

3 讨 论

本研究共筛出高风险孕妇 172 例, 筛查阳性率为 7.68%。以 35 岁为分界点, 年龄大于 35 岁的高龄孕妇组共有 187 例, 筛查阳性者 51 例, 阳性率为 27.27% (51/187); 年龄小于或等于 35 岁低龄孕妇组共有 2 053 例, 筛查阳性者 46 例, 阳性率为 2.24% (46/2 053), 高龄组阳性率明显高于低龄组 ($P < 0.05$)。所以年龄因素是引起 DS 和 18-三体综合征的高危因素, 与夏家辉^[2]、梁雄等^[3]的报道相符, 应对高龄孕妇进行产前诊断。各年龄组 NTD 筛查阳性率无统计学差异 ($P > 0.05$)。由表 1 可见, 孕妇生育年龄集中在 ($>25 \sim 30$) 岁, 占 53.26%, 大于 35 岁的孕妇仅占 8.35%, 说明 90% 以上的妇女在 35 岁之前生育, 避开了 DS 和 18-三体综合征高风险年龄段。目前产前筛查的指标均以孕周为基础, 而孕妇提供的孕周与实际孕周相差 2 周即可导致三项指标评估的危险率差异 10%^[4]。本研究筛查者孕周集中在 15~19 周, 14、20 周所占比例较少, 各孕周组筛查高风险率比较, 无统计学差异, 所以要准确计算孕周。本研究显示年龄大于 35 岁的孕妇 DS、18-三体综合征和 NTD 筛查高风险率高于小于或等于 35 岁的低龄孕妇。表 3 显示筛查高风险孕妇发生妊娠期高血压综合征、胎儿发育迟

• 经验交流 •

ELISA 检测过程中影响因素及防控措施分析

徐新蓉, 龚国富, 马 萍

(鄂州市中心医院, 湖北鄂州 436000)

摘要:目的 探讨酶联免疫吸附法(ELISA)操作进程中的干扰因素和防控措施。方法 对 ELISA 操作试验步骤进行回顾分析, 总结各种影响因素。结果 ELISA 检测虽然操作简单, 但标本、试剂、加样、温育、洗板、质量控制等因素都会对其结果产生影响。结论 ELISA 检测过程中需重视各种感染因素, 严格按操作规程操作, 从而提高 ELISA 检测质量。

关键词:酶联免疫吸附测定; 灰区; 重复性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.059

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)01-0112-02

酶联免疫吸附法(ELISA)是应用最为广泛的酶免疫测定技术^[1]。其基本原理是将抗原(抗体)在不破坏其免疫活性的条件下预先结合到固相载体表面, 再将待测抗体(抗原)和酶标抗原(抗体)按一定顺序与结合在固相载体上的抗原(抗体)反应并形成免疫复合物, 经洗涤去除反应体系中的其他物质, 使固相载体上的免疫复合物与待测抗体(抗原)的量呈一定比例, 加入酶反应底物后, 底物即被固相载体上的酶催化变为有色产物, 最后根据颜色深浅进行定量或定性分析^[2]。由于酶的催化效率很高, 故可有效放大免疫反应, 提高检测灵敏度, 加之操作简单, 使 ELISA 已成为目前临床检验中应用较广泛的免疫测定方法。本为以检测乙型肝炎病毒表面抗原为例, 探讨 ELISA 操作过程中常见的问题和防控措施。在 ELISA 检测过程中, 常会遇到弱阳性质控品无法检出、处于灰区的弱阳性结果难以报告、重复性差、阴阳性对照品检测均不显色、阴阳性对照品检测均显色或间隔有规律地显色等。ELISA 检测的每一步环节都至关重要, 现将几点体会总结如下。

1 临床标本的采集和保存

(1) 避免使用溶血和混有红细胞的血清标本。血红蛋白(Hb)分子中的血红素基团含有类过氧化物酶的活性物质, 如血清标本中 Hb 浓度较高, 则容易在温育过程中吸附于固相载体表面, 导致以辣根过氧化物酶(HRP)为标记酶的 ELISA 检

