

• 临床检验研究 •

化学发光免疫测定在梅毒螺旋体抗体检测中的临床应用

何 惠, 周迎春, 刘基铎, 庞志宇, 李 翠, 朱海龙
(广州中医药大学第一附属医院检验科, 广州 510405)

摘要:目的 探讨全自动化学发光免疫分析仪在梅毒螺旋体特异性抗体(TPsAb)检测中的临床应用价值。方法 验证 ARCHITECT I2000 全自动化学发光免疫分析仪在 TPsAb 检测中的精密度、灵敏度、抗干扰能力及携带污染。对 50 例化学发光免疫测定 TPsAb 阴性及 307 例 TPsAb 阳性临床标本分别进行梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验(TPPA)和甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)检测。结果 ARCHITECT I2000 系统批内、批间变异系数均小于 10%。高值标准品稀释后用 TPsAb 和 TPPA 同时检测, TPsAb 检测 1:16 稀释标本为阴性, TPPA 检测 1:8 稀释标本为阴性。ARCHITECT I2000 系统的携带污染率为 0.13%。30.0 mmol/L 三酰甘油、120.0 g/L 血红蛋白、320.0 mol/L 胆红素对测定结果的影响小于 4%。TPsAb 与 TPPA 检测临床标本阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 全自动化学发光免疫分析仪检测 TPsAb, 其精密度较好, 特异性强, 灵敏度高于 TPPA, 抗干扰能力强, 无携带污染, 值得在临床推广。

关键词:化学发光测定法; 梅毒螺旋体特异性抗体; 梅毒螺旋体明胶凝集试验; 甲苯胺红不加热血清反应素试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1469-02

A full automatic chemiluminescence immunoassay instrument applied for detection of treponema pallidum antibody in clinic syphilis

He Hui, Zhou Yingchun, Liu Jiduo, Pang Zhiyu, Li Cui, Zhu Hailong

(the Department of Clinic Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To explore the clinical application of a full automatic chemiluminescence immunoassay instrument system for the detection of treponema pallidum antibody. **Methods** The precision, sensitivity, anti-interference and carry over of ARCHITECT I2000 system were analyzed, 50 TPsAb negative and 307 TPsAb positive samples, detected on ARCHITECT I2000, were analyzed by Tolidine red unheated serum regain test (TRUST) and Treponema pallidum particle agglutination test (TPPA) separately. **Results** The within-run and between-run coefficients of variation (CV) of ARCHITECT I2000 were both less than 10%. The treponema pallidum antibody could be detected by the TPsAb in 1:16 dilutions and TPPA in 1:8 dilutions of positive standards. The carry over rate of ARCHITECT I2000 was 0.13%. The affects of triacylglycerol with 30.0 mmol/L, hemoglobin with 120.0 g/L and biliubin with 320.0 mol/L were all less than 4%. There was no significant difference between TPsAb and TPPA ($P>0.05$). **Conclusion** The system could be a reliable, sensitive, fast and easily operating method for the detection of treponema pallidum antibody, and worth for clinic application.

Key words: chemiluminescence measurements; treponema pallidum antibody; toluidine red unheated serum regain test; treponema pallidum particle agglutination test

梅毒螺旋体(Treponema pallidum, TP)感染所致梅毒是常见性传播疾病之一,易导致全身性损害及病变。2006 年中国梅毒发病率为 13.35/10 万,2009 年为 64.41/10 万,年均增长 49.2%^[1-2]。梅毒筛查目前多为检测非密螺旋体特异性抗体(non-treponema specific antibody, nTsAb),阳性标本再以确证试验进行检测。筛查试验,如甲苯胺红不加热血清试验(toluidized red unheated serum test, TRUST)易出现假阴性或假阳性结果^[3],而常用确证试验,如梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验(Treponema pallidum particle agglutination assay, TPPA)及梅毒螺旋体血凝试验(Treponema pallidum hemagglutination assay, TPHA)均为手工检测方法、操作繁琐且耗时,均已不能满足临床需要。化学发光免疫测定(chemiluminescent immunoassay, CLIA)检测梅毒螺旋体特异性抗体(Treponema pallidum specific antibody, TPsAb)是近年出现的新方法,笔者从仪器性能及方法学评价等方面对该方法进行了研究,结果报道

