

3 讨 论

矮小症是指与同地区、同年龄、同性别健康儿童比较,身高低于正常身高 2s 以上,或者低于健康儿童生长曲线的第 300 分位^[4]。儿童矮小症病因复杂,受遗传、疾病、营养、机体内外多种因素影响,与内分泌系统中 GH、甲状腺轴激素、性腺轴等激素的完整和协调密切相关。研究表明,引起儿童身材矮小的原因主要可分为生产激素缺乏型和非生产激素缺乏型两类^[5]。其中部分疾病可通过早期治疗获得较为理想的身高。因此矮小患儿的早期诊断及治疗十分重要。

GH 是垂体前叶促生长细胞合成和分泌的一种肽类激素,是腺垂体含量最多、分泌量最大的一种激素,是控制人体生长发育最重要的激素。GH 的生理作用非常广泛,既促进骨骼生长,也调节代谢,对促进增高起重要作用。GH 受下丘脑分泌的 GH 释放激素及 GH 释放抑制激素双重调剂,在生理条件下,还受饥饿、进食、睡眠、运动、血糖水平等因素的影响。GH 的分泌是呈脉冲式的,在白天血清 GH 的浓度很低,测定基础状态下的 GH 水平不能反映垂体 GH 的储备功能,因此评价矮小患儿是否缺乏 GH 必须进行 GH 激发试验。其中深睡眠、运动试验主要用于筛查,而药物性激发试验(精氨酸、左旋多巴、胰岛素等)则作为确认试验。运动试验是一种安全、经济、便于门诊进行的方法,但结果易被试验的标准和运动的程度所影响,它的灵敏度较低,使阳性率偏低,这将会导致扩大治疗范围,因此有条件时应考虑以药物激发替代。

基因重组人 GH 的问世给生长激素缺乏患者带来显著疗效,但代价昂贵,因此近年对生长激素缺乏诊断准确性的要求提高。有学者认为,采用联合或序贯激发可能优于单种药物激发,而且若两种药物分别经不同途径作用,效果可能更好^[6]。本文结果表明,左旋多巴和精氨酸这两种激发试验阳性率高,一种是口服,另一种是静脉滴注,且原理各异,左旋多巴介导于神经递质多巴胺能途径的兴奋或刺激下丘脑 GH 激素的释放,

以促进 GH 的应答反应,精氨酸介导于抑制下丘脑生长抑制激素的分泌,这两种药物是一对较理想的激发试验组合。行左旋多巴和精氨酸 GH 激发试验,由于服药后会产生恶心、呕吐等不良反应,限制了应用范围,但作为确认试验是必不可少的^[7]。另外,儿童生长激素缺乏的诊断是综合性的,对于 GH 激发结果,尤其是 GH 峰值显示为部分缺乏者,应结合临床其他资料综合判断,积极寻找病因,以免造成误诊,从而取得及时、合理的治疗。

参考文献

- [1] 张文,宋向凤,王辉.人生长激素基因在小鼠体内的高效表达[J].新乡医学院学报,2003,20(4):232-234.
- [2] 朱兰香.身材矮小儿童 378 例病因分析[J].山东医药,2008,48(28):102-104.
- [3] 李智勇,李兴华,季雪静,等.左旋多巴、精氨酸和运动激发试验对脑垂体 GH 分泌的影响[J].放射免疫学杂志,2004,17(5):338-339.
- [4] 韩蓓,朱子阳,石星,等.矮小儿童 309 例的常见病因[J].实用儿科临床杂志,2008,23(8):604-605.
- [5] 鲍秀兰,赵时敏,刘蓉,等.矮小儿童的分类[J].中华儿科杂志,1989,27(2):72-74.
- [6] 李燕虹,杜敏联,马华梅,等.吡啶斯的明与左旋多巴联合激发试验对儿童生长激素缺乏症的诊断价值[J].中华内分泌代谢杂志,2004,20(3):227-230.
- [7] 李玉清,李启亮,张美和.生长激素运动筛查试验与生长激素激发试验对生长激素缺乏症诊断价值的比较[J].实用儿科临床杂志,2009,24(8):601-602.

