2.3 CRP 在感染中的作用 多数病毒感染不与 CRP 结合,而是细胞内的结合,相反,直接的损伤和多数细菌感染发生在细胞外,使细胞膜分离,暴露出胆碱磷酸分子和提供一个 CRP 的附着点,通过 IL-6 传递给肝脏,刺激产生活性 CRP,CRP 在细菌感染时增高,而病毒感染时不增高,升高的幅度与细菌感染的程度相符合^[5]。在临床上可鉴别诊断病毒性或细菌性发热疾病及监测感染,明确术后感染并发症对炎症反应过程的筛选^[6]。

2.4 CRP 在手术和意外创伤中作用 CRP 正常合成为 1~10 mg/d,在外科损伤患者血中 CRP 8~10 h 可增加 1 倍,48 h 达到高峰,24 h 后下降。因此在外科损伤等急性事件发生大约 3 d 内测试对指示炎症反应是有用的。

3 CRP 在临床医学中的应用

3.1 CRP 与心血管疾病 CRP 水平高,意味着心脏病、卒中发作的风险比正常情况高 2~5 倍^[7]。在不清楚心脏病风险时进行 CRP 检查可了解心脏病风险及家族病史,对心脏病的诊断大有帮助,如心肌梗死、动脉粥样硬化、原发性高血压、冠心病、冠状动脉综合征等。

3.2 CRP 与糖尿病 CRP 水平升高也是糖尿病等慢性轻微炎症反应的标志。

3.3 CRP 与骨关节疾病 (1)帮助鉴别诊断关节痛、肌痛和不典型背痛;(2)可用于风湿病的处理;(3)CRP 可用于骨关节疾病(风湿性关节炎、强直性脊柱炎、牛皮癣性关节炎、Reiter 综合征、结晶性关节炎骨关节炎、风湿性多肌痛、系统性脉管炎、结缔组织疾病、A 型淀粉样变性)的诊断。

3.4 CRP 与生殖系统疾病 可用于生殖器感染、子宫附件炎(骨盆炎症性疾病)的诊断。

3.5 CRP 与肿瘤 可协助恶性肿瘤的诊断及观察肿瘤治疗效果。

3.6 CRP 与微生物和寄生虫感染。

3.7 CRP 与其他系统疾病。

3.7.1 CRP 与消化系统疾病 (1)可用于帮助鉴别诊断胃肠道症状;(2)可用于区别激惹性肠道综合征和器质性疾病;(3)帮助区分溃疡性肠炎和局限性回肠炎(克罗恩病);(4)可用于鉴别诊断急性胰腺炎、肠道性疾病、阑尾炎。

3.7.2 CRP 与呼吸系统疾病 (1)鉴别诊断病毒性或细菌性发热病(如胸膜炎、肺炎);(2)协助诊断肺部感染、喘息性支气管炎、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、肺动脉高压等。

参考文献

- [1] 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,2006:590-592.
- [2] Gulich MS, Matschiner A, Gluck R, et al. Improving diagnostic accuracy of bacterial pharyngitis by near patients measurement of C-reactive protein (CRP) [J]. Br J Gen Pract, 1999, 439(49): 119-121.
- [3] 托马斯,朱汉民,沈霞,等.临床试验诊断学[M].上海:上海科学技术出版社,2004:667-682.
- [4] 魏明亮,俞善丁,石自明,等.临床检验学[M].北京:科学技术文献出版社,1994.
- [5] 王英侠,宁依群,吴芳丽.血清 C 反应蛋白在鉴别细菌感染和病毒感性疾病诊断中应用[J].现代检验医学杂志,2007,22(6):127.
- [6] 单小鹏,何时平,钱彬,等.C 反应蛋白在预测细菌感染中的作用[J].中华急诊医学杂志,2007,16(3):297-298.
- [7] 胡健,陈润祥,张学民,等.冠心病患者血清 C 反应蛋白水平与冠脉斑块形态的关系[J].中国循环杂志,2004,19(增刊):151-152.

