

诊试验,该试验采用的是纯化的致病性梅毒螺旋体(Nichols 株)抗原,其敏感性、特异性均较高,被誉为“证实试验”,但这种试验并非完美无缺,仍可出现生物学假阳性^[3-4]。

CLIA 技术是 ELISA 技术的新发展,通过化学发光底物取代传统的显色底物,其特点是酶促增强发光信号,并稳定和延长发光信号时间,既保持发光免疫分析的高灵敏性,又克服了传统方法光信号持续时间短的缺点。目前常用的有辣根过氧化物酶催化鲁米诺发光和碱性磷酸酶催化金刚烷衍生物发光。CLIA 法检测梅毒螺旋体是近年应用的一种新技术,有报道其对各期梅毒的敏感性和特异性分别大于 98.7%和 99.9%^[5-6]。本研究对大量标本的检测结果显示 CLIA 阳性符合率为 100.0%,高于 TPPA 的 98.7%。对 CLIA 阳性结果的 S/CO 值分析,可以看出在 S/CO 值低时容易出现 TPPA 的阴性结果,结合 16 份 WB 法确认阴性,再次进行 CLIA 检测也为阴性的结果,这一方面说明 CLIA 在敏感性方面比 TPPA 有优势,同时也说明 CLIA 检测中会由于标本处理等原因而存在假阳性的结果。

在本研究中, WB 法检测阳性 4 份,其中 1 份含 TP45、TP47 条带, 2 份含 TP17、TP47 条带, 1 份含 TP17、TP45、TP47 条带, 不确定 5 份,均为单条 TP47 阳性。这是由于 CLIA 包被的梅毒抗原是针对 TP15、TP17、TP47 抗体,而 TPPA 采用的是纯化的致病性梅毒螺旋体菌体抗原,针对的是 TP15、TP45 的抗体,所以当仅有 TP17、TP47 抗体时, TPPA 无法出现阳性。有报道 TP47 为梅毒早期诊断指标^[7], TP15 是活动期梅毒标志抗体^[8-10], 因此,这 9 份抗体不全型梅毒标本可能属于早期感染或隐性感染的患者,说明 CLIA 比 TPPA 在早期或隐性梅毒感染中的检测更具优势。

综上所述,CLIA 作为新开发的梅毒抗体检测试剂,在敏感性上与 TPPA 比较有一定的优势,而且具有操作简便、易于自动化、结果判断客观且重复性好的特点,便于进行大规模的筛选试验。由于 CLIA 也存在个别的假阳性,在临床工作中,

• 检验技术与方法 •

可以将 CLIA 与 RPR 或 TRUST 进行结合检验,对阳性结果用 TPPA 进行复查,对于 CLIA 与 TPPA 结果不相符的,用 WB 法进行确认,以达到最准确的结果。

参考文献

[1] 刘建华. 4 种梅毒螺旋体检测方法的临床评价[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 1031-1032.

[2] 高俊, 黄文红. 梅毒酶联免疫吸附测定法假阳性结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1439-1440.

[3] 武建国. 老年人抗梅毒螺旋体抗体测定的假阳性率偏高[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(4): 241-243.

[4] 程艳杰, 王广杰, 王旭, 等. 梅毒螺旋体特异性抗体检测方法的实验室评价[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(3): 272.

[5] 侯晓青, 梁艳, 陈洁, 等. 化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体的实验评价[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 365-367.

[6] Marangoni A, Sambri V, Accardo S, et al. Evaluation of LIAISON treponema screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(10): 1231-1234.

[7] 张良芬. 梅毒螺旋体 47 kD 脂蛋白的研究现状[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 2001, 27(4): 219-221.

[8] Sato NS, Hiratani H, Hirata RDC, et al. Analysis of Treponema pallidum recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1999, 41(2): 115-118.

[9] 何惠, 周迎春, 刘基铎, 等. 化学发光免疫测定在梅毒螺旋体抗体检测中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1469-1470.

[10] 白雪梅, 闪全忠, 刘欧, 等. 不同方法检测抗梅毒抗体阳性标本的分析[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(2): 96-98.

