

酶联免疫吸附试验在实验室应用中的质量控制

吴正铜 综述, 韦理关 审校(广西壮族自治区环江县疾病预防控制中心 547100)

【关键词】 酶联免疫吸附试验; 应用; 质量控制

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.09.050 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)09-1147-03

质量控制是运用现代科学管理技术和数据统计学的方法,使实验室的检验结果控制在允许的范围所采取的一系列有效措施。酶联免疫吸附试验(ELISA)具有操作简单、灵敏度高、特异性强、快速稳定及不需要特殊设备等优点。ELISA 已广泛应用于各种抗原和抗体测定,但其影响因素较多,其中任何因素控制不当都会对检测结果产生严重影响。因此,必须加强 ELISA 检测的全面质量控制,才能保证实验室检测结果的准确可靠。综合目前国内外总结资料,结合作者工作经验,现将 ELISA 使用过程中需要加以控制的关键因素综述如下。

1 人员素质

实验室检验人员必须熟练掌握 ELISA 的原理、检测试剂和检测仪器的性能、操作方法、实验室质量控制及生物安全等方面的知识,有较丰富的免疫血清学理论知识和操作经验,具有独立分析判断与处理检测结果异常值的思维能力。人员素质的高低将直接影响检测结果及影响有关数据的处理能力。

2 实验环境

2.1 室内温度对检测结果的影响非常大,特别是试剂的室温平衡,因此实验室应安装冷暖空调,使环境温度控制在 20~25℃。

2.2 实验室环境中氯离子对 TMB 显色也有很大影响,当氯离子浓度增高时,可使 TMB 显色,从而造成假阳性,这就要求实验室不能用含氯离子的消毒剂^[1]。

3 仪器

3.1 移液器 移液器应送计量检定校准部门检定或校准。同时实验室也应不定期的使用万分之一的电子天平进行蒸馏水称量法校准,误差控制在 0.10 以内。

3.2 水浴箱 水浴箱应送计量检定校准部门校准。温度的高低将直接影响试剂和样品的反应速度,应严格控制水浴箱内的温度,注意水浴箱盖的密闭性,往往水浴箱温度计所指示的温度与箱内的实际温度有一定的误差,必要时水浴箱内应放置温度计加以核准。

3.3 洗板机 根据各种洗板机要求不同进行必要的调试,包括洗板机的针头吸水高度、放水高度、泵的压力、加液量、浸泡时间、洗涤次数及检测试剂对洗板机的其他要求。同时,洗板时应注意管道的气泡及针头的通畅情况,最好进行预洗。

3.4 酶标仪 酶标仪应定期送计量检定校准部门校准,同时加强对光学部分的维护,如用无水乙醇擦拭滤光片,防止发霉^[2]。

4 标本

患者标本中可能会含有干扰 ELISA 测定导致假阳性和假阴性结果的干扰因素,可分为两大类,即内源性和外源性干扰因素。

4.1 内源性干扰因素

4.1.1 类风湿因子(RF) 患者体内的 RF 能显著干扰 ELISA 检测,其中 IgM 和 IgG 型 RF 可以与 ELISA 检测中的捕获抗体及标记二抗的 Fc 段直接结合,从而导致假阳性或假

阴性结果。解决办法:(1)在使用 RF 吸附剂后再检测,可有效纠正错误结果;(2)稀释标本后再检测这对 HAV-IgM、HBV-IgM 和 TORCH 的 IgM 抗体尤为有用。

4.1.2 补体 ELISA 试验固相抗体和酶二抗可因其在固相吸附及标记过程中抗体分子发生变构,其 Fc 段的补体 C1q 分子结合位点被暴露出来,使 C1q 可以将二者连接起来,从而造成假阳性;另一方面,固相抗体也会因为活化补体的结合,封闭抗体的抗原表位结合能力,从而引起假阴性结果或使定量测定结果偏低。解决方法:(1)用终浓度 10~40 mmol/L 处理标本,灭活补体;(2)56℃ 加热血清 30 min 使 C1q 灭活^[3]。

4.1.3 异嗜性抗体 人血中含有抗啮齿类动物(如鼠、马、羊等)Ig 抗体,即天然的异嗜性抗体,其通过非竞争机制干扰 ELISA 检测,造成检测的假阴性或假阳性。解决办法:可在标本稀释液或待检标本中加入过量的动物 Ig,封闭可能存在的异嗜性抗体。

