

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.10.011

HBsAg 胶体金检测试剂进货性能验证的探讨

林惠燕,孙爱农[△],郑晓兰,方育如

广东省中山市中心血站质管科,广东中山 528403

摘要:目的 通过使用已知水平的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)标准物质和 HBsAg 阳性标本验证 HBsAg 胶体金试剂(简称乙肝试纸条)性能,并作对比分析,以确定乙肝试纸条进货性能验证的最佳方法。方法 选用不同水平的 HBsAg 标准物质,分别验证不同厂家乙肝试纸条性能,观察 5、10、15、30 min 后试纸条的变化,同时使用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上述标准物质的 S/CO 值,挑选最合适的 HBsAg 阳性标本 40 份验证乙肝试纸条性能。结果 用 4 IU/mL 的标准物质验证试纸条性能时,5 min 后 90% 试纸条出现反应性结果,15 min 后全部试纸条出现反应性结果,另外通过倍比稀释方法,得出最低检出限为 2 IU/mL,不同厂家之间差异无统计学意义($P>0.05$);4 IU/mL 的标准物质通过 ELISA 得出相应的 S/CO 在 28.00 ± 2.00 ,而使用 S/CO 值 28.00 ± 2.00 的 HBsAg 阳性标本验证试纸条性能时,试纸条全部出现反应性结果。结论 4 IU/mL 的 HBsAg 标准物质或 ELISA 中 S/CO 在 28.00 ± 2.00 的 HBsAg 阳性标本,均能够作为乙肝试纸条进货性能验证的质控品,采用 HBsAg 标准物质作为阳性质控品,既没有职业暴露风险,又解决了 HBsAg 阳性标本反复冻融导致抗原活性下降的问题,是乙肝试纸条进货性能验证的最佳选择。

关键词:乙型肝炎病毒表面抗原; 胶体金试剂; 性能验证

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)10-1351-04

Exploration on verification of purchasing performance of HBsAg colloidal gold detection reagent

LIN Huiyan, SUN Ainong[△], ZHENG Xiaolan, FANG Yuru

Department of Quality Management, Zhongshan Municipal Central Blood Station, Zhongshan, Guangdong 528403, China

Abstract: Objective To verify the performance of HBsAg colloidal gold reagent (HB test strip) by using the known level of HBsAg standard material and HBsAg positive sample and to conduct the comparative analysis for determining the optimal method of HB test strip performance verification. **Methods** The different levels of HBsAg standard material were selected, and the performance of HB test strips produced by different manufacturers was verified. The changes of test strip after 5, 10, 15, 30 min were observed. The S/CO values of the above standard material were detected by using the ELISA method. Forty most suitable HBsAg positive samples were selected to verify the performance of HB test strip. **Results** In verifying the performance of test strip by 4 IU/mL standard material, 90% of the test strips appeared the reactive results after 5 min, and all test strips appeared the reactive results after 15 min, in addition, the lowest detection limit 2 IU/mL was obtained by the doubling dilution method. The difference among different manufacturers had no statistical significance; the corresponding S/CO value from 4 IU/mL standard material obtained by ELISA was 28.00 ± 2.00 , but when verifying the performance of test strip by using the HBsAg positive sample with the S/CO value 28.00 ± 2.00 , the test strips all appeared the reactive results. **Conclusion** 4 IU/mL HBsAg standard material or the HBsAg positive samples with S/CO value 28.00 ± 2.00 all can serve as the quality control material for purchasing performance verification of HB test strip. Adopting the HBsAg standard material as the positive control material neither has the occupational exposure risk, also resolves the problem of antigen activity decrease due to repeated freezing and thawing of HBsAg positive sample, which is the optimal selection of HB test strip purchasing performance verification.