如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 50 例体检健康者血清标本(对照组),本院门诊以及住院部 307 例疑似和确诊 TP 感染者血清标本(试验组),两组标本对应患者间年龄及性别构成差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 ARCHITECT I2000 型全自动化学发光免疫分析仪及其配套试剂(雅培,美国)、TRUST 试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司,中国)、TPPA 试剂盒(富士瑞必欧株式会社,日本)。严格按照试剂盒说明书进行试验操作及结果判读。

1.3 方法

1.3.1 重复性及灵敏度检测 以 ARCHITECT I2000 型分析仪检测样本吸光度与临界值比值(S/CO)分别为高(24.00)、中(3.00)、低(0.05)水平的 TPsAb 定值标准品,进行批内与批间

试验,批内试验为在 2 h 内连续测定各水平标准品各 5 次;批间试验为连续 20 d 内,每日分别连续测定各水平标准品各 2 次。将高值标准品进行系列稀释,分别用 ARCHITECT I2000 型分析仪和 TPPA 法检测。

1.3.2 携带污染率检测 参照国际血液学标准委员会推荐的方法^[4],分别取 TP_sAb 高值(24.00)和低值(0.05)标准品,在 ARCHITECT I2000 型分析仪上进行 TP_sAb 检测,先连续测定高值 3 次(结果为 H1、H2、H3),随即测定低值 3 次(结果为 L1、L2、L3),其中 L1、L3 分别为低值第 1 次和第 3 次测定值,H3 为高值第 3 次测定值,按公式:携带污染率(%)=(L1-L3)/(H3-L3)×100%,计算携带污染率。

1.3.3 干扰试验 TP_sAb 浓度分别为高、中、低的患者血清各 1 份,加入不同量的生物性干扰物胆红素、血红蛋白和三酰甘油,以 ARCHITECT I2000 型分析仪进行检测,记录干扰物加入前、后测定值,计算其差异^[5]。

1.3.4 临床标本检测 对试验组及对照组血清标本同时进行 TPPA 及 TRUST 检测,对 TPPA 与 ARCHITECT I2000 型分析仪检测结果不同者,结合 TRUST 检测结果与临床资料进行分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。计量资料采用(±s)表示,计数资料以百分率表示;计量资料的比较采用 t 检验,计数资料的比较采用 χ² 检验;P<0.05 时差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重复性检测 以 ARCHITECT I2000 型分析仪对高、中、低水平 TP_sAb 定值标准品进行重复性检测,批内及批间变异系数(coefficient of variation, CV)均低于 10%,见表 1。

表 1 ARCHITECT I2000 型分析仪重复性检测

定值标准品(S/CO)	批内重复性			批间重复性		
	S/CO	ss/co	CV	S/CO	ss/co	CV
24.00	23.20	1.530	6.59	24.20	1.620	6.69
3.00	2.98	0.250	8.38	3.15	0.270	8.57
0.05	0.06	0.005	8.33	0.06	0.005	8.33

2.2 灵敏度检测 以 ARCHITECT I2000 型分析仪和 TPPA 法同时检测高水品定值标准品系列稀释液,ARCHITECT I2000 型分析仪检测为阳性的最高稀释度为 1:16,TPPA 法为 1:8。

2.3 携带污染率检测 高值及低值 TP_sAb 按序检测结果见表 2,计算携带污染率为 0.13%。

表 2 ARCHITECT I2000 型分析仪携带污染率检测

定值标准品(S/CO)	发光值(RLU)		
	第 1 次	第 2 次	第 3 次
24.00(H)	574 016	573 983	574 103
0.05(L)	1 291	1 285	1 273

2.4 干扰试验 干扰物三酰甘油、血红蛋白、胆红素终浓度分别为 30.0 mmol/L、120.0 g/L 和 320 mol/L 时,干扰物加入前、后 ARCHITECT I2000 型分析仪测定结果差异小于 4%

(S/CO),且加入前、后判读结果不变。

2.5 临床标本检测 357 例临床标本以 TP_sAb、TPPA、TRUST 分别进行检测,阳性率分别 86.0%(307/357)、81.5%(291/357)和 43.1%(154/357);TPPA 与 TP_sAb 比较,阳性率差异无统计学意义(P>0.05);16 例 TPPA 与 SyphilisTP_sAb 结果不相同的受检者中,10 例既往有梅毒感染史,余 6 例自述既往无梅毒感染史,经 2 个月观察后排除梅毒早期感染。357 例标本中的 50 例体检健康者标本 3 种方法检测结果均为阴性。