4.1.4 人体动物抗体(HAAs) HAAs 是当机体受到外源异种蛋白(如鼠、牛、马、羊等)抗原刺激,激发机体免疫应答,导致人体产生 HAAs。标本内的 HAAs 结合了试剂中所用动物源抗体形成复合物阻断了标本中分析物与之的特异性结合,导致检测结果异常增高或降低,甚至出现假阳性或假阴性,使实验检测结果与临床诊断不相符^[4]。

4.1.5 交叉反应物质 待测标本中存在的类地高辛、甲胎蛋白(AFP)样物质等,是一些与检测的靶抗原交叉反应的物质,容易造成假阳性结果^[5]。

4.2 外源性干扰因素

4.2.1 标本溶血 要注意避免出现严重溶血,如标本溶血,标本中血红蛋白释放出来,血红蛋白含有血红素基团,其有类似过氧化物的活性,因此在经辣根过氧化物酶(HRP)为标记酶的 ELISA 测定中,吸附于固相,从而与后面加入 HRP 底物显色反应,呈假阳性^[6]。

4.2.2 细菌污染 样本的采集及血清分离中要注意尽量避免细菌的污染,因为一是细菌生长分泌一些酶可能对抗原抗体等蛋白产生分解作用;二是一些细菌的内源性酶(如大肠杆菌的β-半乳糖苷酶)本身会对相应酶作标记的测定方法产生特异性干扰。

4.2.3 标本保存不当 标本在 2~8℃ 下保存时间过长,IgG 可聚合成多聚体,在间接 ELISA 测定中会导致本底过深,造成假阳性结果。血清标本如是以无菌操作分离,则可以在 2~8℃ 下保存 1 周,样本长时间保存,应在 -70℃ 以下保存。冷冻保存的血清标本必须注意避免因停电造成的反复冻融,标本的反复冻融所产生的机械剪切力将对标本中的蛋白等分子产生破坏作用,使抗体效价下降,从而引起假阴性结果。

4.2.4 标本凝固不全 标本采集后应使其充分凝固后再分离血清,或标本采集时用带有分离胶的采集管或于采集管中加入适当的促凝剂,这样有利于血清完全分离,否则血清中有纤维蛋白原非特异性吸附于微孔而造成假阳性结果。标本在保存

中如出现非细菌污染所致的混浊或絮状物时,应离心沉淀后取上清液检测。

5 试剂使用和保管

优质的试剂是保证检验质量的基础。虽然国家采用批检的形式对 ELISA 试剂严格把关,但不同厂家的试剂在性能上仍存在较大差异,试剂的质量在很大程度上决定了检测水平,因此,在使用之前必须对试剂进行严格把关。

5.1 选择灵敏度高,特异性强,精密度好,稳定性和安全性能好且经济实惠的试剂。

5.2 保存试剂的冰箱应经常检查储存温度并做好记录,冰箱应避免频繁开关,在试验开始前,将试剂盒先从冰箱中拿出来,在室温放置 20~30 min,否则水化层的形成可能影响试剂的原始浓度及试剂中溶质分子的均匀分布。

5.3 配试剂所使用的蒸馏水或去离子水应保证质量。

5.4 当试剂盒以邻苯二胺(OPD)为底物时,则底物溶液应在反应显色前临时配制,显色反应过程需避光。

5.5 根据蛋白质在冷冻过程中出现蛋白分子分布改变的特点,试剂在使用前要充分混匀。未用完的试剂和质控品要密封并及时放回冰箱保存。

5.6 不同批次的试剂在制作过程中很难保证质量完全一致,因此必须选择和订购长批号的试剂,这样才能避免试剂批号改变而重新建立质量体系及重新评估试剂的复杂过程,并能保证结果的稳定性^[7]。