(收稿日期: 2011-08-12)

被动凝集法和 ELISA 法检测肺炎支原体抗体及其 IgM、IgG 分型研究

欧阳芳, 吴 豫, 龚跃云

(中国人民解放军第九四医院检验病理科, 南昌 330002)

摘要:目的 研究成人呼吸道感染患者中肺炎支原体(MP)抗体效价检测和 MP-IgM、MP-IgG 抗体分型检测结果的一致性及其在 MP 诊断中的价值。方法 分别采用被动颗粒凝集法(PPA)、ELISA 法检测 527 例成人呼吸道感染者的 MP 抗体效价、MP-IgG 和 MP-IgM, 对所测结果进行对比研究。结果 经配对 χ^2 检验发现, PPA 法与 ELISA 法所测得的 MP-IgM 结果之间差异有统计学意义($P=0.000$), 且结果缺乏一致性($Kappa=0.256$)。而 PPA 法与 ELISA 法所测得的 MP-IgG 结果之间差异无统计学意义($P=1.000$), 且具有良好的一致性($Kappa=0.702$)。如果将 MP-IgM 和(或)MP-IgG 阳性的患者均认为 ELISA 法检测阳性, 与 PPA 法所报告的 MP 抗体结果之间差异无统计学意义($P=0.073$), 两种报告方式之间具有更好的一致性($Kappa=0.746$)。结论 在成人患者中, 诊断 MP 感染不能仅依靠检测 MP-IgM, 而应动态检测 MP-IgG 或 MP 抗体效价, 并结合患者病史、发病时间、用药情况等因素综合分析。

关键词: 支原体, 肺炎; 被动凝集法; 酶联免疫吸附测定; 抗体分型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1352-03

肺炎支原体(MP)是引起呼吸道感染最常见病原体^[1], 目前检测 MP-IgM 抗体是诊断 MP 感染的最常用的诊断证据^[2], 各临床实验室采用的检测方法也较多, 其中被动颗粒凝集法(PPA)和 ELISA 法都得到了广泛使用。然而在实际工作中使用这两种方法得出 IgM 阳性结果的一致性并不令人满意,

给临床解释工作带来一定的困难。一些临床研究也发现 PPA 法检测 MP 抗体阳性率偏高, 认为 PPA 法检测 MP 抗体所设置的 1:40 的阳性界值偏低, 应提高到 1:80 或 1:160^[3], 但实际工作中发现这样操作仍然不能完全解决问题, 尤其在成人患者中效果不明显。因此笔者采用这两种方法对成人患者的

MP 抗体效价和 MP-IgM 和 MP-IgG 分型测定之间的结果进行了比较分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 1 月至 2010 年 8 月在本院呼吸科就诊疑似 MP 感染患者 527 例,其中男 269 例,女 258 例,年龄 18~75 岁,平均(32±19.3)岁。所有患者于初诊时采集血样,同时进行 MP 抗体效价和 IgM、IgG 抗体检测。

1.2 方法

1.2.1 MP 抗体效价检测 采用日本富士瑞必欧株式会社生产的 MP 抗体试剂盒,方法学为 PPA 法,严格按试剂说明书操作。效价大于或等于 1:40 的判定为阳性。对于结果判定为可疑的患者于 7 d 后重新采集血样检测并记录此次结果,如第 2 次检测结果仍为可疑则判定为阴性。

1.2.2 MP-IgG 抗体和 MP-IgM 抗体检测 采用德国欧蒙抗肺炎支原体 IgM、IgG 抗体试剂盒,方法学为 ELISA 法,严格按试剂说明书操作。样本吸光度值/标准品吸光度值大于或等于 1.1 判定为阳性,小于 0.8 判定为阴性。样本吸光度值/标准品吸光度值大于或等于 0.8 且小于 1.1 的为可疑,可疑样本于 7 d 后重新采集血样检测并记录此次结果,如第 2 次检测仍为可疑则判定为阴性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。PPA 法和 ELISA 法之间的比较采用配对 χ^2 检验,并计算一致性 Kappa 系数,考察 PPA 法测定 MP 抗体效价与 ELISA 法测定 MP-IgM、MP-IgG 所得结果之间的一致性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,Kappa ≥ 0.7 为一致性良好,0.4<Kappa<0.7 为中等程度一致性,Kappa ≤ 0.4 为一致性较差。

