

法^[7-8]。ELISA 检测的应用提高了检测速度,但一步法检测 HBsAg 等项目会因抗原浓度过高产生钩状效应而出现假阴性;二步法则导致检测时间延长,当抗原浓度过低时,会因敏感性低而漏检;溶血、脂血、黄疸会使 ELISA 检测产生灰区而出现假阳性,且钩状效应可引起假阴性或低值灰区。CLIA 采用的固相载体体积小,增大了反应面积,且标记物可循环利用,延长了发光时间,大大提高了敏感性,表面抗原检测敏感性可达到 0.05 ng/mL。故 CLIA 能较早检测出 HBsAg,确证 HBV 感染,缩短“窗口期”,同时 CLIA 减小了加样可能带来的误差,也减少了 ELISA 中酶标板孔不均一性所带来的误差,故 CLIA 提高了方法的可靠性。近年来,随着分子生物学技术迅速发展,采用微生物的基因型特征或基因标志对微生物进行检测及鉴定成为可能。FQ-PCR 作为一种新技术,具有快速、准确、灵敏等优点,能同时平行检测大量样本。但该技术耗时长、制备成本高、过程复杂、使用率低、核酸杂交反应的特异性与检测的敏感性不够理想,难以建立标准化数据库,这在一定程度上使 FQ-PCR 不能为实验室研究或临床普遍采用^[9-10]。本研究提示, FQ-PCR 检测的总符合率略高于 ELISA 及 CLIA 检测。

CEA 是医院实验部门及临床医师最终选定检验方法应考虑的因素之一,也是重要的质控指标,它的目的不仅是节约检验费用,最重要的是使检验项目得到合理应用。将“合理、经济、有效”融为一体。CEA 得出的最佳检验方案不是简单的降低成本,而是合理应用医学资源。在临床检验、治疗过程中,用经济学方法拟订最佳检验方法,为临床合理选择检验项目提供客观依据。本研究中,CLIA 检测的成本/效果值低于 FQ-PCR 及 ELISA 检测。

总之,虽然 FQ-PCR 检测的符合率比 ELISA 及 CLIA 检

• 检验技术与方法 •

电化学发光免疫分析法与酶联免疫吸附、胶体金测定低浓度 HBsAg 的效果评价

吕学琴, 马雅静

(新疆兵团农三师图木舒克市中心血站, 新疆图木舒克 843900)

摘要:目的 探讨分别采用增强化学发光酶联免疫分析(ECLIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)及免疫胶体金技术检测低浓度乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的效果。方法 利用 ECLIA 法筛选 70 例 HBV DNA 检测阳性的标本, 将 50 例 HBsAg 临界值指数(COI)为 1~50 的临床标本作为观察组, 20 例 HBsAg COI<1 的临床标本作为阴性对照组。将 70 例临床标本分别再次用 ELISA 及免疫胶体金技术进行检测, 将 COI 控制品作为质控标准。结果 HBsAg ≥ 0.08 ng/mL 时, ECLIA 结果显示阳性(COI>1); HBsAg ≥ 0.7 ng/mL 时, ELISA 法结果显示阳性(OD/CO>2.1); HBsAg ≥ 1.00 ng/mL 时, 免疫胶体金法结果显示阳性。低浓度 HBsAg 的 ECLIA、ELISA 及免疫胶体金技术的检出率分别为 100.00%、46.00% 及 32.00%, 自备临床 HBsAg 血清和标准质控品批内变异系数(CV)为 1.7%~6.1%, 批间 CV 为 2.4%~9.3%, 符合 ECLIA 检测的精密度要求。结论 检测低浓度 HBsAg 时, ECLIA 法是降低假阳性率的理想方法。

关键词:肝炎表面抗原, 乙型; 酶联免疫吸附测定; 胶体金; 增强化学发光酶联免疫分析; 低浓度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1133-03

乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)结果是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的重要诊断依据之一, 持续性 HBsAg 低浓度状态可预示轻微及早期的肝脏损伤, 其测定对乙型肝炎有协助诊断的作用^[1]。目前, HBsAg 的检测方法有增强化学发光酶联免疫分析(en-hanced chemiluminescence enzyme immunoassay, ECLIA)、ELISA 及免疫胶体金技术等。当临床出现 HBsAg 低浓度标

测高, 但是其成本也高, 通过质控分析, CLIA 检测应用的效果最好。

参考文献

- 单桂秋, 李秋生, 肖韶英. 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, 2012, 25(2): 107-108.
- 冯仁丰. 分析灵敏度(检测限)[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(3): 133-136.
- 周迎春, 陈辉, 关平, 等. 3 种方法测定低浓度乙型肝炎病毒表面抗原效果评价[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(11): 1070-1071.
- 王利娜, 姚智. 电化学发光免疫分析技术检测乙肝标志物的应用[J]. 天津医科大学学报, 2008, 14(1): 48-50.
- 董伟. 新型的电化学发光免疫分析及其临床应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2001, 8(1): 31-33.
- 陶洪群, 叶剑彪. ECLIA 和 ELISA 检测血清 HBsAg 的结果比较[J]. 江西医学检验, 2002, 20(6): 323-324.
- 陈慧英, 张锦锋, 岑小鹅, 等. ELISA 检测乙型肝炎 HBsAg 室内质控血清的试制和使用[J]. 上海医学检验杂志, 2010, 15(4): 203-204.
- Weber B, Bayer A, Kirch P, et al. Improved detection of hepatitis B virus surface antigen by a new rapid automated assay[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(8): 2639-2647.
- 郑晓兰, 王文敏, 王彩. 乙型肝炎产妇乳汁乙型肝炎病毒标志物检测与哺乳探讨[J]. 西南国防医药, 2005, 15(3): 296-297.
- 王利娜. 电化学发光免疫分析技术检测乙肝标志物的方法学评价及临床应用[D]. 天津: 天津医科大学, 2008.

(收稿日期: 2013-01-10)

本时, 检测方法的敏感性尤为重要, 由于影响检测结果的因素众多, 浓度处于灰区附近的标本, 其检测结果差异性大, 临床重复性差。免疫胶体金技术虽然操作简便, 但是结果特异性、敏感性低, 临床漏检率居高不下, ECLIA 法具有检测速度快、敏感性高、重复性好、操作简便的优点, 对提高临床有关疾病的诊断速率有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 利用 ECLIA 法筛选 HBV DNA 检测阳性的

标本 70 例,其中,男 45 例,女 25 例;年龄 37~55 岁,平均(38±3.9)岁。将 50 例 HBsAg 临界值指数(cut off index, COI)为 1~50 的临床标本作为观察组,20 例 HBsAg COI<1 的临床标本作为阴性对照组。将 70 例临床标本分别再次用 ELISA 及免疫胶体金技术进行检测,同时将本省临床检验中心提供的临界值(cut off, CO)控制品作为质控标准。

1.2 主要仪器和试剂 LightCycler 荧光定量 PCR 仪、PCR 试剂盒及 HBV DNA 荧光定量配套试剂由广州达安基因股份有限公司提供;链霉亲和素包被的磁性微粒(粒子浓度:0.72 mg/mL,生产批号:2345.2.02)购自美国 Roche 公司;配对的 HBsAg 单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)、生物素标记蛋白试剂盒为美国 Thermo Scientific 公司产品;钌复合物标记的 McAb,发光液、Roche Cobas e601 型全自动电化学发光免疫分析仪及原装配套试剂盒、定标液和质控品由美国 Roche 公司提供;ELISA 试剂盒、酶标仪、洗板机以及胶体金试剂盒由上海沪峰生物科技有限公司提供。

1.3 标本采集 研究对象在空腹、无菌条件下用无肝素真空采血管采集肘静脉血 5 mL,在采血后 1 h 内离心 10 min(离心半径 8 cm,3 000 r/min),分离并吸取上层血清,即刻检测,或 4 ℃ 保存,3 d 内检测,溶血标本弃用。检测前标本恢复至室温,不可反复复温。所有试剂盒、质控品及定标液的使用均在有效期内,并根据试剂盒的要求条件贮存。注意仪器的日常维护以确保定标曲线的有效期及定标曲线发光值的可控范围。操作方法严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 检测方法

