

• 论 著 •

## 3 种酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒前 S1 及 S2 抗原的比较\*

付 杰, 杨国骏, 蒋兴宇, 蒲晓允<sup>△</sup>

(第三军医大学附属新桥医院检验科, 重庆 400037)

**摘要:**目的 比较酶联免疫吸附试验(ELISA)的 3 种不同检测方式, 选择最佳检测方式, 用于临床诊疗。方法 用 Addcare ELISA800 全自动酶免仪、TECAN freedom evolyzer 全自动酶免分析系统、手工 ELISA 法等 3 种方式对质控品标本和患者血清标本进行乙型肝炎病毒前 S1 抗原(Pre-S1Ag)和前 S2 抗原(Pre-S2Ag)检测, 并采用统计学方法对其结果进行分析。结果 3 种方式检测 Pre-S1Ag 的批内精密度的分别为 4.73%、5.38%、11.87%, 检测 Pre-S2Ag 的批内精密度的分别为 4.91%、5.04%、11.75%; 检测 Pre-S1Ag 的批间精密度的分别为 6.63%、7.90%、13.26%, 检测 Pre-S2Ag 的批间精密度的分别为 6.74%、7.81%、12.59%。灵敏度均为 100.00%。结论 3 种方法有非常好的一致性, 均能较好地检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag, Addcare ELISA800 全自动酶免仪精密度的最好, 可进一步提升临床检验质量。

**关键词:**酶联免疫吸附试验; 精密度的; 灵敏度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.15.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)15-2017-03

## A comparative study on three methods of enzyme linked immunosorbent assay for detecting hepatitis B virus Pre S1 and S2 antigen\*

FU Jie, YANG Guojun, JIANG Xingyu, PU Xiaoyun<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** Objective To compare the three different methods of enzyme linked immunosorbent assay(ELISA), to select the best method for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Addcare ELISA800, TECAN freedom evolyzer and manual ELISA method were used to detect hepatitis B virus Pre S1 antigen(preS1Ag) hepatitis B virus Pre S2 antigen(preS2Ag) in confrontation control product samples and serum specimens from patients with HBV, and the results were analyzed by statistical methods. **Results** The batch precisions of the three methods to detect pre-S1Ag were 4.73%, 5.38%, 11.87%, the batch precisions of the three methods to detect pre-S2Ag were 4.91%, 5.04%, 11.75%. The inter batch precisions of the three methods to detect pre-S1Ag were 6.63%, 7.90%, 13.26%, the inter batch precisions of the three methods to detect pre-S2Ag were 6.74%, 7.81%, 12.59%. All the sensitivities were 100.00%. **Conclusion** All the three methods have good consistency, which could be used in the detection of Pre-S1Ag and Pre-S2Ag. The precision of Addcare ELISA800 is the best, which could further improve the quality of clinical testing.

**Key words:** enzyme linked immunosorbent assay; precision; sensitivity

酶联免疫吸附试验(ELISA)由于测定灵敏度高, 特异性强, 操作简便, 试剂性能稳定, 易于标准化, 易与其他相关技术偶联等特点, 已成为目前发展较快的一种免疫测定技术, 广泛应用于肿瘤、传染病多种疾病相关免疫指标的检测<sup>[1-2]</sup>。当前 ELISA 检测主要有传统手工法和全自动酶免仪器法, 临床上使用较广的全自动酶免仪包括 Addcare ELISA800 全自动酶免仪、TECAN freedom evolyzer 全自动酶免分析系统<sup>[3-4]</sup>。本研究就上述 3 种常用 ELISA 检测方式进行比较, 现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 40 份血清标本均来自第三军医大学附属新桥医院的就诊患者, 平均(42.5±14.5)岁, 其中男 26 例, 女 14 例。

**1.2 仪器与试剂** Addcare ELISA800 全自动酶免分析仪购自烟台艾德康公司;TECAN freedom evolyzer 全自动酶免分析系统购自瑞士帝肯公司;MB580 酶标仪购自上海汇松公司;洗板机购自苏州新波公司;乙型肝炎病毒前 S1 抗原(Pre-S1Ag)及乙型肝炎病毒前 S2 抗原(Pre-S2Ag)检测试剂盒购自北京贝尔公司。Pre-S1Ag 质控品(1 NCU/mL, 批号

201505002;0.5 NCU/mL, 批号 201505003)及 Pre-S2Ag 质控品(1 NCU/mL, 批号 201412001;0.5 NCU/mL, 批号 201412002)均购自北京贝尔公司。

