[文章编号] 1000-2200(2010)08-0817-03 ·检验医学·

全自动酶免分析仪加样中拖带阳性的解决方法探讨

朱安友,王凤超,杨 萍,葛 鑫,郭 晖,刘 雅

[摘要] 目的:探讨全自动酶免分析仪加样中拖带阳性的解决办法。方法:收集常规筛查中的人体免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)抗体、梅毒螺旋体(treponema pallidum,TP)抗体、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)抗体和乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen,HBsAg)强阳性标本各1份;分别在使用去离子水和0.1% Tween-20弱碱性溶液作为系统冲洗液的情况下,用RMP 200型全自动酶免分析仪做阳性拖带模拟试验;观察0.1% Tween-20弱碱性溶液作为系统冲洗液在消除加样针拖带阳性中的作用,以及其对酶免试验的影响。结果:在拖带模拟试验中,以去离子水作为系统冲洗液时,HIV抗体、TP抗体、HCV抗体和HBsAg强阳性标本都出现了阳性拖带现象,其中HIV抗体拖带阳性最为显著,有6孔被拖带阳性,HBsAg只出现1孔拖带阳性;而以0.1% Tween-20弱碱性溶液作为系统冲洗液时,HIV抗体、TP抗体、HCV抗体和HBsAg均无阳性拖带孔出现;并且在使用2种不同系统冲洗液情况下,相同检测项目之间的质控品和对照品的实验结果差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:0.1% Tween-20弱碱性溶液作为系统冲洗液能够避免全自动酶免分析仪加样中拖带阳性现象的发生,并且对酶免试验结果没有显著影响。

[关键词] 免疫酶技术;自动分析;加样针;拖带阳性;Tween-20
[中国图书资料分类法分类号] R 392.33 [文献标识码] A

A study on the resolution of sampling probe towing positive in automatic enzyme immunoassay instrument

ZHU An-you, WANG Feng-chao, YANG Ping, GE Xin, GUO Hui, LIU Ya

(*Department of Clinical Laboratories, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui* 233004, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the resolution of sampling probe towing positive in automatic enzyme immunoassay instrument. **Methods**: Anti-human immunodeficiency virus (HIV), anti-treponema pallidum (TP), anti-hepatitis C virus (HCV) or hepatitis B surface antigen (HBsAg) strong positive specimens were collected from routine screening test. The towing positive simulation test was performed in RMP 200 automatic enzyme immunoassay under use of demineralized water or 0.1% Tween-20 weak alkaline solution for sampling probe irrigation solutions conditions. By comparison of the two groups results, it was observed that 0.1% Tween-20 weak alkaline solution in role of avoid sampling probe towing positive and it effect on ELISA. **Results**: It was found that every of anti-HIV, anti-TP, anti-HCV, and HBsAg sepecimen had experienced towing positive under use of demineralized water for sampling probe irrigation solutions. Among them, anti-HIV towing positive was most obvious and had 6 towing positive holes; while HBsAg appeared only a towing weak positive hole. In contrast to demineralized water, all towing positive phenomena of anti-HIV, anti-TP, anti-HCV and HBsAg strong positive specimens were avoided under use of 0.1% Tween-20 weak alkaline solution for sampling probe irrigation solutions. Moreover, the results of quality control serum, positive and negative control under two different irrigation solutions had no significant difference for the same test item ($P>0.05$). **Conclusions**: The use of 0.1% Tween-20 weak alkaline solution for sampling probe irrigation solutions could avoid appearance of sampling probe towing positive in automatic enzyme immunoassay instrument and it had no significant effect on ELISA.

