

汁进行 HBV-DNA 检测,但相对 ELISA 而言,HBV-DNA 检测操作繁琐,许多医疗单位受检测条件所限,不能开展此项检测,而且乳汁 HBV-DNA 检测阳性率及拷贝数也低于血清^[2]。另一种评价母乳喂养安全性的方法是采用 ELISA 检测乳汁中的 HBsAg,该项检测操作简单,但乳汁具有易稀释性、乳糜微粒可引起屏蔽效应等因素直接影响 ELISA 对 HBsAg 的检测结果,使检测的灵敏度降低。因此如何提高 ELISA 检测乳汁 HBsAg 的阳性检出率值得探讨。

为了部分去除乳汁中的脂质,以减少乳糜微粒的屏蔽效应,本研究参照陈铭等^[3]提出的方法,将乳汁标本在 4℃ 条件下放置过夜,使乳汁分为三层,上层以脂质为主,下层为沉淀物,中间层乳汁则可用于检测。振动式孵育有助于促进孵育过程中抗原与抗体的结合。毛焱等^[4]探讨了振动式孵育在脂浊血清标本 HBsAg 检测中的应用效果,研究结果显示振动式孵育检测的 OD 值及阳性率均高于静置式孵育。薛艳等^[5]的研究也得到了相似的结果,但该项研究同时还发现,中间层乳汁与未处理乳汁的阳性检出率相近,分析原因可能是由于 HBV-M 在上、中、下三层乳汁中分布不均,确切原因则有待进一步探讨。

ELISA 法检测 HBsAg、HBeAg、PreS1 的原理均为双抗体夹心法,而振动式孵育正是通过促进抗原与包被抗体和酶标抗体的结合,从而使反应体系的 OD 值明显上升,同时也提高了阳性检出率。本研究结果显示,振动式孵育检测的 OD 值高于静置式孵育,且尽管中等稀释度标本两种方法检测的 OD 值差值较大,但变化率随着稀释倍数的增加而增高,原因可能在于稀释倍数较低,即抗原浓度较高时,采用两种孵育条件均可使酶标抗体充分结合抗原,加上酶的高催化效率,底物显色完全,OD 值处于平台期,因此两种孵育方法检测的 OD 值较为接近;而在稀释倍数较高时,振动式孵育增加了抗原与抗体的结合

• 经验交流 •

不同洗板方法对 ELISA 检测结果的影响

黄传政,姚春红,邓建平[△]

(湖北省黄石市爱康医院检验科,湖北黄石 435000)

摘要:目的 比较 2 种洗板方法对酶联免疫吸附法(ELISA)乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)检测结果的影响。方法 洗板机法操作步骤为采用洗板机洗板 5 次。改进洗板法为先用洗板机洗板 4 次,拍干后再用纯净水冲淋 2 次。采用 2 种方法对 934 例标本进行第 1 次检测。采用 2 种洗板方法对第 1 次检出的弱阳性标本进行第 2 次检测。结果 2 种方法第 1 次检测的阳性标本检出例数比较差异有统计学意义($\chi^2=4.96, P<0.05$)。第 1 次检测共检出 39 例弱阳性标本。2 种方法对 39 例弱阳性标本进行第 2 次检测,阳性标本检出例数比较差异无统计学意义($\chi^2=0.06, P>0.05$)。结论 需进行大批量标本检测时,采用改进洗板法优于洗板机法,更有利于避免假阳性结果。

关键词:酶联免疫吸附法; 洗板机; 弱阳性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.067

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2015)08-1154-02

酶联免疫吸附实验法(ELISA)操作简单,检测特异度和灵敏度较高,但影响因素较多,如标本前处理、加样、温育、洗板等。此外,虽然 ELISA 检测操作过程中的洗板过程不涉及任何反应,却也同样对检测结果产生一定的影响^[1-4]。笔者分析了不同洗板方式对大量标本和少量弱阳性标本检测结果的影

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 7 月至 2013 年 5 月于本院体检中心

率,酶标抗体结合较多,因而两种方法检测 OD 值差距增大。由于 HBsAg 检测的临界值(Cut-Off 值)较恒定,因此标本 OD 值升高必然可提高阳性检出率。