2 结 果

2.1 527 例患者采用 PPA 法检测 MP 抗体结果 采用 PPA 法检测结果中,MP 抗体效价小于 1:40 的有 96 例,大于或等于 1:40 的有 431 例。见表 1。

2.2 527 例患者采用 ELISA 法检测 MP-IgM 和 MP-IgG 结果 MP-IgM 和 MP-IgG 均为阴性的 84 例,MP-IgM 单阳性的 13 例,MP-IgG 单阳性的 226 例,MP-IgM 与 MP-IgG 同时阳性的 204 例。见表 1。

表 1 527 例呼吸道感染患者不同效价 MP 抗体与 MP-IgM 和 MP-IgG 分型检测结果

MP 总 抗体效价	MP 总抗体分型			
	全阴例数 [n(%)]	IgM 单阳性 [n(%)]	IgG 型单阳性 [n(%)]	IgM 型与 IgG 型 同时阳性[n(%)]
<1:40	71(74.0)	2(2.0)	23(24.0)	0(0.0)
1:40	8(12.1)	7(10.6)	51(77.3)	0(0.0)
1:80	4(4.4)	3(3.2)*	64(69.6)	21(22.8)
1:160	1(1.2)	1(1.2)**	43(51.2)	39(46.4)
1:320	0(0.0)	0(0.0)	32(46.4)	37(53.6)
1:640	0(0.0)	0(0.0)	12(16.4)	61(83.6)
1:1280	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	21(99.5)
1:2560	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	14(100.0)
>1:5120	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(100.0)

:有 3 例样本初检为 MP-IgM 可疑阳性,MP 抗体效价小于 1:40,7 d 后阳性;:1 例样本初检为 MP-IgM 可疑阳性,MP 抗体效价 1:40,7 d 后阳性。

2.3 527 例患者采用 PPA 法检测 MP 抗体和 ELISA 法检测

MP-IgM 和 MP-IgG 之间的比较 经配对 χ^2 检验发现,PPA 法与 ELISA 法所测得的 MP-IgM 结果之间差异有统计学意义($P=0.000$),且结果缺乏一致性(Kappa=0.256)。相反 PPA 法与 ELISA 法所测得的 MP-IgG 结果之间差异无统计学意义($P=1.000$),且结果间具有良好的一致性(Kappa=0.702)。而如果将 MP-IgM 和(或)MP-IgG 阳性均认为 ELISA 法检测阳性,与 PPA 法所报告的 MP 抗体结果之间差异也无统计学意义($P=0.073$),且两种报告方式之间具有更好的一致性(Kappa=0.746)。见表 2。

表 2 PPA 法检测 MP 抗体效价和 ELISA 法检测 MP-IgM 和 MP-IgG 结果分析(n)

MP 抗体效 价(PPA 法)	ELISA 法 (MP-IgM)			ELISA 法 (MP-IgG)			ELISA 法 (MP-IgM 或 MP-IgG 阳性)		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
<1:40	215	216	431	407	24	431	418	13	431
$\geq 1:40$	2	94	96	23	73	106	25	71	96
合计	217	31	527	430	97	527	443	84	527

3 讨 论

MP 是引起儿童和成人呼吸道感染的重要原因,以往认为 MP 感染多见于儿童,然而在近年的流行病学调查中发现,MP 感染在 16~44 岁的成人中更为多见^[4]。MP 对大环内酯类药物敏感但是对常规治疗耐受,因此 MP 感染的早期诊断受到普遍关注。MP 感染的实验室诊断方法大致分为三类^[5]:病原体的分离与培养、PCR 诊断技术以及血清学检查。其中 MP 的分离培养虽然是最可靠的确诊依据,但是存在临床标本中病原体含量少、呼吸道污染的杂菌多、分离培养需要的时间长以及阳性率低等缺点,因而不能作为临床快速诊断的方法。PCR 方法诊断的敏感性和特异性都较好,但假阳性和假阴性率高等因素制约了其在临床中的开展。因此检测 MP 抗体成为临床辅助诊断 MP 感染的重要实验室证据。

