

脂奶粉含 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\kappa$ 酪蛋白,纤溶酶主要降解 $\alpha$ 、 $\beta$ 酪蛋白。因脱脂奶粉中仍含少量的脂质,这些脂质与酪蛋白形成微球,增强了酪蛋白的水溶性,加上酪蛋白本身的颜色从而使脱脂奶呈现出乳白色<sup>[9]</sup>。纤溶酶降解酪蛋白的同时破坏了微球结构使产物透光率增加,本实验研究表明纤溶酶活性高低与透光率增加呈现良好的线性关系。但制备的底物反应液稳定性稍差,实验中通过增加低溶点的琼脂糖后,提高了反应体系的稳定性,经检测批内、批间重复性均较好。

有研究表明新鲜乳汁本身含有少量的纤溶酶原,主要用于降解酪蛋白,有利于婴儿对酪蛋白的消化和吸收<sup>[10]</sup>,因此新鲜牛奶不宜用于本方法。而脱脂奶粉经过持续加热处理后所剩纤溶酶活性很低<sup>[11]</sup>,实验中通过80℃加热30分钟并加入琼脂糖后放置数小时透光率无明显改变,回收率达到90%,证实纤溶酶原已基本去除。当然,由于不同批次脱脂奶粉的脂质含量有差异,因此试剂制备因尽可能采用同批次的产品,同时测定时必须作好空白对照以减少系统误差。

总之,本实验尝试了一种简便可行的人血纤溶活性的测定方法,并进行了性能评价和临床样本分析。人血纤溶酶活性的测定对于疾病的诊断和溶栓治疗的药物监测都具有重要意义<sup>[12]</sup>。

## 参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:227-228.
- [2] Syrovets T, Simmet T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004, 61:873-885.
- [3] Laumonnier Y, Syrovets T, Burysek L, et al. Identification of the annexin A2 heterotetramer as a receptor for the plasmin-induced

## • 检验技术与方法 •

# 胶体金单克隆抗体法与匹拉米洞法检测粪便隐血的对比分析

黄丽<sup>1</sup>,时爱玲<sup>2</sup>,罗刚惠<sup>1</sup>

(1.解放军第三〇三医院检验科 广西南宁 530021;2.湖北省随州市军分区卫生所 441300)

**摘要:**目的 对胶体金单克隆抗体法与匹拉米洞法检测粪便隐血的分析性能进行评价。**方法** 分别采用两种方法对100例住院患者随机粪便标本和加入动物血、蔬菜汁等物质的粪便标本进行检测,同时测定稀释成系列浓度的红细胞悬液,以评价两种方法的灵敏度、抗干扰能力等。**结果** 胶体金单克隆抗体法的阳性率为34.0%,匹拉米洞法为57.0%, $P < 0.005$ ,差异具有统计学意义;对加入动物血和蔬菜汁的标本,胶体金法检测结果均为阴性,匹拉米洞法均为阳性;胶体金单克隆抗体法可检测到的最低Hb浓度为0.2 μg/mL,匹拉米洞法可检测到的Hb浓度不小于10 μg/mL。**结论** 胶体金单克隆抗体法的灵敏度、抗干扰能力均优于匹拉米洞法,为粪便隐血试验的首选方法。

**关键词:**粪便隐血试验; 胶体金单克隆抗体法; 匹拉米洞法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0348-02

粪便隐血试验(FOBT)是临床用于诊断和监测消化道出血性疾病的一项重要指标,对于早期发现和诊断消化道恶性肿瘤也具有重要意义。目前用于检测粪便隐血的方法主要有化学法和免疫法两大类,化学法干扰因素多,易受饮食(肉类、蔬菜、药物、铁剂等)、药物等的影响,而免疫法不受饮食的限制,而且快速、简单、准确,灵敏度和特异性较高。胶体金免疫法已被世界卫生组织和世界胃肠镜检查协会推荐作为粪便隐血试验的一种较为确认的方法<sup>[1]</sup>。本文选择化学法中的匹拉米洞法和胶体金单克隆抗体法的两种试剂进行性能比较,报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 (1)本院100例住院患者随机粪便标本;(2)已知

信号在人类外周单核细胞中的表达[J]. Blood, 2006, 107(20):3342-3349.

