

# 模拟消化道出血时大便潜血试验金标法的研究

周 强<sup>1</sup>, 王忠英<sup>1</sup>, 谢彩修<sup>2</sup>, 杨 静<sup>1</sup>, 周 芸<sup>1</sup> (1. 广东省广州医学院第二附属医院检验科 510260; 2. 广州医学院医学检验系 2005 级)

**【摘要】 目的** 探讨低浓度血红蛋白(Hb)液被生理浓度的酸、胃蛋白酶和胰蛋白酶破坏和消化作用后金标法大便潜血试验的情况。**方法** (1)配制一定浓度梯度的血红蛋白液,用艾康生物技术有限公司提供的金标法大便 OB 试纸条验证其灵敏度。(2)配制一定浓度梯度的血红蛋白液,分别与生理浓度的酸、胃蛋白酶和胰蛋白酶孵育不同时间后,用金标法大便 OB 试纸条检测。**结果** (1)本试验的金标法 OB 试纸条的灵敏度为 0.1 μg/mL。(2)不同浓度的低浓度的血红蛋白液在孵育 30 min 后基本上全部被胃蛋白酶消化,在孵育 1.5 h 后基本上全部被胰蛋白酶消化。(3)生理浓度范围内的不同浓度的胰蛋白酶对同一低浓度的血红蛋白液的消化时间基本上一致,且经不同浓度的胰蛋白酶消化后,金标法潜血试验结果的阳性程度呈渐降过程,最后阴性。**结论** (1)本试验所用的艾康生物技术有限公司的金标法大便 OB 试纸条的灵敏度为 0.1 μg/mL。(2)在模拟消化道出血,特别是少量出血时,不同浓度的低浓度血红蛋白液在经酸、胃蛋白酶和胰蛋白酶破坏和消化降解后可能导致金标法大便潜血试验假阴性。

**【关键词】** 金标法; 消化道出血; 潜血试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.24.001

中图分类号:R446.13

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)24-2689-03

**Research on colloidal gold method of fecal occult blood testing in simulating gastrointestinal hemorrhage** ZHOU Qiang<sup>1</sup>, WANG Zhong-Ying<sup>1</sup>, XIE Cai-xiu<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>2</sup>, ZHOU Yun<sup>1</sup>. 1. Center of Medical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510260, China; 2. Department of Medical Examination, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510182, China

**【Abstract】 Objective** To study the result of colloidal gold method(GM) of fecal occult blood testing with hypo-concentrations of Hb which was digested by physiological concentration of acid, pepsin and trypsin. **Methods** (1) To prepare the certain concentration gradient of Hb, test and confirm the sensitivity of colloidal gold OB test strips. (2) The certain concentration gradient of Hb was mixed with physiological concentration of acid, pepsin and trypsin respectively, tested with colloidal gold of OB test strips after incubation at different times. **Results** (1) The sensitivity of colloidal gold of OB test strips was 0.1 μg/mL. (2) After incubated, different concentrations of Hb were digested fully by pepsin at 30 min and by trypsin at 1.5h. (3) The physiological concentration range of different concentrations of trypsin had the same time on digesting the same level of hypo-concentrations of Hb and the result of the positive extent was decreasing gradually and was negative finally. **Conclusion** (1) The sensitivity of colloidal gold of OB test strips produced by Aicon Bio-Technology Co. is 0.1 μg/mL. (2) The different concentrations of hypo-concentrations Hb are digested out respectively by the physiological concentration range of acid, pepsin and trypsin in imulating gastrointestinal hemorrhage, which causes the test result of colloidal gold method of fecal occult blood testing negative.

