

# 全自动酶免分析仪和酶标板快速孵育器联合进行 ELISA 检测操作其时间流程优化的实用性探讨

韩小娟<sup>1</sup>, 赵 玥<sup>2</sup>, 田洪伦<sup>1</sup>, 何 军<sup>1</sup>

(1. 贵州省第二人民医院检验科, 贵阳 550004; 2. 温州医科大学检验医学院生命科学学院, 浙江温州 325035)

**摘要:** **目的** 采用全自动酶免分析仪和酶标板快速孵育器相结合, 优化酶联免疫吸附操作流程, 缩短检测时间, 提高工作效率。**方法** 收集化学发光法检测结果为高 ( $\geq 250$  IU/ml)、中 (101~250 IU/ml)、低 (0.05~100 IU/ml) 值的 HBsAg 阳性标本及阴性对照各 50 例, 分别用全自动酶免分析仪, 以及全自动酶免仪联合酶标板快速孵育器设置孵育时间为常规时间的 1/2, 1/3, 1/4 进行检测, 比较与化学发光检测结果的差异性。**结果** 与化学发光检测相比较, 全自动酶免分析仪对 HBsAg 的检测结果差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.053$ ,  $P>0.05$ ), 全自动酶免仪联合酶标板快速孵育器分别缩短孵育时间至常规 1/2, 1/3 和 1/4 对 HBsAg 检测结果差异均无统计学意义 ( $\chi^2=0 \sim 0.323$ , 均  $P>0.05$ )。各方法比较差异均无统计学意义, 但其中将快速孵育时间缩短至试剂盒规定时间的 1/2 时的总样本符合率和敏感度最高。**结论** 全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器缩短孵育时间至常规的 1/2 时, 显著提高检测结果准确度, 同时提高工作效率, 在临床标本检测中具有较高的推广应用价值。

**关键词:** 酶联免疫吸附法; 酶标板快速孵育; 联合检测; 时间优化

**中图分类号:** R446.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-159-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.039

## Discussion on the Practicability of the Time Optimization of ELISA Detection Operation with the Combination of Automatic Enzyme Immunoassay Analyzer and Enzyme Plate Rapid Incubator

HAN Xiao-juan<sup>1</sup>, ZHAO Yue<sup>2</sup>, TIAN Hong-lun<sup>1</sup>, HE Jun<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550004, China; 2. School of Life Sciences, School of Laboratory Medicine, Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325035, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the method of optimizing the operation flow of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), shortening incubation time and improving work efficiency by using the combination of rapid incubation method and automatic enzyme immunoassay analyzer. **Methods** Collected 50 HBsAg negative specimens and positive specimens with high ( $\geq 250$  IU/ml), medium (101~250 IU/ml), and low (0.05~100 IU/ml) values by chemiluminescence method, respectively. Detection with automatic enzyme immunoassay analyzer and combined detection with automatic enzyme immunoassay analyzer and rapid incubator combined were carried out simultaneously. At the same time, the rapid incubation time was shortened to 1/2, 1/3 and 1/4 of the kit's prescribed time. And then compared the results with the chemiluminescence method. **Results** Compared with chemiluminescence detection, the results of HBsAg detection by the automatic enzyme free analyzer were not statistically significant. The results of HBsAg detection by the automatic enzyme free analyzer combined with the rapid incubator of enzyme label plate reduced the incubation time to 1/2, 1/3 and 1/4, respectively, the difference were not statistically significant. There were no statistically significant differences among the methods, but the total sample coincidence rate and sensitivity were the highest when the rapid incubation time was reduced to 1/2 of the time specified by the kit. **Conclusion** When the automatic enzyme-free analyzer combined with the rapid incubator of enzyme-label plate shorted the incubation time to 1/2 of the routine, the detection accuracy and work efficiency were significantly improved, which had a high value of popularization and application in clinical specimen detection.

