

梅毒检测技术进展

蒙在杨¹综述,谢智光²审校(1. 广西壮族自治区亭凉医院检验科,南宁 530022;2. 广西壮族自治区瑞康医院检验科,南宁 530011)

【关键词】 梅毒; 技术进展; 梅毒螺旋体

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 21. 035 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)21-2627-02

梅毒螺旋体(TP)属于密螺旋体属苍白螺旋体的苍白亚种,是引起人类梅毒的病原体。TP 的人工培养问题迄今仍未解决,直接涂片镜检简便,但敏感性低且标本要求高。实验室诊断以血清学检测方法为主。近年来出现的新型免疫学方法和聚合酶链式反应技术具有较高的敏感性和特异性。本文将 TP 检测技术进展综述如下。

1 TP 直接涂片检测法

采用病变组织中的分泌物直接进行 TP 的观察,如找到运动活泼的苍白螺旋体可直接诊断梅毒。临床上常采用暗视野显微镜检查 TP,对一、二期梅毒的皮肤黏膜损害、淋巴结病变具有快速、简便和可靠的诊断价值,是性病实验室常用的方法,但由于敏感性较低且临床标本要求较高而限制其应用^[1]。此外,直接荧光抗体法也是一种较为常用的方法,该法通过异硫氰酸荧光素标记的 TP 抗体来鉴定 TP。灵敏性稍高于暗视野检查。直接荧光抗体法检查的优势在于既可以检测皮损分泌物,又可以检测新鲜或甲醛固定组织中的 TP。

2 非 TP 抗原血清试验

用心磷脂作抗原,测定血清中抗心磷脂抗体,试验为非特异性抗体检测试验,目前多作为梅毒的常规筛查试验。这类试验可观察疗效、复发及再感染,适用于一、二期梅毒的诊断,而不适于诊断三期梅毒,包括潜伏梅毒、神经梅毒。美国疾病预防控制中心认可的磷脂抗体检测方法包括性病研究实验室试验(VDRL)、快速血浆反应素环状卡片试验(RPR)、不加热血清反应素试验(USR)、甲苯胺红不加热血清反应素试验(TRUST)^[2]。

2.1 VDRL VDRL 是从牛心肌中提取的心磷脂,适量加入胆固醇及卵磷脂以提高敏感性,通常称这种抗原为心肌脂抗原。VDRL 试验属于微量玻片絮状沉淀法,假阴性反应可能是由于不正确的操作或抗体过剩引起的前带状效应,是惟一推荐用于检测脑脊液反应素的试验^[2],对诊断神经梅毒具有重要价值,可作定量及定性试验,操作简单,试剂及对照血清已标准化,费用低。缺点是对一期梅毒敏感性和特异性不高,抗原必须是新鲜的。

2.2 RPR RPR 是 VDRL 试验的改良,灵敏度较 VDRL 高,特别是在早期梅毒。RPR 检测血清中非特异性抗体,所用抗原为标准的牛心肌脂抗原,主要用于一期梅毒的诊断,该方法操作简便、快速、可以定性,也可以定量,结果容易判定、不需灭活、不需显微镜、抗原不需新鲜配制等优点,适用于大量标本检测。缺点是当抗体含量过高时,易出现阴性。对潜伏期、神经梅毒亦不敏感。

2.3 USR VDRL 抗原的改良,在玻片上做絮状反应,肉眼读取结果。优点是血清不需加热灭活,抗原悬液可保存 4 个月,不需即时配制,节省操作时间,但主观性强,易出现漏检。USR 与 RPR 可作为疗效观察或随访是否复发或再感染的指征。

2.4 TRUST TRUST 所用的抗原是从牛心提取的心磷脂

和从鸡蛋黄提取的卵磷脂及胆固醇组成,与 RPR 比较,TRUST 是 VDRL 试剂中加了甲苯胺红溶液,阳性呈红色的不同程度的凝块悬于液体中,在白色纸卡上,结果清晰易读,简便快速,稳定性好,对非特异性反应素抗体导致的阳性标本 TRUST 的检出率和重复性都强于 RPR,TRUST 比 RPR、USR 效价测定高一个滴度。缺点是血脂血症和抗心磷脂抗体阳性的血清均可干扰而出现假阳性结果,而且该试验在非淋菌性尿道炎患者中存在生物学假阳性。