- [4] 孙东风,徐光,蔡旭,等.血浆纤维蛋白原活性发色底物测定法[J].上海医科大学学报,1997,24(1):52-53.
- [5] Astrup T, Müllertz S. Fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 40(2):346-351.
- [6] 金灿煌,范征,杜平中,等.人纤溶酶原活力的快速测定[J].中国医药工业杂志,1999,30(1):25-27.
- [7] Shi GY, Wu HL. Isolation and characterization of microplasminogen: A low molecular weight form of plasminogen[J]. J Bio Chem, 1988, 263(32):17071-17075.
- [8] Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography[J]. Science, 1970, 170(3962):1095-1096.
- [9] Ismail B, Nielsen SS. Invited review: Plasmin protease in milk; current knowledge and relevance to dairy industry[J]. J Dairy Sci, 2010, 93(11):4999-5009.
- [10] Eigel WN, Hofmann CJ, Chibber BA, et al. Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk[J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76(5):2244-2248.
- [11] Crudden A, Oliveira JC, Kelly AL. Kinetics of changes in plasmin activity and proteolysis on heating milk[J]. J Dairy Sci, 2005, 72(4):493-504.
- [12] Stief TW, Richter A, Bünder R, et al. Monitoring of Plasmin and Plasminogen Activator Activity in Blood of Patients under Fibrinolytic Treatment by Reteplase[J]. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis, 2006, 12(2):213-218.

(收稿日期:2012-10-05)

Hb浓度的抗凝全血1 mL;(3)5种动物血(猪、鸡、鸭、鱼、牛血)和新鲜绿色蔬菜汁。

**1.2 试剂** 胶体金单克隆抗体法采用英科新创(厦门)科技有限公司的检测试剂盒;匹拉米洞法采用珠海贝索生物技术有限公司的检测试剂盒。

**1.3 方法** 两种检测方法均严格按照各自的试剂盒说明书进行操作。

**1.3.1** 分别用两种方法对本院100例住院患者的粪便标本进行隐血对照实验。

**1.3.2 抗干扰能力检测** 取胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法检测结果均阴性的粪便标本用蒸馏水制成悬液,离心取上清

液,向其中分别加入 5 种动物血(猪、鸡、鸭、鱼、牛血)和新鲜绿色蔬菜汁,使溶液中各动物血的 Hb 浓度均不小于 500 μg/mL,用两种方法进行检测。

**1.3.3 最低检测限检测** 将已知 Hb 浓度的人抗凝全血用生理盐水稀释成浓度为 10 000、5 000、2 500、500、100、20、10、1.0、0.4、0.2、0.1 μg/mL 的红细胞悬液,用上述两种方法进行检测。

**1.3.4 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件中的  $\chi^2$  检验(Pearson Chi-Square)进行统计分析。

## 2 结 果

**2.1 胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法检测患者标本结果比较**,结果见表 1。

**2.2 胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法抗干扰能力比较**,结果见表 2。

**2.3 胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法最低检测限比较**,结果见表 3。

表 3 胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法最低检测限比较(μg/mL)

方法	Hb 浓度										
	0.1	0.2	0.4	1.0	10	20	100	500	2 500	5 000	10 000
胶体金法	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
匹拉米洞法	—	—	—	—	1+	1+	2+	3+	3+	4+	4+

“+”表示阳性,可检出;“—”表示阴性,未检出。

## 3 讨 论

粪便隐血试验作为一项传统常规检验项目,主要用于粪便中微量血红蛋白的检出,对消化道肿瘤和消化道溃疡等出血性疾病的早期发现和诊断具有重要价值。胃肠道出血可由多种疾病引起,美国癌症协会估计早期诊断和及时治疗的情况下,每年死于此类疾病的 2/3 患者可挽救。临床研究证实,粪便中带有的微量出血是早期结、直肠癌惟一可以查出的异常现象,所以对粪便中微量 Hb 的检出具有十分重要的意义,这就要求大便隐血试验必须具有高度的灵敏度及特异性<sup>[4]</sup>。

目前用于检测粪便隐血的化学法主要有邻甲苯胺法、还原酚酞法、匹拉米洞法等,其原理基本相同,都是基于 Hb 中的亚铁血红素有类似过氧化物酶活性,能催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为电子受体使色原氧化呈色,呈色的深浅与 Hb 含量呈正比<sup>[5]</sup>。由表 1 可看出,胶体金单克隆抗体法的阳性率为 34.0%,匹拉米洞法的阳性率达 57.0%, $P < 0.005$ ,差异具有统计学意义;而表 2 提示,匹拉米洞法对 5 种动物血和绿色蔬菜汁的抗干扰能力不及胶体金法。由此可知,匹拉米洞法易受饮食影响,可造成较高的假阳性率。主要原因是其检测的是过氧化物酶的活性,而粪便的成分较为复杂,在食用含血红蛋白的动物血(如鱼、肉、肝脏等)、含过氧化物酶的叶绿素新鲜蔬菜或使用铁剂、铋剂;服用引起胃肠道出血药物如阿司匹林、皮质固醇、非类固醇抗炎药及引起肠炎药物、秋水仙素、萝芙木碱中药等时,均可造成检测结果的假阳性;而服用大量维生素 C 或其他具还原作用药物则可造成假阴性。