**Keywords:** enzyme-linked immunosorbent; enzyme-labeled rapid incubator; joint detection; time optimization

酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 具有简便、快速、成本低等优点而被临床广泛运用<sup>[1-3]</sup>。近年来, 由于全自动酶免分析仪能减少人工成本及人为操作误差, 使检测

作者简介: 韩小娟 (1980-), 女, 学士, 主管技师, 主要从事临床免疫学检验, E-mail: 51031171j@qq.com。

通讯作者: 何军 (1978-), 男, 硕士, 主任技师, 从事临床免疫学研究, E-mail: gzghyjjj@163.com。

流程更加标准和规范,提高检测结果的精确性和可溯源性,因此在临床检验中受到广泛应用。但全自动酶免仪样本孵育时间长,影响临床样本检测效率。酶标板快速孵育器因能缩短孵育时间,提高工作效率,在临床检验中的应用越来越多,但快速孵育法仍需要人工加样,增加了人工参与造成的误差。本实验通过利用全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器检测乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg),探讨优化 ELISA 操作流程在临床检验中的实用性。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 1 月~2019 年 9 月经化学发光法定量检测 HBsAg 阳性高值( $\geq 250$  IU/ml)、中值(101~250 IU/ml)、低值(0.05~100 IU/ml)样本各 50 例,HBsAg 阴性样本 50 例。其中男性 112 例,女性 88 例,年龄 4~93 岁,平均年龄 46 岁。

1.2 仪器与试剂 四川迈克 i3000 化学发光免疫分析仪,嘉兴科瑞迪全自动酶联免疫分析仪(HB-500E),成都盖森酶标板快速孵育器(MKF-6)。迈克生物股份有限公司化学发光法乙型肝炎病毒表面抗原检测试剂盒,北京万泰生物药业有限公司酶联免疫法乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒。

## 1.3 方法

1.3.1 所有收集的血清样本均保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中直至分析。取出待检样本置于室温至完全融化混匀,待测。

1.3.2 化学发光法定量检测 HBsAg (C 法):按照迈克生物股份有限公司乙型肝炎病毒表面抗原检测试剂盒说明书和仪器 SOP 操作,并严格执行质控标准。

1.3.3 ELISA 定性检测 HBsAg:试剂盒室温放置 30min 后分别用四种实验方法检测,A 法:使用全自动酶免分析仪进行孵育检测;B1, B2, B3 法:均使用全自动酶免分析仪加样、加试剂、洗板、比色,孵育时转移到酶标板快速孵育器进行孵育,其中 B1 法孵育时间为说明书规定时间的 1/2, B2 法孵育时间为说明书规定时间的 1/3, B3 法孵育时间为说明书规定时间的 1/4,具体孵育时间见表 1,其他操作步骤严格遵守试剂盒说明书和仪器 SOP 进行。

1.3.4 计算每份样本的 S/CO 值:以 S/CO 值 $\geq 1$ 时判断为样本 HBsAg 阳性, S/CO 值 $< 1$ 时判断为样本 HBsAg 阴性。A, B1, B2, B3 法分别与化学发光法(C 法)进行差异比较,同时计算各方法的总样本符合率、敏感度和特异度。

表 1 各方法实验孵育时间

方法	孵育时间 1 (min)	孵育时间 2 (min)	显色时间 (min)	总反应时间 (min)
A	60	30	30	120
B1	30	15	15	60
B2	20	10	10	40
B3	15	7.5	7.5	30

1.3.5 精密度评价实验:选用试剂盒配套的 HBsAg 阴阳性对照及第三方弱阳性质控品,使用 ELISA (A, B1, B2, B3 法)方法进行检测,每个质控品连续重复测定 20 次,计算变异系数(CV%)。

1.4 统计学分析 使用 SPSS19.0 统计软件对实验结果进行统计学处理,多组间差异的比较采用卡方( $\chi^2$ )检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各方法检测 HBsAg 精密度结果 见表 2。根据说明书要求,阴性对照结果吸光度值 $<0.10$ 、阳性对照结果吸光度值 $>0.80$ 时实验结果有效,第三方弱阳性质控 S/CO 值为 2~5 有效。20 次质控实验中,阴性对照结果吸光度均值 0.008,阳性对照结果吸光度均值 3.68,第三方弱阳性质控 S/CO 均值为 3.98,实验结果有效。A, B1, B2, B3 法批内重复性实验(精密度)判断标准为说明书要求的精密度变异系数(CV%) $\leq 15\%$ ,均在要求以内。

表 2 各方法对 HBsAg 的精密度检测 (CV%)