3 TP 抗原血清试验

用活的或死的 TP 或其成分测定血清中 TP-IgG/IgM 抗体。

3.1 TP 血球凝集试验(TPHA) TPHA 用火鸡或羊红细胞作为抗原载体,吸附从兔睾丸中提取的粗制 TP 粉碎物抗原,检测血清中特异性 TP 抗体,是目前国内常用的梅毒血清确证试验。试剂制备过程排除了各种非特异性反应,因此 TPHA 的敏感性和特异性较高。Marangoni 等^[3]用 TPHA 和免疫印迹法对 244 份血清和 203 份潜在干扰样品进行对比检测后得出其敏感性和特异性分别为 99.2%和 98.5%。但 TPHA 操作较麻烦,所需时间较长,且易发生自凝现象和生物学假阳性。

3.2 TP 明胶凝集试验(TPPA) TPPA 是美国疾病预防控制中心 2002 年推荐用作梅毒确证试验,也是我国实验室近几年来临床常用的梅毒确证试验。作为梅毒抗体检测的确证方法,有着很高的敏感度和特异性,操作较简便,结果清晰易判断,但价格昂贵且结果判断难以自动化。

3.3 TP 酶联免疫吸附试验(TP-ELISA) TP-ELISA 是用双抗原夹心法测定梅毒特异性抗体。主要检测 TP 的 IgG 和 IgM 抗体,国内外的研究表明,TP-ELISA 是目前检测梅毒的一种良好方法,和 TPHA、TPPA 等有良好的相关性,敏感性为 93.0%~100.0%,特异性为 98.3%~99.8%^[4]。TP-ELISA 检测操作简便,不受样本中纤维蛋白和溶血等影响,一次可进行多份样本的检测,可用作筛查和确证试验。

3.4 TP 金标法 金标法是以基因工程方法生产的重组 TP 外膜蛋白为包被和标记抗原,采用胶体金标记和免疫层析技术,具有比传统方法快速、简便、灵敏度高、特异性强及无需仪器设备之特点。Lin 等^[5]采用优化了的具有梅毒特异性的重组蛋白 TPN17 和 TPN47 作为标记抗原,建立检测血清中梅毒抗体 IgM 的 TP 金标法,经过多年的验证,其敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为 98.21%、99.04%、93.75%、99.73%、102.3、和 0.018,灵敏度、特异性与 TPPA 相比差异无统计学意义,比 RPR、TRUST 好。但金标记试验进行实验室质控还存在困难,标准方面还难以形成统一。

4 聚合酶链反应(PCR)

