

[5] Ansari IM, Kickler TS, Borowitz MJ. Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100, relationship to infection and sepsis[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 120(5): 795-799.
 [6] 周新, 阮小明. 临床检验诊断学考核指南[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2006: 122.
 [7] 陈志云. C-反应蛋白与疾病的关系及意义[J]. 河北医学, 2007, 13

(8): 990-992.

[8] 张飞萍, 黄云昆, 王胜虎, 等. C 反应蛋白检测在新生儿感染中的临床研究[J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(16): 2244-2245.

(收稿日期: 2013-05-20)

• 检验技术与方法 •

外周血 HBsAb 的酶联免疫吸附测定与“HOOK 效应”

王 洁, 孟运运, 汪茂荣[△]

(中国人民解放军第八一医院全军肝病中心, 江苏南京 210002)

摘要:目的 探讨酶联免疫吸附测定(ELISA)中,“HOOK 效应”对 HBsAb 测定的影响。方法 分别采用 ELISA 法和化学发光分析仪检测标本原液的光密度(OD)值,并将标本分别作 1:10、1:50 及 1:100 倍稀释,用 ELISA 法对稀释后标本进行检测。结果 HBsAb 检测时,一步法的“HOOK 效应”十分明显,而二步法无此现象。结论 二步法是减少“HOOK 效应”的有效方法。

关键词:酶联免疫吸附测定; 抗乙型肝炎病毒表面抗体; HOOK 效应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2899-02

在中国,抗乙型肝炎病毒表面抗体(anti-hepatitis B virus surface antibody, HBsAb)的检测在没有特殊临床要求的情况下,大多数医院仍采用手工检测法进行检测。正常人群中,通常只有在注射过乙肝疫苗时,选择通过全自动免疫生化仪进行准确定量。目前,大多数国家手工检测一般都采用敏感性为 0.1~1.0 μg/L 的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),该方法具有高度的特异性、敏感性,又加上单克隆抗体技术及自动化设备的发展,试剂稳定,且操作简便、快速、无放射性污染等优点^[1-2]。但在实际工作中,影响 ELISA 测定的干扰因素众多,高剂量钩状效应(HOOK 效应)导致的假低值、假阴性就是其中最常见的影响因素之一。实际上,笔者一直将更多的注意力放在乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)检测中出现的“HOOK 效应”及其解决方法上,事实证明,在实际工作时,HBsAg 检测中的“HOOK 效应”的确得到了很好的解决。但相较 HBsAg,对于 HBsAb 的检测结果,则没有过多地注意和分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集普通门诊就诊患者,男,12 岁,乙肝疫苗注射后,检测 HBsAb 滴度。同时采用了手工 ELISA 检测和化学发光仪检测。

1.2 主要试剂 ELISA 试剂盒由北京万泰生物药业股份有限公司提供,批号为 R20120503;化学发光仪检测试剂由美国 ABBOTT 公司提供,批号为 12076LF00。

1.3 主要检测仪器 主要检测仪器为雅培 i1000SR 化学发光分析仪(美国 ABBOTT 公司)、CliniBio128Ce 型全自动定量绘图酶标仪(奥地利 ASYS 公司)。

1.4 检测方法 分别采用 ELISA 法和化学发光分析仪检测标本原液的光密度(optical density, OD)值,所有步骤均严格遵守操作规程。将标本用生理盐水作 1:10、1:50 及 1:100 倍稀释。并用 ELISA 法分别对稀释后标本进行检测。比较检测结果的差异。

2 结果

采用雅培化学发光法检测原液,结果显示阳性,测得值为 2 249.45 mIU/mL,ELISA 法检测显示阴性。标本稀释后 ELISA 检测的各 OD 值见表 1。

