

周出现症状^[3]。早期先天性梅毒表现为肝脾肿大、皮疹(脓疱疹、脱皮、斑丘疹)、黄疸、慢性鼻炎、贫血、脑膜炎、肠梗阻或出血、间质性肺炎、肺脓肿、骨骼损害等^[4-5]。

本组 70 例母亲临床确诊梅毒阳性的新生儿中,70 例 TP-PA 全部阳性,其中 26 例 TRUST 阳性,TP-IgM 阳性有 18 例。TPPA 检测的是梅毒 IgM 和 IgG 的混合抗体,而血清中 TP 的 IgG 抗体,由于 IgG 相对分子质量较小,可以通过胎盘,不能判断患儿体内的 TP-IgG 究竟是来源于母体还是自身所产生。因此,TPPA 阳性的新生儿尚不能确诊感染梅毒。而 TRUST 是检测梅毒的抗类脂抗原的抗体(反应素),主要是 IgG 和 IgM 型混合抗体,反应素亦可通过胎盘到胎儿血中,如胎儿未感染,出生 3~4 个月后可自动转阴,如果滴度不减或反而上升,或高于母体的 4 倍以上,即可诊断为先天性梅毒,所以 TRUST 有助于鉴别先天性梅毒。IgM 抗体是梅毒感染最早期产生的抗体,由于 IgM 相对分子质量大,母体产生的 IgM 不能通过胎盘,故如新生儿体内检测到 TP-IgM 抗体,则可诊断其为先天性梅毒,所以 TP-IgM 抗体成为新生儿先天性梅毒的诊断和判断疗效的可靠方法。

先天性梅毒是一种可预防的疾病,积极的产前检查及孕期梅毒治疗是预防先天性梅毒的重要措施。大约 40% 未经治疗的初期或 2 期梅毒孕妇流产或婴儿在围生期死亡^[6]。先天性梅毒诊断依据:(1)家族史及其母体患梅毒;(2)典型损害和体征;(3)从损害、鼻分泌物或胎盘脐带上取材查到梅毒螺旋体;

• 经验交流 •

(4)梅毒血清试验阳性。而先天性梅毒患儿出生时 66% 无临床症状,取材查到梅毒螺旋体的阳性率也不高,所以梅毒血清试验是先天性梅毒诊断的重要依据,而 TP-IgM 抗体更是可靠的检验指标^[3]。

参考文献

- [1] 陈涵强. 新生儿先天性梅毒 52 例[J]. 实用儿科临床杂志, 1999, 14(1): 22-23.
- [2] Walker DG, Walker GJ. Forgotten but not gone; the continuing scourge of congenital syphilis[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(7): 432-436.
- [3] Hollier LM, Cox SM. Syphilis[J]. Semin Perinatol, 1998, 22(4): 323-331.
- [4] Ajayi NA, Marven S, Kaschula RO, et al. Intestinal ulceration, obstruction, and haemorrhage in congenital syphilis[J]. Pediatr Surg Int, 1999, 15(6): 391-393.
- [5] Bell C, Taxy J. Pulmonary abscesses in congenital syphilis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2002, 126(4): 484-486.
- [6] Mobley JA, McKeown RE, Jackson KL, et al. Risk factors for congenital syphilis in infants of women with syphilis in South Carolina [J]. Am J Public Health, 1998, 88(4): 597-602.