方法	A 法	B1 法	B2 法	B3 法	判断标准
阴性质控	3.89	3.58	4.12	4.56	$\leq 15$
阳性质控	2.23	1.89	2.11	2.67	$\leq 15$
弱阳性质控	2.74	2.31	2.70	2.86	$\leq 15$

2.2 各方法检测 HBsAg 定性结果 见表 3。各方法与化学发光法(C 法)检测结果进行比较,只有全自动酶免仪联合酶标板快速孵育器孵育时间缩短 1/2 (B1 法)时的阴阳性检测结果与化学发光法完全一致,全自动酶免仪单独检测(A 法)时阴性结果一致,阳性结果有 2 例不一致。但所有结果差异均无统计学意义( $\chi^2=0\sim 0.323$ ,均 $P>0.05$ )。

2.3 各方法检测 HBsAg 总样本符合率、敏感度、特异度情况 见表 4。

表3 各方法检测 HBsAg 定性结果 (n=200)

方法		C法		$\chi^2$	P
		+(150)	-(50)		
A法	+	148	0	0.053	0.819
	-	2	50		
B1法	+	150	0	0.000	1.000
	-	0	50		
B2法	+	149	0	0.130	0.908
	-	1	50		
B3法	+	145	0	0.323	0.570
	-	5	50		

表4 各方法检测 HBsAg 总样本符合率、敏感度、特异度情况 (%)

方法	结果符合 (n)	总样本符合率	敏感度	特异度
A	198	99.00	98.67	100.00
B1	200	100.00	100.00	100.00
B2	199	99.50	99.33	100.00
B3	195	97.50	96.67	100.00

### 3 讨论

基于 ELISA 具有成本低、简便、灵敏等优点,因而 ELISA 的临床检验项目在各级医院都得到广泛开展。近年来,同一 ELISA 检测方法在不同检测系统间的阳性符合率也越来越得到人们关注<sup>[4]</sup>。在 ELISA 实验中,孵育是检测中影响检测成败的最关键因素之一<sup>[5]</sup>,因此,在确保检测结果准确性的前提下,优化检测流程和缩短检测时间对临床检验实际工作有重要的参考意义。

本研究以化学发光法作为检测的金标准,本次实验收集所有样本的乙肝血清学模式均为 HBsAg, HBeAg 和 HBcAb 阳性或 HBsAg, HBeAb 和 HBcAb 阳性。本次实验采用全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器新流程。新流程在缩短 1/2 时间的情况下,其检测 HBsAg 项目的敏感度比单纯的全自动酶免分析仪敏感度更高。由此可见,新流程极大地缩短了检验项目的时长,减少了临床医生和患者的等待时间。当新流程将孵育时间缩短为原规定时间的 1/3 和 1/4 时,虽然和化学发光法检测结果比较差异无统计学意义,但敏感度相对较低,有阳性漏检的可能,所以不推荐将孵育时间缩短为原时间的 1/3 和 1/4。

本研究还发现,全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器检测一些低滴度阳性标本中的敏感度高于全自动酶免分析仪,其原因可能为酶标板快速孵育器的升温原理不一样。酶标板快速孵育器的原理主要是通过发热模块产生空气循环加热,使用多个方向风扇旋转使孵育腔内形成流动气体,保证温度

的均匀性,且孵育全过程中结合振荡,促进抗原抗体结合,能一定程度上增加试剂的灵敏度<sup>[6]</sup>。而全自动酶免孵育室只有微孔板金属载架加温,反应板孔受热不均匀,孵育室整体空间比较大,升温曲线较慢,温度不准确,以及反应板周围环境可达到预期温度而孔内温度不能达到预期温度<sup>[7-8]</sup>。因此,在孵育过程中其实有大量的时间是用于升温过程,而最佳孵育段的时间并没有那么长。由此,金属底板单面加热可能是 ELISA 自动化仪器的缺陷<sup>[9]</sup>。

研究中,HBsAg 含量越低,快速孵育缩短的时间越短,ELISA 漏检率越高。本文结果与刘丽等<sup>[6]</sup>人的研究结果相比,缩短 1/3 时间敏感度略有不同,可能与本文所选取的低值样本较多和仪器试剂的敏感度不同有关。且本实验除孵育环节不一致外,其它步骤均由同一仪器操作完成,减少了实验的系统误差和偶然误差,使结果更具可比性。

