

• 论 著 •

一种化学发光酶免疫分析法检测梅毒特异性抗体结果的正确解读*

谭延国¹, 韩强^{2#}, 田野¹, 李佩¹, 郑芳芳¹, 聂秋燕¹,刘晴¹, 王晓宁¹, 古媛¹, 张岩^{1△}(1. 首都医科大学附属复兴医院检验科, 北京 100038; 2. 首都医科大学医学
检验系 2012 级本科毕业生, 北京 100050)

摘要:目的 研究如何对化学发光酶免疫分析法梅毒抗体检测(TP-CLEIA)筛查梅毒特异性抗体为阳性的检测结果进行正确的解读。方法 对 100 例使用 TP-CLEIA 筛查阳性的标本,在用免疫印迹法梅毒抗体检测(TP-WB)确认的同时,采用梅毒螺旋体血球凝集试验(TPHA)、微粒子化学发光法梅毒抗体检测(TP-CMIA)及 ELISA 法梅毒抗体检测(TP-ELISA)同时测定,对试验结果作了进一步分析。结果 (1)以 TP-WB 法为准,TP-CLEIA 法筛查为阳性的标本中,真阳性的比例为 48.0%。(2)受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析显示,最佳临界值为 25.92,此时的阳性预测值为 97.7%,阴性预测值 89.5%,此时具有最大的 ROC 曲线下面积;当 TP-CLEIA 法 S/CO<7.84 时,经梅毒确认试验被证实为阴性的概率为 100.0%;当 S/CO>49.77 时,梅毒确认试验被证实为阴性的概率为 100.0%。(3)对以 TP-CLEIA 法筛查为阳性,再用 TP-CMIA 复核为阳性的标本中,其真阳性的比例为 81.3%,而无漏检的情况发生。结论 TP-CLEIA 作为梅毒的筛查方法,存在较高的筛查假阳性率,尤其是 S/CO 水平较低时。对 TP-CLEIA 法筛查为阳性的标本,TP-CMIA 法是较为理想的复核方法。

关键词:化学发光酶免疫分析实验;梅毒螺旋体血球凝集试验;微粒子化学发光法;酶联免疫吸附试验;免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.02.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)02-0153-03

Correctly interpret the positive result of serum specific antibody against treponema
screened by a kind of chemiluminescent immunoassay system*

TAN Yanguo¹, HAN Qiang^{2#}, TIAN Ye¹, LI Pei¹, ZHENG Fangfang¹,NIE Qiuyan¹, LIU Qing¹, WANG Xiaoning¹, GU Yuan¹, ZHANG Yan^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China;

2. Grade 2012, Department of Medical Laboratory, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To correctly interpret the positive result of serum specific antibody against treponema (TP-Ab) screened by a kind of chemiluminescent immunoassay system (TP-CLEIA). **Methods** Totally 100 serum samples from different patients positive for TP-Ab screened by TP-CLEIA system, were determined concurrently by several methods (TPHA, TP-CMIA and TP-ELISA), and further confirmed by TP-WB, the results of which were also analyzed. **Results** (1) Based on the results obtained by TP-WB, the genuinely positive samples only account for 48.0% of the overall positive samples screened by TP-CLEIA. (2) Receiver operating characteristic curve (ROC curve) analysis showed that the cut-off value was 25.92, the positive predictive value was 97.7%, negative expected value of 89.5%, this time with the largest area under the ROC curve. When S/CO<7.84, the syphilis confirmation test confirmed the probability of negative was 100.0%; when S/CO>49.77, syphilis confirmation test was confirmed as a negative probability of 100.0%. (3) For samples that were positive screened by TP-CLEIA, and also positive by TP-CMIA, the proportion of true positive was 81.3%, and no missing situation. **Conclusion** TP-CLEIA as a syphilis screening method, there is a high rate of false positive screening, especially when the level of S/CO is low. The TP-CMIA method is an ideal method to check the positive samples of TP-CLEIA method.

Key words: chemiluminescent immunoassay; TPHA; chemiluminescence microparticle immunoassay; ELISA; Western blot

梅毒是由苍白螺旋体引起的一种性传播疾病^[1]。随着近年来我国梅毒感染率的不断攀升^[2],对梅毒的正确诊断和治疗显得尤为迫切,并进一步要求临床实验室加大对梅毒筛查的范围和力度,并且对梅毒相关实验检测方法的性能有正确的认知。目前临床实验室检测梅毒的方法有:暗视野显微镜直接观察梅毒螺旋体,以及检测血清中的梅毒抗体或反应素^[3]。快速梅毒血清反应素试验(RPR)常用于活动期梅毒的判定,灵敏

