

基于 EP-17A2 的胶体金法检测 粪便隐血的空白限、检出限及定量限的建立及评价*

郭绪晓, 柏淑美, 张春来, 袁长金, 李金星 (山东中医药大学附属医院检验科, 济南 250011)

摘要:目的 参考美国临床实验室标准化委员会(CLSI)发布的《临床实验室检验程序检测能力评价指南(第二版)》(EP-17A2)文件, 探讨粪便隐血(FOB)胶体金法检测能力, 建立该实验室的空白限(LOB)、检出限(LOD)及定量限(LOQ), 减少弱阳性标本漏检率, 并为胶体金法的检测限提供定量评价方法。**方法** 使用人游离血红蛋白(f-Hb)ELISA 试剂盒检测新鲜全血制备的系列低浓度的血红蛋白溶液, 制定校准曲线, 将粪便隐血的空白样本及一系列的血红蛋白低浓度样本使用胶体金试纸条进行检测, 利用 Nato Checker710 对显色带进行定量检测, 并对定量结果进行统计分析, 建立胶体金法检测粪便隐血的空白限、检出限及定量限。**结果** 空白限为 99.01 ng/ml, 检出限为 340.48 ng/ml, 定量限为 354.9 ng/ml。**结论** 参考 CLSI EP17-A2 文件建立的检测限比常规方法建立的检测限科学合理, 优于肉眼判断结果, 更能满足临床实验室的质量要求和临床早期诊疗的需求; 为提高实验室质量管理水平, 每批次粪便隐血应根据此方法建立检测限, 以及应用于其它项目胶体金法检出限的建立。

关键词: 胶体金法; 粪便隐血; 空白限; 检出限; 定量限

中图分类号: R446.133 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)01-078-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.021

Establishment and Evaluation of Blank Limit, Detection Limit and Quantitation Limit of Fecal Occult Blood Tests with Colloidal Gold Method Based on the Document of EP-17A2

GUO Xu-xiao, BAI Shu-mei, ZHANG Chun-lai, YUAN Chang-jin, LI Jin-xing

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Shandong
Traditional Medical University, Jinan 250011, China)

Abstract: **Objective** To explore colloidal gold method used to detect fecal occult blood tests(FOB) detection capability and establish the laboratory standard operation of detecting FOB limit of blank(LOB), limit of detection (LOD) and quantification limit (LOQ) according to the CLSI document 《Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition》(EP17-A2), in order to reduce the false negative rate of the weakly positive samples, and to provide a way of quantitative detection for qualitative detection of colloidal gold method. **Methods** Detected series of solution of hemoglobin made of dissolved fresh whole blood with the ELISA kit of human free hemoglobin, and established the standard curve of detection of FOB with colloidal gold method. Detected the blank samples and a series of low concentration samples with the colloidal gold test strip of FOB and measured the color bands by the Nato Checker710. The quantitative results obtained were statistically analysed by SPSS 19.0 and calculated blank limit, detection limit and quantification limit. **Results** The LOB, LOD and LOD were 99.01, 340.48 and 354.9 ng/ml according to the methods in CLSI EP17-A2 document. **Conclusion** The detection limits established by CLSI EP17-A2 document was more scientific in judgement positive or negative to FOB than which used naked eye and can meet the clinical laboratory and clinical doctor requirement better. Clinical laboratories should be strictly in detection limits of reagents in order to ensure their effectiveness, and should be generally to other tests based on colloidal gold method.

Keywords: colloidal gold method; fecal occult blood tests(FOB); limit of blank(LOB); limit of detection(LOD); limit of quantitation(LOQ)

粪便隐血试验(fecal occult blood tests, FOB)对消化道隐性出血、慢性胃肠道出血及结直肠癌恶性肿瘤早期诊断具有重要的鉴别和筛检价值^[1], 是早期诊断消化道恶性肿瘤尤其是直肠肿瘤的有效实验室诊断方法^[2]。检测粪便潜血, 目前临床实验室

广泛使用的检测方法是基于人血红蛋白单克隆抗体标记技术的免疫金标法, 其灵敏度高、特异性强、操作简便、快速等优点逐步替代了化学法。鉴于肉眼判读结果的主观性和粪沉渣工作站的面世, 以及临床诊疗对于检测结果的准确性要求, 我们逐步探

