

• 检验技术与方法 •

# ELISA 一步法和二步法检测 HBsAg 结果的对比分析

刘学政<sup>1</sup>, 张家均<sup>1</sup>, 雷选斌<sup>1</sup>, 冉 训<sup>2</sup>

(1. 湖北省荆州市第一人民医院检验科 434000; 2. 湖北省松滋市第一人民医院检验科 434200)

**摘要:**目的 验证酶联免疫吸附试验(ELISA)乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)二步法诊断试剂灵敏度及评价 HBsAg 二步法诊断试剂的质量。方法 分别采用 ELISA 一步法及二步法两种方法检测体检人群 2 154 例和不同浓度质控血清, 结果不一致样本进行化学发光法定量检测。结果 一步法检测 HBsAg 阴性 1 978 例, 阳性 176 例, 阳性率为 8.17%; 二步法检测 HBsAg 阴性 1 953 例, 阳性 201 例, 阳性率为 9.33%。ELISA 一步法检测的 1 978 例 HBsAg 阴性样本中, 有 25 例二步法检测为阳性。一步法检出率较低, 仅为二步法的 87.56%, 而漏检率为 1.16%。一步法最低检测浓度为 1 IU/mL, 二步法为 (0.1~0.2) IU/mL。结论 一步法与二步法 HBsAg 试剂灵敏度差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 二者检出率具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**关键词:** HBsAg; 一步法; 二步法; ELISA; 乙肝

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.034

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2012)04-0456-02

乙型肝炎病毒(HBV)传染性强, 传播途径广, 发病率高, 且目前无治愈乙型病毒性肝炎(简称乙肝)的特效药。HBV 表面抗原(HBsAg)在 HBV 感染的检测中一直是最为重要的标志物, 是乙肝的早期诊断指标之一。因此, 准确地检测 HBsAg 对于 HBV 感染的临床诊断、治疗以及避免医患纠纷的发生有着重要意义。为评估 ELISA 二步法诊断试剂盒的质量与性能, 本研究通过对 2 154 例本院体检者血清及质控血清同时用一步法与二步法两种方法进行 HBsAg 的检测并进行结果对比分析, 现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 2011 年 3~6 月本院 2 154 例健康体检者血液标本。

**1.2 质控血清** 北京康彻思坦生物技术有限公司生产的 HBsAg(1.0 IU/mL)质控血清, 并配制成 0.5、0.25、0.125 IU/mL 待用。

**1.3 仪器** 美国 ABBOTT ARCHITECT i2000SR 全自动化学发光仪; 美国 Bio-Tek Elx 800 自动酶标仪; 美国 Bio-Tek Elx 50 自动酶标洗板机。

**1.4 方法** ELISA 一步法及二步法 HBsAg 诊断试剂盒均购自北京万泰生物药业股份有限公司。每份血清标本均用一步法及二步法平行检测 HBsAg, 操作严格按照试剂盒说明书进行。检测阳性标本均用两种方法复检 1 次, 对结果不一致的标本在 i2000SR 全自动化学发光仪上进行 HBsAg 的定量检测。

**1.5 结果判断** ELISA 法 P/N 值大于或等于 2.1( $S/CO \geq 2.1$ )为阳性<sup>[1]</sup>。i2000SR 化学发光仪检测结果大于 0.1 IU/mL 为阳性。

**1.6 统计学方法** 应用 SPSS 13.0 统计软件通过 *t* 检验对数据进行统计分析。

## 2 结 果

**2.1 两种方法同时检测样本** 2 154 例。结果显示 ELISA 一步法检测 HBsAg 阴性 1 978 例, 阳性 176 例, 阳性率为 8.17%; 二步法检测 HBsAg 阴性 1 953 例, 阳性 201 例, 阳性率为 9.33%。ELISA 一步法检测的 1 978 例 HBsAg 阴性样本中, 有 25 例二步法检测为阳性, 将此 25 例样本在化学发光仪上进行 HBsAg 定量检测, 23 例检测结果为 (0.13~0.84) IU/mL, 2 例大于 250 IU/mL, 均判定为阳性结果。一步法检

出率仅为二步法的 87.56% (176/201), 而漏检率为 1.16% (25/2 154)。二者检出率的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 结果见表 1。

