

# 匹拉米洞法、邻联甲苯胺法和联苯胺法 检测林麝便隐血的比较

周俊彤 徐尚华 胡德夫\*

北京林业大学自然保护区学院 北京 100083

**摘要:** 圈养林麝 (*Moschus berezovskii*) 长期受困于消化道类疾病, 尤其是肠道炎症性疾病患病率和死亡率一直居高不下。粪便检测是评估野生动物消化系统是否存在出血情况的有效方法之一, 并且在圈养林麝肠道健康状况评估及肠道炎症性疾病临床诊断等方面提供了一定的诊断依据。粪便隐血在消化道出血诊断中有广泛的临床诊断价值。基于此, 本研究用新鲜的林麝血液进行稀释, 来探究匹拉米洞法、邻联甲苯胺法和联苯胺法三种方法对林麝血液浓度的灵敏度范围。检测结果显示, 匹拉米洞法的最低敏感性检测浓度为 0.05 mg/L, 敏感性范围远大于邻联甲苯胺法 (0.40 mg/L) 和联苯胺法 (100.00 mg/L)。分别利用三种检测方法对林麝粪便潜血进行检测, 比较检测结果的阳性率, 结果显示, 匹拉米洞法的检测效果优于其他两种方法, 阳性率分别为匹拉米洞法检测法 10.13%、邻联甲苯胺法检测法 2.56% 和联苯胺法检测法 0, 差异有诊断学意义 ( $P < 0.05$ )。而且在操作上, 匹拉米洞法更加简便快捷。故在诊断林麝消化道出血时, 采用匹拉米洞法进行林麝便隐血的检测更加准确便捷。

**关键词:** 消化道出血; 便隐血; 匹拉米洞法; 邻联甲苯胺法; 联苯胺法

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2020) 03-401-06

## Detection of Fecal Occult Blood in the Stool of Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*): Comparison among Pyramidon Chemical Method, O-toluidine Chemical Method and Benzidine Chemical Method

ZHOU Jun-Tong XU Shang-Hua HU De-Fu\*

College of Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** The high morbidity and mortality of captive Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*) due to the digestive tract diseases, especially the intestinal inflammatory diseases have been a major problem. Fecal detection is a basis for evaluating the health status of the digestive system of the wild animals and the clinical diagnosis of the intestinal inflammatory diseases. The fecal occult blood has a wide range of clinical diagnostic values in the diagnosis of gastrointestinal bleeding. In this study, diluted fresh Forest Musk Deer

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 200/J628830) ;

\* 通讯作者, E-mail: hudf@bjfu.edu.cn;

**第一作者介绍** 周俊彤, 女, 博士研究生; 研究方向: 野生动物生理免疫与疫源疫病防控; E-mail: zhoujuntong908020@126.com。

收稿日期: 2019-11-18, 修回日期: 2020-04-07 DOI: 10.13859/j.cjz.202003015

blood was utilized to explore the sensitivity ranges of three methods (pyramidon chemical method, o-toluidine chemical method and benzidine chemical method) for the determination of the blood concentration in the Forest Musk Deer feces. The results showed that the minimum sensitivity test concentration of the pyramidon method was 0.05 mg/L, more sensitive than that of o-toluidine method (0.4 mg/L) or benzidine method (100 mg/L). The positive rate of gastrointestinal bleeding revealed by the pyramidon method was significantly higher when compared to the other two methods, with the positive rate of pyramidon method 10.13%, o-toluidine chemical method of 2.56% and benzidine chemical method of 0 ( $P < 0.05$ ). The operation of the pyramidon method was more convenient and rapid. Therefore, the detection of fecal occult blood in the Forest Musk Deer by pyramidon method is more accurate and convenient.