在抗原抗体反应中,由于 IgM 类抗体的作用比 IgG 类抗体大数百倍,因此凝集反应主要测定 IgM 抗体。在许多对儿童 MP 感染的研究中也认为采用 PPA 法检测的 MP 抗体为 IgM 类抗体^[3]。但是在实际工作中,笔者发现 PPA 法的阳性率远高于 ELISA 法检测的 MP-IgM,特别在成人患者中这种结果的不一致性尤为突出,在本研究中统计了 527 例成人患者的 PPA 法和 ELISA 法检测 MP-IgM 抗体的结果,其 Kappa 系数仅为 0.256,尽管不同的方法学可能带来两种方法之间结果的差异,但是如此之大的不一致性并不能仅仅用方法原理和包被抗原的不同来解释。PPA 法采用明胶颗粒作为载体,载体颗粒增大了可溶性抗原(或抗体)的反应面积,因此其敏感性比直接凝集反应高 2~8 倍。这种试验适用于各种可溶性的抗原(或抗体)的检测^[6]。且在 PPA 法操作说明书中未提到该方法是为了检测 MP-IgM 而设计的,因此笔者认为 PPA 法检测的不只是 MP-IgM 而是 MP 总抗体。事实上当笔者对 527 例成人患者的 MP-IgM 和 MP-IgG 结果进行一致性分析时,发现 ELISA 法检测的 MP-IgG 与 PPA 法结果取得了良好的一致性,Kappa 系数为 0.702,而当将 MP-IgG 和(或)MP-IgM 阳性的患者均认为 MP 抗体阳性结果时,与 PPA 法检测结果一致性检验 Kappa 系数达到了 0.746,有更好的一致性。

通常认为机体在感染病原体后,免疫系统最早产生的是特

异性 IgM 抗体,以后逐渐降低,几天后出现 IgG 抗体,且随着发病时间的延长,病原体不断地刺激免疫系统导致抗体效价呈上升趋势,因此 IgM 阳性是早期感染的标志,IgG 阳性是既往感染的标志,而 IgM 和 IgG 同时阳性则往往是急性感染的标志^[7]。而笔者在研究成人患者 MP-IgM 和 MP-IgG 亚型时发现,PPA 法阴性和 1:40、1:80 等不同 MP 抗体效价中,均有不同比例的患者 MP-IgM 或 MP-IgG 单阳性,到 1:640 以上的高效价后,才比较一致地出现 MP-IgM 和 MP-IgG 同时阳性。可能因为在成人患者中,MP 感染后潜伏期较长,常为 2~3 周^[8],当患者出现症状而就诊时,IgM 抗体可能在高水平能被检测到,也可能含量很低不能被检测到,因此要正确理解 MP 抗体的诊断意义,检测 MP 抗体反映的是人体对于 MP 感染后的一种反应性,而不是检测 MP 本身,即使 IgM 抗体为阴性,也不能否定 MP 感染,应严格按照 MP 感染诊断原则,动态检测 MP-IgG 抗体或 MP 抗体效价,当抗体效价升高或降低 4 倍以上方可确诊,检测单份样本意义不大^[9-11]。对于临床上无法获得双份样本的患者,也应该结合患者病史、发病时间、用药情况等因素综合分析 MP 抗体阳性的临床意义。

参考文献

[1] Niederman MS. Community acquired pneumonia; the US perspective[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2009, 30(2): 179-188.

• 检验技术与方法 •

振荡孵育法用于国产一步法 HBsAg ELISA 试剂盒的改进

刘 艳,赵中华,王 刚,汪瑞忠
(上海市浦东新区人民医院检验科 201200)

摘要:目的 改变酶反应条件以提高国产一步 ELISA 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)试剂盒检测敏感性。方法 将酶反应的条件由 37℃孵育改为 37℃振荡孵育,观察检测结果的敏感性和精密度的变化。结果 将酶反应的条件改为 37℃振荡孵育,HBsAg ELISA 试验检测的阳性判定值(CO)不变;20 份雅培 i2000 检测 HBsAg 为阴性的标本,在振荡孵育时仍为阴性结果;灰区标本振荡孵育后,吸光度 A 值增加 2 倍左右,与单纯孵育检测相比敏感性提高 4 倍左右;80 份化学发光微粒子免疫测定(CMIA)弱阳性标本中有 62 份可被振荡孵育的 ELISA 检出(检出率 77.5%),而孵育组仅检出 46 份(检出率 57.5%),故振荡孵育法对弱阳性标本的检出率明显高于孵育法的 ELISA。结论 振荡孵育应用于 HBsAg ELISA 酶反应中可明显提高检测的灵敏度。

