

• 论 著 •

时间分辨荧光免疫技术在梅毒特异性抗体筛查中的应用研究

戴 薇,李世云,肖德俊,刘 婷,肖九长,李 晶
(江西省赣州市人民医院检验科,江西赣州 341000)

摘要:目的 探讨时间分辨荧光免疫技术(TRFIA)在梅毒特异性抗体检测中的应用价值。方法 收集 240 例梅毒患者和 150 例健康者血清标本,采用 TRFIA、梅毒螺旋体酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)、梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)进行梅毒特异性抗体检测,比较检测灵敏度、特异度及阳性率。结果 TRFIA、TP-ELISA、TPPA 检测灵敏度分别为 100.00%、98.75%、97.92%,比较差异无统计学意义($P>0.05$);特异度分别为 99.33%、98.67%、100.00%。TRFIA 检测假阳性率为 0.67%,假阴性率为 0.00%;TP-ELISA 检测假阳性率为 1.33%,假阴性率为 1.25%,TRFIA 检测假阳性率和假阴性率均低于 TP-ELISA($P<0.05$)。结论 TRFIA 检测梅毒特异性抗体灵敏度和特异度高,结果准确可靠,可用于梅毒特异性抗体的常规筛查,值得推广应用。

关键词:梅毒特异性抗体; 时间分辨荧光免疫技术; 酶联免疫吸附试验; 明胶颗粒凝集试验; 对比分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.21.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)21-3117-02

Application analysis of time-resolved fluorescence immunoassay technology in syphilis specific antibody screening

Dai Wei, Li Shiyun, Xiao Dejun, Liu Ting, Xiao Jiuchang, Li Jing
(People's Hospital of Ganzhou City, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: Objective To investigate the application of time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) in the detection of specific antibody of syphilis. **Methods** Specific antibody of syphilis was detected in serum samples of 240 cases of syphilis and 150 healthy subjects by TRFIA, Treponemal pallidum particle agglutination (TPPA) and Treponemal pallidum enzyme linked immunosorbent assay (TP-ELISA). The sensitivity, specificity and positivity of these three methods were compared. **Results** The sensitivity of TRFIA, TP-ELISA, TPPA were 100.00%, 98.75% and 97.92%, without significantly differences ($P>0.05$), and the specificity were 99.33%, 98.67% and 100.00%. The false positive rate of TRFIA was 0.67%, and the false negative rate was 0.00%. The false positive rate of TP-ELISA was 1.33%, and the false negative rate was 1.25%. False positive rate and false negative rate of TRFIA were lower than TP-ELISA ($P<0.05$). **Conclusion** TRFIA could be with high sensitivity and specificity in syphilis specific antibody test, and could be used for routine screening of syphilis specific antibody.

Key words: syphilis specific antibody; TRFIA; TP-ELISA; TPPA; comparative analysis

梅毒是由梅毒螺旋体感染引起的慢性传播疾病,可侵犯皮肤、黏膜及其他各种组织器官,可有不同的临床表现,有时可呈无症状的潜伏状态^[1-2]。梅毒感染途径主要包括性行为、血液传播、母婴垂直传播等,传染性较强。目前用于诊断梅毒的血清学试验分两类:一类是非梅毒螺旋体抗原血清学试验,包括快速血浆反应素环状卡片试验(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,包括梅毒螺旋体酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)和梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA),且不同检测方法具有不同的优缺点。为提高梅毒早期诊断率,需寻求一种敏感性、特异性较强,适用于大规模筛查的方法。本研究比较了时间分辨荧光免疫技术(TRFIA)与 TP-ELISA、TPPA 的检测性能,旨在探讨 TRFIA 在梅毒筛查血清学试验中的应用价值。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院住院患者、皮肤性病门诊就诊患者及健康体检者 390 例,其中梅毒确诊患者 240 例(梅毒组),体检健康者(对照组)150 例。

1.2 仪器与试剂 北京天石公司 SM-3 型自动化酶免分析仪,郑州安图公司 iWO-960 型洗板机,四川诺亚公司 NY/MMJ 型酶联免疫加速仪,苏州新波公司 EasyCuta 型全自动 TRFIA 分析仪及配套试剂盒,珠海丽珠公司 TP-ELISA 试剂