表 1 ELISA 一步法及二步法 HBsAg 检测结果比较

一步法	二步法		合计(n)
	阳性(n)	阴性(n)	
阳性	176	0	176
阴性	25	1 953	1 978
合计	201	1 953	2 154

**2.2 两种方法对 1.0、0.5、0.25、0.125 IU/mL 不同浓度质控血清进行检测,**一步法 S/CO 均值分别为 1.458、0.846、0.527 和 0.239; 二步法为 3.682、2.245、1.773 和 1.104。一步法最低检测浓度为 1 IU/mL, 二步法为 (0.1~0.2) IU/mL, 二者灵敏度差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 不同浓度质控血清检测结果比较

质控血清(IU/mL)	ELISA 一步法(S/CO)	ELISA 二步法(S/CO)
1.0	1.458	3.682
0.5	0.846	2.245
0.25	0.527	1.773
0.125	0.239	1.104

## 3 讨 论

HBV 存在于乙肝患者的血液、汁液、唾液、经血、乳汁及泪液等分泌物中。HBV 是一种严重危害人类健康的世界性传染病, 已成为全球性公共卫生问题, 而我国更是乙肝高发区。据调查统计, 我国人群 HBsAg 携带率高达 10%~15%<sup>[2]</sup>, HBsAg 携带者总人数达 1.2 亿左右, 慢性乙肝患者多达 1 000 万人, 防治任务极其艰巨。

我国最常用的 HBsAg 检测方法为 ELISA 双抗体夹心一步法<sup>[3-4]</sup>, 该方法操作简单、快速, 但在实际工作中常会出现因样本中 HBsAg 浓度过低或过高致假阴性结果。本次研究 HBV 血清标志物共检测标本 2 154 例, 其中一步法检出率为 8.17%, 二步法检出率为 9.33%。一步法 1 978 例阴性样本中

二步法检出阳性 25 例,漏检率为 1.16%。其中 23 例经化学发光法定量检测为(0.13~0.84) IU/mL,提示样本中 HBsAg 浓度极低,2 例超过 250 IU/mL,提示样本中 HBsAg 浓度过高,导致一步法因灵敏度较低和“HOOK”现象(钩状效应)<sup>[5-6]</sup>而呈假阴性结果。从其检测原理分析<sup>[7-8]</sup>,一步法由于血清和酶标抗体同时加入,若血清中 HBsAg 浓度过高,分别与酶标抗体和固相抗体形成免疫复合物,不形成夹心复合物,产生钩状效应而呈假阴性。二步法为向反应微孔先加入血清,经长时间(1 h)温育,高浓度 HBsAg 与包被的固相 HBsAb“饱和”性结合,再与酶标抗体结合形成夹心复合物而呈阳性<sup>[9-10]</sup>。同时,不同浓度质控血清检测结果显示一步法最低检测浓度为 1 IU/mL,而二步法为(0.1~0.2) IU/mL,二步法灵敏度显著提升,从而有效提高 HBsAg 检出率,与李艳霞<sup>[11]</sup>和姜标、常秋月<sup>[12]</sup>的报道较为一致。

综上所述,ELISA 一步法检测 HBsAg 虽时间较短,操作简便,但确实存在灵敏度相对较低及钩状效应,造成检验结果一定程度的不可靠,建议使用 ELISA 二步法,虽操作时间长,但能明显提高检出率,减少漏检率,为临床提供更加客观准确的 HBsAg 检测结果。

参考文献

[1] 陈桂山,张秀明. 酶联免疫技术检测乙肝表面抗原的分析性能评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):932-933.  
 [2] 马伟军,董萍. 浅谈降低我国全人群乙肝发病率探讨[J]. 中国卫  
 • 检验技术与方法 •

