

酶联免疫试验两步法检测乙型肝炎病毒表面抗原的影响因素分析

叶 炼, 赵 政, 王 芳, 杨 平 (四川省科学城医院, 四川绵阳 621900)

【摘要】 目的 探讨酶联免疫吸附试验(ELISA)两步法检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的影响因素。**方法** 分别在稀释液的量、洗板时机、孵育时间、显色时间等不同条件下对阳性混合血清、阴性混合血清和弱阳性对照血清进行检测。**结果** 使用滴瓶滴加 1 滴稀释液、不加入稀释液、加入血清后温育时间缩短为 45 min、加入酶结合物后孵育时间缩短为 15 min、加入显色剂后显色时间缩短为 15 min, 弱阳性结果较标准方法差异有统计学意义; 加入样本孵育 1 h 后洗板, 阳性、弱阳性和阴性结果均较标准方法差异有统计学意义。**结论** ELISA 条件的改变, 就强阳性标本而言或许影响不大, 但弱阳性标本的结果会被显著影响, 尤其是处于临界值(灰区)的标本所受影响可能就更为明显。

【关键词】 乙型肝炎表面抗原; 酶联免疫吸附试验; 两步法; 影响因素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.19.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)19-2546-02

Influencing factors on two-step ELISA detection of HBsAg YE Lian, ZHAO Zheng, WANG Fang, YANG Ping (Sichuan Science City Hospital, Mianyang, Sichuan 621900, China)

【Abstract】 Objective To discuss the influencing factors on two-step enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). **Methods** Positive, negative and weakly positive mixed serum were detected under different dilution, plate washing time, incubation time and color time. **Results** With one drop or without dilute solution, incubation time shortened respectively to 45 and 15 min after adding serum or enzyme conjugates, color time changed to 15 min with chromogenic agents, the weakly positive result was statistically different with standard methods. The positive, weakly positive and negative results were also statistically different with standard methods when plate was washed after incubation for 1 h. **Conclusion** The changes of ELISA conditions might have obvious effect on weakly positive samples especially those within critical value range (gray zone), though the effect could be ignored in positive ones.

【Key words】 HBsAg; ELISA; two-step detection; influencing factors

血筛 4 项[乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)、人免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)、梅毒]两步法纳入 2010 年 4 月颁布的新药典, 自 2010 年 10 月 1 日起上市的试剂全部采用两步法, 同时废除其他方法。本室于 2011 年 3 月开始采用两步法对血筛 4 项进行检测。为了了解两步法的影响因素, 以 HBsAg 为例, 在不同条件下进行检测, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本 来源于本院住院和门诊乙型肝炎患者标本, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选出 HBsAg S/CO ≥ 10 的阳性标本分离血清混合, 作为阳性对照血清; HBsAg S/CO < 1 阴性标本分离血清混合, 作为阴性对照血清。并使用由北京康彻思坦生物技术有限公司所提供的 HBsAg 标准物质(1 U/mL)作为弱阳性对照血清。

1.2 仪器与试剂 美国宝特公司 Bio-Tek ELX800 全自动酶标仪; 美国宝特公司 Bio-Tek ELX50/12 全自动洗板机; 北京万泰生物药业股份有限公司乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒(酶联免疫法, 两步法)。

1.3 方法 分别使用阳性、弱阳性和阴性对照血清按以下方式进行检测, 每种血清重复加入 10 次, 取其 S/CO 值的均值进行比较。

1.3.1 标准方法 严格按试剂盒说明书进行操作: (1) 稀释, 除空白孔外每孔加入样品稀释液 20 μ L; (2) 加样, 分别在相应孔中加入阳性、弱阳性和阴性对照血清 100 μ L, 轻轻振荡混匀; (3) 温育, 封板后置(37 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 温育(60 $\pm$ 2)min; (4) 加酶, 除

空白孔外每孔加入酶标试剂 50 μ L, 轻轻振荡混匀; (5) 温育, 封板后置(37 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 温育(30 $\pm$ 1)min; (6) 洗板, 洗板机洗涤 5 遍, 扣干; (7) 显色, 每孔加入显色剂 A、B 液各 50 μ L, 轻轻振荡混匀, (37 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 避光显色(30 $\pm$ 1)min; (8) 测定, 每孔加入终止液 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 10 min 内测定结果。

