



酶联免疫反应加速仪检测乙肝五项标志物的性能评价及应用价值

王琴¹ 黎村艳² 陈涵²

1 邵阳市宝庆精神病医院 邵阳市老年病医院检验科 湖南邵阳 422000 2 湖南省人民医院检验科 湖南长沙 410005

摘要：目的 探讨酶联免疫加速仪检测乙型肝炎血清标志物的性能评价及临床应用。方法 分别验证常规 ELISA 检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 的最低检出限。选择最低检出限浓度的样品，用酶联免疫加速仪取代常规温育，每批次改变一次温育时间，每一批次重复 20 次，其它步骤同常规检测，以平均 S/CO 值最接近 1、且 95% 以上孔 S/CO 值 ≥ 1 的孵育温度为实验最佳温度。同时比较两种方法的不精密度和结果一致性。结果 常规检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 的检出低限分别为 0.15IU/ml、7.50mIU/ml、0.67NCU/ml、3.2NCU/ml 和 2NCU/ml。酶联免疫加速仪检测 HBsAg 时，加样后 25min、加酶后 15min、加显色剂后 15 分钟、其 95% 以上孔的 S/CO 值大于 1。检测 HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 时，加酶后温育 15min，95% 以上孔的 S/CO 值大于 1。随着加速仪时间的延长，平均 OD 值显著增加或下降 (HBeAb) ($P < 0.05$)。酶联免疫加速仪和常规检测乙肝五项标志物的不精密度：HBsAg、HBsAb 和 HBeAg 重复精密度和中间精密度均小于 15%，HBeAb 和 HbCAb 重复精密度和中间精密度均小于 20%。酶联免疫反应加速仪温育与常规方法相比较，乙肝五项标志物阳性和阴性符合率均为 95% 以上。**结论** 酶联免疫反应加速仪检测乙型肝炎血清标志物结果与常规检测方法一致，使用加速仪的效率高，至少可缩短一半的反应时间，更好的保证结果报告时限。

关键词：酶联免疫吸附测定 酶联免疫加速仪 乙肝标志物 最低检出限 符合率 不精密度

中图分类号：R446.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1009-5187 (2017) 18-001-03

乙型肝炎感染性强、传播途径复杂、流行面广、发病率高，预防和控制是当前的重要目标之一，乙肝血清标志物是诊断乙型肝炎感染的重要依据之一。ELISA 法检测乙肝血清标志物具有简易、快速、特异性强、灵敏度高、重复性好的特点，且不需要昂贵的仪器，已广泛应用于乙肝五项标志物检测^[1]。为提高实验效率，缩短检验周期，可使用酶联免疫反应加速仪加快加速酶联免疫反应。酶联免疫反应加速仪是利用免疫反应中抗原、抗体结合部分形状互补、凹腔内氨基酸侧键的位置要有利于产生各种次级键同时有序施加的高频电磁波能促使离子迁移和偶极子转动引起免疫分子振动的原理，从而使酶联免疫反应时间由原来得几十分钟甚至数小时在十分钟内完成^[2]。本文拟用常规 ELISA 法检测乙肝五项标志物的最低检测限浓度的样品，探索酶联免疫加速仪最佳温育时间，同时在此基础上评价此方法的性能，评估酶联免疫加速仪在乙肝血清标志物检测中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2013-2014 年乙肝五项血清标志物检测的血清阳性样本和阴性样本各 20 例，其中阳性标本中含弱阳性 10 份、强阳性 2 份，阴性标本含其它标志物阳性 8 份。-80℃ 冷冻保存。

1.2 仪器与试剂

乙肝五项血清标志物 ELISA 检测试剂盒为北京万泰生物药业股份有限公司产品，乙肝五项血清标志物定值标准物质和阴性血清为北京康彻思坦生物技术有限公司产品，NY/MMJ 型酶联免疫加速仪为四川诺亚医疗科技有限公司生产，酶标仪为上海科华实验系统有限公司生产。

1.3 方法

使用乙肝五项血清标志物 ELISA 检测试剂盒，具体操作方法按试剂盒使用说明书进行。

1.3.1 常规方法检测乙肝五项血清标志物最低检出限验证^[3]

采用 HBsAg 标准物质作为定值样本 (浓度为 1.0IU/ml)，用阴性血清做一系列稀释 (5%、10%、15%、20%)，依次检测稀释样本，每个稀释度平行试验 20 次，记录每一孔的 S/CO 值，计算每批次的平均 S / CO 值。以平均 S / CO 大于 1 且接近于 1、且 95% 以上孔 S/CO 值大于 1 所在批次的对应样品的浓度即为 HBsAg 的检出低限。同样用阴性血清系列稀

