

际工作中,由于 ELISA 灵敏度高、特异性强、简便快速、成本低,且不需要昂贵仪器,适合于大批量标本检测,故被普遍使用^[1-2]。ELISA 有诸多影响检测结果的因素,如试剂、标本、操作及温度等。在实际工作中检验人员严格遵守操作规程,对这些因素都能注意防范,但是,很多实验室内环境温度都随着季节的变化而自行升降温度。本文以乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)为例,对比了实验室环境温度的改变对 ELISA 检测结果的影响,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2011 年本院门诊、病房、体检人群中收集的无溶血、无乳糜颗粒的 HBsAg 阳性血清 60 份,分别用子弹头试管分装于-20℃冰箱保存备用。

1.2 试剂与仪器 北京普朗 DNM-9602 型酶标仪,北京万泰公司的 HBsAg 酶免试剂盒

1.3 方法 在相同的试验条件下,将备用血清恢复至室温,实验室环境温度分别调至 18、25℃,设双孔阳性对照,双孔阴性对照,一孔空白,一孔质控。在不同的温度下按照试剂盒说明书(二步法)进行操作,试剂均在室温下平衡 30 min。每份标本双孔检查,用酶标仪读取各孔 A 值。HBsAg 阳性标本包括可疑阳性(0.105 0≤A<0.210 0)和阳性(A≥0.210 0)。使用省临床检验中心购买的室内质控。

1.4 统计方法 采用临床医师统计学助手 V3.0 软件进行统计。采用配对 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

检测结果见表 1。经配对 t 检验,两组之间差异有统计学意义(P<0.05)。25℃时 A 值均值为 0.509 2,18℃时 A 值均值为 0.302 2,25℃时 A 值明显高于 18℃时 A 值。有 17 份标本在 25℃时检测为阳性,A 值在 0.105 0~0.300 0 之间,18℃时检测为阴性,漏检率 28%。质控标本 25℃时 A 值为 0.544,18℃时 A 值为 0.112。

表 1 同一标本两种温度下检测结果(n=60)		
温度	A 均值	S/CO 均值
25℃	0.509 2	4.850
18℃	0.302 2	2.878

3 讨论

ELISA 在检测过程中影响因素很多,如仪器、试剂、标本、

操作及环境等因素。尤其是酶对温度非常敏感,温育过程是 ELISA 测定中影响测定结果最为关键的因素,温度的控制就显得特别重要。酶反应的最佳温度为 37℃,但是在日常实际操作时,却忽略了从室温平衡的温度逐步上升到 37℃需要相对比较长的时间,从 24℃升到 37℃需要大约 17 min^[3],对于一个中型医院的临床免疫检验室(二级生物安全实验室)来说,每一批次的标本量加样大约需要 15~30 min,正好可以缓冲升温的这十几分钟。如果标本量过大,应分批次检测。室温过低,则会使升温时间延长,无法保证设定温度下足够的温育时间,而导致酶反应不完全,使结果偏低,出现假阴性。另外试剂及板条从冰箱内取出恢复到室温需要较长时间。ELISA 以酶催化底物显色判断结果。温度高,显色深,S/CO 值高,温度低;显色浅,S/CO 值低,弱阳性标本很容易变成阴性而导致漏检。

夏季由于温度较高,实验室工作人员还要穿厚重的防护服,很多实验室将室温调至 18℃左右。由对比试验可以看出,室内温度过低对检测结果影响很大,极易造成弱阳性标本的漏检。因此将室温控制在(25±1)℃,试剂室温下恒温 30 min 后操作,同时实验时每板要加入低值弱阳性临界值质控血清作室内质控,以监控 ELISA 的成功与否及试剂的灵敏度,目的是使实验室测定结果趋于稳定^[4],降低弱阳性标本的漏检率,保证结果的准确性及良好的重复性。

参考文献

[1] 孙辉,赵佳强,孙刚,等. 内源性疑似干扰物对 ELISA 检测结果的影响[J]. 检验医学与临床,2011,8(5):543-544.
[2] 贾晓平,黄爱龙. 乙型肝炎病毒标志物胶体金试纸和 ELISA 方法学比较[J]. 重庆医学,2002,31(5):401-402.
[3] 曹庆宏,刘素珍,朱广亮. 孵育设备对 ELISA 检测试验的影响[J]. 中国输血杂志,2005,18(2):128-129.
[4] 郑怀竟. 免疫学检验室间质评与室内质控[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997:38-61.

