

• 论 著 •

梅毒血清学检测中 RPR 前带现象发生率及其与 CMIA 的相关性研究

汤 庆,熊志刚,李辉军,王 旭,孙自镛,管 青[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科,武汉 430030)

摘要:目的 探讨在梅毒血清学检测中快速血浆反应素试验(RPR)前带现象的发生率及与化学微粒子发光法(CMIA)结果强度的相关性。方法 应用化 CMIA、明胶凝集试验(TPPA)及 RPR 对 2014 年 1 月至 2015 年 12 月同济医院 101 493 例患者进行梅毒血清学检测,评估其 RPR 试验中前带现象的发生率,应用逻辑回归探讨其影响因素。结果 101 493 份血清标本中,CMIA 检测阳性 2 180 例,RPR 检测阳性 767 例,其中 RPR 前带现象的发生率为 3.3%(26/767)。Logistic 回归结果显示,RPR 前带现象的发生率与 CMIA 的样本吸光度值比临界值、RPR 滴度明显相关,而与年龄、性别及季节性无相关性。结论 在梅毒血清学检测时,RPR 前带现象的发生率虽然较低,但应给予足够重视。CMIA 试验 S/CO 值较高的患者,其 RPR 前带现象的发生率较高。

关键词:梅毒; 快速血浆反应素试验; 化学微粒子发光法; 前带现象

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)04-0493-04

Incidence of RPR prozone phenomenon in syphilis serologic testing and its correlation with CMIA

TANG Qing, XIONG Zhigang, LI Huijun, WANG Xu, SUN Ziyong, GUAN Qing[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the incidence of prozone phenomenon of rapid plasma reagin (RPR) test in syphilis serologic testing and its correlation with the intensity of chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) results. Methods A total of 101 493 patients in our hospital from January 2014 to December 2015 were performed syphilis serologic testing by CMIA, RPR and treponema pallidum particle agglutination (TPPA). The incidence rate of prozone phenomenon in RPR testing was evaluated. Its influencing factors were investigated by using the Logistic regression. Results Among 101 493 serum samples, 2 180 cases were positive by CMIA and 767 cases were positive by RPR, the incidence rate of prozone phenomenon was 3.3%(26/767) in RPR. The Logistic regression results indicated that the incidence of prozone phenomenon was significantly correlated with CMIA S/CO values and RPR titer, but had no correlation with sex, age and seasonality. Conclusion Although the incidence of prozone phenomenon is low in syphilis serologic testing, but it is enough important. The patients with higher S/CO value in CMIA test have a higher incidence rate of RPR prozone phenomenon.

Key words: syphilis; rapid plasma regain test; chemiluminescent microparticle immunoassay; prozone phenomenon

梅毒是由梅毒螺旋体感染引起的全世界范围的性传播疾病,具有高度传染性^[1]。世界卫生组织估计全球每年大约有 1 200 万例患者感染梅毒^[2]。近年来,我国梅毒发病率有不断上升趋势,并且已从高危人群向普通人群扩散^[3]。梅毒螺旋体只能在体内培养,因而梅毒的诊断及疗效的监测主要依靠流行病学史、临床症状和体征及实验室诊断。目前国内检测梅毒螺旋体的主要方法包括化学微粒子发光法(CMIA)、快速血浆反应素试验(RPR)、甲苯胺红快速反应素试验(TRUST)、梅毒螺旋体酶联免疫吸附试验(ELISA)、梅毒螺旋体血凝试验(TPHA)和梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)等,其中 TPPA 是目前公认的较好的梅毒螺旋体抗体确认方法^[4]。然而,在梅毒血清学检测过程中,由于前带反应导致 RPR 试验假阴性结果,可能会导致给临床对患者的诊断和治疗提供错误信息。前带现象指当定量抗原检测抗体,若抗体过剩,可使所形成的免疫复合物反而减少,不出现可见凝集现象。当使用患者的未稀释血清进行 RPR 检测时,前带现象可出现在任何一期梅毒患者中。目前,国内仅有少数关于 RPR 前带现象的病例报道。本研究采用大样本回顾性研究,以评估前带现象的发生率,并探讨与患者自身因素的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在本院进