表 1 ELISA 法稀释前、后结果比较

血清	ELISA 结果	OD 值
原液	—	0.134
1:10 稀释液	+	2.922
1:50 稀释液	+	2.335
1:100 稀释液	+	1.036

3 讨论

HBsAb 采用手工检测和化学发光分析仪检测截然相反的结果模式,在常规工作中很少见。大部分人群在疫苗注射后常选择 ELISA 手工检测是否有抗体,只有少部分或有特殊需要的人群会选择化学发光法进行定量检测。ELISA 手工测定分一步二位点夹心法和二步二位点夹心法。由于一步法少了一次洗板及孵育过程,节省了时间,目前仍得到广泛应用。我实验室使用的试剂盒,除 HBsAg 采用的是二步法,HBsAb、乙型肝炎病毒 e 抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)、抗乙型肝炎病毒 e 抗体(anti-hepatitis B virus e antibody, HBeAb)和抗乙型肝炎病毒核心抗体(anti-hepatitis B virus core antibody, HBeAb)均采用的一步法。由于一步法检测 HBsAg 易受到高剂量“HOOK 效应”的干扰,使结果呈假低值或假阴性^[3]。所以,笔者考虑这种情况也可能发生在 HBsAb 的检测中,通过将标本稀释后,采用 ELISA 检测即可测得阳性。

固相 ELISA 测定中,当被测物浓度过高时,反应信号并不强,反而降低,即当被测物浓度超过其线性范围时,其剂量反应曲线并不呈平台状无限延伸,而呈向下弯落状,剂量反应曲线似一把钩子,故而将这种发生在固相 ELISA 测定中的特殊效

[△] 通讯作者, E-mail: maorongwang@gmail.com.

应称“HOOK 效应”^[4-5]。其往往造成标本假低值,甚至出现假阴性的错误结果。

ELISA 检测中的“HOOK 效应”,往往会使强阳性标本检测结果呈现为弱阳性甚至为阴性。一步法“HOOK 效应”是由被测物浓度决定的,抗体的“量”是决定因素。

双抗体夹心二步法是先将被测物加到微孔中孵育一定时间,形成固相抗体,即待测抗体结合物;洗板;再加入酶标表面抗原,形成固相抗原,即待测抗体-酶标抗原结合物,酶催化底物显色。从试验原理可看出,二步法有效地减少了过量复合物的产生,大大降低了“HOOK 效应”的发生率。从而避免一步法因“HOOK 效应”而漏检高值标本的现象发生^[6]。

本实验中雅培 i1000SR 化学发光分析仪的工作原理即为典型的二步免疫测定法,检测结果也证明了在规避“HOOK 效应”上,二步法明显优于一歩法^[7]。

HBsAb 的“HOOK 效应”在实际工作中不易察觉,特别是用一步法试剂盒手工检测时,常被误认为阴性结果。这提示,特别是对于注射乙肝疫苗后的就诊者,手工检测阴性时,可进行“同步稀释法”复检,这是最简便、直接的方法^[8-9],以排除是否为“HOOK 效应”造成的假阴性,建议进一步做化学发光法进行定量。

参考文献

[1] 申子瑜.我国血站实验室血清学标志物检测能力初探[J].临床输血与检验,2013,15(1):1-4.

血与检验,2007,9(2):170-172.
 [2] Fernando SA, Wilson GS. Studies of the 'HOOK' effect in the one-step sandwich immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1992, 151(1/2):47-66.
 [3] 沈伟锋. HOOK 效应与酶联免疫测定[J]. 江西医学检验, 2001, 19(3):172-174.
 [4] 吴人光. 血站 HBsAg 酶联免疫检测的 HOOK 效应及对策[J]. 湖南师范大学学报:医学版, 2010, 7(2):43-44.
 [5] 葛文飞, 罗卜. AFP 酶免疫测定的 HOOK 效应[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(2):99.
 [6] 张国平, 王林, 韩惠云. 抗-HIV 酶联免疫检测的 HOOK 效应及对策[J]. 临床输血与检验, 2007, 9(2):142-143.
 [7] 龚跃云, 欧阳芳, 吴豫. 新两步法和一步法检测乙肝表面抗原的比较[J]. 临床输血与检验, 2012, 14(3):241-243.
 [8] 曹文飞, 罗卜. AFP 酶免疫测定的 HOOK 效应[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(2):99-100.
 [9] 耿全林, 周镇先, 朱媛媛. 南京市两对中标试剂与美国 abbott 试剂的比较[J]. 河北医药, 2005, 8(10):112-114.

