

三种梅毒螺旋体抗体检测方法的比较分析

魏从芳^{1,2}, 汤巧^{1△}

(1. 南京医科大学附属南京医院检验科, 江苏南京 210006; 2. 南京市建邺区江心洲社区卫生服务中心检验科, 江苏南京 210019)

摘要:目的 比较化学发光法(TP-CLIA)、酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)和梅毒螺旋体明胶颗粒凝聚试验(TPPA)对梅毒螺旋体特异性抗体(TP-Ab)检测的意义。方法 分别用 CLIA、ELISA 和 TPPA 检测患者的 1 797 份血清样本, 收集 CLIA/ELISA/TPPA/法检测均阳性但临床未明确诊断的标本及结果不一致标本以重组免疫印迹法(RIBA)最终确认。结果 三种方法共筛选 69 例阳性及可疑血清标本。CLIA/ELISA/TPPA 法均阳性标本 63 例, 其中 52 例有临床明确诊断。另 11 例 3 种方法检测均阳性但未明确诊断标本和 6 例检测结果不一致标本用 RIBA 确证。CLIA 法确认阳性 66 例, 阳性率 3.67%; ELISA 法确认阳性 65 例, 阳性率 3.62%; TPPA 法法确认阳性 61 例, 阳性率 3.39%; CLIA、ELISA 及 TPPA 法敏感性分别为 98.51%、97.02% 和 91.05%; 特异性均为 99.88%; 诊断效率分别 99.83%、99.78 和 99.66 %。结论 CLIA 法和 ELISA 法敏感性均高于 TPPA 法, 不管用何种方法检测对于临床诊断不符的标本均应慎重, 必要时用 RIBA 法补充确认, 以排除假阳性。

关键词:梅毒螺旋体; 化学发光法; 酶联免疫吸附试验; 梅毒螺旋体明胶颗粒凝聚试验; 重组免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)04-0458-03

Experimental evaluation on the determination of specific antibodies to *Treponema pallidum* using three different methods

Wei Congfang^{1,2}, Tang Qiao^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Community Health Service of JianYe Qu Central Bar, Nanjing 210019, China)

Abstract: Objective To compare the consistency of chemiluminescent immunoassay (CLIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *Treponema pallidum* particle agglutination (TPPA) in detecting the specific antibody against *Treponema pallidum* in patient serum. **Methods** 1 797 serum samples were collected and detected by TP-CLIA, TP-ELISA and TPPA. The positive samples were confirmed by recombinant immunoblot assay (RIBA). **Results** In 1797 serum samples, 66 were positive for CLIA; 65 were positive for TP-ELISA; 61 were positive for TPPA, 17 serum samples with contradictory results were determined by RIBA. The Sensitivity was 98.51%, 97.02% and 91.05%, and diagnostic efficiency was 99.83%, 99.78% and 99.66 %, respectively. All three methods have the same specificity of 99.88%. **Conclusion** The sensitivities of CLIA and TP-ELISA are better than that of TPPA. CLIA should be combined with TPPA and confirmed by clinical information.

Key words: *Treponema pallidum*; chemiluminescent immunoassay; enzyme-linked immunosorbent assay; *Treponema pallidum* particle assay; recombinant immunoblot assay

梅毒是梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, TP)所引起的一种经典的慢性传播疾病, 几乎能侵犯全身各个器官, 并产生多种多样的症状和体征, 近年来该病的发病率呈逐年上升趋势^[1]。因此梅毒的明确诊断和治疗显得至关重要。目前临床实验室检测梅毒螺旋体感染的血清学方法主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)和梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)^[2]; 化学发光法(CLIA)作为国内新开发的梅毒血清学特异性抗体检测方法, 检测精密度好, 无携带污染现象, 灵敏度和特异性都很高, 自动化程度高, 值得在临床推广^[3]。本文就这三种方法对梅毒螺旋体抗体的检测进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 2013 年 4 月至 5 月南京市第一医院患者血清样本共 1 797 例。抽血 4 h 内分离血清, 4 ℃ 保存, 次日进

行 CLIA 和 ELISA 法检测, 收集 CLIA/ELISA 法检测阳性标本 TPPA 复检, 收集所有阳性及可疑标本分装于 -20 ℃ 集中保存, 以 western blotting(WB)法确证。

