

· 短篇论著 ·

3 种方法检测梅毒螺旋体抗体不确定标本的性能评价*

刘 蓉,滕文友[△],何章勇,代国知,郭旺源

(湖南省郴州市第一人民医院检验医学中心,湖南郴州 423001)

摘要:目的 评价时间分辨荧光免疫试验(TRFIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和胶体金法检测梅毒螺旋体抗体不确定标本的性能。方法 以 TRFIA 筛选 $1.0 \leq S/CO \leq 9.9$ 的梅毒螺旋体抗体不确定标本,同时用梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)、ELISA 和胶体金法检测,以 TPPA 为确认方法,比较 TRFIA、ELISA 和胶体金法的灵敏度、特异度、符合率、约登指数、似然比和受试者工作特征(ROC)曲线下面积。结果 与 TPPA 比较,TRFIA、ELISA 和胶体金法的灵敏度分别为 100.00%、88.57%和 51.43%,特异度分别为 0.00%、96.26%和 85.05%,符合率分别为 24.65%、94.37%和 76.76%,约登指数分别为 0.00、0.85 和 0.36,阳性似然比分别为 1.00、23.69 和 3.44,阴性似然比分别为 0.00、0.12 和 0.57,ROC 曲线下面积分别为 0.50、0.92 和 0.68。结论 TRFIA 灵敏度高,可用于梅毒血清学筛查,ELISA 的灵敏度、特异度和符合率均高,可用于梅毒血清学筛查和诊断,胶体金法的灵敏度低,不宜用于梅毒血清学筛查。检测灰区的梅毒抗体不确定标本需用 TPPA 复查,以减少误诊。

关键词:梅毒螺旋体; 梅毒螺旋体颗粒凝集试验; 酶联免疫吸附试验; 时间分辨荧光免疫试验; 胶体金法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.24.026

中图法分类号:R446.61;R759.1

文章编号:1673-4130(2020)24-3050-03

文献标识码:B

梅毒是梅毒螺旋体感染人体所引起的一种慢性、系统性、长期发展的性传播疾病,具有较强传染性^[1]。梅毒主要传播途径为性接触传播、母婴垂直传播和血液传播。孕妇一旦感染,可导致胎儿早产、死产或娩出先天梅毒患儿^[2]。由于梅毒螺旋体培养困难,实验室常用血清学检查进行梅毒血清学筛查和诊断,包括梅毒螺旋体试验和非梅毒螺旋体试验^[3]。梅毒螺旋体试验包括化学发光免疫试验(CLIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)、时间分辨荧光免疫试验(TRFIA)和胶体金法等。本研究拟以 TPPA 为确认试验,比较 TRFIA、ELISA 和胶体金法检测梅毒抗体不确定标本的能力,为实验室选择合适的梅毒检测方法和策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 收集 2019 年 10 月 15 日至 2020 年 1 月 17 日于本院进行梅毒特异性抗体检测结果为不确定的血清标本共 142 份,男 54 例,女 88 例,平均年龄(50±14)岁。

1.2 标本纳入标准 用 TRFIA 检测梅毒血清抗体, $1.0 \leq S/CO \leq 9.9$ 为梅毒抗体不确定标本,作为研究对象,纳入研究。

1.3 仪器与试剂 TPPA 梅毒螺旋体抗体检测试剂

盒(TPPA 试剂)由日本富士瑞必欧株式会社生产,ELISA 梅毒螺旋体抗体诊断试剂盒(ELISA 试剂)由北京万泰生物药业股份有限公司生产,TRFIA 梅毒螺旋体抗体检测试剂盒(TRFIA 试剂)和 EasyCuta MiNi 全自动时间分辨荧光免疫分析检测仪由江苏苏州新波生物技术有限公司生产,胶体金法梅毒螺旋体抗体检测试剂盒由厦门英科新创科技有限公司生产,洗板机 ELX-50 和酶标仪 ELX-800 由美国宝特公司生产。

1.4 方法 将实验前收集并保存于-20℃的血清标本取出并解冻,同时用 TPPA、ELISA、TRFIA 和胶体金法检测。TPPA:加标本稀释液至 U 型反应板,第 1 孔 100 μL,第 2~4 孔各 25 μL,用移液器取血清 25 μL 至第 1 孔,反复混匀后取 25 μL 至第 2 孔,连续倍比稀释至第 4 孔,最后 1 孔混匀后弃去 25 μL,第 3 孔加未致敏粒子 25 μL,第 4 孔加致敏粒子 25 μL,将微量反应板置振荡器振荡 30 s;置微量反应板于有盖湿盒内,室温静置 2 h 后,观察结果,第 4 孔凝集成实心圆为阴性,散在分布或者成环状为阳性。ELISA:分别在预包被板条孔中加入待测标本 100 μL,同时设空白对照 1 孔、阴性对照各 3 孔和阳性对照 2 孔;37℃温育 60 min;洗板 5 次;除空白对照孔外,分别加入酶标记物 100 μL,轻轻振荡混匀;37℃温育 30 min;洗

