

# 内源性疑似干扰物对 ELISA 检测结果的影响

孙 辉, 赵佳强, 孙 刚, 杜彦丹(内蒙古林业总医院检验科, 内蒙古牙克石 022150)

**【摘要】 目的** 探讨样品中存在的一些内源性干扰物(结合胆红素、溶血血红蛋白及乳糜)对酶联免疫吸附试验(ELISA)检测结果的干扰。**方法** 选取双抗体夹心法、竞争法、捕获法、间接法 4 种 ELISA 中具有代表性的 4 个项目, 采用实验添加法将结合胆红素、溶血血红蛋白及乳糜 3 种内源性干扰物添加到新鲜混合血清中配制成极限浓度(结合胆红素浓度为 344  $\mu\text{mol/L}$ 、溶血血红蛋白浓度为 4.95 g/L、乳糜为 1460FTU)样品与正常对照组, 共 24 组同时检测, 并对检测结果吸光度(A 值)进行差异分析。**结果** 上述浓度的内源性干扰物样品 ELISA 4 种方法检测结果与正常对照组检测结果 A 值差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 仅竞争法乙型肝炎病毒 e 抗体阳性的福尔马肼浊度小于或等于 1460FTU 研究组, 与正常对照组的检测结果 A 值差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 当样品中干扰物浓度未超过以上浓度时, 不对 ELISA 的检测结果产生干扰, 但检验工作中仍需注意含有大于以上浓度干扰物质的样品可能会对检测结果产生影响, 对其应采取前处理或重新采血检测的办法。

**【关键词】** 结合胆红素; 溶血血红蛋白; 乳糜; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.05.014 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)05-0543-02

**Effect of suspected endogenous interferents on results of ELISA test** SUN Hui, ZHAO Jia-qiang, SUN Gang, DU Yan-dan (Department of Clinical Laboratory, Neimenggu Forestry General Hospital, Yakeshi, Neimenggu 022150, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the interference of the endogenous interferents existing in samples (conjugated bilirubin, hemolytic hemoglobin and chyle) on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test results. **Methods** 4 representative items double-antibody sandwich assay, competition method, capture method and indirect method in ELISA were selected. The experimental adding method was adopted to add 3 kinds of endogenous interferents conjugated bilirubin, hemolytic hemoglobin and chyle to the mixed fresh serum for preparing the limiting concentration (conjugated bilirubin concentration 344  $\mu\text{mol/L}$ , hemolytic hemoglobin concentration 4.95 g/L, chylous Formazine turbidity 1460FTU) specimens and the negative control group. All 24 groups were simultaneously detected and the detection results were performed the variance analysis. **Results** Comparing the results for above endogenous interferents specimens and normal control group detected by 4 kinds of ELISA method, A value had no significant difference ( $P>0.05$ ). But A value in the results between the specimens of HbeAg positive (chylous Formazine turbidity  $\leq$  1460FTU) and the normal control group detected by the competition method had significant difference ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Interferent with concentration not exceeding the above limiting concentration can not interfere with ELISA test results. But in the laboratory work, the specimens containing interferents with more than above concentrations could affect the detection results, which still needs to pay attention to and adopt pretreating specimen or collect blood for detection.

**【Key words】** conjugated bilirubin; hemolytic hemoglobin; chyle; ELISA

目前酶联免疫吸附试验(ELISA)已被临床检验医学界所广泛使用。由于试验环节较多决定了其影响因素也有很多。溶血、黄疸、乳糜等都被人们称之为影响因素, 其实它们仅仅是疑似干扰物质, 并未真正被列入影响因素的行列, 试剂厂家说明书也没有相关说明。但在日常工作中经常会遇到溶血、黄疸、乳糜的样品, 为明确以上物质是否对 ELISA 方法检测结果产生影响, 保证检测结果的可靠性, 作者针对日常工作中常用的 ELISA 中具有代表性的 4 个项目(双抗体夹心法、竞争法、捕获法、间接法)进行结合胆红素、溶血血红蛋白、乳糜干扰试验和数据分析, 以确定其是否为 ELISA 方法的干扰物质。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 BioTeke Elx808 酶标仪。

1.1.2 试剂 乙型肝炎表面抗原(批号 20090406)、乙型肝炎 e 抗体(批号 20090326)(上海科华生物工程股份有限公司), 甲

型肝炎病毒 IgM 抗体(批号:AM20090503, 北京万泰生物工程股份有限公司), 丙型肝炎病毒抗体(批号 20090201, 上海荣盛生物工程股份有限公司)。