(收稿日期:2011-12-19)

乙型肝炎检验的假阴性与假阳性结果原因分析

谭旭明(广东省东莞市黄江医院检验科 523750)

【摘要】 目的 提高检验结果的正确率,避免人为因素导致乙型肝炎(下称乙肝)检验结果假阳性或假阴性现象的出现,为临床诊断提供真实可靠的依据。方法 统计 2009 年 1 月至 2010 年 1 月门诊实验室检验结果假阳性或假阴性乙肝患者的资料,并对检验结果进行分析。结果 造成检验结果出现假阳性或假阴性的因素是多样的,其中最主要的影响因素是实验室操作占 52.00%,试剂占 27.93%、检验方法占 16.05%、其他占 4.02%。结论 为提高乙肝检验结果的真实可靠,需要临床医生、实验室医生、患者及患者家属的密切配合。

【关键词】 乙型肝炎; 假阴性; 假阳性

DOI:10.3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 09. 043 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2012)09-1105-02

乙型肝炎(下称乙肝)病毒表面抗原(HBsAg)的检测通常采用胶体金免疫层析法及酶联免疫吸附试验(ELISA)。ELISA 操作简单、试剂方便易得、技术可靠,自 20 世纪 90 年代以来 ELISA 的特异性及灵敏度得到显著改善,因此,尽管当

前 HBsAg 的检测新技术如化学发光法、聚合酶链反应、时间分辨免疫荧光法及电化学发光法等被不断建立、应用,但 ELISA 作为一项科学、成熟的 HBsAg 检测技术仍有其较大的临床应用价值。在临床工作中,经常有患者患病但检验结果阴

性或患者未患病检验结果却显示阳性,给临床工作带来极大的麻烦。这就需要仔细分析检验单中的阴性结果与阳性结果,需要在检验试剂、仪器、方法等方面下功夫,以提高正确率。作者统计了本院门诊 7 万次的检验结果发现,临床上乙肝的报告结果出现假阳性或假阴性的较多。本文对乙肝检验结果出现假阴性结果与假阳性结果的原因进行分析,并提出解决办法,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所涉及对象均为 2009 年 1 月至 2010 年 1 月在本院门诊实验室进行乙肝检验的患者,患者年龄 0~84 岁,平均 45.5 岁,男女比例约为 1:1。

1.2 方法 将 2009 年 1 月至 2010 年 1 月在本院门诊实验室做过乙肝检验的 7 万份检验结果进行抽样检查,统计检测结果的错误情况,并总结分析造成这些检测结果错误的原因。

2 结 果

门诊实验室对 7 万份检验结果进行分析发现,结果错误共 623 份(0.89%),假阳性结果 276 份(0.39%),假阴性结果 347 份(0.50%)。导致检验结果错误的因素有实验室操作、试剂、检验方法及其他,见表 1。

表 1 检测结果错误影响因素统计[n(%)]

错误结果	实验室操作	试剂	检验方法	其他
假阳性	145(23.27)	76(12.20)	42(6.74)	11(1.77)
假阴性	179(28.73)	98(15.73)	58(9.31)	14(2.25)
合计	324(52.00)	174(27.93)	100(16.05)	25(4.02)

3 讨 论

目前 HBV 感染已呈全球性分布趋势,其属于一种常见病、多发病,主要通过血液和血液制品传播。最新统计每年全球新发感染病例约 5 千万,每年约 100 万人因乙肝发病死亡。在我国 HBsAg 阳性率约占 10%,由此可见乙肝的发病率在我国是非常高的,乙肝是当前严重危害人们身体健康的传染病之一。HBV 感染后的病程和转归受多种因素影响,它的疾病谱要取决于病毒与人体免疫应答相互作用的结果^[1]。因此,对乙肝的假阴性与假阳性结果进行分析尤为重要。