1.4.1 ECLIA 本研究使用双抗体夹心 ECLIA 法,将标记有 HBsAg 的生物素、标记有 HBsAg 的三联吡啶钌络合物标记与检测标本共同孵育,使之形成生物素的复合体,将链霉亲和素包被的磁性微粒与复合物共同孵育,结合成生物素/链亲和素磁微粒复合体,调节流速将反应液移至流动室,磁微粒复合体在磁铁的作用下吸附于电极表面,注入三丙胺,使电极产生的电压启动化学发光物质,利用光电倍增管测量光的强度,计算血液标本中 HBsAg 的浓度。

1.4.2 ELISA 用 0.05 mol/L pH9.0 碳酸盐包被缓冲液,将抗体稀释至蛋白质浓度为 1~10 μg/mL。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 mL 抗体稀释液,4 ℃ 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 min。加稀释的待检样品 0.1 mL 于上述已包被之反应孔中,置 37 ℃ 孵育 1 h。然后洗涤。同时做空白孔、阴性对照孔及阳性对照孔实验。于各反应孔中加入新鲜稀释的酶标抗体 0.1 mL。37 ℃ 孵育 0.5~1.0 h,洗涤。于各反应孔中加入临时配制的四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride, TMB)底物溶液 0.1 mL,37 ℃ 孵育 10~30 min。于各反应孔中加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL。在 ELISA 检测仪上于 450 nm 处,以空白对照孔调零后测各孔光密度(optical density, OD)值,若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍,即为阳性。

1.4.3 免疫胶体金技术 在检测板的反应孔中加入 2 滴封闭液,待薄膜吸入;取 40 μL 新鲜血清标本加入反应孔,待薄膜吸入;在反应孔中加入 6 滴洗涤液,待薄膜吸入;在反应孔中加入 2 滴金标液,待薄膜吸入;在反应孔中加入 6 滴洗涤液,待薄膜吸入,最后目测结果。质控点显示红色,反应孔中有红色斑点出现,则判断为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,两组间的相关性采

用直线相关分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ECLIA、ELISA 及免疫胶体金技术检测敏感性的比较 将 CO 控制品稀释成不同浓度的标本,采用 ECLIA、ELISA 及免疫胶体金技术各检测 5 次。HBsAg ≥ 0.08 ng/mL 时, ECLIA 结果显示阳性(COI>1);HBsAg ≥ 0.7 ng/mL 时, ELISA 法结果显示阳性($OD/CO > 2.1$);HBsAg ≥ 1.00 ng/mL 时,免疫胶体金法结果显示阳性。ECLIA 法的敏感性高于其余 2 种方法,ELISA 法的敏感性高于胶体金法。

2.2 ECLIA、ELISA 及免疫胶体金技术检出率的比较 低浓度 HBsAg 的 ECLIA、ELISA 及免疫胶体金技术的检出率分别为 100.00%、46.00% 及 32.00%,见表 1。

表 1 ECLIA、ELISA 及免疫胶体金技术检出率的比较

HBsAg COI	<i>n</i>	ECLIA 阳性 [n(%)]	ELISA 阳性 [n(%)]	胶体金法阳性 [n(%)]
1~50	50	50(100.00)	23(46.00)	16(32.00)
<1	20	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)

2.3 ECLIA 法的精密度 自备临床 HBsAg 血清和标准质控品批内变异系数(coefficient of variation, CV)为 1.7%~6.1%,批间 CV 为 2.4%~9.3%,符合 ECLIA 检测的精密度要求。

3 讨 论

ELISA 法是目前国内各血液检查最常用的方法之一,根据结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,受检标本(测定其中的抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体发生反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原-抗体复合物与液体中的其他物质分开^[2-4]。再加入酶标记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上。此时,固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析,以了解被测标本中抗体或抗原含量。ELISA 操作简单,故被广泛运用,但其受加样、温度、孵育时间、洗板、显色等因素的影响,会出现假阳性或假阴性结果,给临床结果判读带来一定程度的影响^[5-7]。本研究结果显示 ELISA 法检出率为 46%,说明其仍有标本漏诊;胶体金法虽然操作简单、方便,但由于其方法学的原因,敏感性更低,同样对低浓度 HBsAg 检测会产生假阴性结果,通过本研究发现仍有标本在胶体金法中被漏诊。