**Key words:** Digestive tract hemorrhage; Fecal occult blood; Pyramidon chemical method; O-toluidine chemical method; Benzidine chemical method

林麝 (*Moschus berezovskii*) 饲养繁育是缓解野生麝资源压力, 保障麝香资源可持续利用的重要途径, 也是实施重引入重建野生种群的种源基础 (Yang et al. 2003, 姜海瑞等 2008, He et al. 2014a, Wang et al. 2016)。我国林麝的人工养殖始于 1958 年, 经多年探索已在很多方面取得显著进展 (薛程等 2008)。然而, 其饲养种群长期受到健康状况不稳定和疾病高发的困扰, 严重制约着种群的发展 (徐正强等 2003, He et al. 2014b, 魏雨婷等 2016)。林麝的驯化期尚短, 且其生性机警胆怯, 应激反应强 (Meng et al. 2006), 由野生变为人工驯养后, 生态环境和饲养管理均发生变化, 对其生理机能及代谢状况均会产生一定的影响。加之其不易近人的天性, 患病后常不易被发现 (Meng et al. 2006, 姜海瑞等 2007, 韩红金等 2019)。消化道疾病 (肠胃炎、腹泻、消化道出血等) 是造成饲养林麝死亡的主要疾病之一 (何迟酪等 2011, 罗茜 2014, 赵贵军等 2019, Zhao et al. 2019), 属当前亟待防控的林麝疾病种类。

便隐血 (feces occult blood, FOB, 亦称便潜血) 是指消化道少量出血, 红细胞被消化破坏, 夹裹在粪便中, 肉眼和显微镜下均不能证实的出血。便隐血试验被广泛用于临床诊断, 是临床诊断消化道出血性疾病、筛查消化道肿瘤的有效手段之一 (Lieberman 2001, Hiraoka et al. 2019)。血红蛋白有类似过氧化物酶的作

用, 能催化过氧化氢氧化某些色源 (使其脱氢) 而显色。目前常见的色源有联苯胺、邻联甲苯胺 (O-toluidine)、愈创木、还原酚酞、无色孔雀绿、匹拉米洞、四甲基联苯胺等 (胡旭 2019)。根据不同的检测原理, 消化道隐性出血可由各种粪便隐血试验 (fecal occult blood test, FOBT) 检测, 分为化学法和免疫法两大类 (熊立凡等 1998, 李月等 2018, Ye et al. 2018, Lee et al. 2019)。除这两种方法以外, 还有一种新方法——转铁蛋白试纸法。目前人类临床检验中, 美国胃肠道学学会 (American Gastroenterological Association, AGA) 推荐愈创木酯化学法或免疫法 (贾红丽 2013)。尽管这两者检测的特异性很强, 但是目前只有针对人红细胞的试纸和试剂, 目前还没有针对其他物种的试纸, 而且免疫法需要比较昂贵的特异性抗体蛋白, 这种试纸的制作和保存都十分昂贵。匹拉米洞法、邻联甲苯胺法和联苯胺法三种方法所用的试剂都比较廉价, 而且操作方法简单, 不仅可以实验室直接开展, 也可以在现场进行测定。所以本研究对采用这三种试剂的化学法进行探究, 不采用愈创木酯化学法和免疫法这两种方法。

本研究通过采集新鲜的林麝血液进行稀释, 来探究匹拉米洞法、邻联甲苯胺法和联苯胺法三种方法对林麝血液浓度的灵敏度范围。再分别利用三种方法检测林麝粪便潜血, 比较所测结果的阳性率。综合检测方法的操作便捷

程度、灵敏度范围和检测效果, 探索适合检测林麝消化道出血的检测手段。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

2016 年 7 和 8 月间, 在陕西片仔癯凤县养麝场和达吉康留凤关镇养麝场选取年龄 3 ~ 7 岁的林麝, 共 78 头, 其中雄麝 49 头, 雌麝 29 头, 采样期间正值雌麝妊娠期和哺乳期, 为避免采集样本给雌麝和仔麝带来的不利影响, 故而本实验选取的 29 头雌麝均为未怀孕且未带幼崽的雌麝。本实验中所用的动物操作流程均严格按照《国家动物福利法》要求执行, 动物实验方法和目的均符合人类的道德伦理标准和国际惯例。取 10 粒 (5.0 g) 左右新鲜未污染的粪样放入采集瓶中, 标记采样个体的耳号和采集日期, 常温保存。因为实验中所用的粪便样品中的隐血在常温条件下只能保存 30 min, 便隐血的检测在采样后 30 min 内进行。随机抽取健康林麝新鲜血样 5.0 ml, 常温保存。必须在 10 min 内完成检测技术的敏感性范围测试。

