

· 论 著 ·

## 高通量 ELISA 测定血清糖类抗原 125 的方法学评价\*

陈娟<sup>1</sup>, 张蓉<sup>1</sup>, 于水<sup>2</sup>, 曲松本<sup>1△</sup>

(1. 山东省青岛市中心医院检验科 266042; 2. 山东省青岛市妇女儿童医院检验科 266034)

**摘要:**目的 对高通量酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清糖类抗原(CA)125 进行方法学评价,实现高通量 ELISA 定量检测 CA125 的标准化。**方法** 收集住院患者血清标本共 4 180 例,健康查体者血清标本 200 例。对高通量 ELISA 测定 CA125 的线性范围、精密度、正确度、参考区间、敏感度、特异度及抗干扰能力进行评价,将其与电化学发光法(ECLIA)结果进行比对,评价其临床应用价值。**结果** 高通量 ELISA 测定 CA125 的线性范围为 0.0~500.0 U/mL;低、中、高水平的批内变异系数(CV)分别为 4.18%、3.80%、4.75%, 日间 CV 分别为 3.33%、3.11%、2.17%, 总 CV 分别为 6.74%、6.76%、6.34%;中位数回收率为 97.40%;参考区间为 0.00~35.89 U/mL, 敏感度为 3.0 U/mL。癌胚抗原(CEA)≤2 500 mIU/mL、甲胎蛋白(AFP)≤500 IU/mL、CA50≤500 IU/mL、CA724≤500 IU/mL, 对该方法无明显交叉反应。三酰甘油小于或等于 4 mmol/L, 胆红素小于或等于 150 μmol/L、血红蛋白小于或等于 2.0 g/L, 对检测结果无明显影响。检测结果与 ECLIA 结果呈直线相关( $R^2=0.948$ ), 阳性率比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 该研究建立的高通量 ELISA 检测 CA125 的标准操作规程, 测定血清 CA125 结果可靠、稳定, 与 ECLIA 结果具有可比性, 可降低检验成本, 提高检测效率。

**关键词:**高通量酶联免疫吸附试验; 糖类抗原 125; 方法学评价**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.005 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)22-3292-03**Methodological evaluation of high-throughput ELISA for detecting serum CA125\***CHEN Juan<sup>1</sup>, ZHANG Rong<sup>1</sup>, YU Shui<sup>2</sup>, QU Songben<sup>1△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Qingdao Municipal Central Hospital, Qingdao, Shandong 266042, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Qingdao Municipal Women and Children's Hospital, Qingdao, Shandong 266034, China)

**Abstract:** **Objective** To conduct the methodological evaluation on high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting serum carbohydrate antigen 125 (CA125) to realize the standardization of high-throughput ELISA for quantitatively detecting serum CA125. **Methods** A total of 4 180 serum samples of inpatients and 200 serum samples of healthy people were collected. The linear range, precision, accuracy, reference interval, sensitivity, specificity and anti-interference ability of high-throughput ELISA for detecting CA125 were evaluated. The results were compared with those detected by the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) and its clinical application value was assessed. **Results** The linear range of high-throughput ELISA for detecting CA125 was 0.0–500.0 U/mL. The intra-batch coefficient of variation (CV) of low, medium and high levels were 4.18%, 3.80% and 4.75% respectively, the inter-batch CV were 3.33%, 3.11% and 2.17% respectively, the total CV were 6.74%, 6.76% and 6.34% respectively. The median recovery rate was 97.40%. The reference interval was 0.00–35.89 U/mL. The sensitivity was 3.0 U/mL. Under the conditions of CEA ≤ 2 500 mIU/mL, AFP ≤ 500 IU/mL, CA50 ≤ 500 IU/mL and CA724 ≤ 500 IU/mL, the method had no obvious cross-reactivity. Under the conditions of triglycerides ≤ 4 mmol/L, bilirubin ≤ 150 μmol/L and hemoglobin ≤ 2.0 g/L, which had no obvious influence on detection results. The detection results by high-throughput ELISA had linear correlation with those by electrochemiluminescence assay ( $R^2=0.948$ ). The positive rate had no statistically significant difference between the two methods ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The standard operating procedure for detecting serum CA125 established by high-throughput ELISA is reliable and stable in the results for detecting CA125, has comparability with the results of ECLIA, which can reduce the detection cost and increases the detection efficiency.