**1.3 检测方法** (1)用 3 种方式对 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 质控品 1 NCU/mL 分别在同一反应板上连续测定 10 次, 以所得标本 S/CO 值计算批内精密度的(CV<sub>批内</sub>), 并进行比对分析。(2)用 3 种方式对 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 质控品 1 NCU/mL 每天进行 3 个测试, 连续进行 5 d, 以所得标本 S/CO 值计算批间精密度的(CV<sub>批间</sub>), 并进行比对分析。(3)用 3 种方式对 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 质控品 1 NCU/mL 与 0.5 NCU/mL, 40 份血清标本平行测定 2 次, 计算 S/CO, 根据灵敏度 = A/(A+C)×100%, 判断不同系统灵敏度。其中 A 为真阳性, C 为假阴性。(4)用 3 种方式对 40 例患者血清分别进行 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 检测, 将所得标本 S/CO 值、阴阳性例数进行比对分析。手工法试验过程严格按试剂盒说明书进行, 手工完成加样、加试剂, 洗板、读板过程分别由洗板机、酶标仪完成。全自动酶免仪严格按试剂盒说明书进行编程, 加样、加试剂、孵育、洗板、判读结果等所有检测过程均由仪器完成。

\* 基金项目:国家卫生和计划生育委员会医药卫生科技发展研究中心专项课题(28-1-6)。

作者简介:付杰,男,技师,主要从事临床免疫检验研究。△ 通信作者,E-mail:puxiaoyong@yahoo.com。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理及统计分析,正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料以例数或百分率表示,患者血清标本的符合率及阴性标本 S/CO 值分布的比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 批内精密度比较** 3 种检测方式检测 Pre-S1Ag  $CV_{批内}$  分别为 4.73%、5.38%、11.87%；检测 Pre-S2Ag  $CV_{批内}$  分别为 4.91%、5.04%、11.75%。见表 1。

**2.2 批间精密度比较** 3 种检测方式检测 Pre-S1Ag  $CV_{批间}$  分别为 6.63%、7.90%、13.26%；检测 Pre-S2Ag  $CV_{批间}$  分别为

6.74%、7.81%、12.59%。见表 2。

**2.3 灵敏度比较** 3 种检测方式检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 灵敏度均为 100%。见表 3。

**2.4 40 例患者血清标本的检测** 用 3 种方式对随机 40 例患者血清标本进行检测,Pre-S1Ag 阳性 3 例和 Pre-S2Ag 阳性 3 例(阳性标本标记为 NO. 1、NO. 2、NO. 3)；3 种方法检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 为阴性的标本的 S/CO 值在所分的 5 个点段中所占的百分率几乎是相同的,经  $\chi^2$  检验分析,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )；试验中阳性标本的 S/CO 值的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )，见表 4。

**表 1 3 种方法检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag  $CV_{批内}$  结果比较 ( $n=10$ )**

方法	Pre-S1Ag		Pre-S2Ag	
	S/CO 值( $\bar{x} \pm s$ )	$CV_{批内}$ (%)	S/CO 值( $\bar{x} \pm s$ )	$CV_{批内}$ (%)
Addcare ELISA800	3.15 ± 0.15	4.73	3.24 ± 0.16	4.91
TECAN freedom evolyzer	3.59 ± 0.19	5.38	3.57 ± 0.18	5.04
手工 ELISA 法	4.18 ± 0.50	11.87	4.34 ± 0.51	11.75

**表 2 3 种方法检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag  $CV_{批间}$  结果比较 ( $n=15$ )**

方法	Pre-S1Ag		Pre-S2Ag	
	S/CO 值( $\bar{x} \pm s$ )	$CV_{批间}$ (%)	S/CO 值( $\bar{x} \pm s$ )	$CV_{批间}$ (%)
Addcare ELISA800	3.34 ± 0.22	6.63	3.41 ± 0.23	6.74
TECAN freedom evolyzer	3.61 ± 0.29	7.90	3.59 ± 0.28	7.81
手工 ELISA 法	4.57 ± 0.61	13.26	4.71 ± 0.59	12.59

**表 3 3 种方法检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 的灵敏度结果比较**

方法	Pre-S1Ag			Pre-S2Ag		
	A(n)	C(n)	灵敏度 (%)	A(n)	C(n)	灵敏度 (%)
Addcare ELISA800	80	0	100.00	80	0	100.00
TECAN freedom evolyzer	80	0	100.00	80	0	100.00
手工 ELISA 法	80	0	100.00	80	0	100.00