(收稿日期:2010-04-21)

临床研究

探讨 ELISA 法检测 HIV 抗体的影响因素

罗雯斌(舟山医院中医骨伤院区检验科,浙江 舟山 316000)

【摘要】 目的 探讨酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测抗-人类免疫缺陷病毒(HIV)的影响因素,提高 HIV 初筛试验的准确性。**方法** 将 4 584 例标本中的 7 例初筛试验阳性标本送市疾病预防控制中心(CDC)确证实验室进行确证,并对患者、试剂、样本及操作过程进行分析。**结果** 7 例初筛阳性标本经确证试验仅 2 例为确证试验阳性,认为 ELISA 法检测抗-HIV 抗体的影响因素覆盖了操作中的各个环节,从样本、加样、温育、洗涤到比色,均可能造成试验的误差。**结论** 要提高 ELISA 法检测抗-HIV 的试验的准确度,必须严格按照试剂盒说明书和全国艾滋病检测技术规范来操作,并且重视实验室的质量控制,确保试验的质量。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒抗体; 酶联免疫吸附试验; 影响因素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.042

中图分类号:R446.6;R575.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)20-2252-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)是检测抗-HIV 最常用的方法。此法特异性强、灵敏度高、操作简便,既适合于大批量样本的筛查,也可用于单个样本的测定。但是易受到多种因素的影响,造成假阳性或假阴性。为提高检测结果的准确性,作者结合试验对 ELISA 检测抗-HIV 中常见的影响因素进行探讨和分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2009 年 1~12 月住院和门诊患者

4 584 例血清标本进行抗-HIV 检测(其中术前筛查 4 267 例、性病门诊 19 例、孕产期检查 219 例、其他就诊患者 79 例),常规静脉采血,低速离心分离血清。

1.2 仪器 芬兰雷勃 MK3 酶标仪;芬兰雷勃 MK2 洗板机;芬兰雷勃移液器。

1.3 试剂 北京金豪制药股份有限公司生产的人类免疫缺陷病毒(HIV)1+2 型抗体诊断试剂盒 酶联免疫双抗原夹心法

(国药准字号 20010004)。

1.4 方法 严格按照厂家操作说明书及《全国艾滋病检测技术规范(2009 版)》进行试验操作和结果判断。临界值设定为 cut off 值 = $0.1 + N$ (阴性对照平均值)。标本 A 值小于 cut off 值为阴性, 大于或等于 cut off 值为阳性; 阴性对照 A 值小于 0.02 时, 按 0.02 计算; 阳性对照 A 值小于 0.5, 阴性对照 A 值大于 0.1, 则试验不成立。

2 结果

4 584 例样本共筛查出 7 例初筛试验阳性标本并送市 CDC 确证实验室进行确证, 只有 2 例为确证试验阳性, 其余为阴性。初筛试验阳性率 0.15%, 确证试验阳性率 0.04%, 确证试验阳性占初筛试验阳性的 29%。

3 讨论

在 ELISA 法检测抗-HIV 的过程中存在多种影响因素。

3.1 患者自身因素 患者的内源性物质是影响 ELISA 检测抗-HIV 的因素之一, 常见的抗-HIV 假阳性的人群有: 多次输血史患者、自身免疫患者等。另大约 40% 的人血清中含有非特异性干扰物质(内源性物质), 主要有血清类风湿因子(RF)、补体、自身抗体、交叉反应物质等, 均能影响 ELISA 检测抗-HIV 的测定结果。并且抗体和异质抗原间的交叉反应, 也可在检测中发生多种非特异性吸附作用, 导致出现假阳性^[1]。所以在出现抗-HIV 初筛阳性结果的时候, 也必须结合患者自身的因素来分析判断, 从而提高结果的可靠性。

3.2 试剂因素 现在多数实验室在使用较为先进的第 3 代双抗原夹心法试剂盒, 这种试剂盒具有更好的敏感性和特异性^[2], 但在生产、运输、存储的过程中的多种因素也会影响结果的可靠性。同时在使用时也要做到即取即用或使用小包装, 防止反复冻融, 减少酶的失活。

3.3 样本因素 标本的质量在检验的过程中非常重要。(1)临床上最常用的标本为血清, 特别要注意血清的分离一定要做到完全彻底, 避免纤维蛋白随标本加入反应孔, 因为纤维蛋白会吸附于孔底, 不易被洗掉, 易导致假阳性。(2)冷冻保存血清样本须避免反复冻融, 反复冻融标本所产生机械剪切力对蛋白等分子产生破坏作用, 从而产生假阴性结果。(3)另外溶血标本产生的游离血红蛋白虽然具有过氧化物酶的作用, 可催化底物辣根过氧化物酶(HRP)显色而导致假阳性, 但是在实际操作过程中每次试验都会有 2 次充分的洗板, 最后残余的游离血红蛋白对抗-HIV 的检测没有明显影响^[3]。

