

• 论 著 •

全自动粒子化学发光法在梅毒抗体筛查中的应用与分析^{*}邵淑丽¹, 李秋静², 耿建利³, 刘 鹏¹, 曲业敏¹, 宋 宇¹, 王晓伟⁴, 姚继承⁴, 王明义^{1△}

(大连医科大学附属威海市立医院: 1. 中心实验室; 2. 病理科; 3. 肝胆外科, 山东威海 264200;

4. 威海威高生物科技有限公司, 山东威海 264200)

摘要:目的 评价威高 Autolumis 3000 微粒子化学发光分析仪在梅毒特异性抗体筛查试验中的特异度。

方法 对梅毒特异性抗体的检测结果进行回顾性分析。采用威高 Autolumis 3000 梅毒特异性抗体检测试剂, 对 2018 年 3 月至 2019 年 3 月大连医科大学附属威海市立医院 36 854 例患者的血清标本进行检测。对初筛结果阳性标本附加甲苯胺红不加热血清试验 (TRUST), 再采用梅毒螺旋体明胶凝集试验 (TPPA) 进行复检, 并对 TPPA 试验复检结果为阴性的样本采用免疫印迹法 (Western blot) 进行确证。采用 SPSS 软件进行检测结果的统计分析。 **结果** 36 854 份血清标本中, 微粒子化学发光免疫法共初筛检出阳性标本 544 份。TRUST 试验复检阳性 314 份, 阴性 230 份。经 TPPA 试验复检后, 检出阳性标本 526 份, 阴性标本 18 份; 对 18 份 TPPA 阴性结果的血清标本, 采用 Western blot 试验确证, 检测结果为阳性 2 份, 不确定样本 5 份, 阴性 11 份。Autolumis 3000 微粒子化学发光法检测梅毒特异性抗体的特异度为 99.97%。 **结论** 微粒子化学发光免疫法检测梅毒特异性抗体的特异度高, 对初筛阳性标本选用 TPPA 试验作为补充试验进行复检, 可有效提高梅毒检出的准确性。

关键词: 微粒子化学发光; 凝集试验; 梅毒; 血清诊断**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.02.003**中图法分类号:** R318.6**文章编号:** 1673-4130(2020)02-0138-04**文献标识码:** AApplication and analysis of automatic particle chemiluminescence in syphilis antibody screening^{*}SHAO Shuli¹, LI Qiujing², GENG Jianli³, LIU Peng¹, QU Yemin¹,SONG Yu¹, WANG Xiaowei⁴, YAO Jicheng⁴, WANG Mingyi^{1△}

(1. Department of Central Laboratory; 2. Department of Pathology; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Weihai Municipal Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Weihai, Shandong 264200, China; 4. Weihai Weigao Biotechnology Co., Ltd., Weihai, Shandong 264200, China)

Abstract: Objective To evaluate the specificity of Autolumis 3000 microparticle chemiluminescence analyzer in the screening test of treponema pallidum specific antibody. **Methods** The detection results of syphilis-specific antibody were analyzed retrospectively. A total of 36 854 serum samples from patients between March 2018 and March 2019 were tested using the Virgil Autolumis 3000 syphilis-specific antibody detection reagent. For the positive samples with positive screening results added toluidine red unheated serum test (TRUST), the treponema pallidum gelatin agglutination test (TPPA) was adopted for reexamination, and the samples with negative reexamination results of TPPA test were confirmed by Western blot method. SPSS software was used for statistical analysis of the data. **Results** Of 36 854 serum samples, 544 were positive for anti syphilis antibody. There were 314 positive and 230 negative samples in TRUST test. After the retest of TPPA test, 526 positive samples and 18 negative samples were detected; 18 serum samples with negative results of TPPA were confirmed by Western blot test, and the results were positive in 2, uncertain in 5 and negative in 11. The specificity of Autolumis 3000 microparticle chemiluminescence method for detection of syphilis specific antibody was 99.97%. **Conclusion** TPPA test was used as a supplementary test for re examination of positive samples of primary screening, which could effectively improve the accuracy of syphilis detection.

