

• 综 述 •

# 梅毒血清学诊断实验方法研究进展

马开富<sup>1</sup>综述,刘胜武<sup>2</sup>审校

(1. 湖北省襄阳市中心医院 441021; 2. 武汉大学医学部 430072)

**关键词:**梅毒; 梅毒血清诊断; 梅毒螺旋体

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.027

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)01-0063-04

梅毒(Syphilis)是由苍白密螺旋体苍白亚种(*Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, TP)感染引起的慢性全身性性传播疾病。依靠临床症状、使用暗视野显微镜(blackfield microscopy, DFMD)直接查找病原体 and 血清学结果是诊断梅毒的有效方法。由于其自然病程存在潜伏期,直接查找病原体方法限于发病早期,梅毒螺旋体体外培养尚未成功,所以血清学诊断是梅毒诊断(特别是晚期和潜伏期梅毒的诊断)的重要手段。选择敏感性、特异性均高的血清学实验方法无论是对梅毒的诊断、治疗、预防,还是对血液制品的梅毒筛查都十分重要<sup>[1]</sup>。梅毒血清学诊断实验分非特异性、特异性梅毒螺旋体抗体实验两大类。特异性抗体实验经历了从荧光抗体吸收实验(FTA-ABS)、明胶颗粒凝集实验(TPPA),到酶联免疫吸附实验(TP-ELISA),再到化学发光免疫实验(CMIA)的发展历程<sup>[2]</sup>。实验方法的进展不仅从技术上提高了梅毒血清学诊断的敏感性、特异性、准确性,而且使检测更便捷、经济,但时至今日仍没有一种方法可满足梅毒诊断、疗效观察等需要。现就梅毒血清学诊断实验方法研究进展作一综述。

## 1 血清学诊断在梅毒诊疗、预防方面的作用

**1.1 梅毒的传染、免疫和临床特点** 梅毒主要通过垂直、接触方式传染,少数可通过间接途径(如血液)传染。其广泛流行和传播,主要表现在原发性梅毒快速递增(先天性梅毒的发病率逐年增高、部分欧洲和北美国家中男性同性恋者梅毒暴发流行)和复发率非常高,已成为世界各国严重的公共卫生问题。20世纪80年代,梅毒在中国再次流行,1993年之后,梅毒成为中国主要的性传播疾病之一,2006年梅毒列全国法定报告传染病病例数顺位的第4位(17.5万例),其中隐性梅毒报告病例急剧增加,占38.52%<sup>[3]</sup>。

**1.2 梅毒的免疫** 梅毒螺旋体是一种小而纤细的螺旋体状微生物,长5~20 μm,基本结构为一原质体的圆柱体,透明,不易染色,在体外不易存活,不能在人工培养基上生长<sup>[4]</sup>,只能通过兔睾丸中传染进行保存。通过生殖器黏膜上的小伤口进入人体后到达局部淋巴系统,通过血液传播到全身各系统,诱导机体的体液免疫。人体感染2周后,首先产生IgM型梅毒螺旋体抗体,4周产生IgG型抗体。体液免疫对机体保护作用很弱,能杀死梅毒螺旋体的是细胞免疫。梅毒螺旋体进入人体后主要诱导CD11型DC(树突状细胞)表达,引发TH1/TH2极化,启动细胞免疫<sup>[5]</sup>,早期免疫应答以TH1型细胞因子占优势,TH2型细胞因子的表达主要见于感染较长的皮损;在Ⅱ期梅毒中,梅毒螺旋体同时诱导局部和系统的固有免疫和适应性免疫;血清固定梅毒患者存在明显的细胞免疫不平衡(主要是TH1/TH2不平衡)和免疫抑制<sup>[6]</sup>;有研究表明,梅毒患者的细胞免疫功能受到不同程度的损伤,但机制非常复杂。根据临床特征、病程、血清学结果等可将梅毒分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期梅毒和隐