本研究中,79 例乳汁标本,静置式孵育 HBsAg 阳性检出率为 34.17%,振动式孵育为 41.77%,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。值得关注的是,血清 HBeAg(+)和(或)PreS1(+)产妇的乳汁 HBsAg 检测阳性率接近 100%,提示血清 HBeAg(+)和(或)PreS1(+)产妇应尽量采用奶粉喂养新生儿。乳汁中的待检抗原被稀释及乳糜微粒的屏蔽效应是客观存在的,因此即使检测结果为阴性也不能完全排除传染的可能。母乳喂养有较多的优势,因此对于血清 HBsAg(+),HBeAg(+)和(或)PreS1(+)的产妇,应尽可能进行乳汁 HBV-M 和 HBV-DNA 检测,并根据检测结果判断是否采用母乳喂养。

参考文献

- [1] 田瑞华. 乙型肝炎病毒携带者母乳喂养的安全性研究[J]. 中华护理杂志, 2010, 45(8): 739-740.
- [2] 祝峰, 钱厚明, 周宁. HBV 感染产妇血清和乳汁中 HBV-M 与 HBV-DNA 检测[J]. 武警医学, 2012, 23(8): 692-693.
- [3] 陈铭, 艾彪, 何翰, 等. 乳汁 HBV 标志物检测对乙肝产妇哺乳的指导价值[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(5): 759-760.
- [4] 毛焱, 钱厚明, 徐玮, 等. ELISA 振动式孵育用于脂浊血清标本 HBsAg 检测[J]. 江苏医药杂志, 2004, 30(8): 623-624.
- [5] 薛艳, 赵江燕, 钱厚明. 不同标本处理方法对 ELISA 检测乳汁 HBV-M 结果的影响[J]. 临床误诊误治, 2011, 24(11): 85-87.

(收稿日期:2014-12-14)

[△] 通讯作者, E-mail: 3yue12@sina.com.

接受招工及单位体检的人员 934 例。

1.2 仪器与试剂 DNX-9620A 型洗板机购自北京普朗新技术有限公司, MK3 型酶标仪购自芬兰雷勃公司。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)ELISA 诊断试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司, (批号 20130721, 有效期 20140120), 包括阴、阳性对照品及浓缩洗涤液。HBsAg 质控品购自湖北省临检中心, 浓度为 1 ng/L。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 采用不含抗凝剂的真空采血管采集体检者晨起空腹静脉血 3 mL, 常规离心后分离血清标本并冷藏保存。

1.3.2 洗板方式设定 (1) 洗板方式 1 (洗板机法): 参照试剂盒说明书的要求, 按 1:20 的比例稀释浓缩洗涤液; 完成反应步骤的反应板在洗板机上洗涤 5 次后, 在干净的滤纸上拍干; 显色后采用酶标仪读板, 同时肉眼观察结果。(2) 洗板方式 2 (改进洗板法): 按前述方法将完成反应步骤的反应板洗板 4 次, 然后采用纯净水冲淋反应板 2 次。将微孔板正面倾斜 60°~80°, 采用适中的水流量逐列冲淋反应板^[5]。冲淋完成后迅速甩干, 然后用同样方法再冲淋 1 次, 在干净的滤纸上拍干反应板。显色后采用酶标仪读板, 同时肉眼观察结果。

1.3.3 标本检测 按批次取出冷藏血清标本, 常规复温, 由 2 名检验人员在 3 d 以内分别采用上述 2 种洗板方式对 934 例标本进行 HBsAg 检测。对于第 1 次检测检出的弱阳性标本 (光密度值 0.105~0.42), 由 1 名检验人员在 1 d 以内采用上述 2 种洗板方式进行第 2 次检测。比较各批次检测结果的差异。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料采用例数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 第 1 次检测结果比较 洗板机法和改进洗板法检测 934 例标本, 分别检出 HBsAg 阳性标本 87 和 61 例。 χ^2 检验结果显示, 阳性标本检出例数组间比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.96, P < 0.05$)。不同方法 HBsAg 第 1 次检测结果见表 1。

表 1 不同方法 HBsAg 第 1 次检测结果 (n)

洗板机法	改进洗板法		合计
	阳性	阴性	
阳性	61	26	87
阴性	0	847	847
合计	61	873	934

2.2 第 2 次检测结果比较 2 种方法第 1 次检测共检出 HBsAg 弱阳性标本 39 例, 其中包括第 1 次洗板机法检测结果为阳性的 13 例, 改进洗板法检测结果为阴性的 26 例标本。39 例标本进行第 2 次检测, 洗板机法检出阳性标本 14 例, 改进洗板法检出阳性标本 13 例。 χ^2 检验结果显示, 2 种方法第 2 次检测阳性标本检出例数比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.06, P > 0.05$)。不同方法 HBsAg 第 2 次检测结果见表 2。

表 2 不同方法 HBsAg 第 2 次检测结果 (n)

