

# 乙型肝炎病毒血清标志物 ELISA 法检测条件的优化

何文英<sup>1</sup>, 彭 宽<sup>2△</sup>, 鞠北华<sup>2</sup>

(1. 抚州市医学科学研究所, 江西抚州 344000; 2. 南昌大学第一附属医院检验科, 江西南昌 330006)

**摘要:**目的 分析和探讨乙型肝炎病毒(HBV)血清标志物 ELISA 法检测条件的优化途径。方法 比较洗板机洗板后用蒸馏水或干净自来水冲洗反应板与不冲洗反应板的临界值标本比例。结果 洗板后用蒸馏水再次冲洗反应板数秒后、用干净自来水再次冲洗反应板与不冲洗反应板的表面抗原临界值标本比例(含临界阴性和弱阳性)分别为 0.52%、2.60% 和 5.56%; 表面抗体临界值标本比例(含临界阴性和弱阳性)分别为 5.52%、8.02% 和 14.86%; e 抗原临界值标本比例(含临界阴性和弱阳性)分别为 2.82%、2.92% 和 3.55%。结论 洗板结束后用蒸馏水或干净自来水再次冲洗反应孔边缘可降低因酶标试剂或显色剂污染反应孔边缘导致的高临界值标本比例。蒸馏水比干净自来水更适合作为反应孔边缘的冲洗液。

**关键词:**乙型肝炎病毒; 酶联免疫吸附测定; 临界值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)12-1618-02

## Optimizing of ELISA assay for HBV serum markers

He Wenyi<sup>1</sup>, Peng Kuan<sup>2△</sup>, Ju Beihua<sup>2</sup>

(1. Institute of Medical Sciences of Fuzhou, Fuzhou, Jiangxi 344000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract:** Objective To analyze and approach the optimizing of ELISA assay for HBV serum markers. Methods To compare the critical value rate of flushing with distilled water, flushing with cleaning tap water and flushing without anything. Results The HBsAg critical value rates of flushing with distilled water, flushing with cleaning tap water and flushing without anything were 0.52%, 2.60% and 5.56%. The HBsAb critical value rates of flushing with distilled water, flushing with cleaning tap water and flushing without anything were 5.52%, 8.02% and 14.86%. The HBeAg critical value rate of flushing with distilled water, flushing with cleaning tap water and flushing without anything were 2.82%, 2.92% and 3.55%. Conclusion Flushing with distilled water or flushing with cleaning tap water can reduce the high critical value rate because of enzyme or developer pollution. Flushing with distilled water exhibits more efficacy than flushing with cleaning tap water.

**Key words:** hepatitis B virus; enzyme linked immunosorbent assay; critical value

ELISA 法是检测乙型肝炎病毒(HBV)血清标志物的定性或半定量方法,且以微孔板条为固相,一般涉及标本收集、保存、试剂准备、加样、温育、洗板、显色、比色和结果判断等步骤,任一步骤操作不当都有可能将导致临界值标本比例上升<sup>[1]</sup>。为提高 HBV 血清标志物检测的准确性,同时也对每位受检者负责,在检测过程中需严格按标准程序进行操作。笔者通过总结临床工作经验,主要分析了加样过程对结果的影响原因,也找到了解决问题的办法:即洗板后通过蒸馏水再次冲洗反应孔边缘数秒来有效降低加样污染所导致的乙肝表面抗原和表面抗体的高临界值标本比例。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 于本院进行 HBV 血清标志物检测的患者和体检者。

**1.2 仪器与试剂** HBV 血清标志物 ELISA 检测试剂盒购自新创生物有限公司;PHOMO 酶标仪,DEM-3 型全自动酶标洗板机购自北京拓普分析仪器有限公司,SH-2(A)酶标板脱水仪购自早稻田(北京)生物科技发展有限公司;KJ-201A 振荡器购自江苏康健医疗用品有限公司。

**1.3 方法** 以干燥真空采血管采集患者和体检者外周静脉血标本,离心后按照试剂盒说明书进行 ELISA 操作。分别统计“洗板后用蒸馏水再次冲洗反应板数秒后”、“用干净自来水再次冲洗反应板”与“不冲洗反应板”的条件下获得的血清标本检测结果。临界阴性的判断标准<sup>[2-4]</sup>: $0.8 < S/CO < 1$ ,弱阳性的

