

• 检验技术与方法 •

4 种梅毒血清学检测方法的临床应用及评价

尹 静, 徐贵江, 刘 艳

(江苏省扬州市妇幼保健院检验科, 江苏扬州 225002)

摘要:目的 比较目前常用的 4 种梅毒血清检测方法即梅毒酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)、梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)、梅毒快速血浆反应素试验(RPR)及梅毒螺旋体抗体检测-乳胶法(TP-AD)在梅毒检测中的价值。方法 对 5 870 例门诊及住院患者的标本,先用 TP-ELISA 进行筛查,对查出的 121 例阳性标本同时做 TP-AD、TPPA 与 RPR 的检测,对检测结果进行比较分析。结果 5 870 例标本用 TP-ELISA 法检出阳性 121 例,检出率为 2.06%。121 例阳性标本同时做 TPPA、RPR 及 TP-AD 检测,TPPA 检出阳性 119 例,符合度为 98.34%;RPR 检出阳性 49 例,符合度为 40.41%;TP-AD 检出阳性 113 例,符合度为 93.39%。以 TPPA 的检测结果为标准,经过统计学处理,TPPA 与 TP-AD 之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),TPPA 与 RPR 之间,比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 4 种方法各有适用性,TP-ELISA 法特异性好、灵敏度高,操作简单,适用于大批孕、产妇及健康人群的体检。TPPA 特异性好、准确性高,适用于确诊,RPR 适用于梅毒活动期患者的监测与疗效观察。TP-AD 与 ELISA 法比较,敏感性略差,特异性好可用于没有特定仪器时的筛查。

关键词:梅毒抗体; 梅毒酶联免疫吸附试验; 梅毒快速血浆反应素试验; 梅毒螺旋体颗粒凝集试验; 梅毒螺旋体抗体检测-乳胶法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.23.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)23-3244-03

Clinical application and evaluation of 4 kinds of siphilis serological detection method

Yin Jing, Xu Guihong, Liu Yan

(Department of Clinical Laboratory, Yangzhou Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225002, China)

Abstract: Objective To compare the value of four kinds of commonly used serological detection method for detecting Treponema Pallidum, i. e., Treponema Pallidum enzyme-linked immunosorbent assay (TP-ELISA), Treponema pallidum particle agglutination test (TPPA), Treponema Pallidum rapid plasma reagin test (RPR) and Treponema Pallidum antibody detection (TP-AD, emulsion method). **Methods** 5 870 specimens from outpatients and inpatients were screened by TP-ELISA, 121 cases of detected positive specimen were simultaneously detected by TP-AD, TPPA and RPR. Then the detection results were performed the comparative analysis. **Results** Among 5 870 specimens, 121 cases were positive by ELISA, the detection rate was 2.06%. Among 121 positive cases, 119 cases were positive by TPPA, the conformity degree was 98.34%, 49 cases were positive by RPR, the conformity degree was 40.41%, 113 cases were positive by TP-AD, the conformity degree was 93.38%. With the TPPA results as the standard, there was no statistically significant difference between TPPA and TP-AD ($P>0.05$), but there was statistically significant difference between TPPA and RPR ($P<0.01$). **Conclusion** The four kinds of method have their applicability. ELISA d has good specificity and high sensitivity, and is simple to operate and suitable for the physical examination of large amount of pregnant women, parturients and normal people. TPPA has good specificity and high accuracy, is suitable for definite diagnosis. RPR is suitable for the monitoring and the curative effect observation in the patients with the active stage of siphilis. Compared with ELISA, TP-AD has slightly less sensitivity, but good specificity and can be used for screening without specific instrument.