通过本研究证实,优化后的全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器的方法检测 HBsAg,将孵育时间缩短至规定时间的 1/2,在确保结果准确性的同时,缩短了整个检验项目的检测时间,提高了工作效率,这对临床标本的检测具有重要的应用价值。

### 参考文献:

- [1] 邓安彦,蔡艳娟,周守容,等. ELISA 法检测 HBsAg (CMIA) 低值血清样本的结果分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2015,30 (2): 123-125.  
DENG Anyan, CAI Yanjuan, ZHOU Shourong, et al. Analysis of the results of ELISA by detecting low quantitative HBsAg(CMIA) in serums [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015,30 (2): 123-125.
- [2] 辛晓阳,徐立群,潘峰. 化学发光免疫分析技术和酶联免疫吸附试验在乙肝病毒血清学检验中的价值分析 [J]. 中国现代医生, 2018,56 (10): 127-130.  
XIN Xiaoyang, XU Lique, PAN Feng. Analysis on the value of chemiluminescence immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay in serological detection of hepatitis B virus [J]. China Modern Doctor, 2018,56 (10): 127-130.
- [3] WILLIAMS S, SCHULZ P, SIERKS M R. A sensitive phage-based capture ELISA for sub-femtomolar detection of protein variants directly from biological samples[J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(1): 289-298.
- [4] 李娅,章迪,张赞,等. 罗氏 cobas e602 与 modular e170 电化学发光分析仪检测血清 HBsAg 阳性低值结果的对比分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2017,32 (3): 123-125.  
LI Ya, ZHANG Di, ZHANG Yun, et al. Study on the low positive results of detecting HBsAg in serum specimens with Roche Cobase602 and Modular e170 electrochemical luminescence analyzer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017,32 (3): 123-125.
- [5] 李晓霞,迟伟群,姚玉虹,等. 温湿度对高通量 ELISA 检测系统检测梅毒螺旋体抗体影响的分析 [J]. 标记免疫分析与临床, 2015,22 (1): 46-51.  
LI Xiaoxia, CHI Weiqun, YAO Yuhong, et al. Influence of temperature and humidity on detection of treponema pallidum antibodies with high-throughput ELISA