性梅毒<sup>[7]</sup>。

**1.3 在梅毒诊断中的独特价值** 如前所述,血清学诊断是梅毒诊断的主要手段。

**1.4 在梅毒治疗效果评价方面的作用** 梅毒治愈主要包括临床治愈和血清治愈(指2年内梅毒血清学反应转阴)。早期梅毒要求彻底治愈,以消灭传染源,力争血清反应转阴,晚期梅毒要求减轻症状,控制发展,部分血清反应转阴。

**1.5 在梅毒预防和控制方面的作用** 预防和控制梅毒的原则是干扰其传播链和预防新的病例发生,所采用的对可疑患者进行筛查、对患者所有性接触者进行预防性检查、对已接受治疗患者进行疗效观察等措施都需要血清学实验。

**1.6 在血液、体检梅毒筛查中的作用** 为了控制院内感染,梅毒血清学实验已被列入临床患者输血、手术以及各种创伤性检查前的常规检测项目<sup>[8]</sup>。安德荣等<sup>[9]</sup>报道,血液筛查中传染性疾病以梅毒阳性率最高(2.40%),实验方法的可靠性决定了血液制品使用的安全性;实验方法关系到体检结果的准确性和潜伏期梅毒筛查的效果。

## 2 梅毒血清学诊断实验方法的发展历史

**2.1 非特异性抗体实验方法** 非特异性抗体实验方法的原理是用心磷脂作抗原,检测针对TP感染后宿主细胞释放的类脂质和螺旋体表面脂质的抗体(即反应素),该类实验主要包括快速血浆反应素实验(rapid plasma reagin, RPR)、甲苯胺红不加热血清实验(toluidine red unheated serum test, TRUST)、性病研究实验室实验(veneral diseases research laboratory, VDRL)等,以RPR、TRUST最为常用。RPR实验是将心磷脂等抗原吸附在活性炭颗粒上,在白色纸卡片上形成肉眼可见的黑色凝集颗粒为阳性。通过稀释血清后再实验进行半定量;TRUST是采用VDRL抗原重悬于甲苯胺红溶液,在白色卡片上出现絮状沉淀为阳性,红色颗粒集中于中央或均匀分散为阴性;VDRL实验属于微量玻片法,是惟一推荐用于检测脑脊液反应素的实验,对无症状神经梅毒诊断具有重要价值。

**2.2 特异性抗体实验方法** 特异性抗体实验方法的原理是用梅毒螺旋体或其成分作抗原检测血清中的梅毒螺旋体抗体,该类实验主要包括FTA-ABS、TPPA、TP-ELISA、免疫印迹技术(western immunoblot technique, WIT)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)等。FTA-ABS以螺旋体Reiter株抗原吸收待检血清;TPHA用生物细胞(火鸡或羊红细胞)做载体,吸附从兔睾丸中提取的梅毒螺旋体粉碎抗原;TPPA是用梅毒螺旋体致敏明胶颗粒,产生可见的凝集反应为抗体阳性,凝集的程度与抗体浓度呈正相关,是常用的梅毒确认实验。19S-IgM-TPPA检测的是沉降系数为19S的梅毒螺旋体单一成分特异性IgM抗体(感染2周后即可测出),对于早期梅毒、梅毒复发、再感染、晚期梅毒的诊断和判断有重要价值,对诊断