* 作者简介: 郭绪晓(1977—), 男, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为定量定性检测项目的性能评价和质量控制, Tel: 13793188381, E-mail: guoxuxiao180@163.com.
通讯作者: 柏淑美, Tel: 0531-68616500。

索用数值来判读金标法检测 FOB 的定性结果,尤其是探讨金标法检测限,避免弱阳性标本漏检。参考美国临床实验室标准化委员会(CISI)发布的《临床实验室检验程序检测能力评价指南》(第二版)(EP17-A2)^[3]文件对检测粪便隐血胶体金法试剂性能进行了初步评价,并建立本实验室方法学性能参数-空白限(LOB)、检出限(LOD)及定量限(LOQ)。

1 材料与方法

1.1 检测试剂和设备

1.1.1 粪便隐血检测试剂:万华普曼生物工程有限公司粪便隐血检测金标试纸条(批号:13080107;有效期:20150829)。

1.1.2 人游离血红蛋白(f-Hb)ELISA 检测试剂盒:上海信裕生物科技有限公司提供。

1.1.3 溶血剂:日本 Sysmex 公司提供,适用于 Sysmex XT2000 全血细胞分析仪(批号:A3025;有效期:20140902)。

1.1.4 Nato Checker710 定量分析系统:美国 Nano-Ditech 公司生产。

1.1.5 安图 PHOMO 全自动酶标仪:安图实验仪器(郑州)有限公司生产。

1.2 检测标本的制备

1.2.1 空白样本制备:试剂盒附带的标本稀释液,共 12 个空白标本。

1.2.2 低浓度血红蛋白样本的制备:取 Sysmex XT2000Hb 检测的新鲜全血标本,用 Sysmex 公司配套的溶血剂按 1:1 的比例机外溶血,再用 FOB 试剂盒配套的稀释液调配低浓度 Hb 溶液,使用人游离血红蛋白(f-Hb)ELISA 试剂盒检测,选取浓度在空白限 1~4 倍的标本 5 个,其浓度分别为

82.3,176.5,287.1,354.9 和 436.1 ng/ml。

1.2.3 样本保存:将配制好的系列低浓度样本分装于 EP 管中,-20℃冰冻保存。测定时放置室温待完全溶解后摇匀检测。

1.3 检测方法

1.3.1 建立标准曲线:使用上海信裕生物科技有限公司人游离血红蛋白(f-Hb)ELISA 检测试剂盒提供的 400,200,100,50 和 25 ng/ml 等系列浓度标准品溶液,每个浓度分别在 Nato Checker710 上检测 3 次,记录并计算平均吸光度(A),应用安图公司 AUTOsoft V2.5.5 软件,采用四参数拟合方式拟合标准曲线,其公式为 $Y=(a-d)/[1+(X/c)^b]+d$ (式中 $X=A$, $a=4.421$, $b=-8.158$, $c=2.831$, $d=0.229$)。

1.3.2 每日检测 12 个空白样本 1 次,连续测定 5 天,记录吸光度(A)值,共计 60 个检测数据,通过标准曲线计算出相对应的浓度。

1.3.3 检测 5 个制备的系列低浓度血红蛋白样本每天检测 1 次,连续检测 12 天。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,检测结果呈非正态分布,采用百分位数进行统计描述。

2 结果

2.1 空白限(LOB) 连续 5 天检测 12 个空白标本(分别用 S1,S2... 表示),根据 1.3.1 标准曲线方程计算获得 60 个检测数据,见表 1。经正态性检验,结果呈正态分布,其均值 $\bar{x}_{\text{空白}}=81.21$,标准差 $s_{\text{空白}}=8.90$,根据 CLSI EP17-A2 文件,空白标本单次检测结果有 95% 的概率在区间 $[\bar{x}_{\text{空白}} \pm 2s_{\text{空白}}]$ 故得出 $LOB=\bar{x}_{\text{空白}}+2s_{\text{空白}}=99.01$ ng/ml。