Key words: Treponema Pallidum antibody; Treponema Pallidum, i. e., Treponema Pallidum enzyme-linked immunosorbent assay; Treponema Pallidum rapid plasma reagin test; Treponema Pallidum particle agglutination test; Treponema Pallidum antibody detection

梅毒是由苍白螺旋体引起的一种性传播疾病,具有高度的传染性和致病性^[1]。它可侵犯人体的多个脏器,包括皮肤,黏膜及内脏器官,临床表现比较复杂,病程长,危害大。母体还可以通过胎盘传给胎儿,近年来发病率呈逐年上升之势^[2]。由于诊断初期有些患者隐瞒病史,陈述不准确加上抗菌药物广泛使用,故血清学检测成为诊断梅毒的重要依据之一^[3-4]。临床上梅毒的诊断主要根据临床表现和梅毒血清学检测,梅毒血清学检测分为两类,一类为非梅毒螺旋体抗原血清学试验,即检测非特异性抗体主要包括快速血浆反应素试验(RPR)和甲苯

胺红不加热血清试验(TRUST)。另一类是梅毒螺旋体抗原血清学试验,用于检测梅毒特异性抗体,包括酶联吸附试验(ELISA)和梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)。因梅毒螺旋体所致的疾病不仅对健康和生命造成极大威胁,还对婚姻家庭造成影响,故相关检测结果的准确性与否不仅会引起医疗纠纷,而且是敏感的医学和社会问题。所以选择简单、快速、准确的检测方法对该病的早期诊断及疾病控制有着重要意义。本文对临床常用的梅毒酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)、TPPA、RPR 和梅毒螺旋体抗体检测-乳胶法(TP-AD)4 种方法进行比

较分析,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 均来自于 2013 年 7~12 月的 5 870 例该院门诊,住院患者及健康孕、产妇的体检人群。

1.2 仪器 DNM960Z-G 酶标仪,DEM-3 自动洗板机。

1.3 试剂 TP-ELISA 试剂盒由北京金豪制药股份有限公司生产,TPPA 试剂盒由日本富士瑞必欧株式会社生产,RPR 试剂盒由上海荣盛生物技术有限公司生产,TP-AD 试剂盒由杭州艾博生物医药有限公司生产。

1.4 方法 所有送检的 5 870 例标本用 TP-EILSA 法筛查,其中 121 例阳性标本同时进行 TPPA、RPR(血清 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 稀释),TP-AD 的检测。(1)TP-ELISA:为双抗原夹心一步法用 DNM960Z-G 酶标仪检测,标本 A 值≥Cut off 值为阳性。(2)TPPA:加血清 25 μL,标本稀释液 100 μL,混匀后加 25 μL 在特定的微孔板,再加入 25 μL 稀释液倍比稀释,重复以上操作加入 TPPA 25 μL,充分混匀 15℃~30℃静置 2 h 后观察结果。(3)RPR:在卡片规定的圆圈内加入 50 μL 待测血清,用专用针头和滴管加抗原悬液 1 滴,转动卡片 8 min,出现黑色凝块为阳性。(4)TP-AD:将试剂置于平坦的台面上,垂直滴加 2 滴(约 50 μL)标本置于加样区,再加 1 滴缓冲液,同时计时,等待红色带出现,10~30 min 内判断。具体操作方法严格按照各个试剂盒的要求进行,标准的判断也依据试剂盒提供的标准进行判断。

1.5 统计学处理 以 TPPA 的结果与 RPR 和 TP-AD 的结果进行比较,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。乳胶法 $P>0.05$ 为差异无统计学意义。RPR 法 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

5 870 例标本首先用 TP-ELISA 法进行检测,检出阳性标本 121 例,检出率为 2.06%,检出的 121 例阳性标本同时做 TPPA 和 RPR、TP-AD 的检测,结果 TPPA 阳性 119 例,符合率 98.34%,RPR 检出阳性 49 例,符合率 40.49%。TP-AD 检出阳性 113 例,符合率 93.39%,见表 1。以 TPPA 检测的结果与 RPR 法和 TP-AD 进行比较,经过统计学处理,TP-AD 与 TPPA 比较差异无统计学意义($P>0.05$),TPPA 法与 RPR 法比较差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

表 1 阳性标本的几种方法检测结果比较

阳性标本 (n)	TPPA		RPR		TP-AD	
	阳性数	符合率	阳性数	符合率	阳性数	符合率
121	119	98.34	49	40.49	113	93.39