释 HBsAb 标准物质 (30.0mIU/ml)、HBeAg 标准物质 (4NCU/ml)、HBeAb 标准物质 (4NCU/ml) 和 HbCAb 标准物质 (2NCU/ml)，验证这四项标志物的检出低限。

1.3.2 酶联免疫反应加速仪温育时间确定

取上述 3.2.1 常规 ELISA 方法的最低检出限浓度的 HBsAg 稀释样品，分为 9 个批次检测：每批次改变一次温育时间，并用酶联免疫加速仪取代常规温育，其它步骤同常规检测。同样分别取 HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 的最低检出限浓度的稀释样品，每个项目分 3 个批次检测：每批次改变一次温育时间，用酶联免疫加速仪取代常规温育，其它步骤同常规检测。

每批次平行试验 20 次，记录每一孔的 S/CO 值，计算每批次的平均 S / CO 值。以平均 S / CO 大于 1 且接近于 1、且 95% 以上孔 S/CO 值大于 1 所对应批次的孵育温度即实验最佳温度。

1.3.3 加速仪和常规检测乙肝标志物的不精密度验证^[4]

选择最低检出限样品一份，分别用加速仪和常规方法同一批次内检测 20 次，以 S/CO 值评价五个项目的重复性精密度。

分别用加速仪和常规方法选择最低检出限样品一份，连续检测 20 天，每天 1 次，以 S/CO 值评价五个项目的中间不精密度。

不精密度应小于本检测试剂允许误差 (HBsAg、HBsAb 和 HBeAg 重复精密度和中间精密度均小于 15%，HBeAb 和 HbCAb 重复精密度和中间精密度均小于 20%)。

1.3.4 酶联免疫反应加速仪温育下与常规方法结果一致性比较^[5]

分别抽取常规检测方法检测为阳性和阴性的标本各 20 份，用加速仪检测方法检测，分别计算阳性符合率和阴性符合率。判断是否阴性符合率 $\geq 80\%$ ，阳性符合率 $\geq 80\%$ 。

阴性符合率 (%) = 被测试剂盒测定真阴性数 / (真阴性数 + 假阳性数) * 100%

阳性符合率 (%) = 被测试剂盒测定真阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数) * 100%

1.4 统计学方法

检测结果采用 SPSS13.0 软件进行分析处理，计量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 T 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果



2.1 常规检测乙肝血清标志物的检出低限

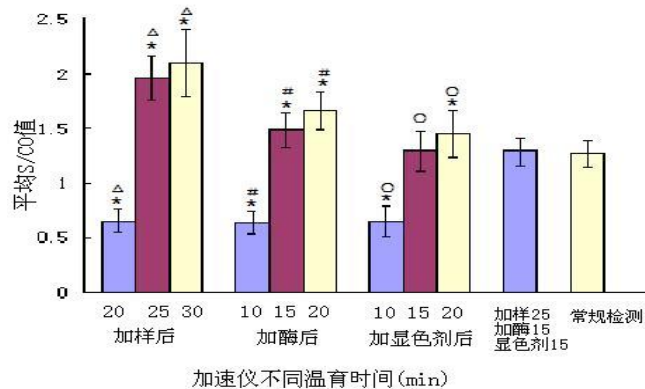
HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 的检出低限分别为 0.15IU/ml、7.50mIU/ml、0.67NCU/ml、3.2NCU/ml 和 2NCU/ml。结果见表 1。

表 1: 常规检测乙肝五项血清标志物的检出低限

检测项目	最低检出浓度	平均 S/CO 比值	S/CO 值大于 1 的比率 (%)
HBsAg	0.15IU/mL	1.27±0.12	100
HBsAb	7.50mIU/ml	1.31±0.11	100
HBeAg	0.67NCU/ml	1.36±0.14	100
HBeAb	3.2NCU/ml	0.84±0.14	95
HbCAb	2NCU/ml	0.48±0.09	100

