

# Discussion on the Edge Effect of Enzyme-Linked Immunosorption Assay

Lingzhi Meng

Peking University Third Hospital Yanqing Hospital (Beijing Yanqing District Hospital), Beijing, 102100, China

## Abstract

**Objective:** The influence of the edge effect of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELA) on the test results. **Methods:** From 2011 to 2013, four blood samples were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for hepatitis B, hepatitis C, syphilis, and AIDS. Fourteen blood samples with marginal effects were rechecked with the same batch of reagents and compared with the initial results. **Results:** Among the 14 specimens, the “gray zone” of specimen No.2 was judged to be reactive, specimen No.10 is reactive after review, and the rest of the specimens were non-reactive, the re-examination results were significantly different from the initial results at  $P < 0.05$ . **Conclusion:** In the enzyme-linked immunosorbent assay, the quality control of the whole process of the experiment is implemented to avoid the occurrence of edge effects and reduce the workload of laboratory staff, reducing the rate of elimination of blood donors is of great significance to the establishment of a regular team of unpaid blood donors.

## Keywords

enzyme-linked immunosorbent assay; blood testing; marginal effects

# 影响酶联免疫吸附实验边缘效应的探讨

孟立志

北京大学第三医院延庆医院（北京市延庆区医院），中国·北京 102100

## 摘要

**目的:** 酶联免疫吸附实验(ELA)边缘效应对检测结果的影响。**方法:** 2011-2013年血液四项检测乙肝、丙肝、梅毒、艾滋的酶联免疫吸附实验(ELISA)检测结果发生边缘效应的14个血液样本用同一批号试剂进行双孔复查,与初次结果比较。**结果:** 14份标本中2号标本“灰区”判为有反应性,10号标本复查有反应性,其余标本复查结果无反应性,复查结果与初次结果比较  $P < 0.05$  具有显著性差异。**结论:** 在酶联免疫检测中实施实验全过程的质量控制,避免边缘效应的发生,减小实验室工作人员的工作量,减少献血者的淘汰率,对建立固定无偿献血着队伍的归队具有重要意义。

## 关键词

酶联免疫吸附实验; 血液检测; 边缘效应

## 1 引言

酶联免疫吸附实验(ELISA)是血站血液免疫检测技术常规检测方法,因其操作简单、灵敏度高、特异性强的特点在临床上应用广泛,一般包括试剂准备、样本采集、加样、温育、洗板、显色、比色、结果判断等步骤。其中,任何一项操作不当都有可能导导致试验误判的发生。“边缘效应”是在酶联免疫吸附实验中使用96孔板的ELISA测定中,外周孔显色明显较中心孔深的现象。本章忽略标本、试剂、加样、洗板、显色等因素,只针对实验过程中发生边缘效应的样本

做一回顾性分析。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂

HBsAg由中国北京万泰公司提供,批号为20101204、20110711、20120611和20120917;抗-HIV由中国北京万泰公司提供,批号为201110508和201200916;抗-HCV由中国北京金豪公司提供,批号为201006104和2012030308;TP由中国北京金豪公司提供,批号为201006106和2010120408。

### 2.2 标本来源

2011-2013年ELISA检测中发生边缘效应的14名无偿献血者标本;0.2IU/mlHBsAg标准品购自中国北京康彻斯坦

**【作者简介】**孟立志(1972-),男,中国北京人,主管检验师,从事输血质量控制和输血检验工作研究。

生物技术有限公司。

### 2.3 方法

参照《全国临床检验操作规程》(第3版),按照试剂盒说明书进行操作。

### 2.4 仪器

E-STAR 全自动酶免分析系统一体机(瑞士生产)。

## 3 结果

### 3.1 2011-2013 年四项 ELA 实验检测及复查结果

2011-2013 年四项 ELA 实验检测中发生边缘效应的 14 个样本 S/CO 值和同一样本同一批号试剂双孔平行复查 S/CO 值结果,见表 1。

表 1 2011-2013 年四项 ELA 实验检测及复查结果

实验项目	献血码	s/co 值	复检 s/co 值 1	复检 s/co 值 2
1.HBV	0010312001936	0.981	0.133	0.086
2.HCV	0010313000199	0.972	0.860	0.580
3.HIV	0010313000524	0.861	0.360	0.381
4.TP	0010311000788	1.633	0.030	0.030
5.TP	0010311000786	0.690	0.022	0.022
6.TP	0010311000202	0.630	0.039	0.022
7.TP	0010311000795	1.293	0.190	0.230
8.HBV	0010311000802	0.711	0.048	0.038
9.HCV	0010311000905	0.764	0.124	0.206
10.HBV	0010311001157	37.55	28.33	26.86
11.HBV	0010311002162	4.592	0.057	0.067
12.HBV	0010311002155	2.481	0.048	0.057
13.HBV	0010312000309	1.026	0.280	0.214
14.HIV	0010312001406	3.308	0.135	0.107