Key words: microparticle chemiluminescence; agglutination test; syphilis; serum diagnosis^{*} 基金项目: 国家科技重大专项 (2009ZX10004-719)。

作者简介: 邵淑丽, 女, 主任技师, 主要从事微生物研究。 △ 通信作者, E-mail: wangmingyi1973@outlook.com。

本文引用格式: 邵淑丽, 李秋静, 耿建利, 等. 全自动粒子化学发光法在梅毒抗体筛查中的应用与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(2):

梅毒是由梅毒螺旋体感染所致的慢性性传播疾病,对人类的身体健康危害较大^[1-2]。近年来,梅毒的发病率和流行范围不断增加^[3-5],因此,对梅毒的及时诊断就显得至关重要。微粒子化学发光免疫法(CMIA)是近年来应用于检测梅毒特异性抗体的一项新技术,自动化程度高,检测简捷,应用前景良好^[6-7]。但 CMIA 作为梅毒特异性抗体的筛查试验,也会出现假阳性^[7]。甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)主要用于梅毒非特异性抗体的检测^[8-9],梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)是目前较为认可的梅毒确证试验方法^[10]。因此,本文主要对微粒子化学发光分析仪 Autolumis 3000 在梅毒抗体筛查中的应用与分析进行阐述,以 CMIA 进行初筛,TPPA 试验作为参比方法进行复检,并对二者检测结果不相符的标本采用免疫印迹法(Western blot)进行确证,评价威高 Autolumis 3000 微粒子化学发光分析仪在检测梅毒特异性抗体中的应用与分析,以提高实验室对梅毒检出的准确性。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2018 年 3 月 10 日至 2019 年 3 月 10 在大连医科大学附属威海市立医院体检、门诊及住院患者共 36 854 例的血清标本。

1.2 试剂与方法 所有患者的血清标本均采用威高生物科技有限公司 Autolumis 3000 全自动微粒子化学发光分析仪及其配套试剂进行检测,在室内质控在控的情况下检测,质控品和定标液均购自威高生物科技有限公司,威高 Autolumis 3000 微粒子化学发光分析仪采用的是双抗原夹心法来测定患者血清梅毒特异性抗体,即在磁微粒上共价包被梅毒螺旋体抗原,加入待测样本和测梅毒螺旋体抗体示踪结合物,形成包被抗原-抗体-异鲁米诺标记抗原复合物,充分反应后洗涤,加入激发液,异鲁米诺在激发液的作用下发光,相对发光强度(RLU)与血清/血浆中梅毒抗体含量呈正相关,根据 S/CO 值对样本检测结果进行判断。TRUST 试剂购自上海荣盛生物技术有限公司;TPPA 试剂购自日本富士株式会社;Western blot 试剂购自欧蒙医学诊断(中国)有限公司。CMIA 结果的判断标准:S/CO $\geq$ 1 判定为阳性,<1 判定为阴性。对初筛试验阳性的判断:需对 CMIA 阳性标本采用同种试剂进行二次复检,结果一致方可确定。对初筛阳性标本附加 TRUST 试验,采用 TPPA 试验进行复检,并对 TPPA 结果阴性的标本进行 Western blot 确证。Western blot 实验检测梅毒螺旋体 Tp15、Tp17、Tp45 和 Tp47 蛋白的 IgM 抗体,Western blot 结果判定标准为:至少出现 2 条条带则判定为阳性结果,若仅出现 1 条条带为可疑结果,无条带出现为阴性结果。上述所有试验均按照仪器及试剂盒操作使用说明书进行。

1.3 统计学处理 使用 Microsoft Excel 对数据进行整理统计,再使用 SPSS 软件对数据进行统计学分析,

本研究数据为计数资料,以率表示,采用 χ^2 检验进行比较,并采用特异度、阳性预测值等分析各个方法的诊断效能, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMIA 初筛实验阳性的 544 份标本的 TRUST 检测结果 梅毒检测标本共 36 854 份;经 CMIA 初筛实验检出 544 份阳性标本,其中男性标本 287 份,女性标本 257 份。但 TRUST 共检出 314 份阳性标本,其中男性标本 156 份,男性检出率是 CMIA 初筛实验阳性的 54.36%(156/287);女性标本 158 份,女性检出率是 CMIA 初筛实验阳性的 61.48%(158/257)。见表 1。

2.2 CMIA 初筛实验阳性的 544 份标本的 TPPA 检测结果 CMIA 初筛实验阳性的 544 份标本经 TPPA 复查,检出 526 份阳性标本,18 份阴性标本,其中男性标本 261 例,女性标本 265 例,CMIA 初筛实验阳性的 544 份标本的 TRUST 和 TPPA 检测结果比较见表 1。经统计分析得出,特异度为 99.95%,阳性预测值为 96.69%。

表 1 CMIA 初筛实验阳性的 544 份标本的 TRUST 和 TPPA 检测结果比较(n)