**【Key words】** colloidal gold method; gastrointestinal hemorrhage; occult blood tests

潜血试验(occult blood tests, OB),是消化道隐性出血、慢性胃肠道出血及恶性肿瘤早期诊断的常用筛选指标,免疫金标法由于灵敏度高、特异性强、操作简便快速而逐渐被广泛地接受和应用<sup>[1]</sup>。健康人胃液中含有一定浓度的酸和胃蛋白酶,十二指肠胰液中含有一定浓度的胰蛋白酶,理论上胃酸对红细胞或 Hb 有破坏作用,胃蛋白酶和胰蛋白酶对红细胞和 Hb 有降解作用。为了探讨消化道少量出血时,胃液的酸、胃蛋白酶和十二指肠胰液中的胰蛋白酶对低浓度 Hb 的破坏、消化后的金标法大便潜血试验情况,也为了证实消化道少量出血时金标法大便潜血试验的假阴性的真实性,作者设计了相关的体外试验,模拟体内胃少量出血、肠道少量出血时,探讨生理浓度的

酸、胃蛋白酶与胰蛋白酶对低浓度血红蛋白破坏或消化后的金标法大便潜血试验的情况,现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 金标法大便 OB 试条** 由艾康生物技术杭州有限公司提供,试纸条批号为 200906347,试剂有效期为 2011-05-04。

**1.1.2 胃蛋白酶干粉** 由 Sigma 提供,有效期为 2011-12。

**1.1.3 胰蛋白酶原液** 由 BIOLOGICAL INDUSTRIES 公司提供,试剂批号为 821719,有效期为 2009-11。

**1.1.4 自行制备血红蛋白液** 8 g/L。

**1.1.5 HCl 标准滴定液** 配制日期为 2009-09-19,有效期为 2

个月,浓度为 1.010 mol/L。

**1.1.6 NaOH 标准滴定液** 配制日期为 2009-09-11,有效期为 2 个月,浓度为 1.017 mol/L。

**1.1.7 pH 精密试纸** 由上海三爱思试剂有限公司提供,批号为 20081015,有效期为 2010-11-15。

**1.1.8 Sysmex XE-2100 全血细胞分析仪** EPK 稀释液的批号为 G9403,有效日期为 2011-03-03;SLS 溶血液的批号为 A9016,有效日期为 2010-07-07。

**1.2 方法**

**1.2.1 检测本试验 OB 试纸条的灵敏度** 配制浓度为 0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025 μg/mL 的 Hb 液,用 OB 试纸条检测,5 min 后记录试验结果。每个浓度平衡检测 5 次。

**1.2.2 探讨生理浓度的酸对低浓度血红蛋白的破坏作用** (1)配制浓度为 0.4、0.3、0.2、0.1 μg/mL 的 Hb 液各 10 mL,分别加入浓度为 1.010 mol/L 的 HCl 400 μL,将 pH 调到 0.9~1.5 内,用 OB 试纸条检测,5 min 后记录试验结果,每个浓度平衡检测 5 次。(2)配制浓度为 0.4、0.3、0.2、0.1 μg/mL 的 Hb 液各 10 mL,分别加入浓度为 1.010 mol/L 的 HCl 400 μL,将 pH 调到 0.9~1.5 内,然后用 NaOH 将 pH 调到中性,再用 OB 试纸条检测,5 min 后记录试验结果,每个浓度平衡检测 5 次。

**1.2.3 探讨生理浓度的胃蛋白酶对低浓度血红蛋白的消化作用** 配制浓度为 0.4、0.3、0.2、0.1 μg/mL 的 Hb 液各 5 mL,然后分别加入浓度为 100 U/mL 的胃蛋白酶 5 mL,置于 37 °C 恒温箱,每隔 0.5、1 h 用 OB 检测条检测,5 min 后记录试验结果,每个浓度平衡检测 5 次。

**1.2.4 探讨生理浓度的胰蛋白酶对低浓度血红蛋白的消化作用** 配制浓度为 0.4、0.3、0.2、0.1 μg/mL 的 Hb 液各 5 mL,分别加入浓度分别为 500、1 000 μg/mL 的胰蛋白酶 5 mL,然后加入浓度为 1.017 mol/L 的 NaOH 5 μL,将 pH 调到 7.0~8.0 内,置于 37 °C 恒温箱,每隔 0.5、1、1.5 h,用 OB 检测条检测,观察其反应情况,每个浓度平衡检测 5 次。

