比较一致地出现 MP-IgM 和 MP-IgG 同时阳性。可能因为在成人患者中,MP 感染后潜伏期较长,常为 2~3 周^[8],当患者出现症状而就诊时,IgM 抗体可能在高水平能被检测到,也可能含量很低不能被检测到,因此要正确理解 MP 抗体的诊断意义,检测 MP 抗体反映的是人体对于 MP 感染后的一种反应性,而不是检测 MP 本身,即使 IgM 抗体为阴性,也不能否定 MP 感染,应严格按照 MP 感染诊断原则,动态检测 MP-IgG 抗体或 MP 抗体效价,当抗体效价升高或降低 4 倍以上方可确诊,检测单份样本意义不大^[9-11]。对于临床上无法获得双份样本的患者,也应该结合患者病史、发病时间、用药情况等因素综合分析 MP 抗体阳性的临床意义。

参考文献

[1] Niederman MS. Community acquired pneumonia; the US perspective[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2009, 30(2): 179-188.

[2] 朱宏,计雪强,缪美华,等.肺炎支原体抗体的定量检测及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(9): 788-789.

[3] 刘玉玲,张杰.颗粒凝集法检测肺炎支原体特异性抗体 451 例结果分析[J]. 职业与健康, 2007, 23(11): 912-913.

[4] 黄海辉,张婴元,汪复,等.亚洲地区肺炎支原体和肺炎衣原体在成人社区获得性肺炎中的流行病学研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(2): 89-93.

[5] 胡元生,温和,周银娣,等.三种肺炎支原体检测方法的比较[J]. 临床输血与检验, 2008, 10(1): 9-10.

[6] 王兰兰. 临床免疫学与检验[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007: 86.

[7] 陆权,陆敏.肺炎支原体感染的流行病学[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(4): 241-243.

[8] 代亚东,尹金星,王晶.成人肺炎支原体感染 48 例临床分析[J]. 吉林医学, 2007, 28(12): 1406-1407.

[9] 张德文,罗兴旺.被动颗粒凝集法测定肺炎支原体抗体的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 65-66.

[10] 朱宏,计雪强,缪美华,等.肺炎支原体抗体的定量检测及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(9): 788-789, 792.

[11] 谭笑红,何静玲,崔奕文,等.肺炎支原体抗体 IgM 检测的常用方法比较[J]. 中华医学研究杂志, 2005, 5(12): 1234-1235.

(收稿日期:2011-08-20)

• 检验技术与方法 •

振荡孵育法用于国产一步法 HBsAg ELISA 试剂盒的改进

刘 艳,赵中华,王 刚,汪瑞忠
(上海市浦东新区人民医院检验科 201200)

摘要:目的 改变酶反应条件以提高国产一步 ELISA 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)试剂盒检测敏感性。方法 将酶反应的条件由 37℃ 孵育改为 37℃ 振荡孵育,观察检测结果的敏感性和精密度的变化。结果 将酶反应的条件改为 37℃ 振荡孵育,HBsAg ELISA 试验检测的阳性判定值(CO)不变;20 份雅培 i2000 检测 HBsAg 为阴性的标本,在振荡孵育时仍为阴性结果;灰区标本振荡孵育后,吸光度 A 值增加 2 倍左右,与单纯孵育检测相比敏感性提高 4 倍左右;80 份化学发光微粒子免疫测定(CMIA)弱阳性标本中有 62 份可被振荡孵育的 ELISA 检出(检出率 77.5%),而孵育组仅检出 46 份(检出率 57.5%),故振荡孵育法对弱阳性标本的检出率明显高于孵育法的 ELISA。结论 振荡孵育应用于 HBsAg ELISA 酶反应中可明显提高检测的灵敏度。

关键词:肝炎表面抗原,乙型; 酶联免疫吸附测定; 试剂盒,诊断; 一步法; 敏感度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)11-1354-02

目前 ELISA 法由于成本低廉,敏感性、特异性均较理想,成为国内检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的首选方法之一。但相比于化学发光法,前者的灵敏度明显较低^[1]。国产 HBsAg ELISA 试剂盒酶反应的条件为 37℃ 孵育,笔者经过试验发现,将酶反应条件适当改进——在孵育的同时振荡,敏感性得到了明显提高。

1 资料与方法

1.1 一般资料 取自浦东新区人民医院 2010 年 8 月至 2011 年 3 月的患者标本(标本检测方法为化学发光法,检测仪器为雅培 i2000SR 化学发光微粒子免疫分析仪),包括 20 份 HBsAg 阴性标本,20 份阳性标本及 80 份弱阳性标本(HBsAg 0.050~2.000 IU/mL),阳性标本全部经中和试验确认并复检。标本收集好后,置-70℃ 冰箱保存,试验前复融。