1.1.3 干扰物 希森美康株式会社生产的干扰检查·A 试剂盒(批号:ZS8003), 为干粉制品, 2 mL 蒸馏水复融, 其中包括结合胆红素 3440  $\mu\text{mol/L}$ 、溶血血红蛋白 49.5 g/L、乳糜 1460FTU(福尔马肼浊度)各一瓶, 相应的空白液各一瓶。

1.2 对象 正常对照组(C): 每个项目选择阴性、阳性 2 种样品, 每种样品随机选取 20 份非黄疸、溶血、乳糜的新鲜血清进行混合, 将 3 种干扰物对应的空白液分别加入阴性样品(阴性对照组)和阳性样品(阳性对照组)中作为正常对照组。研究组(S): 将与空白液同等体积的 3 种干扰物分别加入对应的阴性样品(阴性研究组)和阳性样品(阳性研究组)中作为研究组。

### 1.3 方法

1.3.1 研究内容, ELISA 中的双抗体夹心法、竞争法、捕获

法、间接法反应原理不同, 所以为了全面衡量疑似干扰物质对 ELISA 检测结果的影响, 此次选出每种方法中的一个项目进行干扰试验。

**1.3.2 干扰检查**·A 试剂盒说明书所给的最高浓度为新鲜血清体积的 10%, 将以上浓度的干扰物按 1:9 比例加入到混合的新鲜血清中, 制备成干扰检查·A 试剂盒说明书所指的含有极限浓度的样品(即结合胆红素浓度 344 μmol/L、溶血血红蛋白浓度为 4.95 g/L 以及乳糜的福尔马肼浊度为 1460FTU)。

**1.3.3 制备好的每个样品**(正常对照组和研究组)均需同时检测 20 孔, 由于干扰物的不稳定性, 决定了干扰物质从制备到进行 ELISA 的间隔应等同于日常工作所规定的时间间隔(约 2 h)。ELISA 加样应按照 C1, S1, C2, S2……C10, S10 的顺序进行配对操作, 并记录下每个样品测定的吸光度(A 值)。

**1.4 结果判断** 相应浓度的内源性干扰物的 ELISA 4 种方法的检测结果与正常对照组检测结果 A 值比较用 SAS 进行方差分析(ANOVA)。

**2 结果**

**2.1 试验结果** A 值见表 1。

**2.2** 当样品中结合胆红素浓度小于或等于 344 μmol/L、溶血血红蛋白浓度小于或等于 4.95 g/L 以及福尔马肼浊度小于或等于 1460FTU 的乳糜时, ELISA 4 种方法(双抗体夹心法、竞争法、捕获法、间接法)的 23 对研究组检测结果与正常对照组检测结果 A 值差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 仅竞争法乙型肝炎 e 抗体阳性的福尔马肼浊度小于或等于 1460FTU, 样品与正常对照组的检测结果 A 值差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 干扰试验结果( $\bar{x} \pm s$ )

项目	阴性样品		阳性样品	
	阴性对照组	阴性研究组	阳性对照组	阳性研究组
<b>乙型肝炎表面抗原</b>				
乳糜	0.007 0±0.009 3	0.005 1±0.001 7 <sup>a</sup>	2.235 2±0.251 3	2.374 2±0.202 1 <sup>b</sup>
结合胆红素	0.060 9±0.019 1	0.062 8±0.019 9 <sup>a</sup>	2.016 5±0.358 7	2.064 0±0.258 4 <sup>b</sup>
溶血血红蛋白	0.000 5±0.001 7	0.000 8±0.002 9 <sup>a</sup>	3.398 5±0.353 4	3.321 6±0.283 3 <sup>b</sup>
<b>乙型肝炎 e 抗体</b>				
乳糜	1.409 8±0.169 1	1.292 9±0.083 9 <sup>a</sup>	0.070 6±0.006 9	0.074 3±0.007 1 <sup>c</sup>
结合胆红素	1.027 0±0.098 1	1.070 1±0.077 9 <sup>a</sup>	0.057 2±0.010 2	0.053 2±0.009 4 <sup>b</sup>
溶血血红蛋白	0.985 6±0.099 4	1.020 3±0.133 6 <sup>a</sup>	0.053 6±0.020 1	0.050 2±0.005 6 <sup>b</sup>
<b>甲型肝炎病毒 IgM 抗体</b>				
乳糜	0.001 9±0.000 6	0.001 2±0.000 9 <sup>a</sup>	0.173 8±0.016 8	0.168 0±0.016 2 <sup>b</sup>
结合胆红素	0.002 1±0.000 3	0.002 0±0.000 4 <sup>a</sup>	0.956 3±0.059 1	0.931 1±0.053 3 <sup>b</sup>
溶血血红蛋白	0.002 2±0.002 9	0.001 4±0.000 5 <sup>a</sup>	0.053 6±0.067 8	0.946 3±0.068 5 <sup>b</sup>
<b>丙型肝炎病毒抗体</b>				
乳糜	0.010 8±0.002 3	0.010 9±0.002 0 <sup>a</sup>	3.422 7±0.246 4	3.477 5±0.196 8 <sup>b</sup>
结合胆红素	0.059 8±0.018 2	0.059 9±0.015 2 <sup>a</sup>	2.474 0±0.442 9	2.552 0±0.322 6 <sup>b</sup>
溶血血红蛋白	0.061 3±0.019 1	0.063 3±0.018 9 <sup>a</sup>	2.118 3±0.382 6	2.176 7±0.278 4 <sup>b</sup>