1.3.2 滴加 1 滴稀释液 除“(1)稀释”一步中稀释液改为直接用滴瓶滴加 1 滴外, 其余步骤同标准方法。

1.3.3 无稀释液 除“(1)稀释”一步中不加入稀释液外, 其余步骤同标准方法。

1.3.4 加血清后温育时间的改变 除“(3)温育”一步中温育时间由 60 min 改为 45 min 外, 其余步骤同标准方法。

1.3.5 洗板 加入血清孵育后洗板这一步骤, 其余步骤同标准方法。

1.3.6 加酶后孵育时间的改变 除“(5)温育”一步中温育时间由 30 min 改为 15 min 外, 其余步骤同标准方法。

1.3.7 显色时间的改变 除“(7)显色”一步中显色时间由 30 min 改为 15 min 外, 其余步骤同标准方法。

1.4 统计学处理 所有数据资料采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。

2 结 果

2.1 滴加 1 滴稀释液 使用 20 μ L 稀释液的阳性标本 S/CO 值为(14.997 $\pm$ 0.143), 1 滴稀释液的值为(15.248 $\pm$ 0.235), 差异无统计学意义($P=0.200$); 弱阳性标本为(10.495 $\pm$ 0.283), 1 滴稀释液的值有所降低, 为(8.317 $\pm$ 0.227), 差异有统计学意义($P=0.008$); 阴性标本为(0.079 $\pm$ 0.020), 1 滴稀

释液的值为(0.270±0.127),差异无统计学意义($P=0.110$)。见表 1。

2.2 无稀释液 使用 20 μL 稀释液的阳性标本 S/CO 值为(14.997±0.143),无稀释液的为(15.302±0.054),结果差异无统计学意义($P=0.060$);弱阳性标本为(10.495±0.283),无稀释液的为(11.921±0.700),结果差异无统计学意义($P=0.083$);阴性标本为(0.079±0.020),无稀释液的值有所升高,为(0.425±0.063),差异有统计学意义($P=0.006$)。见表 1。

2.3 加血清后温育时间的改变 温育 60 min 的阳性标本 S/CO 值为(14.997±0.143),45 min 的为(14.562±0.126),差异无统计学意义($P=0.052$);温育 60 min 的弱阳性标本为(10.495±0.283),45 min 的为(9.556±0.800),差异无统计学意义($P=0.097$);温育 60 min 的阴性标本为(0.079±0.020),45 min 的为(0.254±0.143),差异无统计学意义($P=0.144$)。见表 1。

2.4 加入血清孵育后洗板 标准方法的阳性标本 S/CO 值为(14.997±0.143),洗板后的值明显降低,为(5.946±0.467),差异有统计学意义($P=0.001$);标准方法的弱阳性标本为(10.495±0.283),洗板后的值明显降低,为(5.235±1.327),

差异有统计学意义($P=0.029$);标准方法的阴性标本为(0.079±0.020),洗板后为(4.011±0.287),差异有统计学意义($P=0.002$)。见表 1。

2.5 加酶后孵育时间的改变 温育 30 min 的阳性标本 S/CO 值为(14.997±0.143),15 min 为(15.063±0.148),差异无统计学意义($P=0.145$);温育 30 min 的弱阳性标本为(10.495±0.283),15 min 的值明显降低,为(5.575±0.773),差异有统计学意义($P=0.007$);温育 30 min 的阴性标本为(0.079±0.020),15 min 为(0.873±0.130),差异有统计学意义($P=0.010$)。见表 1。

2.6 显色时间的改变 显色 30 min 的阳性标本 S/CO 值为(14.997±0.143),15 min 的值为(15.006±0.074),差异无统计学意义($P=0.057$);显色 30 min 的弱阳性标本为(10.495±0.283),15 min 的值明显降低,为(8.790±1.108),差异有统计学意义($P=0.033$);显色 30 min 的阴性标本为(0.079±0.020),15 min 的值为(0.173±0.166),差异无统计学意义($P=0.104$)。见表 1。

表 1 ELISA 一步法和两步法 CV 值比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

项目	标准方法	1 滴稀释液	无稀释液	温育 45 min	洗板	孵育 15 min	显色 15 min
阳性	14.997±0.143	15.248±0.235	15.302±0.054	14.562±0.126	5.946±0.467	15.063±0.148	15.006±0.074
弱阳性	10.495±0.283	8.317±0.227	11.921±0.700	9.556±0.800	5.235±1.327	5.575±0.773	8.790±1.108
阴性	0.079±0.020	0.270±0.127	0.425±0.063	0.254±0.143	4.011±0.287	0.873±0.130	0.173±0.166

3 讨 论

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个全球性的健康问题,目前,全世界有 20 亿的人感染 HBV,3.5 亿人为慢性乙型肝炎患者^[1-2]。目前我国的 HBV 感染的形式依旧很严峻,HBsAg 总流行率为 9.75%^[3-4];HBsAg 阳性患者大约有 1.2 亿^[5]。现有慢性 HBV 感染者约 9 300 万人,占全世界的 1/4;其中慢性乙型病毒性肝炎患者超过 2 000 万例,占全世界慢性乙型肝炎患者的 1/3。2010 年 6~11 月,本科参与国家科技重大专项“四川省绵阳市乙型肝炎与结核规模化现场流调及分级协同综合防治一体化示范研究”,集中检测了 7 509 例,其中 15 岁以下儿童 1 782 例,15 岁以上成人 8 296 例,阳性率为 7.63%,其中儿童为 2.02%,成人 8.96%。所以国家强制要求使用特异性和灵敏度更高的两步法替代一步法。