**表 4 3 种方法检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 阳性结果 S/CO 值**

方法	Pre-S1Ag			Pre-S2Ag		
	NO. 1	NO. 2	NO. 3	NO. 1	NO. 2	NO. 3
Addcare ELISA800	14.96	20.70	8.23	18.21	18.93	8.06
TECAN freedom evolyzer	15.07	20.79	8.31	18.29	19.04	8.03
手工 ELISA 法	16.14	21.38	9.04	19.36	19.71	8.89

**3 讨 论**

随着医学科技的不断发展进步,临床免疫检测仪器不断更新,ELISA 检测逐步趋向于标准化、自动化、程序化,从传统手工加样酶标仪已发展至现在的全自动酶免仪<sup>[5]</sup>。目前许多检验科免疫室都在拥有了全自动酶免仪的同时仍保留传统手工 ELISA 检测。不同检测方式获得的结果是否具有可比性,关系到检验科免疫室的检测质量<sup>[6]</sup>。所以 ELISA 不同检测方式之间的比对,尤其重要。

CAN freedom evolyze 全自动酶免分析系统和手工检测 3 种不同的 ELISA 检测方式之间的比对。从实验结果可以看出,3 种检测方式检测 Pre-S1Ag  $CV_{批内}$  分别为 4.73%、5.38%、11.87%；检测 Pre-S2Ag  $CV_{批内}$  分别为 4.91%、5.04%、11.75%。3 种检测方式检测 Pre-S1Ag  $CV_{批间}$  分别为 6.63%、7.90%、13.26%；检测 Pre-S2Ag  $CV_{批间}$  分别为 6.74%、7.81%、12.59%。三者都能满足临床检测各项目的精密度要求,但相对而言,Addcare ELISA800 全自动酶免仪精密度更好,TECAN freedom evolyze 全自动酶免分(下转第 2021 页)

本研究进行了 Addcare ELISA800 全自动酶免仪、TE-

低色素贫血,基因型正常的患者;重型地贫表型,但基因型仅为携带者。

本研究中发现的 11 种罕见  $\alpha$ -地贫突变类型,有 6 种出现在  $\alpha 2$  基因上,5 种出现在  $\alpha 1$  基因上;除 1 例为  $\alpha 1$  基因内含子区突变外,其他均为外显子区突变,提示  $\alpha$ -地贫主要是外显子区突变引起的,内含子区的突变意义尚不明确。测序发现的 35 种罕见  $\beta$ -地贫突变类型中,包括 8 种内含子区突变,22 种外显子区突变,2 种 Int 帽子区突变,1 种 5'UTR 非编码区突变,1 种 3'UTR 非编码区突变,1 种 Ploy 区突变。所有突变基因型均与其临床表型相符。可以看出导致  $\beta$ -地贫的基因突变分布区域较广,在编码区和非编码区均有出现,大部分为编码区基因突变。在本次研究中有一些突变位点出现频率较高,例如: $\alpha\alpha$ CD29(T→C)共 6 例, $\alpha$ CD30(-GAG)  $\alpha$  共 5 例,CD37(G→A)共 14 例,-90(C→T)共 7 例,IVS-2-5(G→C)共 5 例。建议将这些高频突变,加入常见突变检测范围,可以提高试剂盒检测准确性,降低漏诊率<sup>[7]</sup>。

本研究中仍有 51 例疑似罕见地贫患者测序未见异常,考虑可能为  $\alpha$  和  $\beta$ -珠蛋白基因上游调控机制的改变或修饰基因突变等引起<sup>[8-9]</sup>。尽管测序技术可以发现罕见的  $\alpha$  及  $\beta$ -地贫基因突变,但也有一定的局限性。一些罕见缺失突变无法通过测序检测,需要用 MLPA 等方法进行检测<sup>[10]</sup>。因此采用不同方法联合检测罕见地贫突变,可以起到取长补短的作用,使罕见地贫基因检测更加准确。

#### 参考文献

- [1] 李朋,张杰.地中海贫血基因检测方法的研究进展[J].中国妇幼保健,2016,31(4):891-894.
- [2] 叶国永,张莉,黄国珍,等.MLPA 与基因测序技术检测联用检测地中海贫血基因缺陷分析[J].中国当代医药,2012,19(24):90-91.