**2 结 果**

本文模拟体内少量出血时,生理浓度的酸、胃蛋白酶和胰蛋白酶对低浓度 Hb 消化作用,实验结果如下所述。

**2.1 验证本试验所用的艾康生物技术有限公司 OB 试纸条灵敏度**,其结果为 0.1 μg/mL,见表 1。

**表 1 验证本实验所用的金标法试纸条的灵敏度结果**

| 编号        | 1   | 2   | 3   | 4   | 5    | 6     |
|-----------|-----|-----|-----|-----|------|-------|
| Hb(μg/mL) | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.05 | 0.025 |
| OB 试验结果   | +++ | ++  | +   | ±   | -    | -     |

注:“+++”表示阳性结果,且 OB 试纸条的检测线与质控线颜色一样深;“++”表示阳性结果,但 OB 试纸条的检测线比质控线略浅;“+”表示阳性结果,但检测线明显要比质控线浅很多,但又比弱阳性深;“±”表示弱阳性;“-”表示阴性。

**2.2 生理浓度的酸对血红蛋白的影响** 见表 2。

**2.3 不同浓度的血红蛋白液与生理浓度的胃蛋白酶(pH 为 4.5~5.0)孵育不同时间后的潜血试验结果** 见表 3。

**2.4 不同浓度的血红蛋白液与不同浓度的胰蛋白酶(pH 为**

**7.0~8.0)孵育不同时间后的潜血试验结果** 见表 4。

**表 2 生理浓度的酸对血红蛋白(μg/mL)的影响结果**

| 项目                    | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|
| Hb 原液+蒸馏水(对照)         | +++ | ++  | +   | ±   |
| Hb+ HCl(pH0.9~1.5)    | -   | -   | -   | -   |
| Hb+ HCl+ NaOH(pH 为中性) | -   | -   | -   | -   |

注:同表 1。

**表 3 生理浓度的胃蛋白酶对血红蛋白液(μg/mL)的影响结果**

| 项目                        | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Hb 原液+蒸馏水(对照)             | +++ | ++  | +   | ±   |
| Hb+100 U/mL 胃蛋白酶 孵育前      | +++ | ++  | +   | ±   |
| Hb+100 U/mL 胃蛋白酶 孵育 0.5 h | ±   | -   | -   | -   |
| Hb+100 U/mL 胃蛋白酶 孵育 1 h   | -   | -   | -   | -   |

注:同表 1。

**表 4 不同浓度的胰蛋白酶对血红蛋白液(μg/mL)的消化的影响**

| 项目                           | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Hb 原液+蒸馏水(对照)                | +++ | ++  | +   | ±   |
| Hb+500 μg/mL 胰蛋白酶 孵育前        | +++ | ++  | +   | ±   |
| Hb+500 μg/mL 胰蛋白酶 孵育 0.5 h   | ±   | ±   | ±   | -   |
| Hb+500 μg/mL 胰蛋白酶 孵育 1 h     | ±   | ±   | -   | -   |
| Hb+500 μg/mL 胰蛋白酶 孵育 1.5 h   | -   | -   | -   | -   |
| Hb+1 000 μg/mL 胰蛋白酶 孵育前      | +++ | ++  | +   | ±   |
| Hb+1 000 μg/mL 胰蛋白酶 孵育 0.5 h | ±   | ±   | ±   | -   |
| Hb+1 000 μg/mL 胰蛋白酶 孵育 1 h   | ±   | -   | -   | -   |
| Hb+1 000 μg/mL 胰蛋白酶 孵育 1.5 h | -   | -   | -   | -   |