3 讨 论

TP 属于密螺旋体属苍白螺旋体的苍白亚种,感染人体后诱导产生非特异性的 nTsAb 及特异性的 TP_sAb,后者较前者出现早、消失迟,即使患者在治愈后仍可检测出特异性抗体,甚至可终身检出^[6-7]。nTsAb 检测影响因素较多,多种感染性疾病(如疟疾、结核和麻风等)、怀孕、结缔组织疾病、肿瘤和吸毒等均可导致假阳性结果^[8]。由于早期梅毒患者体内针对 TP 的体液免疫主要以 IgM 为主,随后才出现 IgG 和 IgA,而 nT_sAb 检测方法针对的是 IgG,故在疾病早期易出现假阴性结果,对一期及三期梅毒存在检测盲区^[9]。目前中国 TP 抗体检测的临床需求逐年增长^[10]。虽然可用于 TP 抗体检测方法较多,但传统方法应用于低风险人群以及住院患者初筛时,易出现误诊或漏诊;手工凝集法存在特异性低、灵敏度低等缺点,已不能满足临床需要。

全自动免疫化学发光仪在 TP 抗体检测中的应用逐渐受到人们的重视。ARCHITECT I2000 型全自动化学发光免疫分析仪以 CLIA 为检测原理,采用两步法进行 TP_sAb 定性检测。首先是混合重组 TP 抗原(TpN15、TpN17 和 TpN47)包被微粒子与被检标本,标本中存在的 TP_sAb 与微粒子上的 TP 抗原相结合,进而固定于微粒子表面,并洗脱游离的其他抗体后加入抗人吖啶酯标记结合物,经洗脱去除游离的标记结合物并加入预触发液和触发液后,测定与微粒子表面 TP_sAb 结合的化学发光反应物的相对光单位,即 RLU。样本中 TP_sAb 水平与被检测到的 RLU 成正比。通过对比反应测定的 RLU 与通过检测校准品确定的临界值,即可确定标本中是否存在 TP_sAb,如果标本检测获得的 RLU 大于或等于临界值,则可视为 TP_sAb 阳性。本研究发现,ARCHITECT I2000 型全自动化学发光免疫分析仪对高、中、低值 TP_sAb 校准品重复性检测的批内、批间 CV 均小于 10%,表明该系统准确度较高;灵敏度检测试验表明,CLIA 检测 TP_sAb 为阳性的最高稀释度为 1:16,高于 TPPA 的 1:8,说明 CLIA 具有更高的灵敏度;携带污染率检测试验表明,该系统检测 TP_sAb 的携带污染率为 0.13%,说明该系统无携带污染现象。虽然 CLIA 具有较多的优势,但标本中含有较强的可吸收或发射荧光的物质时将影响测定结果的准确度^[11]。建议对于低水平的 TP 抗体阳性标本结合 TPPA、CLIA 及患者临床症状进行判断。本研究中的干扰试验表明,ARCHITECT I2000 型分析仪具有较强的抗干扰物影响能力;临床标本检测试验则表明,在临床标本检测中,CLIA 与 TPPA 检测阳性率差异无统计学意义(P>0.05)。随着 TP_sAb 自动化检测的逐步推广,建议临床同时进行梅毒筛选试验与确证试验检测^[12]。有部分学者已建议(下转第 1473 页)

从细胞群体中分离出来。笔者发现以 ISHAGE 设门法检测同型对照管的 CD34 计数结果为 0/mL(结果未示),证实可以不设同型对照测试管。因此 ISHAGE 设门法可节省试剂成本,减少检测耗时,具有较高的工作效率,适合在临床推广^[12]。

综上所述, CyFlow space 流式细胞仪应用 ISHAGE 设门法可作为检测外周血 CD34⁺ 细胞绝对计数的可靠方法。

参考文献

[1] Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34⁺ cell counts based on the ISHAGE guidelines[J]. Cytometry, 1998, 34(2): 61-70.
 [2] Sutherland DR, Keating A, Nayar R, et al. Sensitive detection and enumeration of CD34⁺ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry[J]. Exp Hematol, 1994, 22(10): 1003-1010.
 [3] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry[J]. J Hematother, 1996, 5(3): 213-226.
 [4] 李山, 黄鹏, 易珍, 等. 同一厂家不同型号血液分析仪检测结果的可比性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 833-834.
 [5] 刘艳荣, 陈珊珊, 于弘. 流式细胞术计数 CD34 阳性细胞的标准化和质量控制[J]. 中国实验血液学杂志, 2000, 8(4): 302-306.
 [6] Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34⁺ Cells in Cord Blood; a variation on a single platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy[J]. Cytometry, 2001, 46(4): 254-261.
 [7] Cassens U, Göhde W, Kuling G, et al. Simplified volumetric flow