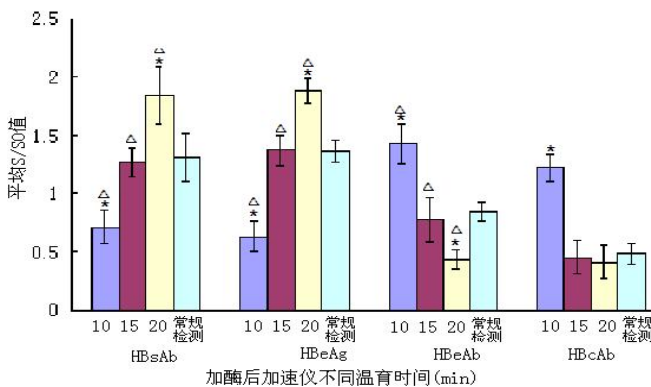
2.2 酶联免疫反应加速仪最佳温育时间

结果显示: 酶联免疫加速仪检测 HBsAg 时, 加样后 25min、30min, 加酶后 15min、20min, 其 95% 以上 S/CO 值大于 1, 与常规检测组相比, 平均 OD 值均明显增加 ($P < 0.05$); 加显色剂后 15min、20min, 其 95% 以上 S/CO 值大于 1, 且 20min 时平均 OD 值明显高于常规组 ($P < 0.05$), 见图 1。检测 HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 时, 加酶后温育 15min, 95% 以上的 S/CO 值大于 1, 平均 OD 值与常规组相比, 无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。随着加速仪时间的延长, 平均 OD 值显著增加或下降 (HBeAb) ($P < 0.05$), HbCAb 有下降的趋势, 但加酶后 15min 与加酶后 20min S/CO 值相比无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: * 与常规检测相比, $P < 0.05$, Δ 加样后三组两两相比, $P < 0.05$, # 加酶后三组两两相比, $P < 0.05$, \circ 加显色剂后三组两两相比, $P < 0.05$ 。

图 1: 酶联免疫加速仪不同温育时间对 HBsAg 检测影响



注: * 与常规方法相比, Δ 加酶后加速仪温育三组两两相比, $P < 0.05$ 。

图 2: 加酶后酶联免疫加速仪不同温育时间对 HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 检测影响

2.3 加速仪和常规检测乙肝标志物的不精密度比较

在最佳温育时间下, 加速仪和常规检测乙肝五项标志物的不精密度: HBsAg、HBsAb 和 HBeAg 重复精密度和中间精密度均小于 15%, HBeAb 和 HbCAb 重复精密度和中间精密度均小于 20%。结果见表 2。

表 2: 加速仪和常规检测乙肝标志物的不精密度 (%)

检测项目	加速仪	常规方法	加速仪中间	常规方法中间
	重复性	重复性	精密度	精密度
HBsAg	9.89	9.51	11.59	13.18
HBsAb	10.29	8.72	13.26	13.75
HBeAg	9.76	10.25	12.27	14.03
HBeAb	14.80	17.13	19.51	19.51
HbCAb	19.95	18.75	18.61	19.30

酶联免疫反应加速仪温育与常规检测的方法学比较

酶联免疫反应加速仪温育与常规方法相比较, HBsAg、HBsAb 和 HBeAg 阳性和阴性符合率均为 100%; HBeAb 和 HbCAb 阳性符合率均为 95%, 阴性符合率均为 100% (表 3)。

表 3: 酶联免疫反应加速仪温育与常规方法结果一致性比

检测项目	标本数量	阳性符合率	阴性符合率
HBsAg	40	100 (%)	100 (%)
HBsAb	40	100 (%)	100 (%)
HBeAg	40	100 (%)	100 (%)
HBeAb	40	95 (%)	100 (%)
HbCAb	40	95 (%)	100 (%)

3 讨论

ISO15189:2007 准则作为指导实验室建立质量体系的纲领性文件, 其第 5.5.2 条款指出实验室应评估所选用方法和程序, 在用于医学检验之前应证实其可给出满意结果^[6]。所以本研究参照医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学检验领域的应用说明^[7], 对酶联免疫反应加速仪检测乙肝五项血清标志物进行检出限, 精密度和符合率的分析性能验证。

抗原抗体的特异性结合是基于抗原决定簇与抗体分子超变区分子间的结构互补性与亲和性, 同时抗原表位与抗体高变区必须紧密接触并且有足够的接触时间才能有足够的结合力保证两者结合完全^[8]。很多因素会对实验结果产生不良影响, 如抗原和抗体本身的性质、活性及含量, 此外, 反应时间、温度、振荡等实验条件, 对 ELISA 检测结果的影响也大, 尤其对于弱阳性标本, 由于孵育条件不当会造成假阴性, 从而出现此类标本的漏报或错报^[9]。

