

# 单采血小板乙型肝炎病毒表面抗原快速检测的漏检分析

杨俊鸿, 彭 楷, 刘加伟, 杨 培<sup>△</sup>, 骆展鹏, 邹晓萍, 王娟娟(重庆市血液中心 400015)

**【摘要】** 目的 通过比较胶体金法和酶联免疫法检测前端漏检单采血小板献血员标本结果, 分析快速检测筛查漏检原因。方法 采用金标法和酶联免疫法再次检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)前端筛查阴性、采集后酶联免疫吸附试验(ELISA)检测呈反应性的 31 例单采血小板献血员标本, 对结果进行对比分析。结果 31 例前端漏检标本 ELISA 检测结果均为阳性, 再次用胶体金法检测有 16 例阴性, 15 例阳性, 总的一致性为 48.4%。ELISA 阳性标本中 S/CO 值小于 10 前端筛查漏检再次用胶体金法检测为阳性结果的有 3 例, 阴性 14 例, 一致性为 9.7%; S/CO 值在 10~30 时用胶体金法检测为阳性的标本总共有 14 例, 阴性为 2 例, 一致性为 45.2%; S/CO 值大于 30 的 9 例标本再次用胶体金法检测全部检出, 一致性为 100.0%。结论 试剂检测方法不同所致的分析灵敏度差异和检测过程中操作不当是 HBsAg 漏检的主要原因, 胶体金试剂与 ELISA 试剂包被片段不同以及观察时间不够也是单采血小板 HBsAg 漏检的常见原因。

**【关键词】** 单采血小板; 乙型肝炎病毒表面抗原; 快速检测; 漏检

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.16.037 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)16-2275-02

我国是乙型肝炎的高流行区, 约有 10% 人群为乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)携带者。为了最大限度保障献血者的健康和降低经血传播疾病的风险, 以及减少血液报废, 血液采集前采用快速、高效的方法对献血者进行筛查是十分必要的。由于采集单采血小板的耗材成本较全血高, 以及献血者血液中血小板达到单采血小板要求的献血员相对较少, 而临床需求量、输入受血者体内的血液体积较多, 因此单采血小板在采集前的筛查工作质量更显得重要。但在实际工作中前端筛查与血液最终检测结果的符合性仍然存在一定的差距。为了分析并减小这种差距, 作者针对 HBsAg 这个项目收集到了本中心 2012 年 3 月至 2013 年 10 月 HBsAg 前端胶体金法筛查阴性、采集后酶联免疫吸附试验(ELISA)检测呈反应性的 31 例单采血小板献血员标本再次采用两种方法检测, 分析快速检测漏检的原因。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2011~2013 年本中心 HBsAg 实验室 ELISA 检测呈反应性的 31 例单采血小板献血员血浆标本, 标本收集后置于一 30℃ 以下冷冻保存。

## 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 仪器** Xiril 全自动加样仪、BEP III 全自动酶联免疫后处理系统、200 mL 移液器、秒表。

**1.2.2 试剂** ELISA 检测 HBsAg 抗原诊断试剂盒、胶体金法 HBsAg 诊断试剂盒。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本准备** 标本从冷冻冰箱取出后在 37℃ 孵育箱内复融, 并平衡 40 min, 平衡后将标本充分混匀待测。

**1.3.2 胶体金法** 采用胶体金试纸条, 按 HBsAg 诊断试剂盒(胶体金法)试剂说明书要求检测标本, 用移液器加样 80 μL 后开始计时, 30 min 内观察结果, 只出现质控线为阴性结果, 质控线和检测线同时出现为阳性结果。记录标本检测结果以及阳性标本检测线出现时间。

**1.3.3 ELISA** 按 HBsAg 诊断试剂盒(ELISA)试剂说明书要求检测标本, 采用 Xiril 全自动加样仪加样, 用 BEP III 全自动 ELISA 后处理系统进行试验及结果判读, A 值大于或等于 CUT OFF 值为阳性。设置室内质控, 并且结果受控。

**1.4 统计学方法** 使用一般统计学方法计算前端漏检标本中

胶体金法检测结果与 ELISA 结果总的一致性, ELISA 阳性结果 S/CO 值小于 10 时结果的一致性、S/CO 值在 10~30 时结果的一致性以及 S/CO 值大于 30 时的一致性。

## 2 结果

**2.1** 31 例标本 ELISA 检测结果均为阳性, 再次用胶体金法检测有 16 例阴性, 15 例阳性, 总的一致性为 48.4%。

**2.2** ELISA 阳性标本胶体金法检测结果 S/CO 值小于 10 前端筛查漏检再次用胶体金法检测为阳性结果的有 3 例, 检测线出现时间为 8~12 min, 阴性 14 例, 一致性为 9.7%; S/CO 值在 10~30 时用胶体金法检测为阳性的标本总共有 14 例, 检测线出现时间为 2~8 min, 阴性 2 例, 一致性为 45.2%; S/CO 值大于 30 的 9 例标本再次用胶体金法检测, 在 2~5 min 内全部检出, 一致性为 100.0%。