### 3.2 两种孵育方法的对比

以 0.2IU/mlHBsAg 标准品作为样品,采用 37℃水浴箱 1h、37℃孵育箱 1h,2 种不同温育方式检测 HBsAg,读取吸光度 A 值,将周围孔(96 孔周边 36 孔)和中央孔的吸光度 A 值分组 t 检验,结果见表 2。

表 2 周围孔和中央孔的数值

	中央孔 A (s)	周围孔 A (s)	P
水浴法	0.308 (0.023)	0.291 (0.038)	< 0.05
孵箱法	0.283 (0.028)	0.358 (0.047)	< 0.01

## 4 讨论

《血站技术操作规程(2015 版)》血清学检测结果判定,初次试验为有反应性的检测标本的后续处理有 2 种选择。以同一试验对原血样(或从血袋导管重新取样)做双孔复试,如果双孔复试结果均为无反应性,其初试有反应性可能由于假反应性或技术误差导致,检测结论为无反应性,血液可放行供临床使用;如果双孔复试结果中任何 1 孔为有反应性,则检测结论为有反应性,对应的血液及由其制备的所有成分应隔离并报废,将血液标本转送相关实验室做进一步确证或补充试验<sup>[1]</sup>。本实验室采用方案 1 再结合血液中心核酸检测报告发出最终报告。

ELISA 的报告方式为小于 cutoff 值判为无反应性,大于或等于 cutoff 值判为有反应性,为解决检测“窗口期”及试剂敏感性不足的问题,而在实际工作中常在酶联免疫吸附实验检测试剂盒临界 cutoff 值的基础上上下设一定的区域作为“灰区”,落在此区域的检测结果,虽然还没真正达到临界 cutoff 值,但也列为不合格结果<sup>[2]</sup>,吸光度值较高且目测有显色标本即“灰区”,提示有抗体活性存在,因为在感染早期(血清转阳期)由于抗体含量低,仅出现 OD 值轻微升高是可能的。一般将 OD 值在阈值下 10% 范围的样品定位灰色带<sup>[3]</sup>,为避免输血后感染疾病的发生,减小输血风险,本实验室将 HBV、HIV、TP 的 cutoff 值基础上上下设 40% 作为灰区,而 HCV 下设 50% 作为灰区。表 1 在 2011-2013 年初检四项 HBV、HCV、HIV、梅毒感染标志物实验中发生边缘效应的 14 份有反应性标本进行了复试,试验中 2 号标本“HCV 灰区”判为有反应性,10 号标本复查 HBV 有反应性,其余 12 份标本判为无反应性。表 2 两种孵育方法的对比,不同的孵育方式均会导致边缘效应,中央孔和周围孔的吸光度值有显著性差异,水浴法较温箱法稳定,边缘效应影响较小<sup>[4]</sup>。试验中发现将聚苯乙烯实验板从室温(通常在 25℃左右)置于 37 度水浴箱,板孔升温时,在外周孔与中心孔之间存在热力学梯度,外周孔显色明显较中心孔颜色深,实验中 ELISA 板应和水面充分接触,使反应溶液温度迅速平衡,温育时应加贴封纸,这样可防止孔内液体成分蒸发或水珠等杂质溅入孔内,以免影响检测结果,尽量消除边缘效应,提高测定的准确性和重复性。

## 5 结语

为了保障血液安全,提高血液检测质量,避免输血传播

疾病,血液检测尤其重要,血液检测最终结论是血液放行与否的重要依据。只有检测合格的血液方可放行供临床使用,检测不合格的血液不得放行<sup>[1]</sup>。不仅要提高实验室技术人员的检测技术水平,更要提高实验室技术人员的质量安全意识。加强实验室质量控制,做好室内质控(IQC)保证实验室的人员经过培训、仪器设备经过校准、选择灵敏度高、特异性强、重复性好的优质试剂,认真做好室内质控失控原因分析。参加室间质量评价(EQA)找出差距、分析原因,控制实验结果的准确性。避免试验中边缘效应的发生造成假阳性,增加了献血者的淘汰率,降低了固定无偿献血者的招募率,对

建立固定无偿献血队伍的归队具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 国家卫生计生委.血站技术操作规程(卫医政发【2015】95号附件)[S].2015.
- [2] 王林.酶联免疫吸附试验“灰区”不合格在无偿献血血液检测中的作用与意义[J].检验医学与临床,2014(02):237.
- [3] 胡继征,余妙嫦.9种抗-HCV试剂质量比较[J].中国输血杂志,2003(04):263.
- [4] 许斌,朱虎定.ELISA检测HBsAg影响因素的探讨[J].临床检验杂志,2000(04):232.