

· 论 著 ·

胶体金免疫层析法检测血清 β -HCG 的性能评价

林一民, 徐旭仁, 吴立翔[△], 赖年轻

(重庆市肿瘤研究所临床检验中心 400030)

摘要:目的 评价胶体金免疫层析法“早早孕”试纸条检测血清中人绒毛膜促性腺激素 β 亚单位(β -HCG)的性能。方法 通过与化学发光法比较,从灵敏度、特异度、重复性、检出限等方面评价杭州艾康生物技术公司生产的“早早孕”人绒毛膜促性腺激素试纸条(胶体金免疫层析法)。结果 “早早孕”试纸条检测血清 β -HCG 的最低检出限为 25 mIU/mL,以化学发光法为真值,其灵敏度为 84.6%,特异度为 100%,尤登指数为 84.6%,准确度为 93.3%。试纸条浸入标本的最佳时间为 10 s,观察结果最佳时间为 3 min,检测结果在 10 min 之内稳定。该方法重复性良好,实验不受溶血、脂血的干扰。结论 杭州艾康生物技术公司生产的“早早孕”试纸条(胶体金免疫层析法)检测血清 β -HCG 的特异度高,重复性好,准确度高。

关键词:胶体金免疫层析法;人绒毛膜促性腺激素;性能评价

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.010

中图分类号:R446.61;R714.15

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2570-03

Performance evaluation about detection of serum β -HCG through colloidal gold immunochromatography

LIN Yi-ming, XU Xu-ren, WU Li-xiang[△], et al.

(Clinical Testing Center, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

Abstract: **Objective** To performance evaluate the human chorionic gonadotropin β subunit in serum (β -HCG) by early pregnancy test strip through colloidal gold immunochromatography. **Methods** By comparison with the chemiluminescence immunoassay method, estimated human chorionic gonadotropin early pregnancy test strip made in Hangzhou aicon company from the sensitivity, specificity, repeatability, detection limit, etc. (colloidal gold immunochromatography). **Results** The detection limit of serum β -HCG by early pregnancy test strip was 25 mIU/mL. By comparison with the chemiluminescence immunoassay method, its sensitivity was 84.6%, its specificity was 100%, its Youden index was 84.6%, its Accuracy was 93.3%, the best time test strip of specimens immersed was 10 seconds, Best time to observe the results was 3 minutes, Test results keep stability within 10 minutes. This method is good reproducibility, hemolysis and lipemia didn't interfere the experiment. **Conclusion** Early Pregnancy Test Strip made in Hangzhou aicon company (Colloidal gold immunochromatography) have a high degree of specificity, Repeatability and high accuracy while detection of serum β -HCG.

Key words: colloidal gold immunochromatography; human chorionic gonadotropin; performance evaluation

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)作为一种生殖内分泌激素,其检测正在临床实验室展开,其对于妊娠或急腹症的辅助诊断及随访都有重要作用^[1]。检测血清或尿液中的人绒毛膜促性腺激素 β 亚单位(β -HCG)已成为正常早孕、异位妊娠、滋养细胞肿瘤、肝癌等疾病诊断与鉴别诊断的重要方法^[2]。目前检测 β -HCG 的方法很多,包括放射免疫分析法、化学发光法、酶联免疫分析法、胶体金免疫层析法(GICA)等。化学发光法是较新而优秀的实验室免疫学检验技术,其以极高的特异性、精确度、稳定性和良好的随机操作性成为免疫实验室的主要检验手段,但其成本高,成为推广应用的障碍^[3]。而胶体金免疫技术是 20 世纪 80 年代继三大标记技术(荧光素、放射性同位素和酶标记)发展起来的固相标记免疫测定技术,该法因其具有简单快速、价格低廉、可单份测定^[4]、适合基层医疗机构和家庭使用等特点而得到广泛的应用。目前,市面上有多家的人绒毛膜促性腺激素试纸条(GICA)在使用,这些产品在某些性能指标、操作使用上存在较大差异。本文通过与化学发光法比较,从灵敏度、特异度、稳定