胎传梅毒也有特殊意义<sup>[10]</sup>; TP-ELISA 是将基因重组表达的梅毒螺旋体抗原(常用 TpN47、TpN15、TpN17)包被在微孔板上,用双抗原夹心法测定梅毒螺旋体特异性抗体(同时检测 IgM/IgG 抗体);免疫印迹技术(western immunoblot technique, WIT)结合了免疫学和分子生物学技术。有报道,印迹膜上针对相对分子质量为  $45 \times 10^3$  和  $15 \times 10^3$  的两区带为梅毒螺旋体特异性抗原带,上述两区带任何一条出现阳性即可判断为梅毒感染,而有研究者报道印迹膜上针对相对分子质量  $17 \times 10^3$ 、 $15 \times 10^3$ 、 $47 \times 10^3$  和  $42 \times 10^3$  的 4 条区带为梅毒特异性抗原,目前没有一个标准<sup>[11]</sup>; PCR 主要有常规 PCR 和巢式 PCR 两种。国内有研究发现,常规 PCR 产物得到 377 bp 的 DNA 片段,巢式 PCR 外引物扩增得到 597 bp 的 DNA 片段,内引物扩增得到 174 bp 的 DNA 片段。从非特异性抗体实验到特异性抗体实验是梅毒血清学诊断实验方法一次质的飞跃。近年来,美国雅培公司推出了全自动微粒子化学发光免疫实验方法(chemiluminescence microparticle immunoassay, TP-CMIA),其原理为标本与包被有重组抗原(TpN15、TpN17 和 TpN47)的磁微粒及稀释液混合后,标本中的抗体同磁微粒上的抗原结合,清洗后,加入标记 acridinium 的抗人 IgM 或 IgG,孵育并洗涤后,加入预激发液和激发液,通过测定反应液的相对光强度(RLU)可反映抗体的水平<sup>[12]</sup>。意大利 LIAISON 公司推出了全自动一步夹心化学发光法免疫分析法。化学发光免疫分析技术以化学发光底物取代传统的显色底物,既保持了发光免疫分析的高灵敏度(高于 ELISA 方法一倍),又延长了发光信号时间<sup>[13]</sup>。

### 3 血清学诊断实验方法的性能比较

#### 3.1 各实验方法的优缺点

**3.1.1 非特异性抗体检测实验** RPR 操作简便、试剂成本低、肉眼判读、可快速诊断,适宜基层和人群调查,是目前国内普遍使用的方法之一。TRUST 简单快速、试剂成本低。非特异性抗体实验特异性差,在健康人群阳性率达 0.1%。在麻疹、水痘等疾病可出现急性生物学假阳性(6 个月内转阴),在系统性红斑狼疮、干燥综合征、妊娠、年老等情况下可出现慢性生物学假阳性(可持续 6 个月以上或数年)。感染梅毒后立即治疗或晚期梅毒反应素低、前带现象等易出现假阴性。对 I、III 期梅毒的诊断敏感性不理想。据报道,TRUST 对 I、II、III 期梅毒诊断的敏感性分别为 74.00%~87.00%、100.00%、34.00%~94.00%。一般和特异性抗体实验组合使用。

**3.1.2 特异性抗体实验** 有文献报道,FTA-ABS 对各期梅毒检测的特异性达到 92.20%,对 I、II、III 期梅毒检测的敏感性分别达到 80.00%、99.00%~100.00%、95.00%~100.00%。其主要缺点是需要荧光显微镜设备,实验结果判断带有一定的主观性。TPPA 用梅毒螺旋体毒株作抗原,敏感度高,人体感染后约 2 周即可检出特异性抗体,其发生的非特异性凝集可通过作吸收实验后复检排除,特异性好,是目前公认的梅毒血清确认实验。TPPA 试剂稳定,不需要专门仪器。但因梅毒螺旋体培养尚未成功,其试剂成本高。检测时需将标本作系列稀释,不适宜大批量标本检测。肉眼观察判断结果,原始数据无法保存。ELISA 特异性、灵敏度(对 I、II、III 期和潜伏梅毒梅毒的敏感性分别为 97.92%、98.29%、87.50%、100.00%,特异性为 99.30%)与 TPPA 相近,与 TPPA 结果一致性好<sup>[14-15]</sup>,且成本较低,操作方便,可使用全自动酶标仪,原始数据易于保存,是大批量标本梅毒检测的理想方法。但是因为只采用 3 种