6 加血清样本及反应试剂

6.1 加样时应将标本加在微孔反应板底部,同时吸头不要接触微孔反应板底部,每次加不同的标本均需更换吸头,以免发生交叉污染。

6.2 加样速度不能太快,速度要均匀,角度要垂直,力度要一致,避免加在孔壁上部和 2 个孔之间,防止溅出或产生气泡,造成结果偏移。

7 温 育

温育是 ELISA 测定中影响测定成败最为关键的因素,因此在此操作过程中一定要注意如下几点。

7.1 测量温育的温度要用水银温度计 温箱内的温度应恒定在(37±1)℃,尽量少开温箱门,温育时微孔反应板不要叠加,严格按试剂盒说明书控制温育时间,不能人为延长或缩短温育时间;微孔反应板温育时要加贴封片,这样可以防止孔内液体成分蒸发或水珠等杂质滴入孔内影响检测结果。封片不能重复使用,避免交叉污染。

7.2 要保证在设定的温度下有足够的反应时间 一般来说,加完样品和反应试剂后,将微孔板从室温拿至水浴箱时,孔内温度从室温升至所需温度需要一定时间,尤其是室温较低以及非水浴的状态下,这段升温过程可能还比较长,要等到微孔板的孔内温度升至所需温度时才开始计时,否则容易造成实际测定中温育时间不够,弱阳性样本假阴性出现。

7.3 边缘效应的排除 为了保证好的测定效果,避免“边缘效应”,可采用水浴的温育方式,让微孔板浮于水面上。或将浸透水的纱布放入一大饭盒或一湿盒中,放入温箱,这样就会因为板条孔底部直接与 37℃水或湿布接触,以及水浴箱或温盒内的高温度而使反应溶液的温度迅速升至 37℃。

8 洗 板

8.1 洗涤是 ELISA 不同于均相免疫学检测技术的一大特征,洗涤在整个 ELISA 反应过程中虽不是一个反应步骤却非常关键。其目的是将特异结合于固相的抗原或抗体与反应温育过

程中吸附的非特异成分分离开来,以保证 ELISA 测定的特异性。用 HRP 为标记酶的 ELISA 试剂盒中使用的洗板液一般为含 0.05%山梨醇-20 的中性磷酸盐缓冲液,山梨醇-20 为一种非离子去垢剂,既含亲水基团,也含疏水基团,其在洗涤中的作用机制是借助其疏水基团与经疏水性相互作用,被动吸附于聚苯乙烯固相上蛋白的疏水基团形成疏水键,从而削弱蛋白与固相的吸附。同时在其亲水基团与液相中水分子的结合作用下,促使蛋白质脱离固相而进入液相,这样就可以达到去除非特异吸附成分的目的。由于抗体或抗原的包被通常也是在碱性条件下与固相的疏水基相互作用而被动吸附于固相,因此要注意非离子去垢剂的使用浓度,如果山梨醇-20 浓度高于 0.2%,可使包被于固相上的抗原或抗体解吸附而影响试验的测定下限。

8.2 配制洗涤液需要用新鲜、干净、无菌、无污染的蒸馏水或去离子水配制,洗涤液应现用现配,盛放洗涤液的塑料容器应经常用清洗剂彻底清洗干净后方可使用,洗板时应保证洗涤液注满微孔反应板各孔。洗完板后微孔反应板在吸水纸上轻轻拍干^[5]。

8.3 ELISA 测定的洗板一般有两种方式,即手工和洗板机洗板,无论何种洗板方式都应该严格控制洗板次数,增加洗板次数会造成部分与固相结合抗原抗体脱离,从而影响检测的灵敏度,使样本检测的吸光度值偏低,造成假阴性^[8]。减少洗板次数会造成未与固相结合抗原抗体未能完全被洗掉,从而引起假阳性。在向板内注液时应避免气泡残留孔内,否则会因为洗涤液难以进入孔中而影响洗涤效果。在采用洗板机洗板时,要保证洗板机上的每个吸液针都能一致地插入板孔底部将洗涤液完全吸净,要求洗板后残液小于 2 μL,即人工扣板垫纸不湿,要注意加注洗液的探针孔的堵塞问题以及液体吸加的有效性,假阳性往往与洗板不彻底有很大关系。