### 1.2 方法

**1.2.1 匹拉米洞法检测便隐血** 利用取样木棒挖取采集瓶中不同部位的粪便样本约 10 ~ 50 mg 涂抹在匹拉米洞法试纸 (贝索 BASO 便隐血检测试纸, 珠海贝索生物技术有限公司) 卡正面 A 窗; 将试纸卡背面朝上, 试纸卡背面有两个方格, 在两个方格中各加入 1 滴显色剂 A 液, 在 A 液完全渗透后在两个方格中各加入 1 滴显色剂 B 液。当加入显色剂 B 液后, 立即产生紫蓝色, 报告为阳性 4+; 当加入 B 液后, 2 ~ 10 s 内产生紫红色, 报告为阳性 3+; 当加入 B 液后, 10 ~ 60 s 产生紫红色, 报告为阳性 2+; 当加入 B 液后, 1 ~ 2 min 产生紫红色, 报告为阳性 1+; 当加入 B 液后, 超过 2 min 无任何紫蓝或紫红的颜色反应, 报告为阴性 (-)。

**1.2.2 邻联甲苯胺法检测便隐血** 配制 3%

过氧化氢溶液和 10 g/L 邻联甲苯胺溶液, 即将邻联甲苯胺 1.00 g 溶于冰醋酸及无水乙醇各 50 ml 的混合液中, 置棕色瓶中, 保存于 4 °C 冰箱。

将所有用具加热处理 (如试管、玻片、滴管), 粪使用水稀释加热煮沸后再加醋酸和乙醚, 提取血红蛋白; 滴加 2 ~ 3 滴邻联甲苯胺溶液于空白白瓷板上, 然后向滴加过邻联甲苯胺溶液的白瓷板孔内滴加 1 ~ 2 滴 3% 过氧化氢溶液, 如溶液颜色不变则再将上述经处理过的粪便 (2 滴) 加入到混合液中, 观察不同时间内溶液颜色变化。若溶液即显深蓝色, 报告为阳性 (4+), 2 ~ 10 s 内显蓝色, 报告为阳性 (3+), 10 ~ 30 s 内显蓝绿色, 报告为阳性 (2+), 30 ~ 60 s 内显蓝色, 报告为阳性 (1+), 3 min 后不显蓝绿色, 报告为阴性 (-)。

**1.2.3 联苯胺法检测便隐血** 配制 1% 联苯胺冰醋酸溶液和 3% 过氧化氢溶液。将所有用具加热处理 (如试管、玻片、滴管), 粪使用水稀释加热煮沸后再加醋酸和乙醚提取血红蛋白; 滴加 2 ~ 3 滴 1% 联苯胺冰醋酸溶液于空白白瓷板上, 然后向滴加过 1% 联苯胺冰醋酸溶液的白瓷板孔内滴加 1 ~ 2 滴 3% 过氧化氢溶液, 如溶液颜色不变则再将上述经处理过的粪便 (2 滴) 加入到混合液中, 观察不同时间内溶液颜色变化。若溶液即显深褐色, 报告为阳性 (4+), 2 ~ 10 s 内显深黄色, 报告为阳性 (3+), 10 ~ 30 s 内显黄色, 报告为阳性 (2+), 30 ~ 60 s 内显淡黄色, 报告为阳性 (1+), 3 min 后不显浅黄色, 报告为阴性 (-)。

**1.2.4 敏感性范围检测** 健康林麝血液中血红蛋白含量为 136.87 ~ 152.83 g/L (何迟酪等 2012)。将抽取的健康林麝新鲜血样用蒸馏水进行稀释, 稀释成含血红蛋白 2 000.0、1 500.0、1 250.0、1 100.0、1 050.0、1 001.0、1 000.0、500.0、250.0、125.0、110.0、100.0、90.0、45.0、20.0、15.0、10.0、6.4、4.0、1.6、0.8、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01 mg/L

共 30 种浓度的混悬液, 用上述三种方法分别测定。

### 1.3 统计分析

原始数据经 Excel 进行初步整理后, 使用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件对每种检测方法检测后得到的该组数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验判定差异性。

## 2 结果

### 2.1 敏感性范围检测结果

**2.1.1 匹拉米洞法灵敏性检测结果** 血红蛋白浓度为 0.01 ~ 0.04 mg/L 时, 检测结果为阴性 (-); 0.05 ~ 0.3 mg/L 时, 检测结果为阳性 (1+); 0.4 ~ 4.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (2+); 6.4 ~ 15.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (3+); 超过 20.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (4+) (图 1)。

