

• 基础实验研究 •

ELISA 法检测 HBsAg 实验条件的优化

郭 翀, 张真铭

(昆明医学院附属第一医院检验科 650032)

摘 要:**目的** 探讨温度、孵育时间、振荡对 ELISA 法检测 HBsAg 的影响,以期进一步优化检测条件。**方法** 采用 HBsAg 含量约为 1 ng/mL 的血清标本,在 4 种不同条件(37 ℃ 振荡、37 ℃ 不振荡、25 ℃ 室温震荡、25 ℃ 室温不振荡)下的 3 个不同反应时间(10、20、30 min)测定 HBsAg,记录吸光度值。**结果** 除 10 min 37 ℃ 不振荡和 25 ℃ 不振荡差异无统计学意义($P>0.05$)外,其余各组差异都有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 37 ℃ 振荡 20 min 为 ELISA 检测 HBsAg 的较佳条件。

关键词:酶联免疫吸附测定; 肝炎表面抗原,乙型; 实验条件

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.019 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)06-0656-02

The optimized of ELISA examines HBsAg the experimental condition

Guo Chong, Zhang Zhenming

(Clinical Laboratory of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

Abstract:**Objective** To analysis temperature, the incubating time, the vibration examine HBsAg to the influence of the ELISA method, further in expectation of optimizes the experimental conditions. **Methods** The HBsAg blood serum specimen were used, which density approximately was 1 ng/mL, in four kinds of different experimental conditions (37 ℃ vibration, 37 ℃ no vibration, 25 ℃ room temperatures vibrations, 25 ℃ room temperatures no vibration) and three different reaction time (10 minutes, 20 minutes, 30 minutes) determine HBSAg, and register the numerical value of the absorbency. **Results** except 37 ℃ no vibration and 25 ℃ room temperatures no vibration exsist no apparent differences($P>0.05$), they exsist the apparent differences($P<0.05$). **Conclusion** 37 ℃ and vibrating 20 minutes is the best optimized condition of this experiment.

Key words:enzyme-linked immunosorbent assay; hepatitis B surface antigens; experimental condition

乙型肝炎感染性强、传播途径复杂、流行面广、发病率高,预防和控制是当前的重要目标之一,而 HBsAg 是诊断乙型肝炎感染的重要依据之一。ELISA 法检测 HBsAg 具有简易、快速、特异性强、灵敏度高、重复性好的特点,且不需要昂贵的仪器,没有放射性污染,可被普遍采用,但在检测过程中影响因素很多,如有不当,则容易造成弱阳性标本的漏检。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院门诊、住院患者的 HBsAg 阳性标本 20 例。

1.2 仪器与试剂 wellscan MK3(芬兰);MODEL 1575(法国);SYM-B10 振荡器(上海新波);WALLAC 1235 全自动时间分辨荧光免疫分析系统。ELISA 定性检测 HBsAg 试剂盒(上海科华);时间分辨荧光定量检测 HBsAg 试剂盒(上海新波);HBsAg(1 ng/mL)室内质控品(卫生部临床检验中心)。

1.3 方法 把 20 例阳性标本血清混合后,先测定混合标本 HBsAg 的浓度,将其稀释成约 1 ng/mL 后与 1 ng/mL 的室内质控品同时上机检测 HBsAg 的浓度(自制标本 1.35 ng/mL,卫生部室内质控品 1.15 ng/mL)。首先使用空调将室内温度恒定在 25 ℃,然后在 4 种不同条件(37 ℃ 振荡、37 ℃ 不振荡、25 ℃ 室温振荡、25 ℃ 室温不振荡)下的 3 个反应时间(10、20、30 min)进行检测。检测时严格按照试剂说明书操作,由专人对本标本进行 4 次,每次 5 孔的平行检测,阳性对照及阴性对照各做 2 孔。最终检测不同条件下的吸光度值,计算相应条件下吸光度值的 $\bar{x}$ 、SD、CV(%)。

1.4 统计学处理 采用 PEMS 3.1 软件进行统计分析,计量

资料多样本均数分析。

2 结 果

2.1 通过对标本在 4 种不同条件(37 ℃ 不振荡、37 ℃ 振荡、25 ℃ 不振荡、25 ℃ 振荡)下的 3 个不同反应时间(10、20、30 min)得到的数据进行统计分析发现,同一条件下的 3 种不同反应时间的数据之间差异有统计学意义($P<0.05$),同一反应时间不同条件下的数据之间,除了 10 min 37 ℃ 不振荡和 25 ℃ 室温不振荡差异无统计学意义($P>0.05$)外,其他各组数据之间差异都有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 标本在不同实验条件下所测得的 OD 值代数均值,见表 1。

表 1 标本在不同实验条件下所测得 OD 值代数均值				
时间(min)	37 ℃ 不振荡	37 ℃ 振荡	25 ℃ 不振荡	25 ℃ 振荡
10	0.166	0.445	0.159	0.337
20	0.210	0.512	0.189	0.500
30	0.276	0.646	0.254	0.550

3 讨 论

有很多因素会对实验结果产生不良影响,除了抗原和抗体本身的性质、活性及含量外,还受到各种实验条件的影响,如反应时间、温度、振荡等,特别是温育条件对 ELISA 检测结果的影响更大,尤其对于弱阳性标本,由于温育条件不当会造成假阴性,增加传染概率^[3]。定性测定时往往将这些因素忽视,其结果对高值阳性标本影响不大,但对一些低值含量的阳性标本