(收稿日期:2010-08-09)

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

卢 振,汪海华(湖北省洪湖市人民医院检验科 433200)

【关键词】 酶联免疫吸附测定; 乙型肝炎; 乙型肝炎抗体; 乙型肝炎抗原

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.02.086 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2011)02-0255-02

自 20 世纪 80 年代以来,酶联免疫吸附试验(ELISA)以其灵敏度较高、特异性较好、价格低廉、开展条件要求不高等特点在各级医学实验室得到了广泛应用,特别是对于乙型肝炎病毒(HBV)标志物(HBV-M)的检测,目前国内大多数实验室均采用 ELISA 一步法,其操作简单,但其检测结果的准确性容易受到多种因素的影响,已成为各级医院实验室最易引起纠纷的检测项目。本文结合临床工作对 ELISA 检测 HBV-M 的影响因素及存在问题作简要讨论,报道如下。

1 影响因素

1.1 试剂因素 试剂盒在到达实验室之前易受各种因素比如运输、温度、时间等的影响,必须在低温环境下运输和保存,以保证其灵敏度不会减低。不同厂家的试剂盒灵敏度存在差异,灵敏度低的试剂盒直接导致低浓度水平 HBV-M 漏检率的增高。试剂盒中的阴性对照吸光度(OD)值较高时,夹心法易产生假阴性,而竞争抑制法易产生假阳性。试剂盒中中和抗原浓

度过高,其敏感性下降,检出率低,假阴性增多。试剂盒的抗原不纯、采用多克隆抗体和酶结合物纯度低等也可导致假阳性结果^[1]。此外,试剂盒使用之前的平衡时间过短,也直接影响低浓度水平 HBV-M 的检出率,应保证 37℃ 15 min。

1.2 标本因素 标本受到细菌污染、溶血、含有纤维蛋白原时均可产生假阳性,标本严重脂血时则造成假阴性,冷冻标本反复冻融可造成假阴性。当血清标本中含有类风湿因子、补体、高浓度的非特异性免疫球蛋白、异嗜性抗体、某些自身抗体、因使用鼠抗体治疗或诊断诱导的抗鼠 Ig 抗体、交叉反应物质等均,可导致假阳性结果。此外,在一级医院及少数二级医院中存在生化与免疫检测使用同一份标本的问题,极易产生交叉污染,造成假阳性结果。

1.3 加样因素 所有试剂盒说明书不论是样本和试剂的加样操作都以准确数字告知,而实际操作大多数实验室除标本使用加样器外,试剂均采用滴瓶滴加,试剂加样的准确度没有保证,

直接影响到结果的准确性。有报道标本加样误差是影响试验结果的常见和主要原因^[2]。加样量的微小增加, S/CO 值明显上升趋势, 如果其变化发生在 CO 值附近, 就可能影响到检测结果的阴、阳性判断。同样加样器套筒、活塞、加样头和吸液、放液速度等均可能影响到加样的准确性, 造成检验结果的误差^[3]。显色剂与终止液的加样量减少, 检测结果的 OD 值会偏高。

1.4 温育和洗板因素 温育的温度偏低或时间过短, 特异性结合不够, 检测 OD 值偏低, 就会导致低值阳性的标本漏报而发出错误结果; 反之, 非特异性结合物附于反应孔, 检测 OD 值会偏高。洗板不彻底, 将使非特异性呈色增高, 造成“花板”现象; 洗板过度会造成部分与固相结合的抗原脱离, 从而影响检测的灵敏度, 使标本检测的 OD 值降低, 这样会引起 OD 值正好在“灰区”或弱阳性结果的漏检^[4]。

1.5 显色因素 显色时间延长或温度增高会导致检测 OD 值增高, 但高 OD 值标本加终止液后黄色很快转化为黄绿色, OD 值反而下降。显色温度低, 结合反应速度慢, 显色不充分; 同样, 显色时间过短也可造成标本检测的 OD 值偏低。

2 存在问题

2.1 操作方法 国际上通用两步法检测程序, 而我国大多数实验室为了追求快速简便都采用一步法, 牺牲了灵敏度, 检测时还面临钩状效应。如采用两步法可有效防止钩状效应的产生和提高弱阳性标本的检出率, 如 HBsAg 低浓度感染者和感染早期带毒者的漏检可能造成 HBV 通过手术、输血等途径传播的严重后果; 有些抗病毒治疗后的患者 HBeAg 的 OD 值可能降至很低水平, 如检测不出, 就可能误导临床治疗效果, 给临床疗效观察提供不可靠的数据。一步法检测抗-HBe 时, 如血清中存在 HBeAg, 就会产生前带现象, 导致抗-HBe 假阳性; 血清中有 HBeAg、抗-HBe 的免疫复合物时, 一步法就检测不出抗-HBe; 一步法检测抗-HBe 处于临界状态时, 易导致假阴性。抗-HBc 检测国际上均采用原倍血清, 而我国大多采用血清稀释后测定, 而且不同厂家试剂稀释比例各不相同, 导致检测结果不一致, 再者也不能通过人为稀释降低阳性率。目前大多数实验室操作时 5 种标志物检测同时加样, 导致加样时间过长, 对于抗-HBe、抗-HBc 检测不能及时加入竞争性酶标记抗体而导致 OD 值下降, 阳性率增高。在结果判读上, 有很多实验室特别是乡镇一级医院均采用肉眼报告, 存在着严重的主观性。另外, 酶标仪、洗板机、加样器的校准也大多未真正开展, 这些问题都应引起重视。