## 3 讨论

胶体金法是 20 世纪 90 年代初在免疫渗滤技术基础上建立起来的一种免疫学快速检测技术, HBsAg 胶体金试剂采用双抗体夹心法, 在硝酸纤维素膜上的检测区包被抗-HBs, 在对照区包被羊抗鼠 IgG。检测时, 阳性标本中的 HBsAg 与试纸条前端的胶体金-抗体结合形成免疫复合物, 在层析作用下, 复合物沿膜带移动, 在检测区形成紫红色条带。胶体金法检测 HBsAg 因为其具有快速、操作简单、准确率高、无需特殊设备等优点, 被广泛应用于血液采集前端筛查, 但是由于方法的局限性, 其检测灵敏度较 ELISA 低。

胶体金法试剂灵敏度较 ELISA 低是引起漏检的主要原因之一, 胶体金法检测灵敏度低于 ELISA 检测灵敏度<sup>[1]</sup>。文献[1]报道采用胶体金法检测 ELISA 结果全阴性 100 例, HBsAg 阳性、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)阳性和乙型肝炎病毒核心抗原(抗-HBc)阳性 100 例, HBsAg 阳性、乙型肝炎病毒 e 抗体(抗-HBe)阳性、抗-HBc 阳性 100 例和抗-HBs 阳性 100 例, 共 400 份新鲜血清。检测这些血清中 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 以及抗-HBc, 同时采用 ELISA 检测相同的标本、相同的项目, ELISA 严格按试剂盒说明书要求进行操作检测。用 ELISA 检测完成后, 立即再用胶体金试剂进行检测, 将检测试纸条的加样区直接浸入待测血清中 10 s, 取出后平放静置, 在 5~30 min 内观察检测结果。胶体金免疫层析法和 ELISA 均采用原卫生部的乙型肝炎病毒质控样品作为室内质控。以此

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 420858328@qq.com.

评价胶体金法检测血清乙肝免疫标志物的特异性和灵敏度。应用胶体金免疫层析法对各个浓度的质控样品进行重复性测定,每个标本分别重复检测20次。结果显示1 μg/L HBsAg和30 U/L抗-HBs的20次结果均为阴性,其余各个浓度的质控样品20次均为阳性。HBsAg项目与ELISA相比,胶体金法灵敏度为96.0%,特异性为100.0%,其灵敏度相对较低。更有资料报道S/CO值低于10时,胶体金法检出率为0.0%<sup>[2]</sup>。文献[2]报道采用2个厂家提供的HBsAg胶体金免疫层析法试纸条以及1个厂家提供的ELISA试剂共检测600份血清标本的HBsAg,室内质控标本由康彻思坦公司提供,定值为2 U/mL。方法严格按照3个试剂厂家的说明书规定以及试验要求的环境条件下进行检测。ELISA检测时,每天用室内质控物进行质控,并确保在控。对检测结果进行了统计分析,结果显示2个厂家提供的胶体金法试剂检测的阴、阳性结果与ELISA法检测结果总的一致性分别为96.5%和97.3%,阳性标本检测结果的一致性分别为86.7%和89.4%。阳性标本的S/CO值在10以下时,两种国产试纸条的检测方法与ELISA一致性均为0.0%,阴性标本的检测方法与ELISA一致性均大于100.0%。表2数据表明S/CO值低于10的弱阳性标本总数为17例,胶体金法检测阴性结果为14例,占弱阳性标本的82.4%,占总漏检标本的45.2%;这是由于其检测方法所决定的,对于此类漏检不再继续查找原因<sup>[3]</sup>。文献[3]报道采用HBsAg胶体金试剂检测HBsAg定值血清1 ng/mL(2 U/mL)、2 ng/mL(4 U/mL)、5 ng/mL(10 U/mL),HBsAg标准物质4 U/mL和阴性质控血清,检测HBsAg强阳性血清6份、4 U/mL阳性质控血清2份和阴性质控血清2份,同时记录检测对照线和检测线出现的时间,同时采用ELISA检测这些标本,结果S/CO值低于10的标本胶体金法未能检出。但是作为一种病原体标志物的快速检测试验,应该是在确保特异性的前提下,选择灵敏度较高的试剂。

检测方法原因引起的单采血小板HBsAg快速检测漏检还包括试剂包被片段不同或者少数标本可能存在HBV变异或者亚型导致阳性标本漏检<sup>[4]</sup>。如本次分析中有2例ELISA检测S/CO值在10~20的阳性标本,再次用金标法检测均为阴性结果,可能属于此种情况。