**Key words:** high-throughput ELISA; carbohydrate antigen 125; methodological evaluation

随着检验技术的发展和高通量检测仪的出现,酶联免疫吸附试验(ELISA)定量检测肿瘤标志物成为可能。目前,高通量 ELISA 检测多采用国外仪器与试剂,价格较高且没有统一的国家标准,存在操作规程和判读标准不一致的问题。ELISA 系统化、标准化的建立及实现实验室间结果的互认成为重要课题。糖类抗原(CA)125 是上皮性卵巢癌、胃癌、肺癌等多种癌症的肿瘤标志物<sup>[1-3]</sup>,对于疾病的诊断及疗效监测等有重要价值。本研究将国产试剂和国产仪器进行配套整合,寻求最佳匹

配点,并对检测系统的性能进行验证,将检测结果与电化学发光法(ECLIA)结果进行比较,评价其临床诊断价值,为高通量 ELISA 定量检测血清 CA125 的系统化、标准化及临床应用奠定基础,以降低检验成本,提高检测效率。现报道如下。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 收集 2015 年 3 月至 2016 年 3 月住院患者中有检测项目 CA125 的血清标本 4 180 例;年龄 12~92 岁,中位年龄 57 岁;男 1 366 例,女 2 814 例。选取健康查体者血清 200

\* 基金项目:国家卫生计生委医药卫生科技发展研究中心专项课题资助项目(28-2-8);山东省医药卫生科技发展计划项目(2013WS0016)。

作者简介:陈娟,女,技师,主要从事临床检验诊断方面的研究。△ 通信作者,E-mail:173864477@qq.com。

例;年龄 35~64 岁,中位年龄 54 岁;男 70 例,女 130 例。

**1.2 仪器与试剂** ADDCARE 1100 全自动 ELISA 分析仪购自烟台艾德康公司;CA125 ELISA 试剂及标准品购自北京热景公司;COBAS e601 ECLIA 仪及试剂购自瑞士罗氏公司;Lyphochek® Tumor Marker Plus Control 肿瘤标志物质控物购自上海伯乐公司;甲胎蛋白(AFP)、CA724 标准品购自美国 Fitzgerald 公司;癌胚抗原(CEA)、CA50 标准品购自美国 BIODESIGN 公司。

**1.3 方法**

**1.3.1 标本采集** 抽取静脉血 5 mL,血液凝固后 3 000 r/min 离心 10 min,上层血清待用。

**1.3.2 变异系数(CV)试验** 分别检测 35、200、400 U/mL 3 种水平的 CA125 质控血清,各水平每天做 2 批试验,每批对样品做 2 例检测,连续测定 20 d。以批内 CV 小于 25.0% 的允许误差、日间 CV 小于 33.3% 的允许误差为临床可接受标准。

**1.3.3 正确度评价(回收试验)** 取 6 个水平的患者血清,每例血清制成对照标本(0.9 mL 血清加 0.1 mL 生理盐水)和回收标本(0.9 mL 血清加 0.1 mL 最高水平标准品),均分析 4 次。计算回收率和比例误差。比例误差小于可允许总误差即达到可接受标准。

