

与肝纤维化分期呈正相关,PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA 水平越高,则纤维化分期越高。这与临床多项有关研究结果一致<sup>[8-10]</sup>。出现这种情况是因为肝纤维化是由于多种疾病导致肝脏慢性损伤后,肝细胞的外基质发生过度增生、集聚所导致肝纤维化的,因此 PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA 水平能够反映患者肝脏纤维化的水平,从而为临床治疗和诊断提供可靠依据<sup>[11]</sup>。

综上所述,血清 PCⅢ、Ⅳ-C、LN 以及 HA 水平与肝纤维化程度呈正相关,因此临床上可将血清 PCⅢ、Ⅳ-C、LN 以及 HA 指标作为反映肝纤维化严重程度的测量指标,在肝纤维化的早期诊断时作为重要的诊断依据。

参考文献

[1] 石海虹,赵辉.血清肝纤四项检测在原发性肝癌诊断中的应用[J].海军医学杂志,2014,35(4):301-302.  
 [2] 史连盟,郝玉梅.210 例肝病患者血清肝纤维化指标检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(1):113-114.  
 [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会.病毒性肝炎防治方案[J].中国内科学杂志,2001,40(1):62-68.  
 [4] 苑同业,刘国凤,张立营.血清肝纤四项检测在诊断原发

性肝癌的应用[J].中国疗养医学,2014,23(11):1023-1024.  
 [5] 赵权,刘婧.肝纤四项检测在肝癌严重程度鉴别诊断中的价值[J].实用医药杂志,2016,33(9):793-794.  
 [6] 杨明磊,姚定康.磁共振弹性成像在肝纤维化无创诊断中的应用[J].临床肝胆病杂志,2016,32(3):588-592.  
 [7] 邓锡源,马苏美,李辉,等. ARFI 技术与血清总胆汁酸在慢性丙型肝炎肝硬化 Child-Pugh 分级中的应用[J].世界华人消化杂志,2016,24(2):287-292.  
 [8] 康从利,王艳,林雪,等.血清肿瘤标记物联合检测诊断原发性肝癌的临床应用研究[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2014,8(13):2408-2411.  
 [9] GAGGINI M C, NAVARRO R S, STEFANINI A R, et al. Correlation between METAVIR scores and Raman spectroscopy in liver lesions induced by hepatitis C virus: a preliminary study[J]. Lasers Med Sci, 2015, 30(4): 1347-1355.  
 [10] 王松贤.慢性乙型肝炎患者肝组织学检查的意义[J].实用肝病杂志,2014,17(3):297-298.  
 [11] 周红星.慢性乙型肝炎临床和组织病理学诊断的对比研究[J].中国医疗前沿,2013,8(23):90-91.

(收稿日期:2018-08-11 修回日期:2018-11-12)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.05.026

重组蛋白抗原 Tp0608 对梅毒诊断的血清学评价\*

吴奇,王丽,季灵婷,吕盈盈<sup>△</sup>

(上海市静安区闸北中心医院检验科 200070)

**摘要:**目的 探讨重组蛋白抗原 Tp0608 对梅毒诊断的血清学评价价值。方法 收集各期梅毒患者 406 例以及可能有交叉反应的患者 90 例,建立了一个重组蛋白抗原 Tp0608,用酶联免疫吸附试验(ELISA)对梅毒各期患者及可能有交叉反应的患者进行了检测,并与常规的快速血浆反应素试验(RPR)+梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)进行对比。结果 对各期梅毒患者,Tp0608 重组蛋白筛查的灵敏度为 95.3%,RPR+TPPA 筛查灵敏度为 93.1%。对可能有交叉反应的患者,Tp0608 重组蛋白筛查的特异度为 99.1%,ROC 曲线的 AUC 为 0.99;RPR+TPPA 筛查的特异度为 97.2%,ROC 曲线的 AUC 为 0.96。Tp0608 重组蛋白对梅毒筛查的灵敏度、特异度均高于常规的 RPR+TPPA 检测方法,特别是对先天性梅毒、一期梅毒的检测优于常规方法。结论 Tp0608 重组蛋白是非常有前景的梅毒筛查的诊断性抗原,但其在细胞内的位置和保护性反应还未确定,还有待进一步研究和验证。

**关键词:**梅毒螺旋体; Tp0608 重组蛋白; 梅毒; ROC 曲线

**中图分类号:**R446.1

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9455(2019)05-0668-04

梅毒是苍白螺旋体(Tp)感染人体所引起的性传播疾病,近年来发病率持续上升。在中国的所有性传播疾病中居首位<sup>[1-2]</sup>。

梅毒为重要的公共卫生问题之一。2010 年《新英格兰医学杂志》报道中国地区不到 1 h 就增加 1 例先天性梅毒,说明我国的梅毒防控面临严峻挑战<sup>[1-3]</sup>。梅毒的早期发现和治疗预后良好,不典型症状及未经治疗的梅毒常导致心血管系统及神经梅毒等严重并

