

• 论 著 •

早期皮损组织液的定量 PCR 检测在梅毒诊断中的价值分析

吴丽婷¹, 欧武英^{2△}, 马乙云¹

(1. 海南省人民医院门诊部, 海口 571100; 2. 海口市人民医院检验科 570208)

摘要:目的 探讨早期皮损组织液的荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测在梅毒诊断中的价值。方法 选择 2014 年 9 月至 2016 年 9 月该院收治的 40 例疑似梅毒患者, 患者在判断为疑似病例后, 于次日清晨抽取 5 mL 静脉血送至免疫实验室, 进行甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)、梅毒螺旋体抗体 ELISA 检测; 并收集皮损组织液, 进行 FQ-PCR 检测; 均采用苄星青霉素治疗 3、6 个月后再次检测, 记录转阴率。结果 ELISA、FQ-PCR 总检出率比较, 差异无统计学意义[97.50%(39/40)与 95.00%(38/40), $P>0.05$]; ELISA、FQ-PCR 总检出率均明显比 TRUST 总检出率高, 差异有统计学意义[97.50%(39/40)与 67.50%(27/40), 95.00%(38/40)与 67.50%(27/40), $P<0.05$]; 在治疗后 3 个月、6 个月时, ELISA、FQ-PCR 转阴率均明显高于 TRUST, 差异有统计学意义($P<0.05$), FQ-PCR 转阴率和 ELISA 比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 在 FQ-PCR 检测结果中, 治疗后 TP-DNA 定量平均值均得到明显降低, I 期、II 期和治疗前比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 采用早期皮损组织液 FQ-PCR 可有效测定梅毒螺旋体 DNA, 有利于梅毒诊断, 临床应用价值高。

关键词:梅毒; 组织液; 荧光定量聚合酶链反应; 梅毒螺旋体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.14.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)14-1942-03

The value of quantitative PCR detection in early skin tissue fluid of syphilis

WU Liting¹, OU Wuying^{2△}, MA Yiyun¹

(1. Department of Out-patient, the People's Hospital of Hainan Province, Haikou, Hainan 571100, China;

2. the People's Hospital of Haikou, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract:Objective To study the value of fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) detection in early skin tissue fluid of syphilis. **Methods** A total of 40 patients of suspected syphilis who received therapy from September 2014 to September 2016 in our hospital were selected in this study. Five mL venous blood samples were collected in all the patients, and detected by toluidine red unheated serum test (TRUST) and treponema pallidum antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and skin tissue fluid were collected and performed FQ-PCR detection, all patients were treated with benzylpenicillin for 3 and 6 months, then detected again, the conversion rates were record. **Results** There was no significant difference in the detection rate of ELISA and FQ-PCR[97.50%(39/40) vs. 95.00%(38/40), $P>0.05$]. The total detection rate of ELISA and FQ-PCR were significantly higher than that of TRUST[97.50%(39/40) vs. 67.50%(27/40), 95.00%(38/40) vs. 67.50%(27/40), $P<0.05$]. After 3 and 6 months of treatment, negative rates of ELISA and FQ-PCR were significantly higher than that of TRUST($P<0.05$), there was no significant difference on negative rate between FQ-PCR and ELISA ($P>0.05$). In the FQ-PCR detection results, the average value of TP-DNA was significantly decreased after treatment, there were significant differences in the phase I, phase II compared with before treatment($P<0.05$). **Conclusion** FQ-PCR could be used to measure treponema pallidum (TP-DNA) effectively in early stage, it's conducive to the diagnosis of syphilis, the clinical application value is high.

Key words:syphilis; tissue fluid; fluorescence quantitative polymerase chain reaction; treponema pallidum

梅毒主要是受到梅毒螺旋体(TP)感染所致, 其具有较强的传染性, 易对人体多个重要器官造成损伤, 而病情严重的患者甚至可能残疾^[1]。梅毒潜伏期大约在 2~3 周, 在感染早期仅有皮疹现象出现, 体内不存在特异性、非特异性抗体^[2]。该病的检测目前多采用血清学诊断, 包括甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)、TP 抗体 ELISA 试验等, 但易受到诸多因素影响, 存在假阳性、前带现象, 具有较大的非特异性反应, 容易导致误诊、漏诊等^[3-4]。荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)是在常规 PCR 基础上, 增加荧光探针, 可对 DNA 拷贝数进行定量检测, 并直接在计算机屏幕中得出定量数据, 近年来, 该方式已逐渐应用到梅毒检测中^[5-6]。因此, 本研究旨在探讨 FQ-PCR 检测梅毒皮损组织液中 TP-DNA 的效果, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 9 月至 2016 年 9 月本院接诊的 40 例疑似梅毒患者, 其中男 23 例, 女 17 例; 年龄 24~49 岁, 平