**1.3.4 参考区间建立** 受试对象 200 例,均为体格检查正常、肝肾功能正常和影像学检查无异常者。以结果 95% 的分布范围为参考区间。只有参考上限有意义才使用 95% 位数。

**1.3.5 敏感度** 零标准品重复测定 20 次,吸光度均值加上 2 倍标准差,其标准曲线上对应的水平即为敏感度。

**1.4 统计学处理** 采用 Microsoft Excel 2003、SPSS19.0 和 GraphPad Prism 5 软件进行统计学处理。2 种方法结果的相关性分析采用直线回归分析。计数资料以例数或率表示,组间

比较采用配对  $\chi^2$  检验。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 高通量 ELISA 检测 CA125 的标准曲线** 双对数线性拟合方式处理 5 例标准品数据,得到  $Y = 0.79X + 1.24$  的线性方程标准曲线,  $R^2 = 0.998$ 。说明吸光度值随标准品水平的变化呈直线相关。

**2.2 高通量 ELISA 检测 CA125 的 CV** 从室内质量评价表中查阅 CA125 的可接受范围是 23.3%,3 种水平血清检测的批内 CV 分别为 4.18%、3.80%、4.75%,均小于 25.0% 的允许误差范围(5.83%);日间 CV 分别为 3.33%、3.11%、2.17%,均小于 33.3% 的允许误差范围(7.77%);总 CV 分别为 6.74%、6.76%、6.34%,均小于 15%,在临床可接受标准内。见表 1。

表 1 高通量 ELISA 测定 CA125 水平的 CV

水平	$\bar{x}$ (U/mL)	$s_{\text{批内}}$ (U/mL)	$s_{\text{日间}}$ (U/mL)	$s_{\text{总}}$ (U/mL)	$CV_{\text{批内}}$ (%)	$CV_{\text{日间}}$ (%)	$CV_{\text{总}}$ (%)
低	34.93	1.47	1.17	2.37	4.18	3.33	6.74
中	199.21	7.58	6.19	13.48	3.80	3.11	6.76
高	407.59	19.36	8.63	25.82	4.75	2.17	6.34

**2.3 高通量 ELISA 检测 CA125 的正确度** CA125 的回收率为 97.40% (92.69%~104.01%),比例误差为 5.04% (-4.01%~7.31%),6 例标本的比例误差均小于允许总误差(23.3%),表明回收率合格。见表 2。

表 2 高通量 ELISA 测定血清 CA125 的回收率

标本编号	对照标本均值(U/mL)	回收标本均值(U/mL)	偏差(U/mL)	加入量(U)	回收率(%)	比例误差(%)
1	16.96	68.60	51.64	50.00	103.29	-3.29
2	53.34	100.59	47.25	50.00	94.50	5.50
3	97.31	149.32	52.00	50.00	104.01	-4.01
4	153.33	200.61	47.27	50.00	94.55	5.45
5	212.07	258.42	46.35	50.00	92.69	7.31
6	308.35	356.03	47.67	50.00	95.35	4.65

**2.4 高通量 ELISA 检测血清 CA125 的参考区间** 200 例健康查体者血清 CA125 水平为 9.46~18.55 U/mL,中位水平为 13.73 U/mL,实测范围为 0.60~40.40 U/mL。95% 置信区间为 0.00~35.89 U/mL。

**2.5 高通量 ELISA 检测 CA125 的敏感度** 对零标准品进行 20 次测定,吸光度均值加上 2 倍标准差,经标准曲线计算其对应的水平,高通量 ELISA 的检测敏感度为 3.0 U/mL。

**2.6 高通量 ELISA 检测 CA125 的特异度** 用高通量 ELISA 分别测定 CEA(2 500 mIU/mL)、AFP(500 IU/mL)、CA50(500 IU/mL)和 CA724(500 IU/mL)4 种肿瘤标志物标准品,均无明显交叉反应。ECLIA 测定 CA125 水平,4 种肿瘤标志物均小于或等于 10 U/mL;ELISA 测定 CA125 水平,4 种肿瘤标志物均小于或等于 15 U/mL。