Key words: hepatitis B virus surface antigen; colloidal gold reagent; performance verification

乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原(HBsAg)阳性是感染 HBV 的标志,是检查乙型肝炎血清标志物的重要指标之一。HBsAg 是 HBV 的外壳蛋白,它本身不

具有传染性,但它的出现常伴随 HBV 的存在^[1]。在感染 HBV 2~6 个月后,大部分人可在血清中测到 HBsAg 呈反应性(俗称“阳性”)。HBV 主要感染亚

洲人群^[2],且我国人群 HBV 感染率相对较高。在无偿献血体检时,首先 HBsAg 初筛检测合格才能进入献血环节,然而 HBV 的筛选仅限于 HBsAg 检测^[3],因此 HBsAg 胶体金试剂(简称乙肝试纸条)在初筛时显得尤为重要,它能够在献血前体检中有效检测出 HBsAg 阳性的献血者,并能有效控制因 HBsAg 阳性导致采集的血液报废,从而降低血液检测成本和采供血工作人员的职业暴露风险。试剂质量的好坏将影响到 HBsAg 初筛结果的可靠程度,按照《血站技术操作规程 2019 版》^[4]和 CNAS-CL39^[5]要求,即使试剂生产厂家提供了符合国家相关标准的说明书和质量检测合格报告,也要建立并执行试剂的质量抽检制度,对每次购进的试剂进行质量抽检,验证产品性能是否真实、有效,保证试验结果检测可靠。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 HBsAg 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂由英科新创(厦门)科技有限公司、珠海丽珠试剂股份有限公司提供;乙肝试纸条由英科新创(厦门)科技有限公司、北京万泰生物药业股份有限公司提供,定义厂家为 A 试剂、B 试剂(不分顺序);水平为 4、8、64 IU/mL 的 HBsAg 标准物质由北京康彻思坦生物技术有限公司提供;所有试剂均在有效期内使用。

1.1.2 标本来源 选取中山市中心血站 2018 年 6 月至 2019 年 6 月试验确证为 HBsAg 阳性献血者标本 40 份,试验确证为阴性的健康献血者标本 10 份,其中 40 份阳性标本献血者年龄 18~55 岁、中位年龄 34 岁,男 25 例(62.5%)、女 15 例(37.5%)。

1.1.3 阳性对照品 分离并留取经两个厂家 HB-sAg 的 ELISA 试剂检测均阳性的献血者血浆标本, -25°C 以下低温保存备用。

1.1.4 阴性对照品 留取经两个厂家 HBsAg 的 ELISA 试剂和 HBV DNA 检测均阴性的献血者血浆标本作为阴性对照,同时用来做液体移行速度检测。

1.1.5 全血标本 留取经两厂家 HBsAg 的 ELISA 试剂和 HBV DNA 检测均阴性献血者全血标本。

1.2 仪器与环境 检测仪器使用 Tecan RSP 全自动加样仪(瑞士帝肯)、ELISA 全自动加样仪(安图生物)、BEP III 全自动免疫分析仪(德国西门子)、Tecan Sunrise 日升酶标仪(瑞士帝肯)、HydroSpeed 洗板机

(瑞士帝肯)、iEMS 孵育振荡器(美国热电公司)、罗氏 COBAS S201 核酸检测分析仪(瑞士罗氏)、Thermo 单通道移液器 20~200 μL (美国赛默飞世尔)。在恒温实验室(室温 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 40%~60%)完成所有试验。

1.3 方法

1.3.1 乙肝试纸条的最低检出限和最佳检出限 厂家提供水平为 4、8、64 IU/mL 的 HBsAg 标准物质, 其中 1、2 IU/mL 是使用 4 IU/mL 的 HBsAg 标准物质加生理盐水倍比稀释所配制。分别测定上述两种不同厂家的乙肝试纸条, 按时间 5、10、15、30 min 观察试纸条的变化, 30 min 内能检测出最低结果定义为最低检出限, 15 min 内检测出全部结果定义为最佳检出限。

1.3.2 移行速度(时间)与血球阻断率检测 乙肝试纸条在加样后立即观察,加样后液体移行速度(阳性对照线显色时间)应 <3 min,乙肝试纸条的血球阻断率应合格(即本底应无明显变红)。

