3 检测过程中各环节应注意事项

3.1 质量控制 每次检测均应设置双孔阳性与阴性对照,并绘制标准曲线。

3.2 加入标本及试剂 微量加样器必须经过校准,使用洁净的加样吸管^[4];标本需加在微孔板底部,如加在孔壁上部的非包被区,易导致非特异性吸附;加样速度不可太快,从而保证加样准确性和均匀性;避免标本溅出和产生气泡,从而避免孔间污染及反应界面的差异。试剂使用前需颠倒混匀数次,并垂直加入微孔板中;试剂滴加速度不能太快,否则很容易出现重复滴加或试剂黏附于孔壁上部,从而导致在非包被区出现非特异性吸附,引起非特异性显色,造成假阳性结果;每一步试剂都不可遗漏,否则将导致假阴性结果。

3.3 温育的温度及时间 ELISA 作为一种固相免疫测定方法,抗原抗体的结合反应在固相上进行,且必须保证一定的温育温度和时间。如温育温度较低,可能出现弱阳性标本漏检的情况。为了使反应微孔尽早达到 37 ℃,可在检测前对微孔板进行温育。检测过程中进行温育时,需在微孔板表面加贴封片,从而防止孔内液体成分蒸发或水珠等杂质滴入孔内引起的污染;封片不能重复使用,以免引起交叉污染。

3.4 洗板 使用符合要求的蒸馏水或去离子水配制洗板液,且洗板液应在临用前配制。严格按操作说明书设定洗板机的各项参数,注意观察洗板液加入量是否充足;保持洗板针通畅,及时清除洗板针内积存的纤维蛋白原等杂质;洗板后须在干净的吸水纸上拍干。

3.5 加入显色剂与终止液 显色剂应在临用前配制,加显色剂不能溅出孔外,加终止液时要避免产生气泡,以免酶标仪比色时结果不准确。

3.6 结果判读 使用酶标仪判读结果时,应注意阴阳性对照空 OD 值设定及试剂盒提供的阴阳性对照品检测值上下限等諸多因素。

4 讨 论

ELISA 检测步骤简单,但操作过程中的各个环节都不可

忽视,否则将影响检测结果的准确性^[5]。一般而言,弱阳性质控品无法检出可能与试剂质量缺陷、温育时间及温度不够、显色和反应时间太短或检测用水有问题等有关;检测结果重复性差可能与标本或试剂加入量不准确、加入速度过快导致孔间污染及温育、洗板、显色时间不一致等因素有关;阴阳对照品检测均不显色可能与漏加酶结合物、洗板液中含有酶抑制剂(如 NaN_3)、漏加显色剂及终止液当显色剂使用等因素有关;阴阳性对照品检测均显色或间隔有规律地显色可能与洗板不彻底(如洗板机中无洗板液、洗板针堵孔、洗板机管道密封不严导致不能形成有效负压)、洗板液受酶污染和显色剂变质等因素有关。对于灰区标本(通常将临界值上下限一定范围设为灰区)应重复检测,以避免假阳性和假阴性结果^[6]。

为保证 ELISA 检测质量,在实际工作中一定要按操作规程和试剂说明书的要求进行^[7],重视每一步操作细节,从而保证检测质量,为临床提供准确、可信的诊断依据。

参考文献

- [1] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 244-245.
- [2] 王兰兰. 临床免疫学和免疫检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 91-92.
- [3] 孙艳霞. 简要分析标本溶血对 ELISA 检测血清乙肝表面抗原的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(4): 253-254.
- [4] 谢璟, 崔江龙. ELISA 法对乙肝六项检测结果的影响及处理对策[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 84-85.
- [5] 岳希全, 石宏, 李迎. ELISA 法检测 HBSAg 影响结果的重要因素分析[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(2): 213-215.
- [6] 伍伟健, 郭如华. ELISA 试验灰区设置方法的探讨[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(10): 911-912.
- [7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 618-619.