生检验杂志,2009,19(2):451.  
 [3] 张善弟,黄宁. 酶联免疫吸附试验法检测乙型肝炎病毒表面抗原的质量保证[J]. 检验医学与临床,2009,6(1):48.  
 [4] 李凤侠,范亚敏,范永丽. 酶联免疫吸附试验一步法检测 HBsAg 的分析体会[J]. 中国误诊学杂志,2009,9(16):3875-3876.  
 [5] 谭显清,李骏. 酶免疫一步法检测乙型肝炎表面抗原影响因素探讨[J]. 检验医学与临床,2009,6(3):380-381.  
 [6] 蒋玉莲,朱浩稳,等. 酶联免疫吸附试验显色与样本含量的关系[J]. 现代检验医学杂志,2008,23(1):123-124.  
 [7] 王颖. 酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒表面抗原的影响因素[J]. 检验医学与临床,2009,6(1):59-60.  
 [8] 陈佑明,黄敬,刘京平,等. 两种方法检测乙型肝炎病毒表面抗原的比较[J]. 检验医学与临床,2009,6(3):495-496.  
 [9] 土亚婷,包名家,唐晓红,等. 体检人群的 HBV 血清标志物反应模式调查[J]. 中国误诊学杂志,2009,9(12):3022-3023.  
 [10] 陈金超,刘涤瑕,王丽,等. 免疫学检测方法中的干扰因素和对策[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(21):2575-2576.  
 [11] 李艳霞. 时间分辨荧光免疫分析和酶联免疫吸附实验检测乙型肝炎病毒血清标志物结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(11):1218-1219.  
 [12] 姜标,常秋月. HBsAg 酶联免疫法诊断试剂的质量评价[J]. 中华全科医学,2009,7(3):309-310.

(收稿日期:2011-10-13)

## 不同方法提取血清总 RNA 的性能评价

邱 方,陈子祥<sup>△</sup>,杨清玉,刘 晨,董 亮,李 星  
 (江苏省南京迪安医学检验所 210007)

**摘要:**目的 评价 3 种方法提取血清总 RNA 的性能。方法 分别用 Trizol 法、磁珠总 RNA 提取法(磁珠法)、柱式总 RNA 提取法(柱式法)提取血清总 RNA。通过测定样品 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值评价提取的总 RNA 纯度、产量;通过设计引物及 TaqMan 探针扩增总 RNA 的管家基因(GAPDH),以观察各方法提取的总 RNA 用于 RT-PCR 的效果。**结果** 3 种方法提取总 RNA 纯度分别为 Trizol 法(1.83±0.19)、磁珠法(1.94±0.11)、柱式法(1.92±0.12);扩增管家基因 GAPDH,其 Ct 值分别为 Trizol 法(19.37±3.51)、磁珠法(18.33±1.11)、柱式法(18.85±1.20)。**结论** 磁珠法、柱式法明显优于 Trizol 法,磁珠法与柱式法结果差异无统计学意义(P>0.05)。

**关键词:**RNA; 聚合酶链反应; Trizol 法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)04-0457-02

分子生物学技术已经渗透到生物学、医学、遗传学和动物学等各个领域。在分子生物学实验中,提取基因组 RNA 是一项基础工作,能否获得高纯度、一定浓度的模板,是后续实验成败的关键之一。现在用于提取总 RNA 的商品试剂盒很多,根据原理不同归纳起来主要有 Trizol 法、磁珠法和柱式法 3 种,各试剂盒提取效果如何,本文设计实验对上述方法进行评价,现详述如下。

### 1 材料和方法

**1.1 主要仪器及试剂** 日本岛津 UV-2501 可见紫外分光光度计、罗氏 Light cycle 480 荧光定量 PCR 分析仪。Trizol 提取试剂由 invitrogen 公司提供,磁珠总 RNA 提取试剂及 PCR 试

剂由上海之江公司提供,柱式总 RNA 提取试剂由上海科华公司提供。GAPDH 扩增引物及 TaqMan 探针由上海生工提供。

**1.2 标本来源** 20 例血清样本来源于本所临床送检样本。

### 1.3 方法

**1.3.1 Trizol 法** 向灭菌的 1.5 mL eppendorf 管中加入 Trizol 及血清各 100 μL,充分混匀,室温静置 10 min,再加入 200T 的氯仿,用力震荡 15 s;4 ℃,以离心半径 8 cm,13 000 r/mim 离心 15 min,取上层液相至另一灭菌 1.5 mL eppendorf 管,加入等体积异丙醇,轻轻颠倒混匀,室温静置 10 min;4 ℃,13 000 r/mim 离心 15 min,弃上清液,加入 500 μL 75%乙醇,颠倒混匀;4 ℃,8 000 r/mim 离心 5 min,弃上清液,干燥 5

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:chenzx@dagene.net.