

本研究中, cTnI 处于中、高浓度时, POCT 法与电化学发光法检测结果相关性良好, 但处于低浓度时, 两种方法检测结果相关性差, 可能与上述因素有关。此外, 本研究中的 POCT 分析系统采用的是固相免疫层析法, 灵敏度小于电化学发光法, 有待进一步改善。

综上所述, 完善的 POCT 检测具有快速、准确、方便等特点, 对心肌标志物的检测特异度高, 与电化学发光法有较高的可比性, 但 cTnI 检测结果与电化学发光法相关性较差, 批内精密度也有待提高。

## 参考文献

- [1] 杨振华, 潘柏申, 许俊堂. 中华医学会检验学会文件心肌梗死标志物的应用准则[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(3): 185-189.
- [2] Price CP. Point of care testing[J]. BMJ, 2001, 322(7297): 1285-1288.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 医疗机构临床实验室管理办法[Z]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2006.
- [4] 叶任高. 内科学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 155-171.
- [5] 邱锡荣, 彭冬迪, 唐荣, 等. 三种心肌标志物检测对心肌梗死及心力衰竭临床诊断的价值[J]. 检验医学, 2011, 26(12): 814-817.
- [6] Wu AH, Apple FS, Gibler WB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases[J]. Clin Chem, 1999, 45(7): 1104-1121.
- [7] 谢正乐, 毛小飞. 心肌标志物检测的发展历程和未来[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 22(1): 64-68.
- [8] Saha B, Evers TH, Prins MW. How antibody surface coverage on nanoparticles determines the activity and kinetics of antigen capturing for biosensing[J]. Anal Chem, 2014, 86(16): 8158-8166.
- [9] Fukunaga A, Tsumoto K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions[J]. Protein Eng Des Sel, 2013, 26(12): 773-780.
- [10] Li F, Yu Y, Cui H, Yang D, et al. Label-free electrochemiluminescence immunosensor for cardiac troponin I using luminol functionalized gold nanoparticles as a sensing platform[J]. Analyst, 2013, 138(6): 1844-1850.
- [11] Kim DH, Paek SH, Lim GS, et al. Performance characteristics of monoclonal antibodies as recyclable binders to cardiac troponin I[J]. Anal Biochem, 2012, 431(1): 11-8.
- [12] Lappe JM, Pelfrey CM, Cotleur A, et al. Cellular proliferative response to cardiac troponin-I in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. Clin Transl Sci, 2011, 4(5): 317-322.
- [13] Song SY, Han YD, Kim K, et al. A fluoro-microbead guiding chip for simple and quantifiable immunoassay of cardiac troponin I (cTnI)[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(9): 3818-3824.
- [14] Lowenthal MS, Gasca-Aragon H, Schiel JE, et al. A quantitative LC-MS/MS method for comparative analysis of capture-antibody affinity toward protein antigens[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(26): 2726-2732.
- [15] Akanda MR, Aziz MA, Jo K, et al. Optimization of phosphatase and redox cycling-based immunosensors and its application to ultrasensitive detection of troponin I[J]. Anal Chem, 2011, 83(10): 3926-3933.
- [16] Haas MS, Alicot EM, Schuerpf F, et al. Blockade of self-reactive IgM significantly reduces injury in a murine model of acute myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(4): 618-627.

(收稿日期: 2015-05-16)

## • 临床研究 •

# 洗板次数与浸泡时间对 ELISA 法 HBsAg 检测结果的影响

闫朝春

(江苏省连云港市东方医院检验科, 江苏连云港 222042)

**摘要:**目的 探讨洗板次数与浸泡时间对酶联免疫吸附法(ELISA)HBsAg 检测结果的影响。方法 采用平行试验的方法, 改变洗板次数和洗板浸泡时间, 对阴性对照、阳性对照、质控品及临床标本进行 ELISA 法 HBsAg 检测。对结果进行统计学分析。结果 只改变洗板次数的情况下, 阴性对照、阳性对照及质控品光密度值(OD 值)均值均随洗板次数增加而降低; 弱阳性标本 OD 值比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 弱阳性标本阳性率随洗板次数增加而降低。只改变洗板浸泡时间的情况下, 阴性对照、阳性对照及质控品 OD 值均值均随浸泡时间增加而降低; 弱阳性标本 OD 值也随浸泡时间的增加而降低( $P < 0.05$ ), 弱阳性标本阳性率也随浸泡时间增加而降低。结论 洗板是 ELISA 操作中的关键步骤, 人为改变洗板次数和浸泡时间均会影响检测特异度和灵敏度, 必须严格按照说明书的要求进行洗板操作。

**关键词:**酶联免疫吸附试验; 洗板次数; 浸泡时间

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.21.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)21-3173-03