(收稿日期: 2012-08-28)

• 经验交流 •

210 例肝病患者血清肝纤维化指标检测结果分析

史连盟, 郝玉梅

(西宁市第三人民医院内科, 青海西宁 810005)

摘要:目的 探讨血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)和层黏连蛋白(LN)检测在肝纤维化诊断中的价值及其临床意义。**方法** 采用放射免疫法检测 210 例肝病患者及 55 例健康者血清 HA、PC-Ⅲ、Ⅳ-C 和 LN 水平。**结果** 慢性乙型肝炎(简称慢性乙肝)、肝硬化、肝癌患者血清 LN、HA、PC-Ⅲ和 Ⅳ-C 水平高于健康者($P < 0.05$),肝硬化、肝癌患者血清 LN、HA 和 Ⅳ-C 水平高于慢性乙肝患者($P < 0.05$),肝硬化、肝癌患者血清 PC-Ⅲ水平与慢性乙肝患者比较无统计学差异($P > 0.05$),急性肝炎、丙型肝炎患者血清 LN、HA、PC-Ⅲ和 Ⅳ-C 水平与健康者比较没有统计学差异($P > 0.05$)。**结论** LN、HA、PC-Ⅲ和 Ⅳ-C 是反映肝脏状况和肝纤维化程度的良好指标,动态观察其变化可用于判断患者病情进展,也可用于判断患者治疗效果。

关键词:肝病; 肝纤四项; 肝纤维化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.060

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)01-0113-02

肝纤维化是指由各种急慢性肝病引起的肝脏持续创伤修复反应导致细胞外基质过度沉积和肝功能损伤,进而导致肝脏纤维结节形成并破坏正常肝脏结构,最终发展成为肝硬化而出现肝功能衰退,甚至有演变为肝癌的可能^[1-2]。有学者认为肝

纤维化尚有逆转至正常的可能,而肝硬化则没有,阻止或延缓肝纤维化发生、发展有助于治愈大部分慢性肝病患者,因此肝纤维化早期诊断十分重要^[3]。肝纤维化诊断以组织病理学检查为金标准,但该项检查具有创伤性,且不利于多次进行。为此,笔者检测了多种类型肝病患者血清肝纤维化标志物水平,包

括透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)及层黏连蛋白(LN),探讨其对肝纤维化的诊断价值,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 1 月至 2012 年 5 月于本院就诊的患者 210 例,男 132 例、女 78 例,年龄 25~67 岁;急性肝炎 12 例、慢性乙型病毒性肝炎(简称慢性乙肝)128 例、肝硬化 45 例、肝癌 13 例、丙型病毒性肝炎(简称丙肝)12 例,均符合《病毒性肝炎防治方案》诊断标准^[4]。同期于本院体检健康者 55 例纳入对照组,男 35 例、女 20 例,年龄 25~69 岁,无肝病史,近期内肝功能正常,且无服药史。

1.2 方法 采用放射免疫法(RIA)检测试剂盒(北京北方生物技术研究所)及 FJ-2008/PS 型 γ -放射免疫计数器(西安核仪器厂)进行 HA、PC-Ⅲ、Ⅳ-C、LN 检测,具体测定方法参照试剂

盒说明书。各指标质控品检测结果均在要求范围内。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件包进行数据分析。计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

慢性乙肝、肝硬化、肝癌患者血清 LN、HA、PC-Ⅲ 和 Ⅳ-C 水平高于对健康者($P<0.05$),肝硬化、肝癌患者血清 LN、HA 和 Ⅳ-C 水平高于慢性乙肝患者($P<0.05$),肝硬化、肝癌患者血清 PC-Ⅲ 水平与慢性乙肝患者比较无统计学差异($P>0.05$),急性肝炎、丙肝患者血清 LN、HA、PC-Ⅲ 和 Ⅳ-C 水平与健康者比较没有统计学差异($P>0.05$);各型肝炎患者血清肝纤维化标志物水平见表 1。

表 1 各研究组血清肝纤维化标志物水平($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	<i>n</i>	LN	HA	PC-Ⅲ	Ⅳ-C
对照组	55	72.1±16.5	54.8±20.7	69.5±19.8	42.9±12.6
丙肝组	12	85.9±19.8	65.9±25.7	82.6±22.7	55.3±13.8
急性肝炎组	12	88.3±19.9	63.7±21.8	75.4±18.3	63.9±14.8
慢性乙肝组	128	182.4±45.9*	305.9±102.1*	188.6±42.9*	137.5±42.1*
肝硬化组	45	277.2±52.4*#	535.1±125.4*#	196.8±39.6*	241.9±45.7*#
肝癌组	13	263.5±40.2*#	486.6±167.3*#	198.3±52.6*	234.2±42.7*#