2.2 检出限(LOD) 连续 12 天检测 5 个低浓度

表 1 不同批次空白标本测定结果(ng/ml)

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
第 1 天	80.94	85.2	63.72	87.33	95.14	60.17	70.23	77.39	90.17	75.97	69.58	83.78
第 2 天	72.36	72.95	69.58	78.1	85.2	72.89	92.3	88.75	88.04	89.46	75.97	88.75
第 3 天	63.07	75.97	70.29	75.26	83.78	85.2	83.78	85.91	90.88	92.3	88.04	91.59
第 4 天	92.3	81.65	88.04	84.37	90.17	95.14	81.65	87.33	68.01	62.42	81.65	92.3
第 5 天	85.91	79.52	85.2	93.24	69.98	77.27	73.84	85.2	76.68	78.1	77.39	85.2

标本,获得 60 个检测数据(见表 2),经方差齐性检验呈非正态分布,使用非参数程序估计 LOD,即 $LOD=LOB+D_{sp}$, D_{sp} 是低浓度样本测定值中位数(M)和低浓度标本的第 5 个百分数值的间距,低浓度标本 $M=307.25$,第 5 个百分数值=65.78, $D_{sp}=307.25-65.78=241.47$,故 $LOD=99.01+241.47=340.48$ ng/ml。

2.3 定量限(LOQ) 本实验室依据临床要求设定金标法检测粪便隐血质量要求为总误差为 20%,总误差的估计值(TE)=偏倚+2×变异系数(CV)。FOB 度在 354.9 ng/ml 时检测的日间变异为 7.59%,偏倚为 1.11%,总误差小于 20%,符合质量目标的要求,所以胶体金法检测粪便隐血 $LOQ=354.9$ ng/ml,见表 3。

表 2 不同批次低浓度系列标本测定结果

批次	低浓度标本(ng/ml)				
	82.3	176.5	287.1	354.9	436.1
第1天	94.2	158.4	312.5	385.2	425.6
第2天	103.5	138.9	268.5	342.5	386.3
第3天	77.1	147.1	324.1	399.8	397.9
第4天	65.8	134.0	255.1	382.5	435.2
第5天	91.2	177.6	250.8	366.5	371.0
第6天	56.4	212.0	286.0	318.1	423.6
第7天	89.3	214.1	309.1	360.3	440.0
第8天	102.2	199.5	321.8	320.1	436.5
第9天	65.4	179.5	241.7	338.4	389.9
第10天	82.4	214.4	310.5	379.6	388.9
第11天	62.9	205.9	305.4	335.9	449.3
第12天	86.1	202.2	311.2	377.7	451.1

表 3 胶体金法检测粪便隐血低浓度标本的日 CV(n=12)

标本浓度(ng/ml)	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	CV(%)
82.3	81.38±15.82	19.44
176.5	181.97±30.49	16.76
287.1	291.39±29.69	10.19
354.9	358.88±27.22	7.59
436.1	416.28±27.81	6.68

3 讨论 健康人的胃肠道生理性失血量每天约 0.6 ml,用高灵敏度的化学法检测粪便隐血试验结果多为阴性,一般少量出血也难以检出;而且受饮食、药物等因素影响,特异性不高,且易出现假阳性。近年来,随着免疫学方法在临床上的逐步应用,胶体金法的粪便隐血试剂越来越广泛地应用于临床^[4]。胶体金法已被世界卫生组织和世界胃镜检查协会推荐作为 FOB 的检测方法。由于其不受动物血红蛋白和过氧化物酶的干扰,因而不需控制饮食,还具有敏感度高、特异度好等优点^[5],是目前临床上较为理想的粪便隐血检测方法。但目前临床实验室金标法检测粪便隐血,仅能报告定性结果,而且结果判断依靠检验人员目测,有很大的主观性,尤其对少量出血的标本容易产生误差。本文尝试应用光电散射原理检测显色条带的反射信号,根据信号强弱判断阳性结果,并应用 CLSI EP17-A2 文件的实验方案设定本实验室的空白限(LOB)、检出限(LOD)及定量限(LOQ),定量判断粪便隐血的强弱程度,进而判断消化道出血量。