1.2 仪器与试剂 上海科华公司 HBsAg ELISA 检测试剂盒(批号:20100911);美国雅培公司化学发光微粒子免疫测定(CMIA)配套的 HBsAg 检测试剂(批号:94412LF00)。主要仪

器:其林贝尔 MH-1 微型振荡器;上海一恒恒温孵育箱;BIO-RAD 680 酶标仪;BIO-RAD 1575 洗板机;雅培公司 i2000SR 化学发光微粒子免疫分析仪,序列号为 C06A1322。质控血清为来自上海市临检中心的 HBsAg 质控血清,批号为 1001,置-70℃ 冰箱保存,试验前复融。

1.3 方法

1.3.1 国产 ELISA 试剂检测 HBsAg 按照试剂盒说明书进行操作,S/CO(CO 为阳性判定值 cutoff 值)大于 1.0 即判为阳性。

1.3.2 振荡孵育的国产 HBsAg ELISA 试剂检测 使用国产 HBsAg ELISA 试剂盒,操作按说明书进行,改动之处在于 37℃ 孵育时,将酶标板固定在振荡器上,一同移至孵育箱中反应,反应时调频率 2 800 r/min。

1.3.3 CMIA 法检测 HBsAg 参照雅培公司仪器和试剂盒说明书,由仪器自动检测并判断结果,HBsAg ≥ 0.05 IU/mL 判为 HBsAg 阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件,采用 χ^2 统计方法。

2 结果

2.1 对 CO 值的影响 以试剂盒中阴性对照为样本,按操作说明书进行的酶反应条件为 37 °C 孵育(孵育组)和 37 °C 孵育加振荡(振荡孵育组)的检测,做 20 孔的平行测定实验,计算检测的吸光度(A)值。结果孵育组的 A 值均小于 0.05,平均为 0.011;振荡孵育组的 A 值均小于 0.05,平均为 0.008。按照说明书计算 CO 值,两种反应条件的 CO 值相同,均为 0.105。

2.2 HBsAg 阴性样本检测结果 取 20 份经 CMIA 方法检测 HBsAg 结果为阴性的血清标本,进行孵育和振荡孵育两种反应条件的 HBsAg ELISA 检测,双孔平行测试。结果显示,孵育组 20 份样本 A 值均小于 0.05,平均值为 0.015;振荡孵育组,20 份阴性样本 A 值均小于 0.05,平均值为 0.005。试验结果显示,孵育加振荡对 HBsAg 阴性样本检测结果无影响。

2.3 对检测敏感性的影响 取 20 份 HBsAg 阳性血清混合后用乙型肝炎病毒血清标志物均为阴性的人血清做适当稀释,使其 HBsAg ELISA 检测 A 值在 0.5 左右,再对该混合血清作倍比稀释,取各稀释度的血清标本,同时进行两种酶反应条件下的 HBsAg ELISA 检测及 CMIA HBsAg 测定,每份标本做双孔,取平均值。结果显示,同一低浓度 HBsAg 标本的 A 值经振荡孵育后较孵育组增加 2 倍左右,按 CO 值计算,HBsAg ELISA 的敏感性提高 4 倍(从稀释度 1/4 提高至 1/16),见表 1。

表 1 不同稀释度 HBsAg 弱阳性标本在孵育和振荡孵育及与雅培 i2000 的结果比较

HBsAg 弱阳性 血清稀释倍数	不同酶反应条件下的 A 值(CO=0.105)		雅培 i2000 结果 (CO=0.049)
	孵育组	振荡孵育组	
不稀释	0.473	1.376	2.66
2	0.233	0.781	1.37
4	0.123	0.459	0.78
8	0.064	0.246	0.44
16	0.043	0.149	0.23
32	0.031	0.093	0.14
64	0.020	0.056	0.08
128	0.016	0.026	0.04

2.4 HBsAg 弱阳性样本两种方法的对比检测 对 80 份经 CMIA 法检测及 HBsAg 中和试验确认为弱阳性的标本同时进行孵育和振荡孵育两种条件下 ELISA HBsAg 的检测。结果显示,检测结果均为阴性的标本为 18 份;均为阳性的标本为 46 份;其余 16 份标本在振荡孵育时呈阳性而孵育时呈阴性反应。80 份 CMIA 弱阳性标本中有 62 份可被振荡孵育的 ELISA 检出(77.5%),而孵育组仅检出 46 份(57.5%)。振荡孵育法对弱阳性标本的检出率明显高于孵育法的 ELISA ($\chi^2=7.29, P=0.007$)。

