

化学发光微粒子免疫分析法筛查梅毒螺旋体特异性抗体的临床研究*

范婷婷, 张 婷, 欧阳立杰, 万舒婷(广州医科大学附属第一医院检验科, 广州 510120)

【摘要】 目的 用化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)联合梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)和甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)检测梅毒抗体(TP-Ab),探讨 CMIA 在筛查梅毒螺旋体特异性抗体中的临床应用价值。**方法** 采用 CMIA 对住院和门诊患者进行 TP-Ab 筛查,阳性标本再进行 TPPA 和 TRUST 的检测,对比分析 3 种检测方法的检验结果的符合率。**结果** 25 030 例血清标本经 CMIA 筛查共检出 TP-Ab 阳性 732 例,检出率为 2.9%。以 TPPA 和 TRUST 对阳性标本进行联合检测的阳性检出率分别为 78.7%、37.2%。以 TPPA 为标准参考方法,CMIA/S/CO 在 1~<9 的阳性符合率为 29.7%~90.1%,S/CO≥9 的阳性符合率为 100.0%。**结论** CMIA 可取代传统的非密螺旋体抗原血清试验用于高通量梅毒抗体的筛查。

【关键词】 梅毒螺旋体特异性抗体; 化学发光微粒子免疫分析; 梅毒螺旋体明胶凝集试验; 甲苯胺红不加热血清试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.10.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)10-1313-03

Research of the clinical application value of chemiluminescent microparticle immunoassay in screening reponema pallidum specific antibody* FAN Ting-ting, ZHANG Ting, OUYANG Li-jie, WAN Shu-ting (Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

【Abstract】 Objective To explore the clinical application value of chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) in screening treponema pallidum specific antibody by using CMIA, treponema pallidum particle agglutination experiment (TPPA) and syphilis toluidine red untreated serum test (TRUST) to detect reponema pallidum antibody (TP-Ab). **Methods** Used CMIA method to screen TP-Ab for inpatient and outpatient, positive specimens were tested by TPPA and TRUST, compared and analyzed the coincidence rate of the test result of the 3 detection methods. **Results** 25 030 serum samples were detected TP-Ab by CMIA, 732 were positive, detection rate was 2.9%. Positive samples were detected by TPPA and TRUST, the positive detection rates were 78.7% and 37.2% respectively. With TPPA as standard reference method, positive coincidence rates of S/CO in 1 to 9 by CMIA method were 29.7% to 90.1%, S/CO in 9 or more was 100.0%. **Conclusion** CMIA method could replace the traditional non treponema antigen in serum test for high throughput screening of TP-Ab.

【Key words】 treponema pallidum specific antibody; chemiluminescent microparticle immunoassay; treponema pallidum particle agglutination experiment; syphilis toluidine red untreated serum test

梅毒是由梅毒螺旋体(TP)引起的一种性传播疾病,传染性较高,危害性较大。血清学试验是诊断梅毒的重要手段。目前传统的梅毒血清学筛查试验检测的是非特异性梅毒抗体(TP-Ab),敏感性和特异性较差,在某些自身免疫性疾病、病毒感染、妊娠时易产生假阳性结果,从而造成梅毒的漏诊、误诊^[1]。化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)检测 TP-Ab 是近年来应用起来的新技术,具有灵敏高、特异性强且适于大批量筛查的优点。本文对 CMIA 筛查出 TP-Ab 阳性结果与梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)和甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)复检所得结果进行对比分析,以探讨 CMIA 在 TP-Ab 筛查中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 标本来源 血清标本来自本院 2013 年 1 月至 2014 年 1

月住院及门诊患者,共 25 030 例,其中男 15 266 例,女 9 764 例,年龄 0~101 岁。

1.2 仪器与试剂 CMIA 检测 TP-Ab 使用美国雅培公司生产的 i2000sR 全自动化学发光微粒子免疫分析仪及其配套试剂,TRUST 检测使用姜堰市新康医疗器械有限公司生产的 XK-20A RPR 旋转振荡仪和上海荣盛生物药业有限公司生产的试剂盒,TPPA 试剂盒为日本富士瑞必欧株式会社产品。所有测试的试剂均在有效期内。

1.3 检测方法 用 CMIA 对 25 030 例临床血清标本进行 TP-Ab 筛查,检测结果阳性的标本再进行 TPPA 和 TRUST 检测。分析 TPPA、TRUST 与 CMIA 检测结果以及 CMIA 阳性结果的 S/CO 值与 TPPA 检测结果的符合率。所有操作严格按照仪器及试剂盒说明书进行。3 种方法均设立阴性质控

