DOI:10.16016/j.1000-5404.1980.03.013

酶联免疫吸附法检测乙型肝炎表面抗原的灵敏度及其主要影响因素

田荣福　张　凌　薛国文

酶联免疫吸附法（ELISA）是70年代发展起来的一项新的检测技术。它具有放射免疫、免疫荧光技术的优点，又克服了两者的缺点；灵敏度高，特异性强，简便易行，对人无害。国外已广泛使用。

我们于1979年初，开始了ELISA检测乙型肝炎表面抗原（HBsAg）的实验，取得了较好的结果①。现又进一步对其检测HBsAg的灵敏度及其主要影响因素进行了研究，共检测各类人员标本3034份。现将结果报告如下：

材　料　和　方　法

一、材料：

1．待检血清标本：1,959份来自重庆地区病毒性肝炎流行病学调查标本，1,075份来自部队医院工作人员及连队干部战士调查标本。

2．包被和标记用纯抗-HBs，反向血凝法（RPHA）诊断用血球均由卫生部北京生物制品所供给。

3．I^{125}标记抗-HBs由中国科学院原子能研究所供给。测定用FH—408型自动定标器、FT—603井型γ闪烁探头为北京261厂产品。

4．辣根过氧化物酶：上海东风厂（RZ:3.1），西德（RZ:2.88），美国Sigma Ⅵ（RZ:3.1，RZ:3.2）。

二、检测方法：

1．ELISA检测HBsAg用双抗体夹心法：除标本用量改为每孔0.05毫升。第一次孵育温度和时间改为放4℃冰箱过夜，结果判断除因比色杯坏时曾用过肉眼观测外，均与前次报告相同①。

2．固相放射免疫法（RIA）检测HBsAg，采用范殿英等人报告的方法②。我们检测时加标本用原液和1:10两种浓度，每管用量0.2ml，同时做两管。

3．RPHA检测HBsAg，采用全国肝炎流行病学调查统一方法，以1:8以上滴度者判为HBsAg阳性。

结　　果

一、灵敏度：

1．ELISA和RPHA检测HBsAg阳性标本滴度：

用相同的HBsAg阳性和阴性血清，用倍比稀释法，稀释成不同浓度，同时用两种方法进

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

行检测。经多次检测结果：RPHA滴度为256—512，而ELISA滴度为8,192—16,384（以阳性标本/阴性标本的光密度的比值>2.1者的稀释度为ELISA的滴度）。从ELISA以上结果看出，ELISA的灵敏度比RPHA高16倍以上。

2．ELISA与RPHA检出率比较：

用ELISA和RPHA同时对3,034份各类人员的标本进行检测，结果见表1

表1　　ELISA与RPHA对3,034份标本检出率比较

ELISA	RPHA +	RPHA −	合　计
+	222	147	369
−	0*	2,665	2,665
	222	2,812	3,034

* 2份标本RPHA阳性，ELISA初筛时阴性，因无标本复查暂未计算入内。

从表1的结果看出，ELISA检出阳性369例，而RPHA只检出阳性222例，ELISA检出率比RPHA高66%，P<0.01差别显著，与Wolters报告的结果基本相同。

3．ELISA与RIA、RPHA对54份标本检测结果：

用ELISA，RIA和RPHA对54份标本同时进行检测，结果见表2。RPHA检出阳性16例，RIA检出21例，ELISA检出27例，RIA的检出率比RPHA高30%，而ELISA比RPHA检出率高60%，证明ELISA灵敏度高于现用RIA。

表2　　ELISA与RIA、RPHA对54份标本检出率比较

		RIA +	RIA −	ELISA +	ELISA −	合　计
RPHA	+	16	0	16	0	16
	−	5	33*	11	27	38
		21	33	27	27	54

* 其中有3份P/N值在1.5—2.0之间的可疑标本。

二、影响灵敏度的主要因素：

1．包被液中抗-HBs含量对灵敏度的影响：

用包被缓冲液将纯抗-HBs稀释成10,20,30,40微克/毫升，包被聚苯乙烯板。将已知HBsAg阳性和阴性血清用倍比稀释法，稀释成1:8，1:16……1:32768等一系列稀释度，用方阵法测定其灵敏度，结果见表3。从表3的结果表明，包被抗-HBs的浓度以20—30微克/毫升时，ELISA的检测灵敏度最高。

2．不同孵育温度和时间对灵敏度的影响：

用HBsAg阳性和阴性稀释成1:2,000—32,000等一系列稀释度，加标本后分别于常用的4℃、25℃、37℃、50℃孵育不同时间，冲洗3次后，加酶标记抗-HBs，全部用37℃孵育2小时，加基质37℃30′，测定光密度，计算阳性与阴性光密度的比值（P/N），结果见图1。图1结果表明以50℃孵育2小时的P/N值最高，灵敏度最好。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3　　不同包被抗-HBs 浓度对灵敏度的影响