性、反应条件、检出限、抗干扰能力等方面对杭州艾康生物技术公司生产的“早早孕”GICA 进行方法学评价,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本 60 例标本为本所 2009 年 4 月 18 日至 2009 年 5 月 21 日门诊及住院患者血清,均无明显溶血、脂血等,其 β -HCG 的含量已经由化学发光法测出。

1.2 试剂与仪器 “早早孕”人绒毛膜促性腺激素免疫胶体金定性试纸条(以下简称试纸条)由杭州艾康生物技术公司提供,批号:200801250,有效期至 2009 年 12 月。化学发光免疫分析仪为天津德普 Immulite1000, β -HCG 检测范围为 1.1~5 000 mIU/mL,原装配套试剂。

1.3 方法 (1)方法比较实验:室温下严格按照说明书操作,将试纸条下端插入样品血清中,其深度不宜超过 MAX 线,10 s 后取出平放,3 min 时观察结果。以化学发光法所测值为真值,小于或等于 5 mIU/mL 为阴性,大于 5 mIU/mL 为阳性,将试纸条测定结果和化学发光法测定结果进行比较,评价 2 种

[△] 通讯作者,电话:13452935376;E-mail:wxl124610@yahoo.cn。

方法的相关性及试纸条法的灵敏度、特异性、准确度等。(2)重复性实验:选取 10 个样本,浓度从低到高(<1、2.2、12.3、32.5、398、3 292、9 158、15 176、35 077、57 894 mIU/mL),按照说明书操作,每个样本重复测定 10 次。(3)最低检出限实验:将已由化学发光法检测定量的浓度为 4 070 mIU/mL 的标本稀释成 4 070、407、100、50、25、12.5、6.3、1.5、0.7 mIU/mL 共 10 个样本,同时设阴性对照,按照说明书每个标本重复测定 3 次。(4)最佳检测条件的选择:将化学发光法测定 β -HCG 浓度为 57 894 mIU/mL 的标本,以 10 倍比例稀释成 5 789、579、58、5.8 mIU/mL 及小于 1 mIU/mL 共 5 个标本,同时设阴性对照。①最佳浸入时间实验:将试纸条分别浸入标本 3、5、10、15、20、30 s,均在 3 min 后读取结果。②最佳观察时间实验:将试纸条分别浸入标本 10 s,在 1、3、5、10、15、20、30、60、120 min 时读取结果。(5)干扰实验:准备高、中、低浓度干扰实验(57 894、17 607、3 292 mIU/mL)各一组,每组设实验管一个,对照管一个。①溶血干扰实验:实验管均加入阴性溶血血清 0.9 mL,对照管均加入阴性无溶血血清 0.9 mL,向实验管和对照管依次加入高、中、低浓度样本 0.1 mL,混匀后检测。②脂血干扰实验:实验管均加入阴性脂血血清 0.9 mL,对照管均加入阴性无脂血血清 0.9 mL,向实验管和对照管依次加入高、中、

低浓度样本 0.1 mL,混匀后检测。

2 结 果

2.1 方法比较实验 化学发光法检出阳性 26 例(大于 5 mIU/mL),阴性 34 例(小于或等于 5 mIU/mL)。试纸条检出阳性 22 例,阴性 38 例。其中化学发光法 4 例阳性标本(β -HCG 浓度分别为 18.7、10.5、12.3 和 6.7 mIU/mL)用试纸条诊断为阴性。以化学发光法为真值,“早早孕”试纸条的灵敏度为 84.6%,特异度为 100%,尤登指数为 84.6%,准确度为 93.3%。60 例标本胶体金试纸条法和化学发光法检测结果见表 1。

表 1 “早早孕”试纸条与化学发光法检测结果对比

项目	化学发光(+)	化学发光(-)
试纸条(+)	22	0
试纸条(-)	4	34

2.2 重复性实验 β -HCG 浓度大于或等于 398 mIU/mL、小于或等于 12.3 mIU/mL 时,10 次结果呈色均一,浓度为 32.5 mIU/mL 时,1 次结果显示阴性,另 9 次显示为弱阳性。各浓度 10 次重复测定结果见表 2。