性别	CMIA	TRUST	TPPA
男	287	156	261
女	257	158	265
合计	544	314	526

2.3 CMIA 检测结果 S/CO 分段值与 TPPA、TRUST 结果比较 544 份 CMIA 初筛阳性检测结果 S/CO 值分段与 TPPA、TRUST 结果比较见表 2,其中 S/CO 最小值为 1.19,S/CO 最大值为 293.50。在 TPPA 阳性结果中,当 S/CO $\geq$ 10 时 99.58%为阳性,S/CO<10 只有 75.00%为阳性,经统计学分析,二者差异有统计学意义($P<0.01$)。在 TPPA 阴性结果中,CMIA 的 S/CO $\leq$ 10 共出现 16 份,占 88.89%(16/18)。其中 S/CO 值在 1~<3 出现 6 份,占 33.33%;3~<5 出现 4 份,占 22.22%;5~<7 出现 3 份,占 16.66%;7~<10 出现 3 份,占 16.66%。结果表明在 S/CO<10 的血清样本中,随着 S/CO 值的减小,TPPA 阴性比例越来越高。在 526 份 TPPA 阳性结果中,TRUST 检测出 214 份阴性,312 份阳性,随着 S/CO 值的增加,滴度 $\geq$ 1:2 的份数也明显增多;在 18 份 TPPA 阴性结果中,TRUST 阴性标本 16 份,阳性标本 2 份,均未出现滴度 $\geq$ 1:2 的结果。

2.4 Western blot 检测结果 544 份 CMIA 初筛实验阳性的标本经 TPPA 复查,检测出 526 份标本呈现出阳性结果,而 18 份标本呈现出阴性结果。对 CMIA 和 TPPA 2 种检测方法检出结果不相符合的 18 份阴性标本继续采用 Western blot 法进行验证,验

证结果显示 18 份标本中的 2 份呈现出阳性结果,5 份标本的结果为不确定,剩下的 11 份标本为阴性结果。对于检测结果不确定的标本不纳入统计计算范围,经统计学分析,CMIA 法检测梅毒抗体的特异度为 99.97%。

表 2 CMIA 检测结果 S/CO 值分段与 TPPA、TRUST 结果比较

S/CO 值	TPPA(+)			TPPA(-)		
	1 : 1	≥1 : 2	TRUST(-)	1 : 1	≥1 : 2	TRUST(-)
1~<3	4	2	1	0	0	6
3~<5	1	1	4	0	0	4
5~<7	2	2	8	1	0	2
7~<10	7	3	13	0	0	3
10~<15	9	6	18	1	0	0
15~<30	14	35	34	0	0	0
30~<50	8	44	35	0	0	1
50~<100	30	59	60	0	0	0
100~<200	25	54	36	0	0	0
200~300	4	2	5	0	0	0

3 讨 论

近年来,梅毒的发病率逐年递增^[10],因此,准确、快速地诊断对疾病控制和患者管理具有重要意义。人类感染梅毒螺旋体后会产生 2 种抗体,一种是非特异性抗体,一种是特异性抗体。目前实验室多采用 TRUST、TPPA 及 CMIA 等方法对梅毒抗体进行检测^[11]。在本研究中,通过 CMIA 初筛实验共检出 544 份阳性标本,在 544 份 CMIA 初筛阳性结果中,TRUST 检出 314 份阳性标本,230 份阴性标本,两者的检出率差异显著。544 份初筛阳性标本中经 TPPA 复查检出 526 份阳性标本,18 份阴性标本,两者阳性检出率无显著性差异,与贾敏利等^[12]的报道相一致。

TRUST 与 CMIA 检出率差异明显,这是由于 TRUST 是利用正常牛心肌的心类脂作为抗原来测定患者血清中的反应素,即非特异性抗体-抗心磷脂抗体^[13]。而本文 Autolumis 3000 微粒子化学发光分析仪检测梅毒特异性抗体的原理是利用双抗原夹心法来测定抗 TP 的特异性抗体。由于 TRUST 检测的非特异性抗体的出现时间滞后于 CMIA 检测的特异性抗体,且非特异性抗体在梅毒治疗后或疾病晚期可能减少,故 TRUST 的灵敏度低于 CMIA^[10,13]。此外,除梅毒患者之外,如系统性红斑狼疮、麻风、结核、类风湿性关节炎等非梅毒患者体内也可以短暂地或长期地存在抗心磷脂抗体,干扰实验结果^[14]。因此,单独的 TRUST 阳性结果对临床诊断的指导意义并不大,其检测灵敏度、特异度均低于 CMIA^[15]。TPPA 作为梅毒感染检测的“金标准”,和 CMIA 一样检测的是梅毒特异性抗体,其原理是采用超声裂解后的梅毒螺旋体作为抗原,致敏红色明胶颗粒与人血清或血浆中的梅毒螺旋体抗体结合,产生肉眼可见红色凝集反应,即便行抗梅毒治疗后 TPPA 结果也会终身阳