发症,而危及生命。

由于 Tp 在体外无法培养,因此梅毒的诊断主要依靠血清学检测。快速血浆反应素试验(RPR)、甲苯胺红不加热血清反应素试验(TRUST)及梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)为常用方法。先天性梅毒依靠 19S-IgM 抗体荧光螺旋体抗体吸收试验(FTA-ABS)和暗视野显微镜诊断,目前市场上常用的检测方法采用的均为重组的 TpN15、TpN17、TpN47。除上述 3

\* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会面上资助项目(201440640)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail:lvyingying2013@sina.com。

种抗原外,其他几种膜蛋白 TpN44.5 (TnpA, Tp0768)、Tp0453、Tp92 (Tp0326) 及 Tp0965<sup>[4-6]</sup> 也被研究,并在梅毒的一些临床分期表现了较高的灵敏度和特异度,但一些抗原并不能检测出临床各期梅毒的特异性抗体,尤其是在早期梅毒和先天性梅毒。Tp0608 是近年发现的一种假想蛋白<sup>[7]</sup>,生物学信息分析表明 Tp0608 蛋白存在多个 B 抗原表位,且与其他物种没有同源性,表明其具有潜在的灵敏度和特异度,在梅毒各期预测中具有潜在的免疫诊断价值。本研究将对 Tp0608 在各期梅毒中的诊断进行评价,探讨 Tp0608 在梅毒临床诊断应用的可行性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 于 2015 年 1 月至 2016 年 6 月收集上海市静安区闸北中心医院皮肤性病科和妇产科梅毒患者,其中男 216 例,女 190 例;年龄 0~84 岁,平均 41.3 岁;潜伏期梅毒 120 例,一期梅毒 78 例,二期 69 例,三期 55 例,先天性梅毒 84 例。收集同期与梅毒螺旋体可能有交叉反应的病例 90 例,包括 3 例钩端螺旋体病患者(男 2 例,女 1 例;年龄 18~54 岁,平均 37.8 岁),14 例沙门菌感染(男 8 例,女 6 例;年龄 14~63 岁,平均 33.5 岁),28 例风湿病患者(男 9 例,女 19 例;年龄 20~67 岁,平均 45.6 岁),25 例 EB 病毒感染患者(男 13 例,女 12 例;年龄 15~72 岁,平均 47.2 岁)及 20 例妊娠妇女标本(年龄 21~37 岁,平均 24.3 岁)。另外收集同期 50 例正常标本(男 25 例,女 25 例;年龄 22~58 岁,平均 37.5 岁)。梅毒的诊断和分期按照《梅毒诊断标准》(WS273-2007)判断。所有研究对象对本研究知情同意,本研究经过本院伦理委员会批准同意。

## 1.2 方法

**1.2.1 Tp0608 重组蛋白的表达和纯化** 提取 Tp (Nichols) 菌株的基因组 DNA,从 GenBank 获取 Tp0608 基因序列 (Access number: NC\_000919),参照文献引物序列如下,上游引物:5'-GGAATTCATGGCGGATCCCTCGGCA-3';下游引物:5'-CCCAAGCTTCTTGCCGCCAGAAACGACT-3',荧光实时 PCR 方法扩增 Tp0608 基因。反应条件:95 °C 4 min,而后 95 °C 20 s,50 °C 20 s,72 °C 30 s,72 °C 5 min 共 29 个循环,用 PCR 产物回收试剂盒回收 PCR 产物。

PCR 产物与质粒 pET28a(+) 分别进行 EcoR I 与 HindIII 双酶切,连接酶连接,转化 E. coli DH5 $\alpha$  感受态细胞,37 °C 过夜。筛选阳性克隆,酶切测序鉴定。将重组菌接种在含卡那霉素 30  $\mu$ g/mL LB 培养基上,以 IPTG 诱导培养 4 h,收集并用裂解液裂解细菌,经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,用含 250 mmol/L 咪唑 (imidazole) 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)、300 mmol/L NaCl、10% 甘油洗涤,再用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)、150 mmol/L NaCl 的溶液进一步洗去咪唑,用 bi-cinchoninic acid (BCA) 蛋白分析试剂盒测量蛋白水平。