1.1.2 仪器与试剂 CHEMCLIN600 型全自动化学发光免疫分析仪以及配套的梅毒螺旋体抗体诊断试剂盒(北京科美生物技术有限公司)、全自动酶联免疫分析仪 ELISA-STAR(瑞士澳斯邦公司)以及梅毒螺旋体抗体诊断试剂盒(厦门英科新创科技有限公司); TPPA 试剂盒为日本富士瑞必欧株式会社产品。WB 确证试剂, 即重组免疫印迹法(recombinant immunoblot assay, RIBA)试剂是由欧蒙医学实验诊断股份公司生产的抗梅毒螺旋体抗体 IgG 检测试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 CLIA 法 采用双抗原夹心一步法免疫分析模式, 使用 TP 抗原制备固相抗原, 用辣根过氧化物酶(horseradish

peroxidase, HRP) 标记 TP 抗原, 与样品中的梅毒螺旋体抗体形成双抗原夹心。经洗涤后, 加入化学发光底物液, 测定其发光值(RLU), 根据临界值判断样品中是否含有梅毒螺旋体(TP) 特异性抗体, 结果判断以 S/CO \geq 1.0 为阳性, S/CO $<$ 1.0 为阴性。

1.2.2 ELISA 法 采用双抗原夹心 ELISA 法检测血清或血浆中梅毒螺旋体抗体。在微孔条预包被基因表达梅毒抗原, 与血清中抗 TP 抗体反应, 再加入 HRP 标记基因工程重组梅毒抗原与之结合, 然后用 TMB 系统作用显色, 再以酶免仪结果判断, S/CO \geq 1.0 为阳性, S/CO $<$ 1.0 为阴性。

1.2.3 TPPA 法 采用超声裂解纯化的梅毒螺旋体 Nichols 株为抗原, 包被在人工载体明胶粒子上, 与血清中的特异性抗体结合后出现肉眼可见的凝集反应的检测方法。

1.2.4 RIBA 法 通过电泳转移硝酸纤维素膜抗原条上含有梅毒螺旋体的抗原和样本中的特异性 IgG 抗体结合, 在于酶标抗人 IgG 温育后通过显色条带以判定阴性、可疑及阳性结果, 一般以出现两条及以上特异性条带(P15、P17、P45、P47)为阳性; 一条特异性条带为可疑; 无特异性条带为阴性。

1.3 统计学处理 分别统计三种方法的阳性结果并计算阳性率, 采用 SPSS13.0 统计软件对检测结果进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CLIA、ELISA 和 TPPA 法检测结果 共检测血清标本 1 797 份, 获得阳性或可疑结果共 69 例。三种方法测定均为阳性结果的标本 63 例; 其中 52 例临床已明确诊断未用 RIBA 法确认; 另 11 例 3 种方法检测均阳性但未明确诊断标本和 6 例检测结果不一致标本以 RIBA 确诊。结果为: CLIA 筛选未明确诊断的 16 例阳性标本, RIBA 法确认 14 例阳性, 1 例阴性; ELISA 法筛选未明确诊断的 15 例阳性标本, RIBA 法确认 13 例阳性, 1 例阴性; TPPA 法筛选 11 例未明确诊断阳性标本, RIBA 法确认 9 例阳性, 1 例阴性; 值得注意的是有 1 例标本三种方法测定结果均为阳性, RIBA 法测定结果为不确定, 见表 1。部分 RIBA 法测定结果见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

表 1 三种方法测定的阳性结果[n(%)]

测定方法	经 RIBA 确证前	经 RIBA 确证后
TP-CLIA	68(3.78)	66(3.67)
TP-ELISA	67(3.73)	65(3.62)
TPPA	63(3.51)	61(3.39)

2.2 三种检测方法敏感性和特异性比较 CLIA、ELISA 和 TPPA 法敏感性分别为 98.51%、97.02% 和 91.05%; 特异性均为 99.88%; 统计学分析表明, CLIA 法、ELISA 法敏感性均高于 TPPA 法, 差异具有统计意义($P < 0.05$)。CLIA 法和 ELISA 法之间敏感性差异无统计学意义($P > 0.05$)。CLIA、ELISA 和 TPPA 法诊断效率分别为 99.83%、99.78% 和 99.66%, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。值得注意的是本次检测出现 1 例老年人标本三种方法均阳性, 但 RIBA 法不确定。