行梅毒螺旋体检测的门诊、健康体检及住院患者 101 493 例为研究对象,年龄 0~95 岁,平均(45.8±2.0)岁。

1.2 仪器与试剂 Architect i-2000 system 全自动免疫分析仪及配套梅毒抗体检测试剂和校准品购自美国雅培公司;TPPA 试剂盒购自日本富士瑞必欧株式会社;RPR 试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司;梅毒阳性、弱阳性、阴性标准质控血清购自伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 取患者肘正中静脉血,静置待血液凝固后,4 000 r/min 离心 10 min。

1.3.2 CMIA 检测 所有处理好的血清标本均经 Architect i-2000 system 上机检测。CMIA 试剂盒是基于两步夹心法的化学发光酶免疫检测法研制的梅毒抗体检测试剂。结果通过临界值进行评估,若样本吸光度值比临界值(S/CO)≥1 则判定为阳性,否则判定为阴性。CMIA 阳性标本经 15 000 r/min 离心 10 min 后重新上机检测防止假阳性结果出现。

1.3.3 TPPA 检测 TPPA 是将梅毒螺旋体的精制菌体成分包被在人工载体明胶粒子上,这种致敏粒子和样品中的梅毒螺旋体抗体进行反应,发生凝集,产生粒子凝集反应。由此,可以检测出血清中的梅毒螺旋体抗体。TPPA 是目前公认的较好的梅毒螺旋体抗体确认方法,所有经 CMIA 检测阳性的血清

标本采用 TPPA 方法进行验证。

1.3.4 RPR 检测 经 CMIA 检测阳性血清标本用无菌生理盐水(0.9% NaCl)进行 1:1~1:32 稀释防止前带效应所产生的假阴性结果,阳性标本经过倍比稀释直至出现阴性结果为止。结果报告为弱阳性结果的最高稀释倍数,实验过程中出现的弱阳性结果必须经 2 位试验人员同时观测进行确认。

1.4 检测标准 所有梅毒血清学检测方法均采用同一血清标本进行检测,结果解释如下:CMIA-阳性/TPPA-阴性,报告梅毒抗体阴性;CMIA-阳性/TPPA-阳性,报告梅毒抗体阳性;CMIA-阳性/TPPA-阳性,报告非特异性干扰。如果血清标本在 1:1 进行试验时 RPR 结果为阴性,经过无菌生理盐水 1:2~1:32 稀释后 RPR 试验为阳性,则该标本判断为出现前带反应。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理。前带现象与 RPR 滴度、CMIA S/CO 值、性别、年龄、季节的潜在相关因素应用 Logistic 回归进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RPR 试验前带现象的发生率 101 493 份血清标本中,CMIA 检测阳性 2 193 份,其中经 TPPA 确证阳性标本 1 614

份,因此,梅毒抗体检测阳性率为 1.59%(1 614/101 493)。767 份血清标本 TPPA 及 RPR 检测同时阳性,其中包括发生前带反应的 26 份标本,故前带现象的发生率为 3.3%(26/767)。这些标本在 1:1 进行试验时 RPR 结果为阴性,但是经过无菌生理盐水 1:2~1:32 稀释后 RPR 试验为阳性。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 发生前带现象患者的临床特点 在本研究中,26 份血清标本发生前带反应,前带反应的发生率与患者 RPR 滴度明显相关($P < 0.05$)。发生前带现象患者的 RPR 滴度均大于或等于 1:16,滴度范围为 1:16~1:512。提示当对患者血清进行 1:8 稀释时,此稀释倍数为检测 RPR 前带反应较为适当的稀释倍数。见表 1。RPR 前带现象的发生率与患者 CMIA 的 S/CO 值相关。本研究结果显示,所有发生前带现象的患者的 S/CO > 20。将患者按 S/CO 值进行分层,用 Logistic 回归进行分析。与 S/CO 值为 20 ~ < 25 的患者相比,S/CO 值为 35 ~ < 40 的患者发生前带反应的概率是其 14.493 倍($P = 0.001$),而 S/CO 值为 40 ~ < 45 的患者发生前带反应的概率是其 108.316 倍($P < 0.05$)。患者年龄、性别、来访的季节性与前带现象的发生率无明显相关性。见表 1。