性^[12,15]。虽然 TPPA 的灵敏度和特异度均较高,但其相较于 CMIA 而言,检测费用较为昂贵,检测耗时长,加样过程需手工稀释,检测结果也要肉眼判断,人为干扰因素多,且待检标本量较大时并不适用,一般是作为筛选试验阳性标本的确诊试验^[8,16]。因此,在梅毒特异性抗体的筛查过程中,CMIA 相较于 TRUST、TPPA 而言,既兼顾了灵敏度高、特异度强、稳定性好、检测简捷的优点;同时又规避了费用昂贵、检测人为干扰因素多、耗时长的缺点,发展前景良好^[17]。

对 TPPA 检测出 18 份结果不相符(阴性)的标本采用 Western blot 法进行确证,本研究中 Western blot 仅检出 2 份阳性,5 份不确定,11 份阴性结果,说明 TPPA 方法作为 CMIA 初筛的补充实验,可有效降低 Western blot 验证的检测成本。在去除不确定结果后,经统计分析,Autolumis 3000 检测梅毒螺旋体特异性抗体特异度较高(99.97%)。此外,S/CO 越小,CMIA 出现假阳性的可能性越大,尤其是 S/CO≤10 的标本。

截至目前,全自动化学发光分析仪在临床筛查过程中应用广泛,而其中 Autolumis 3000 检测梅毒螺旋体特异性抗体作为初筛实验的特异度及灵敏度良好,适合大批量样本的筛查,尤其是血站、各级医院及血液中心等机构中应用更为广泛。但同时也有研究显示,当患者身患类风湿疾病、糖尿病、恶性肿瘤等疾病时,CMIA 的检测结果也会出现假阳性^[7,14]。在利用 Autolumis 3000 检测梅毒螺旋体的过程中,不仅需要检验技术人员认真分析检测过程是否存在错误外,更要全面了解患者此前是否有过感染性疾病、免疫功能紊乱等其他疾病史,在此基础上才能作出正确的判断,防止给患者带来不必要的心理负担。

4 结 论

以 Autolumis 3000 CMIA 为例检测梅毒特异性抗体的特异度高,可以满足临床对梅毒抗体检测快速、准确的要求。对于 CMIA 初筛阳性标本可选用 TPPA 试验进行复检;特别是 S/CO≤10 的标本,要注意假阳性结果的出现,采用 2 种以上的方法进行复查。综上所述,CMIA 检测梅毒特异性抗体的特异度高,灵敏度好,相较于 TRUST、TPPA 更适用于临床大量样本的筛查,适合在临床进行推广。

参考文献

[1] 马红霞,周运恒,杨茜,等. 不同的梅毒血清学试验方法检测 1 808 例血清标本结果分析[J]. 第二军医大学学报, 2011,32(12):1350-1352.

[2] 曹龙古,欧阳丹明,周志雄,等. 梅毒螺旋体四种血清学检测方法比较及检测模式初探[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(5):571-573.

[3] BISSEYE C,EKO MBA J M,NTSAME NDONG J M, et al. Decline in the seroprevalence of syphilis(下转第 145 页)