酶联免疫吸附试验(ELISA)因灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简单、费用低廉而被广泛应用, 例如 ELISA 检测乙肝表面抗原(HBsAg)敏感度可达 0.5 ng/mL<sup>[1]</sup>。然而, 影响 ELISA 检测结果准确性的因素较多, 如试剂因素、温育条件、洗板方式等, 因此操作控制不当会造成结果偏差<sup>[2]</sup>。在临床工作中, 应根据实验室的实际条件, 对各环节操作进行标准化管理, 排除潜在的影响因素, 可最大限度地降低检测的系统误差。本研究分析了洗板次数和浸泡时间对 ELISA 法 HBsAg 检测

结果的影响, 旨在确定最佳洗板次数和浸泡时间。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** ELISA 法 HBsAg 检测试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司(批号: B20140306)。Addcare ELISA 600 型酶免分析工作站购自烟台艾德康生物科技有限公司。质控品购自北京康彻思坦公司(批号: 201311003, HBsAg 浓度 2 IU/mL)。真空分离胶加促凝剂采血管购自广州阳普医疗科技股份有限公司(批号: 141005)。

**1.2 方法** 采用真空分离胶加促凝剂采血管采集静脉血 4 mL, 室温放置 30 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 分离血清标本(排除溶血及脂血标本)。选择光密度值(OD)大于 5.0 的 HBsAg 阳性标本 56 例及 OD<0.002 的血清标本若干。用 OD<0.002 的血清标本将 HBsAg 阳性标本稀释至 OD 0.8~1.3, 对 56 例阳性标本进行平行试验, 同时设置阴性对照孔 3 个, 阳性对照孔及质控品孔各 2 个, 分别计算均值。根据说明书的要求, 用蒸馏水配制洗液。处理方式 1: 浸泡时间设为 30 s, 洗板次数设为 3~8 次。处理方式 2: 设定洗板次数为 6 次, 浸泡时间设为 0、2、5、10、30 s。

**1.3 统计学处理** 采用 Microsoft Excel 2007 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用 *t* 检验; 计数资料以百分率表示, 组间比较采用卡方检

验。P<0.05 为比较差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 洗板次数对检测结果的影响** 在其他条件不变, 只改变洗板次数的情况下, 阴性对照、阳性对照及质控品检测 OD 均值均随洗板次数的增加而降低。不同洗板次数条件下, 弱阳性标本 OD 比较差异有统计学意义(P<0.05), 阳性率也随洗板次数的增加而降低, 见表 1。

**2.2 浸泡时间对检测结果的影响** 在其他条件不变, 只改变浸泡时间的情况下, 阴性对照、阳性对照及质控品检测 OD 均值均随浸泡时间的增加而降低。不同浸泡时间条件下, 弱阳性标本 OD 比较差异有统计学意义(P<0.05), 阳性率也随浸泡时间的增加而降低, 见表 2。

表 1 不同洗板次数对 HBsAg 检测 OD 及阳性率的影响

洗板次数(次)	阴性对照 OD	阳性对照 OD	质控品 OD	临界值	标本 OD( $\bar{x} \pm s$ )	阳性标本[n(%)]
3	0.026	2.296	2.659	0.105	1.223±0.325*	41(73.2)*
4	0.020	2.278	2.498	0.105	1.146±0.282*	35(62.5)*
5	0.015	2.251	2.176	0.105	1.083±0.311	28(50.0)
6	0.012	2.250	2.064	0.105	1.077±0.259	28(50.0)
7	0.010	2.243	2.068	0.105	1.003±0.301	27(48.2)
8	0.010	2.245	2.061	0.105	0.995±0.247*	25(44.6)*

\*: P<0.05, 与洗板 6 次相比。

表 2 不同浸泡时间对 HBsAg 检测 OD 及阳性率的影响

浸泡时间(s)	阴性对照 OD	阳性对照 OD	质控品 OD	临界值	标本 OD( $\bar{x} \pm s$ )	阳性标本[n(%)]
0	0.085	3.315	3.316	0.105	1.512±0.438*	42(75.0)*
2	0.042	2.746	2.792	0.105	1.347±0.387*	37(66.1)*
5	0.028	2.331	2.328	0.105	1.203±0.405	30(53.6)
10	0.019	2.294	2.103	0.105	1.119±0.341	29(51.8)
30	0.008	2.242	2.084	0.105	1.055±0.357*	28(50.0)

\*: P<0.05, 与浸泡 5 s 比较。

**3 讨 论**

洗涤过程是 ELISA 与均相免疫学检测技术的主要区别之一。ELISA 为非均相免疫测定技术, 需要通过洗涤操作将特异性结合于固相的抗原或抗体与温育过程中吸附的非特异成分分离开, 从而保证 ELISA 检测的特异性, 因此洗板是极其关键的步骤<sup>[3]</sup>。