判断标准为  $1 < S/CO < 2$ ,临界值为临界阴性和弱阳性的总和,即  $0.8 < S/CO_{\text{临界}} < 2$ 。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行完全随机设计两样本率的  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

洗板条件对血清标本表面抗原检测结果的影响,见表 1。洗板条件对血清标本表面抗体检测结果的影响,见表 2。洗板条件对血清标本 e 抗原检测结果的影响,见表 3。

表 1 洗板条件对血清标本表面抗原检测结果的影响

洗板条件	n	临界值标本数(n)	比例(%)
不冲洗	2 852	159	5.58
自来水冲洗	2 944	77	2.60*
蒸馏水冲洗	2 760	14	0.52#

\*:  $P < 0.05$ , 与不冲洗比较; #:  $P < 0.05$ , 与自来水冲洗比较。

表 2 洗板条件对血清标本表面抗体检测结果的影响

洗板条件	n	临界值标本数(n)	比例(%)
不冲洗	2 852	423	14.86
自来水冲洗	2 944	236	8.02*
蒸馏水冲洗	2 760	152	5.52#

\*:  $P < 0.05$ , 与不冲洗比较; #:  $P < 0.05$ , 与自来水冲洗比较。

表 3 洗板条件对血清标本 e 抗原检测结果的影响

洗板条件	n	临界值标本数(n)	比例(%)
不冲洗	2 852	423	3.15
自来水冲洗	2 944	236	2.92*
蒸馏水冲洗	2 760	152	2.82#

\*:  $P < 0.05$ , 与不冲洗比较; #:  $P < 0.05$ , 与自来水冲洗比较。

### 3 讨 论

ELISA 法检测 HBV 血清标志物是一种定性或半定量的方法, 很多因素都会干扰检测结果<sup>[5]</sup>。厂商在研发试剂时, 已考虑内源性因素对检测结果的影响, 基本可避免内源性干扰因素对检测结果的影响。就外源性干扰因素而言, 本研究中检出的临界值标本均无溶血、细菌污染和反复冻融等情况。在操作过程中, 要严格按照 SOP 文件进行操作, 但要做到百分之百的规范化确实很难, 再加上 ELISA 方法学检测的局限性, 因此本研究主要从一些细微操作着手研究高临界结果出现的原因来进行分析。

ELISA 法操作过程<sup>[6-9]</sup>包括从标本的采取和保存, 到试剂的准备、加样、保温、洗涤、显色和比色, 再到最后的结果判断。每一个环节都可能引起结果的偏差。试剂的准备: 从冰箱中取出的试验用试剂应待温度与室温平衡后使用。试剂盒中本次试验不需用的部分应及时放回冰箱保存。加样: 在 ELISA 中一般有 3 次加样步骤, 即加标本、加酶结合物、加底物, 加样时应将所加物加在 ELISA 板孔的底部, 避免加在孔壁上, 并注意不可溅出, 不可产生气泡。温育: 在 ELISA 中一般有 2 次抗原抗体反应, 即加标本和加酶结合物后, 抗原抗体反应的完成需要有一定的温度和时间, 这一保温过程称为温育, ELISA 属固相免疫测定, 抗原、抗体的结合只在固相表面上发生。37℃ 是实验室中常用的保温温度, 也是大多数抗原抗体结合的合适温度。洗涤: 洗涤在 ELISA 过程中虽不是一个反应步骤, 但却决定着实验的成败。ELISA 就是靠洗涤来达到分离游离的和结合的酶标记物的目的。通过洗涤以清除残留在板孔中没能与固相抗原或抗体结合的物质, 以及在反应过程中非特异性地吸附于固相载体的干扰物质。显色和比色: 反应的温度和时间仍是影响显色的因素。在一定时间内, 阴性孔可保持无色, 而阳性孔则随时间的延长而呈色加强。适当提高温度有助于加速显色进行。可以说在 ELISA 操作中, 加样是最主要的关键技术<sup>[10]</sup>, 也是最难做到精确的步骤, 应引起操作者的高度重视。因此, 笔者认为本研究中的高临界值标本比例极有可能与标本加样过程中很难完全加到板孔底部有关, 当加样尤其是加

