

梅毒螺旋体抗体化学发光免疫检测方法的建立及其临床应用^{*}

柳丽娟¹, 戴振贤², 卓传尚¹, 谢玉玲², 吴玉水^{2△} (1. 福州市传染病医院检验科 350025;

2. 福建省洪诚生物药业有限公司, 福建莆田 351254)

【摘要】 目的 建立梅毒螺旋体抗体化学发光免疫检测方法, 并分析其临床应用价值。**方法** 应用基因工程重组的梅毒螺旋体外膜脂蛋白 TP15、TP17 和 TP47 抗原混合包被微孔板, 并以辣根过氧化物酶标记此 3 种抗原蛋白, 结合鲁米诺化学发光底物系统, 建立梅毒螺旋体抗体双抗原夹心化学发光检测方法。应用梅毒螺旋体抗体诊断试剂国家参考品分析所建立方法的特异性、灵敏度、稳定性和精密性。所建立的方法与日本富士 TPPA、雅培化学发光试剂同时检测临床血清样本 352 份, 比较检测结果。**结果** 所建立的方法符合国家参考品质量标准。批内变异系数 4.68%~5.77%、批间变异系数 12.82%; 试剂盒置 37℃ 考核 3 d, 其稳定性良好。与 TPPA 法、雅培化学发光法对照, 阳性符合率分别为 98.2%、96.55%; 阴性符合率分别为 99%、98.64%; 总符合率分别为 98.9%、98.58%; Kappa 值分别为 0.96、0.95, 一致性强度均最强。**结论** 成功建立了特异、敏感和稳定的梅毒螺旋体抗体化学发光免疫检测方法, 适用于梅毒感染的批量筛查, 具有较大的临床应用价值。

【关键词】 梅毒; 梅毒螺旋体特异性抗体; 化学发光法; 梅毒螺旋体明胶凝集试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.05.027 文章标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)05-0569-02

近年来由梅毒螺旋体(TP)引起的病毒性传播疾病的发病率在我国呈上升趋势^[1]。梅毒临床表现复杂, 容易漏诊或误诊。因此, 梅毒的血清学检查对鉴别诊断、早期治疗和阻断传播途径极为重要^[2]。梅毒的血清学检查作为输血和术前的必检项目, 包括梅毒血清反应素检测和梅毒螺旋体特异性抗体检测。前者敏感性和特异性不理想, 后者特异性和敏感性好, 成为最重要的诊断指标之一^[3-5]。本文应用基因工程重组的梅毒螺旋体外膜脂蛋白 TP15、TP17 和 TP47 抗原混合包被微孔板, 并以辣根过氧化物酶标记此 3 种抗原蛋白, 结合鲁米诺化学发光底物系统, 成功建立梅毒螺旋体抗体双抗原夹心化学发光检测方法, 并初步应用于临床标本的检测。

1 材料与方法

1.1 标本来源 福州市传染病医院 2011 年 5 月 11 日至 11 月 22 日就诊患者梅毒抗体阳性血清 47 份, 及 2011 年 11 月 23 日至 12 月 7 日门诊或住院患者梅毒抗体检测血清标本 305 份, 共 352 例, 其中男 279 例, 女 73 例, 年龄 1~92 岁, 平均 (40.1±15.1) 岁, 所有血清均-30℃ 保存待检。

1.2 主要试剂与仪器 鲁米诺及其增强剂对碘苯酚购自 Sigma 公司; HC-CLA-III 化学发光分析仪 (洪诚公司产品); 洗板机 (anthos fluido); ARCHITEC I1000 化学发光免疫分析仪 (雅培), 白色不透明微孔板购自深圳市金灿华实业有限公司; TP15、TP17 和 TP47 抗原以及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 TP15、TP17 和 TP47 抗原均购自深圳市菲鹏生物股份有限公司; 对照试剂: 日本富士梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验 (TP-PA), 试剂批号: VN10813; 雅培 ARCHITEC 全自动化学发光检测, 试剂批号: 09131LP03。TP 抗体诊断试剂国家参考品购自中国食品药品检定研究院, 批号: 240013-200901。

1.3 化学发光检测方法

1.3.1 化学发光底物配制 化学发光底物液分 A 液和 B 液, A 液用鲁米诺及其增强剂对碘苯酚配制, B 液为 H₂O₂ 溶液, 使用时 A 液和 B 液等量混合后加入。

