

• 经验交流 •

ELISA 振动式孵育在乳汁 HBV-M 检测中的应用

耿继业¹,钱厚明²

(1. 扬州市江都区大桥中心医院,江苏扬州 225000;2. 扬州市第一人民医院,江苏扬州 225000)

摘要:目的 比较振动式孵育与静置式孵育酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清、乳汁乙型肝炎标志物(HBV-M)的差异。**方法** 采集乙肝产妇乳汁,4℃放置过夜后吸取中间层乳汁;采集乙肝产妇血清标本,用乙肝表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎表面抗体均为阴性的产妇中间层乳汁作倍比稀释。倍比稀释后的血清标本与中间层乳汁标本均使用振动式孵育与静置式孵育 ELISA 检测 HBV-M。**结果** 振动式孵育 ELISA 检测血清 HBsAg 的 OD 值高于静置式孵育;振动式孵育 ELISA 对乳汁 HBsAg 的阳性检出率高于静置式孵育($P < 0.05$)。**结论** 振动式孵育孵育 ELISA 检测乳汁 HBV-M 较静置式孵育更适用于乙肝产妇母乳喂养安全性评价。**关键词:**振动式孵育; 静置式孵育; 酶联免疫吸附实验; 乳汁; 乙肝标志物**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.066**文献标识码:**B**文章编号:**1673-4130(2015)08-1152-04

乙型肝炎病毒(HBV)DNA(HBV-DNA)与HBV标志物(HBV-M)是评价乙肝产妇母乳喂养安全性的主要指标。基层医疗单位由于受检测条件所限,无法全面开展HBV-DNA检测,只能采用酶联免疫吸附实验(ELISA)进行乳汁HBV-M检测。然而,由于受到乳汁具有易稀释性、乳糜微粒产生屏蔽效应等因素的影响,导致ELISA对乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝e抗原(HBeAg)、前S1蛋白(PreS1)的检测阳性率较低。本研究采用振动式孵育ELISA对乳汁HBsAg、HBeAg、PreS1进行检测,旨在分析振动式孵育的应用效果。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012年6月至2014年6月于本院产科住院的HBsAg(+)产妇79例,年龄23~32岁,其中HBeAg(+)14例,PreS1(+)18例。

1.2 仪器与试剂 HBsAg、HBeAg检测试剂及质控品购自上海荣盛生物药业有限公司,HBsAg质控品浓度为2IU/mL。PreS1检测试剂购自上海科华生物工程股份有限公司。318-MC型酶标比色仪、ST-36W型洗板机购自上海三科仪器有限公司,振动式搅拌仪购自上海医用分析仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 无菌采集产妇产后2~4d内的乳汁,4℃放置过夜后,吸取中间层乳汁。采集1例HBsAg(+)产妇血清[光密度值(OD值)2.825],用HBsAg、乙肝表面抗体(抗-HBs)均为阴性的产妇中间层乳汁作倍比稀释至1:256。

1.3.2 血清标本检测 采用两种不同孵育方法对将稀释后的标本进行HBsAg检测,每种孵育方法每个稀释度标本各测3孔。加入待测标本后,静置式孵育为恒温箱内孵育60min,振动式孵育时间为30min。加酶标记物及之后的步骤按说明书操作,最后读取OD值。

1.3.3 乳汁标本检测 用上述两种不同孵育方法对79例产妇的中间层乳汁进行检测,计算不同孵育方法检测HBsAg、HBeAg、PreS1的阳性例数与阳性检出率。血清与乳汁标本HBsAg检测均同时设2个质控品检测孔。

1.4 统计学处理 计算不同稀释度血清标本两种孵育方法检测HBsAg的OD均值、差值及变化率[变化率=(振动式孵育检测OD值-静置式孵育检测OD值)/静置式孵育检测OD值×100%]。不同孵育方法对乳汁HBsAg、HBeAg、PreS1的检测阳性率以百分率表示,组间比较采用SPSS11.0软件作U检验。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清标本检测结果 不同稀释度血清标本HBsAg检测OD值见表1。振动式孵育ELISA检测的OD值高于静置式孵育,OD检测差值以中间稀释度为大。随着稀释倍数增加,OD差值逐步减小,但OD差值与静置式孵育的OD值之比逐步增高。当稀释至1:256时,静置式OD为0.085(阴性),而振动式OD为0.251(阳性)。