测出现假阳性结果^[3]。(2) 尽量避免标本被细菌污染。细菌中可能含有内源性 HRP, 造成假阳性结果。(3) 血清标本储存时间不能过长。2~8℃下保存时间过长可使血清中的 IgG 聚集成多聚体, 导致间接法检测中本底过深, 造成假阳性结果。一般在 2~8℃下保存不可超过 1 周。-70℃以下可长期保存标本, 但不能反复冻融。反复冻融所产生的机械剪切力将对标本中的蛋白等分子产生破坏作用, 引起假阴性结果。(4) 避免在血液标本完全凝固前离心分离血清标本。如在血液标本完全凝固前分离血清标本, 将导致血清中残存未凝固的纤维蛋白原, 后者可在 ELISA 微孔板中形成纤维蛋白凝固性团块, 使待测抗原(抗体)不能与固相抗体(抗原)有效结合, 引起假阳性或假阴性结果。(5) 其他化学物质的影响。乙二醇四乙酸、酶抑制剂(如 NaN_3)可抑制 HRP 活性, 造成假阴性结果。(6) 标本中的内源性干扰物影响检测结果, 常见干扰物包括类风湿因子、补体、交叉反应物质和其他物质等。

参考文献

- [1] 戚庆炜, 孙念怙. 产前唐氏综合征筛查概论[J]. 实用妇产科杂志, 2008, 24(1): 4-7.
- [2] 夏家辉. 医学遗传学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 161.
- [3] 梁雄, 朱峰, 朱兰芳, 等. 3195 例孕中期唐氏综合征的血清筛查和产前诊断临床分析[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(20): 3079-3084.
- [4] 杨灿锋, 陈道楨, 王峻峰, 等. 影响唐氏筛查准确性相关问题的分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(4): 117-118.
- [5] Palacio M, Jauniaux E, Kingdom J, et al. Perinatal outcome in pregnancies with a positive serum screening for Down's syndrome due to elevated levels of free-beta-human chorionic gonadotropin [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 1999, 13(1): 58-62.

(收稿日期: 2012-07-04)

2 试剂准备

(1) 尽量选择高质量的检测试剂。(2) 检测前应将试剂在室温中平衡 20~30 min, 使温育反应步骤中反应微孔的温度可较快达到所要求的温度, 从而避免弱阳性标本出现假阴性结果。(3) 必须使用符合质量要求的蒸馏水或去离子水配制洗板液。

3 检测过程中各环节应注意事项

3.1 质量控制 每次检测均应设置双孔阳性与阴性对照,并绘制标准曲线。

3.2 加入标本及试剂 微量加样器必须经过校准,使用洁净的加样吸管^[4];标本需加在微孔板底部,如加在孔壁上部的非包被区,易导致非特异性吸附;加样速度不可太快,从而保证加样准确性和均匀性;避免标本溅出和产生气泡,从而避免孔间污染及反应界面的差异。试剂使用前需颠倒混匀数次,并垂直加入微孔板中;试剂滴加速度不能太快,否则很容易出现重复滴加或试剂黏附于孔壁上部,从而导致在非包被区出现非特异性吸附,引起非特异性显色,造成假阳性结果;每一步试剂都不可遗漏,否则将导致假阴性结果。

3.3 温育的温度及时间 ELISA 作为一种固相免疫测定方法,抗原抗体的结合反应在固相上进行,且必须保证一定的温育温度和时间。如温育温度较低,可能出现弱阳性标本漏检的情况。为了使反应微孔尽早达到 37℃,可在检测前对微孔板进行温育。检测过程中进行温育时,需在微孔板表面加贴封片,从而防止孔内液体成分蒸发或水珠等杂质滴入孔内引起的污染;封片不能重复使用,以免引起交叉污染。

3.4 洗板 使用符合要求的蒸馏水或去离子水配制洗板液,且洗板液应在临用前配制。严格按操作说明书设定洗板机的各项参数,注意观察洗板液加入量是否充足;保持洗板针通畅,及时清除洗板针内积存的纤维蛋白原等杂质;洗板后须在干净的吸水纸上拍干。