表 1 发生前带现象梅毒患者的不同临床特点

项目	出现前带反应[n(%)]		P	OR	95%CI	
	否	是			下限	上限
季节						
春季	219(97.8)	5(2.2)	—	1.000	—	—
夏季	216(95.2)	11(4.8)	0.143	2.231	0.762	6.527
秋季	187(96.4)	7(3.6)	0.405	1.64	0.512	5.252
冬季	119(97.5)	3(2.5)	0.893	1.104	0.259	4.701
性别						
女性	313(95.7)	14(4.3)	—	1.000	—	—
男性	428(97.3)	12(2.7)	0.243	0.627	0.286	1.374
年龄(岁)						
0~<20	14(87.5)	2(12.5)	0.368	3.143	0.260	37.991
20~<30*	7(100.0)	0(0.0)	—	—	—	—
30~<40	118(97.5)	3(2.5)	0.622	0.559	0.056	5.626
40~<50	129(97.7)	3(2.3)	0.569	0.512	0.051	5.143
50~<60	175(96.2)	7(3.8)	0.907	0.880	0.103	7.492
60~<70	123(96.1)	5(3.9)	0.921	0.894	0.100	8.026
70~<80	99(96.1)	4(3.9)	0.918	0.889	0.095	8.345
80~<90	54(98.2)	1(1.8)	0.532	0.407	0.024	6.806
≥90	22(95.7)	1(4.3)	—	1.000	—	—
RPR 滴度						
1:1~1:8*	679(100.0)	0(0.0)	—	—	—	—
1:16	36(97.3)	1(2.7)	—	1.000	—	—
1:32	16(88.9)	2(11.1)	<0.001	28.292	4.419	181.121
1:64	7(41.2)	10(58.8)	<0.001	31.333	22.896	54.165
>1:64	3(18.7)	13(81.3)	<0.001	54.444	35.395	203.883

续表 1 发生前带现象梅毒患者的不同临床特点

项目	出现前带反应[n(%)]		P	OR	95%CI	
	否	是			下限	上限
CLMA (S/CO)值						
1~<20*	229(100.0)	0(0.0)	—	—	—	—
20~<25	114(98.3)	2(1.7)	—	1.000	—	—
25~<30	173(98.9)	2(1.1)	0.496	1.983	0.277	14.195
30~<35	128(98.5)	2(1.5)	0.327	2.680	0.374	19.224
35~<40	71(92.2)	6(7.8)	0.001	14.493	2.866	73.277
40~<45	19(61.3)	12(38.7)	<0.001	108.316	22.611	518.868
45~50	7(77.8)	2(22.2)	<0.001	49.000	6.013	399.327

注：* 为 RPR 滴度为 1:1~1:8 组及 CLMA 的 S/CO 值为 1~<20 组没有纳入统计学分析；—表示无数据。

3 讨论

人体感染梅毒螺旋体抗体后,可产生 2 种抗体。一种为特异度抗螺旋体抗体,主要有 IgM、IgG 2 种,IgG 终生存在于人体内,可终生检出阳性;另一种为非特异度类脂质抗体(又称为反应素),是由螺旋体破坏的组织细胞所释放的类脂样物质。由于反应素对机体无保护作用,未经治疗的患者,其血清内的反应素可长期存在。经适当治疗后,抗体可逐渐减少至转为阴性,其滴度变化与梅毒的治疗情况成正相关,因此,适用于疗效观察、随访和复发的辅助诊断^[5-6]。有报道指出接近 60% 的患者由于前带反应引起的假阳性而被临床漏诊^[7],因此,了解前带反应的发生频率尤其重要。本研究通过大样本回顾性研究,评估前带反应的发生率及其影响因素。研究发现,1 614 份梅毒阳性标本中,有 26 份标本发生前带反应,其前带现象的发生率为 3.3%(26/1 614),此结果与之前研究报道前带反应发生率为 0.2%~2.0% 较接近^[8-10]。

RPR 的前带现象指当定量抗原检测抗体,若抗体过剩,可使所形成的免疫复合物反而减少,而不出现可见凝集现象^[11]。有研究表明,前带现象血清的所含非特异性抗体的浓度很高,其 RPR 滴度为 1:64~1:256^[6]。本研究结果显示,发生前带现象患者的其 RPR 滴度范围为 1:16~1:512,并且当血清的稀释比为 1:8 时为监测前带现象较为合适的稀释比例。