**2.1.2 邻联甲苯胺法灵敏性检测结果** 血红蛋白浓度为 0.01 ~ 0.3 mg/L 时, 检测结果为阴性 (-); 0.4、0.8 mg/L 时, 检测结果为阳性 (1+); 1.6 ~ 6.4 mg/L 检测结果为阳性 (2+); 10.0 ~ 110.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (3+); 超过 125.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (4+) (图 2)。

**2.1.3 联苯胺法灵敏性检测结果** 血红蛋白浓度为 0.01 ~ 90.0 mg/L 时, 检测结果为阴性 (-); 100.0 ~ 125.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (1+); 250.0、500.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (2+); 1 000.0 ~ 1 500.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (3+); 2 000.0 mg/L 时, 检测结果为阳性 (4+) (图 3)。

### 2.2 三种方法检测林麝血红蛋白灵敏性比较

匹拉米洞法灵敏度为 0.05 mg/L, 检测样本浓度过高并不会影响检测结果, 不会出现假阴性的结果, 故而不受高浓度影响; 邻联甲苯胺法灵敏度为 0.4 mg/L, 不受高浓度影响; 联苯胺法灵敏度 100.0 mg/L, 不受高浓度影响。由此可见, 匹拉米洞法检测的灵敏度最高, 对林麝微量出血更有诊断价值。

### 2.3 三种检测方法检测阳性率比较

分别利用三种检测方法对林麝粪便潜血进行检测, 比较所测结果的阳性率。匹拉米洞法的检测效果优于其他两种方法, 阳性率匹拉米洞法检测为 10.13%、邻联甲苯胺法检测为 2.56%、联苯胺法检测为 0, 差异有诊断学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

林麝的消化道疾病的诊断和治疗一直是人工规模化养殖的技术瓶颈, 严重限制了人工养麝的快速发展。而且林麝自身应激性强, 大大降低采血和消化道内窥镜检查操作的可能性。粪便潜血是胃肠道疾病的一个标志 (Federici et al. 2005, Hewitson et al. 2007, Levin et al. 2008, Kobayashi et al. 2015)。当消化道出血时, 红细胞被消化破坏, 夹裹在粪便中, 肉眼和显微镜下均不能证实出血 (Lieberman 2001)。血红蛋白有类似过氧化物酶的作用, 能催化过氧化氢氧化某些色源 (使其脱氢) 而显色 (胡旭 2019)。根据这一原理, 可用化学方法检测林麝的便隐血。

本研究通过采集新鲜的林麝血液进行稀释, 来探究匹拉米洞法、邻联甲苯胺法和联苯胺法三种方法对林麝血液浓度的灵敏度范围, 并根据得到的三种检测方法的灵敏度范围进行了林麝便隐血的检测。从检测方法操作和检测敏感性两个方面进行了三种检测方法的对比。

在检测方法操作上, 联苯胺法和邻联甲苯胺法检测便隐血, 检测试剂不稳定, 操作比较繁琐, 对操作过程中所用的所有器具都要进行前期的煮沸来破坏可能存在的真正的过氧化物酶, 且在检测便隐血前要对粪便进行预处理, 即先将粪使用水稀释加热煮沸后再加醋酸和乙醚提取血红蛋白后, 再进行测定。匹拉米洞法检测法操作简单得多, 只需按照说明要求进行检测即可, 对粪样也无需做前期处理。

在检测敏感性上, 匹拉米洞法能检测出阳性结果所需的样本浓度最低, 敏感性范围远大

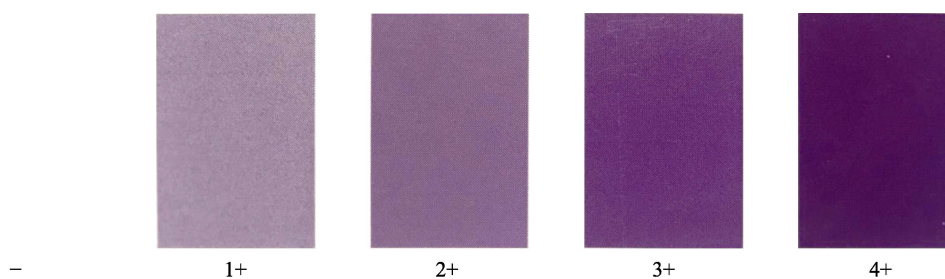


图 1 匹拉米洞法试纸（贝索 BASO 便隐血检测试纸）敏感性检测显色结果

Fig. 1 Color rendering sensitivity of the test paper (BASO fecal occult blood test paper) by using the pyramidon chemical method