(收稿日期:2013-05-13)

高效液相色谱法与琼脂糖电泳法检测 β-地中海贫血携带者 HbA₂ 结果的比较

巢薇

(广西医科大学第四附属医院检验科, 广西柳州 545005)

摘要:目的 比较高效液相色谱法(HPLC)与琼脂糖电泳法检测 β-地中海贫血携带者 HbA₂ 的结果,探讨二者筛查 β-地中海贫血的灵敏性和可靠性。**方法** 产前筛查疑似 β-地中海贫血携带者 154 例,同时检测 β-地中海贫血基因、HbA₂。HbA₂ 分析采用法国 Sebia 琼脂糖凝胶电泳系统和 HPLC 分析系统同时进行分析。β-地中海贫血基因诊断采用反向点杂交法进行 17 种常见突变基因检测,以基因诊断结果作为金标准分别对 HPLC 分析仪和琼脂糖电泳的 HbA₂ 结果进行评价分析。**结果** 在 154 份临床样本中,基因诊断为阳性的样本为 65 例;以 HbA₂>3.5% 作为诊断 β-地中海贫血携带者的最佳临界值,琼脂糖电泳共筛查出 57 例阳性,与基因诊断符合率为 87.6%;HPLC 分析共筛查出 63 例阳性,与基因诊断符合率为 96.9%;琼脂糖电泳与 HPLC 分析仪诊断 β-地中海贫血的灵敏性、特异性分别为 84.6%、97.7%、96.9% 及 98.9%。HPLC 分析仪阳性符合率、灵敏性明显高于琼脂糖电泳,差异有统计学意义(P<0.05);而 HPLC 特异性也稍高于琼脂糖电泳法,但比较无显著差异(P>0.05)。**结论** HPLC 筛查 β-地中海贫血与基因诊断有较高的符合率,是一种筛查 β-地中海贫血灵敏性、特异性和准确度都较高的理想方法。

关键词:琼脂糖凝胶电泳法; 高效液相色谱法; 比较

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.049

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2890-02

地中海贫血是全世界许多国家都关注的重要出生缺陷,估计全球约有 3.45 亿人地中海贫血基因的携带者。广西省中国境内是地中海贫血发生率最高的省份,据统计广西省人群中地中海贫血基因的携带率高达 24.0%。目前,基因检测是诊断 β-地中海贫血的最可靠方法,但由于 β-地中海贫血诊断的实验技术要求高、操作繁琐、价格昂贵且不易进行有效的质量控制,不适合于大规模的人群筛查^[1-2]。经典全血细胞计数和血红蛋白(hemoglobin, Hb)组分分析成为中国南方人群地中海贫血筛查的一线技术。血液学表型筛查结果的准确与否会直接影响地中海贫血基因携带者的检出及后续诊断^[3]。而血红

蛋白的分离鉴定和定量分析在地中海贫血的筛查和诊断中发挥了重要作用,尤其是 HbA₂ 和 HbF 等的定量分析^[4]。本研究对目前应用较广泛的 2 种 Hb 组分分析技术,即高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)与琼脂糖电泳法检测 HbA₂ 的结果进行比较,探讨其在筛查 β-地中海贫血中的灵敏性和可靠性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 154 例研究对象来自本院 2012 年 9 月至 2013 年 3 月产前筛查疑似 β-地中海贫血携带者[平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)<80 fL、平均红细胞血