CMIA 检测梅毒抗体是近年新出现的检测方法,具有全自动、省时、省力等优点,有报道称 CMIA 的灵敏度为 100.0%,特异度为 99.8%^[7]。本研究应用 CMIA 方法对标本进行大批量筛选,阳性标本用 TPPA 确证,同时采用 RPR 方法检测其非特异性抗体滴度。研究发现 RPR 前带现象的发生率除了跟 RPR 的滴度以及 CMIA 的 S/CO 值也就是梅毒特异性 IgG 抗体的浓度相关。结果显示,所有发生前带现象患者血清的 S/CO>25,随着 S/CO 值的增加,其发生前带现象的概率增加。因此,在做梅毒血清试验过程中,当患者血清 CMIA 的 S/CO 值较高(>20)时,提示患者可能会出现前带现象。

通常在做 RPR 试验时,通过将患者的血清进行稀释来发现前带现象^[12]。前带现象的发生率为虽然很低,但是应该给予足够重视。然而在日常工作中有些实验室在做 RPR 试验时并未对其血清进行稀释^[13],并且 RPR 试验灵敏度较低^[14-15],这样会导致一些患者因为前带现象所产生的假阳性给临床带来错误判断。

综上所述,RPR 前带现象的发生率虽然较低,但应给予足

够重视。本研究结果显示,RPR 前带现象的发生率与其 RPR 的滴度以及 CMIA 的 S/CO 值相关。在进行大样本梅毒血清学检测时,为了有效防止假阴性反应的发生,可以采用 CMIA 进行筛选,然后对阳性标本用 TPPA 法进行确证,RPR 法评估梅毒血清学的活动性以及疗效的监测。

参考文献

- [1] Michael W. The centenary of treponema pallidum; on the discovery of spirochaeta pallida[J]. Skinmed, 2005, 4(5): 313-315.
- [2] World Health Organization. The use of rapid syphilis tests [M]. Geneva: World Health Organization, 2006: 2-3.
- [3] 王雁,公洁,郑笑莉. 梅毒患者感染现状调查与分析[J]. 中国临床研究, 2011, 24(10): 926-927.
- [4] 金国江,邹大伟,杜毅鑫,等. CMIA 法测定梅毒螺旋体抗体在临床筛查梅毒的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(8): 1890-1891.
- [5] Marangoni A, Moroni A, Accardo S, et al. Laboratory diagnosis of syphilis with automated immunoassays[J]. J Clin Lab Anal, 2009, 23(1): 1-6.
- [6] Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel treponema pallidum serologic tests; a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century[J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(6): 700-708.
- [7] Wang KD, Xu DJ, Su JR. Preferable procedure for the screening of syphilis in clinical laboratories in China[J]. Infect Dis (Lond), 2015, 48(1): 26-31.
- [8] Elzaatari MM, Martens MG, Anderson GD. Incidence of prozone phenomenon in syphilis serology[J]. Obstet Gynecol, 1994, 84(4): 609-612.
- [9] Musher DM, Hamill RJ, Baughn RE. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the course of syphilis and on the response to treatment[J]. Ann Intern Med, 1990, 113(11): 872-881.
- [10] Walker AN. Rapid plasma reagin (RPR) card test: A screening method for treponemal disease[J]. Br J Vener Dis, 1971, 47(4): 259-262.
- [11] Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. (下转第 499 页)

790.42, $P < 0.05$), 血清 DKK1 水平比较, 差异有统计学意义 (U 值分别为 76.60、40.38, $P < 0.05$)。

本文以 CA199、CA242 和 DKK1 为检测变量, 以胰腺癌组和胰腺良性疾病组为状态变量绘制 ROC 曲线。AUC 即曲线下面积表示该指标检测胰腺癌的准确度, CA199、CA242 和 DKK1 对胰腺癌诊断的敏感度分别为 76.7%、69.6%、85.7%, 特异度分别为 95.0%、96.7%、92.5%, 准确度分别为 86.2%、83.6%、89.2%, 单独检测时 DKK1 敏感度和准确度最高, 分别为 85.7% 和 89.2%, CA242 特异度最高 (96.7%)。此外, 本研究结果显示, CA199 和 CA242 的水平在肿瘤 TNM 分期中差异有统计学意义 ($P < 0.05$), IV 期明显高于 I、II/III 期, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 另外, 本研究还发现血清中 CA199、CA242 和 DKK1 水平与肿瘤大小均无关, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