阳性结果分为四个梯度，4+、3+、2+和 1+，阴性不显色，结果为“-”。

The positive results were divided into four gradients, 4+, 3+, 2+ and 1+, and the negative results were “-”.

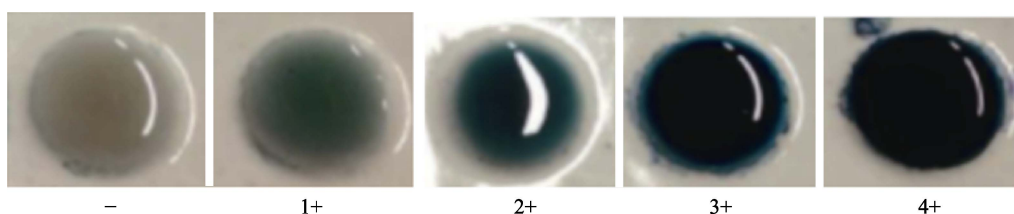


图 2 邻联甲苯胺法敏感性检测显色结果

Fig. 2 Color rendering results of sensitivity test of o-toluidine method

阳性结果分为四个梯度，4+、3+、2+和 1+，阴性不显色，结果为“-”。

The positive results were divided into four gradients, 4+, 3+, 2+ and 1+, and the negative results were “-”.

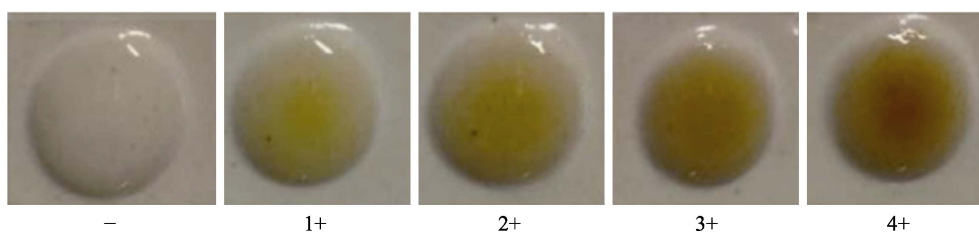


图 3 联苯胺法敏感性检测显色结果

Fig. 3 Color rendering results of sensitivity test by benzidine method

阳性结果分为四个梯度，4+、3+、2+和 1+，阴性不显色，结果为“-”。

The positive results were divided into four gradients, 4+, 3+, 2+ and 1+, and the negative results were “-”.