2.5 室内质控品批内变异 对室内质控品以振荡孵育和孵育同时做 26 次平行测定。孵育组吸光度(A)为 0.394 ± 0.042, CV 为 10.66%;振荡孵育组吸光度(A)为 1.002 ± 0.097, CV 为 9.68%。

3 讨论

中国是乙型肝炎的高发区,有报道显示在普通人群中乙型肝炎的感染率高达 11.36%^[2]。而低水平血清 HBsAg 人群更

占有不小的比例,其中 5 g/mL 以下的感染人群占 HBsAg 阳性人群的 22.01%^[3]。低浓度 HBsAg 人群不容忽视。由于检查方法不灵敏,可导致 HBV 通过手术、输血等途径发生传播造成严重后果^[4]。因此,提高血清 HBsAg 检测的灵敏度有重要意义^[5-6]。目前,ELISA 法以其价格低廉、操作简便快速、无需大型仪器设备等优点,被广泛应用于二、三级医院。

在 ELISA 测定过程中,酶结合物参与的抗原抗体反应是否充分是决定 ELISA 敏感性的主要因素。而温度条件对抗原抗体反应影响很大^[7-8]。抗原抗体反应的完全性取决于在一定反应温度下的反应时间,时间越长反应越完全^[9];由于反应时使用的微孔板,其包被有抗体或抗原的表面只会与其最接近的部分抗原或抗体反应,如果在反应过程中,尽量使反应物之间有更大程度的接触,如孵育的同时振荡,即使抗原、抗体、酶标记的抗抗体三者的布朗运动加速,从而扩大反应范围,使反应更加充分和完全,有利于提高反应的灵敏度^[10-11]。

本试验在酶反应过程中 37 °C 孵育的同时进行振荡,其余的操作均按照说明书进行,证明没有引起假阳性反应。而表 1 的实验结果表明振荡孵育使检测的 A 值增加 2 倍,敏感性提高 4 倍。顾志东等^[12]曾提出将延长酶反应时间至 120 min 可使 HBsAg 吸光度增加 1 倍,灵敏度提高 1 倍,相比之下振荡孵育法较延长反应时间更能明显提高试剂盒灵敏度。80 份弱阳性 HBsAg 标本,经振荡孵育后检出率明显提高,说明孵育振荡法提高了 ELISA 检测的敏感性。

本研究结果表明,在不延长反应时间,又不额外增加试验仪器的前提下,振荡孵育明显提高了试剂盒的灵敏度,有利于低浓度 HBsAg 的检出,值得临床推广。

参考文献

- [1] 王进,董长林,陈国军,等. HBsAg 弱阳性样本的 3 种测定方法比较[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(11):978-979.
- [2] 王莉敏,韩春滔. 3 577 例乙肝检测结果的调查[J]. 中国实用医刊,2010,37(17):93-94.
- [3] 顾晓东,俞碧霞,黄海龙. 低浓度 HBsAg 人群乙肝标志物检测及其临床意义[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(12):1515-1516.
- [4] 王文武,曹树正,杨杰,等. 对乙型肝炎表面抗原弱阳性结果进行确认试验的应用研究[J]. 检验医学,2010,25(4):301-303.
- [5] 李金明. 感染性疾病血清学检验中应重视对弱反应性标本的确认[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(7):577-580.
- [6] 卢振,汪海华. 酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒标志物的影响因素及存在问题[J]. 检验医学与临床,2011,8(2):255-256.
- [7] 徐锡霞,邓巍. 温度条件对 ELISA 定性测定 HBsAg 结果的影响[J]. 实用肝脏病杂志,2005,8(1):16-18.
- [8] 徐锋,李筱莉,陈燕. 不同孵育条件对 HBsAg 定性分析的影响[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(10):933,935.
- [9] 袁红,毛旖,黄文芳. ELISA 试验加样误差对试验结果的影响分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(9):835-837.
- [10] 李育华,陶义训. 影响酶联免疫吸附试验结果的操作因素[J]. 检验医学,2006,21(21):47-49.
- [11] 葛君琰,王丽娜. 影响 ELISA 法检测乙型肝炎病毒血清标志物的因素[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):289-290.
- [12] 顾志东,吴倩文,冯晓静,等. 用于国产一步法 HBsAg ELISA 试剂及确认试验试剂的改进方法[J]. 检验医学,2011,26(1):32-35.