表 2 TP-AD、RPR 法与 TPPA 的 χ^2 检验

方法	χ^2	P
RPR	95.38	<0.01
TP-AD	3.76	>0.05

3 讨论

本文对 2013 年 7~12 月间本院 5 870 例住院及门诊患者标本进行初步筛查,TP-ELISA 法检出阳性标本 121 例,检出率为 2.06%,低于王晓峰等[5]报道的 6.07%,初步分析与浙江相比扬州地区经济稍落后,且标本中部分是孕、产妇及健康人群的体检标本,因此发生率偏低。

梅毒是由苍白螺旋体引起的性传播疾病,梅毒感染人体后

可在机体产生两种抗体,一类为梅毒螺旋体抗体,称特异性抗体。另一类是广泛分布于组织中的与类脂质抗原发生反应的非特异性抗体。梅毒的特异性抗体产生早,一般在潜伏期或者在感染 2 周左右产生。非特异性抗体出现较晚,约较特异性抗体晚 2~3 周[6]。特异性抗体在早期产生,大约 2~4 周就可出现 IgM 抗体,4~6 周即可以出现 IgG 抗体,即使梅毒治疗后仍不消失可终生存在。TP-EILSA 法,TPPA 法就可用于特异性抗体的检测。本文中 TP-ELISA 法检出 121 例阳性标本被 TPPA 法确认 119 例,有 3 例 TPPA 法检测为弱阳性,符合度为 98.34%,此法与 TPPA 法的一致性较好,TP-ELISA 法可检测梅毒特异性抗体的 IgM 和 IgG,并利用酶的放大系统提高了该法的灵敏度,甚至可以比 TPPA 法更早检测出来[7]。是目前梅毒血清学诊断的首选方法[8]。因为其灵敏度高、特异性好、操作简单易于自动化,且可以定量,因此适用于医院大批孕、产妇及正常人群的体检。该法由于包被抗原浓度、标本及操作等因素影响可出现一定的假阳性[9-10]。在日常实验中发现 Cut off 值为 0.128~0.500 的阳性结果应引起重视,这一区间内的标本应复查或进行其他方法的比对,以便减少假阳性的发生。另有报道认为因为老年人的免疫功能减退,容易产生一些针对联接用的清蛋白抗体,或是一些异常蛋白干扰 TP-ELISA 反应[11],本文中就有一例,TP-ELISA 阳性,TPPA 和 RPR 均阴性的老年人,确认为假阳性。因此阳性标本应做 TPPA、RPR 检测,以免误诊。

TPPA 是目前公认的梅毒确诊试验之一[10],该法是将纯化的梅毒特异性抗原包被在凝胶颗粒上,当被测标本中的抗体与包被的抗原发生反应就会出现颗粒凝集现象,所检测的抗体属于特异性抗体,且结果与抗体的浓度呈正相关,不随抗菌药物的治疗及病程的发展而改变。TPPA 具有高灵敏度、高特异性、高准确度的特点,但由于操作较繁杂,试剂较昂贵,结果判断不易自动化,因而受限于医院大规模的筛查检测,适用于作为确诊试验。

RPR 在梅毒螺旋体感染的不同时期检出率差别较大,在梅毒感染的最初 4 周内,由于机体产生的反应素量不足,一般为阴性,不易被 RPR 法检出。梅毒感染大约 4 周后阳性率逐渐升高约 10%~30%,6~8 周可达到 100%,经过抗菌药物治疗或疾病晚期随反应素的下降,有 25%的患者自然转为阴性,治愈后 3~6 月逐渐消失,这也就是 RPR 检出率较 TP-ELISA、TPPA 低的原因之一,由于心磷脂还存在于其他组织中,其他疾病如自身免疫性疾病、系统性红斑狼疮和活动性肺炎等,甚至健康人、孕妇都同样可以出现假阳性结果[12]。本文筛查样本中大部分是孕、产妇及健康人群体检,所以检出率低于其他报道中的比例。从文中数据来看 RPR 更适于药物疗效的观察和病程的监测。