于邻联甲苯胺法和联苯胺法。在实际检测林麝便隐血的阳性率上，匹拉米洞法的检测效果明显优于邻联甲苯胺法和联苯胺法两种方法。表明匹拉米洞法检测林麝便隐血无论从实验操

作、试剂和操作环境要求上，还是从检测敏感性和检测阳性率上都优于邻联甲苯胺法和联苯胺法。故采用匹拉米洞法检测林麝便隐血，检测更加便捷，检测结果更加准确。

## 参 考 文 献

- Federici A, Giorgi Rossli P, Borgia P, et al. 2005. The immunochemical faecal occult blood test leads to higher compliance than the guaiac for colorectal cancer screening programmes: a cluster randomized controlled trial. *Journal of Medical Screening*, 12(2): 83–88.
- He L, Li L H, Wang W X, et al. 2014a. Welfare of farmed musk deer: changes in the biological characteristics of musk deer in farming environments. *Applied Animal Behaviour Science*, 156(12): 1–5.
- He L, Wang W X, Li L H, et al. 2014b. Effects of crowding and sex on fecal cortisol levels of captive forest musk deer. *Biological Research*, 47(48): 48–56.
- Hewitson P, Glasziou P, Irwig L, et al. 2007. Screening for colorectal cancer using the fecal occult blood test, Hemoccult. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 23(1): 1216–1227.
- Hiraoka S, Takashima S, Inokuchi T, et al. 2019. The novel latex agglutination turbidimetric immunoassay system for simultaneous measurements of calprotectin and hemoglobin in feces. *Intestinal Research*, 17(9): 202–204.
- Kobayashi Y, Watabe H, Yamada A, et al. 2015. Impact of fecal occult blood on obscure gastrointestinal bleeding: observational study. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1): 326–332.
- Lee W, Ryoo N, Suh S H, et al. 2019. Improvement in external quality assessment results for qualitative fecal immunochemical tests in Korea after feedback to manufacturers. *Annals of Laboratory Medicine*, 39(10): 584–586.
- Levin B, Lieberman D A, McFarland B, et al. 2008. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*, 134(5): 1570–1595.
- Lieberman D A. 2001. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult blood testing. *The New England Journal of Medicine*, 345(8): 555–563.
- Meng X, Zhou C, Hu J, et al. 2006. Musk deer farming in China. *Animal Science*, 82(1): 1–6.
- Wang Y H, Liu S Q, Yang S, et al. 2016. Determination of ovarian cyclicity and pregnancy using fecal progesterone in forest musk deer (*Moschus berezovskii*). *Animal Reproduction Science*, 170: 1–9.
- Yang Q, Meng X, Feng Z, et al. 2003. Conservation status and causes of decline of musk deer (*Moschus spp.*) in China. *Biological Conservation*, 109(3): 333–342.
- Ye Y Y, Deng Y, Mao J J, et al. 2018. Development of a combined human transferrin–hemoglobin lateral immunochromatographic assay for accurate and rapid fecal occult blood test. *Clinical Laboratory*, 64(17): 805–813.
- Zhao G J, Ma T Y, Tang W J, et al. 2019. Gut microbiome of Chinese forest musk deer examined across gender and age. *Biomed Research International*, 2019: 9291216.
- 韩红金, 蔡永华, 程建国, 等. 2019. 圈养林麝(*Moschus berezovskii*)行为特征及影响因素. *四川农业大学学报*, 37(1): 116–121.
- 何迟酩, 李旭鑫, 邓家波, 等. 2011. 林麝的疾病统计 // 四川省动物学会. 四川省动物学会第九次会员代表大会暨第十届学术研讨会论文集. 成都: 四川省动物学会第九次会员代表大会, 77.
- 何迟酩, 李旭鑫, 邓家波, 等. 2012. 林麝血液生理生化指标研究. *四川动物*, 31(3): 456–459.
- 胡旭. 2019. 新编临床检验医学. 长春: 吉林科学技术出版社, 26–27
- 贾红丽. 2013. 联苯胺法、匹拉来洞法、免疫胶体金法三种粪便隐血试验测定的评价. *中国保健营养*, 1(10): 295–296
- 姜海瑞, 徐宏发, 王晓黎, 等. 2007. 麝的生物学研究现状分析. *生物学通报*, (6): 4–6.
- 姜海瑞, 薛文杰, 王涓, 等. 2008. 陕西凤县春季林麝生境的初步分析. *四川动物*, 27(1): 115–119.
- 李月, 代震宇, 廖方洪. 2018. 三种隐血检测法的方法学评价及结果分析. *重庆医科大学学报*, 42(3): 1212–1216.
- 罗茜. 2014. 林麝肠道乳酸菌耐药基因 PCR 检测及复合微生态制剂的研制. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 1–2.
- 魏雨婷, 周冉, 刘宝庆, 等. 2016. 林麝雌体粪便甲状腺激素的测定及其生物学意义. *北京林业大学学报*, 38(5): 108–111
- 熊立凡, 金大明, 胡晓波. 1998. 现代一般检验与临床实践. 上海: 上海科学技术出版社, 167–2171.
- 徐正强, 徐宏发. 2003. 饲养林麝的种群特征和幼麝的存活研究. *兽类学报*, 23(1): 17–20.
- 薛程, 孟秀祥, 徐宏发, 等. 2008. 圈养林麝春季活动节律及时间分配. *兽类学报*, 28(2): 194–200.
- 赵贵军, 封孝兰, 朱吉彬, 等. 2019. 成年与未成年圈养林麝粪便菌群多样性的比较. *兽类学报*, 39(3): 266–275.