ELISA 有 99.9% 的准确率,被常用于筛检相应的血清标志物^[6-9]。目前使用的两步法北京万泰乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒较一步法有如下变化,究其原因解释如下:(1)加入的样品稀释液可以中和样品中的非特异性干扰组分,有利于特异性的提高。(2)样品的加样量增加,由原来的 50 μL 增加至 100 μL ,提高了阳性标本的检出率。(3)孵育时间延长。标本中的抗原与固相载体上的抗体开始反应结合形成第一步抗体-抗原,耗时 1 h。ELISA 作为一种固相免疫测定,抗原抗体的结合反应在固相上进行,要使液相中的抗原或抗体与固相上的特异抗体或抗原完全结合,必须在一定的温度条件下反应一定的时间^[10]。(4)减少一次洗板。两步法酶标板包被的抗体以及酶的浓度有所提高,但同时增加了酶与板的非特异性结合。因此,必须借助样品在反应中起的阻断性作用,抑制酶标试剂与板的非特异性结合。

以上的改变使得检测的灵敏度和特异性有明显提高,同时检测步骤较以往的一步法明显复杂,所耗工时至少延长了 90 min,给临床工作带来了极大的不便。为此,本实验室反复进行了相关步骤的试验,以期改良工作程序,达到又快又好的完成检测的目的。

虽然按试剂盒的要求,稀释液的量为 20 μL ,但临床大批量操作时,不加稀释液或是只滴加 1 滴稀释液更为方便。但经试验可以发现,阳性、弱阳性和阴性的结果差异有统计学意义,特别是滴加 1 滴稀释液的弱阳性结果较标准方法的值偏低,可能是稀释液量过多对样本稀释的原因造成的。而不加入稀释液会使结果明显偏高,尤其是弱阳性和阴性标本受影响非常明显。酶联免疫两步法于加酶前无需洗板,经试验验证,如果洗板会花板,导致阴性血清和阴性对照的 A 值升高,阳性血清和阳性对照的 A 值降低。为什么不能洗板,作者认为加样温育之后直接加酶,加到孔里的酶相当于被稀释了,最终在孔里起作用酶的浓度是被 20 μL 稀释液和 100 μL 样品稀释之后的浓度。如果中间洗了板,再加入酶之后,那起作用的酶的浓度就大大升高。

酶联免疫一步法将血清和酶标志物同时加入,温育时间为 30 min,而两步法加入血清后温育时间延长至 60 min。温育时间是酶联免疫试验中很关键的步骤。就阳性标本而言,缩短少量时间也许影响不大,毕竟抗原量较大,抗原抗体可以特异性反应;但弱阳性标本的结果就会被显著影响。本次试验选用的弱阳性标本为 1 IU/mL 的标准物质,若是处于临界值(灰区)的标本所受影响可能就更为明显。这一特点通过 1.3.6 加酶后孵育时间的改变也可得到印证,弱阳性标本的 S/CO 值为仅为标准方法的一半左右。(下转第 2549 页)

多使用口服药物治疗,普遍认为医院感染发生率不高,受重视程度较低。

本院对 2008 年 1 月至 2011 年 12 月精神科医院感染进行回顾分析,发现出现感染 141 例,感染率高达 10.4%,说明精神科医院感染率极高,应予以重视。有研究认为,精神病患者兴奋、躁动、违拗等情绪导致其用药较为困难,时常接受强制性治疗,再加上其行为及自我控制能力较低,时而暴饮暴食,时而乱食异物,增加了呼吸道及胃肠道的感染风险^[4-5]。而本组 141 例感染患者中,呼吸道及胃肠道感染共出现 97 例,占 68.8%,是精神科医院感染的主要感染类型。作者发现,原发疾病、住院时间及封闭式管理是影响精神科患者医院感染的独立危险因素。精神分裂症及器质性精神障碍患者发病后患者自控能力大幅降低,易受情绪暴躁等因素出现躯体受伤,从而导致感染。本组 141 例感染患者中,精神分裂症及器质性精神障碍感染率最高,分别为 13.0%及 14.9%,说明在精神科患者的护理中应加大精神分裂症及器质性精神障碍患者的抗感染干预,降低感染风险。还有研究认为,住院时间与医院感染发生率呈正相关,精神科患者住院时间越长,感染发生率越高,住院时间超过 30 d 的患者,其感染风险上升 50%以上^[6];而由于集中、封闭式治疗导致的病房环境较差、空气不流通、飞沫传播等因素为病原菌的传播提供了便利的条件,加上患者神志不清,生活用品及床铺混用,为感染的互相传播提供了基础。因此,应改善住院条件、加强患者生活护理、实行每日开窗通风 2 次,每次不少于 30 min,严格消毒并密切观察患者病情变化,将精神科院内感染发生风险降至最低。