[**Key words**] immunoenzyme technique; autoanalysis; sampling probe; towing positive; Tween-20

全自动酶免分析仪的使用,实现了ELISA试验过程的自动化和标准化,避免了手工操作时产生的人为误差,提高了酶免分析的准确性和客观性。但目前仪器加样系统大多采用的是非一次性的Teflon涂层钢针,当遇到强阳性标本时,由于加样针未能进行彻底洗涤,导致了后一孔甚至多孔加样拖带阳性现象[1-3]。目前,我科采用瑞士TECAN公司RMP 200型全自动酶免分析仪对我院临床输血和手术前患者做感染性疾病血清学标志物筛查。我们在检测过程中也证实人体免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)抗体、梅毒螺旋体(treponema pallidum, TP)抗体、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)抗体和乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)等项目都有阳性拖带现象,其中以HIV和TP最为常见,导致许多疑似样本复查,不但加大了试剂成本,还增加了日常工作量。为此,我们用0.1% Tween-20弱碱性溶液来冲洗加样针,试图避免阳性拖带现象的发生,取得满

[收稿日期] 2009-12-30
[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 检验科,安徽 蚌埠 233004
[作者简介] 朱安友(1968-),男,主管检验师.

意效果，现作报道。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)仪器：TECAN RMP 200 型全自动酶联免疫分析系统。(2)试剂：HCV 抗体、HIV(1+2)抗体和 TP 抗体 ELISA 检测试剂盒均为北京现代高达生物公司产品；HBsAg ELISA 检测试剂盒为北京华大吉比爱生物技术公司产品；均经中国药品生物制品检定所批检合格，在有效期内使用。(3)系统液配制：在 10 L 去离子水(pH 值约 6.7)中分别加入 Tween-20 液体 10 ml 和 10 mol/L 氢氧化钠溶液约 5 ml，混匀后即为 0.1% Tween-20 弱碱性溶液(pH 值约 9.0)。(4)评价血清：质控血清为卫生部临床检验中心提供的 HCV 抗体(2 NCU/ml)、HIV(1+2)抗体(2 NCU/ml)、TP 抗体(2 NCU/ml)和 HBsAg 质控血清(2 IU/ml)；本室筛查的 HCV 抗体、HIV(1+2)抗体、TP 抗体和 HBsAg 有阳性拖带现象的强阳性标本；HIV、TP、HCV 和 HBsAg 均为阴性的健康体检标本。

1.2 方法

1.2.1 仪器运行程序 根据检测项目和试剂说明书的要求，对 TECAN RMP 200 进行编程，仪器自检完成后选择正确的程序开始试验。使用特弗隆钢针，八针加样，十六针洗板，方向都是 A1→A12。分配不同的血液标本或液体试剂后，根据预编程序用加压式大流量系统液冲洗加样针内部，再采用涡流方式对加样针外部进行清洗，另外每次加显色液之前加样针用终止液净化。

1.2.2 阳性拖带模拟试验 试验板的第 1 列 1~8 孔均为控制孔，其中 A1 为阳性对照，B1 为质控品，C1 和 D1 为阴性对照，剩余 4 孔为空。第 2~12 列 88 孔为检测标本，其中 A2、B2、C2 和 D2 分别为 HIV 抗体、TP 抗体、HCV 抗体和 HBsAg 强阳性标本，其他为健康体检标本，分别在使用去离子水和 0.1% Tween-20 弱碱性溶液作为加样针冲洗液情况下运行 HIV 抗体、TP 抗体、HCV 抗体和 HBsAg 4 种组合试验。试验中 HIV 抗体的阳性拖带孔可能为：A3(第 1 孔)→A12(第 10 孔)；TP 抗体的阳性拖带孔可能为：B3(第 1 孔)→B12(第 10 孔)；HCV 抗体的阳性拖带孔可能为：C3(第 1 孔)→C12(第 10 孔)；HBsAg 的阳性拖带孔可能为：D3(第 1 孔)→D12(第 10 孔)；整个试验操作过程严格按照标准化操作规程进行。

