

加样反应温育条件对ELISA法检测丙肝抗原的影响

王丽 滕晓梅 权翠侠

(徐州市第一人民医院检验科, 江苏徐州 221002)

[摘要] 目的: 探讨丙肝抗原检测(ELISA法)加样后改变反应温度及时间对检测结果的影响。方法: 对234例样本分别在37℃温育90min及在43℃温育45min的条件下检测丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-cAg)的S/CO值。

结果: 两种温育条件对于样本阳性检出率、吸光度值、S/CO值没有显著影响。结论: 适当地提高温育温度及缩短温育对HCV-cAg的检测结果影响不明显。这有助于缩短临床检验工作者的工作时间, 尽快报告结果, 提高工作效率。

[关键词] 丙型肝炎病毒核心抗原 酶联免疫吸附试验 温育

The affect of reaction incubation conditions for detecting Hcv-cAg by ELISA method

WANG Li, TENG Xiao-mei, QUAN Cui-xia

(Department of clinical laboratory, The first people's hospital of Xuzhou city, xuzhou, jiangsu 221002)

[Abstract] Objective: In this study, we discuss the effects of incubation temperature and incubation time on results of hepatitis C virus core antigen in the reaction between packet-antibody and antigen by ELISA. Methods: 234 samples were incubated at 37℃ for 90 min and 43℃ for 45 min to detect S/CO value of the hepatitis C virus core antigen (HCV-cAg) separately.

Results: The results suggested that there were no significant changes among the samples positive, absorbance and S/CO value under two incubation conditions. Conclusions: The appropriate increase of incubation temperature and shorter incubation time did not change the results of the HCV-cAg by ELISA. It is helpful for clinical laboratory workers to save work time and improve work efficiency.

[Key words] HCV-cAg; ELISA; Incubation

酶联免疫吸附试验(ELISA)是目前临床上最为常用的感染性疾病血清学标志物免疫测定方法之一。但在临床实验室实际工作中, 经常存在测定结果差异很大的情况。温育是影响检测结果的最关键因素。温育时间及温度对ELISA检测乙型肝炎血清标志物的影响已有相关报道, 而在丙肝抗原检测方面未见报道, 因此我们采用加样后43℃温育45分钟与原反应条件(加样后37℃温育90分钟)进行比较, 探讨加样反应条件的改变对测定结果的影响, 为临床应用提供实验参考依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

所采用的样本来自徐州市第一人民医院检验科从2013年3月-5月份检验完毕之后的血清样本234例, 包括丙肝抗原阳性样本58例, 该58例阳性样本经HCV-RNA进行补充实验或跟踪复查进行了确认。

1.2 试验方法及试剂

1.2.1 样本检测方法 采用酶联免疫(ELISA)双抗体夹心法检测血清中丙型肝炎病毒核心抗原, 所用ELISA试剂盒为山东莱博生物技术有限公司丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒(批号为201302001)。操作过程参照试剂盒说明书, 简述如下: 将234例标本同时分别在37℃温育90min及43℃温育45min后, 加酶液37℃温育30min, 加显色剂显色10min终止反应观察结果, 记录样本在不同温度下的OD值、S/CO值。通过对阳性检出率及精密性等指标的比较, 探讨不同温育条件对检测结果的影响。

1.2.2 精密性比较检测 选取2份HCV感染血清中HCV核心抗原测定结果为阳性的样本A(S/CO=1.56), B(S/CO=6.4), 1份HCV感染血清中HCV核心抗原测定结果阴性的样本C(S/CO=0.44), 按1.2.1的操作步骤进行检测, A B C各测10孔/次; 结果以S/CO值表示, 计算均数及CV值。

1.3 仪器 杭州博日水箱(HB-100); 美国伯乐酶标洗板机(BIO-RAD); 瑞士奥斯邦全自动酶免分析仪(E-SIAR)。

2 结果

2.1 不同温育条件HCV核心抗原初次测定结果实验表明, 234例样本在37℃温育90min条件下, 共检出阳性样本58例、阴性样本176例, 阳性检出率为23.87%。234例样本在43℃温育45min条件下, 共检出阳性样本53例、阴性样本181例,

阳性检出率为 21.81%。经 χ^2 检验， $P < 0.05$ ， $Kappa = 0.941 > 0.75$ ，表明两种温育条件并没有对样本阳性检出率造成显著影响，一致性良好。有 5 例样本 43 温育 45 min 检测为阴性而 37 温育 90 min 为阳性，该 5 例样本 37 温育 90 min 检测为弱阳性 ($1 < S/CO < 1.2$)，而 43 温育 45 min 检测为可疑 ($0.8 < S/CO < 0.99$)。

表 1 37 温育和 43 温育条件下 HCV 核心抗原初次测定结果 S/CO 值分布表

样本温育条件	阴性结果 <0.8	可疑结果 0.8-0.99	弱阳性结果 1-1.2	强阳性结果 >1.2
37 温育 90 min	174	2	3	55
43 温育 45 min	165	16	6	47