**2.7 高通量 ELISA 检测 CA125 的抗干扰能力** 以 CA125 水

平为 200 U/mL 的血清标本作为基础血清,分别加入不同水平的三酰甘油、胆红素和血红蛋白作为干扰标本,加入等体积的生理盐水作为对照标本,进行回收试验。结果表明,三酰甘油小于或等于 4 mmol/L、胆红素小于或等于 150  $\mu$ mol/L、血红蛋白小于或等于 2.0 g/L 时,回收比例误差均小于 10.0%,表明上述水平的物质对高通量 ELISA 检测 CA125 无明显干扰。

**2.8 2 种方法检测 CA125 的线性范围及相关性** ECLIA 检测 CA125 的线性范围为 0.0~5 000.0 U/mL,ELISA 线性范围较窄,为 0.0~500.0 U/mL。ELISA 线性范围内,2 种方法的检测结果呈直线相关,线性方程为  $Y = 0.98X + 2.12$ ,  $R^2 = 0.948$ ,  $n = 3 830$ ,  $P < 0.05$ 。超出 ELISA 线性范围(大于 500 U/mL)的标本,用生理盐水稀释后再测定,得到线性方程  $Y = 0.93X + 70.89$ ,  $R^2 = 0.871$ ,  $n = 350$ ,  $P < 0.05$ 。

**2.9 2 种方法检测 CA125 的符合率比较** 将参考区间值

35.89 U/mL 作为高通量 ELISA 的临界点,35.00 U/mL 是本实验室 ECLIA 的临界点,用 2 种方法分别对 4 180 例患者的血清 CA125 进行检测。高通量 ELISA 和 ECLIA 的阳性率分别为 59.07% 和 59.35%,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 3。

表 3 2 种方法 CA125 检测结果比较(n)

ECLIA	高通量 ELISA		合计
	阴性	阳性	
阴性	1 655	44	1 699
阳性	56	2 425	2 481
合计	1 711	2 469	4 180

### 3 讨 论

ELISA 是国内临床免疫检验最常用的方法,其结果的准确度直接影响临床诊断、治疗监测和预后评估。随着我国医学发展,流行病学检测和临床样本量逐年增加,对结果的准确度和时效要求也越来越高,实现 ELISA 的高通量检测及标准化便成为当务之急。

CA125 是临床常用的肿瘤监测指标,其水平不仅在卵巢癌患者的血清中升高,在子宫内膜癌、肺癌、胃癌等恶性肿瘤中也可见升高,并随着病情的进展不断上升<sup>[4]</sup>。因此,CA125 在各类腺癌中的作用及临床检测值得重视。目前,检测 CA125 的“金标准”仍然是 ECLIA,但较高的成本增加了患者的医疗负担。高通量 ELISA 操作简便、价格低廉,利于临床大批量标本检测,正获得临床实验室越来越多的青睐<sup>[5-6]</sup>。

本研究使用的高通量 ELISA 仪避免了手工加样易出现的漏加、错加及加样精度不够等问题,其与国产 ELISA 试剂盒进行配套整合,摸索最佳试验条件,可评价整套系统的分析性能。结果显示,3 个 CA125 水平对应的 CV 值均在可接受范围内,检测的正确度也可以满足临床要求。

由于方法本身的局限性,高通量 ELISA 检测 CA125 的线性范围较窄,为 0~500 U/mL。在此范围内,ELISA 测定结果与 ECLIA 结果具有可比性,呈直线相关。对水平大于 500 U/mL 的标本进行预稀释后再测定,测定结果与 ECLIA 结果相关性也较好,相关系数达到 0.871,说明稀释后再检测不影响临床对结果的判断,高通量 ELISA 检测 CA125 的结果可信。

本实验室高通量 ELISA 测定血清 CA125 的参考区间为 0~35.89 U/mL,与 ECLIA 的 0~35 U/mL 较为接近,与大部分医学实验室的参考范围也一致。高通量 ELISA 检测 CA125

