

酶联免疫吸附试验两种方法检测梅毒螺旋体抗体结果比较

张 鹏¹, 张薇娜², 汤荣华¹, 张 英¹ (1. 皖南医学院弋矶山医院检验科, 安徽芜湖 241001; 2. 安徽省芜湖市中医医院检验科 241001)

【摘要】 目的 比较梅毒螺旋体-酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)一步法和二步法检测梅毒螺旋体抗体(抗-TP)的结果, 研究钩状效应对 TP-ELISA 一步法检测抗-TP 结果的影响, 评价 TP-ELISA 二步法检测抗-TP 的应用价值。**方法** 分别用梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)、TP-ELISA 一步法和二步法检测 3 600 份住院患者血清, 并用 TP-ELISA 一步法(稀释法)检测怀疑存在钩状效应的血清标本 12 份。**结果** TPPA、TP-ELISA 二步法分别检测出 91 份抗-TP 阳性, 结果一致; TP-ELISA 一步法检测出 79 份抗-TP 阳性, 12 份 TP-ELISA 一步法检测结果阴性怀疑存在钩状效应的血清标本进行 1:5、1:10、1:40、1:80 倍稀释后, 再采用 TP-ELISA 一步法进行检测, 分别有 12 份、12 份、8 份、4 份结果转为阳性。**结论** 采用 TP-ELISA 二步法或 TP-ELISA 一步法同时对标本进行一定倍数稀释后检测, 可以克服钩状效应, 提高检测的敏感度。

【关键词】 抗体; 细菌; 梅毒; 酶联免疫吸附测定; 假阴性反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 17. 019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)17-2089-02

Comparison on results of measuring anti-syphilis antibody by one-step and two-step ELISA ZHANG Peng¹, ZHANG Wei-na², TANG Rong-hua¹, ZHANG Ying¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Wuhu Hospital of Chinese Traditional Medicine, Wuhu, Anhui 241001, China)

【Abstract】 Objective To compare the results of measuring anti-syphilis antibody by one-step and two-step ELISA, to investigate the influence of hook effect in measuring anti-syphilis antibody and to evaluate the advantages of two-step ELISA. **Methods** 3 600 samples of inpatients' sera were tested by TPPA, one-step TP-ELISA, two-step TP-ELISA separately. 12 patients' sera with suspected hook effect were measured with one-step ELISA(diluted). **Results** 91 cases were diagnosed positive by TPPA and two-step ELISA, 79 cases were diagnosed positive by one-step ELISA. After 1:5, 1:10, 1:40, 1:80 dilution, 12 cases of syphilis were detected again by one-step ELISA and 12, 12, 8, 4 cases turned to positive respectively. **Conclusion** The hook effect can be eliminated by two-step ELISA or one-step ELISA after diluting all samples and the detection sensitivity can be increased.

【Key words】 antibodies; bacterial; syphilis; enzyme-linked immunosorbent assay; false negative reactions

梅毒螺旋体(TP)感染是一种全身性慢性传播疾病, 早期主要表现为皮肤黏膜损伤, 晚期将累及心血管、中枢神经、骨骼及眼部等重要脏器^[1]。近年来我国 TP 感染率呈逐年上升趋势^[2]。目前我国医院和血站等大批量检测梅毒螺旋体抗体(抗-TP)时多采用梅毒螺旋体-酶联免疫吸附试验(TP-ELISA)一步法。而据文献报道, ELISA 一步法测定样本中的抗原或抗体浓度过高时会因钩状效应出现假阴性造成漏检, 从而增加输血、母婴、患者间的传播风险^[3-4]。本研究通过比较 ELISA 一步法和二步法检测结果, 探讨 ELISA 一步法中钩状效应对检测抗-TP 结果的影响, 评价 TP-ELISA 二步法检测抗-TP 的应用价值。

1 资料与方法

1.1 血清来源 3 600 份血清标本来源于皖南医学院弋矶山医院 2010 年 12 月至 2011 年 1 月住院患者。

1.2 试剂 TP-ELISA 一步法和二步法抗-TP 诊断试剂盒均购自北京万泰生物药业股份有限公司; 梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)试剂盒购自日本富士株式会社。

1.3 方法

1.3.1 使用 TPPA、TP-ELISA 一步法、TP-ELISA 二步法 分别检测 3 600 份住院患者血清标本。检测步骤严格按说明书

进行操作。

1.3.2 12 份 TP-ELISA 一步法检测结果为阴性, 怀疑存在钩状效应的血清标本经 1:5、1:10、1:40、1:80 倍稀释后, 再进行 TP-ELISA 一步法检测。