度不高,时有假阳性出现^[1]。而梅毒特异性抗体的检测是用于诊断梅毒的最常用方法,但由于其方法学种类繁多,如 ELISA、各种化学发光法、凝集法、免疫层析法、荧光抗体吸收试验和免疫印迹(WB)法等,各种方法的性能和方法学间的可比性令人困惑^[2-4]。

化学发光酶免疫分析方法(CLEIA)作为逐渐被广泛使用的化学发光法的一种,常用作梅毒特异性抗体的初筛^[4]。其优

* 基金项目:卫生部医药卫生科技发展研究中心专项课题资助项目(28-5-5);首都临床特色应用研究(吴阶平)(Z1411020060000)。

作者简介:谭延国,男,主任检验技师,主要从事临床检验诊断学的研究。 # 共同第一作者:韩强,男,检验应届本科生。 △ 通信作者, E-mail: fxjyk@sina.com。

势是可以实现自动化,价格低廉和具有较高的筛查效率。在使用 CLEIA 检测梅毒抗体的过程中,发现其检测灵敏度似乎有些偏高,尤其一些弱阳性标本常被检出。本研究将用此检测系统筛查梅毒抗体为阳性的标本,进一步用其他检测系统和确认方法进行复测和分析,以便对该检测系统的性能有更准确的认识。

1 材料与方 法

1.1 材料 于 2015 年 8 月至 2016 年 2 月,在首都医科大学附属复兴医院,选择使用 CLEIA 检测系统常规筛查梅毒血清特异性抗体为阳性(均经使用同一方法二次复检证实)的血清标本共 100 例(共来自 11 544 例常规筛查患者)纳入本研究。标本于-80℃冰箱保存待用。

1.2 仪器、试剂和方法 CLEIA 法梅毒抗体检测(TP-CLEIA)为北京科美生物技术有限公司的 CHEMCLIN1500 全自动化学发光免疫分析仪及其配套试剂(双抗原夹心法);确认试验使用 WB 法梅毒抗体检测系统(TP-WB),为欧蒙医学实验诊断股份有限公司产品,其 4 条检测条带分别包被的抗原为 TP15、TP17、TP45 和 TP47,只有一个条带显色为可疑,出现 2 个及以上明显可见的条带为阳性;微粒子化学发光酶免疫分析技术梅毒抗体检测(TP-CMIA)系统由美国雅培公司的全自动化学发光分析仪 ARCHITECT i-2000 及其配套试剂构成,包被的抗原为 TP15、TP17 和 TP47,可同时检测 IgM 和 IgG 型抗体;梅毒密螺旋体血凝试验(TPHA)为英国 Omega Diagnostics 公司产品;ELISA 法梅毒抗体检测(TP-ELISA)的试剂盒为北京万泰生物药业股份有限公司产品(双抗原夹心法)。所有使用 TP-CLEIA 法筛查为阳性的标本,同时使用 TPHA、TP-CMIA、TP-ELISA 和 TP-WB 法平行测定。所有操作均按试剂盒或检测系统的要求规范操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。计数资料多组间整体比较采用行×列表 χ^2 检验。使用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)对 TP-CLEIA 法筛查阳性的标本,结合确认试验的结果,进行最佳临界值的分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TP-CLEIA 筛查为阳性的、处于不同 S/CO 区间的标本,经 TP-WB 确认后,真阳性结果的分布情况 临床常规检测标本共 11 544 例,经 TP-CLEIA 法初筛和次日复检,共 100 例为阳性($S/CO > 1.00$),初筛阳性率为 0.9%(100/11 544)。经 TP-WB 法确认为真阳性的共 48 例(48.0%),阴性 52 例(52.0%)。人群的总体真阳性率为 0.4%(48/11 544)。按 TP-CLEIA 结果的阳性程度,将其分为(1)~(5)个区间,分别为:1.0~4.0、4.1~10.0、10.1~20.0、20.1~100.0 以及 100.1~200.0。各区间经 TP-WB 确认后的真阳性检出情况

见表 1。结果显示,随着 S/CO 值的增高,真阳性率逐渐增高,由第(1)组的 0 上升至第(5)组的 100.0%。见表 1。

2.2 TP-CLEIA 法筛查、经 TP-WB 确认后,几个关键临界值的确定 以 TP-CLEIA 法筛查为阳性标本的抗体水平(S/CO)为基础,结合 TP-WB 确认的结果,经受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析显示:当对梅毒抗体的检测灵敏度为 100.0%,且特异度最大时(73.1%),TP-CLEIA 法所对应的界定值为 $S/CO = 7.84$;当对梅毒抗体检测的特异度为 100.0%,且灵敏度最大时(77.1%),TP-CLEIA 法所对应的界定值为 $S/CO = 49.77$;而当 ROC 曲线下面积(AUC)为最大(0.97),此时具有最佳的检测性能(灵敏度为 87.5%,特异度为 98.1%)时,对应的界定值为 $S/CO = 25.92$ 。这 100 例标本中, S/CO 值 > 25.92 的标本共 43 例,其中经 TP-WB 确认为真阳性 42 例, $S/CO < 25.92$ 的标本共 57 例,其中真阳性的为 6 例。见表 2。