3.5 加入显色剂与终止液 显色剂应在临用前配制,加显色剂不能溅出孔外,加终止液时要避免产生气泡,以免酶标仪比色时结果不准确。

3.6 结果判读 使用酶标仪判读结果时,应注意阴阳性对照空 OD 值设定及试剂盒提供的阴阳性对照品检测值上下限等諸多因素。

4 讨论

ELISA 检测步骤简单,但操作过程中的各个环节都不可

忽视,否则将影响检测结果的准确性^[5]。一般而言,弱阳性质控品无法检出可能与试剂质量缺陷、温育时间及温度不够、显色和反应时间太短或检测用水有问题等有关;检测结果重复性差可能与标本或试剂加入量不准确、加入速度过快导致孔间污染及温育、洗板、显色时间不一致等因素有关;阴阳对照品检测均不显色可能与漏加酶结合物、洗板液中含有酶抑制剂(如 NaN_3)、漏加显色剂及终止液当显色剂使用等因素有关;阴阳性对照品检测均显色或间隔有规律地显色可能与洗板不彻底(如洗板机中无洗板液、洗板针堵孔、洗板机管道密封不严导致不能形成有效负压)、洗板液受酶污染和显色剂变质等因素有关。对于灰区标本(通常将临界值上下限一定范围设为灰区)应重复检测,以避免假阳性和假阴性结果^[6]。

为保证 ELISA 检测质量,在实际工作中一定要按操作规程和试剂说明书的要求进行^[7],重视每一步操作细节,从而保证检测质量,为临床提供准确、可信的诊断依据。

参考文献

- [1] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 244-245.
- [2] 王兰兰. 临床免疫学和免疫检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 91-92.
- [3] 孙艳霞. 简要分析标本溶血对 ELISA 检测血清乙肝表面抗原的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(4): 253-254.
- [4] 谢璟, 崔江龙. ELISA 法对乙肝六项检测结果的影响及处理对策[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 84-85.
- [5] 岳希全, 石宏, 李迎. ELISA 法检测 HBSAg 影响结果的重要因素分析[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(2): 213-215.
- [6] 伍伟健, 郭如华. ELISA 试验灰区设置方法的探讨[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(10): 911-912.
- [7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 618-619.

(收稿日期: 2012-08-28)

• 经验交流 •

210 例肝病患者血清肝纤维化指标检测结果分析

史连盟, 郝玉梅

(西宁市第三人民医院内科, 青海西宁 810005)

摘要:目的 探讨血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)和层黏连蛋白(LN)检测在肝纤维化诊断中的价值及其临床意义。**方法** 采用放射免疫法检测 210 例肝病患者及 55 例健康者血清 HA、PC-Ⅲ、Ⅳ-C 和 LN 水平。**结果** 慢性乙型肝炎(简称慢性乙肝)、肝硬化、肝癌患者血清 LN、HA、PC-Ⅲ和 Ⅳ-C 水平高于健康者($P < 0.05$),肝硬化、肝癌患者血清 LN、HA 和 Ⅳ-C 水平高于慢性乙肝患者($P < 0.05$),肝硬化、肝癌患者血清 PC-Ⅲ水平与慢性乙肝患者比较无统计学差异($P > 0.05$),急性肝炎、丙型肝炎患者血清 LN、HA、PC-Ⅲ和 Ⅳ-C 水平与健康者比较没有统计学差异($P > 0.05$)。**结论** LN、HA、PC-Ⅲ和 Ⅳ-C 是反映肝脏状况和肝纤维化程度的良好指标,动态观察其变化可用于判断患者病情进展,也可用于判断患者治疗效果。

关键词:肝病; 肝纤四项; 肝纤维化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.060

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)01-0113-02

肝纤维化是指由各种急慢性肝病引起的肝脏持续创伤修复反应导致细胞外基质过度沉积和肝功能损伤,进而导致肝脏纤维结节形成并破坏正常肝脏结构,最终发展成为肝硬化而出现肝功能衰退,甚至有演变为肝癌的可能^[1-2]。有学者认为肝

纤维化尚有逆转至正常的可能,而肝硬化则没有,阻止或延缓肝纤维化发生、发展有助于治愈大部分慢性肝病患者,因此肝纤维化早期诊断十分重要^[3]。肝纤维化诊断以组织病理学检查为金标准,但该项检查具有创伤性,且不利于多次进行。为此,笔者检测了多种类型肝病患者血清肝纤维化标志物水平,包