注: 阴性研究组检测结果与阴性对照组比较, <sup>a</sup> $P>0.05$ ; 阳性研究组检测结果与阳性对照组比较, <sup>b</sup> $P>0.05$ ; 阳性研究组检测结果与阳性对照组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ 。

**3 讨论**

ELISA 由于测定灵敏、特异、操作简便, 是目前应用最广的免疫测定技术。干扰试验结果说明, 当样品溶血血红蛋白浓度小于或等于 4.95 g/L 时, 对 ELISA 4 种方法(双抗体夹心法、竞争法、捕获法、间接法)的检测结果不造成干扰, 与部分研究提出的干扰物的浓度、结论基本一致<sup>[1-4]</sup>; 与王红<sup>[5]</sup>报道溶血对乙型肝炎表面抗原测定会产生影响, 发现样品的 OD 值有随溶血程度的增加而轻微升高的趋势<sup>[5-6]</sup>的结论不同, 主要是因为干扰物的浓度和分析方法不同。黄疸样品在日常工作中是不可避免的, 试验证明结合胆红素浓度小于或等于 344 μmol/L 不会对 ELISA 方法产生干扰。与宋炳荣等<sup>[4]</sup>报道总胆红素(TBIL)36.8 μmol/L、直接胆红素(DBIL)22.2 μmol/L 时乙型肝炎表面抗原假阳性率 46.7%, 乙型肝炎核心抗体假阳性率 33.3% 差异有统计学意义的结论不同, 主要是由于使

用的干扰物质和试验方法不同的原因。本次试验说明中、轻度溶血、黄疸无需重复采血检测, 但应注意超过含有试验浓度干扰物的样品需重新采样检测。

乳糜样品日常工作中也经常遇见, 当样品中含福尔马肼浊度 1460FTU 的乳糜时, ELISA 4 种方法(双抗体夹心法、竞争法、捕获法、间接法)的 7 对研究组检测结果与正常对照组检测结果 A 值差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 仅竞争法乙型肝炎病毒 e 抗体(阳性样品)阳性的福尔马肼浊度小于或等于 1460FTU 研究组与正常对照组的检测结果 A 值差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但 ELISA 4 种方法阴性的福尔马肼浊度小于或等于 1460FTU 研究组与正常对照组的检测结果 A 值差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 故认为此次试验浓度小于 1460FTU 的乳糜样品对 ELISA 的检测结果不会产生干扰。与汪建国和周莺莺<sup>[6]</sup>认为脂质小粒会黏附在反应孔内壁, (下转第 546 页)

续表 1 143 株鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的耐药结果

抗菌药	耐药株数	耐药率(%)
氨曲南	125	87.41
妥布霉素	113	79.02
庆大霉素	134	93.71
头孢他啶	108	75.52
头孢噻肟	125	87.41
左氧氟沙星	127	88.81
哌拉西林	114	79.72
复方新诺明	128	89.51
头孢哌酮/舒巴坦	20	13.99

### 3 讨 论

**3.1** 鲍曼不动杆菌是一种条件致病菌,近几年来已成为医院感染的重要致病菌之一,且呈逐年增加的趋势。不动杆菌广泛存在于医院环境中,尤其是 ICU 患者长时间使用呼吸机、气管插管等,极易获得不动杆菌的感染<sup>[2-3]</sup>。本院 93.01% 鲍曼不动杆菌分离自痰标本,高于张晓兵等<sup>[4]</sup>报道;87.41% 的鲍曼不动杆菌来自 ICU。因此 ICU 应加强消毒隔离,尤其是手卫生,阻隔各种可能的传播媒介,避免鲍曼不动杆菌的交叉感染。

**3.2** 氨基糖苷类抗菌药物作为一类高效、广谱的抗菌药物,因其具有浓度依赖性的快速杀菌、可与细胞壁活性抗菌药物产生协同作用的特点,一直是临床上治疗革兰阴性菌所致严重感染的重要药物<sup>[5]</sup>。但随着广谱抗菌药物的大量使用和抗菌药物选择性压力在不断增加,多重耐药(同时耐 3 种以上不同类型的抗菌药物,如 β-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类等)鲍曼不动杆菌的比例在不断增加,特别是近年来由于碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用,出现了对常规抗菌药物全部耐药的菌株。本院 143 株鲍曼不动杆菌中泛耐药菌株有 16 株,占 11.18%。