HBsAg 检测采用的是双抗体夹心 ELISA, 原理是将抗体(抗原)包被在固相表面后, 依次加入待测抗原(抗体)和酶标抗体(抗原), 充分反应后用洗涤的方法, 使固相上形成的抗原-抗体复合物与其他成分分离, 洗去游离的酶标抗体(抗原)后加入底物, 根据酶催化底物显色的程度对待测抗原(抗体)进行定性或定量检测。ELISA 常以辣根过氧化物酶(HRP)作为酶, 以四甲基联苯胺(TMB)为底物, TMB 经 HRP 作用后变为蓝色, 加入酸性终止液后变为黄色, 再以酶标仪进行比色定量<sup>[2,4]</sup>。因此, 操作中的洗涤步骤至关重要。若标本中含有 HBsAg, 与抗体结合后固定在反应孔表面, 不会被洗涤液洗掉, 加入底物液后, 在酶催化下呈显色反应, 即为特异性显色反应; 若标本中无 HBsAg, 就不会形成抗原-抗体复合物, 酶标抗体也不会结合上去, 经洗涤液充分洗涤后可将其洗掉。如果洗涤不充分

(次数不够或洗涤不干净), 酶标抗体残留在微孔板中, 催化底物呈显色反应, 即为非特异性显色反应, 导致假阳性结果, 且洗板次数越少, 越易造成假阳性<sup>[5-6]</sup>。一般而言, 试剂生产厂商会通过反复试验验证洗板次数, 如果人为减少洗板次数, 可能达不到洗涤效果, 而造成假阳性结果。然而, 人为增加洗板次数也可能造成与固相结合的抗原-抗体复合物被洗脱, 而造成假阴性结果<sup>[7-9]</sup>。此外, 不但应规范洗板次数, 洗板方法也应正确。洗板时的注意事项: (1) 采用负压泵抽吸以保证洗板效果。(2) 避免因洗液冲洗过猛导致抗原-抗体复合物被洗脱而造成的假阴性结果。(3) 浸泡时间不能太长, 若时间太长, 已与固相结合的抗原-抗体复合物有可能漂浮而被洗脱, 也可导致假阴性结果。(4) 洗板次数并非越多越好, 洗板次数过多, 不但浪费人力、物力, 也可导致假阴性结果。(5) 不同试剂盒的洗液不能混用, 洗液应按规定的倍数进行稀释<sup>[3]</sup>。(6) 酶结合物不耐干燥, 在较高的温度下易失活, 因此加入底物前, 反应板在空气中暴露的时间长短也会影响检测结果, 时间越长, OD 值越低<sup>[10]</sup>。准确的洗板方法: 弃去孔内液体, 洗涤液注满各孔(不要溢出), 静置 5 s, 用负压泵抽吸孔内洗涤液, 重复 5~6 次后拍干后滴加显示色剂<sup>[9]</sup>。一般而言, 洗板机的洗板效果优于手

工洗板。采用洗板机洗板时,应正确设置浸泡时间和洗板次数。洗板次数较少,造成酶结合物残留,可引起假阳性结果;洗板次数过多,可造成抗原-抗体复合物被洗脱,造成假阴性结果<sup>[9-20]</sup>。

本研究结果显示,洗板次数越少,假阳性结果越多,洗板 3 次,阳性率为 73.2%,洗板 6 次,阳性率为 50.0%,而洗板 8 次,阳性率为 44.6%。此外,随着洗板次数从 4 次增加到 6 次,质控品、阳性标本的 OD 值均呈下降趋势( $P < 0.05$ )。

综上所述,人为增加洗板次数会造成与固相结合的抗原-抗体复合物被洗脱,降低标本检测的 OD 值,影响检测的灵敏度。有部分检验人员担心洗板次数太少会导致无法洗脱与固相结合的非特异成分,认为将洗板次数增加 1~2 次对结果影响不大,于是错误地人为增加洗板次数,进而影响了检测结果,应引起大家的重视。

## 参考文献

- [1] 汪永红,李军,王昌富,等. 温育和洗板方式对 ELISA 测定结果的影响[J]. 中国优生与遗传杂志,2006,14(11):13-20.
- [2] 季育华,陶义训. 影响酶联免疫吸附试验结果的操作因素[J]. 检验医学,2006,21(增刊):47-49.
- [3] 杨娜. 酶联免疫吸附试验检测影响因素探讨[J]. 检验医学与临床,2010,7(22):2558-2559.
- [4] 陶义训. 免疫学与免疫学检验[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1991.
- [5] 李金民. 如何正确的进行 ELISA 测定操作[J]. 检验诊断与实验室自动化,2004,4(5):18.
- [6] 孙家志. 2 种洗板方式对 HBsAg 检测结果的影响[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(1):92-96.
- [7] 马凤莲,张志民,史慧霞. 增加洗板次数对 HBsAb ELISA 检测结果的影响[J]. 中国误诊学杂志,2008,8(9):2103.