定性试验的临界值高低直接关系实验结果的准确性。所以本研究选择检测底限的样品, 从不同温育时间方面来阐述酶联免疫加速仪对检测结果的影响。结果显示, 与常规 ELISA 检测结果相比, 用酶联免疫加速仪检测 HBsAg 时, 样品温育 25 分钟, 加酶温育 15 分钟, 显色温育 15 分钟已达最佳实验效果。检测 HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HbCAb 时, 加酶后温育 15min 达最佳实验效果。且各组随着温育时间的延长, S/CO 值逐渐增加。通过与常规 ELISA 结果比较, 酶联免疫反应加速仪检测乙肝五项血清标志物的符合率均为 95% 以上。

精密度是检验方法评估中最基本的评价指标, 主要评价测定结果的重复性。

因 ELISA 是数值判定结果的项目, 所以本研究选用定量试验精密度评价方案。结果显示加速仪和常规检测乙肝五项标志物的不精密度均小于厂家给定的变异系数。

另外, 实验结果显示, 酶联免疫加速仪检测 HBsAg 时, 加显色剂后 15min 即达到常规检测效果。可能是酶联免疫加速仪提高了酶催化底物的效率, 从而缩短显色时间。

(下转第 5 页)



课题组采用赵氏雷火灸予以干预气血亏虚伴有腰背疼痛的产后子宫脱垂患者, 点燃的雷火灸具有独特中药配方的药性作用和强大的火热力及红外辐射力, 作用于人体的面(病灶周围)、位(病灶位)、穴达到循经感传传导经络和调节微循环的作用; 另外在用灸区域的面、位、穴形成高浓药区, 在热力的作用下, 以渗透组织深部而达到益气升举的作用。雷火灸所施灸穴位为百会、阿是穴以及腹部任脉(中极、关元)、背部督脉(八髎)和足三里、三阴交穴。百会位于巅顶正中, 督脉穴, 为治疗脱垂性疾病的升提要穴, 有维道属足少阳、带脉之会, 收摄胞宫之功, 张靖敏等^[10]选取百会穴与众多益气调经任督二脉穴位相配, 在结合中药汤剂口服的基础上治疗不同证型的子宫脱垂均取显著疗效, 并认为在长期子宫脱垂患者中, 要视病情正确进行虚实辩证, 切勿虚虚实实之过。中极、关元二穴均位于任脉上, 居于下腹部正中, 二穴是妇产科疾病经典的配伍, 对于妇产科子宫脱垂、痛经、产后尿潴留、盆腔炎等疾病的治疗均有着调理冲任、益气固摄的作用^[11]。八髎穴位于腰骶部督脉上, 有学者从古代文献研究上发现八髎穴与盆底疾病密切相关, 对于“阴挺”的治疗有着众多的文献支持证据^[12]。足三里、三阴交位于下腹部, 分别属于足阳明胃经和足太阴脾经, 二经表里相凑, 共达气血生化之源之功, 有研究发现^[13-14], 在妇产科疾病的针灸治疗中, 足三里、关元二穴可促进产后或绝经期女性的雌激素的释放, 增加大脑活性, 这也从基础实验角度证明的二穴的“培元固本”的作用。补中益气汤出自李东垣的《内外伤辨惑论》, 是治疗中气下陷的代表方, 对于气血不足, 脾胃功能亏损, 中气下陷, 清阳不升的症候有着积极的治疗作用^[5, 16]。

在临床研究中, 本文首次将雷火灸结合补中益气汤治疗妇女产后子宫脱垂气血虚弱型兼有腰背疼痛患者中, 取得满意效果。在研究中, 课题组发现, 在改善脱垂症状及脱垂程度方面, A、B、C三组的总有效率别为63.33%、66.67%

36.67%, A、B两组总有效率明显高于C组, A、B两组相比, 差异不具有统计学意义; 三组治疗前后的盆底肌电位比较有统计学意义, 明显高于治疗前, 组间比较, 与C组比较, A、B组治疗后盆底肌肌电位改善差异具有统计学意义, A、B两组盆底肌肌电位改善程度比较差异无统计学意义; 三组治疗前后盆底肌力比较, 一二类肌纤维肌力均较治疗前明显增高, 但治疗后三组盆底肌力比较无统计学意义。研究结果提示, 雷火灸结合补中益气汤对于产后轻中度子宫脱垂兼有腰背疼痛患者的脱垂程度、脱垂症状及盆底肌肌电位均有积极的效果, 而对于盆底肌肌力的影响, 有盆底肌电刺激与生物反馈和凯格尔运动的组别的效果也较为显著, 这也突出了盆底电刺激和肌力锻炼的重要性。

