

## • 论 著 •

# 全自动酶免后处理在酶联免疫吸附试验中的应用评价

蔡望喜,刘世国

(湖北省中医药大学/湖北省中医院免疫室,湖北武汉 430061)

**摘要:**目的 比较全自动酶免后处理分析系统与手工操作法的差异。方法 2013年于湖北省中医院随机收集的人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)阴性血清标本及梅毒螺旋体抗体(抗-TP)阴性血清标本各240份。1套珠海丽珠公司抗-HIV血清盘和1套北京康彻斯坦公司抗-HIV国家标准物质,以及1套珠海丽珠公司抗-TP血清盘和1套北京康彻斯坦公司抗-TP国家标准物质分别使用BEP-3酶免后处理与手工操作平行试验,测定其吸光度值,计算两种方法的变异系数、符合率、特异度,并使用SPSS19.0软件对两种方法相关数据进行比较。结果 0.5NCU/mL抗-HIV标准物质用手工操作和BEP-3酶免后处理试验CV分别为12.5%、7.4%,6mIU/mL抗-TP标准物质用手工操作和BEP-3酶免后处理试验CV分别为13.8%、6.5%,EP-3酶免后处理的CV明显低于手工操作法CV,比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );两种方法对抗-HIV、抗-TP血清盘阳性、阴性参考品检测符合率100.0%,两种方法对抗-HIV、抗-TP系列稀释参考品的最低检出率分别为66.7%、77.5%。两种方法对240份阴性标本的特异度均为100.0%。结论 BEP-3酶免后处理与手工操作相比,重复性更好,符合率、特异度一致,可以替代手工操作用于临床常规标本检测。

**关键词:**BEP-3酶免后处理分析系统; 手工检测; 酶联免疫吸附试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)02-0230-03

## Evaluation on automatic BEP-3 enzyme post-processing in enzyme-linked immunosorbent assay

Cai Wangxi, Liu Shiguo

(Laboratory of Immunology, Hubei Provincial Hospital of TCM/Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China)

**Abstract: Objective** To compare the difference between automatic enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) analysis system and manual processing method. **Methods** Negative anti-HIV serum samples(240 samples) and negative anti-TP serum samples(240 samples) were collected randomly in Hubei Provincial Hospital of TCM in 2013. A set of anti-HIV serum plate produced in Zhuhai Lizhu company, a set of anti-HIV standard material produced in Beijing Kangchesitan company, a set of anti-TP serum plate produced in Zhuhai Lizhu Company, and a set of anti-TP standard material produced in Beijing Kangchesitan Company were tested by the BEP-3 ELISA analysis system and manual processing method. The absorbance values were measured, and calculated the coefficient of variation(CV) of the two methods, coincidence rate, specificity. Software SPSS 19.0 was used to compare the differences of the two methods. **Results** The detection CV of anti-HIV standard material and anti-TP standard material by manual processing method and BEP-3 ELISA analysis system were 12.5%, 7.4%, and 13.8%, 6.5%. The CV of BEP-3 ELISA analysis system was significant lower than that of manual processing method ( $P<0.05$ ). The coincidence rate of the two methods on the positive and negative references of anti-HIV serum plate and anti-TP serum plate were all 100.0%, the lowest detection of the anti-HIV and anti-TP serial dilution products were all 66.7%, 77.5% respectively. The specificity of the two methods on the 240 negative samples were 100.0% **Conclusion** Compared with manual operation, automatic ELISA analysis system has better repeatability, while has same coincidence rate and specificity so the BEP-3 ELISA analysis system could replace manual handling for routine clinical sample testing.

**Key words:**BEP-3 automatic enzyme-linked immunosorbent assay analysis system; manual inspection; enzyme-linked immunosorbent assay

上世纪80年代,酶联免疫吸附试验(ELISA)在临床血液检测中得到广泛应用,进入90年代后,自动化仪器逐渐取代手工操作。湖北省中医院为适应科室发展需要,提高工作效率,于2013年10月新购进了德国西门子公司BEP-3酶免后处理分析系统。为保证检测结果准确度,本研究主要从重复性、符合率、检出限、特异度等方面,探讨全自动酶免后处理与手工操作的可比性。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

本院2013年10月14日至10月18日人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)阴性标本及梅毒螺旋体抗体(抗-

TP)阴性标本各240份。

**1.2 仪器与试剂** 抗-HIV国家标准物质,浓度0.5NCU/mL(批号:201210003),抗-TP国家标准物质,浓度6mIU/mL(批号:201211003),以上国家标准物质均购自北京康彻斯坦公司。抗-HIV血清盘(批号:20121001),抗-TP血清盘(批号:20121001),均由珠海丽珠试剂股份有限公司提供。抗-HIV血清盘组成:20份阳性参考品,20份阴性参考品,6份系列稀释参考品,1份精密性参考品。抗-TP血清盘组成:10份阳性参考品,10份阴性参考品,4份系列稀释参考品,1份精密性参考品。抗-HIV抗体诊断试剂盒(批号:2013051028),抗-TP抗体