评价检测系统或方法的灵敏度的性能指标主要有 LOB,LOD 和 LOQ,LOB 是测量空白样本时可能得到的最高检测结果^[6],本实验中,对 12 个空白样本连续检测 5 天,对结果进行分析得到 LOB=99.01 ng/ml,它并非样本中的实际被测物浓度,

相当于浓度为 LOD 的样本在一定概率下能得到的最低测量结果。LOD 是检测方法可检测出的最低被测物浓度,也称为检测低限或最小检出浓度^[7]。本实验中建立的 LOD=340.48 ng/ml,即胶体金法检测粪便隐血的最低检出浓度为 340.48 ng/ml,较试剂说明书中标注的试剂检出最低量 200 ng/ml 偏高,可能与校准曲线和标本量有关。LOQ 是指在精密度和正确度可接受的情况下检测系统能够得到可靠结果的被测物最低浓度,分析物在这个浓度下被可靠检出,本实验在临床要求可接受的总误差为 20% 的情况下得出 LOQ 为 354.9 ng/ml,建立的 LOB,LOD 和 LOQ 的关系符合 LOB<LOD<LOQ。用该检测系统检测粪便隐血结果报告时,若粪便隐血结果低于 99.01 ng/ml,可报告“粪便隐血未检出(阴性)”;若粪便隐血结果介于 99.01~354.9 ng/ml 时,报告“粪便隐血浓度 354.9 ng/ml”,同时提示临床医生有高不确定度的可能;若粪便隐血结果>354.9 ng/ml 则可报告结果“粪便隐血阳性(+)”,临床医生可以放心使用粪便隐血 354.9 ng/ml 的结果用于临床检验结果诊断和治疗监测^[8]。

对于低血红蛋白浓度的样本,胶体金法的检测结果有诸多影响因素,使得检测结果重复性较差,特别是标本采集、取样量及稀释倍数以及反应时间等因素的影响。同时还有操作人员的操作误差等,都会使处于临界值范围的低浓度样本容易造成假阴性或假阳性结果。因此实验室应严格要求操作步骤,同时应定期对试剂的检测限进行验证,以确保这些检测限值的有效性。同时期待行业标准的制定及操作标准化,提高粪便检测的质量,如果辅助于光电信号定量检测设备出现,粪便隐血弱阳性标本的漏检率将大大减少。

参考文献:

[1] 刘成玉,罗春丽. 临床检验基础[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2012:198-199.
Liu CY, Luo CL. Basic clinical laboratory medicine [M]. 5th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House,2012:198-199.

[2] Lucidarme O, Cadi M, Berger G, et al. Cost-effectiveness modeling of colorectal cancer: computed tomography vs colonography colonoscopy or fecal occult blood tests[J]. Eur J Radiol, 2011, 81(7): 1413-1419.

[3] Clinical Laboratory Standards Institute. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; Approved guideline-second edition [M]. Wayne: PA CLSI Document EP17-A2, 2012.

[4] Chiang CH, Jeng JE, Wang WM, et al. A comparative study of three fecal occult blood tests in upper gastro-

- intestinal bleeding[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2006, 22(5): 223-228.
- [5] 芦宏凯, 韩呈武, 刘海霞. 两种便潜血检测方法的评价与应用[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(1): 114-116.
- Lu HK, Han CW, Liu HX. Evaluations and applications on two kinds detection methods of fecal occult blood[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(1): 114-116.
- [6] 周强, 王忠英, 谢彩修, 等. 模拟消化道出血时大便潜血试验金标法的研究[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2689-2691.
- Zhou Q, Wang ZY, Xie CX, et al. Research on collo-

idal gold method of fecal occult blood testing in simulating gastrointestinal hemorrhage [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2010, 7(24): 2689-2691.

- [7] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 142-167.
- Yang YY, Zhang XM. Clinical testing methodology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 142-167.
- [8] Linnet K, Kondratovich M. Partly nonparametric approach for determining the limit of detection[J]. Clin Chem, 2004, 50(4): 732-740.