*:与对照组比较, $P<0.05$;#:与慢性乙肝组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

在慢性肝炎发展过程中,由于致病因素持续作用和机体免疫功能失调,以至于肝细胞持续受损,纤维组织不断增生,导致肝纤维化的发生。肝纤维化的主要病理变化是胶原蛋白、蛋白多糖及黏连蛋白等多种细胞外基质在肝内过度沉积,导致肝纤维化甚至引起肝硬化^[1]。随着慢性肝炎及肝纤维化病程的进展,血清中细胞外基质成分水平均发生明显变化。有学者认为血清 HA、PC-Ⅲ、Ⅳ-C 和 LN 联合检测是反映肝纤维化的良好指标^[5]。

本研究结果显示,肝硬化和肝癌患者血清 HA 水平不仅高于健康者,也高于慢性乙肝患者($P<0.05$)。Pontinha 等^[6]检测了 111 例慢性无症状慢性乙肝患者 HA 水平,结果证实血清 HA 水平与肝纤维化程度呈显著正相关,而与肝脏炎症无明显关系,认为 HA 是监测肝纤维化的良好指标,可取代肝组织活检。虽然慢性肝炎、肝硬化和肝癌患者血清 PC-Ⅲ 水平高于健康者($P<0.05$),但在慢性肝炎、肝硬化和肝癌患者之间比较,并无统计学差异($P>0.05$),说明肝纤维化可导致血清 PC-Ⅲ 水平升高,但在后期可维持稳定水平,不会随病情加重而继续升高。有研究表明,血清 PC-Ⅲ 水平升高早于形态学检查发现纤维增生,是早期反映肝纤维化的特异性指标^[7-9]。另有报道,血清 PC-Ⅲ 水平增高提示活动性肝纤维化,动态观察血清 PC-Ⅲ 水平可以判断肝纤维化程度^[10]。慢性肝炎、肝硬化和肝癌患者血清 Ⅳ-C 和 LN 水平高于健康者($P<0.05$),说明其对肝纤维化具有一定的敏感性,可以作为反映早期肝纤维化的指标^[11-12]。

综上所述, LN、HA、PC-Ⅲ 和 Ⅳ-C 是反映肝脏状况和肝纤维化程度的良好指标,动态观察其变化可用于判断患者病情进展,也可用于判断患者治疗效果。

参考文献

- [1] Friedman SL. Liver fibrosis—from bench to bedside[J]. J Hepatol, 2003,38(1):38-53.
- [2] Gines P, Cardenas A, Arroyo V, et al. Management of cirrhosis and ascites[J]. N Engl J Med, 2004,350(16):1646-1654.
- [3] 梁振寰, 李绍白. 肝脏病学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2003.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 肝脏, 2000,5(2):257-263.
- [5] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997:379.
- [6] Pontinha N, Pessequeiro H, Barros H. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in asymptomatic chronic viral hepatitis B [J]. Scand J Clin Lab Invest, 1999,59(5):343-347.
- [7] 李颖, 王静艳, 王玉梅. 4 种血清学指标对各型肝炎患者肝纤维化的诊断意义[J]. 中国医科大学学报, 2003,32(2):46-47, 50.
- [8] 路宝川, 许阳, 蒲雪琴. 96 例慢性肝炎患者肝纤维化指标联合检测的意义[J]. 医学综述, 2005,11(2):191-192.
- [9] 李媛媛, 田茵. 肝纤维化和血清标志物联合检测在肝病诊断中的应用[J]. 贵阳医学院学报, 2005,30(1):39-41.
- [10] 何云, 王建宾, 王宇明. 肝纤维化程度诊断方法评价[J]. 成都军区医院学报, 2002,4(3):35-37, 40.
- [11] Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study[J]. Gastroenterology, 2004,127(6):1704-1713.
- [12] 崔东来, 姚希贤. 肝纤维化的血清学检测[J]. 世界华人消化杂志, 2000,8(4):683-684.