1.3 统计学方法 采用 t 检验。

2 结果

抗-HIV、抗-TP 抗体、抗-HCV 和 HBsAg 强阳性标本都可出现阳性拖带现象，其中抗-HIV 抗体检测，沿着加样方向有 6 孔拖带阳性；抗-TP 抗体拖带阳性 3 孔；抗-HCV 拖带阳性 2 孔；HBsAg 拖带阳性 1 孔(见表 1)。用 0.1% Tween-20 弱碱性溶液冲洗加样针，未出现阳性拖带现象(见表 2)。在采用去离子水和 0.1% Tween-20 弱碱性溶液冲洗加样针两种情况下，相同检测项目对照品和质控品的结果差异均无统计学意义($P>0.05$)，说明未影响酶联免疫分析试验结果(见表 3)。

表 1 抗-HIV、抗-TP、抗-HCV 抗体和 HBsAg 标本加样中阳性拖带现象的试验结果

项目	样本 OD 值	拖带孔 OD 值						
		第 1 孔	第 2 孔	第 3 孔	第 4 孔	第 5 孔	第 6 孔	第 7 孔
抗-HIV	3.505	3.378	3.091	1.666	0.889	0.436	0.164	0.052
抗-TP	3.364	2.652	1.248	0.443	0.115	0.036	—	—
抗-HCV	3.102	1.685	0.625	0.068	0.028	—	—	—
HBsAg	2.968	0.368	0.088	0.035	—	—	—	—

表 2 0.1% Tween-20 弱碱性溶液冲洗加样针对避免阳性拖带的作用

项目	样本 OD 值	拖带孔 OD 值						
		第 1 孔	第 2 孔	第 3 孔	第 4 孔	第 5 孔	第 6 孔	第 7 孔
抗-HIV	3.366	0.068	0.025	0.018	—	—	—	—
抗-TP	3.165	0.033	0.017	0.014	—	—	—	—
抗-HCV	3.022	0.028	0.015	—	—	—	—	—
HBsAg	2.886	0.026	0.014	—	—	—	—	—

表 3 0.1% Tween-20 弱碱性溶液冲洗加样针对酶免试验结果的影响($\bar{x}\pm s$；OD 值)

项目	n	系统液(去离子水)			系统液(0.1% Tween-20 弱碱性溶液)			t			P		
		阳性对照	质控品	阴性对照	阳性对照	质控品	阴性对照	阳性对照	质控品	阴性对照	阳性对照	质控品	阴性对照
抗-HIV	5	2.291±0.244	0.355±0.038	0.013±0.001	2.299±0.263	0.352±0.031	0.013±0.003	0.05	0.14	0.00	>0.05	>0.05	>0.05
抗-TP	5	2.455±0.113	0.295±0.015	0.013±0.002	2.381±0.146	0.279±0.018	0.013±0.001	0.90	1.53	0.00	>0.05	>0.05	>0.05
抗-HCV	5	1.725±0.126	0.242±0.027	0.012±0.001	1.771±0.150	0.247±0.013	0.012±0.002	0.53	0.37	0.00	>0.05	>0.05	>0.05
HBsAg	5	1.934±0.156	0.156±0.012	0.012±0.001	1.931±0.239	0.150±0.012	0.011±0.001	0.02	0.79	1.58	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

近年来，随着临床实验室自动化的提高，样本拖带污染问题日益受到广泛关注[4-6]。TECAN RMP 200 全自动酶免分析仪的加样系统，是由一组 8 根 Teflon 涂层永久性钢针加样来实现标本的批处理，完成一次样本分配后，一般将加样针用加压式大流量去离子水作为系统液冲洗加样针内部 1 次，再采用涡流方式对加样针外部和内部一并清洗 1 次，一般情况下能避免上下孔之间的拖带污染。但若遇到含高浓度抗原、抗体的标本，这种拖带污染仍是存在的。我们在检测过程中也发现，RMP 200 的阳性拖带存在于微孔板的连续一排孔位，并且常见于现症感染患者的 HIV 或 TP 抗体检测，其拖带阳性均可达 3 孔以上；相反，尽管 HBsAg 有较高的检出率，但仅偶尔出现阳性拖带的情况；这可能与阳性标本抗体滴度及所用试剂盒灵敏度有关。