9 显 色

9.1 大多数 ELISA 商品试剂盒选用 HRP 作为标记酶,HRP 可催化的底物为过氧化氢,参加反应的显色供氢体有 OPD、邻联甲苯胺及四甲基联苯胺(TMB)等。操作时应注意各试剂盒显色剂不能混用,添加顺序不能颠倒,不能溅出孔外^[9]。在以 HRP 作为标记酶的 ELISA 试剂盒中,如以 TMB 为底物,则是提供的底物为 A 和 B 2 瓶应用液,A 液为 H₂O₂,B 液为 TMB。TMB 是一种供氢体的染料,在 HRP 催化下,提供氢给 H₂O₂,自身被氧化成蓝绿色,加入含有硫酸的终止剂,降低 pH,即可使蓝色的阳离子根转变为黄色的联苯醌,产物可稳定 90 min,在波长为 450 nm 处有最大消光系数。

9.2 在加入底物开始显色反应前,最好先检查一下底物溶液的有效性,即可将 A 和 B 两种液体各加 1 滴于清洁孔或试管中,观察是否有显色出现,如有,则说明底物已变质,不能使用,在以 TMB 为底物的整个显色反应过程无需避光。

9.3 酶结合物不耐干燥,特别是在较高的温度下更易失活,加入底物前,甩干的反应板在空气中暴露的时间长短会影响时间结果,时间越长,则 A 值越低,因此甩干后的反应板应尽快滴加底物^[10]。

10 比 色

ELISA 比色结果必须通过酶标仪进行检测,不可用肉眼判断结果,因为不同个体色觉存在差异,难以保证检测结果。正确使用酶标仪应注意下面 2 点。

10.1 在实验室进行 ELISA 测定时,以 TMB 为底物和以 OPD 为底物的试剂盒均有使用,由于所使用的波长不同,前者

450 nm, 后者 492 nm, 因此一定注意酶标仪的波长是否调至合适和使用滤光片是否正确。

10.2 酶标仪最好使用双波长进行测定, 一般不必设空白孔, 在敏感波长 450 nm 和非敏感波长 630 nm 下各测定一项, 敏感波长的吸光度测定值为样本酶反应特异显色的吸光度及板孔上指纹、刮痕、灰尘等脏物所致的吸光度之和, 非敏感波长下测定即改变波长至一定值, 使样本测定酶反应特异显色的吸光度值为零, 此时测定的吸光度即为脏物的吸光度值, 最后酶标仪给出的数值为敏感波长的吸光度值与非敏感波长下的吸光度值差。因此, 双波长比色测定具有能排出由微孔板本身、板孔内标本的非特异吸收, 指纹、刮痕、灰尘等对特异显色测定吸光度的影响的优点。

11 结果的判定与报告

11.1 结果判定 ELISA 测定按其表示结果的方式分为定性和定量测定, 定性测定只是对标本是否含有待测抗原或抗体作出“有”或“无”的结论, 分别用“阳性”和“阴性”来表示, 结果的判定要严格依据试剂盒本身提供的临界值 cut off 值进行结果判断。定量测定需要制备标准曲线, 根据标准曲线计算结果。

11.2 注意钩状(HOOK)效应 HOOK 效应是指免疫检测中抗原抗体浓度比例不合适而致检测结果呈阴性的现象^[11-12]。即被检物质浓度过高, 过量的未被捕获的抗原与检测抗体发生结合, 阻断了捕获抗原-抗体-检测抗原抗体复合物的形成, 从而产生假阴性结果。对待 HOOK 效应要注意几点: (1) 关注患者的临床诊断和其他实验室检查; (2) 警惕任何异常的测定值或模式; (3) 使用免疫渗透层析法快速验证; (4) 尽可能使用二步法进行检测; (5) 用健康人血清或生理盐水 10 倍系列稀释再检测^[13-14]; (6) 另外有文献报道 ELISA 孵育过程中适当振荡也可消除 HOOK 效应^[15]。

11.3 灰区的问题 通常情况下 ELISA 结果报告方式为“阴性”或“阳性”, 在二者之间有一条明确的分界线, 也就是阳性判定临界值 cut off 值, 对于样本吸光度值(A)高于 cut off 值判断为阳性, 相反则判断为阴性, 然而在实际工作中经常会出现样本 A 值位为 cut off 值附近的数值, 即 ELISA 检测的“灰区”。目前市场上抗原抗体检测的 ELISA 试剂盒中均未涉及到“灰区”的设置, 仅仅依靠 cut off 值来决定感染的有无, 作者在实际工作中发现, 处于 cut off 值附近的标本重复性很差, 很容易引起医疗纠纷。因此对于检测结果处于“灰区”的人员要采取复查制度或用确认试验来加以确证^[16]。