抗原片段的组合,不可能完全覆盖所有的梅毒抗体,可能存在漏检现象。其操作步骤多,必须成批标本进行检测。

免疫印迹法检测治疗前后梅毒患者血清中抗体阳性率均为 100.00%,对 II 期梅毒、早期潜伏梅毒、神经梅毒的阳性诊断率达 100.00%,稍高于 FTA-ABS 法和 ELISA 法。免疫印迹技术几乎不出现假阳性或可疑反应,且操作简便,不要求特殊仪器和环境,结果易判定,主要缺点在于制备含有梅毒螺旋体特异性抗原的硝酸纤维素膜成本高。

PCR 取材简单,对 I、II 期梅毒检测的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 94.70%、98.60%、94.70%、98.60%和 80.00%、98.60%、88.90%、97.02%<sup>[16]</sup>。

TP-CMIA 采用原管在全自动微粒子化学发光仪器 ARCHITECT i2000 System(封闭系统)上完成检测,重复性好、易操作,可随时上机检测,方便患者及时就诊。有研究者报道,除 I 期梅毒检测的敏感性为 97.92%外,各期梅毒检测的敏感性均为 100.00%,特异性为 99.31%。且患者的经济负担与 TPHA、TPPA、ELISA 法没有区别。Knight 等<sup>[17]</sup>报道,LIAISON 一步夹心化学发光免疫法梅毒实验(CLIA)的整体灵敏度为 95.80%、特异性为 99.10%,既可作为筛选实验,又可作为确认实验。Mo 等<sup>[18]</sup>报道,以 TPPA 为标准,化学发光法(试剂为北京生产)敏感性、特异性分别为 100.00%、99.90%,化学法与 TPPA 法一致性为 99.50%~100.00%,化学发光法检测 I 期梅毒更敏感。

特异性抗体检测方法虽能检出 I 期梅毒,但存在假阴性和生物学假阳性,梅毒合并 HIV 感染时,本类实验的应用受到限制,不能用于诊断先天性梅毒。IgM 实验较 IgG 实验更难以控制。

**3.2 实验方法间特异性、敏感性比较** 有研究者报道,用微粒子化学发光(CMIA)、ELISA、TPPA、TPHA 4 种方法检测梅毒螺旋体抗体血清盘标本,结果 CMIA、ELISA、TPPA、TPHA 检测敏感性分别为 98.08%、96.15%、96.15%、92.31%,各种方法均存在一定漏检,特异性均为 100.00%。对 8 份弱阳性标本,四种方法分别检出阳性 7、6、6、4 例;有研究者报道,TRUST、ELISA、TPPA、化学发光法(试剂购自北京科美)敏感性分别为 81.25%、98.75%、100.00%、98.75%。以 TPPA 为标准,ELISA 和化学发光法敏感性高于 TRUST,差异有统计学意义,ELISA 和化学发光法敏感性差异无统计学意义<sup>[19]</sup>。Mo 等<sup>[18]</sup>报道,以 TPPA 为参考方法,化学发光法敏感性、特异性分别为 100.00%、99.90%,化学发光法与 TPPA 法的一致性为 99.50%~100.00%;有研究者报道,以 TPPA 为参照,化学发光法敏感性 100.00%,特异性 99.30%,优于 ELISA(敏感性 98.1%,特异性 97.9%)和 TRUST;有研究者报道,TP-CMIA 和 TP-ELISA 法检出阳性率高于 TPHA,差异有统计学意义。WIT、FTA-ABS、ELISA、TPPA 比较,敏感度分别为 100.00%、98.30%、98.30%、100.00%,特异性分别为 100.00%、100.00%、100.00%、92.20%。以 FTA-ABS 为参考方法,RPR、TPHA、ELISA 法诊断 I 期梅毒的特异性分别为 92.00%、98.00%、100.00%,三法诊断 II 期梅毒的特异性均为 100.00%,诊断隐性梅毒的特异性分别为 97.20%、99.40%、100.00%,诊断已经治疗患者特异性分别为 57.90%、92.60%、97.90%;有研究者报道,用 RPR、WIT、CLIA、ELISA、TPHA 同时测定 2 494 个献血员血清、131 个梅毒阳性血清、96 个易引起假阳性反应血清、1 800 个随机标本,发现除

