维普资讯 http://www.cqvip.com

⑱
225-228

重庆医科大学学报 1993年第18卷第3期

手指全血微量ELISA法检测乙型肝炎病毒六项标志物的方法学评价

检 验 系 刘国卿 罗云萍 曹唯希
第一医院检验科 康 红 张玉洪 赖利华

R446.61

提 要 本文建立了手指全血微量ELISA法检测乙型肝炎病毒六项标记物的改良方法，并按照卫生部对乙肝标志物检测质控的要求对该方法作了系统的方法学评价，用该法和静脉血清常规法同时检测了240例乙肝六项标志物，两方法检测结果经配对资料显著性检验无显著性差异（$P>0.05$）。该方法突出的优点是用血量甚微、直接用全血加样，实验所用试剂、标本加样全部减半量反应

关键词 乙肝标志物；酶联免疫吸附试验 乙型肝炎病毒，ELISA
中图分类号 R446.61

乙型肝炎病毒标志物六项指标的检测，是乙型肝炎病原学诊断必不可少的实验，也是对乙型肝炎疗效观察，预防接种的重要指标。为便于乙肝六项指标检测的普及，方便病人，特别是解决婴幼儿采血难的问题，我们采用微量手指全血微量ELISA法检测乙型肝炎病毒标记物六项指标，并与静脉血清常规法进行比较，同时检测了240例病人，证明两方法六项指标检测结果有较好的符合率。我们采用手指全血，对常规的酶联免疫吸附法检测六项指标的试验反应系统改为减半量反应，大大节省了成本，省钱、省事。各项指标的检出率经方法学评价鉴定都达到卫生部对乙肝六项指标的检测要求。现将实验方法介绍如下：

材料和方法

1. 材料

（1） 标本来源

健康普查人群和乙肝复查人群共240例，同时取静脉血3ml，手指全血80μl。

（2） 器材

① 10～50μl、100μl加样器各一支

② 全血稀释板（用聚丙乙烯酶标反应板替代）

（3） 手指全血稀释液

全血稀释液（pH7.4PBS—吐温）

NaCl 0.8克 KH_2PO_4 0.02克
KCl 0.02克 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.29克

溶解于100ml蒸馏水中，加吐温-20 0.5ml，肝素钠5000u，4℃冰箱保存备用。

（4） 检测试剂

检测试剂盒系华美生物工程公司乙肝六项指标检测精装试剂盒

（5） 乙肝标志物定值质控血清：

由华美生物工程公司提供（系由华美生物工程公司质控部根据卫生部中国药品生物制品检定所提供的标准品标定的质控物）

2. 方法

（1） 检测标本制备

① 常规静脉采血3ml。

② 同时对患者的无名指尖用75%酒精消毒，用一次性采血针刺破皮肤，用40μl微量移液器分两

维普资讯 http://www.cqvip.com

次共取血80μl，按下述方法加入全血稀释板进行稀释：在稀释板的第一横排孔加入全血稀释液120μl，第二横排孔加入全血稀释液100μl，第三、四横排孔加入全血稀释液180μl。然后将采集的80μl手指全血放入稀释板的第一横排孔中，（约相当于1:5的血清稀释度）；从第一横排孔取稀释全血100μl加到第二横排孔（约相当于1:10的血清稀释度）；再从第二横排孔取稀释全血20μl，加到第三横排孔（约相当于1:100血清稀释度）；最后从第三横排孔取稀释全血20μl，加到第四横排孔（约相当于1:1000的血清稀释度），混匀，备用。

③ 各系统阴、阳性对照血清参照所述相应项目的稀释度进行稀释。

（2） 酶联免疫吸附试验

基本上按华美生物工程公司的乙肝六项指标的试剂盒说明书进行，但各系统从包被物开始，各步骤的试剂、样品的加样量都比原来的静脉血清常规法减半量进行。具体操作步骤和结果判断参见试剂盒说明书。