ECLIA 运用的是双抗体夹心 ECLIA 法,将化学发光剂作为底物,将单克隆抗体包被的磁性微粒作为固相载体(如磁性微粒、树脂及聚苯乙烯珠等),使小分子颗粒与抗体结合,使抗体捕捉能力得到提高并增强表面积的吸附,且能与液体在磁场中分离,使其具有检测速度快、敏感性高、重复性好、操作简便的优点,对提高临床有关疾病的诊断速率有重要意义^[8-10]。该方法所使用的试剂对人体无危害、准确度高、线性范围广,值得临床推广。Roche Cobas e601 型全自动电化学发光免疫分析仪的自动化使人工操作误差减少,标本间相互交叉污染率低,能随机连续检测,适于临床检验即时之需。

笔者认为,临床疑诊 HBsAg 感染者应及时使用 ECLIA 法进行检测筛选,以避免漏诊。HBsAg 的转阴治疗是目前临

床的难点,患者治疗前如果出现 HBsAg 浓度降低,应尽量用 ECLIA 法进行重复检测,以便准确诊断及治疗。

参考文献

- [1] 中华医学会传染病、寄生虫病学分会,肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
- [2] 王蕾, 刘华, 章励, 等. 乙型肝炎血清标志物 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性模式的相关研究[J]. 检验医学, 2008, 23(5): 530-534.
- [3] 徐兆珍, 关伟, 张淑静, 等. 乙型肝炎表面抗原/抗体同时存在的血清学模式与病毒血症的关系[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(3): 216-218.
- [4] 赵秀英, 陈俊梅, 辛永梅, 等. 不同方法检测乙型肝炎病毒血清标志物的差异[J]. 肝脏, 2008, 10(4): 303-305.
- [5] 江涛, 王昌富, 李军. 349 例乙型肝炎病毒血清标志物复检结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(10): 1269-1271.
- [6] 余谨, 毕昊, 陆华新, 等. 核酸检测技术在酶联免疫吸附法漏检 HIV 和 HBV 血样筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(8): 964-965.
- [7] 赵秀英. 血清 HBsAg 定量检测及探讨——从检验者角度看 HBsAg 定量[J]. 北京医学, 2010, 12(3): 216-218.
- [8] 何应中, 郑国波, 邹焰, 等. ECLIA 和 ELISA 检测乙肝病毒血清标志物对比探讨[J]. 遵义医学院学报, 2010, 33(5): 439-442.
- [9] 丁文, 薛庆欢, 吴文金, 等. 人为操作因素对酶联免疫吸附法检测乙肝病毒血清标志物影响的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(7): 1019-1022.
- [10] 杨凡, 单咏梅, 周宏, 等. 不同方法学检测乙型肝炎血清标志物结果的评价分析[J]. 检验医学, 2010, 25(9): 723-726.

(收稿日期: 2013-01-06)

• 检验技术与方法 •

改良加热沉淀法在临床上的应用体会

徐周超

(中国人民解放军第一七五医院检验科,福建漳州 363000)

摘要:目的 评价改良加热沉淀法在本周蛋白检测中的价值。方法 收集该院门诊、住院部申请检测尿本周蛋白患者的尿液标本 50 例,将被检尿液标本用磺基水杨酸进行蛋白定性检查,取蛋白定性检测结果呈阳性的标本分别采用改良热沉淀反应法及免疫法检测尿本周蛋白与尿轻链。结果 50 例尿标本采用改良热沉淀反应法检测本周蛋白,有 3 例标本显示为阳性,阳性率为 6%;同时采用免疫法检测尿轻链,有 19 例标本显示为阳性,阳性率为 38%。结论 改良加热沉淀法作为初筛试验对于基层医疗机构仍为有效的检测方法。