1.3.3 标准物质的 ELISA 评估

所有 HBsAg 标准物质均用 ELISA 检测,选择最佳 S/CO 值,以此为标准,从已知 HBsAg 阳性标本中挑选 S/CO 值相对应的标本。设置 20 份阳性标本与厂家最佳检出限水平标准物质进行对比检测。

1.3.4 最佳检测水平标本的乙肝试纸条检测 选择最佳检测水平(S/CO 值)献血者血浆标本,用不同厂家乙肝试纸条检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBsAg 标准物质乙肝试纸条检测情况 从检测时间来看,2 IU/mL 为 HBsAg 最低检测水平,A 试剂在 15 min 内能够检测出 8 例,最迟能在 30 min 内能检测出所有阳性结果;B 试剂在 15 min 内能够检测出 7 例,30 min 内能检测出 8 例。从结果上看,不同试剂之间差异不大。4 IU/mL 为 HBsAg 最佳检测水平,两家试剂均在 15 min 内检测出所有阳性结果。64 IU/mL 为高水平标准物质,两家试剂均在 5 min 内检测出所有阳性结果,均无后带现象导致的假阴性结果出现。结果见表 1。

表 1 HBsAg 标准物质乙肝试纸条检测情况[n(%)]

[illegible]

表 2 液体移行速度(时间)与血球阻断率

试剂	检测项目	血浆标本		标准物质		全血标本		试剂本底
		阴性(<i>n</i>)	检测时间(min)	阴性(<i>n</i>)	检测时间(min)	阴性(<i>n</i>)	检测时间(min)	
A 试剂	液体移行速度	5	<2	5	<2	5	<2	—
	血球阻断率	—	—	—	—	5	<3	合格
B 试剂	液体移行速度	5	<2	5	<2	5	<2	—
	血球阻断率	—	—	—	—	5	<3	合格

注：—为未检测。

2.2 液体移行速度(时间)与血球阻断率 选择 5 例阴性血浆和全血标本,分别用上述两个厂家乙肝试纸条检测,结果均合格,见表 2。

2.3 ELISA 检测 HBsAg 标准物质的最佳 S/CO 值选择 结果显示,不同水平的 HBsAg 标准物质,检测出不同的 S/CO 值,见表 3。在定性试验中,应该用接近临界值的标本对试纸条进行灵敏度评估。因此,根据表 1 结果,计算出 HBsAg 标准物质在最佳检测水平 4 IU/mL 时 ELISA 试剂 1、2 的最佳 S/CO 检测限(CV 均值±1s),分别是 28.45±2.13 和 29.08±2.18,综合考虑定出最佳 S/CO 值为 28.00±2.00。

表 3 ELISA 检测 HBsAg 标准物质的最佳 S/CO 值选择

水平 (IU/mL)	国产 ELISA 试剂 1		国产 ELISA 试剂 2	
	S/CO 均值	结果判断	S/CO 均值	结果判断
1	4.19	+	5.34	+
2	8.63	+	10.43	+
4	28.45	+	29.08	+
8	35.20 [△]	+	31.50 [△]	+
64	35.20 [△]	+	31.50 [△]	+

注：[△]表示该试剂盒检测结果 A 值≥3.0,均为强阳性。

2.4 献血者 HBsAg 两家 ELISA 阳性标本与标准物质用乙肝试纸条检测的结果 根据 ELISA 的 S/CO 结果,选择最佳检出限标本、强阳性标本及 4 IU/mL、64 IU/mL 水平的标准物质各 20 份,分别使用两家厂家乙肝试纸条检测,结果表明,最佳检出限标本和 4 IU/mL 的标准物质均能在 15 min 内被检出,强阳性标本和 64 IU/mL 的标准物质均能够在 5 min 内被检出,都没有出现后带(假阴性)现象。

2.5 开展乙肝试纸条性能验证前后 HBsAg 检测情况 开展乙肝试纸条性能验证前,2017 年无偿献血 47 461 例,HBsAg 阳性 292 例,阳性率 0.62%;开展乙肝试纸条性能验证后,2018 年无偿献血 48 889 例,HBsAg 阳性 241 例,阳性率 0.49%,2018 年 HBsAg 阳性率有了明显下降,差异有统计学意义($\chi^2=6.55$, $P<0.05$)。