ELISA 敏感性好且操作简便。目前酶免法检测人类免疫缺陷病毒抗体试剂有美国的雅培、上海科华、北京万泰等,敏感度几乎可以达到 100%,特异性 98.1%~99.8%,并且可用于批量操作,但缺点是有一定假阳性^[2]。ELISA 检测的准确性会受到许多因素的影响,如检测时间、血细胞^[3]、加样量、洗板方式、血清分离等。另外,标本的充分离心与否对假阳性的产生有重要影响。引起这种情况的原因是因为离心不充分的上清液中含有不等量的过氧化物酶,当含有这些细胞成分的血浆加样于反应孔中时,黏附于板条上,不易洗去,导致辣根过氧化物发生酶样作用而显色,导致假阳性^[4]。其次,血清中的补体可与 IgG 的 Fc 段结合,也可造成假阳性;再次,若在血清中存在类风湿因子,其可同抗体结合,也会造成检测结果假阳性;最后,若标本中存在免疫球蛋白聚合物,其可吸附于塑料的表

面,产生非特异性吸附,同样可导致检测结果呈假阳性。

为有效减少检测结果假阳性的出现,取得准确的结果,可采取以下措施:(1)使用前将试剂盒平衡至室温;(2)在使用抗凝血标本时,若溶血标本不可检验,应重新抽血^[5];(3)抽血后将其置于温水中 2 h 待凝块收缩后再加大离心时间和离心速度以 3 000 r/min 进行离心,使纤维蛋白和红细胞完全沉淀;(4)待标本放置 10 h 后再行检测,保证血凝块收缩良好,使标本中的非特异性活性物质部分或全部失活,降低非特异性反应。

因为 ELISA 具有操作简单,方便的优点,所以广泛为医疗单位所接受。但是这种方法存在局限性,这是因为如果抗原及酶结合物浓度低,吸光度值太小,易出现假阴性结果;若浓度太高,吸光度值偏大,就会出现乙肝患者或 HBV 携带者漏检的情况^[6]。一旦发生漏检,不仅延误了患者的临床诊断及最佳治疗时机,也给血库工作带来了极为严重的危害,患者将会因为输注漏检的 HBsAg 阳性、乙肝病毒 e 抗原阳性、乙肝病毒核心抗体阳性献血者的血而造成终生遗憾。因此,血库安全应引起卫生、医疗、预防等相关部门的高度重视,建议对献血人员的检查由原来的单项表面抗原检查更改为乙肝 5 项检测,做到万无一失。

对以上这些常见的患者出现假阴性或假阳性情况的原因分析可以得出以下结论。为提高实验室检验结果的准确性,应该加强以下几方面的工作:(1)作为实验室的工作人员应严格检查试剂、仪器,杜绝因为操作不当而导致检验结果的错误。(2)强烈呼吁临床医生在对患者进行相关实验室检查前,对患者进行详细的检查,认真询问相关病史及服药情况。(3)呼吁患者严格遵守医嘱,比如:检查前空腹、停药等。只有三方共同努力,密切配合,才能降低实验室检查结果的假阳性与假阴性率,才能为临床诊断提供可靠依据。

参考文献

[1] 陈维玉,吕凤艳.乙型肝炎病毒感染的自然病程[J].职业与健康杂志,2007,17(23):1550-1551.

[2] 宋兴华,姜世辉,向华国. HIV 检验技术的研究进展[J].实用医学杂志,2006,5(14):10.

[3] 施纪文,徐简华,温惠萍. ELISA 法和胶体金免疫层析法检测乙肝表面抗原的比较[J]. 现代检验医学杂志,2005,20(5):48-49.

[4] 雷震,谢楠,敖琴芳,等. 加酶时间对 ELISA 定性测定 HBsAg 的影响[J]. 现代检验医学杂志,2007,22(5):20-22.

[5] 黄秋芳,王薇,李永. ELISA 检测 HBsAg 复检结果的分析[J]. 检验医学,2004,19(4):603.

[6] 林嘉友,秦晓光. 掌握抗体检测的临床意义与实验要求[J]. 中华医学检验杂志,2000,23(3):133-134.

(收稿日期:2011-12-13)