* 基金项目:广东省医学科研基金立项课题(A2012246)。

作者简介:范婷婷,女,硕士,主管技师,主要从事临床生化免疫检验工作。

和阳性质控,所测质控均在控。

1.4 结果判断 CMIA 仪器按内置标准自动判读结果,测得的样本化学发光信号/临界化学发光信号(S/CO)≥1.0 视为 TP-Ab 检测呈反应性,结果为阳性;S/CO<1.0 则为阴性结果。TPPA 采用手工加样,肉眼判读结果,加样后经室温 2 h 后,以微量反应板中粒子环明显变大,外周边缘不均匀,且杂乱凝集在周围或在底部整体上呈膜状延展判定为阳性,出现阳性的最高稀释倍数为抗体效价,抗体效价大于或等于 1:80 为阳性;粒子成纽扣状聚集,呈现出外周边缘均匀且平滑的圆形判断为阴性。TRUST 为手工操作,加样后将卡片置水平旋转仪旋转 8 min,出现红色凝聚物判定为阳性,以呈现明显凝集反应的最高稀释度作为该血清标本的凝集效价;红色颗粒均匀分散为阴性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CMIA 筛查的阳性标本采用 TRUST 和 TPPA 检测的结果 25 030 例标本经 CMIA 筛查 TP-Ab 阳性 732 例,占 2.9%。732 例阳性标本中,TRUST 检出阳性 272 例,阴性 460 例,其中 272 例阳性标本经 TPPA 检测阳性 262 例,阴性 10 例;460 例 TRUST 阴性标本经 TPPA 检测阳性 314 例,阴性 146 例。TRUST 的阳性检出率为 37.2%(272/732),TPPA 的阳性检出率为 78.7%(576/732)。TRUST 的阳性检出率与 CMIA 和 TPPA 比较差异有统计学意义($P<0.01$)。TPPA 的阳性检出率与 CMIA 比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 CMIA 阳性标本 TPPA 和 TRUST 的检测结果(n)

项目	TRUST		合计
	阳性(n=272)	阴性(n=460)	
TPPA 阳性	262	314	576
TPPA 阴性	10	146	156
CMIA 阳性	272	460	732

2.2 CMIA 测得 S/CO 值结果区间与 TPPA 阳性符合率情况 将 CMIA 测得的 S/CO 值分成 1~<2、2~<3、3~<5、5~<7、7~<9、≥9 共 6 个组,各组与 TPPA 结果的阳性符合率分别为 29.7%、42.6%、54.8%、81.6%、90.1%、100.0%。732 例 CMIA 阳性标本与 TPPA 检测结果的阳性符合率为 78.7%。见表 2。

表 2 CMIA 阳性标本在不同 S/CO 值区间 TPPA 检测的结果(n 或 %)

CMIA 检测 S/CO	TPPA		总计	阳性符合率
	阳性	阴性		
1~<2	27	64	91	29.7
2~<3	23	31	54	42.6
3~<5	46	38	84	54.8
5~<7	71	16	87	81.6
7~<9	64	7	71	90.1

续表 2 CMIA 阳性标本在不同 S/CO 值区间 TPPA 检测的结果(n 或 %)

CMIA 检测 S/CO	TPPA		总计	阳性符合率
	阳性	阴性		
≥9	345	0	345	100.0
合计	576	156	732	78.7

3 讨 论

人体感染 TP 后可产生两种抗体,一种是非特异性抗脂质抗体,为机体感染 TP 后组织受到破坏裂解出来的一种脂质成分,其与 TP 的蛋白质结合,成为抗原,刺激机体产生抗脂质抗体的反应素,另一种是特异性 TP-AP,包括 IgM 和 IgG。梅毒螺旋体特异性抗体出现的时间较非特异性抗体早 1 周左右,在感染后 2~4 周出现 IgM 抗体,4~6 周后即出现 IgG 抗体,IgG 抗体可终身存在^[2]。世界卫生组织推荐使用性病研究实验室实验(VDRL)、快速血清反应素环状卡片试验(RPR)对血清进行过筛试验,出现阳性者用荧光螺旋体抗体吸收试验(FTA-ABS)、TPHA、TPPA 等方法作确认试验^[3]。

TPPA 是目前我国大多数性病实验室用于梅毒的确诊试验,是将 TP Nichols 株的精制菌体成分包被在红色明胶颗粒上,这种致敏粒子和样品中的 TP-Ab 进行反应发生凝集,对 TP-Ab 的检测具有高度的特异性和敏感性^[4]。但是由于 TPPA 需要手工稀释操作,检测时间较长,且需肉眼观察结果,人为影响因素较大,难以标准化,不适用于临床工作中大规模的筛查,而是作为梅毒筛选试验中阳性标本的确认试验。