关键词:肝炎表面抗原,乙型; 酶联免疫吸附测定; 试剂盒,诊断; 一步法; 敏感度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)11-1354-02

目前 ELISA 法由于成本低廉,敏感性、特异性均较理想,成为国内检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的首选方法之一。但相比于化学发光法,前者的灵敏度明显较低^[1]。国产 HBsAg ELISA 试剂盒酶反应的条件为 37℃孵育,笔者经过试验发现,将酶反应条件适当改进——在孵育的同时振荡,敏感性得到了明显提高。

1 资料与方法

1.1 一般资料 取自浦东新区人民医院 2010 年 8 月至 2011 年 3 月的患者标本(标本检测方法为化学发光法,检测仪器为雅培 i2000SR 化学发光微粒子免疫分析仪),包括 20 份 HBsAg 阴性标本,20 份阳性标本及 80 份弱阳性标本(HBsAg 0.050~2.000 IU/mL),阳性标本全部经中和试验确认并复检。标本收集好后,置-70℃冰箱保存,试验前复融。

1.2 仪器与试剂 上海科华公司 HBsAg ELISA 检测试剂盒(批号:20100911);美国雅培公司化学发光微粒子免疫测定(CMIA)配套的 HBsAg 检测试剂(批号:94412LF00)。主要仪

- [2] 朱宏,计雪强,缪美华,等.肺炎支原体抗体的定量检测及临床意义[J].国际检验医学杂志,2007,28(9):788-789.
- [3] 刘玉玲,张杰.颗粒凝集法检测肺炎支原体特异性抗体 451 例结果分析[J].职业与健康,2007,23(11):912-913.
- [4] 黄海辉,张婴元,汪复,等.亚洲地区肺炎支原体和肺炎衣原体在成人社区获得性肺炎中的流行病学研究[J].中国感染与化疗杂志,2008,8(2):89-93.
- [5] 胡元生,温和,周银娣,等.三种肺炎支原体检测方法的比较[J].临床输血与检验,2008,10(1):9-10.
- [6] 王兰兰.临床免疫学与检验[M].北京:人民卫生出版社,2007:86.
- [7] 陆权,陆敏.肺炎支原体感染的流行病学[J].实用儿科临床杂志,2007,22(4):241-243.
- [8] 代亚东,尹金星,王晶.成人肺炎支原体感染 48 例临床分析[J].吉林医学,2007,28(12):1406-1407.
- [9] 张德文,罗兴旺.被动颗粒凝集法测定肺炎支原体抗体的临床应用[J].国际检验医学杂志,2010,31(1):65-66.
- [10] 朱宏,计雪强,缪美华,等.肺炎支原体抗体的定量检测及临床意义[J].国际检验医学杂志,2007,28(9):788-789,792.
- [11] 谭笑红,何静玲,崔奕文,等.肺炎支原体抗体 IgM 检测的常用方法比较[J].中华医学研究杂志,2005,5(12):1234-1235.

(收稿日期:2011-08-20)

器:其林贝尔 MH-1 微型振荡器;上海一恒恒温孵育箱;BIO-RAD 680 酶标仪;BIO-RAD 1575 洗板机;雅培公司 i2000SR 化学发光微粒子免疫分析仪,序列号为 C06A1322。质控血清为来自上海市临检中心的 HBsAg 质控血清,批号为 1001,置-70℃冰箱保存,试验前复融。

1.3 方法

1.3.1 国产 ELISA 试剂检测 HBsAg 按照试剂盒说明书进行操作,S/CO(CO 为阳性判定值 cutoff 值)大于 1.0 即判为阳性。

1.3.2 振荡孵育的国产 HBsAg ELISA 试剂检测 使用国产 HBsAg ELISA 试剂盒,操作按说明书进行,改动之处在于 37℃孵育时,将酶标板固定在振荡器上,一同移至孵育箱中反应,反应时调频率 2 800 r/min。

1.3.3 CMIA 法检测 HBsAg 参照雅培公司仪器和试剂盒说明书,由仪器自动检测并判断结果,HBsAg≥0.05 IU/mL 判为 HBsAg 阳性。