检测过程导致单采血小板HBsAg快速检测漏检的主要原因是工作人员操作不当所致。本次分析中5例S/CO值在10~20的阳性标本,再次用胶体金法检测3例检测结果为阳性,阳性结果检测线出现时间在2~8 min;同时有9例S/CO值大于30的强阳性标本,再次用检测胶体金法检测在5 min内全部出现阳性结果。此类前端检测漏检再次用胶体金法检测为阳性的标本总共有14例,占总漏检标本的45.2%。检测操作中如加样量不足、稀释液滴加时间或位置不正确、检测试剂保存条件不符合说明书要求以及未及时将没用完的试剂条密封保存等不规范的操作均可能导致高浓度的阳性HBsAg献血员筛查时漏检。与文献[5]报道的胶体金法漏检分析一致,该报道分析了2003年4~6月4 959份街头献血HBsAg胶体金法快速检测的阴性标本,用两种HBsAg-ELISA试剂严格按照说明书要求及步骤进行初复检,两种试剂检测结果S/CO值均大于或等于1.0阳性者或其中一种试剂S/CO值大于或等于1.0,经同一试剂双孔复查后任一孔结果S/CO大于或等于1.0为阳性。结果显示有22例标本ELISA检测HBsAg结果为阳性,漏检率为0.44%,将22份胶体金法漏检标本再次用胶体金试剂检测,有18例仍为阴性,4例为阳性。结果显示的4例漏检标本为人为原因引起,占18.18%。

检测过程引起的另一个比较重要的漏检原因为观察时间

不够。本次分析中有3例弱阳性的标本检测结果为阳性,但是阳性结果检测线出现时间相对较长,在8~12 min。在献血员较多的情况下,前端快速检测筛查判读结果的时间有缩短的情况,也是造成部分弱阳性标本漏检的原因。文献[6]报道,观察结果的时间延长至10~15 min为宜。该文献针对12 923份经胶体金法初筛合格的血液标本采用ELISA进行复检,复检阳性的标本再用胶体金法进行检测,对其检测结果进行分析。严格按照试剂说明书进行检测。结果有213份标本ELISA结果为阳性,表明漏检率为1.65%(213/12 923);ELISA结果S/CO值大于25.0的69份强阳性标本,胶体金法检测5 min内全部出现阳性结果;ELISA结果S/CO值为9.1~25.0的65份较强阳性血液标本,胶体金试纸条在5~10 min内先后出现比较清晰的紫红色条带检测线;ELISA结果S/CO值位于4.1~9.0的42份较弱阳性标本,10~15 min内出现阳性结果,只是部分检测线显色过于浅淡;ELISA结果S/CO值介于1.0~4.0的37份弱阳性标本,超过15 min后检测线尚未显色,按要求不再继续观察,按阴性结果处理。因此做采血前端快速检测筛查的工作人员应摸索出最佳检出效率与工作效率相匹配的判读时间,以减少观察时间不够所引起的漏检。

另外,文献[7]报道,季节变化对胶体金法检测结果也有影响,在温度低、湿度高的季节,HBsAg胶体金法漏检率较高。该报道将胶体金法对HBsAg检测漏检率与一年四季温湿度的关系进行分析,统计了2008~2012年街头采血车内温度、湿度变化对胶体金法筛查HBsAg的影响,结果显示,2008~2012年这5年间1~3月和10~12月这2个温度低、湿度高的季节HBsAg平均漏检率分别为0.73%和0.80%,高于其他2个季节(0.69%和0.68%)。由于无偿献血工作主要是在街头采血车上进行,环境条件不易控制,在因此工作人员应该注意试剂使用的环境条件,尽可能在其适宜的温度、湿度条件下进行检测,降低漏检率。

单采血小板前端筛查HBsAg是减少血小板报废和预防输血性感染乙型肝炎的一道重要防线,首先应选择灵敏度和特异性都较好的试剂用于前端筛查,以减少试剂原因引起的漏检。但是更重要的是要避免人为因素引起的漏检,因此要加强快速检测工作人员的素质培养,规范工作人员的操作步骤,保证检测结果的真实性,减少经济损失,减少宝贵的血小板资源浪费。

## 参考文献

- [1] 陈瀑,康红.胶体金免疫层析法检测乙型肝炎的评价[J].临床输血与检验,2003,4(1):30-31.
- [2] 张茂海,吴建业,陆玲娜,等.胶体金与酶联免疫法检测乙肝表面抗原结果分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(14):1625-1626.
- [3] 杨俊涛,邹晓萍,骆展鹏,等.快速检测试剂质量控制研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(12):1578-1579.
- [4] 胡晓静.金标法快速检测HBsAg漏检分析[J].中国医药导报,2009,8(6):69-79.
- [5] 李生菊.金标法快速检测HBsAg漏检原因分析[J].青海医药杂志,2006,36(9):51-52.
- [6] 符慧杰.胶体金法筛检HBsAg漏检原因与对策[J].中国热带医学,2004,4(3):464-465.
- [7] 董韬,邱淑华,邓振明,等.乙肝表面抗原金标法与酶联免疫法吸附法的比较[J].贵州医药,2013,10(37):252-253.