了 RPR 特异性差 (尤其是对潜伏期梅毒), WIT、CLIA、ELISA、TPHA 特异性均为 99.90%, 敏感性分别为 100.00%、99.20%、95.40%、94.70%。CLIA 与 WIT、ELISA、TPHA 之间的整体一致性分别为 99.90%、98.70%、99.30%。袁丽<sup>[20]</sup>报道, 实验中常出现 TP-USR 阳性而 TP-ELISA 阴性的情况, 因此世界卫生组织推荐用 USR 等方法进行过筛实验, 出现阳性再用 TP-ELISA 方法进行确认。不管是特异性抗体实验还是非特异性抗体实验都会不同程度受试剂、操作环境、设备等多种因素的影响, 应用于临床诊断时都应结合患者的症状、体征、既往史和生活史。

**3.3 准确度** Muller 等<sup>[21]</sup>报道, 2000~2003 年, 德国 8 个诊断实验效能分析表明, 筛选实验 TPHA、TPPA、VDRL、FTA-ABS 定性(定量)准确度分别为 91.40%(75.40%)、98.10%(82.90%)、89.60%(71.10%)、88.00%(65.80%), ELISA、WIT 定性实验平均准确度分别为 95.00%、87.30%。

**3.4 实验方法的线性和精密度** 有研究者报道, 用 TP-CMIA、TP-ELISA、TPHA 分别测定倍比稀释标本(用阴性血清将强阳性标本作 2 倍系列稀释, 最高稀释度为 1:192), 发现 TP-CMIA 和 TP-ELISA 的 S/CO 值随抗体含量下降而降低, 其中 TP-CMIA 下降更为显著, 基本呈线性关系, TP-ELISA 只有在稀释度在 1:16 以上基本呈线性关系, 稀释度 1:32 以上 TPHA 已检测不出; 用 TP-CMIA 对 3 份阳性标本连续测定 10 次, S/CO 均数分别为 10.44、4.996、1.570, 变异系数分别为 3.86%、8.05%、3.76%; Knight 等报道, 用阳性、阴性质控血清测试 CLIA、ELISA 精密度, 结果 CLIA 阳、阴性质控血清均值、标准差、变异系数分别为 5.21%、0.27%、5.3% 和 0.24%、0.04%、12.80%, 而 ELISA 分别为 4.49%、0.75%、16.6% 和 0.24%、0.055%、20.2%。有研究者报道, 使用阳、阴性质控血清测定 CLIA 实验的变异系数, 结果阴性质控血清批内、批间变异系数均值分别为 5.1%、6.5%, 阳性质控血清的批内、批间变异系数均值分别为 6.7%、8.8%。

#### 4 血清学诊断实验的临床价值

**4.1 非特异性梅毒螺旋体抗体实验的临床价值** 非特异性梅毒螺旋体抗体实验方法适用于大量人群的血清筛查、鉴别先天性梅毒与反应素血症、进行疗效观察, 高滴度 RPR 是近期活动性感染指标, 滴度降低 1/4 说明治疗有效, 经正规而足量的抗梅毒治疗, 达到临床治愈, 观察 3~6 个月, RPR 滴度保持原来的低滴度水平或有下降趋势, 说明已无传染性。因此类实验假阳性、假阴性率较高, 用于诊断梅毒时应结合临床症状等慎重做出结论。

**4.2 特异性梅毒螺旋体抗体实验的临床价值** 特异性梅毒螺旋体抗体实验敏感性和特异性均较高, 可作为梅毒确诊实验, 但不能用于观察疗效、判定复发和再感染。有研究者用 PCR 法检测溃疡分泌物或血清中梅毒螺旋体 DNA 片段, 认为 PCR 对分析疑难病例有一定的帮助, 因此对无临床表现及血清学诊断阴性的可疑梅毒、暗视野显微镜检查阴性的早期梅毒、伴有艾滋病的梅毒、神经梅毒、胎传梅毒等, 可取相应标本作 PCR 检测。