表1 不同稀释度血清标本HBsAg检测OD值

标本类型	静置式孵育	振动式孵育	差值	变化率
原倍	2.825	2.832	0.007	0.25
1:2	2.805	2.823	0.018	0.64
1:4	2.412	2.606	0.194	8.04
1:8	1.951	2.321	0.370	18.97
1:16	1.352	1.842	0.490	36.24
1:32	0.835	1.463	0.628	75.21
1:64	0.412	0.953	0.541	131.31
1:128	0.176	0.425	0.249	141.48
1:256	0.085	0.251	0.166	195.29
质控血清	0.362	0.664	0.302	83.43

2.2 乳汁标本检测结果 两种孵育方法检测乳汁HBV-M阳性例数及阳性率见表2。振动式孵育ELISA对HBsAg、HBeAg的检测阳性率高于静置式孵育($P < 0.05$),两种方法PreS1检测阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 两种孵育方法检测乳汁HBV-M阳性例数及阳性率[n(%)]

孵育方法	n	HBsAg	HBeAg	PreS1
静置式	79	27(34.17)	4(5.06)	6(7.59)
振动式	79	33(41.77)	6(7.59)	6(7.59)

3 讨 论

HBV在乙肝产妇的初乳及日后的乳汁中都可以排出。由于新生儿消化道黏膜尚未发育完全且极易受损,一旦母乳中存在HBV,新生儿感染HBV的风险极高,因此保证母乳喂养的安全性十分重要^[1]。评价母乳喂养安全性的方法之一是对乳

汁进行 HBV-DNA 检测,但相对 ELISA 而言,HBV-DNA 检测操作繁琐,许多医疗单位受检测条件所限,不能开展此项检测,而且乳汁 HBV-DNA 检测阳性率及拷贝数也低于血清^[2]。另一种评价母乳喂养安全性的方法是采用 ELISA 检测乳汁中的 HBsAg,该项检测操作简单,但乳汁具有易稀释性、乳糜微粒可引起屏蔽效应等因素直接影响 ELISA 对 HBsAg 的检测结果,使检测的灵敏度降低。因此如何提高 ELISA 检测乳汁 HBsAg 的阳性检出率值得探讨。

为了部分去除乳汁中的脂质,以减少乳糜微粒的屏蔽效应,本研究参照陈铭等^[3]提出的方法,将乳汁标本在 4 ℃ 条件下放置过夜,使乳汁分为三层,上层以脂质为主,下层为沉淀物,中间层乳汁则可用于检测。振动式孵育有助于促进孵育过程中抗原与抗体的结合。毛焱等^[4]探讨了振动式孵育在脂浊血清标本 HBsAg 检测中的应用效果,研究结果显示振动式孵育检测的 OD 值及阳性率均高于静置式孵育。薛艳等^[5]的研究也得到了相似的结果,但该项研究同时还发现,中间层乳汁与未处理乳汁的阳性检出率相近,分析原因可能是由于 HBV-M 在上、中、下三层乳汁中分布不均,确切原因则有待进一步探讨。

ELISA 法检测 HBsAg、HBeAg、PreS1 的原理均为双抗体夹心法,而振动式孵育正是通过促进抗原与包被抗体和酶标抗体的结合,从而使反应体系的 OD 值明显上升,同时也提高了阳性检出率。本研究结果显示,振动式孵育检测的 OD 值高于静置式孵育,且尽管中等稀释度标本两种方法检测的 OD 值差值较大,但变化率随着稀释倍数的增加而增高,原因可能在于稀释倍数较低,即抗原浓度较高时,采用两种孵育条件均可使酶标抗体充分结合抗原,加上酶的高催化效率,底物显色完全,OD 值处于平台期,因此两种孵育方法检测的 OD 值较为接近;而在稀释倍数较高时,振动式孵育增加了抗原与抗体的结合

· 经验交流 ·

不同洗板方法对 ELISA 检测结果的影响

黄传政,姚春红,邓建平[△]