HBsAg稀释度	抗-HBs浓度(微克/毫升)			
	10	20	30	40
1:8	+	+	+	+
1:128	+	+	+	+
1:512	+	+	+	+
1:1,024	+	+	+	+
1:2,048	+	+	+	+
1:4,096	+	+	+	+
1:8,192	−	+	+	−
1:16,384	−	−	−	−
1:32,768	−	−	−	−

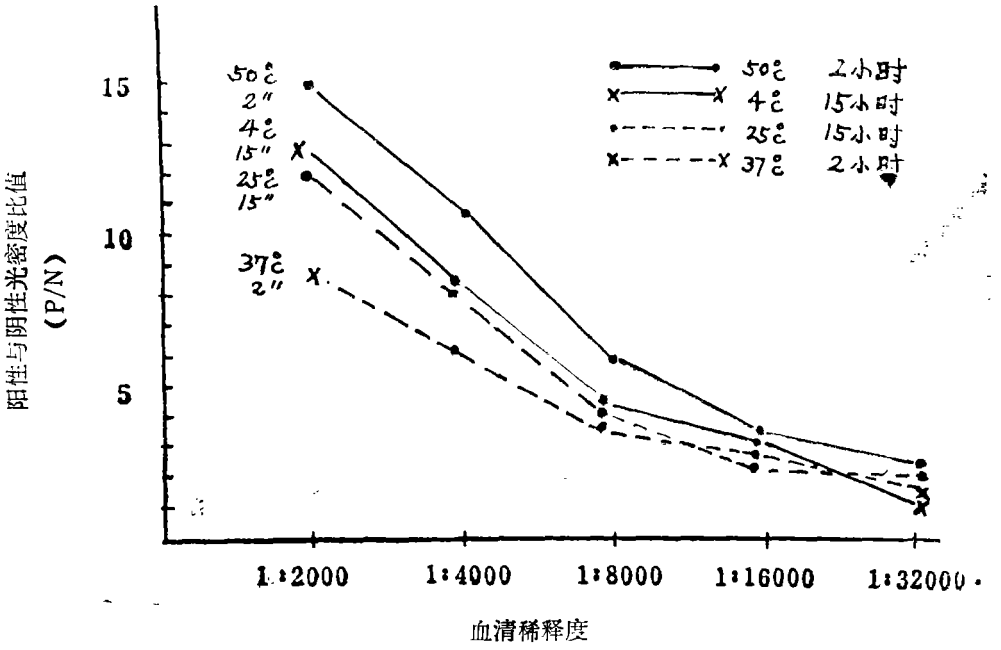


图 1　不同孵育温度和时间对灵敏度影响

3. 再生的聚苯乙烯板对灵敏度的影响：

ELISA所用的载体聚苯乙烯板使用后，经过一般洗净后，再次使用时，灵敏度明显降低，甚以至不能使用，国外使用后弃去。我们将用后的板子用自来水冲洗——→清洁液浸泡12小时以上——水洗——→脱脂棉擦每一个孔的方法使其再生，而具吸附蛋白质的能力。用此种再生板和新板同时进行 ELISA 检测 HBsAg 的试验，其结果见图 2 。从图 2 的结果表明，再生板 HBsAg 阳性血清的光密度比新板高；而阴性光密度比新板低，P/N再生板比新板大，证明再生板比新板灵敏度还高。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

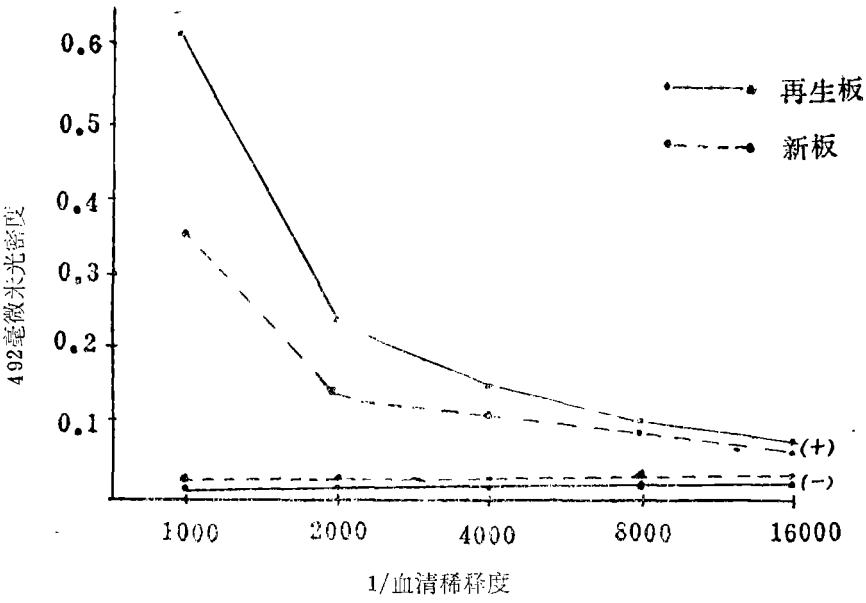


图2　聚苯乙烯再生板与新板灵敏度比较

讨　论

一、灵敏度：用ELISA和RPHA同时测定HBsAg阳性血清的滴度，RPHA滴度256—512，ELISA滴度为8,092—16,384，ELISA比RPHA灵敏度高16倍以上。与国外文献报道相同。范殿英等人报告，用他们建立的RIA与RPHA比较，RIA比RPHA灵敏度高16倍(RPHA所诊断血球也是北京生物制品研究所供给)。说明我们所用ELISA与国外ELISA和国内RIA灵敏度基本相同。