注:同表 1。

**3 讨 论**

**3.1 本试验所用的艾康生物技术有限公司金标法大便 OB 试纸条灵敏度验证** 根据艾康生物技术有限公司提供的金标法大便 OB 试纸条灵敏度参考值(0.05 μg/mL),设计浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 μg/mL 的 Hb 液,按照其说明书操作,用金标法大便 OB 试纸条检测,结果见表 1。本文发现当浓度在 0.1 μg/mL 时,检测结果出现弱阳性,大于 0.1 μg/mL 的其他 4 个浓度结果都是阳性,小于 0.1 μg/mL 的其他 2 个浓度检测结果都是阴性。因此,本试验所用的艾康生物技术有限公司的金标法大便 OB 试纸条的实际灵敏度为 0.1 μg/mL,与文献报道相一致<sup>[2]</sup>。为了探讨体内少量出血时,金标法检测大便 OB 结果的真实性和准确性,以本试验所用的 OB 试纸条实际所测的灵敏度为基准,配制浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 μg/mL 的低浓度 Hb 液,代表体内少量出血时胃肠道内的 Hb 浓度。

**3.2 模拟上消化道少量出血时,生理浓度的胃酸(pH 为 0.9~1.5)和胃蛋白酶(pH 为 4.5~5.0)对低浓度 Hb 的影响。**

**3.2.1 生理浓度的胃酸对 Hb 影响** 通常所说的胃酸即指盐酸,是由胃壁细胞分泌。正常胃液的 pH 值为 0.9~1.5<sup>[3]</sup>。

在临床上常用胶体金法检测胃液及呕吐物的潜血,常常会出现假阴性<sup>[3]</sup>,这可能与胃液及呕吐物中都含有盐酸,并且对低浓度的血红蛋白液的消化有关。于是,用盐酸来代替胃酸,设计相关试验来验证此设想。试验结果见表 2,只加盐酸的试验组(pH 0.9~1.5)的各个浓度的 Hb 液用胶体金 OB 试纸条检测,试验结果全为阴性,考虑到可能因为盐酸为酸性物质,对于抗原抗体的结合可能有一定的影响,将表中只加盐酸的各管各取出一部分加入适量 NaOH,调整各管至中性(用 pH 计检测),再用胶体金 OB 试纸条检测,结果不发生改变。调整了 pH 值后结果仍与没有调整 pH 值前的结果相同,说明不是 pH 过低影响了抗原抗体的结合,而是盐酸破坏了 Hb 的抗原结构造成了假阴性,这种破坏是不可逆性的。因此,本试验可以说明,当上消化道少量出血时,胃酸对 Hb 的破坏是导致金标法检测大便潜血试验假阴性的重要原因之一。

**3.2.2 生理浓度的胃蛋白酶(pH 4.5~5.0)对低浓度 Hb 的影响** 正常胃液中的酶以胃蛋白酶原为主,是由主细胞分泌的,在 pH<5 的酸性环境中可转化为胃蛋白酶,其浓度为 40~60 U/mL。根据胃蛋白酶的生理浓度,设计浓度为 50 U/mL, pH 4.5~5.0 的胃蛋白酶液与不同浓度 Hb 液混合,探讨其消化情况。在表 3 中,各浓度的 Hb 液与不同浓度的胃蛋白酶液混合后,在孵育前立即用胶体金 OB 试纸条检测,其试验结果同对照组一样,都是阳性,说明在 Hb 在孵育前还没有被胃蛋白酶消化,将上述各个管置于恒温箱分别孵育 30 min、1 h,再检测,原来阳性程度为“+++”的 0.4 μg/mL 的 Hb 混合液在孵育 30 min 后变成了弱阳性,1 h 后全部变成阴性,其余 3 个较低浓度的 Hb 混合液在孵育 30 min 后试验结果全都变成阴性,且其消化过程是呈一个渐降过程,与相关文献报道相一致<sup>[4]</sup>。因此,从本试验结果可以证实,胃液中的胃蛋白酶对 Hb 具有消化作用,并且有可能是导致金标法检测大便 OB 试验结果假阴性的又一重要原因之一。