本研究着重分析 3 种指标联合检测时对胰腺癌的诊断性能, 用 Binary Logistic 过程进行 Logistic 回归逐步分析 (入选标准: $\alpha = 0.05$, 剔除标准 = 0.1), 筛选出有价值的肿瘤标志物, 建立回归方程 $P = 1/[1 + e^{-(-4.163 + 0.21X_1 + 0.156X_2 + 0.342X_3)}]$, 通过方程中的概率值来拟合 ROC 曲线, 其敏感度和准确度最高, 为 94.4% 和 92.2%; 曲线下面积 ($AUC^{ROC} = 0.949$, $P = 0.001$), 高于各项指标单独检测, 但特异度略有下降。此外, 根据统计结果中各可能切点的敏感度和特异度计算敏感度 + 特异度, 最高值为临界值 CA199 35.27 U/mL, CA242 18.63 U/mL, DKK1 2.06 ng/mL。以上研究均表明联合检测血清肿瘤标志物的敏感度、准确度均高于单独检测, 有些是以牺牲特异度为代价的, 但可以降低胰腺癌诊断的漏诊率。

本研究观察病例数偏少, 仅主要从血清学方面进行研究, 并未从患者的流行病学、临床表现、影像、病理等进行研究。因此, 在以后的研究中, 应当纳入更多的样本, 综合考察分析多方面资料。

参考文献

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
 [2] 赵平, 王成锋. 重视胰腺癌的预防和早期诊断[J]. 国际外科学杂志, 2007, 34(9): 584-587.
 [3] 李宁, 沈世强, 刘建超. 血清 CA199, CA242, CEA 及 CA125 在胰腺癌诊断和预后中的价值[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(3): 300-304.
 [4] Jiang XT, Tao HQ, Zou SC. Detection of serum tumor

markers in the diagnosis and treatment of patients with pan-creatic cancer [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(3): 464-468.

[5] 王春友, 赵刚. 胰腺癌发生机制研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(7): 825-826.
 [6] Ni XG, Bai XF, Mao YL, et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer [J]. Eur J Surg Oncol, 2005, 31(2): 164-169.
 [7] 瞿彩平. 肿瘤标志物联合检测在晚期恶性肿瘤诊疗中的价值 (附 112 例临床分析) [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2002, 9(3): 97-98.
 [8] 沈剑虹, 陆品相. 血清 CA199 检测对消化道恶性肿瘤的临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2008, 32(20): 3056-3057.
 [9] 尹莉莉, 杜叶平, 武春梅. 血清 CA50 与 CA199 联合检测在胰腺癌诊断中的意义 [J]. 解放军医药杂志, 2013, 20(1): 31-32.
 [10] Duraker N, Hot S, Polar Y, et al. CEA, CA 199 and CA 125 in the differential diagnosis of benign and malignant pancreatic diseases with or without jaundice [J]. J Surg Oncol, 2007, 95(2): 142-147.
 [11] 张乐之, 龚燕芳, 屠振兴. 胰腺癌患者血清 CA242 定量测定及其意义 [J]. 胰腺病学, 2002, 20(1): 20-21.
 [12] Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumors angiogenesis-dependent [J]. J Pathol, 2004, 202(1): 5-13.
 [13] Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, et al. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2010, 55(9): 1012-1015.
 [14] 陆奎英, 崔素芬, 徐亮, 等. 重组 DKK1 及 pCMV-HA2/DKK1 重组质粒对宫颈癌细胞体外增殖作用的影响 [J]. 临床检验杂志, 2012, 30(11): 898-901.
 [15] Shen QJ, Fan J, Yang XR, et al. Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a large-scale, multicentre study [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(8): 817-826.

(收稿日期: 2016-07-30 修回日期: 2016-10-20)

(上接第 495 页)

Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis [J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(1): 1-21.
 [12] Saryan JA, Garrett PE, Kurtz SR. Failure to detect extremely high levels of serum IgE with an immunoradiometric assay [J]. Ann Allergy, 1989, 63(4): 322-324.
 [13] Haslett P, Laverty M. The prozone phenomenon in syphilis associated with HIV infection [J]. Arch Intern Med, 1994, 154(14): 1643-1644.
 [14] Romanowski B, Sutherland R, Fick GH, et al. Serologic response to treatment of infectious syphilis [J]. Ann In-

tern Med, 1991, 114(12): 1005-1009.

[15] Loeffelholz MJ, Binnicker MJ. It is time to use treponema-specific antibody screening tests for diagnosis of syphilis [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 2-6.

(收稿日期: 2016-07-28 修回日期: 2016-10-18)