结　果

1. 改良微量手指全血微量ELISA法的方法学评价结果

（1） 灵敏度

同时用微量法和常规法对华美公司提供的根据卫生部中国药品生物制品检定所同标准品标定的高值质控血清，经连续倍比稀释后进行测定。结果表明：以卫生部标准衡量，各系统经改良的微量法检测的灵敏度都达到卫生部规定的最低检出限量的要求。各系统所达最低检出限，两方法是完全一致的。结果见表1。

（2） 线性

对HBsAg、抗-HBs和抗-HBe三个系统已知的阳性高值血清进行了倍比稀释，结果不同浓度和相应OD值之间有良好的线性相关。其线性相关系数γ值均为0.99。

（3） 特异性与精密度

各系统分别对同一定值阳性质控血清及同一已知阴性血清重复10孔检测，结果未出现1例假阴性和假阳性。各系统精密度显示了较好重复性，变异系数均<15%。见表2。

（4） 与常规法比较

用改良微量法与常规法同时检测HBsAg，20例标本，将两法测得的OD值结果进行相关分析，显示两法有良好的相关性（$\gamma=0.96$，$P<0.01$）

2. 病人标本用微量手指全血微量ELISA法和静脉血清常规法检测结果比较

检测了240人份微量手指全血和静脉血清，结果及比较见表3，每人份的两种标本在同时、同人、同一批试剂盒检测乙肝六项

表1 改良法与常规检测最低检出值比较

	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc
改良法	1ng/ml	27.2mIU/ml	0.5NCU/ml	2NCU/ml	1NCU/ml
常规法	1ng/ml	27.2mIU/ml	0.5NCU/ml	2NCU/ml	1NCU/ml
卫生部颁标准	1—5ng/ml	10—30mIU/ml	1—2NCU/ml	2NCU/ml	8NCU/ml

表2 各系统精密度检测结果

项目	平均OD值(OD)	标准差(S)	变异系数(%)
HBsAg	2.26	0.073	3.3
抗-HBs	0.682	0.015	2.3
HBeAg	0.641	0.025	3.9
抗-HBe	0.114	0.0113	9.9
抗-HBc	0.116	0.0065	5.5

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3　微量手指全血微量酶法与静脉血清常规法检测HBV六项标记的比较

微量手指全血	静脉血清（常规法）																	
	HBsAg			抗-HBs			HBe			抗-HBe			抗-HBc			抗-HBc-IgM		
	+	−	合计	+	−	合计	+	−	合计	+	−	合计	+	−	合计	+	−	合计
+	89	4	93	18	1	19	52	5	57	32	2	34	69	1	70	62	6	68
−	11	136	147	5	216	221	3	180	183	8	198	206	3	167	170	8	164	172
合计	100	140	240	23	217	240	55	185	240	40	200	240	72	168	240	70	170	240
结果一致率	93.8%			97.5%			96.7%			95.8%			98.3%			94.2%		
配对资料 χ^2 检验	=2.4			=1.5			=0.125			=2.5			=0.25			=0.07		
P值	>0.05			>0.05			>0.05			>0.05			>0.05			>0.05		

指标，两种方法比较，六项指标结果一致率在93.8～98.3%之间，经显著性检验两法检测结果是一致的。（$P>0.05$）见表3。

讨　论

对于乙肝五项指标的检测以前曾有人用微量的纸片法、试管法进行试验[1,2]，但均需离心取上清液进行实验，且折合血清稀释的起始浓度一般都大于1:15倍，这往往造成某些系统的阳性标本的漏检，使这种改良法失去了医学决定性水平的意义。

我们曾两次将5例阳性病人的手指全血原样和分别1:5、1:10、1:20、1:40稀释后进行ELISA法检测，结果发现，抗-HBs、抗-HBe的原样、1:5稀释后，其显色明显，结果易判断，而在1:10稀释时则显色浅淡，易被判为阴性。HBsAg的原倍，1:5、1:10、1:20稀释后，显色都明显，结果易判断。考虑到全血用量少，在尽可能不降低阳性检出率的情况下，我们选用抗-HBs、抗-HBe的全血稀释度折合血清稀释度约为1:5，而HBSAg、HBeAg的全血稀释度折合血清稀释度约为1:10，而抗-HBc、抗-HBc-IgM则按厂家试剂盒要求，按1:100、1:1000的血清稀释度进行加样。