(收稿日期: 2011-06-11)

TPPA、TP-ELISA、TRUST 试验在梅毒诊治中的联合应用

周先军

(四川金域医学检验中心, 成都 610081)

摘要:目的 探讨梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验(TPPA)、梅毒螺旋体抗体酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)、梅毒甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)在梅毒检测诊断中的联合应用及在疗效观察中的作用。方法 采用 TPPA、TP-ELISA、TRUST 检测 650 例患者血清,其中术前检查患者血清 198 例,临床确诊梅毒患者 452 例。另对其中 29 例梅毒患者进行治疗前后试验检测跟踪,并对结果进行统计、比较、分析。结果 在 452 例临床诊断为梅毒的患者中,TPPA 试验全部阳性;TP-ELISA 试验阳性 450 例,假阴性 2 例;TRUST 试验阳性 208 例。在术前检查患者中 TPPA 假阳性 1 例,TP-ELISA 试验假阳性 1 例,TRUST 试验存在部分假阳性结果。29 例梅毒患者治疗后,TRUST 滴度下降或转阴者 23 例,上升 3 例,无变化者 3 例,而 TPPA、TP-ELISA 治疗前后均为阳性。结论 TPPA、TP-ELISA 对疑为梅毒患者有确证作用,但不能单独作为诊断标准,而应结合临床综合判断,对于梅毒高度怀疑患者,而 TP-ELISA 试验阴性者应用 TPPA 复查。TRUST 试验则可作为梅毒患者疗效观察及复发监测的一项指标。

关键词:梅毒; 梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验; 梅毒螺旋体抗体酶联免疫吸附试验; 梅毒血清学试验甲苯胺红不加热血清试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.056

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2011)19-2275-03

近年来我国梅毒的发病形势严峻,呈上升趋势。据报道 2009 年,梅毒报告病例数在我国甲乙类传染病报告中居第 3 位^[1]。目前大多数医院检测梅毒常用的方法为梅毒甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)、梅毒螺旋体抗体酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)、梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验(TPPA)。为更好、更快、更准确协助临床诊断、治疗梅毒,现将这 3 种方法进行比较,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2008 年 7 月至 2010 年 8 月在该检验中心进行梅毒检查的 452 例临床梅毒患者和 198 例术前检查患者的检测结果进行统计分析。

1.2 仪器与试剂 上海热电 MK3 型酶标仪,TPPA 试剂为日

本富士瑞必欧株式会社生产,TP-ELISA 试剂为上海科华生物工程股份有限公司生产,TRUST 为上海荣盛生物药业有限公司生产,所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法 所有试验均严格按照厂商说明书进行操作,每次试验均设阴阳质控对照。

1.3.1 TPPA 试验 室温条件下,在 U 形板上用稀释液将每份血清样本稀释,加入致敏粒子或未致敏粒子,静置 2 h 后观察结果,加致敏粒子孔大于或等于 1:80 为阳性。

1.3.2 TP-ELISA 试验 在每孔加入待检样本、酶标试剂各 50 μ L,轻轻振荡混匀、封板,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,洗板 5 遍,扣干。每孔加入显色剂 A、B 液各 50 μ L,混匀、封板 37 $^{\circ}$ C,15 min 再加 50 μ L 终止液混匀比色,酶标仪波长 450 nm,空白孔

调零,读取吸光度(A 值), $A <$ 临界值为阴性, $A \geq$ 临界值为阳性。

1.3.3 TRUST 定性试验 加 50 μ L 待检血清在纸卡的圆圈内,用盒中的专用针头,垂直滴加 TRUST 试剂 1 滴,以 100 r/min 离心 8 min 后在显微镜下观察凝集情况,凝集为阳性。TRUST 半定量试验:对检测样本进行倍比稀释,按定性试验方法进行检测,以最大稀释倍数凝集处作为最终滴度。