胶体金单克隆抗体法采用特异性的抗原抗体反应及免疫层析分析技术,通过双抗体夹心法检测原理来定性检测人粪便标本中出现的人血红蛋白(Hb),检测结果不会因非甾体类消炎药物或维生素 C 等抗氧化剂及铁剂、动物血、辣椒过氧化物酶等干扰,假阳性率低,能够较真实地反映消化道出血与否。但在实验过程中,有 4 例标本胶体金法为阴性,而匹拉米洞法为强阳性结果,且患者明确诊断为消化道出血,粪便呈黑色或

表 1 胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法检测  
粪便隐血结果比较

匹拉米洞法	胶体金单克隆抗体法		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	29	28	57
阴性(-)	5	38	43
合计	34	66	100

$\chi^2$  检验  $P = 0.001$ ,两种检测方法具有显著性差异。

表 2 胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法抗干扰能力比较

方法	5 种动物血					蔬菜汁
	猪	鸡	鸭	鱼	牛	
胶体金法	—	—	—	—	—	—
匹拉米洞法	+	+	+	+	+	+

红褐色。将粪便悬液稀释后重新以胶体金法检测,其中 2 例为阳性,另外 2 例仍为阴性。这主要有两个原因造成的:(1)Hb 在肠道中停留过久,被各种消化酶和细菌降解,血红素消失或免疫原性被破坏;(2)出血量过多造成 Hb(抗原)过剩,形成后带现象,亦或是 Hb 抗原与单克隆抗体不匹配等。

消化道生理性出血一般为 0.6 mL/24 h,达到 2 mL/24 h 确认为病理性出血<sup>[6]</sup>。从表 3 可知,胶体金单克隆抗体法可检测到的最低 Hb 浓度为 0.2 μg/mL,而匹拉米洞法可检测到的 Hb 浓度则不小于 10 μg/mL,明显高于前者。由此可知,在消化道微量出血时,匹拉米洞法的检测灵敏度不及胶体金法,容易造成漏诊。虽然在出血量较多时匹拉米洞法可给予半定量的提示,且可避免抗原过剩出现后带反应造成的假阴性结果,但对于粪便隐血试验来说,能否及早提示是否存在消化道出血对医生和患者的意义更大。

综上所述,化学法检测粪便隐血具有简单、方便,半定量的特点,易于对出血程度的判断。但其受饮食影响较大,易致较高的假阳性结果,且其试剂不稳定,久置反应减弱,在判断消化道微量出血时易造成漏诊,使医生对检测结果难以判断。免疫法检测粪便隐血不易受饮食影响,具有快速、准确、灵敏度和特异性高的特点,但在消化道出血量较多时,可出现假阴性结果。因此,本文认为,对于粪便隐血检测,应以免疫法为主,化学法为辅,两者同时进行,以提高检测结果的准确性。

## 参考文献

- Young GP, St John DJ, Winawer SJ, et al. Choice of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. Recommendations based on performance characteristics in population studies. A WHO(World Health Organization) and OMED(World Organization for Digestive Endoscopy) report[J]. Am J gastroenterol, 2002, 97(10): 2499-2507.
- Lieberman DA, Weiss DG. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. One-time screening for colorectal

(下转第 357 页)

表 2 两种初筛试剂联合检测结果与确证  
结果比较( $n=24\,685$ )

初筛试剂	初筛阳性		初筛假阳性		灵敏度	与确证阳性 符合率(%)
	例数	百分比(%)	例数	百分比(%)		
丽珠+伯乐	14	0.06	1	0.00	100	92.86

### 3 讨 论

对一种试剂而言,特异性和灵敏度是基础。对于血站来说,应该选择特异性与灵敏度指标均好的 ELISA 试剂来筛查 HIV 抗体,特别是要重视筛查试剂的灵敏度,即尽可能检出所有的阳性标本。但特异性指标也不容忽视,因出现过多假阳性的结果而使血液报废或血源流失<sup>[1]</sup>。为了提高 HIV 抗体筛查的阳性符合率,我站从 2011 年 11 月起增加国产珠海丽珠试剂来筛查 HIV 抗体。本文结果显示,两种 ELISA 试剂的灵敏度均达到 100%,说明这两种试剂具有共同的检测能力,但进口伯乐试剂的初筛阳性率明显比国产珠海丽珠试剂高( $P<0.05$ ),假阳性率明显高于国产试剂( $P<0.05$ ),阳性符合率明显比国产试剂低( $P<0.05$ )。究其原因是两种试剂的原理不同,珠海丽珠试剂为第 3 代 HIV 抗体检测试剂,其采用的是双抗原夹心法,可同时检测 HIV(1+2 型)抗体;而法国伯乐试剂为第 4 代 HIV 抗原抗体联合试剂,其可同时检测 HIV(1+2 型)抗体及 P24 抗原,这就提高了试剂的敏感性,缩短了“窗口期”,减少急性感染期漏检。但由于抗原抗体同时包被在反应板上,存在相互干扰的可能,影响了试验的阳性符合率<sup>[2]</sup>。