3 讨 论

目前梅毒的实验室诊断方法主要有病原学、血清学方法。

其中病原学检查方法直接可靠, 但易受条件制约, 适于科研或教学使用; 血清学检查方法分非梅毒螺旋体抗体试验和梅毒螺旋体抗体试验, 前者操作简便、试剂成本低、肉眼判读、可快速诊断, 适于早期筛查及疗效观察, 但为非特异性方法, 存在一定的假阳性率; 特异性梅毒螺旋体抗体试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。ELISA 法采用双抗原夹心法检测血清中的梅毒螺旋体抗体, 利用酶的放大系统, 且具有双重识别机制使假阳性和假阴性不易出现, 故敏感性和特异性均较高, 许多学者认为 ELISA 法是梅毒血清学诊断的首选方法^[4-5], 本法费用相对较低, 可实现自动化和标准化, 适用于大批量标本的检测; 但由于 ELISA 法本身方法学的影响, 结果的重复性较差, 检测过程受干扰因素较多, 易出现假阳性结果, 检测结果往往需要第 2 种方法验证后方可发出^[6]; TPPA 法从标本处理到出具检测结果只需要 2 h, 也不需要特殊设备, 但当进行大样本量检测时, 费时费力且人工肉眼观察结果易有差异, 结果不能自动化保存。CLIA 法采用苯并葱为发光底物, 且洗涤液的特殊配方可有效排除其他因素的干扰, 检测过程高度自动化、试验重复性好、耗时短, 能高度敏感地检测出 TP 抗体。然而, 这种方法的缺点也是显而易见的: 检测成本要高于上述两种方法。而作为确证方法, RIBA 操作简单、不需要特殊仪器, 肉眼即可判断结果, 并且特异性和敏感性的优势是上述三种方法无法比拟的^[7]; 但是实验时间同样比较长, 约 100 min, 手工操作的流程在大样本检测时就显得繁琐, 而且检测成本高昂, 与 ELISA、CLIA 比较并没有优势。因此 RIBA 事实上并不适于大规模医院临床实验室常规开展应用, 一般仅用于科研及特殊标本检测。

本实验血清标本无脂血及溶血, 且为次日检测, 排除血球沉降不充分干扰, 但仍出现 1 例老年人标本三种方法都阳性, 但 RIBA 法不确定, 推测可能是老年人血清检测易出现假阳性^[8]。有报道只有 15 kd 和 45 kd 两区带是梅毒螺旋体特异性抗原, 若两区带任何一条出现阳性即可判定梅毒感染^[9-11]。该文献报道用免疫印迹法检测梅毒时, 上述两区带几乎 100% 阳性, 而其他螺旋体及健康人血清与其不发生结合。有研究者对不同条带做了研究, 认为, 梅毒螺旋体感染后, 首先出现的是 TP45 IgM 抗体(45 kd 区带)后期阶段出现 TP15 IgM 抗体(15 kd 区带)。抗梅毒治疗减少 IgG 的 TP17(17 kd 区带)和 TP47 抗体(47 kd 区带)的表达水平^[12]。

需要指出的是, 由于方法学比较成本较高, 本文仅仅比较了南京医科大学附属南京第一医院 2013 年 4~5 月间 2 个月的标本 1 797 份, 如果需要更深入的比较上述三种方法的优劣, 以及 RIBA 各区带在梅毒患者不同分期中的分布特征, 还需要收集更多的样本、更详细的实验方案, 此项工作以后将进一步进行。

综上所述, 建议不管 ELISA 法还是 CLIA 法对 S/CO 较低的标本均应慎重, 必要时用 RIBA 法补充确证, 以排除假阳性。

参考文献

[1] 程娟, 段红岩, 李安信. 梅毒流行病学和诊疗现状分析[J]. 传染病信息, 2012, 25(1): 58-60.
 [2] 王靖, 王丽, 王春风. 梅毒临床诊断的 3 种检测方法的应用评价[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(3): 19-20. (下转第 462 页)

体,但 Fab 抗体 Fc 切除更完全、分子量更小易穿透等优点使其在医学上使用更加广泛^[6]。我国首个抗体药物即是由一株肝癌单克隆抗体 Fab 片段与碘 131 偶联的偶合物^[7]。

Fab 是由木瓜蛋白酶水解 IgG 的铰链区二硫键连接的 2 条重链的近 N 端获得,其酶切过程受缓冲环境、pH 及温度的影响^[8],一般先通过小规模酶切摸索最佳的酶切条件。酶切条件选择的一般条件是在相同酶切效果下最低的木瓜蛋白酶浓度及最短的酶切时间,因为过度酶切会影响 Fab 的产量及活性。抗体经酶切后的 Fab 分离一般均采用传统的蛋白 G/A 亲和层析及凝胶过滤或离子交换的方式,本文介绍的纯化方式与之比较具有以下优势:(1)操作快速简单,凝胶过滤每次处理及上样至少需要 6 h 以上,且需要专业的纯化设备。亲和层析纯化每步完成仅需半小时,手工及仪器均可完成。(2)适合大规模制备,凝胶过滤每次上样体积限制 2~5 mL,最大每次处理数十毫克的抗体,本方法仅需扩大亲和柱体积,即可完成克级抗体的处理。(3)Fab 抗体质量更高,双亲和层析法不仅可以完全去除 Fc 片段及加入的木瓜蛋白酶,还能去除酶切失活的 Fab 抗体及腹水制备过程中混入的“杂抗体”,达到二次纯化效果,这是其他纯化方式无法完成的。