盒,日本富士瑞必欧株式会社 TPPA 试剂盒。所有试剂均为合格产品,且在有效期内使用。室内质控血清购自省临检中心。

1.3 方法 采集所有受试对象静脉血,常规方法分离血清标本,分别采用 TRFIA、TP-ELISA、TPPA 方法进行检测。操作步骤参照仪器及试剂盒说明书。按下列公式计算灵敏度及特异度,灵敏度=梅毒组阳性例数/梅毒组总例数 $\times 100\%$,特异度=对照组阴性例数/对照组总例数 $\times 100\%$ 。TRFIA 与 TP-ELISA 标本孔检测光密度值与临界光密度值比值(S/CO) ≥ 1 判为阳性。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel 2007 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种方法检测结果比较 240 例梅毒患者中,TRFIA、TP-ELISA、TPPA 检测灵敏度分别为 100.00%、98.75%、97.92%,3 种方法检测灵敏度比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。TRFIA 检测假阳性率为 0.67%(1/150),假阴性率为 0.00%(0/240);TP-ELISA 检测假阳性率为 1.33%(2/150),假阴性率为 1.25%(3/240),TRFIA 检测假阳性率和假阴性率均低于 TP-ELISA($P<0.05$)。

2.2 不一致检测结果分析 3 例梅毒初期患者自述有高危行

为,可能处于感染窗口期,TRFIA 阳性、TP-ELISA 阴性,随访检测显示 TP-ELISA、TPPA 均为阳性;2 例患者 TRFIA、TP-ELISA 阳性,TPPA 阴性,可能与肉眼观察结果导致 TPPA 检测结果判断错误有关,随访检测显示 TPPA 为阳性。1 例新生儿 TRFIA、TP-ELISA 阳性,TPPA 阴性,6 个月后 TRFIA、TP-ELISA 阴性,可能与母亲接受梅毒感染治疗,外周血中的抗体进入婴儿体内有关。1 例 70 岁以上老年人经临床证实可排除梅毒,检测结果为假阳性。3 种方法不一致检测结果分析见表 2。

表 1 3 种方法检测结果

方法	梅毒组(n=240)		对照组(n=150)		灵敏度 (%)	特异度 (%)
	阳性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阳性率(%)		
TRFIA	240	100.00	1	0.67	100.00	99.33
TP-ELISA	237	98.75	2	1.33	98.75	98.67
TPPA	235	97.92	0	0.00	97.92	100.00

表 2 3 种方法不一致检测结果分析

标本编号	TRFIA(S/CO)		TP-ELISA(S/CO)		TPPA	
	首次检测	随访 6 个月	首次检测	随访 6 个月	首次检测	随访 6 个月
1 号	1.2	4.5	0.7	2.1	阴性	阳性
3 号	2.6	6.6	0.7	3.4	阴性	阳性
8 号	3.0	7.3	0.9	4.6	阴性	阳性
12 号	3.3	6.7	1.2	4.8	阴性	阳性
15 号	2.4	7.4	1.1	5.7	阴性	阳性
323 号	3.6	0.8	2.5	0.7	阴性	阴性
349 号	0.7	0.5	3.4	0.8	阴性	阴性

3 讨 论

据世界卫生组织估计,全球每年约有 1 200 万的梅毒新发病例;1993 年,国内每 100 万人的梅毒总发病数不到 2 例,而到 2005 年,每 100 万人中仅一、二期梅毒发病数高达 57 例^[3]。2010 年,《新英格兰医学杂志》报道,中国几乎每小时增加 1 例先天性梅毒患者^[4]。由此可见,国内梅毒发病率在逐年递增。制定合理的梅毒筛查方法,实施科学的产前保健,以及规范妊娠期梅毒治疗方案,可防止 90% 以上的先天性梅毒的发生^[5-10]。

TRFIA 采用镧系元素的三价稀土金属离子[钕(Eu)等]及其螯合物作为示踪物,标记螺旋体特异性抗原,在抗原-抗体复合物形成后,加入增强液以放大信号(生物素-链亲和素-Eu),再采用 TRFIA 分析仪测定终产物荧光强度,根据荧光强度和相对荧光比值确定待测物浓度^[11]。此外,TRFIA 包被的抗原片段较为全面,包含了 P15、P17、P47 抗原片段。

TP-ELISA 以基因工程合成的梅毒螺旋体抗原为基础,利用酶的放大系统,提高了检测灵敏度^[7]。然而,自身免疫性疾病、恶性肿瘤、糖尿病等疾病使患者体内出现异嗜性抗体、类风湿因子、甲胎蛋白等,在 TP-ELISA 反应中有一定的吸附作用,导致产生假阳性结果^[8-11]。此外,由于老年人易因免疫功能异常产生自身抗体或异常蛋白质,干扰 TP-ELISA 反应,更易出现假阳性检测结果^[9]。目前,普遍使用 TP-ELISA 作为梅毒筛查试验,但在实际操作中,如果待测标本中存在一些过氧化物酶样物质,操作时洗涤不充分、孵育温度过高、孵育时间过长或显色时未避光等,极易导致假阳性结果。