从本文试验结果可知,两种初筛试剂均存在一定比例的假阳性,可能与下列因素有关:(1)ELISA 法检测抗体过程中可能存在其他抗体(如 RF、ASO、CRP、ANA 等)的干扰,或存在非特异性反应原发生非特异性吸附作用,导致假阳性出现。(2)样本溶血、血样交叉污染、红细胞内酶类物质的非特异性反应等也可导致假阳性反应。(3)某些厂家在研发生产试剂的过程中,有意识地提高试剂的敏感性,导致试剂本身敏感性过高而特异性降低造成假阳性<sup>[3]</sup>。(4)由于不同试剂厂家使用的抗原原料不同,而不同原料反应性可能存在一定差异,使其在灵敏

度、特异性上存在差异,从而造成检测结果不同<sup>[5]</sup>。(5)初筛试验采用 ELISA 方法,而确证试验采用 WB 法,其检测原理不同,因此两者结果也存在差异。从本文试验结果还可知,两种初筛试剂呈单项阳性与 WB 的阳性符合率为 0%,两种初筛试剂呈双阳性与 WB 的阳性符合率为 92.86%,与黎峰等<sup>[6]</sup>报告的 97.97% 接近,提示国产珠海丽珠第 3 代 ELISA HIV 试剂与法国伯乐第 4 代进口试剂联合应用,可提高阳性预测值。

抗-HIV 结果的假阳性,不但造成血液报废和血源流失,同时对献血者反馈检验结果也带来了困难。为避免漏检一个真阳性要求试验较敏感,为取得较低的假阳性率,要求试验提高特异性。因此,选择检测试剂的灵敏度和特异性显得极其重要。从本文结果可知进口 ELISA HIV 试剂初筛阳性率高,而国产 ELISA HIV 试剂有较高的阳性符合率,因此,两种试剂联合检测应用,可提高试剂敏感性,缩短“窗口期”,减少急性感染期漏检,而且双阳性结果可提高对 HIV 感染判断的准确率。

### 参考文献

- [1] 颜秀娟,邱昌文,梁进恒,等. 两种 ELISA 抗-HIV 试剂对无偿献血者 HIV 初筛和确证结果的影响[J]. 广西医学, 2011, 33(3): 370-372.
- [2] 白浪,雷秉钧. HIV/AIDS 实验室检测及其研究进展[J]. 中国循证医学杂志, 2008, 62(3): 206-209.
- [3] 温涛,赵君,张淑琴. 加样引起酶标板拖带及标本污染探讨[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(1): 72-73.
- [4] 符鹏,王召乾,胡玉銮,等. 2004~2006 年海南省 HIV 初筛阳性标本的复检及确认情况分析[J]. 中国热带医学, 2007, 7(8): 1407-1408.
- [5] 郭红玉. 抗-HIV 初筛与确证实验结果分析[J]. 临床输血与检验, 2011, 13(3): 265.
- [6] 黎峰,刘伟,梁富雄,等. 2 472 例 HIV 抗体筛查(ELISA)与免疫印迹试验的比对研究[J]. 应用预防医学, 2009, 15(5): 302-304.

(收稿日期:2012-11-09)

(上接第 349 页)

- cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon[J]. N Engl J Med, 2001, 345(8): 555-560.
- [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 310-311.
- [4] 李倩男,滕宗莉. 3 种粪便隐血试剂检测性能的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1116.
- [5] 周湘红,安邦权,王伟,等. 两种隐血试纸检测结果对比分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(11): 1090-1091.
- [6] 吴鹏,李艳,陈进,等. 联合免疫法和化学法检测粪便隐血的临床

应用评价[J]. 检验医学, 2010, 25(3): 176-178.

- [7] 刘亮,周清. 化学试剂带法与单克隆金标法测定粪便隐血试验的评价[J]. 当代医学, 2010, 16(20): 48-49.
- [8] 余悦能. 帕拉米洞化学法和双联试纸条法检测粪便隐血方法学评价[J]. 检验医学, 2009, 24(3): 232-234.
- [9] 陈伟红. 关于联合免疫法和化学法检测粪便隐血的临床应用研究[J]. 中国医药指南, 2011, 9(30): 30-31.

(收稿日期:2012-10-09)