* 基金项目:湖南省卫生健康委科研计划项目(B2019003);湖南省科技创新计划项目(2018SK50302);南华大学医院管理研究所 2017 年校级课题(2017YYGL10);湘南学院 2017 年教改课题(2017-68)。

[△] 通信作者, E-mail:380600636@qq.com。

本文引用格式:刘蓉,滕文友,何章勇,等.3 种方法检测梅毒螺旋体抗体不确定标本的性能评价[J].国际检验医学杂志,2020,41(24):

板 5 次;每孔加入显色剂 A、B 各 50 μL ,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 30 min;每孔加入终止液 50 μL ,轻轻振荡混匀;终止后 10 min 内测试并输出结果,结果判读 $S/\text{CO} < 1.0$ 为阴性, $S/\text{CO} \geq 1.0$ 为阳性。TRFIA:分别在相应板条孔中加入待测标本 50 μL ,同时设阴性和阳性对照各 2 孔;各孔中加相应钡标抗原 100 μL ;室温,振荡 45 min;洗板 5 次;各孔加入相应钡标生物素 100 μL ;室温,振荡 15 min;洗板 5 次;每孔加入增强液各 100 μL ,室温,振荡 15 min;加增强液后 30 min 内自动检测并输出结果,以 $S/\text{CO} < 1.0$ 为阴性, $S/\text{CO} \geq 1.0$ 为阳性。胶体金法:从包装袋内取出试剂条,置于干净平台上,于加样区加 100 μL 标本,20 min 内读取并记录结果,仅出现质控线为阴性,质控线和检测线同时出现为阳性。以上操作和结果判定均严格按照作业指导书进行。

1.5 统计学处理 将实验数据录入 EXCEL 表格,用 SPSS19.0 进行数据处理及统计分析。本研究数据为配对计数资料,以频数或率表示。以 TPPA 为标准,采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 TRFIA、ELISA 和胶体金法的检测能力。

2 结果

2.1 TPPA、TRFIA、ELISA 和胶体金法检测结果分析 以 TPPA 结果为标准,检出梅毒抗体阳性 35 例,阴性 107 例;TRFIA 与 TPPA 不一致 107 例,均为假阳性;ELISA 与 TPPA 不一致 8 例,假阳性和假阴性均为 4 例;胶体金法与 TPPA 不一致 33 例,假阳性和假阴性分别为 16 例和 17 例。见表 1。

表 1 TRFIA、ELISA、胶体金法与 TPPA 检测结果 (n)

TPPA	TRFIA			ELISA			胶体金法		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
阳性	35	0	35	31	4	35	18	17	35
阴性	107	0	107	4	103	107	16	91	107
合计	142	0	142	35	107	142	34	108	142

2.2 TRFIA、ELISA 和胶体金法检测能力比较 以 TPPA 为标准,TRFIA 的灵敏度为 100.00%,而特异度为 0.00%,假阳性率高;ELISA 灵敏度为 88.57%,特异度为 96.26%,符合率为 94.37%;胶体金法灵敏度仅为 51.43%,特异度和符合率分别为 85.05% 和 76.76%,假阴性率高;ELISA 阳性似然比为 23.68,TRFIA 阴性似然比为 0.00。见表 2。

表 2 TRFIA、ELISA 和胶体金法检测能力比较

检测方法	灵敏度 (%)	特异度 (%)	符合率 (%)	约登指数	阳性似然比	阴性似然比
TRFIA	100.00	0.00	24.65	0.00	1.00	0.00
ELISA	88.57	96.26	94.37	0.85	23.68	0.12
胶体金法	51.43	85.05	76.76	0.36	3.44	0.57

2.3 TRFIA、ELISA 和胶体金法 ROC 曲线 TR-

FIA、ELISA 和胶体金法 ROC 曲线下面积分别为 0.50、0.92 和 0.68,其中 ELISA 检测梅毒抗体不确定标本准确率最高,胶体金法次之,TRFIA 最低。见图 1。