**1.2.2 Tp0608 重组蛋白对梅毒各临床分期及先天性梅毒的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测** 配制一定水平的 Tp0608 重组蛋白溶液,ELISA 检测梅毒不同临床分期及先天性梅毒患者的血清,纯化的 Tp0608 重组蛋白用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 稀释,每孔 100  $\mu$ L 在 96 孔板上 4 °C 过夜,PBS 洗涤,室温封闭 2 h,每份血清标本按照 1:100 用 PBS 稀释,每孔加入 100  $\mu$ L,37 °C 放置 2 h,用 PBS 洗 5 次,加入 HRP 标记的二抗,37 °C 孵育 1 h,用 PBS 洗 5 次,加入 100  $\mu$ L 四甲基联苯胺,室温孵育 30 min,加入 50  $\mu$ L 1 mol/L 的硫酸终止反应,酶标仪测量 450 nm 的吸光度,每份标本重复测定 3 次,与各期参考标准对照。一期梅毒参照 RPR 检测和滴度试验,用 FTA-ABS 确认;二期梅毒参照 RPR 检测和滴度试验,用 TPPA 确认;三期梅毒参照 RPR 检测和滴度试验,Tp0608 重组蛋白方法的临界值定义为均值 $\pm$ 2 倍标准差,用 TPPA、FTA-ABS 与参考标准对照。

**1.2.3 评价 Tp0608 重组蛋白的灵敏度、特异度和 95% 可信区间** Tp0608 重组蛋白的整体表现用受试者工作特征曲线 (ROC 曲线),以灵敏度为纵坐标代表真阳性率,1-特异度为横坐标代表假阳性率,作图绘成 ROC 曲线。在 ROC 曲线上计算最佳截断点的灵敏度、特异度和假阳性率。

**1.2.4 用 RPR+TPPA 对梅毒不同临床分期和先天性梅毒进行评价** RPR+TPPA 检测结果与 Tp0608 重组蛋白检测结果对比,观察 Tp0608 重组蛋白方法在临床各期,特别是在先天性梅毒、早期梅毒患者中是否优于血清学方法,能否用于这部分患者的筛查。评价指标和方法同 1.2.3。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 完成了 Tp0608 基因扩增,蛋白诱导和纯化** 通过使用一对上下游特异性引物对目标序列进行 PCR 反应,得到 Tp0608 基因的 PCR 产物结果,见图 1,PCR 产物大小在 750~1 000 bp,符合预期。

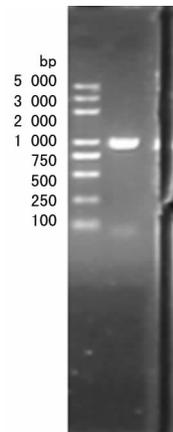


图 1 Tp0608 基因的 PCR 产物

**2.2 PCR 产物的转化** 对载体 pET28A 进行 Eco-

RI-HindIII 双酶切,连接酶连接,转化,使用菌落 PCR 方法以鉴定阳性克隆,共挑取 8 个转化子进行菌落 PCR 鉴定,结果见图 2,其中 1、2、4、7 转化子有插入片段。取 pETNus-TP68 1、2、4、7 菌落过夜培养,提取质粒后送样测序,序列结果完全正确的为 Nus 的 4 号质粒。

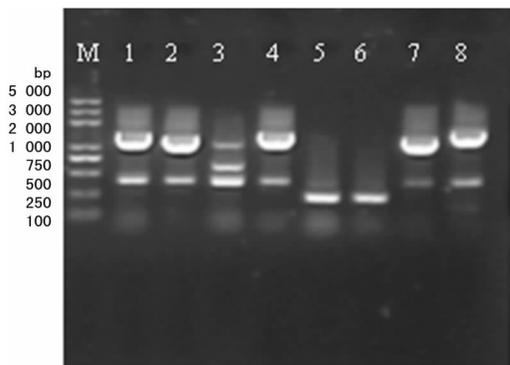


图 2 pETNus-TP68 菌落 PCR 结果

**2.3 蛋白的表达与纯化** 接种重组菌,以 IPTG(1.0 mmol/L)诱导培养 4 h,收集并裂解细菌,经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化和洗涤,各阶段 SDS-PAGE 电泳结果如图 3,经分子筛后,样品纯度基本在 90%左右,符合作为诊断抗原的基本要求。

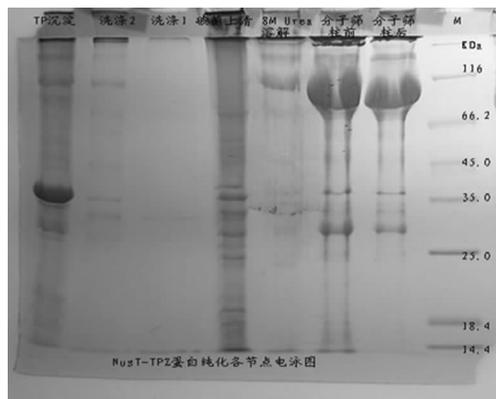


图 3 NusTPZ 各阶段中间产物电泳结果

**2.4 Tp0608 重组蛋白和 RPR+TPPA 对梅毒各临床分期、先天性梅毒及可能有交叉反应病例的检测结果** Tp0608 重组蛋白筛查梅毒患者 406 例,阳性为 387 例,灵敏度为 95.3%,RPR+TPPA 筛查方法阳性 378 例,灵敏度为 93.1%;筛查可能有交叉反应的患者 90 例,Tp0608 重组蛋白特异度为 99.1%,RPR+TPPA 筛查方法特异度为 97.2%;两种方法对正常标本检测阳性数均为 0。结果证实 Tp0608 重组蛋白对梅毒筛查的灵敏度、特异性均高于常规的 RPR+TPPA 检测方法,特别是对先天性梅毒、一期梅毒检测优于常规方法。结果见表 1、2。