TP-AD 用于定性检测人全血、血清和血浆样本中的梅毒螺旋体抗体,是特异性抗体的检测。该法采用高特异性抗原抗体反应原理及乳胶标记免疫层析分析技术,操作简单、方便,检测结果出现快速、准确。与 TP-ELISA 法比敏感性略差,且不可定量,但特异性较好、准确度高。该法可用于没有特殊仪器时的定性检测,实际操作中一般用于阳性标本的方法比对。

结合上面的分析,4 种方法各有所长,TP-ELISA 灵敏度高,特异性好适用于大批量的筛查工作,TPPA 特异性高、准确性好被公认为确诊试验,RPR 干扰因素多及病程对其有影响较大,适用于病程监测及疗效观察。TP-AD 操作简单,不需特殊仪器,可作为定性试验及方法的比对。在(下转第 3248 页)

间接法 ELISA 用酶标记抗人 IgG 作为第二抗体来检测血清中是否存在 HCV IgG 抗体,而 IgG 抗体出现在体内出现时间晚于 IgM 抗体,献血者在感染早期采集的血液容易被漏检。同时,为了避免血清中其他非特异性抗体和类风湿因子的干扰,试验的第一步需要通过降低检测样本量和稀释样本的方法来降低反应的板底值,而这种方法也会导致一定程度上降低试剂的检测灵敏度。另一方面,在间接法 ELISA 试验过程中,容易受到非特异性抗体的影响,比如非特异性 IgG 抗体的吸附、类风湿因子的结果干扰,导致易产生假阳性反应。所以间接法 ELISA 试剂在检测灵敏度不高的情况下,仍然存在特异性差的问题。

近年来,国内外丙肝抗体诊断试剂也正在从间接法向夹心法过渡。由于丙肝重组抗原的活性依赖于空间构象,因此,抗原结构的稳定性以及酶标记过程对构象的影响成为了夹心法试剂研究的重点和难点^[8]。当前,影响抗-HCV 试剂盒质量的主要因素是其包被的丙型肝炎病毒抗原^[9]。现在国内血站一般采用 2 个不同厂家的间接法 ELISA 试剂对献血者进行 HCV 抗体的初筛,目的就是降低不同厂家由于包被的抗原片段不同而造成的漏检。间接法 ELISA 检测试剂,虽然增加了 NS5 区作为包被抗原,一定程度上提高了试剂盒的灵敏度。但是,从本次的实验数据来看,2 个厂家的间接法 ELISA 检测试剂的使用会导致假阳性率的增加,增加血液筛查工作的负担和成本。有报道称,在血液筛查中采用夹心法试剂可以有效地提高抗-HCV 阳性标本的检出率,并降低假阳率,为血液筛查工作提供更高的准确度^[10],这与本次研究结果一致。

《血站技术操作规程(2012 版)》及《全血及成分血质量要求(GB18469-2012)》中规定关于 HCV 感染标志物及其检测方法可有 2 种选择:一种是采用 2 个不同生产厂家的 ELISA 试剂检测 HCV 抗体;另一种是采用一种 ELISA 试剂检测 HCV 抗体,采用一种试剂检测 HCV 核酸。核酸检测(NAT)在许多发达国家和地区已普遍应用于献血者血液筛查^[11],国内也有多家采供血机构进行了血液 NAT 的评估性研究^[12],国内采供血机构在选用 HCV 感染标志物检测试剂和方法时,应对夹心法 ELISA 试剂、间接法 ELISA 试剂和 HCV 核酸试剂进行合理选择配伍,从而有效地提高 HCV 感染标志物阳性标本的检出率,并降低假阳率,减少假阳性血液的报废,同时增强血液筛

查工作的准确率,避免了献血者的非正常淘汰,促进无偿献血工作的可持续发展。

参考文献

[1] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome[J]. Science, 1989, 244(2): 359-362.

[2] Sy T, Jama MM. Epidemiology of hepatitis C virus(HCV) infection[J]. Int J Med Sci, 2006, 3(1): 41-46.