表 2 样本阳性检出率 χ^2 检验

样本温育条件	阴性结果 <1	阳性结果 >1
37 温育 90 min	174+2=176	55+3=58
43 温育 45 min	165+16=181	47+6=53

注： $\chi^2 = 207.921$ ， $P < 0.05$ ， $Kappa = 0.941$

2.2 不同温育条件下阳性样本、阴性样本下吸光度和 S/CO 值对比

表 3 6 例出现阴阳性判断差异 S/CO 值

样本温育条件	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6
37 温育 90 min	1.05	1.17	1.14	1.09	1.14	0.91
43 温育 45 min	0.97	0.93	0.87	0.94	0.82	1.12

对比发现，37 温育 90min 和 43 温育 45mi 共有 6 例出现阴阳性判断差异。其中有 5 例样本在 37 处理时检测为阳性，43 温育处理时检测为阴性。有 1 例样本在 37 处理时检测为阴性，43 温育处理时检测为阳性。且以上结果有差异样本均为弱阳性($1 < S/CO < 1.2$)。对比 58 例样本在 37 温育处理和 43 温育处理下 S/CO 值可以看出 37 反应条件下有 39 个样本的 S/CO 值比该样本在 43 时样本的 S/CO 高。从阳性样本 S/CO 均值上看，37 温育 90 min 得到的均值比 43 温育 45 min 得到的均值高 0.08，高出 1.12%，差异不显著。另外，实验中 43 温育 45min 时阴性样本值比 37 值高。

表 4 37 温育和 43 温育条件下阳性样本、阴性样本吸光度和 S/CO 值对比均值测定结果

	阳性样本吸光度均值	阳性样本 S/CO 均值	阴性样本吸光度均值	阴性样本 S/CO 均值
37 温育 90 min	0.599	4.79	0.0826	0.66
43 温育 45 min	0.589	4.71	0.0854	0.76

实验表明，243 例样本在 37 温育 90 min 条件下，S/CO 均值为 4.79。243 例样本在 43 温育 45 min 条件下，S/CO 均值为 4.71。

2.3 方法内和方法间精密度

如下图所示，方法间离散指数 CV 值均小于 10%，说明以上样本测定结果可靠。

表 5 方法间精密度评估结果

血清	方法间精密度			
	37 90 min		43 45 min	
	S/CO 均值	%CV	S/CO 均值	%CV
A	1.53	3.98	1.26	4.94
B	6.50	6.03	4.62	5.37
C	0.45	9.12	0.50	9.84

3 讨论

ELISA 反应是抗原、抗体的结合在固相表面上发生的一系列的反应，抗原抗体结合是一个逐步平衡的过程，需要经过扩散才能达到反应的终点。因此，ELISA 反应需要一定时间的温育 [1]。温育常采用的温度是 43、37、室温和 4，其中最常用的是 37，也是大多数抗原抗体反应的适合温度 [2]。在临床 ELISA 法测定中，检验工作者往往要同一时间处理大量的样本并且要获得准确的检测结果，这需要大量的时间和精力。丙肝抗原检测中 (ELISA) 加样反应条件为 37 温育 90 分钟，比较耗时。在乙型肝炎表面抗原酶免疫检验方法的国家标准 (ws/T 223-2002)，提到加样后的反应条件为 37 C 水浴或恒温箱保温 2h 或 43 C 保温 1h，另根据阿仑尼乌斯方程式，提高反应温度可以缩短反应时间，在丙肝抗原检测中是否可以采用提高反应温度缩短反应时间，以提高工作效率，尽快报结果，因此我们设计本实验使样本中的抗原与包被抗体在水浴 43 下反应 45min，与在 37 下反应 90min 的结果作比较，研究结果表明，两种温育条件在大多数阳性样本及阴性样本其阴阳性检出率、吸光度值、S/CO 值没有显著差异，但在 $0.8 < S/CO < 1.2$ 的样本易产生波动及差异。

根据本次研究结果，笔者认为在丙肝抗原检测在初次检测时可以采用 43 反应 45min 的温育条件进行操作，另设定灰区 ($0.8 < S/CO < 1.2$)，对检测为灰区的样本再可按造产品说明书中的设计 37 反应 90min 进行复查，按此方法既可以缩短反应时间，以提高工作效率，尽快报结果，同时对灰区样进行复查，也更以更好地保证结果的准确性。

参考文献：

[1] 李天君，张印则. 影响 ELISA 检测结果的因家 [J]. 中国输血杂志，2000,13(4)：250
 [2] 王芳. 浅谈温度对 ELISA 检测法的影响 [J]. 医技杂志，2007,14(17)：2366.
 [3] 陈 鹤，刘庆菊. 温育温度及时间对 ELISA 快速一步法检测乙型肝炎标志物的影响 [J]. 南华大学学报医学版，2006,34 (1)：138-139