**4.3 检测程序** 从避免医疗纠纷、减少患者心理压力及家庭矛盾诸方面考虑, 合理的检测顺序是先做 TP-CMIA 或 ELISA, 如果阳性则做 TPPA 确认, 如为阳性结果, 则再做 RPR 实验, 如为阳性则稀释定量<sup>[22-23]</sup>。

#### 5 展 望

当今实验室检测技术的发展趋势是快速化、准确化, 标本

采集微量化、简单化、自动化。ELISA、WIT、PCR 等基本符合要求, TP-CMIA 等已完全符合要求, 是梅毒血清学诊断的首选方法, 但现有血清学诊断实验还存在不足。(1) 特异性、敏感性的差距, 非特异性、特异性抗体实验都存在一定的漏检率或非特异性, 因此需要联合检测;(2) 血清学结果在疗效评价方面的局限, 非特异性实验可作为疗效观察, 但梅毒经充分治疗后, 早期症状可很快消失, RPR 要到半年至 2 年后才能消失, 少数患者持续阳性, 特异性实验与疗效的关系目前尚不明确;(3) 血清学结果不能判断有无传染性。TPPA 等确诊实验不能判断有无传染性。近来研究表明, 不同厂家的试剂其实实验结果差异有统计学意义<sup>[24-25]</sup>, 操作方法改进可大大提高潜伏期梅毒等检出率。随着科学技术的进步, 简单、可靠、经济的诊断实验方法值得期待<sup>[26]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 林碧, 陈筱华. 血液梅毒筛查中不同实验方法适用性探讨[J]. 浙江实用医学, 2008, 13(1): 68-69.
- [2] 赵娟, 谭延国. 化学发光法检测梅毒抗体的实验评价[J]. 中国皮肤性病杂志, 2008, 22(10): 626-627.
- [3] 吴晓明, 林汉生. 1999~2006 年全国淋病梅毒的流行特征分析[J]. 现代预防医学, 2008, 35(16): 3051-3052.
- [4] 卢毅. 梅毒血清学检测方法应用近况[J]. 医学动物防制, 2009, 25(3): 184-186.
- [5] 郑利雄, 房思宁. 梅毒患者外周血树突状细胞亚型及血 IL-12、IFN- $\gamma$  的检测[J]. 复旦学报, 2006, 33(2): 244-246.
- [6] 陶小华. 梅毒的临床免疫学研究进展[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2009, 16(1): 65-66.
- [7] 李安信, 王鹰. 梅毒的诊断和治疗策略[J]. 感染性疾病杂志, 2007, 20(1): 26-29.
- [8] 石新云, 吴白平. 12 290 例肿瘤患者梅毒血清学试验检测及结果分析[J]. 实用预防医学, 2008, 15(1): 225-226.
- [9] 安德荣, 古丽群·阿布拉, 张和平. 2005~2009 年和田地区献血者梅毒检验结果分析[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(7): 520-522.
- [10] 尹跃平. 梅毒血清学检测方法的应用评价[J]. 实用医院临床杂志, 2006, 3(2): 11-13.
- [11] 张华荣. 5 种梅毒检测方法的应用评估[J]. 中国国境卫生院检疫杂志, 2007, 30(4): 193-203.
- [12] 谭延国, 张岩. 微粒子化学发光法检测梅毒抗体的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 23(1): 91.
- [13] 郑和平, 黄进梅. 化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体的方法学评价[J]. 中国艾滋病性病, 2008, 14(6): 609-616.
- [14] 徐慧杰, 徐杰前, 候珏. 梅毒抗体筛查可疑感染献血员回访结果分析[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(9): 724-725.
- [15] 钟菊香, 付先辉, 陈兰芳. 三种梅毒血清学试验方法比较分析[J]. 实用预防医学, 2009, 16(1): 231-232.
- [16] Castro R, Prieto MS, Santo I, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibody against *Treponema pallidum*[J]. Clinical Microbiology, 2003, 41(1): 250-253.
- [17] Knight C, Mary S, Crum A. Evaluation of the LIAISON chemiluminescence immunoassay for diagnosis of Syphilis[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(6): 710-713.
- [18] Mo XH, Jin YL, Yang Y, et al. Evaluation of a new chemiluminescence immunoassays for diagnosis of syphilis[J]. European Journal of Medical Research, 2010, 15(1): 66-69.
- [19] 祝新, 吴志周, 柯建良. 四种梅毒血清学实验检测方法的比较[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(9): 933-934.