均(37.42±2.16)岁; 体质量 42~84 kg, 平均(61.59±3.48) kg。患者均以皮肤溃烂、梅毒疹、脓疱等典型皮损为主要表现, 或既往有梅毒感染史, 高度怀疑为梅毒患者。

1.2 方法 患者在被判断为疑似病例后, 于次日清晨抽取 5 mL 静脉血送至免疫实验室, 进行 TRUST、TP 抗体 ELISA 试验, TRUST 试剂盒购于上海荣盛生物公司, ELISA 试剂盒购于上海科华生物有限公司。FQ-PCR 标本采集: 溃疡渗出性皮损的患者, 采用无菌生理盐水将皮损处冲洗干净后, 将组织液挤出, 并采集; 非渗出性皮损的患者表面采用 75%浓度的酒精进行消毒, 干燥后, 使用手术刀钝侧, 刮去表皮, 将组织液挤出, 并采集; 主要症状为扁平疣、湿性丘疹的患者采用一次性棉签蘸取皮损处分泌物; 主要症状为手足、躯体红斑、丘疹的患者, 采用一次性棉签对皮损处用力摩擦, 直至有血清样渗出物。标本采集后均置于无菌试验管中, 送至检测。试剂盒为达安基因股份有限公司及 ABI7300 荧光 PCR 扩增仪, 操作方式严格参

照仪器及试剂盒说明书;将结果经过计算机分析。均采用苋星青霉素治疗 3、6 个月后再次检测,记录转阴率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理及统计学分析,呈正态分布、方差齐性的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 F 检验,多组间中的 2 组比较采用 SNK- q 检验,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,多组间中的 2 组比较采用 Fisher 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 治疗前诊断结果相比 ELISA、FQ-PCR 总检出率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);ELISA、FQ-PCR 总检出率均明显高于 TRUST 总检出率,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 2 治疗后转阴情况比较[%(n/n)]

检测方法	治疗 3 个月后		治疗 6 个月后	
	I 期	II 期	I 期	II 期
ELISA	73.68(14/19) *	75.00(15/20) *	94.73(18/19) *	85.00(17/20) *
TRUST	30.77(4/13)	35.71(5/14)	46.15(6/13)	57.14(8/14)
FQ-PCR	77.78(14/18) *	80.00(16/20) *	100.00(18/18) *	100.00(20/20) *

注:与 TRUST 比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 FQ-PCR 检测 TP-DNA 定量平均值比较 在 FQ-PCR 检测结果中,治疗后 6 个月 TP-DNA 定量平均值均得到明显降低, I 期、II 期和治疗前比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 FQ-PCR 检测 TP-DNA 定量平均值比较($\bar{x} \pm s$, copies/mL)

梅毒分期	治疗前	治疗后 6 个月
I 期	(3.39 ± 0.43) × 10 ⁴	(2.18 ± 0.24) × 10 ² *
II 期	(5.83 ± 0.76) × 10 ⁶	(4.53 ± 0.58) × 10 ³ *

注:与治疗前比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

TRUST 在临床上已得到较长时间的使用,主要是使用已知的牛心磷脂抗原作为参考免疫指标,和检测标本中的抗心磷脂抗体之间发生非特异性结合,然后进行检测,主要优点是成本低、时间短等^[7]。但也有研究指出,若检测过程中血清抗体过剩,会减少所形成的免疫复合物,导致其无法凝聚,此时梅毒呈阳性的患者则会被检测出阴性,影响早期诊断及治疗^[8-9]。王娜等^[10]研究显示,不仅是梅毒患者血清中存在抗心磷脂抗体,在其余类似病毒感染后也会有该抗体出现,增加误诊率。

ELISA 主要指将已知的抗原在固相载体的表面进行吸附,并发生酶标记的抗原抗体反应,洗涤液相中的游离成分,而对于梅毒的检测主要以双抗原夹心法为主,具有特异性强的优点。较多报道证实,ELISA 试验与 TRUST 比较,可克服其无法批量检测的缺点,且简单克隆,不会遭受到凝血因子等物质的感染,采用酶标仪进行数据收集,具有较高的可信度^[11-12]。但由于 ELISA 检测在测定 IgM/IgG 抗体时,在机体免疫反应中,最先产生的为 IgM,若有临床症状出现,同时 IgM 表达过低甚至无表达的情况,则极易出现漏诊,耽误治疗^[13-14]。Huh 等^[15]研究中提出,IgG 仅可反映感染梅毒病史,若需确诊还需要联合其余免疫学证据的检测。

