

ELISA 法中出现非特异性显色原因分析

张建伟

【关键词】 ELISA 非特异性 显色
【中图分类号】 R446.61 【文献标识码】 B 【文章编号】 1671-2587(2005)01-0037-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)自 1971 年问世以来,以敏感性高,特异性强、操作简便、安全等特点被广泛应用于临床诊断。但作为一种免疫诊断方法,常常会出现非特异性问题,本文就非特异性显色的原因控制措施进行分析。

1 试剂盒特异性因素

1.1 固相载体的选择:ELISA 中常用的固相载体有微量滴定板、小珠和小试管三种,以微量滴定板最常见^[1]。其具有良好的吸附性能,孔底透明度高,空白值低,各板之间、同一板各孔之间性能相近。聚苯乙烯 ELISA 板由于原料的不同和制作工艺的差别,各产品的质量差异很大。因此,选择试剂盒的同时应对其使用的微孔板质量进行认证、评估。

1.2 包被物的纯度:在酶联免疫测定尤其是间接 ELISA 中,试剂的特异性取决于使用抗原的纯度。目前由于技术条件的限制,包被用抗原或抗体的纯度不可能达到 100%,所以有些非特异性显色不可避免,只能尽可能提高纯度,提高特异性。目前使用的包被抗原一般为合成多肽抗原。

1.3 包被抗体的效价:具有高亲和力和高特异性的包被抗体,是决定试剂特异性的重要方面。

1.4 封闭 封闭是 ELISA 中重要的一步,目的是封闭固相载体表面尚未被包被物所占据的空隙^[2],减少后续步骤中非特异性蛋白的干扰。

2 检验标本中含有酶标记物的干扰物

2.1 内源性干扰物:包括类风湿因子(RF)、黄疸等,类风湿因子可作用于多种动物及人 IgG Fc 段的自身抗体,多数为 IgM 类,能充当抗原成分与固相及酶标抗体反应,从而呈现非特异性显色。黄疸血标本中常含有内源性过氧化物酶,如用辣根过氧化物酶为标记物,就有可能产生非特异性显色。

2.2 外源性干扰物:常常因样品采集、贮存、处理不当造成样品溶血、被细菌污染、标本凝集不全等。溶血标本中红细胞溶解破裂,释放出血红蛋白,而血红蛋白中的铁卟啉是过氧化物酶的类似物,以 HRP 为标记物的 ELISA 测定中,溶血标本可能会增加非特异性显色,有国内报道酶免 HBsAg 试剂检测溶血标本时可造成假阳性^[3]。如有细菌污染,菌体中可能含有内源性 HRP(辣根过氧化物酶)^[2],如在冰箱中保存过久,其中的 IgG 可发生聚合,在间接 ELISA 法中可使本底

加深^[2]。因此,血标本在采集处理时应小心,在冰箱中保存不宜过久。标本分离不完全时,血清中会残留部分纤维蛋白原,也易造成假阳性。

3 操作过程中的问题造成假阳性

3.1 加样:间接 ELISA 标本一般都要进行稀释,如果加样不准就会造成误差,尤其当稀释倍数大时,很小的绝对误差会导致较大的相对误差,使阴性(或弱阳性)标本呈阳性(或阴性)。因此,加样时应将所加物加在 ELISA 板孔的底部,避免加在孔壁上,并注意不可溅出,不可产生气泡。目前,大部分血站已使用全自动酶免加样系统处理标本,可较好地避免以上误差。

3.2 洗涤:ELISA 中正确洗涤是保证结果可重复性的关键步骤,应引起操作者重视。无论是手工还是机器操作,不正确的结果常与不正确的洗涤有关,而 ELISA 就是通过洗涤来达到分离游离和结合的酶标记物的目的。洗涤可以消除残留在板孔中未能与固体抗原或抗体结合的物质,以及在反应过程中非特异性吸附于固相载体的干扰物质。

3.3 温育:每种试剂都有其最佳反应模式,其中温度和温育时间的控制是重要因素。因孵育温度高,反应时间长,会造成整板本底高,阳性率高。温育一般用湿盒或水浴,反应板不宜叠放,以保证各板温度都能迅速平衡,为避免蒸发,板上应加盖。

3.4 酶标仪判读:作为记录测定结果的仪器,酶标仪的性能稳定与否,决定结果的可靠度。首先酶标仪应进行定期保养,对滤光片定期校正;其次酶标仪波长设置要正确,最好使用双波长,一个检测波长,一个参比波长,以消除微孔板底部划痕、不平、指印或液面高度差异造成的光干扰。此外,在用酶标仪读数时最好先擦拭微孔板底部并压平板条。由于各种酶标仪性能有所不同,使用时应详细阅读说明书。

综上所述,目前由于酶联免疫吸附法在技术上缺乏标准化,尽管目前国内外已有部分标准血清或参比血清(血清盘)。但由于受方法学及技术条件的限制,在 ELISA 测定中有时不可避免的会出现一定的非特异性反应,但通过以上措施可以把非特异性显色降至最低限度,从而提高检测特异性,以得到更准确、更可靠的实验结果。