3 讨论

HBsAg 胶体金检测法(又称金标法)检测 HB-

sAg 具有操作简单方便、检测快、结果易看并且可行单份标本检测等优点^[6],且保存方便。我国现阶段 HBsAg 胶体金检测为血站献血者采血前初筛的一项必要手段,因此试剂的质量好坏影响着检测结果的可靠程度,单位质管部门在新进试剂使用前就必须做好每一批试剂的抽检,检测合格发放质检合格报告;检测不合格,与厂家协商作退换货处理。

本次最低检出限水平(2 IU/mL)与国内外相关研究结果(2.0~2.5 IU/mL)^[7-8]相差不大,比厂家提供的合格报告的最低检测量 2.5 ng/mL(相当于 5 IU/mL)更低。2004 年,世界卫生组织将 HBsAg 标准物质的定值单位从 ng/mL 改成 IU/mL,换算公式 1 IU/mL≈0.5 ng/mL。4 IU/mL 标准物质从 HBsAg 胶体金检测结果上看,处于临界水平,能较好反映试纸条的灵敏度检测水平,在规定时间内能检测出所有结果。

本研究对这种检测方法使用不同厂家提供的试纸条检测后的数据进行分析,从表 1、3 可以看出,两个厂家不同水平的 HBsAg 标准物对比,30 min 内检测结果基本一致,在最低检测限 2 IU/mL 上,只能检测出个别结果,导致抽检结果不合格,建议不要使用该水平的标准物质作为进货检验标准。使用 HBsAg 最佳检出限标本进行验证,合格结果也能达到 100.0%。由此看来,阳性标本 S/CO 值在 28.00±2.00 也能较好验证出乙肝试纸条水平。高水平标准物质 64 IU/mL 和 HBsAg 强阳性标本,能在短时间检测出阳性结果。

乙肝试纸条渗透速度(即液体移行速度)的快慢对检测的结果会有影响,太快会造成假阴性,HBsAg-Ab1-Au 还没来得及与 Ab2 结合就超过了检测线^[9];太慢也会导致假阴性。高水平标准物质和强阳性标本中的 HBsAg 水平过高,远超过抗原抗体结合的最大适宜比例,沉淀反应也会不明显,就会出现后带现象^[10],即假阴性结果。因此,还要留意高水平(强阳性)质控品的结果。

开展 HBsAg 胶体金试剂性能验证后,对献血者标本进行 ELISA 检测仍检出少量的阳性标本,经分析原始数据,发现大多是弱阳性(S/CO 值<20)人群。2018 年采取该验证方法进行进货验收后,当地献血者

HBsAg 初筛后阳性率有了明显下降,在此期间曾出现一批乙肝试纸条因检测结果不达标而退回厂家,说明每批试剂开展进货检验是有必要的。

按照进货检验要求^[4-5],对于血源筛查的体外诊断试剂盒,必须要有国家食品药品监督管理部门批签发报告,其他检测试剂,以生产厂商出具的出厂检验报告为准。当需要留取 HBsAg 阳性标本时,建议选择 S/CO 值在 28.00±2.00 的阳性标本作为验证使用,阳性标本必须经过消毒灭活后装管冷冻保存,尽量降低检测人员职业暴露的风险。水平为 4 IU/mL 的 HBsAg 标准物质和 S/CO 在 28.00±2.00 的 HBsAg 阳性标本均能够作为乙肝试纸条进货性能验证使用。而使用 4 IU/mL 的 HBsAg 标准物质既没有职业暴露风险,又解决了 HBsAg 阳性标本在低温存储环境下反复冻融导致抗原活性下降的问题,是乙肝试纸条进货性能验证的最佳选择。