虽然血清学的检测方式在梅毒的诊断中较为常用,但也有较多研究显示,其阳性结果并不代表体内存在活的 TP^[16-17]。

检测方法	I 期	II 期	总检出率
ELISA	19(47.50)	20(50.00)	39(97.50) *
TRUST	13(32.50)	14(28.00)	27(67.50)
FQ-PCR	18(45.00)	20(50.00)	38(95.00) *

注:TRUST 比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 治疗后转阴情况比较 在治疗 3、6 个月后,ELISA、FQ-PCR 转阴率均明显高于 TRUST 检测,差异有统计学意义($P < 0.05$),FQ-PCR 转阴率和 ELISA 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

苏宗义等^[18]研究显示,在人体内 TP 死亡后,其 DNA 在 24 h 内则会被体内某些酶所代谢,而无法检测出。FQ-PCR 是通过荧光染料或者荧光记忆的特异性探针,对 PCR 产物进行标记跟踪,同时整个进程可得到同步直观的观察,并配合相关处理分析,得到检测样品的含量。国内外均有报道指出,FQ-PCR 不仅可排除人为主观影响,还可对 TP-DNA 的水平进行准确的测定^[19-20]。国内刘燕平^[21]的报道中得出论证,FQ-PCR 在漏诊、误诊率上较低,可早期诊断梅毒患者,并积极给予干预,获得较好的预后。国外 Maeda 等^[22]也得出过相似结论。

在本研究中,所有疑似病例通过 ELISA 检测结果显示,97.50% 为梅毒患者,其中 I 期 47.50%, II 期 50.00%。与 TRUST、FQ-PCR 检测结果比较,TRUST 总检出率仅为 67.50%,明显比 ELISA 低,而 FQ-PCR 总检出率为 95.00%,和 ELISA 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),且 II 期检出率相同,虽然 I 期检出率不一致,但仅有 1 例差异,不对 FQ-PCR 的检测灵敏度造成影响。在李钟洙等^[23]分析中显示,FQ-PCR 在 TP-DNA 的检测中,特异度为 100.00%, I 期梅毒检测灵敏度为 100.00%, II 期梅毒检测灵敏度为 90.00%。此外,药物治疗、自身免疫力和 TP-DNA 清除存在着密切的关系,对 TP-DNA 的检测不仅可对药物疗效进行判断,还可知晓疾病恢复情况。本研究显示,经过治疗后,FQ-PCR 转阴率逐渐增加,治疗后 3 个月变化明显,且在治疗后 6 个月时, I 期、II 期的转阴率均为 100.00%,明显比 PRP 高,且和 ELISA 比较差异不明显;并且在阳性患者中的 TP-DNA 定量平均值下降程度明显,在一定程度上可反映药物治疗效果明显,增加了机体免疫力,与刘燕平等^[24]研究具有相似性。

综上所述,采用早期皮损组织液 FQ-PCR 可有效测定 TP-DNA,有利于梅毒诊断,临床应用价值高。

参考文献

[1] 胡冰雪,曲波,刘洁,等. 中国 1990-2011 年梅毒流行特征分析与趋势预测[J]. 现代预防医学,2014,41(6):961-963.
[2] Svecová D, Luha J. Trend and challenge in mother-to-