酶结合物时如果碰到孔壁上, 则最后显色的时候容易产生非特异性的颜色, 从而导致临界值标本比例的升高。

本研究显示, 洗板后用自来水冲洗和用蒸馏水冲洗反应板均可有效降低乙肝表面抗原和表面抗体的临界值标本比例, 但对乙肝 e 抗原的临界值标本比例无影响。用蒸馏水冲洗与用自来水冲洗所测的临界值标本比例差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。分析原因为: (1) 用自来水或蒸馏水冲洗反应板数秒能够有效去除反应孔壁上部污染的酶结合物或其他反应试剂; (2) 因蒸馏水的 pH 值更接近反应所需的 pH 要求, 自来水则存在一定的偏差, 因此蒸馏水洗板比自来水更能有效降低临界值标本比例; (3) 对于用蒸馏水冲洗后, 仍然存在较低比例的临界值标本, 它们是特异性的, 出现这种情况可能与病毒感染的量少或者患者刚刚处于感染的初期阶段有关。因此, 结合本科室实际情况, ELISA 法检测 HBV 血清标志物时, 考虑通过加完酶结合物的洗板步骤后, 再次用蒸馏水冲洗反应板数秒来降低临界值标本比例。

### 参考文献

- [1] 汪德宇. 酶联免疫吸附法出现假阳性的原因分析和解决方法[J]. 中国当代医药, 2009, 16(19): 137-138.
- [2] 陈保民. 酶免法检测 HBsAg 中实验操作个体差异及可疑区域的界定[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(5): 904-906.
- [3] 陈保民. 酶免法检测结果可疑区域的界定及应用[J]. 职业与健康, 2001, 17(5): 40-42.
- [4] 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.
- [5] 曹文飞. 酶联免疫测定的干扰因素与对策[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1998, 10(3): 60-64.
- [6] 王支兰. ELISA 试验的质量控制[J]. 现代预防医学, 2004, 31(1): 148.
- [7] Carlander D, Larsson A. Avian antibodies can eliminate interference due to complement activation in ELISA[J]. Ups J Med Sci, 2001, 106(3): 189-195.
- [8] 岳化葵, 陈月, 程娟. 乙肝血清标志物 ELISA 检测过程中的质量控制[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(5): 84-85.
- [9] 张熹. ELISA 操作要求及质量控制[J]. 中国畜牧业通讯, 2008(9): 35-37.
- [10] 段元宏. 浅谈 ELISA 操作中由加样差异造成的 OD 值偏差[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(6): 749-749.

(收稿日期: 2014-02-02)

(上接第 1617 页)

et al. Tumor necrosis factor alpha and high sensitivity C-reactive protein in diagnosis of exudative pleural effusion[J]. J Res Med Sci, 2011, 16(11): 1405-1409.

- [2] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 149.
- [3] Light RW. Pleural effusion[J]. N Engl J Med, 2002, 346(25): 1971-1977.
- [4] 陈志. C 反应蛋白的检测及其临床意义[J]. 国外医学: 临床生物化学及检验分册, 1994, 15(3): 98-99.
- [5] 许凯声, 黄洪, 杨旭峰, 等. C 反应蛋白检测在判断胸腹水积液性质中的价值[J]. 检验医学, 2006, 21(3): 241-243.
- [6] Garcia-Pachon E, Soler MJ, Padilla-Navas I, et al. C-reactive protein in lymphocytic pleural effusions: a diagnostic aid in tuberculous pleuritis[J]. Respiration, 2005, 72(5): 486-489.
- [7] 王立, 吕苏成. CRP 鉴别渗出液, 漏出液性质的可行性观察比较

[J]. 职业与健康, 2000, 16(3): 18.

- [8] 王丹青, 林斌, 孙冰梅. 胸腹水鉴别诊断的实验探讨[J]. 临床医学, 2003, 23(4): 10-11.
- [9] Porcel JM, Bielsa S, Esquerda A, et al. Pleural fluid C-reactive protein contributes to the diagnosis and assessment of severity of parapneumonic effusions[J]. Eur J Intern Med, 2012, 23(5): 447-450.
- [10] Assi Z, Caruso JL, Herndon J, et al. Cytologically Proved Malignant Pleural Effusions Distribution of Transudates and Exudates[J]. Chest, 1998, 113(5): 1302-1304.
- [11] 陆青, 俞国荣. 全血 CRP 测定仪及其试剂的评估[J]. 上海医学检验杂志, 1999, 14(5): 268-269.
- [12] 巩丽颖, 卢燕平, 宋瑞群, 等. 两种方法测定 C-反应蛋白的评价和比对[J]. 中华全科医学, 2011, 9(1): 122.

(收稿日期: 2014-01-16)