表 1 TP-CLEIA 筛查为阳性、处于不同 S/CO 区间的标本,真阳性结果的分布情况

TP-WB	1.0~4.0	4.1~10.0	10.1~20.0	20.1~100.0	100.1~200.0
阳性(n)	0	2	4	14	28
阴性(n)	28	10	11	3	0
真阳性率(%)	0.0	16.6	26.7	82.4	100.0
假阳性率(%)	100.0	83.3	73.3	17.6	0.0

表 2 TP-CLEIA 法筛查、经 TP-WB 确认后,几个关键临界值的确定及意义

界定值(S/CO)	灵敏度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	阳性似然比	阴性似然比
7.84	100.0	73.1	77.4	100.0	3.72	0.00
25.92	87.5	98.1	97.7	89.5	46.0	0.12
49.77	77.1	100.0	100.0	82.5	0.00	0.23

2.3 TP-CLEIA 法联合其他检测方法,对梅毒抗体检出效能的评估 TP-CLEIA 法筛查阳性的标本,平行用其他方法检测,经 TP-WB 确认后,不同的检测方案对梅毒抗体的检出能力见表 3。TP-CLEIA 法联用其他方法同时阳性的标本中,真阳性标本所占比例最高,均为 97.4%,但其漏检率也较高(22.9%);TP-CLEIA 法筛查为阳性、经 TP-CMIA 法复核仍为阳性的标本,此时真阳性的比例为 81.3%,漏检率为 0;TP-CLEIA 法筛查为阳性、TPHA 法复核为阳性的标本中,真阳性的比例为 88.1%,但漏检率为 22.9%;而 TP-CLEIA 联合其他方法,则分别具有不同的阳性检出率和漏检率。

表 3 TP-CLEIA 法联用其他方法对梅毒抗体的检出能力评估

检测方案	TP-WB		真阳性标本所占比例 [% (n/n)]	漏检率 [% (n/n)]
	阳性(n)	阴性(n)		
方案 1-CLEIA+TPHA	37	5	88.1(37/42)	22.9(11/48)
方案 2-CLEIA+ELISA	47	27	63.5(47/74)	2.10(1/48)
方案 3-CLEIA+CMIA	48	11	81.3(48/59)	0.00(0/48)
方案 4-CLEIA+TPHA+CMIA	37	1	97.4(37/38)	22.9(11/48)
方案 5-CLEIA+TPHA+ELISA	37	3	92.5(37/40)	22.9(11/48)
方案 6-CLEIA+ELISA+CMIA	47	9	83.9(47/56)	2.10(1/48)
方案 7-CLEIA+TPHA+ELISA+CMIA	37	1	97.4(37/38)	22.9(11/48)

根据确认试验的结果,进一步比较了上述各种检测方案对梅毒抗体的检测效能。经行 χ^2 检验,从总体上讲,上述 7 种联合检测梅毒抗体的方案,各组间真阳性标本所占比例差异有统计学意义($P=0.000$)。

3 讨 论

RPR 等血清中的非特异性抗体,在初发硬下疳 10~15 d 后(感染后约 6 周)即可检出,而血清中梅毒特异性抗体在硬下疳出现后的第 1 周到第 2 周可阳性^[1]。对梅毒进行早期诊断、早期治疗是控制其蔓延至关紧要的一个环节。目前,与梅毒相关的各种实验方法众多,且缺乏金标准,而且实验总是在检测抗体,而不能直接判定为感染^[5]。故选择灵敏度高、特异度好的方法便显得尤为重要。