[20] 袁丽. 1 540 例两种梅毒抗体检测结果分析[J]. 中国医药导报, 2008,5(4):78.

[21] Muller I, Brade V, Jochen H, et al. Is serological testing tool in laboratory diagnosis of syphilis? Meta-analysis of eight external quality control surveys performed by the Germany infection serology proficiency testing program[J]. *Clinical Microbiology*, 2006, 44(4):1335-1341.

[22] 肖勇健. 2 450 例梅毒血清学结果分析[J]. 湖南师范大学学报, 2008,5(3):64-65.

[23] 王素娟, 徐建平. 3 种梅毒检测方法的比较[J]. 现代预防医学, 2008,35(3):555.

[24] 曹文琴, 宋文忠, 毕超. 六种梅毒初筛试剂的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2010,31(2):129-130.

[25] 魏万惠, 尹跃平, 王红春, 等. 全国性病防治机构实验室梅毒血清学检测首次室间质评[J]. 中国输血杂志, 2010,23(2):113-118.

[26] 邓兆亨, 彭志雄. TPPA 与改进 TRUST 联合检测对梅毒诊治的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009,30(11):1136.

(收稿日期:2011-08-09)

• 综 述 •

# 纳米材料在表面等离子体共振生物传感器中的应用

汪 龙<sup>1,2</sup>综述, 丁世家<sup>1</sup>△ 审校

(重庆医科大学:1. 医学检验系/临床检验诊断学教育部重点实验室;2. 公共卫生学院 400016)

**关键词:** 纳米材料; 生物传感器; 敏感性与特异性; 表面等离子体共振

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.028

**文献标识码:** A

**文章编号:**1673-4130(2012)01-0066-03

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感器是以金属薄膜和电介质分界面处发生的表面等离子体共振现象为基础的光学检测系统,具有方便、快捷、无需标记、实时检测、非破坏性及高选择性等特点,是检测、分析生物分子相互作用的有效工具,已被广泛应用于医学诊断、药学研究、食品安全及环境监测等领域。传统的 SPR 生物传感器不能检测到敏感膜上生物分子吸附量小于 1 pg/mm<sup>2</sup> 所引起的极小折射率变化,从而无法用于超灵敏检测分析。这成为限制 SPR 生物传感器应用的一项重要因素,促使国内外众多研究学者都致力于探索各种能提高该检测灵敏度的方法<sup>[1]</sup>。纳米材料是指尺寸在三维空间中至少有一维在纳米尺度(1~100 nm)范围内或以他们为结构单元组成的材料,当物质的颗粒尺寸进入纳米级时,便有了不同寻常的小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应等。近年来,利用纳米材料来提高 SPR 生物传感器检测灵敏度已取得重大的进展,并展现出良好的发展势头和巨大的应用潜力。本文就金纳米粒子、磁性纳米粒子、碳纳米管三种纳米材料在 SPR 生物传感器中的应用现状作一综述,并对其发展前景作出展望。

## 1 金纳米粒子

金纳米粒子具有体积小、比表面积大、容易修饰、良好的光学可调性、生物相容性等特点。将金纳米粒子应用在 SPR 生物传感器中,不仅可使金膜表面的吸附量大大增加,同时金纳米粒子和金膜表面的电磁场耦合作用都可使检测信号明显增强,有效地提高检测灵敏度<sup>[2]</sup>。因此,金纳米粒子被广泛引入到 SPR 生物传感器的各个应用领域。