- child transmission of syphilis[J]. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*, 2017, 66(1):24-29.
- [3] Wang KD, Xu DJ, Su JR. Preferable procedure for the screening of syphilis in clinical laboratories in China[J]. *Infect Dis*, 2016, 48(1):26-31.
- [4] 刘春华, 孙国清, 薛秀娟, 等. TPPA 和酶联免疫吸附法在梅毒诊断中的作用[J]. *中国医药科学*, 2014, 4(6):142-144.
- [5] 陈春晓, 蒋荣猛. 神经梅毒临床及实验室诊断相关因素的分析[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2014, 8(5):654-657.
- [6] Shin YJ, Chung JH, Kim DJ, et al. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction for rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidies in chorionic villus sampling in a single institution[J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2016, 59(6):444-453.
- [7] 张森森, 陈访梅, 蔡川川, 等. 两种 PCR 方法检测隐性梅毒患者梅毒螺旋体 DNA 的初步比较[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2014, 21(1):3-6.
- [8] Hanley A. Syphilization and its discontents; experimental inoculation against syphilis at the London lock hospital[J]. *Bull Hist Med*, 2017, 91(1):1-32.
- [9] 田小青, 高长杰, 张森, 等. 171 例梅毒血清学检测阳性及追踪结果分析[J]. *临床血液学杂志(输血与检验版)*, 2014, 11(4):682-683.
- [10] 王娜, 张馨月, 张吴琼, 等. 神经梅毒诊断与治疗新进展[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2016, 16(7):397-403.
- [11] Boonchaoy A, Wongchampa P, Hirankarn N, et al. Performance of chemiluminescent microparticle immunoassay in screening for syphilis in pregnant women from Low-Prevalence, Resource-Limited setting[J]. *J Med Assoc Thai*, 2016, 99(2):119-124.
- [12] 郭家权, 洪敏, 林永前. 酶联免疫吸附法检测与甲苯胺红不加热血清试验在梅毒检验中应用价值的比较[J]. *广东医学*, 2014, 35(5):738-740.
- [13] 徐仁秀. RPR 与 TPPA 检测在梅毒诊断中的临床价值[J]. *当代医药论丛*, 2014, 12(11):62-63.
- [14] 范婷婷, 张婷, 欧阳立杰, 等. 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[J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(10):1313-1315.
- [15] Huh HJ, Chung JW, Park SY, et al. Comparison of automated treponemal and nontreponemal test algorithms as first-line syphilis screening assays[J]. *Ann Lab Med*, 2016, 36(1):23-27.
- [16] 曾霓, 曹碧兰. 梅毒血清学检测方法研究和应用进展[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2014, 28(5):530-533.
- [17] 黄文喜, 章平, 郑和平, 等. 梅毒螺旋体血清学检验研究进展[J]. *中国医学工程*, 2014, 22(1):193.
- [18] 苏宗义, 张振国, 乐宏元, 等. 15 881 例患者梅毒血清学诊断的方法学比较[J]. *中国微生态学杂志*, 2014, 26(7):831-833.
- [19] Zhao J, Zhao JY, Chen ZX, et al. Detection of echinoderm microtubule associated protein like 4-Anaplastic lymphoma kinase fusion genes in non-small cell lung cancer clinical samples by a real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction method[J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2016, 38(6):643-649.
- [20] 王晶华. 3 种梅毒螺旋体检测方法的比较与分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(1):50-51.
- [21] 刘燕平. 荧光定量聚合酶链反应技术在梅毒患者检测中的应用价值分析[J]. *中国医学工程*, 2015, 23(3):53-54.
- [22] Maeda T, Date A, Watanabe M, et al. Optimization of recovery and analysis of RNA in sorted cells in mRNA quantification after fluorescence-activated cell sorting[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2016, 46(6):571-577.
- [23] 李钟洙, 王传敏. 荧光 PCR 技术检测梅毒螺旋体 DNA 的意义[J]. *吉林医学*, 2009, 30(9):769-771.
- [24] 刘燕平, 吴忠勇, 吴建松. 荧光定量聚合酶链反应技术在梅毒患者检测中的应用价值[J]. *当代医学*, 2013, 19(18):115.

(收稿日期:2017-02-07 修回日期:2017-04-12)

(上接第 1941 页)

- 全科医学, 2012, 15(12):1314-1318.
- [6] 薛超, 刘文玲, 孙艺红, 等. 炎症反应及免疫指标对类风湿关节炎患者血脂的影响分析[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(10):941-945.
- [7] 孙明珠. 炎症反应相关细胞因子与类风湿关节炎血管钙化[J]. *中华风湿病学杂志*, 2014, 18(3):212-214.
- [8] 夏农. 中西医结合治疗对类风湿关节炎老年患者血清中 hs-CRP、TNF- α 和 IL-18 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(10):2059-2060.
- [9] 朱旭明, 丁小青, 杨燕. 类风湿因子、快速 C 反应蛋白、红细胞沉降率诊断类风湿关节炎的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(20):3007-3008.
- [10] 伍婷. 高分子量 APN 和 APN 受体在类风湿关节炎中的临床意义[D]. 长沙:中南大学, 2013.
- [11] 李雪, 王俊祥. 类风湿关节炎患者血清同型半胱氨酸和 APN 的表达及其意义[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2012, 6(3):177-180.
- [12] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14(4):265-270.
- [13] 孙淑银, 王颖翠. 血清白细胞介素-37 水平与类风湿关节炎发病及病情进展的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(20):5115-5117.
- [14] 刘素苗, 张莉芸, 马丹. 临床疾病活动指数和简化疾病活动指数在类风湿关节炎疾病活动性评估中的比较研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2012, 16(9):601-605.
- [15] 雷玲, 赵钺, 米存东. 类风湿关节炎病情活动指标与 DAS28 的相关性研究[J]. *广西医科大学学报*, 2008, 25(6):893-895.

(收稿日期:2017-02-02 修回日期:2017-04-02)