1.3.2 阴阳性对照品配制 分别取多份梅毒螺旋体抗体阴性

或阳性血清, 经 60℃ 1 h 灭活, 过滤除菌后适当稀释配制。

1.3.3 抗原包被板的制备 用 0.05 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液为包被液, 将 TP15、TP17 和 TP47 混合抗原作不同稀释度稀释后, 每孔 100 μL 加入微孔板中, 置 4℃ 包被 24 h。PBS 洗涤 3 次后, 加 0.5% BSA 的 pH7.4 的 PBS 封闭液, 室温 2 h 后弃去封闭液, 除湿干燥后备用。

1.3.4 实验方法 采用双抗原夹心一步法检测 TP 抗体。主要操作步骤是: 包被板设阴性对照、阳性对照、待检样品孔。分别加入对照血清和血清标本 50 μL, 然后每孔再加 HRP 标记的 TP 混合抗原结合物 (每孔 50 μL, 酶结合物 1:3 000 稀释), 振荡混匀后, 于 37℃ 温育 60 min; 然后用 PBS 洗板 5 次后拍干; 最后每孔加发光底物液 (A 液和 B 液等量混合) 100 μL, 混匀后室温避光放置 5 min, 用化学发光分析仪测量相对发光值 (RLU)。

1.3.5 结果判定 Cut off 值=阴性对照 RLU 均值×2.1; 样品的 RLU 值大于或等于 Cut off 值判定为 TP 抗体阳性; 否则判定为 TP 抗体阴性。

1.4 准确性实验 将生产的三批梅毒螺旋体抗体化学发光免疫检测试剂 (批号: 111110; 111120; 111130), 检测 20 份 TP 抗体国家阴性参考品, 10 份国家阳性参考品、精密度参考品以及 L1、L2、L3 和 L4 共 4 份灵敏度参考品。

1.5 稳定性实验 将 TP 抗体化学发光诊断试剂置 37℃ 3 d 后, 检测 20 份 TP 抗体诊断试剂国家阴性参考品、10 份国家阳性参考品、精密度参考品以及 L1、L2、L3 和 L4 共 4 份灵敏度参考品。

1.6 与对照试剂进行比较 严格按照试剂盒中操作步骤进行检测, 并在试剂盒有效期内使用。

2 结果

2.1 准确性 将生产的三批梅毒螺旋体抗体化学发光免疫检测试剂 (批号: 111110; 111120; 111130) 检测 TP 抗体诊断试剂国家参考品, 检测结果符合均国家质量标准, 结果见表 1。

2.2 稳定性 将 TP 抗体化学发光诊断试剂置 37℃ 3 d 后,

^{*} 基金项目: 福建省莆田市科技计划项目 (2008C18)。△ 通讯作者, E-mail: wawater@126.com。

检测 20 份 TP 抗体诊断试剂国家阴性参考品结果为全部阴性;检测 10 份国家阳性参考品结果全部为阳性;精密度参考品检测的批内变异系数为 8.19%,符合国家质量标准要求;L1、L2、L3 和 L4 灵敏度参考品检测结果为全部符合国家质量标准要求。

2.3 与其他进口试剂比较

2.3.1 以 TPPA 结果为参照标准,特异性(阴性符合率) = $(292/295) \times 100\% = 99.0\%$;灵敏度(阳性符合率) = $(56/57) \times 100\% = 98.2\%$;总符合率 = $(348/352) \times 100\% = 98.9\%$ 。见表 2。与参照试剂比对,Kappa 值 = 0.96,一致性强度最强(0.81~1.0)。

表 1 三批产品检测 TP 抗体诊断试剂国家参考品实验结果				
项目	国家质量标准	111110	111120	111130
阴性参考品符合率	20/20	20/20	20/20	20/20
阳性参考品符合率	10/10	10/10	10/10	10/10
灵敏度参考品符合率	L1 阳性	阳性	阳性	阳性
	L2 阳性	阳性	阳性	阳性
	L3 阳性或阴性	阴性	阴性	阴性
	L4 阴性	阴性	阴性	阴性
精密度符合率(%)	批内 CV≤15.0	4.68	5.56	5.77
	批间 CV≤20.0	三批试剂的批间 CV 为 12.82		

表 2 本化学发光试剂与 TPPA 试剂测定结果对比(n)			
本化学发光试剂盒	TPPA 对照试剂盒		合计
	阳性	阴性	
阳性	56	3	59
阴性	1	292	293
合计	57	295	352