- system[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2015,22 (1):46-51.
- [6] 刘丽,何露,孔凡虹,等.应用快速孵育法优化酶联免疫吸附实验过程探讨-以乙型肝炎病毒表面抗原检测为例[J].标记免疫分析与临床,2016,23 (9):1073-1076.
- LIU Li, HE Lu, KONG Fanhong, et al. Evaluation of rapid incubation optimization process of enzyme-linked immunosorbent assay on hepatitis B surface antigen detection[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2016,23 (9): 1073-1076.
- [7] 赵彤.全自动酶免疫分析仪温育时间对系统检测的影响[J].内蒙古医学杂志,2013,45 (2): 225-226.
- ZHAO Tong. Effect of incubation time on the detection of enzyme in automated enzyme immunoassay system [J]. Inner Mongolia Medical Journal, 2013,45 (2): 225-226.
- [8] 李媛,谭艳,韩晓芳.ELISA检测血清HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV灰区设定的探讨[J].国际检验医学杂志,2017,38 (6):810-812.
- LI Yuan, TAN Yan, HAN Xiaofang, et al. Detection of HBsAg, anti-HCV, anti-TP and anti-HIV in sera by ELISA [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2017,38 (6):810-812.
- [9] 徐国锋,徐飞,任碧琼,等.不同温育模式对全自动酶联免疫分析仪检测结果的影响[J].临床检验杂志,2015,33 (9):657-658.
- XU Guofeng, XU Fei, REN Biqiong, et al. Effects of different incubation modes on the results of ELISA [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2015,33 (9):657-658.
- 收稿日期:2020-02-21 修回日期:2020-07-31
- (上接第71页) young adults: A registry-based study [J]. Journal of the American Heart Association, 2016,5(5):e003158.
- [10] 杨欢,张珊珊,钱海洲,等.年轻型缺血性脑血管病的特点及病因分析[J].中国继续医学教育,2020,12(4):101-103.
- YANG Huan, ZHANG Shanshan, QIAN Haizhou, et al. Characteristics and etiology of ischemic cerebrovascular disease in young adults[J]. China Continuing Medical Education, 2020,12(4):101-103.
- [11] 赵忠新,张照环.分别从临床与细胞水平看睡眠障碍与脑血管病之间的联系[J].中国卒中杂志,2015,10(1):15-19.
- ZHAO Zhongxin, ZHANG Zhaohuan. Association between sleep disorders and cerebrovascular disease at clinical and cellular levels[J]. Chinese Journal of Stroke, 2015,10(1):15-19.
- [12] 徐琰.益肾活血法治疗缺血性脑卒中后失眠(肾阴虚兼血瘀型)的临床观察[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2011.
- XU Yan. The clinical study of nourishing kidney yin and promoting blood circulation on treating aypnia after ischemic stroke (combination of blood stasis and kidney yin deficiency [D]. Haerbin: Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [13] 吴乐昌.血浆同型半胱氨酸、超敏C反应蛋白与颈动脉粥样硬化的相关性分析[J].青岛医药卫生,2019,51 (4):277-279.
- WU Lechang. Clinical correlation analysis between plasma homocysteine, high-sensitivity C-reactive protein and carotid atherosclerosis[J]. Qingdao Medical Journal, 2019,51(4):277-279.
- [14] 于玉英.瑞舒伐他汀钙片对缺血性脑血管病患者颈动脉硬化性狭窄伴斑块改变及超敏C-反应蛋白的影响[J].中国医药指南,2019,17(26):70-71.
- YU Yuying. Effect of rosuvastatin calcium tablets on carotid artery sclerosing stenosis with plaque changes and hypersensitive c-reactive protein in patients with ischemic cerebrovascular disease [J]. Guide of China Medicine, 2019,17(26):70-71.
- [15] 刘赵东.观察银杏二萜内酯葡胺注射液对动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期患者血液流变学的影响[J].临床医药文献电子杂志,2019,6(74):156-157.
- LIU Zhaodong. Observation of the effect of ginkgo di-terpenoid lactone glucamine injection on hemorheology in patients with convalescent atherosclerotic thrombotic cerebral infarction [J]. Journal of Clinical Medical Literature (Electronic Edition), 2019,6(74):156-157.
- [16] KAMATH J, PRPICH G, JILLANI S. Sleep disturbances in patients with medical conditions[J]. The Psychiatric Clinics of North America, 2015, 38(4): 825-841.
- [17] GREISENEGGER S, ZEHETMAYER S, FERRARI J, et al. Clinical predictors of death in young and middle-aged patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: long-term results of the Vienna Stroke Registry: clinical predictors of ischemic stroke mortality in patients <60 years[J]. Journal of Neurology, 2011, 258(6): 1105-1113.
- [18] 魏蒙.太极推拿治疗慢性失眠的临床观察及对血清CRP、IL-6的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2020.
- WEI Meng. The clinical observation of Taichi Tuina in the treatment of chronic insomnia and its effect on serum CRP and IL-6[D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [19] 耿彪,宋婷阁,张鹏举,等.血清炎症因子与老年急性脑梗死颈动脉粥样硬化及预后的关系[J].现代检验医学杂志,2019,34(4):120-123, 127.
- GENG Biao, SONG Tingge, ZHANG Pengju, et al. Relationship between inflammatory factors in serum and carotid atherosclerosis and prognosis in elderly patients with acute cerebral infarction[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(4):120-123, 127.
- [20] 杨静,戚志强,周红,等.中性粒-淋巴细胞比值对急性脑梗死患者颅内外动脉狭窄的预测研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(6):890-893.
- YANG Jing, QI Zhiqiang, ZHOU Hong, et al. Prediction of intracranial and extracranial stenosis in patients with acute cerebral infarction by neutrophil to lymphocyte ratio [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science edition), 2019,39(6):890-893.
- [21] SCHNEIDER S, KORNEJEVA A, VIBO R, et al. Risk factors and etiology of young ischemic stroke patients in Estonia[J]. Stroke Research and Treatment, 2017, 2017: 8075697.
- [22] THIMGAN M S, GOTTSCHALK L, TOEDEBUSCH C, et al. Cross-translational studies in human and Drosophila identify markers of sleep loss[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61016.
- 收稿日期:2020-07-22 修回日期:2020-10-09