**3.3 模拟上消化道少量出血时生理浓度的胰蛋白酶(pH 7.0~8.0)对 Hb 影响** 正常的十二指肠液中含有多种消化酶,其中以胰蛋白酶的含量最多,其浓度为 150~600 μg/mL,最适宜的 pH 为 8.0。因此,本试验设计浓度为 100 μg/mL 和 500 μg/mL, pH 7.0~8.0 的胃蛋白酶液与 Hb 液混合,探讨其消化情况。试验结果见表 4,对照组的胶体金 OB 试验结果同表 2 的对照组一样。在试验组中,各浓度的 Hb 液与不同浓度的胰蛋白酶液混合后,其消化过程同胃蛋白酶一样,也是呈一个渐降过程,且不同浓度的胰蛋白酶对同一浓度的血红蛋白液的消化时间是一致的,都是在 1.5 h 内完全消化完。因此,说明在体外试验中,生理浓度的胰蛋白酶对血红蛋白具有消化作用,而且对低浓度的血红蛋白液在 1.5 h 内基本上消化完。从本试验结果可以证实,胰蛋白酶对 Hb 具有一定的降解作用,这种降解作用可能是导致金标法检测下消化道少量出血时金标法大便潜血试验结果假阴性的重要原因之一。

综上所述,通过本文的模拟试验证实,当消化道出血,特别是少量出血时,胃液酸的破坏作用和消化道酶的消化作用是导致金标法大便 OB 试验假阴性结果的主要原因。而健康人胃每 2 h 排空一次,十二指肠每 12 h 排空一次。因此,临床上的隐性出血、慢性胃肠道出血及恶性肿瘤的少量出血,血红蛋白停留在体内的时间过长(远远大于 1.5 h),其一方面受到胃酸的破坏作用,另一个面受到胃蛋白酶或胰蛋白酶的消化作用,最终有可能导致假阴性结果,说明金标法检测大便 OB 试验结果为阴性时,并不代表体内没有出血。

目前,临床上经常出现的一种情况就是许多检验者为了避免不必要的医疗纠纷,对于弱阳性或极弱的阳性结果有些检验人员不报,结果造成许多隐匿性消化道出血的患者漏诊,为临床诊断和鉴别诊断带来了一定的困扰;或者检验人员即便报了,临床医生也不给予足够的重视。因此,根据试验研究结果,在临床上遇到的金标法检测的大便潜血试验的弱阳性结果,甚至极弱阳性结果都应报阳性,同时应积极与临床沟通,建议临床医生对于金标法检测的大便潜血试验弱阳性或极弱的阳性结果应给予足够重视。

但是,另一方面也要考虑到,正是由于免疫学方法的高度敏感性,同时又由于有正常的生理性出血,在某些健康人特别是服用刺激胃肠道的药物后可造成假阳性,停药后可恢复正常。另外,不是所有肠癌都每天出血,只有溃疡性癌肿才会持续出血<sup>[5]</sup>。故特别疑有大肠癌或隐匿性消化道出血的患者应连续取粪便标本 3 次<sup>[6]</sup>追踪做潜血试验,结果才会更加可靠。

#### 参考文献

- [1] 桔红,张玲玲,林伟.金标法测便类潜血中的后带现象[J].实用医技杂志,2004,1(4):402-403.
- [2] 钱迎芬,肖兴元,徐礼杰,等.两种粪便潜血实验方法的对比观察和评价[J].兰州大学学报:医学版,2007,33,(2):145-146.
- [3] 吴乾虎.胃液潜血与临床[J].标记免疫分析与临床,2005,12(1):52-53.
- [4] 成军,孙长贵,李早荣,等.免疫法大便潜血试验用于上消化道出血性疾病的诊断应慎重[C].2004 第二届世界华人临床生化和检验医学大会第六届全国检验医学学术会议论文汇编,2004:46.
- [5] Lieberman DA. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing[J]. N Engl J Med,2001,345(8):555-561.
- [6] 潘国宗,张秀兰.如何减少大肠癌的误诊[J].中华内科杂志,1998,7(37):459-460.

(收稿日期:2010-06-24)