阳性拖带现象的产生主要是由于钢针处理强阳性标本后，不易被冲洗干净，附着在针的内壁上，接着吸取下一个标本时发生污染，并且随着钢针被重复使用次数的增加，其内壁可能吸附蛋白质或脂质等污物，阳性拖带现象会更加严重。我们分析认为，加样针不能得到有效冲洗主要与冲洗液的性质有关。由于去离子水的 pH 值一般接近 7.0，其中的离子强度极低，清洗附着物能力较差。我们试验中的 HIV 强阳性标本拖带阳性达到 6 孔以上，说明在消耗大量冲洗液，且加样针已做了 12 次内壁和 6 次外壁冲洗后，仍未能避免阳性拖带的产生[7]。

本文研究结果表明，用 0.1% Tween-20 弱碱性溶液作为系统冲洗液，在没有改变仪器运行程序的情况下，避免了加样针的阳性拖带现象。Tween-20 为一种非离子型表面活性剂，是 ELISA 试验中洗涤液的一种重要成分，使用浓度一般在 0.05% ~ 0.1%。我们在系统液中使用 0.1% Tween-20 作为增溶剂，能够增加脂类和蛋白质的溶解度，减少这些污物在加样针内外壁上的吸附，提高了对加样针的清洗能力。而添加 0.005 mol/L 氢氧化钠不仅增加了一定离子强度，其提供的弱碱性环境，使吸附在加样针内壁上的抗体、抗原或其他蛋白质成分远离它们的等电点，转变为带更多负电荷的离子，有利于其溶解而被彻底冲洗干净。此外，按照仪器的预设定程序，每次经高速冲洗后，加样针中冲洗液的残留量一般 <5 μl，在进行下一次血清加样时，由于血清中存在着抗弱酸碱能力的缓冲对，仍能使样本的 pH 值维持在 7.4 左右。如果加样针经高速冲洗后是进行酶结合物或稀释液分配，同样这些液体都具有一定的缓冲能力，而且这些液体的一次性吸取量（每次多孔）要大于血清标本的吸取量（每次 1 孔）。同时我们的结果也表明，用 0.1% Tween-20 碱性溶液作为系统冲洗液，对常规开展的酶免试验结果均没有显著影响。因此，用 0.1% Tween-20 弱碱性溶液代替去离子水，作为全自动酶免或全自动加样机的系统冲洗液，能够避免强阳性标本拖带现象的发生，同时也能有效地防止血清中的脂类或蛋白质在加样针内壁上附着。但只要是不使用一次性加样针，携带污染还是可能存在的，尤其是遇到极强阳性标本的检测。因此，最后通过对酶免微孔板的观察，发现是否可能存在阳性拖带情况，及时对可疑的结果进行复查仍是十分必要的。

[参 考 文 献]

[1] 柯苑，马成平，赵静. 抗-HIV 抗体检测时出现拖带污染分析[J]. 临床检验杂志，2004，22(6)：480.

[2] 胡成义，刘洋. 全自动酶免仪结果污染因素的分析[J]. 国际检验医学杂志，2006，27(10)：940.

[3] 蒋国瑾. ELISA 法检测梅毒抗体拖带阳性现象分析[J]. 浙江实用医学，2004，9(5)：375 - 376.

[4] 来力，张评. 抗-HIV 检测时出现血样污染的分析[J]. 中国输血杂志，2002，15(5)：334.

[5] Armbruster DA, Alexander DB. Sample to sample carryover: a source of analytical laboratory error and its relevance to integrated clinical chemistry/immunoassay systems[J]. Clin Chim Acta, 2006, 373(1/2): 37 - 43.

[6] 修淑丽，李燕，吴硕，等. 阳性拖带现象产生的原因和解决方法[J]. 中国输血杂志，2006，19(3)：218 - 219.

[7] 段友斌，寸伟，裘俊梅，等. 全自动加样系统抗-HIV 阳性样本拖带现象对试验的影响及其解决方案[J]. 中国输血杂志，2007，20(5)：385 - 386.