收稿日期: 2014-05-20

修回日期: 2014-12-30

(上接 77 页) 表达载体 pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971 和 pQE32/Tp0663, 并表达出相应蛋白, 将纯化后的 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 重组蛋白分别经 SDS-PAGE 电泳分析各显示出单一清晰条带, 分子质量与各预期值相符合。

TPPA 为梅毒实验室确诊常用方法。本研究用以上四种膜蛋白单一重组抗原及四种重组蛋白嵌合抗原包被液分别建立的各种 Tp-ELISA 检测临床标本, 并与 TPPA 法比较。本研究结果显示, 单一重组蛋白抗原建立的 Tp-ELISA 检测临床标本有良好的特异度、较高的灵敏度及较好的符合率, 但阳性检出率低于 TPPA, 差异有统计学意义, 这可能与 Tp-ELISA 以单一重组蛋白为诊断抗原, 覆盖抗原表位有限, 因而降低了检测的灵敏度, 而 TPPA 法以天然全螺旋体全抗原为诊断抗原及 TPPA 法检测的是总抗体(包括 IgM 和 IgG), 而本研究建立的 ELISA 法检测的是特异性 IgG 等有关, 而以四种重组蛋白嵌合抗原建立的 Tp-ELISA 法因覆盖抗原表位相对单一重组蛋白要多得多, 因此, 检测临床标本的灵敏度和符合率会更接近于 TPPA 法。因此, 构建多表位的嵌合重组蛋白能有效降低假阳性率和假阴性率, 若采用更为灵敏的检测方法(如双抗原夹心法检测总抗体), 更会提高梅毒感染的阳性检出率。

参考文献:

- [1] Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete[J]. Science, 1998, 281(5375): 375-388.
- [2] 赵飞骏, 吴移谋, 张晓红, 等. 梅毒螺旋体融合双价 DNA 疫苗的构建及其免疫活性的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(5): 250-253.
- Zhao FJ, Wu YM, Zhang XH, et al. Construction of fusion bivalent DNA vaccine of *Treponema pallidum* and its immune activity[J]. Chinese Journal Derma-

tology, 2006, 39(5): 250-253.

- [3] 严加林, 吴移谋, 赵飞骏, 等. 梅毒螺旋体 Gdp 重组蛋白的表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2007, 40(5): 301-302.
- Yan JL, Wu YM, Zhao FJ, et al. *Treponema pallidum* Gdp expression of recombinant protein[J]. Chinese Journal Dermatology, 2007, 40(5): 301-302.
- [4] Champion CI, Blanco DRExner MM, Erdjument Bromage H, et al. Sequence analysis and recombinant expression of a 28-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. pallidum outer membrane protein (Tromp2) [J]. J Bacteriol, 1997, 179(4): 1230-1238.
- [5] Brinkman MB, McKevitt M, McLoughlin M, et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 888-891.
- [6] McKevitt M, Brinkman MB, McLoughlin M, et al. Genome scale identification of *Treponema pallidum* antigens[J]. Infect Immun, 2005, 73(7): 4445-4450.
- [7] Deka RK, Brautigam CA, Tomson FL, et al. Crystal structure of the Tp34(Tp0971) lipoprotein of *Treponema pallidum*; implications of its metal-bound state and affinity for human lactoferrin[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8): 5944-5958.
- [8] 曾铁兵, 刘小军, 张跃军, 等. 梅毒螺旋体 Tp0971 重组蛋白的表达及其在梅毒血清学诊断中的初步评价[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(6): 411-413.
- Zeng TB, Liu XJ, Zhang YJ, et al. Expression of recombinant protein Tp0971 of *Treponema pallidum* and its assessment in syphilis serodiagnosis[J]. Chinese Journal of Pathogenic Biology, 2010, 5(6): 411-413.
- [9] 伍宁, 肖勇健, 顾伟鸣, 等. 梅毒螺旋体 Tp0821 基因的克隆、表达、纯化及免疫活性研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(7): 489-492.
- Wu N, Xiao YJ, Gu WM, et al. Gene cloning expression and purification of Tp0821, a membrane lipoprotein of *Treponema pallidum*[J]. Chinese Journal Dermatology, 2010, 43(7): 489-492.

收稿日期: 2014-11-16

修回日期: 2014-12-27