诊断试剂盒(批号:2013071138),均购自珠海丽珠试剂股份有限公司。MK3 酶标仪购自芬兰雷勃有限公司,PW812 洗板机购自深圳汇松科技有限公司,BEP-3 全自动酶免分析仪购自德国西门子医疗设备有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 重复性检测** 混合 3 支 0.5 NCU/mL 抗-HIV 标准物质,3 支 6 mIU/mL 抗-TP 标准物质,混匀后在一块板上手工加 15 孔,后续试验由 BEP-3 酶免后处理和手工操作平行进行,测得 BEP-3 酶免后处理和手工操作吸光度值,分别计算变异系数(CV)。

**1.3.2 符合率检测** 采用抗-HIV、抗-TP 血清盘检测。分别在 4 块板上手工加样后,手工操作和 BEP-3 酶免后处理平行进行,计算两种操作方法的阳性符合率、阴性符合率、系列稀释样品结果符合率。阳性符合率=(2 种方法同为阳性结果例数/检测总例数)×100%;阴性符合率=(2 种方法同为阴性结果例数/检测总例数)×100%。

**1.3.3 特异度检测** 手工加样后,BEP-3 酶免后处理和手工操作平行检测 240 份阴性标本,测定标本吸光度值,计算两种方法的特异度并进行比较。特异度=阴性符合率=(2 种方法同为阴性结果数量/检测总例数)×100%。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理,计数资料以  $n$  或率表示,组间比较采用  $\chi^2$  比较。 $P<0.05$  为比较差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 两种方法重复性比较** 0.5 NCU/mL 抗-HIV 标准物质用手工操作和 BEP-3 酶免后处理试验 CV 分别为 12.5%、7.4%。6 mIU/mL 抗-TP 标准物质用手工操作和 BEP-3 酶免后处理 CV 分别为 13.8%、6.5%。BEP-3 酶免后处理 CV 明显低于手工操作 CV,比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 手工操作与 BEP-3 酶免后处理试验重复性比较

项目	$n$	检测方法	$\bar{x} \pm s$	CV(%)
抗-HIV(NCU/mL)	3	手工	2.56±0.32	12.5
	3	BEP-3	2.30±0.17	7.4*
抗-TP(mIU/mL)	6	手工	2.50±0.345	13.8
	6	BEP-3	2.15±0.139	6.5*

\*:  $P<0.05$ , 与同一项目手工操作结果比较。

**2.2 符合率与检出限比较** 手工操作和 BEP-3 酶免后处理试验对于抗-HIV 血清盘阳性、阴性、系列稀释参考品的检出率均一致,两种方法对抗-HIV 血清盘阳性、阴性参考品的检测符合率均为 100.0%,最低检出限一致。手工操作和 BEP-3 酶免后处理试验对于抗-TP 血清盘阳性、阴性、系列稀释参考品的检出率均一致,两种方法对抗-TP 血清盘阴性、阳性参考品的检测符合率均为 100.0%,最低检出限一致。见表 2。

表 2 血清盘符合率及检出限比较[%( $n/n$ )]

项目	$n$	检测方法	阳性参考品	阴性参考品	系列稀释参考品
抗-HIV	20	手工	100.0(20/20)	100.0(20/20)	66.7(4/6)
	20	BEP-3	100.0(20/20)	100.0(20/20)	66.7(4/6)
抗-TP	10	手工	100.0(10/10)	100.0(10/10)	77.5(3/4)
	10	BEP-3	100.0(10/10)	100.0(10/10)	77.5(3/4)

**2.3 特异度比较** 手工操作与 BEP-3 酶免后处理同时检测 240 份抗-HIV 阴性标本,检出阴性例数均为 240 例,符合率为 100.0%。手工操作和 BEP-3 酶免后处理检测 240 份抗-TP 阴性标本,检出阴性例数均为 240 例,符合率为 100.0%。手工操作和 BEP-3 酶免后处理特异度一致。