【参 考 文 献】

1 王培华,主编.输血技术学[M].北京:人民卫生出版社,1998.84.
2 郑怀充,韩松,主编.临床检验.ELISA 指南[M].北京:

作者单位:213003 江苏省常州市红十字中心血站
作者简介:万为数据(1965—),男,江苏常州人,主管检验师,本科,主要从事检验和输血管理工作,(Tel)0519-6689995。

23 例抗-HIV 初筛试验阳性结果分析

张玉春 陈斌 石玉惠 梁世艳

【关键词】 抗-HIV ELISA

【中图分类号】 R373 R446.61 【文献标识码】 B 【文章编号】 1671-2587(2005)01-0038-01

由于 AIDS 主要经血液途径传播,故检测 HIV 是保证输血安全的重要检测项目。根据《血站基本标准》和《全国艾滋病检测工作规范》要求,初筛试验室检出的 HIV(1+2)抗体阳性标本,应送确证试验室确证。笔者2000 年应用 ELISA 法检测 28 744 人份标本的抗-HIV(1+2),并与确证试验室反馈结果进行比较,现报告如下。

材料与方法

- 1 样品来源 2000 年本中心体检和复检标本 28 744 人份。
- 2 试剂 国产 ELISA 间接法抗-HIV(1+2)检测试剂,分别来自上海实业科华生物技术有限公司,批号 2000320、20000510、2000706,有效期为 2000620、20001210、200010106;厦门新创技术有限公司,批号 20002101、200021601、200042601、200061601、200071601、200081601,有效期为 2000810、2000810、20001026、20001216、200010116、200010216。试剂盒均为中检所批检合格。
- 3 方法 严格按照各厂家试剂说明书要求进行实验操作和结果判定。同时,根据《全国艾滋病检测工作规范》,标本初筛检测阳性,原有试剂双孔复检或原有试剂加另外一个厂家试剂检测,两孔阳性或一阴一阳,均送确认实验室确认。

结 果

- 1 28 744 份样本中共检出 23 例阳性样本,其中新创试剂(间接法)检出 14 例,科华试剂(间接法)检出 13 例。
- 2 23 例初筛阳性样本全部送省疾病预防控制中心艾滋病确证实验室确认。反馈结果显示,万泰试剂(夹心法)检出 2 例阳性,确证后 1 例可疑(P24);阿克苏试剂(夹心法)检出 1 例阳

性,确证后为阳性(P160、P24),其余 21 例全部为阴性。

讨 论

抗-HIV 检测结果的准确与否对血液质量将产生很大影响,直接关系到供血方的信誉和发展。因此,血液中心化实验室作为初筛实验室,应提高检测质量。

分析 23 例初筛阳性样本,其中新创试剂检出阳性 14 例,阳性率 0.049%;科华试剂检出 13 例,阳性率 0.045%;4 例新创/科华试剂检出结果均为阳性。反馈结果表明,阿克苏试剂(夹心法)检出的 1 例阳性,万泰试剂(夹心法)为阴性,蛋白印迹法(WB)确证为阳性(P160/P24);万泰试剂(夹心法)检出的 2 例阳性,阿克苏试剂(夹心法)为阴性,蛋白印迹法(WB)确证 1 例可疑(P24),1 例阴性;其余样本两种试剂检测结果均为阴性。由此可见,初筛实验室与确证实验室的结果有差异,可能与以下原因有关:(1)操作人员的操作误差。如邻近孔污染、加错标本等。(2)实验室之间的误差。(3)不同厂家试剂之间的误差。(4)双抗原夹心法与间接法之间的误差。第 3 代双抗原夹心法试剂的质量优于第 2 代间接法试剂,第 3 代试剂具有更好的敏感性和特异性,尤其针对感染早期的弱阳性标本^[1]。

总之,为防止 HIV 经血液传播,根据《血站基本标准》和《全国艾滋病检测工作规范》要求,血站对同一份血样必须使用两种不同厂家的试剂检测。本中心要求每份血样的初复检由不同人员操作,使用不同厂家的试剂,对阳性结果及时上报省疾病预防控制中心艾滋病确证实验室确证,尽量避免无偿献血者中抗-HIV 阳性的漏检、漏报,确保输血安全,严防艾滋病经输血传播和蔓延。

【参 考 文 献】

- 1 强来英,林旭东,沈彤庆,等. 国产抗-HIV ELISA 诊断试剂质量提高的血清学证实[J]. 中国输血杂志,2003,16(2):82.

(收稿日期:2004-03-17)

(校对:廖艳秋)

作者单位:730046 兰州,甘肃省红十字血液中心
作者简介:张玉春(1962-),男,甘肃人,主管输血检验师,主要从事血液质量控制与管理,(Tel)0931-8340295-3058。

北京医科大学、北京协和医科大学联合出版社,1994. 40.

- 3 刘振玉,张淑琴,马宏伟,等. 溶血对抗-HIV、HBsAg 等

测定结果的影响[J]. 中国输血杂志,1999,12(1):32.

(收稿日期:2004-03-24)

(校对:廖艳秋)