洗板机法	改进洗板法		合计
	阳性	阴性	
阳性	13	1	14
阴性	0	25	25
合计	13	26	39

3 讨论

在 ELISA 检测过程中, 洗板的目的是去除未结合的酶结合物, 但又不能将已结合的酶标记物质洗脱下来^[6]。常用的 ELISA 洗板方法包括洗板机法和手工洗板法。由于 ELISA 检测灵敏度较高, 而灵敏度和特异度不可能同时达到 100%, 因此多种因素对 ELISA 检测结果造成不同程度的影响, 如标

本溶血、血清标本中存在纤维蛋白凝块、加样过程中混入红细胞、加样时间过长等^[5]。此外, 除了仪器、试剂、环境、标本等客观因素外, 操作人员的技术水平、质量意识等主观因素也极易对检测结果造成影响^[7-10]。

在本研究的第 1 次检测中, 由于标本量大, 需由 2 名检验人员耗时 3 d 完成检测, 期间有可能为了提高检测速度, 忽略了标本的预处理, 导致部分血清标本存在细小的纤维蛋白凝块, 或者未能将酶结合物和 (或) 显色剂滴加到反应孔正底部, 而是挂在相邻反应孔交界处。此外, 采用洗板机洗板时, 吸液针极易被微小凝块堵塞, 无法彻底吸取反应体系或洗涤液。而且, 洗板机无法吸取微小的纤维蛋白凝块和反应孔边缘的酶结合物, 容易导致假阳性结果。本研究中的改进洗板法首先采用洗板机洗涤 4 次, 然后以纯净水温和冲淋反应板 2 次, 不仅有助于洗去反应孔内未结合的酶结合物, 也便于洗去反应孔边缘附着的酶结合物, 最大程度地减少了假阳性结果的出现。

在进行第 2 次检测时, 由 1 名检验人员采用 2 种方法完成 39 例弱阳性标本的检测, 标本预处理、加样、洗板等操作步骤均细致、规范, 符合要求, 因此 2 种方法阳性标本检出例数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 39 例弱阳性标本中, 包括第 1 次洗板机法检测结果为阳性而改进洗板法检测结果为阴性的 26 例标本。在第 2 次检测中, 上述 26 例标本洗板机法检出阴性标本 25 例, 阳性标本 1 例, 说明第 1 次和第 2 次洗板机法检测结果符合性较差, 而改进洗板法第 1 次与第 2 次检测结果符合性较好。

综上所述, 在 ELISA 检测工作中, 只要严格规范操作过程, 采用本文提出的 2 种洗板方法都能得到正确的检测结果, 洗板机法和改进洗板法在检测结果方面没有本质上的差别。然而, 在需要进行大批量标本检测时, 采用改进洗板法可以克服加样不当和洗板机保养不当等因素的影响, 最大程度地避免假阳性结果, 明显优于洗板机法。

参考文献

[1] 郑怀竞, 韩松. 临床检验 ELISA 指南[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994: 89.

[2] 丁文, 薛庆欢, 吴文金, 等. 人为操作因素对酶联免疫吸附法检测乙肝病毒血清标志物影响的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14 (7): 1019-1022.

[3] 冯新国, 李新红, 欧阳淑兰. ELISA 二步法检测 HBsAg 的钩状现象及解决方案[J]. 社区医学杂志, 2013, 12(1): 82-83.

[4] 王一丁. 酶联免疫吸附法检测 HBsAg 结果的影响因素探讨[J]. 海南医学, 2012, 23(1): 103-105.

[5] 郑卫东, 杨均, 彭静, 等. ELISA 检测 HBV-M 洗板方法的改进对检验结果的影响探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(1): 88.

[6] 曾怀跃, 杨贵洪. 两种洗板方法在 ELISA 中的应用分析[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(14): 1857-1858.

[7] 常磊, 孙娅莉, 王伟杰, 等. ELISA 检测过程影响因素及操作注意事项[J]. 河南畜牧兽医: 市场版, 2014, 35(1): 46-47.

[8] 秦凤英. 酶联免疫吸附法与金免疫层析试验在检测梅毒特异性抗体中的应用价值[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(2): 131-132.

[9] 杨晓燕, 陈涛, 郭仲辉, 等. 线性免疫印迹法和酶联免疫吸附法检测抗核抗体的比较分析研究[J]. 中外医学研究, 2014, 12(1): 11-13.

[10] 郝丽, 郝娟. 酶联免疫吸附法对乙型肝炎病毒抗-HBc 假阳性的检测[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 14(1): 136-136.