cytometry allows feasible and accurate determination of CD4⁺ T lymphocytes in immunodeficient patients worldwide[J]. Antivir Ther, 2004, 9(3): 395-405.
 [8] Pattanapanyasat K, Lerdwana S, Noulstri E, et al. Evaluation of a new single-parameter volumetric flow cytometer (CyFlow green) for enumeration of absolute CD4⁺ T lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1-infected thai patients[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(12): 1416-1424.
 [9] Fryland M, Chaillet P, Zachariah R, et al. The partec CyFlow counter could provide an option for CD4⁺ T-cell monitoring in the context of scaling-up antiretroviral treatment at the district level in Malawi[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006, 100(10): 980-985.
 [10] Manasa J, Musabaikie H, Masimirembwa C, et al. Evaluation of the Partec Flow Cytometer against the BD FACSCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(3): 293-298.
 [11] 凌艳英, 邓家德, 陈江玲, 等. 血小板相关参数在造血干细胞移植后巨核系重建中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 427-429
 [12] Keeney M, Gratama J, Chin-Yee I, et al. Isotype controls in the analysis of lymphocytes and CD34⁺ stem/progenitor cells by flow cytometry -time to lets go[J]. Cytometry, 1998, 34(6): 280-283.

(收稿日期: 2011-01-04)

(上接第 1470 页)

以 TP_sAb 检测作为初筛试验, 尤其是对于需要对大量标本进行检测的综合医院、疾控中心等医疗卫生机构。对于 TP_sAb 阳性患者再行非螺旋体特异抗体试验检测, 依据血清滴度作为诊断依据并用于指导治疗和评价疗效, 有利于进一步避免漏诊和误诊、提高疗效和监测病情。对于存有疑问的标本, 建议同时采用两种不同的方法进行平行测定, 并结合患者的临床表现、社会关系、生活情况等综合考虑。

综上所述, 全自动化学发光免疫分析仪是自动化程度高、数据保存方便、有利于实现质量控制的检测系统, 具有重复性好、高灵敏度、高特异性、抗干扰能力强等优点, 值得在临床推广应用。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心公共卫生监测和信息服务中心. 2007 年 12 月中国甲乙丙类传染病疫情动态简介[J]. 疾病监测, 2008, 23(1): 4.
 [2] 中华人民共和国卫生部. 中国预防与控制梅毒规划(2010~2020 年)[R]. 北京: 卫生部, 2010.
 [3] 张学军, 刘维达, 何春涛. 现代皮肤病学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 991-994.
 [4] England JM, Rowan RM, van Assendelft OW, et al. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for dif-

ferential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications[J]. Clin Lab Hematol, 1994, 16(2): 157-174.
 [5] 杨昌国, 张抗. 线性评价和干扰试验中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(3): 184-186.
 [6] Kadioglu P, Aöbay O, Demir G, et al. The effect of prolactin and bromocriptine on human peripheral immune status[J]. J Endocrinol Invest, 2001, 24(3): 147-151.
 [7] 王长海, 吕长坤. 梅毒螺旋体感染筛选方法的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 609-610.
 [8] 尹建奇, 李晓娥, 刘平英, 等. 2 592 份血清中梅毒血清学假阳性结果的临床分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2001, 15(5): 317-318.
 [9] 中华人民共和国卫生部. WS 273-2007 梅毒诊断标准[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
 [10] Juárez-Figueroa L, Uribe-Salas F, Garcia-Cisneros S, et al. Evaluation of a rapid strip and a particle agglutination tests for syphilis diagnosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 59(2): 123-126.
 [11] 沈云松, 董云华, 金敏, 等. 化学发光法定量检测乙型肝炎病毒标志物临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 437-438.
 [12] 王露楠, 邓巍, 李金明. 梅毒螺旋体感染不同血清学诊断方法的临床评价[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(6): 353-355.

(收稿日期: 2011-01-10)