- [8] 胡薇薇,商晓春. ELISA 快速法检测 HBsAg 时洗板对检测结果的影响[J]. 浙江预防医学,2002,14(7):62.
- [9] 刘祖勇. 增加洗板次数对 HBsAg ELISA 检测影响[J]. 中国输血杂志,2006,19(2):135-136.
- [10] 彭黎明,王兰兰. 检验医学自动化及临床应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [11] 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.
- [12] 周红辉,李华,麦吕芬. 两种不同技术的洗板机在 ELISA 检测 HBsAg 中的应用分析[J]. 湘南学院学报:医学版,2013,15(4):47-49.
- [13] 刘婷. 3 种不同实验条件的 ELISA 法检测 HBsAg 的比较研究[J]. 中外医学研究,2012,10(7):48.
- [14] 刘莹. 酶联免疫吸附试验操作影响因素分析[J]. 黑龙江科技信息,2011,21(26):83.
- [15] 马兰,吴涛,朴桂花,等. ELISA 检测 HBsAg 洗板方法的探讨[J]. 中国误诊学杂志,2011,11(35):8596.
- [16] 范海丽,史恩祥,王伟,等. 酶联免疫吸附试验检测过程中的质量控制[J]. 解放军医药杂志,2011,23(5):51-53.
- [17] 赵建萍,王莉敏. 洗板因素对 ELISA 方法检测 HIV 抗体的影响[J]. 中外医学研究,2011,9(27):126.
- [18] 易太珍,邹书珍. 影响 ELISA 操作的主要因素[J]. 中外妇儿健康:学术版,2011,19(7):140-141.
- [19] 陈艳玲. 洗板对酶联免疫吸附试验检测结果的影响[J]. 中国误诊学杂志,2011,11(6):1343-1344.
- [20] 刘晓燕,王红. ELISA 法手工洗板与机洗板测定 HBsAg 的比较[J]. 长江大学学报自然科学版:医学卷,2010,16(1):234.

(收稿日期:2015-07-25)

## • 临床研究 •

# 多指标联合检测对卵巢癌诊断意义分析

杨英番<sup>1</sup>,杨 椿<sup>2</sup>,陈 涛<sup>3△</sup>

(1. 甘肃省嘉峪关市计划生育服务中心妇产科,甘肃嘉峪关 735100;2. 甘肃省嘉峪关市第二人民医院外科,甘肃嘉峪关 735100;3. 甘肃省康复中心医院检验科,甘肃兰州 730000)

**摘要:**目的 探讨多指标联合检测对卵巢癌的诊断价值。方法 选择卵巢癌患者 46 例、卵巢良性疾病患者 45 例、体检健康女性 50 例,检测血清肿瘤特异性生长因子(TSGF)、糖类抗原 724(CA724)、CA125、糖类抗原 199(CA199)水平,并进行统计学分析。结果 卵巢癌患者 TSGF、CA724、CA125、CA199 水平高于健康者和卵巢良性疾病患者( $P < 0.05$ ),健康者与卵巢良性疾病患者比较差异无统计学意义( $P < 0.05$ )。TSGF、CA724、CA125、CA199 单项检测对卵巢癌的诊断灵敏度分别为 86.6%、66.7%、77.7%、51.1%,4 项指标联合检测灵敏度为 94.1%,准确度为 90.8%,特异度为 93.8%。结论 TSGF、CA125、CA724、CA199 联合检测可提高对卵巢癌的诊断灵敏度和特异度,对卵巢癌早期诊治有重要临床意义。

**关键词:**卵巢癌; 肿瘤特异性生长因子; 糖类抗原 724; 糖类抗原 125; 糖类抗原 199

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.21.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)21-3175-03

卵巢癌是病死率较高的恶性肿瘤之一,约占妇科恶性肿瘤的 15%,发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌。随着诊治方法水平的不断提高,卵巢癌患者治疗后的生存率有所提高<sup>[1]</sup>。然而,约 70%的卵巢癌患者确诊时已为晚期,治疗后的 5 年生存率仅为 10%~30%<sup>[2]</sup>。目前,尚缺乏可用于卵巢癌早期诊断的特异性肿瘤标志物。糖类抗原 125(CA125)灵敏度和特异

性较低,用于筛查有可能出现漏诊和误诊。临床多采用多肿瘤标志物联合检测以提高卵巢癌诊断率<sup>[3]</sup>。本研究分析了卵巢癌患者肿瘤特异性生长因子(TSGF)、糖类抗原 724(CA724)、CA125、糖类抗原 199(CA199)表达水平及阳性率,旨在探讨肿瘤标志物联合检测在卵巢癌中应用价值。现将研究结果报道如下。

△ 通讯作者,E-mail:1467389532@qq.com。