PCR 是一种体外扩增 DNA 技术。当存在模板 DNA、底物、上下游引物和耐热 DNA 聚合酶时,经过多次变性-复性-延

伸反应的循环过程,模板 DNA 就可得到大量扩增。目前,对 TP 的全基因组测序已经完成,TP 含一个环状的染色体,由 1 138 006 个碱基对组成,有 1 041 个开放读码框架^[6]。可以根据 TP 特异性基因序列设计引物,进行 PCR 检测。选择特异性高的靶基因是 DNA 扩增首先考虑的问题,针对 TP 的 PCR,早期常用的靶基因有基础膜蛋白基因、TPF-1 蛋白、膜蛋白基因、 47×10^3 蛋白基因等特异性较低^[7],核糖体 RNA16sr 序列、DNA 多聚酶 I 基因具有较高的特异性^[7-8]。梅毒 PCR 检测方法有常规 PCR、巢式 PCR、逆转录-PCR、多重 PCR 和实时 PCR。常规 PCR 只需要设计一对相应的引物,扩增后需做凝胶电泳鉴定,故操作比较繁琐,同时扩增产物极易受到污染造成假阳性。巢式 PCR 先用一对外引物进行第一轮 PCR,然后再使用第一对引物扩增的 DNA 序列内部的一对引物再次扩增,因其采用 2 对引物进行 2 轮扩增,因此敏感性和特异性均有所增强。优点是减少扩增产物的污染,缺点是增加了每次试验的复杂性。逆转录-PCR 是提取组织或细胞中的总 RNA,以其中的 mRNA 作为模板,采用 Oligo(dT)或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA;再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,而获得目的基因或检测基因表达。用于逆转录-PCR 设计引物的靶基因是 16S rRNA,也需要 Southern 印迹杂交试验来保证其特异性,因此,操作比较繁琐,临床上不常使用。多重 PCR 是在同一个反应管中用多对引物同时扩增几条 DNA 片段,目前常用于与其他病原体同时检测^[9-10]。PCR 技术应用至今已有 20 余年,随着科技及检测技术的进步,近年来出现的实时荧光定量 PCR 技术实现了从定性到定量的飞跃。实时荧光定量 PCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用对荧光信号积累的实时检测来监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。Heymans 等^[11]选择 *poIA* 作为靶基因,正向引物为 5'-GGT AGA AGG GAG GGC TAG TA,反向引物为 5'-CTA AGA TCT CTA TTT TCT ATA GGT ATG G 和 Taqman 探针序列为 5'-FAM-ACA CAG CAC TCG TCT TCA ACT CC-BHQ1,对 716 例疑似梅毒患者进行检测。同时用暗视野显微镜进行对比检测,结果相对于临床诊断的敏感性为 72.8%,特异性为 95.0%,阳性预测值为 89.2%,阴性预测值为 95.0%。但用 Gayet-Ageron 等^[12]报道实时荧光定量 PCR 检测 TP 全血和血清样品时敏感性较低。实时荧光定量 PCR 不仅实现了对 DNA/RNA 模板的定量,而且采用完全闭管荧光检测,不需要电泳确证,自动化程度高,降低了 PCR 产物污染造成的假阳性。因而在一定程度上具有较高的灵敏度和特异性,目前已广泛应用于分子生物学研究和医学研究等领域。

5 小 结

上述方法是临床上检测 TP 的常用方法,经过多年的优化提高,血清学试验发展得比较成熟,但由于机体感染 TP 后经过一段时间才产生抗体,不能做到早期诊断。PCR 虽然快速、敏感性和特异性高,但检测费用高也限制其在基层实验室广泛应用。同时 PCR 需要特异性高的 TP 靶基因,目前除梅毒螺旋体 DNA 多聚酶 I 基因(*TP-porA*)特异性较高外,大部分与其他微生物具有一定的同源性,特异性还不理想。因此,以 *porA* 基因为靶点的 PCR 在临床上应用后,显示高度的特异性和敏感性,随着实时荧光定量 PCR 的不断完善,PCR 技术在

梅毒诊断上将具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Leslie DE, Azzato F, Karapanagiotidis T, et al. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 93-96.
- [2] Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005, 16(1): 45-51.
- [3] Marangoni A, Moroni A, Accardo S, et al. Laboratory diagnosis of syphilis with automated immunoassays[J]. J Clin Lab Anal, 2009, 23(1): 1-6.
- [4] Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis[J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(1): 1-21.
- [5] Lin LR, Tong ML, Fu ZG, et al. Evaluation of a colloidal gold immunochromatography assay in the detection of *Treponema pallidum* specific IgM antibody in syphilis serofast reaction patients; a serologic marker for the relapse and infection of syphilis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 10-16.
- [6] Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *treponema pallidum*, the syphilis spirochete[J]. Science, 1998, 281(5): 375-388.
- [7] Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, et al. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(6): 1348-1352.
- [8] Rodes B, Liu H, Johnson S, et al. Molecular cloning of a gene(*poIA*) coding for an unusual DNA polymerase I from *Treponema pallidum*[J]. J Med Microbiol, 2000, 49(7): 657-667.
- [9] Scott LJ, Gunson RN, Carman WF. A new multiplex real-time PCR test for HSV1/2 and syphilis; an evaluation of its impact in the laboratory and clinical setting[J]. Sex Transm Infect, 2010, 86(7): 537-539.
- [10] McIver CJ, Rismanto N, Smith C, et al. Multiplex PCR testing detected higher than expected rates of cervical Mycoplasmas, Ureaplasmas, Trichomonas and viral agents in sexually active Australian women[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(5): 1358-1363.
- [11] Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, et al. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 497-502.
- [12] Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples[J]. Sex Transm Infect, 2009, 85(4): 264-269.