关键词:本周蛋白; 轻链; 尿; 加热沉淀法; 免疫法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1135-02

本周蛋白是免疫球蛋白的轻链单体或二聚体,属于不完全抗体球蛋白。多发性骨髓瘤患者产生大量本周蛋白,阳性率达 35%~65%。本周蛋白的量反映了产生本周蛋白的单克隆细胞数,对观察骨髓瘤病程和判断化疗效果有重要意义。本周蛋白阳性也见于良性单克隆免疫球蛋白血症、巨球蛋白血症、淀粉样变、恶性淋巴瘤、慢性肾炎、转移瘤等^[1]。摄入氨基水杨酸、氯丙嗪、大剂量青霉素等药物可出现假阳性。碱性尿、严重尿道感染等可出现假阴性。故检测尿本周蛋白有诊断意义。免疫球蛋白轻链有含 κ 轻链和 λ 轻链 2 种,游离轻链又称本周蛋白。相对分子质量约为 40 000,在 pH4.9 的酸性环境中加热至 40 °C~60 °C 时凝固,温度上升至 90 °C~100 °C 时溶解,冷却至 40 °C~60 °C 时又出现凝固现象,故又称为“凝溶蛋白”^[2],由于其相对分子质量小,可自由通过肾小球滤过膜进入原尿。当血浆中本周蛋白大量增加,滤入原尿中的本周蛋白超出肾小管的重吸收阈值,即形成本周蛋白尿。有报道采用经典加热法进行本周蛋白检测^[3],但由于经典加热法易受其他蛋白质干扰,结果不容易判断^[4];另有研究认为离心沉淀加热法可克服前者的不足^[5];还有人在原来的基础上使用醋酸盐缓冲液^[6-7],认为这可减少假阳性和假阴性的发生,本研究综合上述检测方法,严格控制实验条件,并将结果与免疫法进行比较,获得较好效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 9 月至 2012 年 11 月本院门诊、住院部申请检测尿本周蛋白患者的尿液标本 50 例,分别采用

改良热沉淀反应法及免疫法检测尿本周蛋白与尿轻链。

1.2 主要试剂 主要试剂为 200 g/L 磺基水杨酸及 pH4.9 醋酸盐缓冲液(醋酸钠 3H₂O 17.5 g, 冰醋酸 4.1 mL, 加水至 100 mL, 调 pH 值至 4.9)。

1.3 检测方法 (1)将被检尿液标本(按常规方法留取患者的新鲜尿液标本)用磺基水杨酸进行蛋白定性检查,若检测结果呈阴性,则可认为该被检尿液本周蛋白阴性^[3],若检测结果呈阳性,则再进一步后续检测。(2)取蛋白定性检测为阳性的被检尿液,编号,各取新鲜尿液 4 mL 于玻璃试管中,加入 pH4.9 醋酸盐缓冲液 1 mL 混匀后,置于 56 °C 水浴 15 min,如有浑浊或出现沉淀,则离心 3 min(离心半径 8 cm,1 500 r/min),将上清液倒入另一个玻璃试管中,收集的沉淀保留于原试管中,将盛有上清液的试管置于 100 °C 水浴煮沸 8 min,若上清液中仍有沉淀,则再离心 5 min(离心半径 8 cm,3 000 r/min),将上清液倒入 56 °C 沉淀管中,将该沉淀与上清液一起混匀,置 100 °C 水浴煮沸 3 min,若混浊变清或减弱,提示本周蛋白试验阳性。(3)将采用改良热沉淀反应法检测所得的本周蛋白阳性的尿液,采用免疫法^[8-9]进行检测。

2 结 果

50 例尿标本采用改良热沉淀反应法检测本周蛋白,有 3 例标本显示为阳性,阳性率为 6%;同时采用免疫法检测尿轻链,有 19 例标本显示为阳性,阳性率为 38%。

3 讨 论

清蛋白在煮沸温度(80 °C~90 °C)开始发生沉淀反应,冷