TPPA 是将纯化的梅毒螺旋体特异性抗原包被在凝胶颗粒上,当抗原和待测血清中的抗体发生特异性反应时,可出现颗粒凝集现象,且与抗体的浓度呈正相关^[12]。TPPA 具有很

高的特异性和敏感性,是目前公认的梅毒血清学检测确证试验。

本文研究结果显示,虽然 TP-ELISA 检测灵敏度高于 TP-PA,但低于 TRFIA,而且特异度不及 TRFIA、TPPA。TPPA 检测需进行手工操作,需将标本作系列稀释,以肉眼观察判断结果,主观干扰因素多,且实验结果不易保存、试剂价格高,不利于大批量标本筛查,只适用于梅毒筛查阳性标本的复检确证。TRFIA 检测可全程全自动化,避免人为因素的干扰。晚期妊娠、系统性红斑狼疮、类风湿疾病等因素对 TRFIA 检测结果无影响。TRFIA 分析系统采用波长分辨和多次检测计算均值等方法,提高了检测灵敏度和特异度,实现了零本底检测,而且检测结果重复性好、标记物存储时间长、结果判定准确且原始数据易保存,降低了标本复检率^[13-15]。2014 年江西省疾控中心第 1 次室间质控品种,有 1 例标本 TP-ELISA 检测结果为阴性,TRFIA 检测结果为阳性,本实验室按 TRFIA 检测结果回报,最终反馈为结果正确,再次证明 TRFIA 比 TP-ELISA 更敏感。

TRFIA 检测具有较高的灵敏度和特异度,结果准确可靠,与 TPPA 有较高的符合率。此外,TRFIA 检测可避免人为因素的影响,降低了复检率,可用于梅毒特异性抗体的常规筛查,尤其适用于大批量标本的梅毒初筛试验,值得推广应用。

参 考 文 献

- [1] 彭慧芬. 4 种梅毒血清学检测方法的适用性探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(21): 2929-2930.
- [2] 王欣俞, 王德辉, 刘淑娟. 新生儿 64 例筛查梅毒血清学方法的临床应用[J]. 中华临床医师杂志, 2014, 8(9): 1781-1783.
- [3] Chen ZQ, Zhang GC, Gong XD, et al. Syphilis in China: results of a national surveillance programme[J]. Lancet, 2007, 369 (9556): 132-138.
- [4] Tucker JD, Chen XS, Peeling RW. Syphilis and social upheaval in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(18): 1658-1661.
- [5] Gloyd S, Chai S, Mercer MA. Antenatal syphilis in sub-Saharan Africa: missed opportunities for mortality reduction[J]. Health Policy Plan, 2001, 16(1): 29-34.
- [6] Waston-Jones D, Oliff M, Triss Prestholt F, et al. Antenatal syphilis screening in sub-Saharan Africa: lessons learned from Tanzania[J]. Trop Med Int Health, 2005, 10(9): 939-943.
- [7] 戴薇, 肖九长, 李晶. 三种梅毒血清学检测方法在临床中的应用与评价[J]. 临床合理用药, 2011, 4(8): 59-60.
- [8] 张晓红. TP-ELISA 与 TPPA 梅毒检测方法的比较[J]. 中外健康文摘, 2013, 10(6): 22-23.
- [9] 董旭才, 刘昕阳, 张婧, 等. 酶联免疫吸附法检测梅毒抗体试验灰区结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(5): 598-600.
- [10] 陈彬, 徐克, 林小敏, 等. 81946 例住院患者梅毒抗体检测结果分析[J]. 中华传染病杂志, 2013, 31(8): 479-482.
- [11] 文海燕, 张华荣, 陈正明, 等. 梅毒检测方法的研究进展[J]. 中国皮肤性病杂志, 2012, 26(4): 354-360.
- [12] 张波. 几种梅毒血清学检测方法的比较与分析[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(2): 173-175.
- [13] 王世真. 分子核医学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2001: 163-169.
- [14] 秦卫仕, 田蓉, 匡安仁. 中国分辨荧光分析和放射免疫分析测量精度的比较[J]. 同位素, 2002, 15(2): 115.
- [15] 廖群, 刘小玲, 郭惠. 时间分辨免疫荧光法用于梅毒抗体测定的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(3): 447-450.