[3] Lavanchy. The global burden of hepatitis C[J]. Liver Int, 2009, 29(1): 74-81.

[4] Rustgi VK. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States[J]. J Gastroenterol, 2007, 42(5): 513-521.

[5] 王晓峰,程勇前,张文瑾,等. 丙型肝炎病毒感染至临床诊断肝癌的病程经过[J]. 肝脏, 2004, 20(1): 8-10.

[6] Xia GL, Liu CB, Cao HL, et al. Prevalence of hepatitis B and C virus infections in the general Chinese population: results from a nationwide cross-sectional seroepidemiologic study of hepatitis A, B, C, D, and E virus infections in China, 1992[J]. Int Hepatol Communicat, 1996, 5(1): 62-73.

[7] 梁华钦,王敏,黎世杰,等. 广州市无偿献血者中抗-HCV 阳性人群的比较分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(5): 449-451.

[8] 谢立,吴晓东. 丙型肝炎病毒检测方法的研究进展及其临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(8): 884-886.

[9] 王远忠,邢少军,侯秀丽. 6 家 ELISA 丙型肝炎诊断试剂盒的比较[J]. 旅行医学科学, 2007, 13(4): 45-47.

[10] 赵龙友,纪勇平,王德镜,等. 两种酶联免疫法检测丙型肝炎病毒抗体结果分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 8(4): 304-306.

[11] Soldan K, Davison K, Dow B. Estimates of the frequency of HBV, HCV, and HIV infectious donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996-2003 [J]. Euro Surveil, 2005, 10(2): 17-19.

[12] 李新建. 病毒核酸检测在献血者保留中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(10): 1230-1233.

(收稿日期:2014-05-17)

(上接第 3245 页)

临床实际操作中,为避免假阳性、漏检给患者造成的不良后果,也为了能高效准确地检测,建议 4 种方法的检测顺序为:ELISA 试验进行初筛,阳性标本用 TP-AD 比对,根据需要再进一步做 TPPA 与 RPR 进行确诊和病程监测。

参考文献

[1] 陈灵敏,李长如,周海星,等. 梅毒血清学检测方法的分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(8): 1996-1997.

[2] 唐明,丁建平,等. 中国大陆 2001~2006 年 MSM 的性行为为特征与 HIV/现症梅毒感染现状的 Meta 分析[J]. 中国艾滋病性病, 2008, 14(5): 471-474.

[3] 郑颖,丁文杰,单晓洁,等. 5 种梅毒血清学方法检测方法的临床应用评价[J]. 现代实用医学, 2009, 21(8): 825.

[4] 纪建平,钟贵才,钟岚. 三种梅毒血清学检测方法的比较[J]. 中国现代医生, 2009, 47(1): 126-127.

[5] 王素娟,徐萍. 3 种梅毒方法的比较[J]. 现代预防医学, 2008, 35

(3): 555.

[6] 陈刚. 梅毒血清学试验特异性抗体与非特异性抗体检测的临床应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(1): 59.

[7] 徐树良,赵源源,王宁武,等. 26 名梅毒抗体 ELISA 阳性 TPPA 阴性鲜血者随访调查[J]. 中国输血杂志, 2002, 15(2): 265-266.

[8] 邱月燕,李玉闽,杜雪莉. 梅毒螺旋体抗体特异性与非特异性试验的评价[J]. 医技与临床, 2009, 13(10): 915-916.

[9] 彭明喜. 酶联免疫吸附试验检测梅毒阳性的原因分析 [J]. 现代实用医学, 2006, 18(2): 127-128.

[10] 邵片,王进. ELISA 法检测梅毒抗体假阳性原因分析及探索[J]. 江苏预防医学, 2010, 21(1): 56-57.

[11] 董桂香. 老年人梅毒阳性的分析[J]. 中国实用医学, 2010, 5(2): 118.

[12] 武建国. 梅毒的实验室诊断与临床相关问题 [J]. 临床检验杂志, 2006, 24(4): 316-320.

(收稿日期:2014-05-23)