表 2 重复性实验结果

浓度(mIU/mL)	测试 1	测试 2	测试 3	测试 4	测试 5	测试 6	测试 7	测试 8	测试 9	测试 10
<1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32.5	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
398	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 292	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
9 158	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
15 176	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
35 077	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
57 894	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

-:表示阴性,±:表示弱阳性,+ :表示阳性,++ :表示强阳性。

表 3 最低检出限实验结果

浓度(mIU/mL)	测试 1	测试 2	测试 3
阴性对照	-	-	-
1.5	-	-	-
3	-	-	-
6	-	-	-
12.5	-	-	-
25	±	±	±
50	±	±	±
100	+	+	+
407	+	+	+
4 070	++	++	++

2.3 最低检出限实验 β -HCG 浓度小于或等于 12.5 mIU/mL 时,试纸条检测为阴性; β -HCG 浓度大于或等于 25 mIU/mL 且小于或等于 50 mIU/mL 时,试纸条检测为弱阳性; β -HCG 浓度大于或等于 100 mIU/mL 时,试纸条检测为阳性; β -HCG 浓度大于或等于 4 070 mIU/mL 时,试纸条检测为强阳性。试纸条最低检测限为 25 mIU/mL,见表 3。

2.4 最佳检测条件的选择

2.4.1 最佳浸入时间实验 当试纸条浸入标本时间在 3 s 时,各组均因为没有出现对照线而无法判读;当试纸条浸入标本时间在 5 s 时,部分组出现无法判读的现象;当试纸条浸入标本的时间在 10 s 及 10 s 以上时,各组结果均能正常判读,呈色均一。试纸条浸入标本的最佳时间为 10 s。各组实验结果见表 4。

2.4.2 最佳观察时间实验 当在试纸条离开标本 1 min 后观察结果,除对照组外其余各浓度组结果均因为尚未出现对照线

而无法判读;在 3~10 min 这段时间,各组均出现对照线,可以判读结果,且测试线颜色稳定;10 min 之后,测试线有颜色加深和变黑的趋势,不再适合作为检测结果。综合准确性和实用性考虑,最佳观察时间为 3 min,检测结果在 10 min 之内稳定。各组实验结果见表 5。

2.5 干扰实验

2.5.1 溶血干扰实验 溶血组和对照组结果比较,没有任何差异,溶血造成试纸条测试界面的红色背景也不会影响结果的判读。两组实验结果见表 6。

2.5.2 脂血干扰实验 脂血组和对照组结果比较,没有任何

差异,脂血不会影响 β -HCG 的检测。两组实验结果见表 7。

表 4 最佳浸入时间实验结果

浓度(mIU/mL)	3 s	5 s	10 s	15 s	20 s	30 s
<1	无效	无效	-	-	-	-
5.8	无效	-	-	-	-	-
58	无效	±	±	±	±	±
579	无效	无效	+	+	+	+
5 789	无效	++	++	++	++	++

表 5 最佳观察时间实验结果

浓度(mIU/mL)	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min
<1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.8	无效	-	-	±	±	±	±	±	±
58	无效	±	±	±	+	+	+	+	+
579	无效	+	+	+	++	++	++	++	++
5 789	无效	++	++	++	++	++	++	++	++

表 6 溶血干扰实验测定结果

组别	浓度(mIU/mL)	测试 1	测试 2
正常阴性血清	<1	-	-
溶血阴性血清	<1	-	-
对照组	329.2	+	+
实验组	329.2	+	+
对照组	1 760.7	++	++
实验组	1 760.7	++	++
对照组	5 789.4	++	++
实验组	5 789.4	++	++