有较大的影响,从而出现此类标本的漏报或错报^[2]。本组着重从反应时间、温度、振荡 3 个方面来阐述不同条件对检测结果的影响。

日常工作检测 HBsAg 是在 37 ℃ 不振荡孵育 30 min 的条件下进行的,在本组实验中把它的最终结果作为标准,与其他条件的结果进行比对。在同一时间段时,对标本在 37 ℃ 振荡与 25 ℃ 室温振荡,37 ℃ 不振荡与 25 ℃ 室温不振荡条件下的 OD 值分别进行比较,发现除 10 min 时 37 ℃ 不振荡与 25 ℃ 室温不振荡两者差异无统计学意义($P>0.05$)外,其他各组差异都有统计学意义($P<0.05$),这说明温度在本组实验中对测定结果有影响,但 37 ℃ 的 OD 值高于 25 ℃ 的 OD 值,故认为孵育温度采用 37 ℃ 较好。

在同一反应时间,对相同温度条件下振荡和不振荡两组数据进行统计分析发现,组间 P 值均小于 0.05,差异有统计学意义。对 OD 值比较可以看出,标本在振荡情况下测定的 OD 值均高于标本在没有振荡情况下测定的 OD 值,这说明振荡对检测结果影响较大,本组认为在实验中,条件允许的情况下可采用振荡器以提高 OD 值。

把标本在除孵育时间不同外,其他条件均相同的情况下检测的数据进行比较后可以发现,不同时间段的 OD 值之间在统

计学分析时 P 值均小于 0.05,差异有统计学意义。但孵育 20 min 或 30 min 的 OD 值均高于孵育 10 min。这说明孵育时间对检测结果是有影响的。为提高实验效率,缩短检验周期,所以在采用振荡器的情况下,孵育时间建议采用 20 min。

本组对反应的温度、时间、振荡这 3 个不同条件下检测的 OD 值进行纵、横向比较后,所得结果与相关报道相似^[4],故认为在选用优良的试剂、排除其他干扰因素的前提下,37 ℃ 振荡 20 min 是 ELISA 法检测 HBsAg 的较佳反应条件。

参考文献

- [1] 许斌,朱虎定. ELISA 法检测 HBsAg 影响因素的探讨[J]. 临床检验杂志,2000,18(4):232.
- [2] 曹文飞. 酶联免疫测定的干扰因素与对策[J]. 中国实验临床免疫学杂志,1998,10(3):128.
- [3] 岳希全,石宏,李迎. ELISA 法检测 HBsAg 影响结果的重要因素的分析[J]. 中国实验诊断学,2004,6(2):56.
- [4] 徐锋,李筱莉,陈燕. 不同孵育条件对 HBsAg 定性分析的影响[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(10):933.

(收稿日期:2010-08-10)

(上接第 655 页)

中一些内源性物质的影响造成(类风湿系列、抗甲状腺球蛋白抗体、抗核抗体、甲胎蛋白等)。该病的患病率在中国呈逐年上升趋势,给人们生命健康带来很大威胁^[5]。赵成松等^[6]报道,17 例儿童艾滋病中有 12 例考虑与不安全的输血和血制品有关。申静^[7]报道的 9 例小儿艾滋病,也有 5 例与输注不安全的血液和血制品有关。

虽然导致 ALT 升高的原因较多,药物性、脂肪肝、感冒等原因均可导致肝细胞损害,检测 ALT 可以反映肝损害的程度,ALT 是评价肝细胞损害的敏感指标^[8],患者受血前的检测可了解其健康状况。

输血作为一种药物无法替代的特殊治疗手段,在医疗过程中被广泛使用。输血前对血液要严把质量关,以保证输血安全。目前输血及手术前 9 项指标的检测已列入常规检测项目,但由于检验方法的局限性以及病原体感染后存在的“窗口期”问题,使输血及手术导致的病毒感染无法避免。在本组结果中,5 项都出现阳性率,并且患者对自己的情况并不完全知晓,当出现阳性时,要注意合理沟通及合理处理,保护患者隐私,否则会影响患者情绪及治疗效果,对患者进行输血前 9 项检测无论是对患者和医务人员还是控制院内感染等都有着非常重要的意义。

参考文献

- [1] 刘锡光,祁自柏,熊诗松,等. 病毒性肝炎实验诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:107.

- [2] 石鹏辉,李永勤,耿坤静. 乙型肝炎病毒表面抗体定性测定 S/CO 的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(1):14.
- [3] 翁心华,张继明. 乙型肝炎的流行病学和防治现状[J]. 胃肠病学,2002,7(5):259-261.
- [4] 韦雪凤. 输血前感染性指标检测的结果分析[J]. 中国民康医学,2007,19(8):663.
- [5] 钟映芹,丁常情,梁伟雄. 警务人员艾滋病职业暴露的知识,态度,信念及行为调查[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2010,37(2):95.
- [6] 赵成松,刘刚,杨燕,等. 儿童艾滋病 17 例报告[J]. 实用儿科杂志,2007,22(8):629-630.
- [7] 申静. 小儿艾滋病 9 例[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(15):1212.
- [8] 费德红,何凤琼,颜永乾. 血清总胆汁酸在新生儿溶血患者肝损害中的临床观察[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(1):26.
- [9] 陈永秀. 酶联免疫吸附法检测乙型肝炎病毒表面抗原假阳性原因分析和解决办法[J]. 检验医学与临床,2010,7(24):2742.
- [10] 唐月璐,覃柳. 中心静脉导管在肿瘤合并艾滋病患者中的应用及护理[J]. 检验医学与临床,2010,7(24):2774.
- [11] 欧超伟,陈利权. 临床实验室沟通技巧探索[J]. 检验医学与临床,2010,7(24):2798.
- [12] 徐桂秋. 对临床输血反应病例的分析及对策[J]. 国际检验医学杂志,2010,11(20):2807.

(收稿日期:2010-08-07)