12 质量控制图

目前在临床检验实验室中, ELISA 检测多采用 Lever-Jennings 质控图法进行质控, 但是由于某些实验室检测的样本量较少而且频次较低, 常常采用“即刻法”结合 Lever-Jennings 质控图的方法进行质控^[17]。在每项试验中除了试剂盒附带的阴阳性对照外, 还要选择至少 2 个室内质控品, 一个为弱阳性的质控品的吸光度接近 cut off 值, S/cut off 值应在 2~4, 另一个为阴性质控品。认真分析每次失控的原因, 定期对各项检测的均值和变异系数等进行比对分析, 及时发现检测过程的偏离情况, 采取适当的措施来提高检测的可靠性。

综上所述, 尽管 ELISA 操作简单, 但可影响 ELISA 检测的因素很多, 分布在整个检测过程。世界卫生组织专家曾对 ELISA 的评价认为“ELISA 作为免疫诊断应用是一个好方法, 但要做好它不容易”^[18-20]。因此必须不折不扣地全面加强各环节的质量控制, 当出现实验室检测结果与临床诊断不相吻合时要及时进行沟通, 共同查找其中的原因, 判断是否存在某些

干扰因素, 并采取适当方案重新检测, 才能得到准确可靠且满意的检测结果。

参考文献

- [1] 谭爱华. ELISA 法检测中应注意的问题[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(19): 2496-2497.
- [2] 杨美来, 谢仕明, 曾海华, 等. 用酶联免疫吸附法检测 HIV 抗体的质量控制[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2001, 24(6): 376-377.
- [3] 曹向红, 董玉琳, 徐敏. 酶联免疫吸附试验的干扰因素和对策[J]. 实用医技杂志, 2011, 18(12): 1321-1322.
- [4] Sapin R, Agin A, Gasser F. Misleading high thyrotropin results obtained with a two-site immunometric assay involving a chimeric antibody[J]. Clin Chem, 2004, 50(5): 946-948.
- [5] 周艳萍. 酶联免疫吸附试验检测法的质量控制[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(14): 1206-1207.
- [6] 许斌, 朱虎定. ELISA 检测 HBsAg 影响因素的探讨[J]. 临床检验杂志, 2000, 18(4): 232-232.
- [7] 王兰兰, 柳永和. 临床免疫学和免疫学检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 256-257.
- [8] 易金平. 酶联免疫吸附试验技术的影响因素分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 07(22): 2553-2554.
- [9] 刘祖勇. 增加洗板次数对 HBsAg ELISA 检测结果的影响[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(2): 135-136.
- [10] 段金霞, 冯涛聚, 苏文凡. 酶联免疫吸附试验法检测 HBV 血清标志物的分析前质量控制[J]. 职业与健康, 2008, 24(24): 2674-2675.
- [11] 彭黎明, 王兰兰. 检验医学自动化及临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 553.
- [12] 王火生, 李丽雄, 林萍, 等. 一步法 ELISA 在 HIV 初筛中的应用探讨[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(5): 501-503.
- [13] 陈仁杰, 胡海燕, 严银燕. ELISA 一步法检测梅毒抗体钩状效应三例[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2): 215.
- [14] 单桂秋, 李秋生, 肖韶英, 等. 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.
- [15] 杨剑. ELISA 一步法和二步法检测乙肝 HBSAg 的结果比较[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(5): 569.
- [16] 陈兆鹏, 单永海, 周纪芬. 减少一步法 ELISA 钩状效应的方法探讨[J]. 上海医学检验杂志, 1999, 14(1): 59-60.
- [17] 李金明. 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.
- [18] 刘芳, 胡斌, 何蕴韶. 酶联免疫吸附试验检测 HIV 抗体的质量控制方法探讨[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(8): 796-799, 805.
- [19] 贺智英, 陈美霓, 田红英. 论影响酶联免疫试验结果的常见因素及控制方法[J]. 中国医药导报, 2008, 5(22): 175-176.
- [20] 袁红, 黄文方, 杨明清. 酶联免疫吸附试验室内质控的几个问题[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(1): 28-30.