2 结 果

2.1 在 452 例临床确诊为梅毒患者(梅毒诊断参照 1995 年卫生部防疫司颁布的梅毒诊断标准)中 TPPA 阳性 452 例,TP-ELISA 阳性 450 例,TRUST 阳性 208 例。TP-ELISA 有 2 例阴性,而 TPPA 检测结果为全部阳性,对该样本进行稀释,再进行 TP-ELISA 检测,结果仍为阳性,证实为血清中梅毒特异性抗体过高而出现前带效应造成原倍血清 TP-ELISA 试验为阴性。TPPA 阳性,TRUST 阴性共 244 例,经与临床沟通,均是既往梅毒感染者。198 例术前检查患者,出现 TRUST 阳性 5 例,其中 1 例结肠癌患者术前检查 TPPA、TRUST、TP-ELISA 同为阳性,而术后均为阴性样本,后结合临床证实为假阳性样本。其余 4 例后经临床证实,排除梅毒患者。对其中 29 例梅毒患者进行治疗前后跟踪检测分析,结果发现,治疗 1 个疗程后,TRUST 滴度下降或转阴者 23 例,无变化 3 例,滴度升高 3 例。而 TPPA、TP-ELISA 测定结果治疗前后均为阳性。见表 1。

表 1 452 例梅毒患者 TPPA、TP-ELISA、和 TRUST 试验结果比较[n(%)]

方法	阳性	阴性
TPPA 法	452(100.00)	0(0.00)
TP-ELISA 法	450(99.56)	2(0.44)
TRUST 法	208(46.02)	244(53.98)

2.2 TPPA、TP-ELISA 和 TRUST 试验的特异性和灵敏度比较。见表 2~5。

表 2 TPPA 试验灵敏度和特异性结果(n)

组别	TPPA 阳性例数	TPPA 阴性例数	合计
梅毒患者组	452	0	452
非梅毒患者组	1	197	198

表 3 TP-ELISA 试验灵敏度和特异性结果(n)

组别	TPPA 阳性例数	TPPA 阴性例数	合计
梅毒患者组	450	2	452
非梅毒患者组	1	197	198

表 4 TRUST 试验灵敏度和特异性结果(n)

组别	TPPA 阳性例数	TPPA 阴性例数	合计
梅毒患者组	208	244	452
非梅毒患者组	5	193	198

表 5 29 例梅毒患者治疗后 TRUST 滴度试验结果

组别	TRUST 滴度下降(%)	TRUST 滴度不变(%)	TRUST 滴度上升(%)
治疗后梅毒患者	23(79.4)	3(10.3)	3(10.3)

3 讨 论

近年来,我国梅毒报告病例数明显增加,流行呈快速上升趋势,从 1999~2009 年发病率年均增长 14.3%,可见我国梅毒流行形势日益严峻,控制任务艰巨^[12]。

TRUST 既可进行定性也可进行半定量试验,定性试验主要用于 I、II 期梅毒筛查。半定量试验主要用于疗效观察,通过表 5 可以发现,TRUST 滴度的变化可以较好反映出梅毒患者的治疗效果,其在梅毒疗效观察中有重要作用。当 TRUST 检测结果前后两次滴度上升 4 倍或以上时,可作为判定复发、再感染的指标。但通过表 4 显示,其在梅毒不同感染时期,特别是 III 期梅毒或潜伏期梅毒时灵敏度较低。在很多报道中也指出 TRUST 等非特异性抗原试验因其是针对磷脂的抗体,在某些传染病及胶原病时会出现假阳性反应^[3]。

TP-ELISA 是利用梅毒螺旋体基因工程混合抗原检测人体内相应的梅毒螺旋体特异性抗体,其灵敏度、特异性均较高。从表 3 可看出,灵敏度、特异性均能达到 99% 以上。但方法学上的原因,当待检血清内抗体含量过高,会出现前带效应,造成假阴性结果,影响临床判断。

TPPA 可作为确认试验^[4]。虽然 TPPA 试验灵敏度、特异性均较好,但用于半定量检测时,其操作比较繁琐,反应时间较长,不利于快速检测。另因梅毒螺旋体特异性抗体在人体内存在时间较长,降低速度慢,有的个体甚至会终身存在。所以建议临床不用 TPPA 试验结果作为梅毒疗效观察指标。