参考文献

[1] 史殿魁,魏明. 乙肝表面抗原检测中 ELISA 法和胶体金试纸条法应用分析[J]. 当代医学,2018,24(5):129-130.
[2] BARAZANI Y, HIATT J R, TONG M J, et al. Chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. World J Surg,2007,31(6):1245-1250.
[3] DREIER J, KROGER M, DIEKMANN J, et al. Low-level

viraemia of hepatitis B virus in an antiHBc antiHBs positive blood donor[J]. Transfus Med,2004,14(2):97-103.
[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 血站技术操作规程;国卫医函[2019]98 号附件[S]. 2019 版. 北京:中华人民共和国国家卫生健康委员会,2019:54.
[5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL39 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012.
[6] 周玲,吕定. 金标法检测乙肝表面抗原漏检原因分析[J]. 检验医学与临床,2014,11(17):2402-2403.
[7] 程颖,李维,田耘博,等. 无偿献血者乙肝表面抗原弱阳性标本不同检测方法结果比较[J]. 检验医学与临床,2015,12(16):2444-2446.
[8] 陈臣,张燕琳,裘晓阳. 乙肝表面抗原胶体金检测试剂卡性能验证研究[J]. 预防医学情报杂志,2018,34(6):759-762.
[9] TAKEDA K, MARUKI M, YAMAGAITO T, et al. Highly sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by use of a semiautomated immune complex transfer chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. J Clin Microbiol,2013,51(7):2238-2244.
[10] 张毓,孙国栋,徐晓艳,等. ELISA 法不同 S/CO 值与金标法检测无偿献血者 HBsAg 相关性研究[J]. 临床输血与检验,2016,18(6):559-561.

(收稿日期:2019-08-23 修回日期:2020-03-03)

(上接第 1350 页)

参考文献

[1] SOHRABI M, BEHZADIAN F, HOSSEINI S M, et al. Molecular analysis of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in renal transplant recipients with high viral load[J]. Arch Iran Med,2016,19(10):700-703.
[2] 夏长胜,张正. 人巨细胞病毒耐药突变及其检测的研究进展[J]. 中国实验诊断学,2010,14(5):776-780.
[3] 张美娜,赵虎,李仁哲,等. 新生儿巨细胞病毒感染的临床检测研究[J]. 检验医学与临床,2018,15(18):2812-2813.
[4] BARADHI K M, AURE R L, EL-AMM J M. High-dose valganciclovir treatment for resistant cytomegalovirus colitis due to UL97 and UL54 mutations [J]. Transplant Proc,2018,50(1):142-144.
[5] 曾爱红,董德坤,崔喜梅,等. 造血干细胞移植后巨细胞病毒药敏检测及 UL97 基因突变分析[J]. 南方医科大学学报,2014,34(4):519-522.
[6] MEESING A, RAZONABLE R R. Pharmacologic and immunologic management of cytomegalovirus infection after solid organ and hematopoietic stem cell transplantation [J]. Expert Rev Clin Pharmacol,2018,11(8):773-788.

[7] MONFORTE V, SINTES H, LOPEZ-GALLO C, et al. Risk factors, survival, and impact of prophylaxis length in cytomegalovirus-seropositive lung transplant recipients: a prospective, observational, multicenter study [J/OL]. Transpl Infect Dis, 2017, 19(3) [2019-10-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28294487>.
[8] BEAM E, GERMER J J, LAHR B, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in bronchoalveolar lavage fluid of immunocompromised patients with CMV pneumonia [J/OL]. Clin Transplant, 2018, 32(1) [2019-10-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/291122781>.
[9] CHOU S W, ERCOLANI R J, VANARS DALL A L. Differentiated levels of ganciclovir resistance conferred by mutations at codons 591 to 603 of the cytomegalovirus UL97 kinase gene[J]. J Clin Microbol,2017,55(7):2098-2104.
[10] ZHANG Y, ZHAO Z, SUN J B, et al. A new mutation in the human cytomegalovirus UL97 gene may confer ganciclovir resistance in Chinese kidney transplant recipient [J]. Arch Virol,2013,58(1):247-250.

(收稿日期:2019-10-07 修回日期:2020-03-05)