- gy, 2019, 2019; 1945.
- [5] ZENG G, HU H, ZHENG P, et al. The practical benefit of Phadiatop test as the first-line in vitro allergen-specific immunoglobulin E (sIgE) screening of aeroallergens among Chinese asthmatics: a validation study [J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6(8): 151
- [6] HU H, LUO W, WU Z, et al. A pilot study on the allergen-specific IgE to molecular components on polysensitized miteallergic asthmatic patients in Guangzhou, China [J]. *Mol Immunol*, 2019, 105(1): 38-45.
- [7] HUANG Z, LUO W, ZOU X, et al. Application of biochip microfluidic technology to detect serum allergen-specific immunoglobulin E (sIgE) [J]. *J Vis Exp*, 2019, (146): e59100.
- [8] 黄志锋, 胡海圣, 邹湘玮, 等. 采用 ImmunoCAP 法和 EUROline 法检测血清 IgE 的对比分析 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(12): 1276-1280.
- [9] LUCASSEN R, SCHULTE-PELKUM J, CSUVARSZKI C, et al. Evaluation of a novel rapid test system for the detection of allergic sensitization to timothy grass pollen against established laboratory methods and skin prick test [J]. *J Allergy (Cairo)*, 2010, 2010. pii: 524084.
- [10] HU H, HUANG H, ZHENG P, et al. The sensitization characteristics of adult Chinese patients diagnosed with chronic respiratory diseases [J/OL]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2019. [2019-09-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+sensitization+charac->teristics+of+adult+Chinese+patients+diagnosed+with+chronic+respiratory+diseases. DOI: 10. 12932/AP-161118-0441. [published online ahead of print Jun 4, 2019].
- [11] PFENDER N, LUCASSEN R, OFFERMANN N, et al. Evaluation of a novel rapid test system for the detection of specific IgE to hymenoptera venoms [J]. *J Allergy (Cairo)*, 2012, 2012; 862023.
- [12] PARK K H, LEE J, SIM D W, et al. Comparison of singleplex specific IgE detection immunoassays: ImmunoCAP phadia 250 and immulite 2000 3g allergy [J]. *Ann Lab Med*, 2018, 38(1): 23-31.
- [13] PAGANELLI R, ANSOTEGUI I J, SASTRE J, et al. Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease: clinical evaluation of a new in vitro test system, UniCAPTM, in six European allergy clinics [J]. *Allergy*, 1998, 53(8): 763-768.
- [14] SLATER J E, JAMES R, PONGRACIC J A, et al. Biological potency of German cockroach allergen extracts determined in an inner city population [J]. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37(7): 1033-1039.
- [15] 胡海圣, 罗文婷, 吴世权, 等. 烟曲霉致敏的呼吸道疾病患者对其他真菌致敏的 sIgE 水平及相关性分析 [J]. *国际呼吸杂志*, 2016, 36(10): 721-725.

(收稿日期: 2019-06-13 修回日期: 2019-10-05)

(上接第 140 页)

- markers among first-time blood donors in Libreville (Gabon) between 2004 and 2016 [J]. *BMC Public Health*, 2019, 19(1): 167.
- [4] TESFAZGHI M T, ANDERSON N W, GRONOWSKI A M, et al. Clinical performance of the BioPlex 2200 syphilis total & RPR assay at a tertiary medical center with a high rate of syphilis [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(1): e01487-1518.
- [5] 虞玲, 隋俊, 黄菁, 等. 不同方法检测梅毒螺旋体抗体的效果对照研究 [J/CD]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2016, 8(12): 142-144.
- [6] 张争鸣. ECL、RPR、TPPA、胶体金法检测梅毒的方法学比较 [J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2018, 15(1): 39-42.
- [7] 金月兰, 顾伟鸣, 杨阳, 等. 化学发光免疫分析法与梅毒螺旋体明胶凝集试验检测梅毒螺旋体特异性抗体的比较 [J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(11): 1229-1230.
- [8] 陆鸿燕, 刘海燕, 秦剑秋, 等. TRUST、TP-ELISA、TPPA 三种检测梅毒方法的比较及应用评价 [J]. *应用预防医学*, 2018, 24(1): 77-78.
- [9] 贾伟, 褚福祿, 张杰, 等. TPPA、ELISA、RPR 三种方法检测梅毒的灵敏度及特异度对比 [J]. *中国性科学*, 2017, 26(5): 75-77.
- [10] 马开富. CMIA 与 ELISA、TPPA、TRUST 检测梅毒的方法学比较 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(16): 1994-1996.
- [11] 张晓红, 张倩, 周学红, 等. 化学发光法检测梅毒特异性抗体在临床筛查试验中的应用评价 [J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(10): 780-783.
- [12] 贾敏利, 田慧芳, 王瑞军. 三种常用的不同血清学诊断方法对梅毒螺旋体抗体的检测效果分析 [J]. *中国性科学*, 2017, 26(5): 72-74.
- [13] SONMEZ C, SEZEN F, KILIC S. Performance evaluation of nine different syphilis serological tests in comparison with the FTA-abs test [J]. *J Immunolog Meth*, 2019, 464(1): 9-14.
- [14] 卞成蓉, 卢珊珊, 宋英伟, 等. 老年患者梅毒螺旋体特异性抗体生物学假阳性结果分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2017, 24(9): 967-972.
- [15] 潘兰. 四种梅毒血清检测方法比较分析 [J]. *当代医学*, 2011, 17(28): 8-10.
- [16] 车欣, 杨慧. 3 种不同梅毒检验方法检测梅毒螺旋体的结果准确率比较 [J]. *中国医药指南*, 2018, 16(3): 87-88.
- [17] 黄声凯, 李学祥, 崔婵娟, 等. 化学发光微粒子免疫分析法在梅毒感染筛查中的效能分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(24): 2945-2948.

(收稿日期: 2019-05-25 修回日期: 2019-09-28)