(湖北省黄石市爱康医院检验科,湖北黄石 435000)

摘要:目的 比较 2 种洗板方法对酶联免疫吸附法(ELISA)乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)检测结果的影响。方法 洗板机法操作步骤为采用洗板机洗板 5 次。改进洗板法为先用洗板机洗板 4 次,拍干后再用纯净水冲淋 2 次。采用 2 种方法对 934 例标本进行第 1 次检测。采用 2 种洗板方法对第 1 次检出的弱阳性标本进行第 2 次检测。结果 2 种方法第 1 次检测的阳性标本检出例数比较差异有统计学意义($\chi^2=4.96, P<0.05$)。第 1 次检测共检出 39 例弱阳性标本。2 种方法对 39 例弱阳性标本进行第 2 次检测,阳性标本检出例数比较差异无统计学意义($\chi^2=0.06, P>0.05$)。结论 需进行大批量标本检测时,采用改进洗板法优于洗板机法,更有利于避免假阳性结果。

关键词:酶联免疫吸附法; 洗板机; 弱阳性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.067

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2015)08-1154-02

酶联免疫吸附实验法(ELISA)操作简单,检测特异度和灵敏度较高,但影响因素较多,如标本前处理、加样、温育、洗板等。此外,虽然 ELISA 检测操作过程中的洗板过程不涉及任何反应,却也同样对检测结果产生一定的影响^[1-4]。笔者分析了不同洗板方式对大量标本和少量弱阳性标本检测结果的影响。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 7 月至 2013 年 5 月于本院体检中心

率,酶标抗体结合较多,因而两种方法检测 OD 值差距增大。由于 HBsAg 检测的临界值(Cut-Off 值)较恒定,因此标本 OD 值升高必然可提高阳性检出率。

本研究中,79 例乳汁标本,静置式孵育 HBsAg 阳性检出率为 34.17%,振动式孵育为 41.77%,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。值得关注的是,血清 HBeAg(+) 和(或)PreS1(+) 产妇的乳汁 HBsAg 检测阳性率接近 100%,提示血清 HBeAg(+) 和(或)PreS1(+) 产妇应尽量采用奶粉喂养新生儿。乳汁中的待检抗原被稀释及乳糜微粒的屏蔽效应是客观存在的,因此即使检测结果为阴性也不能完全排除传染的可能。母乳喂养有较多的优势,因此对于血清 HBsAg(+)、HBeAg(+) 和(或)PreS1(+) 的产妇,应尽可能进行乳汁 HBV-M 和 HBV-DNA 检测,并根据检测结果判断是否采用母乳喂养。

参考文献

- [1] 田瑞华. 乙肝病毒携带者母乳喂养的安全性研究[J]. 中华护理杂志, 2010, 45(8): 739-740.
- [2] 祝峰, 钱厚明, 周宁. HBV 感染产妇血清和乳汁中 HBV-M 与 HBV-DNA 检测[J]. 武警医学, 2012, 23(8): 692-693.
- [3] 陈铭, 艾彪, 何翰, 等. 乳汁 HBV 标志物检测对乙肝产妇哺乳的指导价值[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(5): 759-760.
- [4] 毛焱, 钱厚明, 徐玮, 等. ELISA 振动式孵育用于脂浊血清样本 HBsAg 检测[J]. 江苏医药杂志, 2004, 30(8): 623-624.
- [5] 薛艳, 赵江燕, 钱厚明. 不同标本处理方法对 ELISA 检测乳汁 HBV-M 结果的影响[J]. 临床误诊误治, 2011, 24(11): 85-87.

(收稿日期:2014-12-14)

接受招工及单位体检的人员 934 例。

1.2 仪器与试剂 DNX-9620A 型洗板机购自北京普朗新技术有限公司,MK3 型酶标仪购自芬兰雷勃公司。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)ELISA 诊断试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司,(批号 20130721,有效期 20140120),包括阴、阳性对照品及浓缩洗涤液。HBsAg 质控品购自湖北省临检中心,浓度为 1 ng/L。

1.3 方法

△ 通讯作者,E-mail:3yue12@sina.com