的敏感度为 3.0 U/mL,对 CA125 水平小于 3.0 U/mL 的标本,该方法可能无法检出,但该水平远小于血清 CA125 的参考区间上限(35.89 U/mL),不会对临床诊断造成影响。高通量 ELISA 以 35.89 U/mL 为临界点,ECLIA 以 35.00 U/mL 为临界点时,两者阳性率差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示虽然 ELISA 检测敏感度不如 ECLIA,但并不影响阳性率的判断,不影响临床敏感度。

高通量 ELISA 检测 CA125 的特异度较好,与常用肿瘤标志物间无明显交叉反应,且具有较强的抗干扰能力,三酰甘油小于或等于 4 mmol/L、胆红素小于或等于 150  $\mu$ mol/L、血红蛋白小于或等于 2.0 g/L 时,回收比例误差均小于 10.0%,检测结果无明显影响。

研究表明,高通量 ELISA 定量检测血清 CA125 结果可信,准确性和重复性好,线性范围和稀释准确度可以满足临床需求。其系统化和标准化的建立将促进不同实验室间检验结果的互认,降低检验成本,提高检测效率。高通量 ELISA 检测肿瘤标志物可在临床上推广应用。

### 参考文献

- [1] 杨士军,陆卫平,郑云会,等.血清 CA125、HE4 联合 ROMA 指数对卵巢癌诊断的研究分析[J]. 检验医学与临床, 2016,13(14):1931-1933.
- [2] 周娥.血清 CEA、CA125、CA199 及血浆 M2-PK 联合检测在胃癌诊断中的价值分析[J]. 检验医学与临床, 2016,13(16):2360-2362.
- [3] 蒋贝兰,沙杭,马劲夫,等.血清肿瘤标志物检测在肺癌诊断和临床分期中的作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2014,24(3):386-389.
- [4] 李鑫,安兆全,郝冬兰,等.在恶性肿瘤中 CA125 增高的临床应用价值[J]. 中国医药指南, 2014,12(25):86-87.
- [5] Li XQ, Chen J, Huang YF, et al. Evaluation and analysis of dengue virus enhancing and neutralizing activities using simple high-throughput assays[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013,97(14):6503-6511.
- [6] 周爱凤,赵白云,陈娟,等.高通量 ELISA 测定血清癌胚抗原的应用评价[J]. 青岛大学医学院学报, 2015,51(6):659-661.

(收稿日期:2017-05-12 修回日期:2017-07-30)

(上接第 3291 页)

- [2] 夏吉荣,牛司强,曹炬.(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测对侵袭性真菌感染的临床价值的再评价[J]. 中国真菌学杂志, 2016,11(5):269-271.
- [3] 林勇平,陈源,蒋月婷,等.(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖在侵袭性真菌病诊断中的应用价值[J]. 临床检验医学杂志, 2016,34(2):124-125.
- [4] 匡红,周琳瑶,刘书荣,等.G 实验与真菌培养在临床深部真菌感染辅助诊断的价值[J]. 检验医学与临床, 2014,11(23):3308-3309.
- [5] 杨莉莉,邓瑛,刘敏,等.血浆(1-3)- $\beta$ -D-葡聚糖对侵袭性真菌感染诊断的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2016,13

(10):1364-1366.

- [6] 秦好奇,刘玉峰.侵袭性真菌感染患儿 87 例抗真菌药物治疗疗效分析[J]. 中国实用医刊, 2016,43(9):93-95.
- [7] 萧晨路,韩立中,倪语星,等.血浆(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测对血液病患者侵袭性真菌病的诊断价值[J]. 检验医学, 2016,31(8):675-678.
- [8] 张丽琴,肖九长,戴薇,等.血浆(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测对血液病患者侵袭性真菌感染的诊断价值[J]. 医学信息, 2015,28(39):84-85.

(收稿日期:2017-05-18 修回日期:2017-08-06)