**1.1 医学诊断** SPR 生物传感器能够准确、简便、快速检测多种生化指标,并实时监测生物分子间的相互作用,可作为临床疾病诊断的有效工具。2005 年 Mitchell 等<sup>[3]</sup>首次将金纳米粒子用于 SPR 生物传感器中检测孕酮小分子。孕酮分子通过共价结合的方式固定在 CM5 芯片表面,采用竞争抑制法将抗孕酮的单克隆抗体、金纳米粒子标记的第二抗体依次流经芯片表面,通过这种方式使信号增强了 13 倍,检测限在仅使用单抗的基础上提高了两个数量级。2008 年 Mitchell 和 Lowe<sup>[4]</sup>

又将该方法用于人类唾液中睾酮的测定,检测限低至 3.70 pg/mL,从而为临床上睾酮的定量分析提供了新方法。后来, Jiang 等<sup>[5]</sup>和 Riskin 等<sup>[6]</sup>分别将金纳米粒子用于雌三醇(E3)和氨基酸的 SPR 生物传感器检测中,也都实现了超灵敏检测。金纳米粒子的应用克服了传统 SPR 生物传感器检测小分子化合物灵敏度低的缺陷,有效地扩大了 SPR 生物传感器的应用范围。

金纳米粒子增强的 SPR 生物传感器也广泛用于核酸及蛋白质等生物大分子的诊断研究。2006 年 Yao 等<sup>[7]</sup>在羧基化的葡聚糖表面固定寡核苷酸探针,通过“三明治”杂交检测 39 个碱基的核酸序列,并利用金纳米粒子的信号增强作用,使检测限低至 1.38 fmol/L,该检测方法还可用于 p53 的互补 DNA 序列的分析,并呈现良好的特异性和重现性。免疫球蛋白 E(IgE)对变态反应性疾病的诊断具有重要价值, Kim 等<sup>[8]</sup>通过在 SPR 生物传感器金膜表面固定 IgE 适配体捕获 IgE,再用金纳米粒子标记的抗 IgE 抗体与被捕获的 IgE 特异结合来检测 IgE,检测限达到飞摩尔级别,而传统检测方法的检测限仅能达纳摩尔级别。此外,金纳米粒子也被用于提高 SPR 生物传感器检测转铁蛋白<sup>[9]</sup>、金属蛋白酶<sup>[10]</sup>、肿瘤坏死因子 α<sup>[11]</sup>等蛋白质的灵敏度。

**1.2 药学研究** 金纳米粒子的药物靶向传递功能被广泛应用于肿瘤化疗中,但是金纳米粒子用于药物传递系统之前,需要对其与单克隆抗体结合形成的复合物对相应抗原的亲合力进行研究。2009 年 Debotton 等<sup>[12]</sup>用 SPR 生物传感器分析共价结合了金纳米粒子的 AMB8LK 单克隆抗体对相应的 H-铁蛋白抗原的亲合力,结果表明金纳米粒子的应用并不会影响 AMB8LK 和 H-铁蛋白的特异性结合,进一步实验研究表明,包裹了紫衫醇抗肿瘤药的金纳米粒子修饰的 AMB8LK 单克隆抗体对 A-549 肿瘤细胞株具有良好的特异性杀伤作用,从而为肿瘤药物靶向传递系统提供了新的方法。

奶类和肉制品中的药物残留被确认为对人体健康有严重危害,因此,制定出检测微量药物残留的方法至关重要。Yuan 等<sup>[13]</sup>在 SPR 生物传感器金膜表面用分子自组装技术固定氯霉素,利用竞争抑制法通过抗氯霉素抗体与氯霉素结合,再利

△ 通讯作者, E-mail: dingshijia@163.com.