2014 年欧洲梅毒管理指南建议,一种方法如筛查梅毒特异性抗体为阳性,需要用另一种不同检测原理的特异性方法进行确认^[1]。本研究显示,在 100 份用化学发光酶免疫分析法筛查梅毒抗体为阳性的标本中,经 TP-WB 确认后,真阳性率仅为 48.0%。而这些被确认为真阳性的标本,通常具有较高的 S/CO 值,而被确认方法证实为阴性的标本,则具有较低的 S/CO 值。且随着 S/CO 值增大,真阳性率逐渐增高。当临界值的 S/CO 为 7.84 时,对梅毒抗体的检测灵敏度为 100.0%,特异度为 73.1%。故对于 S/CO 低于 7.84 的标本,如果不做确认试验而直接判定为阴性,基本没有误判的可能性。当界定值的 S/CO 值为 49.77 时,灵敏度为 77.1%,特异度为 100.0%,也就是说,当所测定标本的 S/CO 值 >49.77 时,如果不做确认试验而直接判定为阳性,其正确的概率理论上为 100.0%。而对于用 CLEIA 法检测出 S/CO 值在 7.84~49.77 的标本,需要用合适的方法进行复检并确认,以减少误判率。通过 ROC 曲线,进一步确定了本研究所使用筛查梅毒抗体的 CLEIA 法,其最佳临界值 S/CO 为 25.92,此时 ROC 曲线下面积最大,灵敏度为 87.5%,特异度为 98.1%。

本研究用 TP-WB 法确认后发现,TP-CLEIA 法筛查,其 S/CO 值在 7.84~49.77 的标本,真阳性率为 44.0%,故此部分标本是非常有必要进行确认的。然而 TP-WB 法由于价格昂贵,临床上用其作为确认试验可行性较低,需要寻找一种价格低廉、具有良好性能的替代方法。为此在使用 TP-WB 法进行确认的同时,也应用了其他方法同时对梅毒抗体进行了测定。本文发现,TP-CMIA 与 TP-CLEIA 法同时检测为阳性的标本,其真阳性率为 81.3%,漏检率为 0。同其他方法联合检测的结果相比,具有最低的漏检率和适中的真阳性率,是用于复检较为理想的方法。

TPHA 或 TPPA 被认为是对梅毒抗体进行确认较为“经典”的方法,且这种确认方式被临床实验室广为采用^[1,6]。本研究发现,TPHA 法与 CLEIA 法联合检测,其真阳性率为 88.1%,漏检率高达 22.9%。如此高的漏检率是不可以接受的。故不宜使用 TPHA 法作为梅毒抗体的筛查方法,或用于对 TP-CLEIA 法筛查为阳性的标本进行复核。以上结果也得到了文献结果的支持,即 TPPA 或 TPHA 法,其对低滴度的梅毒抗体的检出能力较弱^[7-8]。

ELISA 法检测梅毒抗体,虽然有被化学发光法替代的趋势,但仍被临床实验室广泛使用^[9-10]。本研究发现,100 例 TP-CLEIA 法筛查为阳性的标本,TP-ELISA 检出 74 例,相比其他检测方法,二者具有最高的符合率。也就是说,ELISA 法和 CLEIA 法检测梅毒,方法学上存在相似的问题,如初筛假阳性率较高的问题,但其较低的漏检率,也是其方法学的优势。

参考文献

- [1] Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014, 8(12):1581-1593.
- [2] Yin F, Feng Z, Li X. Spatial analysis of primary and secondary syphilis incidence in China, 2004–2010 [J]. *Int J STD AIDS*, 2012, 23(12):870-875.
- [3] Jonckheere S, Berth M, Van Esbroeck M, et al. Evaluation of different confirmatory algorithms using seven treponemal tests on Architect Syphilis TP-positive/RPR-negative sera [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34(10):2041-2048.
- [4] Mo X, Jin Y, Yang Y, et al. Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for diagnosis of syphilis [J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15(2):66-69.
- [5] Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, 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.
- [6] Bocoum FY, Ouédraogo H, Tarnagda G, et al. Evaluation of the diagnostic performance and operational characteristics of four rapid immunochromatographic syphilis tests in Burkina Faso [J]. *African health sciences*, 2015, 15(2):360-367.
- [7] Sommese L, Paolillo R, Sabia C, et al. Syphilis detection: evaluation of serological screening and pilot reverse confirmatory assay algorithm in blood donors [J]. *Int J STD AIDS*, 2016, 27(8):644-649.
- [8] 谭延国, 张岩, 李琦. 微粒子化学发光法检测梅毒抗体的临床应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(1):90-91.
- [9] Ryan J, Welch L, Christine M, Litwin. Evaluation of two immunoblot assays and a Western blot assay for the detection of antisyphilis immunoglobulin g antibodies [J]. *Clin Vaccine Immunol* ;CVI, 2010, 17(1):183-184.
- [10] Tsang RS, Martin IE, Lau A, et al. Serological diagnosis of syphilis: comparison of the Trep-Chek IgG enzyme immunoassay with other screening and confirmatory tests [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007, 51(1):118-124.

(收稿日期:2016-08-18 修回日期:2016-10-24)