1.4 统计学处理 率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 不同方法检测抗-TP 结果比较 3 600 份住院患者血清标本经 TPPA 和 TP-ELISA 二步法分别检测出 91 份抗-TP 阳性; 而 TP-ELISA 一步法仅检出 79 份抗-TP 阳性。TP-ELISA 一步法和二步法检测抗-TP 阳性率分别为 86.81% 和 100%; 假阴性率为 13.19% 和 0%; 两种方法检测结果差异有统计学意义($\chi^2=12.85, P<0.01$)。3 509 份 TPPA 诊断为抗-TP 阴性标本, TP-ELISA 一步法和二步法检测结果均与其一致, 假阳性率为 0%, 阴性率为 100%; TP-ELISA 一步法和二步法检测结果差异无统计学意义($\chi^2=0, P>0.05$)。

2.2 12 份疑有钩状效应血清不同稀释倍数下 TP-ELISA 一步法检测结果 将 12 份临床标本分别进行 1:5、1:10、1:40、1:80 倍稀释, 检测结果见表 1。

2.3 12 份疑有钩状效应标本检测结果 见表 2。

表 1 12 份疑有钩状效应血清标本不同稀释倍数下 ELISA 一步法检测结果

标本	原倍		1∶5 稀释		1∶10 稀释		1∶40 稀释		1∶80 稀释	
	A 值	结果	A 值	结果	A 值	结果	A 值	结果	A 值	结果
1	0.072	—	0.427	+	0.791	+	0.389	+	0.204	+
2	0.093	—	0.386	+	0.996	+	1.287	+	1.143	+
3	0.069	—	0.319	+	0.782	+	0.544	+	0.265	+
4	0.036	—	0.358	+	0.437	+	0.163	—	0.051	—
5	0.049	—	0.424	+	0.553	+	0.137	—	0.085	—
6	0.023	—	0.201	+	0.262	+	0.160	—	0.051	—
7	0.037	—	0.373	+	0.497	+	0.212	+	0.066	—
8	0.082	—	0.255	+	0.756	+	0.712	+	0.610	+
9	0.028	—	0.392	+	0.348	+	0.141	—	0.045	—
10	0.034	—	0.378	+	0.421	+	0.208	+	0.141	—
11	0.031	—	0.313	+	0.371	+	0.188	+	0.087	—
12	0.042	—	0.416	+	0.536	+	0.221	+	0.116	—

注:A 表示吸光度值。临界值=阴性对照孔 A 均值+0.18。“+”表示阳性;“—”表示阴性。

表 2 不同方法检测 12 份疑有钩状效应标本结果

标本	TPPA 法	TP-ELISA 一步法		TP-ELISA 二步法	
	滴度	A 值	结果	A 值	结果
1	1∶1 280	0.072	—	0.785	+
2	1∶1 280	0.093	—	1.318	+
3	1∶1 280	0.069	—	0.580	+
4	1∶1 280	0.036	—	0.277	+
5	1∶1 280	0.049	—	0.336	+
6	1∶640	0.023	—	0.281	+
7	1∶1 280	0.037	—	0.302	+
8	1∶1 280	0.082	—	1.041	+
9	1∶1 280	0.028	—	0.376	+
10	1∶1 280	0.034	—	0.287	+
11	1∶640	0.031	—	0.283	+
12	1∶1 280	0.042	—	0.520	+

注:A 表示酶标仪测定孔内的吸光度值。ELISA 一步法的临界值=阴性对照孔 A 均值+0.18;ELISA 二步法的临界值=阴性对照孔 A 均值+0.18。“+”表示阳性;“—”表示阴性。

3 讨 论

梅毒是由 TP 感染引起的一种性传播疾病,可以通过血液、母婴途径传播,对人类健康造成极大的危害。因此对于产前检查、术前备血、输血前筛查是否存在 TP 阳性十分必要。目前梅毒的诊断方法主要有病原学检查、血清学检查、聚合酶链反应(PCR)基因诊断、脑脊液检查等。其中病原学检查虽方法可靠,但易受条件制约,适于科研或教学使用。血清学检查分非 TP 抗原血清试验和 TP 抗原血清试验,前者方法简便,但敏感度和特异性均不高,适用于早期筛查,后者敏感度强,特异性高,现为梅毒诊断的主要方法,包括梅毒螺旋体血凝试验(TPHA)、TPPA、TP 荧光抗体吸收试验(FTA-ABS)、TP-ELISA、胶体金免疫结合技术等,尤其是 TPPA 和 TP-ELISA。TPPA 是 TPHA 的改良方法,用 TP 致敏明胶颗粒替代 TPHA 中致敏的红细胞,该致敏颗粒与人血清或血浆中的抗-TP 结合,产生可见的凝集反应,操作步骤也较为方便。TPHA 已具有快速、敏感、特异性强的特点,被称为梅毒的确诊试验,但有时会出现生物假阳性反应,近年来在此基础上改进的 TP-PA 法减少了这一现象的发生,使得检测结果更加准确,但试剂昂贵,不适合疗效观察^[5]。TP-ELISA 一步法采用双抗原夹