用ELISA与RPHA同时检测3,034份标本，ELISA检出阳性369例，RPHA检出阳性222例，ELISA检出率比RPHA高66%。Wolters等人报告，ELISA比RPHA检出率高50%，熊启华等人报告[5]，ELISA比RPHA检出率高30%。我们认为，检出率的高低除与方法本身的灵敏度高低有关以外，还与检测标本的HBsAg的滴度高低有关。我们这次检测3,034份标本中发现，RPHA(-)，而ELISA(+)这类HBsAg低滴度的标本，在不同人群中所占的比例不同。因此，在标本来源不同的情况下，检出率的高低不能完全代表所用方法的灵敏度，只能做相对比较。

用ELISA，RIA，RPHA对54例标本检测结果，ELISA检出阳性27例、RIA检出21例、RPHA检出16例，说明ELISA灵敏度不低于国内现用的RIA。但由于检测标本例数太少，有待于进一步的比较。

二、特异性：这次检测的3,034例标本中，有2,775例标本未进行过灭活。ELISA初筛时阳性357例，确认试验(中和法)后阳性334例，假阳性23例，占6.4%。RPHA初筛时阳性247例，中和试验后阳性199例，假阳性48例，占19%，证明在检测未灭活标本时，ELISA的特异性也比RPHA强。Kacaki等[3]认为，造成ELISA非特异性的主要是第二次孵育后（加酶标记抗体）的洗涤问题。如果洗涤干净RIA和ELISA的特异性基本相同（RIA非特异3.5%），

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

而我们检测未灭活标本非特异6.4%，除洗涤原因以外，检测标本未灭活也是造成非特异性的原因之一。我们曾经用同样方法检测灭活过的标本472例，非特异性明显降低①。所以，在应用ELISA检测时，除注意洗涤外，检测标本应该灭活，从而减少非特异性。

三、灵敏度的影响因素：

包被用抗-HBs的浓度太低或太高都会降低灵敏度，以20—30微克/毫升为最适包被浓度。

孵育温度和时间对灵敏度的影响，以第一次孵育对灵敏度影响最大，试验结果表明，以50℃2小时为最好，4℃和25℃15小时次之，37℃2小时灵敏最低，与Prince等④报告的结果相同。我们还应用加标本和酶标记抗体后的孵育时间均采取50℃1小时，也取得了较好的结果，缩短了试验时间（约需3小时），可以在献血员筛选和流行病学调查中使用。

聚苯乙烯板上用清洁液浸泡法除去的残留蛋白质和消除肝炎病毒的传染性，用脱脂棉擦的方法使其表面再生，重新具有吸附蛋白质的能力。其灵敏度不低于新板，可以反复使用。从而降低了ELISA的成本，为其广泛应用创造了有利条件。

标本和酶标记抗体稀释液用0.02M PBS Tween 20加1%小牛血清可以降低ELISA的非特异性和提高灵敏度。

小　结

（一）本文报告了用ELISA对3,034份标本检测结果，ELISA比RPHA检出率高66%、灵敏度高16倍以上、特异性强。与RIA同时对54份标本检测结果表明，ELISA的灵敏度不低于国内现有的RIA，但例数少，有待于进一步比较。

（二）影响ELISA灵敏度的主要因素除酶标记抗-HBs的质量外，包被用抗-HBs的浓度用20—30微克/毫升，加标本后的孵育用50℃2小时可以提高ELISA的灵敏度。

（三）聚苯乙烯板的再生方法简便易行，再生板的灵敏度不低于新板。因此，聚苯乙烯板可以反复使用，降低了成本，为ELISA的广泛应用创造了有利条件。

（实验过程中蒋德芳付教授、程绍尧讲师曾给予指导，重庆市肝炎调查组钟惠如等同志提供1,961份标本并协助做RPHA，重庆塑料五厂技术组同志为聚苯乙烯板的再生方法给予帮助，特此致谢！）

主要参考文献

1. 田荣福等：酶联接免疫吸附测定法检测乙型肝炎表面抗原的实验，解放军医学杂志，5:2 1980年。

2. 范殿英，王京等：固相放射免疫法检测乙型肝炎表面抗原的实验研究，天津医药，(1) 1980年。

3. Kacaki, J. et al: Rusults of a multicentre Clinical Trial of the Solid-Phas Enzyme Immunassay for Hepatitis B Surface Antigen. Vox Sang 35:65—74 1978.

4. Prince, A. M. et al: Kinetic studies on the Direct Solid Phase Radioimmunassay for Hepatitis B Antigen Vox Sang, 26:209--221 1974.

5. 熊启华等：酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎表面抗原，上海医药 3:2，1980年。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net