## 3 讨 论

ELISA 于 1971 年由瑞典学者 Engrall 和 Perlmann、荷兰学者 Van Weeman 和 Schuurs 分别报道的一种酶标固相免疫测定技术,由于其敏感度和特异度较高,被广泛应用于各种生物活性物质及标志物的临床检测<sup>[1]</sup>。随着检验医学的发展,越来越多的检验项目实现自动化检测<sup>[2]</sup>。全自动酶免分析系统是基于电脑控制,自动完成 ELISA 试验,包括稀释、标本分配、试剂分配、孵育、洗板、酶标判读。标本处理自动化最初由瑞士哈美顿公司于 1985 年基于机械臂运动和具有管路系统的稀释分配器开发 MICROLAB2200。其后发展到现在的第五代斯达尔全自动随机式标本工作站。全自动酶免分析系统的发展可以追溯到上世纪 90 年代初期,第一代全自动酶免分析系统基本特征是单/双针加样系统与酶标板处理系统一体化,加标本占用时间长,节省劳动力但并不提高效率。第二代全自动酶免分析系统基本特征为多任务和单一轨道,不能同时处理 2 个过程,如洗板的同时不能加试剂,不能严格执行试验过程,不含标本加样装置。第三代全自动酶免分析系统基本特征为多任务多通道,洗板同时可以加试剂,平行试验过程处理。全自动酶免分析仪和自动化加样系统由于其加样准确度、结果可重复性高、节省劳动力、人工操作导致的试验误差少等方面的优势,在 1996 年被引入中国,起初主要用于省级或者地市级血液中心标本的血液筛查,2003 年后,逐渐在临床试验室使用<sup>[3]</sup>。

本研究采用 BEP-3 酶免后处理检测抗-HIV 和抗-TP CV 分别为 7.4% 和 6.5%,手工检测分别为 12.5% 和 13.8%,2010 年版《中华人民共和国药典第三部生物制品制造及检定规程》中对孔间差要求 CV 小于 15%<sup>[4]</sup>,手工操作和 BEP-3 酶免后处理 2 种检测系统 CV 均符合国家标准,但 BEP-3 酶免后处理 CV 比手工操作法更低,显示 BEP-3 酶免后处理具有良好的精密性。这可能与 BEP-3 酶免后处理孵育模块温度恒定,洗板单元洗板效果好,加试剂的精确度高等有关<sup>[4]</sup>。

本研究中采用抗-HIV、抗-TP 血清盘,阳性参考品、阴性参考品用于符合率验证,系列稀释参考品用于最低检出限验证。BEP-3 酶免后处理对于抗-HIV 血清盘、抗-TP 血清盘检测能力与手工结果完全一致。丽珠试剂公司提供的血清盘是根据国家参考品标定的企业参考品,符合 2010 年版《中华人民共和国药典第三部生物制品制造及检定规程》<sup>[4]</sup>,具有法律效力。医学实验室认可指南(ISO15189)中要求对试剂盒符合率、检出限等进行验证,从本研究结果来看,符合率、检出限符合国家相关法规<sup>[5]</sup>。

240 份阴性标本,抗-HIV 手工操作法结果与 BEP-3 酶免后处理全自动酶免后处理试验结果完全一致。抗-TP 手工操作法有 5 例标本值与临界值比值(S/CO)在 0.5 以上高值阴性标本,在 BEP-3 酶免分析结果为 S/CO 值小于 0.5 的低值阴性结果。抗-TP 试剂受到干扰因素较多,老年人、自身免疫性疾病、孕妇等均可能会出现弱阳性、阳性、灰区结果,螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)复查是阴性<sup>[6-7]</sup>。全自动酶联免疫系统法洗板单元采用 2 排 8 针洗板,对板类型有不同定义,选择不同的板类型,洗板效果也不一样,本研究选择厂家建议的板类型 5,阴性标本本底更好。

(下转第 234 页)

炎症程度亦明显重于pANCA阴性者,炎症程度与血管炎的存在有相关性,同时pANCA在UC活动期与缓解期阳性率比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),结果提示pANCA的阳性率与病变活动性、受累范围、病程等无关,单一的pANCA阳性无法判断UC是否活动,即pANCA检测对于UC病情活动性的监测及预测病情复发的价值不大,但pANCA阳性对UC疾病诊断具有较高的特异度,是辅助诊断疾病的良好血清学指标,但它又不是特异的指标。ANCA阳性可发生在原发性小血管炎、继发性血管炎、风湿病、系统性红斑狼疮及自身免疫性肝病等<sup>[16]</sup>,所以不能单凭pANCA阳性而诊断UC,但是患UC时pANCA可以表现为阳性,作者将pANCA、FCP两者联合检测其阴性预测值明显高于单一检测阴性预测值,说明二者同时阴性可以排除UC诊断。

综上所述,对UC的诊断目前仍需要内镜下活组织检查进行确诊,虽然血液pANCA是目前公认诊断UC最好的免疫学指标,但因其敏感度不高,不能作为筛选UC的指标,只能作为辅助诊断,并且对于UC活动性评估意义不大。FCP作为无创的生物标志物,虽能较好地评估UC患者疾病的活动性,但它不能诊断UC。作者将pANCA与FCP结合起来进行检测,可以对危险人群进行筛查,即pANCA与FCP同时阴性者可排除UC,对于临床确诊的UC患者,二项指标联合检测可以取代定期肠镜监测,减轻了患者的痛苦,同时也达到了监测病情,指导临床用药,预防UC复发的目的。