表 7 脂血干扰实验测定结果

组别	浓度(mIU/mL)	测试 1	测试 2
正常阴性血清	<1	-	-
脂血阴性血清	<1	-	-
对照组	329.2	+	+
实验组	329.2	+	+
对照组	1 760.7	++	++
实验组	1 760.7	++	++
对照组	5 789.4	++	++
实验组	5 789.4	++	++

3 讨论

3.1 胶体金是一种常用的标记技术,1971 年 Faulk 和 Taylor 将胶体金引入免疫化学,此后免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法,在生物医学各领域得到了日益广泛的应用。目前,在检验医学中的应用主要是免疫层析法和快速免疫金渗滤法,用于检测 HBsAg、HCG 和抗双链 DNA 抗体等,具有简单、快

速、准确和无污染等优点^[5]。免疫层析法是近年国外兴起的一种快速诊断技术,其原理是将特异的抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品(尿液或血清)后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合,若用免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断。

3.2 HCG是由滋养层细胞分泌的一种糖蛋白激素,由 α 和 β 亚单位组成, α 亚单位的氨基酸排列顺序和黄体生成素(LH)、促卵泡成熟激素(FSH)、促甲状腺成熟激素(TSH)的 α 亚单位大体相同,相互间可发生交叉反应。而 β 亚单位结构特异,不存在于其他糖蛋白激素中,根据这一特点制备的 β -HCG 单克隆抗体,可将上述激素之间的交叉反应降低到最低值^[6]。目前, β -HCG 的检测方法主要用免疫学方法,化学发光法是用纯化的鼠抗人 β -HCG 单克隆抗体包被的微孔板、酶标记鼠抗人 α -HCG 单克隆抗体、发光底物液(鲁米诺)等,采用双抗体夹心法检测 HCG。

3.3 “早早孕”试纸条是把鼠抗人 β -HCG 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体分别固定在硝酸纤维素膜上,用胶体金标记鼠抗人 α -HCG 单克隆抗体,利用层析法和双抗体夹心法检测 HCG。本实验结果显示,与化学发光法相比,试纸条的特异性为 100%,但是灵敏度为 84.6%。60 例中有 4 例化学发光检测阳性而试纸条没能检出,这与方法的固有缺陷有关,试纸条的最低检出限为 25 mIU/mL,远远不如化学发光法的 1.1 mIU/mL。早期妊娠因时间太短,大量饮水、服利尿剂或其他药物可使 HCG 含量下降,引起假阴性。异位妊娠时可能因血 β -HCG 低于 25 mIU/mL,试纸条测定 β -HCG 呈阴性。在葡萄胎等妊娠滋养细胞疾病的患者中,其滋养细胞高度增生,产生大量 HCG,血、尿中 HCG 均明显增高,其浓度可达正常妊娠的 100 倍。过量 HCG 分别与试纸中胶体金标记的鼠抗人 β -HCG 单克隆抗体和羊抗人 HCG 多克隆抗体(下转第 2575 页)

分别为 35%、68%、74%，均明显高于正常结直肠黏膜，与国外文献一致。同时提示结直肠癌组织的发生与 Shh 信号通路异常激活有关。随后研究发现三者表达与患者年龄、肿瘤大小、分化类型无关，而与 Duke 分期密切相关。Ptch1、Gli1 蛋白表达与大肠癌 Duke 分期和淋巴结转移密切相关。随着肿瘤增大、侵袭深度加深、出现淋巴结转移，Ptch1、Gli1 蛋白阳性率升高，差异有统计学意义。Shh 蛋白表达与 Duke 分期密切相关，而与有、无淋巴结转移无关。可见，Shh 蛋白在大肠癌发生过程中起重要作用，而 Ptch1、Gli1 蛋白与大肠癌增殖、侵袭、转移有关。而且，可能在大肠癌中还有其它通路调节 Ptch1、Gli1 蛋白表达。经 Spearman 等级相关分析发现，Shh 蛋白与 Ptch1 蛋白表达呈正相关($r=0.500, P<0.05$)，Ptch1 蛋白与 Gli1 蛋白表达呈正相关($r=0.683, P<0.05$)，Shh 蛋白与 Gli1 蛋白表达呈正相关($r=0.424, P<0.05$)。