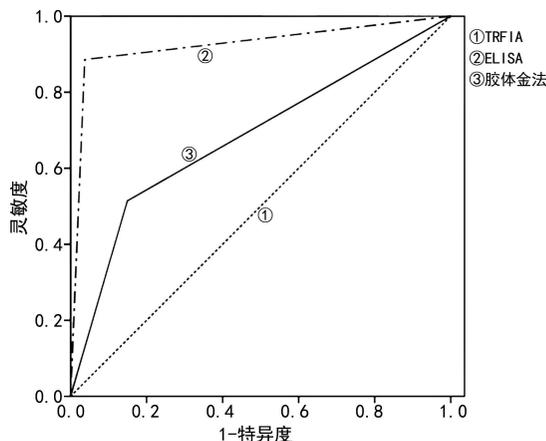


图 1 TRFIA、ELISA 和胶体金法 ROC 曲线

3 讨论

目前,梅毒是一个严重威胁人类健康的公共性问题。近年来,我国梅毒发病率呈明显上升趋势,已成为严重的社会和医学问题^[4]。在美国,梅毒流行率不断上升,其中男性同性恋、育龄妇女和新生儿的梅毒发病率增幅最大^[5]。

梅毒螺旋体筛查作为孕前优生基本项目之一,其准确的检验结果是正确评价计划怀孕夫妇患梅毒风险的重要依据^[6]。我国基层实验室在进行梅毒血清学筛查时,使用的方法种类很多,在日常工作中使用不同检测方法时,需充分了解其特点,报告检验结果时应综合分析,必要时可选择多种方法进行检测和验证,以提高检测结果的准确性^[7]。

TPPA 使用梅毒螺旋体毒株 (Nichols 株) 制成抗原,与待测血清中的梅毒螺旋体抗体产生凝集反应,其优点是试剂稳定、结果明了、灵敏度高和特异度高,缺点是手工操作繁琐,结果需主观判断,对操作人员能力要求较高,试剂成本较高^[1,8],不易进行大批量标本检测。美国疾病预防控制中心推荐使用 TPPA 来判定梅毒螺旋体试验和非梅毒螺旋体试验不一致的结果^[9],并将 TPPA 定为确诊方法。因此,本研究将 TPPA 作为确认试验,来评价其他 3 种方法对临床常见梅毒抗体不确定标本的检测能力。

TRFIA 是以镧系元素 (本研究试剂盒以钡元素为标记) 标记抗原或抗体,与时间分辨测定技术结合而建立起来的一种新型非放射性微量分析方法,经增强液放大,可以将检测下限提高百万倍,具有灵敏度高、发光稳定和荧光寿命长等优点,已被广泛用于临床检测^[10]。但在梅毒患病率较低的人群中,单独使用灵敏度高、特异度较低的方法检测,易导致误诊,会给患者造成不必要的伤害和情绪困扰^[11-12]。由于 TRFIA 灵敏度高和特异度低,用于梅毒血清学筛查时,其检测的低荧光强度的标本需用 TPPA 进一步确认,

以减少假阳性。

ELISA 因具有灵敏度高、特异度高和操作简单等优点,被广泛应用于临床检测。本研究结果显示,ELISA 灵敏度、特异度和符合率均较高。胶体金法是常用的即时检测方法,快速、简便,但由于灵敏度低,使其应用受到限制。有学者认为单独采用 ELISA 检测出的假阳性结果,在没有“金标准”做补充的情况下,很难作出明确的判断。血清学结果不一致的患者[如 EIA-反应性、快速血浆反应素环状卡片试验(RPR)-无反应性]对临床医生来说是诊断和治疗的挑战,因为这些结果可能是假阳性、梅毒前期或在反应性 RPR 发生前的早期梅毒^[13-14]。因此,血清学结果不一致时需用 TPPA 确认。但这样可能会带来一些不必要且重复的工作,增加实验室的试剂和人力成本,这就需要实验室制订科学合理的梅毒检测策略和复检规则,以便精简工作流程,提高工作效率和结果准确性。

既往有关于 CLIA 与 ELISA 和胶体金法等梅毒血清学检测方法比较和评价的研究^[15],而对于梅毒螺旋体抗体不确定标本的检测历来备受关注但研究不多。本研究创新地比较了 TRFIA、ELISA 和胶体金法在梅毒螺旋体抗体不确定标本的检测能力。首先,随着 TRFIA 技术的成熟,其被广泛应用,需要更多的实验数据和结果供参考和选择。其次,笔者在前期实验发现,当 TRFIA 的 $S/CO > 9.3$ 时,TRFIA 与 TP-PA 结果一致,因此,本研究选择 $1.0 \leq S/CO \leq 9.9$ 的标本作为梅毒抗体不确定标本进行研究。此外,不论是梅毒血清学筛查,还是确认试验,梅毒抗体不确定标本才是实验室检测的难点和重点,只有此类标本结果的准确性才能真实和客观地评价某种检测方法和诊断试剂。