## 参考文献

- Vilela EG, da Gama Torres HO, Martins FP, et al. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(9): 872-881.
- Iskandar HN, Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances[J]. Transl Res, 2012, 159(4): 313-325.
- Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, et al. World gastroenterology organization practice guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010[J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(1): 112-124.
- Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(3): 1713-1725.
- Mendoza JL, Abreu MT. Biological markers in inflammatory bowel disease[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2013, 45(1): 109-116.

(上接第231页)

本院采购BEP-3酶免分析仪,从重复性、符合率、检出限、吸光度值、特异度等方面对全自动酶联免疫系统法进行全面验证,与手工操作法结果一致,能够用于临床实验室常规标本检测<sup>[8]</sup>。

随着检验医学的发展,检验科自动化设备越来越多,为保证自动化设备结果与手工结果完全一致,特别是定性试验结果的准确度,需要临床实验室与设备、试剂厂家良好的沟通配合。BEP-3是一种多任务单轨道酶免分析仪,珠海丽珠试剂股份有限公司作为设备和试剂供应商,对设备的校准、试验过程的优化、设备与试剂的匹配等方面做了大量工作,在保证试验结果的准确度的同时,工作效率大大提高。

## 参考文献

- 袁红,谭泰昌,王智斌,等.全自动酶联免疫分析系统的临床应用评价[J].四川医学,2003,24(11): 1119-1120.
- 王新波,魏哲. FAME全自动酶免分析系统的应用[J]. 临床输血

el disease: Practical consideration for clinicians[J]. Gastroenterol Clin Biol, 2009, 33(3): S158-S173.

- Abraham BP, Kane S. Fecal markers: calprotectin and lactoferrin [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2012, 41(2): 483.
- Lewis JD. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease[J]. Gastroen, 2011, 140(6): 160-181.
- Jurgens M, John JM, Cleynen I, et al. Levels of C-reactive protein are associated with response to infliximab therapy in patients with crohn's disease[J]. Clin Gastroenterol H, 2011, 9(5): 421-425.
- Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann AA, et al. Fecal calprotectin more accurately reflects endoscopic activity of ulcerative colitis than the lichtiger index, c-reactive protein, platelets, hemoglobin, and blood leukocytes[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(2): 332-341.
- Van RF, van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis[J]. BMJ, 2010, 341(1): 3369.
- Nakov VN, Penchev PI, Shishenkov MT, et al. Fecal calprotectin for assessment of inflammatory activity, monitoring of therapy and prediction of relapse in ulcerative colitis[J]. J Gastroen Hepatol Res, 2012, 1(11): 297-302.
- Molander P, Bjorkesten CG, Mustonen HA, et al. Fecal calprotectin concentration predicts outcome in inflammatory bowel disease after induction therapy with TNF alpha blocking agents[J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(11): 2011-2017.
- Papp M, Norman GL, Altorjay I, et al. Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(14): 2028-2036.
- Teresa Arias-Loste M, Bonilla G, Moraleja IA, et al. Presence of anti-proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies (anti-PR3 ANCA) as serologic markers in inflammatory bowel disease[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2013, 45(1): 109-116.
- 刘新光,于涛,赵明辉,等.抗中性粒细胞胞浆抗体对溃疡性结肠炎的诊断价值[J].中华内科杂志,1999,38(7): 451-456.
- 王兰兰,吴健民.临床免疫学与检验[M].4版.北京:人民卫生出版社,2007:335-336.

(收稿日期:2014-11-15)

与检验,2010,12(2):187-189.

- 谷成祥.全自动酶免疫分析系统检测乙型肝炎标志物的工作模式的优化研究[J].检验医学,2006,21(1): 78.
- 中华人民共和国卫生部.卫药政发(91)第190号 中国生物制品规程[S].北京:中国标准出版社,2010.
- Gulderen YD. ISO 15189 accreditation: requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory [J]. Clin Biochem, 2009, 42(4/5): 274-278.
- 庄健海,罗娜,莫巧璇,等.自设稀释加样监控程序在凝集法检测梅毒螺旋体抗体中的应用评价[J].实用医学杂志,2013,29(13): 2205-2208.
- 李琦,尚晓泓.全自动酶标仪污染原因及排除方法[J].中国医学装备,2007,4(9): 15-16.
- 李文胜,周伟,柳晓琴,等.全自动酶免仪与半自动酶标仪比对研究[J].中外医疗,2011,30(24): 19.

(收稿日期:2014-06-08)