本研究结果显示，Shh、Ptch1、Gli1 蛋白在大肠癌组织中高表达，Hh 信号通路呈激活状态，据此认为 Hh 信号通路激活与大肠癌的发生关系密切。因此，Hh 信号通路与肿瘤的相关研究有望阐明一部分肿瘤的发生机制，发现一些肿瘤特异性蛋白，并运用特异性信号通路阻断剂，为临床中大肠癌的早期发现及针对性治疗开辟新的途径。Hh 信号通路很有可能是对大肠癌进行早期诊断和治疗的一个理想靶标，值得进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Curran S, Dundas SR. Matrix metalloproteinase tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res,

2004,10(24):8229.

- [2] Gongoll S, Peters G, Mengel M, et al. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2002, 123(5):1478.
- [3] Ruiz I, Altaba A, Sanchez P, et al. Gli and hedgehog in cancer: turnouts, embryos and stem cells[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2):361.
- [4] Murone M, Luoh SM, Stone D, et al. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(1):310.
- [5] Wang WS, Chen PM, Su Y. Colorectal carcinoma: from tumorigenesis to treatment[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(6):663.
- [6] Mullor JL, Sanchez P, Ruizi AA. Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease [J]. Trends Cell Biol, 2002, 12(12):562.
- [7] Ruiz AA, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumors, embryos and stem cells[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5):361.
- [8] Oniscu A, James RM, Morris RG. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia [J]. J Pathol, 2004, 203(4):909.
- [9] Douard R, Moutereau S, Pernet P. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer[J]. Surgery, 2006, 139(5):665.

(收稿日期:2010-03-06 修回日期:2010-05-25)

(上接第 2572 页)

血清结合，而不再形成金标记的 β -HCG 抗体-HCG-羊抗人 HCG 多克隆抗体“夹心复合物”，不再出现阳性结果，此现象称“HOOK”现象，即钩状效应^[7]。为杜绝钩状效应导致的假阴性，对于临床疑诊为葡萄胎、绒毛膜癌等滋养细胞疾病的患者，在检测血 HCG 时，应将标本连续倍比稀释后测定，以提高试纸条阳性检出率，同时用化学发光法定量测定血 β -HCG 的含量。

试纸条说明书提供了 2 种操作方法，一种是把试纸条直接浸入到标本中不拿出来，但必需保证液面不能浸没 MAX 线，实际操作中需要弃去一部分标本或把标本转移到另一容器中，比较繁琐。本文采用另一种方法，即将试纸条下端直接浸入待测标本液面下。实验结果表明只要浸入 10 s 后，即可获得满意的结果。观察结果的最佳时间为 3 min。实验重复性好，特异性高，不受溶血和脂血的干扰。

参考文献:

[1] 丛玉隆, 王丁. 当代检验技术与临床[M]. 北京: 中国科学

技术出版社, 2002:298.

- [2] 王梅, 康红, 李月, 等. 胶体金免疫层析法检测尿 HCG 的质量控制方法探讨[J]. 西部医学, 2005, 17(6):643.
- [3] 陈仲平. 化学发光免疫法联合胶体金法检测血清 β -HCG [J]. 放射免疫学杂志, 2007, 20(1):89.
- [4] 赵春艳, 黄连贵, 任力, 等. 胶体金免疫层析法在 HBsAg 检测中的应用评价[J]. 中国医学检验杂志, 2008, 9(4):214.
- [5] 李莉, 任林柱, 逢大欣, 等. 抗人血白蛋白单克隆抗体的制备及其免疫金标试纸条的研制[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11):2028.
- [6] 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, 2006:300.
- [7] 肖国辉, 张铭. 钩状效应导致葡萄胎 HCG 测定假阴性 1 例[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(11):2678.

(收稿日期:2010-02-25 修回日期:2010-03-03)