**3.3** 国内资料表明,鲍曼不动杆菌约占临床分离不动杆菌的 70% 以上。鲍曼不动杆菌对第 3 代和第 4 代头孢菌素的耐药率已达 63.0%~89.9%<sup>[6]</sup>,本文分析结果与之一致。对 4 种氨基糖苷类(阿米卡星、庆大霉素、奈替米星、妥布霉素)和环丙

沙星的耐药率均达 96.3%<sup>[7]</sup>,本院为 60%~80%,略低于文献报道。

**3.4** 我国目前的绝大多数菌株对亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦和多黏菌素 B 保持敏感,但在呼吸道感染的治疗中效果较差。鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物具有天然的耐药性,其主要耐药机制是外膜微孔蛋白形成的通道小,从而导致外膜通透性低,抗菌药物不易进入。近年来,鲍曼不动杆菌给临床的抗感染治疗带来了很大的困难,又出现了泛耐药菌株,因此要根据药敏试验结果合理选择抗菌药物;同时做好各种医疗器械消毒灭菌工作,加强医护人员的无菌操作观念及无菌操作技术的培训。临床科室必须与微生物室保持密切联系,加强信息交流,以便及时有效地控制和减少鲍曼不动杆菌引起的院内感染。

### 参考文献

- [1] 王金良. 密切注视鲍曼不动杆菌的耐药发展趋势[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 355.
- [2] 汤桂丽. 鲍曼不动杆菌医院感染分布特征及耐药性分析[J]. 中国药业, 2010, 19(12): 27-28.
- [3] 田连芳. 112 株鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(13): 341-342.
- [4] 张晓兵, 龚雅利, 刘智勇, 等. 鲍曼不动杆菌的临床分布特征及耐药趋势分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 428-430.
- [5] 潘韵峰, 周华, 俞云松. 导致高水平氨基糖苷类抗生素耐药的新型 16SrRNA 甲基化酶研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(6): 699-701.
- [6] 张军民, 吴坚, 陈民均, 等. 鲍曼不动杆菌 5 年耐药性监测结果分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1): 51-53.
- [7] 宁美诚, 王开翔. 抗菌药物后效应与临床合理用药[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 24(4): 238.

(收稿日期: 2010-09-10)

(上接第 544 页)

由于洗涤液多为非离子型洗涤剂,很难洗掉反应板上的非特异性吸附干扰物质,引起吸光度 A 值升高,这样进行 ELISA 检测乙型肝炎表面抗原,就容易造成假阳性结果的结论不同;与徐学新等<sup>[7]</sup>认为不同程度的乳糜血液随放置时间的延长,OD 值下降,灵敏度降低,并出现不同程度的漏检的结论亦不同。虽然在临床检验工作中可以通过高速离心的方式将乳糜微粒去除掉,但这样处理是否会影响样品的检测结果还无法考证。本次试验说明无需去除乳糜微粒,但要在规定的时间内完成检测过程,同时注意超过含有试验浓度干扰物的样品需重新采样检测。

日常检验工作中只有明确样品因素对检测结果的影响,在排除这些不利因素的情况下,才能正确分析检测结果,保证检测结果的准确性。

### 参考文献

- [1] 张利泉, 杨杰, 孟淑欣. 溶血对 ELISA 方法检测 HIV 抗

体的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2161-2162.

- [2] 胥加耕. 不同程度溶血对四种梅毒血清学检测方法的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(3): 545-546.
- [3] 毛跃, 田洪淑, 张碧霞, 等. 不同程度的溶血对 ELISA 一步法检测 HBsAb 的影响[J]. 西南军医, 2007, 9(3): 4.
- [4] 宋炳荣, 杜彩霞, 崔娜, 等. ELISA 一步法检测乙型肝炎病毒标志物影响因素的实验研究[J]. 实用医技杂志, 2004, 9(11): 1836-1838.
- [5] 王红. 溶血样品对乙型肝炎表面抗原检测的影响[J]. 华夏医学, 2007, 20(4): 810-811.
- [6] 汪建国, 周莺莺. 溶血、脂浊样品对 ELISA 法检测 HBsAg 结果的影响[J]. 现代实用医学, 2009, 21(8): 818-819.
- [7] 徐学新, 韩海心, 余东. 乳糜血样对酶联免疫吸附试验检测结果的影响[J]. 中国医药指南, 2008, 6(23): 30-31.

(收稿日期: 2010-09-16)