TRUST 是常用的非特异性 TP-AP 筛选试验,是采用牛心肌中提取的心磷脂、胆固醇、卵磷脂组成的 VDRL 抗原重悬于含有特制的甲苯胺红溶液中制成的,其检测血清或血浆中的反应素。由于检测的反应素出现得晚,消失得早,梅毒患者经充分治疗后反应素的滴度可逐渐降低甚至完全消失,病情复发或再感染时又可由阴性转为阳性或滴度逐渐升高。所以 TRUST 在潜伏期、早期梅毒、晚期梅毒及治疗后梅毒检测中的敏感性低,常出现假阴性而漏检。有报道 TRUST 在一期梅毒的阳性率为 53%~83%,晚期梅毒的阳性率 58%~85%^[3]。TRUST 不仅敏感性低,而且特异性也不高,如患者患有急性传染病、自身免疫性疾病、疟疾、麻风等,则经常出现假阳性结果,可能是与外来因素破坏机体产生反应素有关^[5]。因此 TRUST 已不再适合作为 TP-AP 的筛查试验。

本试验中 732 例 CMIA 法筛查阳性标本经 TRUST 复检后,TRUST 的阳性检出率为 37.2%。TRUST 和 TPPA 均为阳性结果的现症梅毒患者有 262 例,占 35.8%,TRUST 阴性和 TPPA 阳性的已治愈的既往梅毒感染 314 例,占 42.9%,这是因为经过梅毒治疗后,非特异性抗体可以逐渐减少至转为阴性,而特异性抗体可终生存在,所以 TRUST 可用于梅毒的疗效观察,而 TPPA 不能作为疗效观察的指标。本研究结果还显示,有 10 例 TRUST 阳性和 TPPA 阴性的结果,要排除 CMIA 和 TRUST 的假阳性的可能性,或许是由于 TPPA 对一期梅毒敏感性稍低的缘故^[6]。此类患者需结合临床资料综合分析并跟踪随访血清学复查结果。

近年来随着基因工程技术的发展,以重组抗原而建立的酶联免疫吸附试验(ELISA)和化学发光试验(CIA)迅速用于 TP-

AP 的检测中, CIA 较 ELISA 自动化程度高、操作简单, 影响因素少而得到更为广泛的应用与推广^[7-8]。本院自 2010 年引进了美国雅培 i2000sR 免疫分析仪后, 以集合了化学发光的高敏感性和免疫分析的高特异性 CMIA 取代了 TRUST 对患者进行 TP-Ab 筛查。i2000sR 的 TP-Ab 检验采用两步骤免疫测定法, 可同时检测 IgG 和 IgM。两步法避免了钩状效应, 减少了假阴性, 检测过程中多次洗涤结合物也减少了假阳性的发生。CMIA 微粒子包被的梅毒抗原用于检测 TP15、TP17 和 TP47 的抗体, 而 TPPA 采用的是纯化的致病性梅毒螺旋体菌体抗原, 针对的是 TP15、TP45 的抗体。TP47 抗体在梅毒感染各期均高度存在, 而 TPPA 不针对该抗体, 这可能是 TPPA 对一期梅毒敏感性稍低的原因^[9]。所以 CMIA 法检测梅毒特异性抗体的敏感性较 TPPA 要高^[10-11]。

本文研究的 732 例 CMIA 阳性标本经由 TPPA 复检后有 576 例阳性, 阳性符合率为 78.7%。TPPA 的阳性检出率与 CMIA 比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 可见 CMIA 的敏感性高过 TPPA 法。此结果与熊继红等^[12]研究的经雅培 i2000sR 筛查阳性标本与 TPPA 比较的真阳性率为 77.8% 相近。CMIA 的高敏感性也带来了假阳性的弊端, 有报道妊娠、恶性肿瘤、自身免疫疾病、心血管疾病等会造成 CMIA 检测 TP-Ab 的假阳性, 假阳性的可能性因素为患者标本中含有类风湿因子、某些自身抗体、异常蛋白质等^[13]。另外, 重组抗原可能含有不符合的序列也是造成假阳性的原因, 这是因为 TpN47 有一段序列 (411~416) 和人纤维连接蛋白存在较高的同源性, 可导致某些自身免疫性疾病患者在梅毒抗体检测时发生交叉反应^[14]。虽然雅培 i2000sR 检测梅毒存在一定的假阳性, 但假阴性率很低, 本课题组研究仅为 0.3%^[15]; 郑妍等^[16]研究雅培 i2000sR 检测梅毒的假阴性率为 0.83%, 所以具有高敏感性和高特异性的雅培 i2000sR CMIA 适用于 TP-AP 的初筛试验。