综上所述,原发疾病、住院时间及封闭式管理是影响精神

科患者医院感染的独立危险因素,患有精神分裂症或器质性精神障碍、住院时间较长且长期接受封闭式管理患者感染率最高,因此,应加强精神科病房管理,采取积极有效的干预措施,控制医院感染的发生。

参考文献

[1] 裴建琴. 精神科医院感染现患率调查与护理对策[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(21): 4748-4749.

[2] Schadé A, van Grootheest G, Smit JH. HIV-infected mental health patients: characteristics and comparison with HIV-infected patients from the general population and non-infected mental health patients[J]. BMC Psychiatry, 2013, 13(1): 35-38.

[3] 金惠敏, 徐伟琴, 顾沈红. 精神科男病区医院感染率高发的原因分析与对策[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(15): 3183-3184.

[4] Stevens LG, Roberts KJ. Novel suicide by division of a chronically infected, externalised axillofemoral graft presenting challenges in prehospital assessment of mental capacity[J]. Case Rep Emerg Med, 2012, 2012: 795648.

[5] 吴明德, 张易, 邹艳, 等. 精神科医院感染控制对策[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(13): 2771-2772.

[6] 傅正闯, 杜凌阳. 108 例精神科住院患者肺部感染临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(6): 1180-1181.

(收稿日期: 2013-03-21 修回日期: 2013-04-12)

(上接第 2547 页)

酶联免疫两步法将显色时间由 15 min 延长为 30 min。就阳性和阴性标本而言, 缩短显色时间对影响不算太大; 但弱阳性标本的结果就很受影响, 其 S/CO 值为仅为标准方法的 80% 左右。

综上所述, 酶联免疫试验条件的改变, 就强阳性标本而言或许影响不大, 毕竟抗原量较大, 抗原抗体可以特异性反应; 但弱阳性标本的结果就会被显著影响, 尤其是处于临界值(灰区)的标本所受影响可能就更为明显。所以, 日常工作中应严格按照试剂盒说明书进行操作。但在此也希望试剂盒研发厂商能在保证试验质量的同时, 关注测试的方便与人性化。比如, 稀释液滴瓶的设计上, 能否将滴瓶的刻度直接设计为准确滴加 20 μ L。

参考文献

[1] Schmidt M, Nübling CM, Scheiblaue H, et al. Anti-HBc screening of blood donors: a comparison of nine anti-HBc tests[J]. Vox Sang, 2006, 91(3): 237-243.

[2] Li L, Chen PJ, Chen MH, et al. A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification technology: detecting occult hepatitis B virus infections and closing the serologic window period for hepatitis C virus [J]. Transfusion (Paris), 2008, 48(6): 1198-1206.

[3] 陈紫榕. 病毒性肝炎[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002: 120-193.

[4] 张卓然. 临床微生物学和微生物学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 374.

[5] 戴志澄, 祁国明. 中国病毒性肝炎血清流行病学调查(下卷) [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999: 138-150.

[6] Torane VP, Shastri JS. Comparison of ELISA and rapid screening tests for the diagnosis of HIV, Hepatitis B and Hepatitis C among healthy blood donors in a tertiary care hospital in Mumbai[J]. Indian J Med Microbiol, 2008, 26(3): 284-285.

[7] Maity S, Nandi S, Biswas S, et al. Performance and diagnostic usefulness of commercially available enzyme linked immunosorbent assay and rapid kits for detection of HIV, HBV and HCV in India [J/OL]. Virol J, 2012-11-26 [2013-01-16], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181517>.

[8] Khan JK, Lone DS, Hameed A, et al. Evaluation of the performance of two rapid immunochromatographic tests for detection of hepatitis B surface antigen and anti HCV antibodies using ELISA tested samples[J]. Sp Ed Ann, 2010, 16(1): 84-87.

[9] Iqbal HS, Solomon S, Murugavel KG, et al. Evaluation and diagnostic usefulness of domestic and imported enzyme-linked immunosorbent assays for detection of human immunodeficiency virus type 1 antibody in India[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(12): 1425-1428.

[10] 李会英. 酶联免疫吸附试验影响因素的分析[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(10): 985-986.

(收稿日期: 2013-02-23 修回日期: 2013-06-10)