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow 活化偶联填料是 Amersham 公司的产品,是一种平均粒径 90 μm 的,含 16~23 μmol NHS/mL 活化基团的高效偶联填料,广泛应用于各类蛋白质相互作用研究及蛋白纯化研究^[9-10]。本研究选用该填料是利用其以下优点:(1)高偶联率,制备的抗原亲和柱平均每毫升的偶联填料中偶联蛋白 3.68 mg,偶联率为 92.1%,5 mL 填料理论结合对应抗体达 100 mg,适合大规模制备。(2)高稳定性,NHS-activated Sepharose 偶联蛋白后非常稳定,偶联分子不易脱落,即使在苛刻洗脱条件下也能保持稳定,避免脱落的偶联分子对制备的 Fab 抗体的污染。此外,耐高压及易清洗的特点利于填料的反复使用,适用于科研及生产。

本文成功建立了一种简单易行的抗体分离纯化抗体 Fab 片段的方法,该方法不仅操作简单,而且能提高纯化 Fab 抗体片段的纯度及亲和力,适用于科研或者生产中快速、高质量、大规模制备 Fab 抗体片段。

(上接第 459 页)

- [3] 房华,吴燕芬,汪瑞忠,等.全自动化学发光免疫分析仪在梅毒螺旋体抗体检测中的临床应用[J].中国皮肤性病学杂志,2010,24(7):671-672+682.
- [4] 孙峥嵘,孙皓,鲁润铭,等.梅毒螺旋体基因重组抗原酶联免疫吸附实验的探讨[J].中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(1):78.
- [5] Wang L, Li L. Evaluation of immunoglobulin M and G Western blot and ELISA for screening antibodies to *Treponema pallidum* in blood donors[J]. Sex Transm Dis, 2009, 36(7):413-416.
- [6] 熊继红,卢建强,赵立光,等.化学发光法与 ELISA 法检测梅毒抗体的一致性比较[J].检验医学与临床,2011,8(3):284-285.
- [7] Marangoni A, Sparacino M, Mondardini V, et al. Comparative evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay methods and three Western Blot methods for the diagnosis of culture-confirmed early Lyme borreliosis in Italy[J]. New Microbiol, 2005, 28(1):37-43.
- [8] 武建国.梅毒的实验室诊断与临床相关问题[J].临床检验杂志,

参考文献

- [1] 陈光.单克隆抗体技术历史与发展简述[J].生物学通报,2003,38(9):36-39.
- [2] Swayampakula M, Baral PK, Aguzzi A, et al. The crystal structure of an octapeptide repeat of the prion protein in complex with a Fab fragment of the POM2 antibody[J]. Protein Sci, 2013, 22(7):893-903.
- [3] Lam GK, Hopoate-Sitake M, Adair CD, et al. Digoxin antibody fragment, antigen binding (Fab), treatment of preeclampsia in women with endogenous digitalis-like factor: a secondary analysis of the DEEP Trial[J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 209(2):119.e1-119.e6.
- [4] 黎燕,冯健男,张纪岩.分子免疫学实验指南[M].北京:化学工业出版社,2008:265-270.
- [5] 王丹,赵美萍.利用亲和柱分离酶切产物制备抗体 Fab 片段[J].分析化学,2009,37(z1):882.
- [6] Shui X, Huang J, Li YH, et al. Construction and selection of human Fab antibody phage display library of liver Cancer[J]. Hybridoma, 2009, 28(5):341-347.
- [7] 施乐华,吴孟超.抗人肝癌单克隆抗体对荷瘤裸鼠的放射免疫定位及治疗[J].中华肿瘤杂志,1995,17(1):20-23.
- [8] Pace AL, Wong RL, Zhang YT, et al. Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH, and temperature[J]. J Pharm Sci, 2013, 102(6):1712-1723.
- [9] Pitcovsky TA, Mucci J, Alvarez P, et al. Epitope mapping of transsialidase from *Trypanosoma cruzi* reveals the presence of several cross-reactive determinants[J]. Infect Immun, 2001, 69(3):1869-1875.
- [10] Langer RC, Schaefer DA, Riggs MW. Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium parvum* sporozoite ligand CSL[J]. Infect Immun, 2001, 69(3):1661-1670.

(收稿日期:2013-11-08)

2006,24(4):316-320.

- [9] 武雨霖,阮森林,王敏敏.梅毒螺旋体感染实验室诊断方法研究进展[J].中国微生态学杂志,2013,25(2):208-210.
- [10] Maple P, Ratcliffe d, Smit E. Characterization of *Treponema pallidum* particle agglutination assay-negative sera following screening by treponemal total antibody enzyme immunoassays[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2010, 17(11):1718-1722.
- [11] Kuznetsov Alexander Vasilevich. Molekularer Nachweis von *Treponema pallidum* mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Hybridisierung in verschiedenen Proben von Patienten mit Syphilis [D]. 2007.
- [12] Sun R, Lai DH, Ren RX, et al. *Treponema pallidum*-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis [J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(2):206-210.

(收稿日期:2013-11-01)