心法同时检测 IgM/IgG 抗体,与其他检测方法比较具有操作简单、用时短、费用低等特点,且有较高的敏感性和特异性^[6],适合大批量样本检测。PCR 基因诊断具有高灵敏度,但目前国内试剂质量有待改进。脑脊液检查取样技术繁杂,患者难以接受,送检率低。

所谓钩状效应是指在一个 ELISA 测定体系中加入待测标本和酶标抗原后会形成固相抗原-待测抗体(A)、固相抗原-待测抗体-酶标抗原(B)、待测抗体-酶标抗原(C)、酶标抗原-待测抗体-酶标抗原(D)4 种复合物。若待测抗体浓度过高,会由于竞争抑制作用导致 C 和 D 结合物增多,B 结合物减少,结果出现显色降低或不显色。本研究对 TPPA 和 TP-ELISA 二步法检测均为阳性,而 TP-ELISA 一步法检测为阴性,怀疑存在钩状效应的 12 份血清标本进行了 1∶5、1∶10、1∶40、1∶80 倍稀释,再用 TP-ELISA 一步法检测,结果全部转为阳性,与 TP-PA 和 TP-ELISA 二步法检测结果一致。说明 TP-ELISA 一步法检测这 12 份标本时存在钩状效应,并且将这些标本进行适当倍数稀释后可以消除钩状效应,这与相关文献报道一致^[7]。而 TP-ELISA 二步法由于抗体和酶标抗原是分两步加入的,因此不存在竞争抑制,即避免了钩状效应^[8]。

本文结果表明,在筛查大量标本时,TP-ELISA 二步法检测结果比 TP-ELISA 一步法检测结果更可靠;双抗原夹心 TP-ELISA 一步法检测抗-TP 时应考虑到钩状效应对试验结果的影响,可以通过稀释法或 ELISA 二步法完全或部分消除钩状效应,保证检测结果的敏感度。也有文献报道将 ELISA 一步法直接改为二步法对结果特异性无明显影响,但对敏感度有一定影响,造成一部分弱阳性标本漏检^[9]。本实验可能样本量仍不够充足,未能发现该现象。另外文献报道 ELISA 孵育过程中适当振荡也可以消除钩状效应^[10],这在今后的研究中有待加以补充完善。

参考文献

[1] 岳秋梅,韦小民. 浅谈梅毒的流行与防治[J]. 医学动物防治,2010,26(7):680-681.
[2] 马聪,王芳,徐武夷. 梅毒螺旋体实验室检测技术的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(12):958-960.
[3] 王火生,李丽雄,林萍,等. 一步法 ELISA(下转第 2092 页)

1 个疗程后的 GCS 评分情况,其中良好(5 分)和轻残(4 分)被归为“预后良好”;重残(3 分)、植物生存(2 分)和死亡(1 分)被归为“预后不良”。(3)病死率和持续植物状态。

1.4 疗效评定标准 参照全国第四届脑血管病学术会议通过的脑卒中患者临床神经功能缺损评分标准。根据患者的主要症状和体征,结合文献的疗效判定标准,治愈:神经功能缺损评分减少 91%~100%,对生活无影响;显效:神经功能缺损评分减少 46%~90%,部分生活自理;有效:神经功能缺损评分减少 18%~78%;无效:神经功能缺损评分减少低于 17%或增加^[2]。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,无序分类变量资料比较用 χ^2 检验,计量资料的比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组觉醒例数和意识恢复时间 治疗组恢复清醒者 95 例(81.9%),所需时间 4~25(8.3±5.9) d;对照组恢复觉醒者 84 例(73.7%),所需时间为 9~38 (12.8 ±6.7)d。两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 临床疗效 治疗组治愈 5 例,显效 17 例,有效 78 例,无效 16 例,总有效率 86.2%。对照组治愈 2 例,显效 14 例,有效 66 例,无效 32 例,总有效率 71.9 %。两组总有效率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 两组治疗前后病死率和持续植物状态比较 见表 1。

表 1 两组治疗前后 GCS 评分及病死率、持续植物状态比较

组别	n	GCS 评分($\bar{x} \pm s$,分)		植物状态及死亡	
		治疗前	治疗后	n	%
对照组	114	6.81±2.25	10.25±3.25	15	13.15
治疗组	116	6.79±2.63	13.65±3.86*	7	6.03*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