3.4 加样 多数的抗-HIV 试剂盒所需的标本量仅为 25~50 μL , 所以血清量的多少对结果影响很大, 作者认为, 在操作中样本及试剂应垂直加样, 不可太快、太猛。若加样过快, 容易溅出和产生气泡, 难以保证加样的准确性, 非垂直加样易加在微孔非包被区, 导致非特异性吸附。加样过猛会使样本溅出对邻近孔产生污染。

3.5 温育 温育是 ELISA 法试验中影响测定的一个关键因素。因此在实际工作中一定要注意以下几点: (1)加样完成后, 将微孔板从室温拿至水浴箱中时, 孔内温度从室温升至 37 $^{\circ}\text{C}$, 需要一定的时间(尤其是在室温比较低的时候), 而在实验室中, 很少有人注意这个问题, 通常是将微孔板一放入温箱即开始计时, 这样就很容易造成实际测定中温育时间达不到标准。所以在日常操作过程中, 最好将温育时间延长 2~3 min, 这样

可以减少因温育时间不足而导致的干扰。(2)有些实验室将微孔板直接放在水浴箱中的试管架上, 并没有直接接触到水的做法是错误的, 应该将微孔板漂浮在水上或把水加至反应孔 1/2 的地方。(3)水浴箱的盖子不能经常打开, 否则也将达不到温度的要求。

3.6 洗板 洗板对 ELISA 检测抗-HIV 来说也是重要的步骤, 因固相免疫测定技术是一种非均相测定技术: 通过洗涤将反应过程中非特异性吸附成份洗脱, 以确认抗原抗体特异性结合; 常用抗-HIV ELISA 初筛试剂盒均以 HRP 作为标记物的洗涤液, 一般为含 0.005g/L 表面活性剂吐温 20(Tween 20)中性磷酸盐缓冲液, Tween 20 浓度不可过高, 超过 0.02g/L 可使包被于固相上的抗原解吸附而影响试验测定下限^[4]。在洗板过程中次数尤为重要, 洗板次数较少, 容易造成残留, 可引起假阳性, 次数多了则可造成抗体结合物的洗脱, 造成假阴性, 经过反复试验, 认为 5~6 次为宜。另外用洗板机洗板的时候要特别注意控制液体的残余量和浸泡时间, 残余量过多或浸泡时间不够, 极易导致洗板不净造成假阳性结果。

3.7 显色 现在国产的抗-HIV ELISA 试剂盒多以 HRP 为标记酶, 以四甲基邻苯胺(TMB)为底物, 底物常为 A、B 两种液体, 在显色时应先加 A 液后加 B 液, 否则有可能出现“白板”的情况。另外在加入终止液后 5~15 min 内必须完成比色, 因为试剂在加入终止液后随着时间的增加, OD 值下降, 导致假阴性的发生。

3.8 质量控制 质量控制对提高 ELISA 法检测抗-HIV 的准确度起着关键的作用, 每一次检测都应该做好室内质控, 有助于提高初筛实验的可靠性。在高、中、低值质控中, 低值(临界值)质控是最为重要的, 低值(临界值)质控是检测试验精密密度最敏感的窗口^[5], 现在多数试剂盒只有阴阳性对照, 没有低值(临界值)质控, 所以在试验之前一定要配置低值(临界值)质控。在做好室内质控的同时, 也要积极参加室间质控的评比, 进一步提高检测的可靠性。

综上所述, 在 ELISA 法检测抗-HIV 的过程中易受到多种因素的影响。这就要求检验人员严格按照试剂盒说明书和全国艾滋病检测技术规范, 每一步操作都应仔细认真, 提高 HIV 初筛试验室的准确性, 为艾滋病的防控工作提供正确的科学依据。

参考文献

- [1] 易浔飞, 徐元斌, 王玉丰. 内源性物质对第 2、3 代抗-HIV ELISA 初筛试验的影响[J]. 中国输血杂志, 2004, 15(4): 243-244.
- [2] 刘佃香, 刘丙现. ELISA 检测抗-HIV 影响因素分析[J]. 牡丹江医学院报, 2008, 29(4): 80-81.
- [3] 殷勤. 溶血对抗-HIV 测定结果的影响[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(10): 2142-2143.
- [4] 李军民, 曾宪飞, 谈昀, 等. HIV 抗体 ELISA 测定中不确定因素探讨[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(15): 封 2.
- [5] 施根林, 何海明, 林国英. 浅析影响 ELISA 试验结果的因素[J]. 实用医技杂志, 2002, 9(4): 265-266.