表 3 本化学发光试剂与 TPPA 试剂测定结果对比(n)			
本化学发光试剂盒	雅培对照试剂盒		合计
	阳性	阴性	
阳性	56	3	59
阴性	2	291	293
合计	58	294	352

表 4 352 例标本中三种试剂检测不一致结果			
标本序号	TPPA	本化学发光试剂(S/CO)	雅培对照试剂(S/CO)
23	弱+	—(0.14)	—(0.53)
25	—	+(1.08)	—(0.57)
140	—	+(4.96)	—(0.09)
142	—	+(1.27)	—(0.09)
208	—	—(0.13)	+(3.32)
351	—	—(0.20)	+(1.17)

注: + 表示阳性, — 表示阴性。

2.3.2 与雅培 ARCHITEC 全自动化学发光检测结果比较,

阴性符合率 = $(291/295) \times 100\% = 98.64\%$;阳性符合率 = $(556/58) \times 100\% = 96.55\%$;总符合率 = $(56 + 291)/352 \times 100\% = 98.58\%$;Kappa 值 = 0.95,一致性强度最强,见表 3。两者检测结果不一致的样本 S/CO<5.0,TPPA 检测结果均阴性,见表 4。

3 讨 论

目前临床常用的 TP 抗体的检测方法有梅毒螺旋体血球凝集试验、TPPA、荧光梅毒螺旋体抗体吸附试验、酶联免疫吸附试验、化学发光法等。前三者检测试剂成本高,操作较烦琐,耗时较长,不适合大量标本的筛查。酶免法试剂是目前检验科常用的免疫学检测方法,适合梅毒的大规模筛查,但灵敏度和特异性不及前三者,且存在一定的假阳性。而化学发光免疫检测方法由于灵敏度高、特异性强、操作简便、快速、线性范围较宽等优点,被认为是最有发展前景的实验室诊断方法之一^[5-6]。由于进口产品价格昂贵,因此成功研制和生产抗梅毒螺旋体测定试剂盒化学发光免疫检测试剂盒具有重大的经济和社会效益。

本研究应用基因工程重组的梅毒螺旋体外膜脂蛋白 TP15、TP17 和 TP47 抗原混合包被微孔板,并以辣根过氧化物酶标记此 3 种抗原蛋白,结合鲁米诺化学发光底物系统,建立了梅毒螺旋体抗体双抗原夹心化学发光检测方法。应用 TP 抗体诊断试剂国家参考品分析所建立方法的特异性、灵敏度、稳定性和精密性,并与进口 TPPA、雅培发光,比较检测临床血清样本 352 份。结果表明所建立的方法用于检测梅毒螺旋体抗体国家参考品,符合国家参考品质量标准。批内变异系数 4.68%~5.77%、批间变异系数 12.82%;试剂盒置 37℃ 考核 3d,其稳定性良好。与 TPPA 法、雅培化学发光法对照,阳性符合率分别为 98.2%、96.55%;阴性符合率分别为 99%、98.64%;总符合率分别为 98.9%、98.58%;Kappa 值分别为 0.96、0.95,一致性强度均最强(0.81~1.0),本研究试剂与进口检测试剂之间具有等效性。本文建立的方法具有操作简便、检测时间短,容易自动化,适合批量检测,便于及时地报告检测结果。因此,本研究成功建立了特异、敏感和稳定的梅毒螺旋体抗体化学发光免疫检测方法,适用于梅毒感染的快速批量筛查,具有较大的临床应用价值。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心性病控制中心. 2006 年全国梅毒与淋病疫情分析报告[R]. 北京:中国疾病预防控制中心性病控制中心,2006.

[2] 马秀清,扎洛,王琰. 输血及术前患者血清感染性指标监测可行性分析[J]. 青海医药杂志,2004,34(5):41-42.

[3] 孙俊,刘美华,闫忠. 两种梅毒检测方法的比较[J]. 检验医学与临床,2011,8(9):1039,1041.

[4] 侯喜琴,黄朝阳,戴淑惠,等. TPPA、TRUST 和电化学发光法检测梅毒螺旋体效果比较[J]. 中国临床实用医学,2010,4(9):170-171.

[5] 马红霞,周运恒,杨茜,等. 不同的梅毒血清学试验方法检测 1808 例血清标本结果分析[J]. 第二军医大学学报,2011,32(12):1350-1352.

[6] 汪晨,吴洁,宗晨,等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学,2012,40(1):3-10.