本研究的不足之处在于,仅选择了 $1.0 \leq S/CO \leq 9.9$ 的梅毒抗体不确定标本进行研究,若能同时选择 $S/CO > 9.9$ 和 $S/CO < 1.0$ 的标本,将能更加全面地比较和评价 3 种方法的检测能力,计划下一步开展此研究。

本研究结果显示,TRFIA 虽灵敏度高,但特异度低,若用于梅毒血清学筛查,低荧光强度的标本需加做 TPPA,以减少误诊;ELISA 的灵敏度、特异度和符合率均高,可用于实验室梅毒血清学筛查和诊断,但灰区标本仍需 TPPA 确认;胶体金法灵敏度低,易漏诊,不宜用于梅毒血清学筛查,但在无条件开展其他梅毒血清学检测的基层或者社区实验室和僻远地区及术前急查时也是可以选择的。因此,建议实验室应全面了解各种梅毒检测方法的优缺点和性能,并结合自身条件和被检测人群的梅毒流行病学特征,选择适当的检测方法和策略,以减少误诊和漏诊,提高梅毒检测结果的准确性,以便更好地服务临床和患者。

综上所述,TRFIA 灵敏度高,可用于梅毒血清学筛查;ELISA 的灵敏度、特异度和符合率均高,可用于

梅毒血清学筛查和诊断;胶体金法的灵敏度低,不宜用于梅毒血清学筛查。检测灰区的梅毒抗体不确定标本需用 TPPA 复查,以减少误诊。

参考文献

- [1] 邓美霞,张晓红,赵飞骏.梅毒实验室检测方法的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2016,44(1):76-82.
- [2] LU Y Q, WU Q, WANG L, et al. Molecular epidemiological survey of *Treponema pallidum* in pregnant women in the Zhabei District of Shanghai [J]. J Med Microbiol, 2017, 66(4): 391-396.
- [3] 王勤.梅毒血清学方法检测策略探讨[J].检验医学,2018,33(8):749-751.
- [4] 龚向东,岳晓丽,滕菲,等.2000—2013年中国梅毒流行特征与趋势分析[J].中华皮肤科杂志,2014,47(5):310-315.
- [5] WORKOWSKI K A. Centers for disease control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines [J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(S8): S759-S762.
- [6] TONG M L, ZHANG H L, ZHU X Z, et al. Re-evaluating the sensitivity of the rabbit infectivity test for *Treponema pallidum* in modern era [J]. Clin Chim Acta, 2017, 464(1): 136-141.
- [7] BURSTEIN G R, WORKOWSKI K A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines [J]. Curr Opin Pediatr, 2003, 15(4): 391-397.
- [8] 李金明,刘辉.临床免疫学检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2015:89-91.
- [9] US Preventive Services Task Force, BIBBINS-DOMINGO K, GROSSMAN D C, et al. Screening for syphilis infection in nonpregnant adults and adolescents: US preventive services task force recommendation statement [J]. JAMA, 2016, 315(21): 2321-2327.
- [10] 童曼莉,刘莉莉,林丽蓉,等.梅毒实验诊断程序研究进展[J].中华检验医学杂志,2017,40(11):898-903.
- [11] MMEJE O, CHOW J M, DAVIDSON L, et al. Discordant syphilis immunoassays in pregnancy: perinatal outcomes and implications for clinical management [J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(7): 1049-1053.
- [12] CASWELL R J, HATHORN E, MANAVI K. The significance of isolated reactive treponemal enzyme immunoassay in the diagnosis of early syphilis [J]. Sex Transm Dis, 2016, 43(6): 365-368.
- [13] 王巧梅,张曼,张世琨,等.中国免费孕前优生健康检查项目质量保证体系的建立[J].中华医学杂志,2015,95(3): 166-168.
- [14] 胡梅,刘娜,蔡宇雨,等.梅毒血清学检测不同方法的准确性分析与比较[J].中华医学杂志,2017,97(36): 2844-2847.
- [15] 王欣俞,赵晋文,张延海,等.4种梅毒血清学检测方法在梅毒抗体不确定样本的分析及评价[J].现代检验医学杂志,2019,34(3):109-111.