在 CMIA 测得 S/CO 结果区间与 TPPA 检测结果比较中, 可以发现 TPPA 与 CMIA 的阳性符合率和 S/CO 的升高趋势是一致的。当 $S/CO \geq 9$ 时, CMIA 与 TPPA 的符合率达 100%, 假阳性率为 0, 与朱鸿等^[17]报道的 $S/CO \geq 8.0$ 和熊继红等^[12]报道的 $S/CO \geq 10.0$ 相近, 另有徐如梅等^[18]报道, 当 $S/CO \geq 20.0$ 时, CMIA 与 TPPA 的符合率达 100%。对于 CMIA 与 TPPA 的阳性率完全相符的 S/CO 阈值仍需继续研究确认, 当确定好该阈值后, CMIA 检测结果高于此阈值时则不需复查 TPPA 可直接发出报告, 减少了复检的工作量和成本, 而 CMIA 检测结果低于此阈值时, 可能会出现假阳性, 需采用其他检测方法进一步鉴定, 排除假阳性后才能发放报告, 以减少不必要的医疗纠纷。

CMIA 检测 TP-AP 操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、稳定性高, 可用于大批量标本的筛查, 代替 TRUST 成为 TP-AP 筛查的新方法, 并可与 TRUST 结合进行梅毒疗效判断, 完善了本科梅毒血清学检测操作流程, 极大地减少了梅毒的漏诊率。作为梅毒诊断的重要依据, 血清学检测结果可提示标本中是否存在抗 TP-AP, 而不能作为梅毒感染的唯一依据, 应结合患者的病史、临床症状和体检等资料综合考虑, 才能做出正确的判断。

参考文献

[1] 王华, 李代渝, 雷丽明. 梅毒螺旋体血清学检测方法比较

[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(6): 660-661.

- [2] 陈开慧, 李仁保. 4 种方法检测梅毒结果分析[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(24): 2126-2127.
- [3] 倪语星, 尚红. 临床微生物学检验[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 250-251.
- [4] 吴志周, 祝新, 柯建良, 等. TPPA 法与化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体的比较[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2008, 15(3): 138-139.
- [5] 解拥军. 4 种梅毒螺旋体检测方法的应用探讨[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(9): 1086-1087.
- [6] 潘顺, 唐振华, 罗军, 等. 19 986 例梅毒螺旋体抗体检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24): 3410-3411.
- [7] 禹梅, 华星, 刘婕, 等. 化学发光法和酶联免疫吸附试验检测梅毒螺旋体抗体的比较分析[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(4): 96-98.
- [8] Wellinghausen N, Dietsberger H. Evaluation of two automated chemiluminescence immunoassays, the LIAISON Treponema Screen and the ARCHITECT Syphilis TP, and the Treponema pallidum particle agglutination test for laboratory diagnosis of syphilis[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(8): 1375-1377.
- [9] 张良芬, 吴勤学. 梅毒螺旋体 47kD 脂蛋白的研究现状[J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2001, 27(4): 219-221.
- [10] 熊斌, 陆建国, 吴意. 发光微粒子免疫分析法对梅毒检测应用评价[J]. 实用预防医学, 2011, 18(9): 1768-1770.
- [11] 侯晓菁, 梁艳, 陈洁, 等. 化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体的实验评价[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 365-367.
- [12] 熊继红, 张秀明, 卢建强, 等. 雅培 I2000sr CMIA 法筛查梅毒螺旋体特异性抗体的测量阈值探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(6): 105-106.
- [13] 陈忠城, 胡波, 李玛, 等. 全自动化学发光免疫分析法检测梅毒抗体与 TPPA 的相关性[J]. 临床医学工程, 2013, 20(10): 1222-1223.
- [14] 白雪梅, 闪全忠, 刘欧, 等. 不同方法检测抗梅毒抗体阳性标本的分析[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(2): 96-98.
- [15] 张东梅, 徐韞健, 张婷. 化学发光微粒子免疫法和梅毒螺旋体颗粒凝集试验检测梅毒抗体的比较[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(10): 1212-1214.
- [16] 郑妍, 刘纹, 刘晓敏. ARCHITECT-i2000SR 全自动化学发光免疫分析仪检测梅毒螺旋体特异性抗体临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(18): 2246-2247.
- [17] 朱鸿, 赵乙洁. 化学发光法检测特异性梅毒抗体的 S/CO 值的实验室评价[J]. 大连医科大学学报, 2013, 35(3): 298-299.
- [18] 徐如梅, 沈菁, 陈雯, 等. CMIA 法与 TPPA 法对梅毒螺旋体抗体检测的相关性研究[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(5): 441-443.

(收稿日期: 2014-01-18 修回日期: 2014-03-18)