综上所述, 雷火灸与补中益气汤结合治疗气血亏虚型轻中度子宫脱垂取得积极疗效, 值得临床推广。但在研究中,

作者也发现对于盆底子宫等其他脏器的脱垂治疗中, 应当整体施治, 明确中医辨证分型, 治疗方式因人而异, 而非仅仅关注盆底解剖局部的位置改变。在治疗随访中笔者也发现雷火灸与补中益气汤的联合运用, 对于子宫脱垂患者的睡眠状况、饮食、心理焦虑或抑郁状态均在一定程度有改善。下一阶段, 课题组将从影像学及客观量化的评定角度探讨雷火灸与补中益气汤的联合运用在临床治疗中的循证医学依据, 以期临床改善产后产妇产盆底功能障碍提供一定的治疗依据。

参考文献

- [1] 林忠, 赵军玲, 张政昌, 等. 广西地区壮族女性盆底功能障碍性疾病状况调查[J]. 中国妇产科临床杂志, 2012, 13(5):342-344.
- [2] 祖月娥, 肖亚玲, 李建军, 等. 长沙地区农村妇女盆底功能障碍调查及其相关因素分析[J]. 医学临床研究, 2012, 29(9):1745-1748.
- [3] 张晓红, 王建六, 魏丽惠. 盆腔器官脱垂的定量分度法及其临床应用[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(3):203-205.
- [4] 朱晓敏. 子宫切除术后盆底功能障碍进行盆底肌肉锻炼效果观察[J]. 吉林医学, 2015, 36(9):1866-1868.
- [5] 谭快玲. 盆底电刺激+生物反馈结合补中益气汤治疗气虚型子宫脱垂的临床观察[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2014(17):2514-2.
- [6] Wang L, Chen X, Li X, et al. The improvement of pelvic floor muscle function in POP patients after the Prolift procedure: results from surface electromyography[J]. Int Urogynecol J, 2013, 24(10):1703-1708.
- [7] 刘娟, 曾洁, 王海兰, 等. 生物反馈盆底肌训练治疗压力性尿失禁的疗效分析[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(10):754-757.
- [8] 孙智晶, 朱兰, 郎景和, 等. 初产妇产后6周盆底电生理指标及盆腔器官脱垂分度状况全国多中心横断面研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(5):433-439.
- [9] 明·武之望著. 济阴纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:188.
- [10] 张应虎, 牛巧能. 张靖敏教授针药并用治疗子宫脱垂的经验[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(10):76-78.
- [11] 余思奕, 杨洁, 任玉兰, 等. 基于数据挖掘技术分析艾灸治疗原发性痛经的选穴特点[J]. 中国针灸, 2015, 35(8):845-849.
- [12] 郭萍, 邱伟明. 雷火灸预防肛管直肠术后尿潴留的临床观察[J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(4):57-59.
- [13] 刘海蓉, 张建斌. 八髎穴治疗盆底疾病的古代文献分析[J]. 中国针灸, 2016, 36(12):1327-1330.
- [14] 王蕾, 姜国华, 张玉瑶. 针刺去势雌性大鼠足三里、关元、三阴交穴对其血清中雌二醇和促卵泡素浓度的影响[J]. 中外医疗, 2008, 27(35):83-83.
- [15] 邹昆. 浅谈足三里、关元二穴合用的处方在防治疾病, 养生保健, 延年益寿中的作用[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(35):95-96.
- [16] 胡静, 熊莉. 生物反馈电刺激治疗联合补中益气汤对产后盆底康复疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(8):1766-1768.

(上接第2页)

综上所述, 使用酶联免疫反应加速仪比使用传统水浴箱大幅缩短乙肝五项血清标志物的检验时间, 同时阴性、阳性符合率和重现性与常规检测方法相比无差异。因此酶联免疫反应加速仪对临床正确、快速诊断有很大的积极意义。

参考文献

- [1] 郭琳, 张真铭等. ELISA法检测HBsAg实验条件的优化[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5):
- [2] 杨曙酶, 俞娟, 王惠民. 酶联免疫反应加速仪在检测乙肝表面抗原中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(12):153-154.
- [3] 王治国. 临床检验方法方法确认与性能验证[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009:250-251.
- [4] 李艳, 李山. 临床实验室管理学[M]. 北京: 人民卫生出版社,

2012:59-60.

- [5] 李艳, 李山. 临床实验室管理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012:44-45.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. ISO15189:2007 医学实验室质量和能力的专用要求[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2008.
- [7] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL39: 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学检验领域的应用说明[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
- [8] 许文荣, 王建中. 临床血液学与检验[M]. 第四版, 北京: 人民卫生出版社, 2008:208.
- [9] 徐锋, 李筱莉, 陈燕. 不同孵育条件对HBsAg定性分析的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(10):933-935.