综上所述,现在用于检测梅毒螺旋体的血清学方法较多。各种检测方法各有其优缺点:(1)TRUST 等非梅毒螺旋体抗原试验操作简便,灵敏度特异性较低,且有假阳性结果,主要适用于疗效观察,判定复发及再感染的监测。梅毒患者经足量规则治疗后还应定期观察,包括全身体检及非梅毒螺旋体抗原血清学试验(TRUST 试验等),以了解是否治愈或复发。梅毒治疗后第 1 年每 3 个月复查 1 次,以后每半年复查 1 次,连续 2~3 年。如血清反应由阴性转为阳性或滴定度升高四倍(如由 1:2 升为 1:8)属于血清复发,或有症状复发,均应加倍量复治。超过 2 年血清不阴转者属于血清固定,如无临床症状复发,是否再治疗,根据具体病情而定;无论再治疗与否,应作神经系统检查及脑脊液检查,以便早期发现无症状神经梅毒^[5-6]。(2)TP-ELISA 试验灵敏度、特异性均较好,但可能出现前带效应造成假阴性结果,对于临床高度疑为梅毒患者而 TP-ELISA 试验阴性者,应对血清样本稀释后再检测或采用 TPPA 试验复检,稀释时可作梯度稀释,防止因抗体滴度过高而稀释倍数不足带来的假阴性。(3)TPPA 试验灵敏度、特异性都很好,但其操作比较繁琐,反应时间长,不便于快速检测。所以为提高梅毒检出率,检验科最好使用两种以上的方法检测(非特异性抗原试验与特异性抗原试验各一种)。另因试验方法及一些干扰因素原因,梅毒血清学试验阳性结果,只提示所测标本中有类脂抗体或抗梅毒螺旋体抗体存在,不能作为患者感染梅毒螺旋体的绝对依据,阴性结果也不排除梅毒螺旋体感染^[7-9]。所有检测结果都应按照卫生部颁布的《梅毒诊断标准及处理原则》并结合临床综合分析判断。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 梅毒诊断标准及处理原则[P]. 1995, GB15974.
[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:647-650.
[3] 杨立新,曾劲峰,许晓绚,等. 血液筛查中梅毒实验方法适用性探讨[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(2):116-120.

[4] 黄永梅. TP-ELISA,TPPA 和 TRUST,RPR 梅毒检测方法的比较[J]. 国际医药卫生导报,2006,12(8):88-89.

[5] 郑春苏,黄湘宁,冯彩莲. TRUST 滴度与 TPPA 联合检测在梅毒诊断中的应用[J]. 湘南学院学报:医学版,2006,8(3):67-68.

[6] 罗晓红,段朝晖,潘貽盼,等. 甲苯胺红不加热血清试验和梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验在梅毒诊治中的应用[J]. 中国自然医学杂志,2007,9(3):219-221.

[7] 沈洪远,余伟,吴敏霞. 三种梅毒血清学试验在梅毒诊断中的应用

价值分析[J]. 临床和实验医学杂志,2008,7(1):59-60.

[8] 石玉萍,李瑞莲,王淑春. 梅毒螺旋体酶联免疫吸附试验、梅毒螺旋体被动颗粒凝集试验和快速血浆反应素试验 3 种试验方法的比较[J]. 山西医药杂志,2009,38(4):379-380.

[9] 卫生部疾病预防控制中心. 中国预防与控制梅毒规划(2010-2020 年)[S]. 2010:52.

(收稿日期:2010-10-09)

• 经验交流 •

某地区结直肠癌患者 K-Ras 基因突变检测结果分析

杨蔚蔚¹,张 玲¹,陈慧娟²,程俊峰²,胡春明²
(广州金域医学检验中心:1. 免疫室;2. 分子病理室 510030)