(上接第 2018 页)

析系统其次,手工检测最差<sup>[7-8]</sup>。3 种检测方式检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 时,灵敏度均为 100.00%,由此可以看出,3 种检测方式都能灵敏地检测出 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag<sup>[9-10]</sup>。另外,3 种方式对 40 例患者血清分别进行 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 检测,检测结果完全一致,Pre-S1Ag 阳性 3 例和 Pre-S2Ag 阳性 3 例;3 种方法检测 Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 为阴性的标本的 S/CO 值在所分的 5 个点段中所占的百分率几乎是相同的,经过  $\chi^2$  检验分析,差异无统计学意义( $P>0.05$ );试验中阳性标本的 S/CO 值的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

综合上述实验结果,可以看出,在临床应用中,Addcare ELISA800 全自动酶免仪检测方式精密度高,灵敏度高,能够较好地完成 ELISA 检测,提供较高质量的检测结果,更适合临床应用。

#### 参考文献

- [1] 王文碧.探讨酶联免疫吸附试验在包虫病诊断中的应用价值[J].中外医疗,2015,34(26):10-12.
- [2] 任秀,骆海朋,崔生辉.酶联免疫吸附法和 DNA 检测法在肉类鉴别中的应用[J].中国食品卫生杂志,2015,27(1):93-97.
- [3] Zhao B, Sedlak JC, Srinivas R, et al. Exploiting temporal

- [3] 解增言,林俊华,谭军,等. DNA 测序技术的发展历史与最新进展[J].生物技术通报,2010,26(8):64-70.
- [4] Abuzenadah AM, Hussein IM, Damanhour GA, et al. Molecular basis of  $\beta$ -thalassemia in the western province of Saudi Arabia: identification of rare  $\beta$ -thalassemia mutations[J]. Hemoglobin, 2011, 35(4):346-357.
- [5] Viprakasit V, Ekwattanakit S, Chalaow N, et al. Clinical presentation and molecular identification of four uncommon alpha globin variants in Thailand. Initiation codon mutation of  $\alpha 2$ -globin Gene (HBA2: c. 1delA), donor splice site mutation of  $\alpha 1$ -globin gene (IVS1-1, HBA1: c. 95 + 1G > A), hemoglobin Queens Park/Chao Pra Ya (HBA1: c > A) and hemoglobin Westmead (HBA2: c. 369C > G)[J]. Acta Haematol, 2014, 131(2):88-94.
- [6] 李兵.广东省地中海贫血流行及防控现状评价[D].广州:南方医科大学,2015.
- [7] 黄海龙,方颖迪,林娜,等.4 种罕见  $\beta$ -地中海贫血基因检测膜条的制备及其临床应用[J].中国妇幼保健,2016,31(1):127-129.
- [8] 余丽华.评价 KLF1 基因对  $\alpha$ -地中海贫血的遗传修饰作用[C].广州:广东省遗传学会第九届代表大会暨学术研讨会,2014.
- [9] 王志鹏. AHSP 基因对  $\beta$ -地中海贫血表型的修饰及 BCL11A 基因在  $\beta$ -地中海贫血患者持续表达胎儿血红蛋白中的作用[D].广州:南方医科大学,2011.
- [10] 丁燕玲,黄际卫.地中海贫血罕见突变的研究进展[J].中国优生与遗传杂志,2016,36(2):4-5.

(收稿日期:2017-02-21 修回日期:2017-04-21)

collateral sensitivity in tumor clonal evolution[J]. Cell, 2016, 165(1):234-246.

- [4] 侯佳宜,王晓玲,宋玲,等. Addcare 600 全自动酶免分析仪与手工法检测乙型肝炎表面抗原的对比[J].中国药物与临床,2015,15(11):1659-1660.
- [5] Jordan D, Kirkland P, Morris S, et al. Describing the within laboratory and between laboratory agreement of a serum ELISA in a national laboratory network[J]. Prev Vet Med, 2012, 104(3-4):240-248.
- [6] 王绍兴.质量控制临床免疫检验中的作用[J].医疗卫生设备,2016,37(10):216.
- [7] 成景松,朱小莉.两国产生化仪器在常规试验室的精密性能评价[J].检验医学与临床,2014,11(1):95-97.
- [8] 周双艳,胡敏,赵克斌,等.全自动酶联免疫吸附法检测血清丙型肝炎抗体精密性能评价[J].中国药物与临床,2016,16(3):305-309.
- [9] 韩忠学,刘静,樊霞.儿童梅毒 4 种检测方法的灵敏度及特异性比较[J].武警医学,2015,26(2):116-117.
- [10] 吴芳芳.甲亢、甲减患者甲功五项水平及其各项指标的灵敏度及临床意义[J].医学理论与实践,2016,29(4):520.

(收稿日期:2017-02-19 修回日期:2017-04-19)