决定脑出血预后的主要因素为颅内血肿的部位、大小及脑水肿程度,而脑水肿程度又与颅内血肿大小呈正相关^[5]。高血压脑出血血肿形成 6 h 后,周围脑组织即可发生不可逆性损害,血肿增大、血肿周围脑水肿、急性脑积水是造成患者病情进一步恶化的主要原因^[6]。因此,手术指征明确时应尽早清除血肿,减少对神经功能的损害和周围组织的压迫,是改善患者预后的关键之一。目前倾向于超早期手术,尽早清除血肿,降低颅内压,抢救受损脑组织,减轻继发性脑水肿,从而有效保护神

经功能^[7]。通天口服液是根据祖国经典名方进行整理而成,主要成分是川芎、白芷、细辛、羌活等。现代药理学认为,川芎能抑制大脑皮层,扩张周围血管,活血化瘀;白芷能调节血管舒缩功能;羌活祛风散寒;细辛具有镇痛功效。诸药配伍能活血化瘀,通脉降压,增加脑血流量。从作用机制上看,通天口服液主要利用天然中药,对血管舒缩功能给予调节,通过血管的扩张和收缩,降低外周血管的阻力,增加组织的抗缺血和缺氧能力,抑制血小板聚集,降低多种血管活性物质的水平。从西医药理学理论来讲,通天口服液能显著降低收缩压和舒张压,降低血管阻力,增加脑内动脉血流量。同时,通天口服液能明显降低高、低切变率,降低血液黏度和血细胞比容,减轻脑缺血所致毛细血管损伤,从而有助于肢体功能的恢复^[4,8]。本研究结果表明,通天口服液治疗 1 个疗程后觉醒例数增加和意识恢复时间缩短($P < 0.05$),治疗组 GCS 评分改善明显,病死率和植物状态减少显著。说明微创清除术联合通天口服液治疗对脑出血患者有一定价值,值得推广使用。

参考文献

- [1] 王新德. 现代神经病学[M]. 北京:人民军医出版社, 2008:256-263.
- [2] 李兴华. 微创清除术治疗高血压脑出血 85 例临床分析[J]. 重庆医学,2006,35(22):2084.
- [3] 张松格,李利,沈桂林. 微创清除术治疗高血压脑出血 46 例对比观察[J]. 临床和实验医学杂志,2008,7(11):58-59.
- [4] 王剑威,朱蔚文. 通天口服液治疗椎基底动脉供血不足临床分析[J]. 临床医药实践,2007,16(4):253-254.
- [5] 张建军,董伟峰,顾水均,等. 高血压脑出血外科治疗近期预后因素临床分析[J]. 中国危重病急救医学,2005,17(5):311-312.
- [6] 原爱中,姚小军,程传斌,等. 微创清除术联合活血化瘀法治疗高血压脑出血的临床研究[J]. 临床荟萃,2010,25(16):1390-1392.
- [7] 夏军,李玮,祁得录,等. 颅内血肿微创清除术的临床应用[J]. 检验医学与临床,2007,4(6):570-571.
- [8] 谢扬兵. 通天口服液对青春期血管性头痛患者的疗效观察[J]. 重庆医学,2009,38(4):495.

(收稿日期:2011-03-01)

(上接第 2090 页)

- 在 HIV 初筛中的应用探讨[J]. 中国实验诊断学,2006,10(5): 501.
- [4] 于泓,李兴武. 乙型肝炎表面抗原一步法检测试剂的钩状效应分析[J]. 淮海医学,2006,24(5): 392.
 - [5] 王芳,威海. 梅毒螺旋体实验室检测技术[J]. 中国皮肤性病学杂志,2003,17(2): 135-136.
 - [6] Castro R, Prieto ES, Santo I, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection for detection of antibodies against Treponema Pallidum[J]. J Clin Microbiol,2003,41(1): 250-253.
 - [7] 单桂秋,李秋生,肖韶英,等. 检测乙型肝炎表面抗原的一

- 步法试剂的钩状效应分析[J]. 中华检验医学杂志,2002,25(2): 107-108.
- [8] 贾杰. 乙型肝炎表面抗原检测的钩状效应[J]. 现代预防医学,2005,32(5): 496-497.
 - [9] 张玲英,游正芸,张丁丁,等. ELISA 一步法检测 HBsAg 漏检分析[J]. 四川省卫生管理干部学院学报,2000,19(4): 258-259.
 - [10] 陈兆鹏,单永海,周纪芬. 减少一步法 ELISA 钩状效应的方法探讨[J]. 上海医学检验杂志,1999,14(1):59-60.

(收稿日期:2011-04-23)