摘 要:**目的** 探讨广东地区结直肠癌患者组织中 K-Ras 基因突变模式,为临床治疗提供科学依据。**方法** 选取广东地区的 40 例结直肠癌患组织标本,应用聚合酶链反应以及测序法对患者 K-Ras 基因进行检测,结果采用卡方检验进行统计学分析。**结果** 在 40 例结直肠癌患者中发现 4 种 K-Ras 基因突变类型,包括密码子 12 位点 GGT→GAT、GGT→GTT、GGT→TGT 突变以及 13 位点的 GGC→GAC 突变,K-Ras 基因突变率为 35.00%。K-Ras 基因突变与年龄和性别无统计学意义。**结论** 广东地区结直肠癌患者 K-Ras 基因突变率为 35.00%(14/40)。密码子 12 位点 GGT→GAT 是突变热点,占突变的 93%,结直肠癌 K-Ras 基因突变与患者年龄及性别无关。

关键词:结直肠肿瘤; K-Ras 基因; 突变检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.057

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)19-2277-02

结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,近年来发病率呈上升趋势。结直肠的发生、发展是一个多阶段、多基因改变的复杂的生物学过程,包括多个癌基因的激活和抑癌基因的失活,研究表明,K-Ras 癌基因的激活与结直肠癌的发生、发展密切相关,40%的患者 K-Ras 基因发生突变^[1]。K-Ras 基因以点突变为主,突变热点位于第 2 外显子的 12、13 密码子^[2]。为探讨广东地区结直肠癌中患者组织中 K-Ras 基因突变模式以及突变特点,现采用 PCR 扩增加测序法对患者标本中 K-Ras 基因突变情况进行分析,以期为临床治疗提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广东地区各个医院送往金域检验中心的结直肠癌患者的蜡块标本 40 例。其中结肠癌 28 例,直肠癌 12 例,男女性比例 5:3;最大年龄 70 岁,最小年龄 29 岁,平均年龄 58.5 岁。每个蜡块均由病理医师检验,其中所含肿瘤组织都超过 50%。

1.2 检测方法 应用聚合酶链反应以及测序法对患者 K-Ras 基因进行检测。主要材料与试剂 PCR 体系:2×Taq PCR MasterMix(#KT201)购自 Tiangen 公司;FFPE DNA 提取试剂盒(cat # 56404) 购自 QIAGEN,100 bp DNA Marker (DL100)购自上海天为时代有限公司;TBE 等均参考《分子克隆》附录部分配制;琼脂糖、胰酶、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙酸、溴化乙啶等,主要购自 Gibico 公司。PCR 产物采用直接测序,由 Invitrogen 公司完成双向测序。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验进行统计。

2 结 果

2.1 40 例结直肠癌中发生突变的百分率 见表 1。

2.2 14 例结肠癌患者 K-Ras 基因各个位点的突变率 见表 2。

2.3 40 例结肠癌患者 K-Ras 基因突变与年龄的关系 见

表 3。

表 1 40 例结直肠癌中发生突变的百分率

组别	例数(n)	百分率(%)
K-Ras 基因突变组	14	35
K-Ras 基因未突变组	26	65

表 2 14 例结肠癌患者 K-Ras 基因各个位点的突变率

密码子	突变类型	氨基酸改变	例数(n)	突变率(%)
12 位点	GGT→GTT	Gly→Val	4	29(4/14)
12 位点	GGT→GAT	Gly→Asp	7	50(7/14)
12 位点	GGT→TGT	Gly→Cys	2	14(2/14)
13 位点	GGC→GAC	Gly→Asp	1	0.7(1/14)

表 3 40 例结肠癌患者 K-Ras 基因突变与年龄的关系

年龄(岁)	未突变例数 (n)	突变例数 (n)	突变检出率 (%)	χ^2 值	P 值
≤50	10	2	17	0.05	>0.05
>50	15	13	46		

2.4 40 例结肠癌患者中 K-Ras 基因突变与性别的关系 见表 4。

表 4 40 例结肠癌患者中 K-Ras 基因突变与性别的关系

性别	未突变例数 (n)	突变例数 (n)	突变检出率 (%)	χ^2 值	P 值
男性	18	7	28	2.56	>0.05
女性	7	8	53		