2.2 灰区的设置与报告 国外 ELISA 试剂通常定义一段灰区的检测范围, 结果报告“可疑”, 而国内无一厂家对灰区进行设定, 各医疗机构对灰区的理解也未达成共识。在报告模式上则只报告阳性和阴性, 因此普遍存在结果不一致的现象。忽视弱反应结果尤其是阳性判断值以下的结果将造成该人群的漏检。国产试剂检测存在变异系数大等因素均造成结果差异, 也影响到弱反应的报告。因此, 各实验室应根据检测结果设立合适的灰区和弱阳性标准, 对弱反应标本及少见模式标本进行严格复检, 有条件者可采用定量或者 HBV DNA 检测, 并对结果做必要的说明, 如结果已复查, 建议定期复查或定量检测^[5]。对于结果有争议时, 《全国临床检验操作规程》明确规定应进一步采用中和试验或进行 HBV DNA 测定。目前国内大多数实验室未开展中和试验, 定量检测也只有少数二级医院和三级医

院开展。因此对弱反应结果应复检或追踪检测并慎重报告, 也可借鉴国外模式报告“可疑”。

2.3 保护性抗体的作用 目前有很多医务工作者并不知道保护性抗体浓度这个概念, 知道者也说不出具体数字^[6]。定量检测时, 当抗-HBs ≥ 10 mU/mL 时, 表明抗体对 HBV 有一定的免疫力; 在评价疫苗接种效果时, 若抗-HBs ≥ 100 mU/mL, 说明免疫力可持续很久。有报道定性检测抗-HBs 结果 S/CO 值与定量检测结果进行比较时, 当 S/CO < 10 时无相关性, 当 S/CO > 10 时则具有良好相关性^[6-7]。作者通过近年来对部分人群接种乙型肝炎疫苗后的跟踪检测发现, 当 S/CO > 10 以上时, 连续检测 3~5 年抗-HBs 无明显变化; 当 S/CO < 10 时, 连续检测 3~5 年抗-HBs 持续下降, 其原因有待继续研究论证。

2.4 少见模式的处置 由于抗病毒药物及乙型肝炎疫苗的广泛使用及宿主免疫功能改变, 导致了病毒的变异, 或双抗体或双抗原夹心双位点一步法因钩状效应现象出现假阳性^[8], 或抗原抗体的比例相当、免疫复合物与野生株的存在等, 以致临床检测中出现一些不典型的特殊模式, 如 HBsAg、抗-HBs 同时阳性, 这类抗体不具保护作用, 其亲和力很差; HBV 感染的转归和恢复过程中也会有 HBeAg、抗-HBe 同时存在, 这些都需要复检或追踪检测, 通过定量检测或中和试验加以确认。目前少见模式的结果越来越多, 而最主要的问题是在结果的解释上, 很多临床医生特别是基层医院医生对此类结果不理解, 因为在现有的医学教材及工具书上很少介绍, 只是在专业检验医学杂志上有些报道, 这就需要专家与同道多加研究与宣传。

总之, 为了提高 ELISA 检测 HBV-M 的质量, 各实验室应制订并严格执行系统操作文件, 做好室内质控, 才能保证检测结果的准确性; 对于检测及报告中存在的问题, 有待试剂厂家与实验室操作人员共同努力加以解决。

参考文献

- [1] 李金明. 血液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.
- [2] 袁红, 毛旖, 黄文芳. ELISA 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.
- [3] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 166-178.
- [4] 孙家志. 2 种洗板方式对 HBsAg 检测结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 92.
- [5] 彭静, 管青, 王斌, 等. HBsAg 检测结果弱反应的分析与处置[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(4): 284-285.
- [6] 刘海英, 陈曲波, 刘云峰, 等. 广州地区医疗机构乙型肝炎表面抗体定性检测情况调查[J]. 检验医学, 2009, 24(10): 746-748.
- [7] 陶青, 吴炯, 潘柏申. 抗乙型肝炎病毒表面抗原抗体国产 ELISA 试剂评价[J]. 检验医学, 2004, 19(3): 185-187.
- [8] 单桂秋, 李秋生, 肖韶英. 检测乙型肝炎表面抗原的一步法试剂的钩状效应分析[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(2): 107-108.