手指全血是否可以代表静脉血清中乙肝标志物的量呢？基于人体静脉血与手指全血在乙型肝炎病毒血症时乙型肝炎病毒标志物在静脉血与外周血的分布应是一致的，因此，手指血液中的乙肝病毒标记物的检出可反映出静脉血液中的乙肝病毒标记物的情况，用手指全血代替静脉血清，除了血液中的有型成份占据了约50%的压积外，其它成份都与静脉血清相同。不离心分离血清，直接用经稀释的全血加样不会干扰检测六项指标的实验反应体系。将稀释的手指全血加入到减半量包被的酶联免疫吸附试验的反应板孔中，各步骤加样量减半，根据免疫反应的原理，抗原、抗体的量都相应地减少，不会影响反应结果。实验证明是完全可行的。

全血标本经稀释后，显色变浅，会不会导致漏检呢？根据卫生部选定的试剂盒应达到的检测的临界值标准[3]，大多数阳性病人的含量范围，经采用本方法选用的血清稀释度稀释后，按理论折算，其检出范围仍远远高于卫生部规定的临界标准。证明本方法稀释后并不影响阳性检出率。

在本实验中，各系统均有2例微量全血法阳性，而血清法阴性的情况，原因可能是1、本实验是全血标本，考虑存在非特异性吸附或凝集。2、全血标本中含有各种细胞，可能在血细胞表面粘附有HBv抗原成份，因而提高了阳性率[4]。

六项标记物的微量手指全血微量ELISA与静脉血清常规法检测结果比较，一致

维普资讯 http://www.cqvip.com

率在93.8～98.3%之间，经配对资料X^2检验均无显著性差异（$P>0.05$），因此用微量手指全血微量ELISA法检测HBV六项标记物是可行的，必要时可取代静脉血清常规法用于检测，对可疑病例，还可减少微量手指全血的稀释倍数复测，或再采静脉血清检测，以防止漏检。

改良微量手指全血微量ELISA法有以下特点：1、所需血样少，取血容易，受试者易接受。2、不需离心分离血清，不需注射器材和离心设备，省钱、省事。实验系统中全用减半量标本及试剂加样，使实验成本降低一半以上，为这项实验的普及以及在广大群众中普查乙肝六项指标提供了方便。3、ELISA操作简便，无需特殊设备，目前国内又有成套试剂盒供应，为乙肝六项标记物检测方法的普及提供了方便。

参 考 文 献

[1] 周 娅,等. 宁夏医学杂志 1988,11(1):14

[2] 徐张汉,等. 上海免疫学杂志 1987; 7(2):90

[3] 郑怀况, 等. 中华医学检验杂志 1992; 15(2):80

[4] 祝念林, 等. 第二军医大学学报 1987; 8(5):349

(收稿日期 1993-03-03)

EVALUATION ON THE METHOLOGY OF IMPROVED ASSAY METHOD FOR 6 MARKS ON HBV USING FINGER'S BLOOD AND MICRODETERMINATION ELISA

Liu Guoqing, et al

Dept. of Hematology, Faculty of Laboratory Medicine

In this paper, we reported the improved assay method for 6 marks on HBV using finger's blood and microdetermination ELISA. It was evaluated with methology according to the quality control standard published by the Health Ministry. Two methods were compared using determination of serum of venous blood and using microdetermination of finger's blood for dectetion of 6 marks on HBV in 240 patients. Their identical ratioes were 93.8-98.3% and this method is better than others. It needs only 80μl finger's blood and it doesn't need serum separated from venous blood. During the experiment, only a half dose reagent and sample were used

KEY WORDS Marks of HBV, ELISA