**2.5 ROC 曲线分析** Tp0608 重组蛋白筛查 406 例,灵敏度为 95.3%,特异度为 99.1%,AUC 为 0.99。RPR+TPPA 联合筛查方法,灵敏度为 93.1%,特异度为 97.2%,AUC 为 0.96。Tp0608-ELISA 检测的 AUC 高于 RPR+TPPA。见图 4。

表 1 Tp0608 重组蛋白和 RPR+TPPA 对各期梅毒患者的检测结果

分组	n	Tp0608-ELISA			RPR+TPPA		
		阳性 (n)	阴性 (n)	灵敏度 (%)	阳性 (n)	阴性 (n)	灵敏度 (%)
一期梅毒	78	76	2	97.4	72	6	92.3
二期梅毒	69	66	3	95.7	66	3	95.6
三期梅毒	55	50	5	90.9	55	0	100.0
潜伏期梅毒	120	111	9	92.5	112	8	93.3
先天性梅毒	84	84	0	100.0	73	9	86.9
合计	406	387	19	95.3	378	26	93.1

表 2 Tp0608 重组蛋白和 RPR+TPPA 对可能有交叉反应患者的检测

分组	n	Tp0608-ELISA			RPR+TPPA		
		阳性 (n)	阴性 (n)	灵敏度 (%)	阳性 (n)	阴性 (n)	灵敏度 (%)
钩端螺旋体病	3	0	3	100.0	0	3	100.0
沙门菌感染	14	0	14	100.0	0	14	100.0
风湿病	28	1	27	96.4	2	26	92.9
EB 病毒感染	25	0	25	100.0	1	24	96.0
妊娠妇女	20	0	20	100.0	0	20	100.0
合计	90	1	109	99.1	3	107	97.2

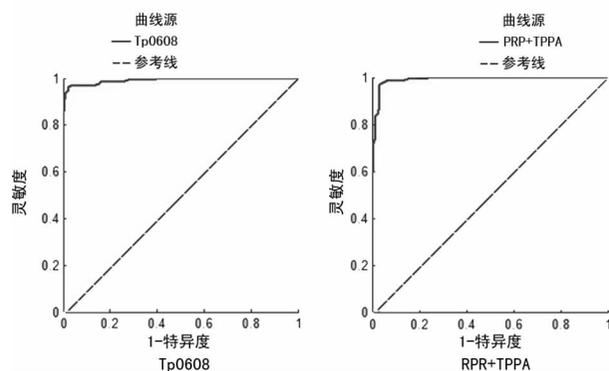


图 4 Tp0608 重组蛋白和 RPR+TPPA 方法对各期梅毒患者检测的 ROC 曲线

### 3 讨论

常规 RPR+TPPA 方法在早期梅毒和先天性梅毒灵敏度和特异度方面还有待提高,还不能区分是现在感染还是既往感染,因此有待发现其他更敏感和特异的蛋白抗原。

本研究成功构建了 pET28a/Tp0608 重组质粒,提取纯化了 Tp0608 重组蛋白,纯化蛋白与阴性者血清无反应,与梅毒患者血清有强反应,提示其作为诊断抗原的可行性。

本研究共收集到各期梅毒 406 例,经临床和实验室检查确诊为梅毒阳性,并且用 Tp0608 重组蛋白对各期梅毒患者进行了检测,与 RPR+TPPA 进行对比,Tp0608 重组蛋白对梅毒筛查的灵敏度、特异度均高于常规的 RPR+TPPA 检测方法,重组蛋白进行检测比脂质抗原和粗制蛋白抗原更有优势;特别是对先天性梅毒的灵敏度为 100.0%,明显高于 RPR+TPPA 检测的灵敏度(86.9%),在一期梅毒 Tp0608 重组

蛋白灵敏度为 97.4%，也高于 RPR + TPPA 的 92.3%，结果证实重组蛋白 Tp0608 显示了高灵敏度和在血清学交叉反应中的高特异度(99.1%)，Tp0608 重组蛋白在先天性梅毒和一期梅毒检测中优于常规方法，重组蛋白在制备上也优于粗制梅毒螺旋体蛋白。重组蛋白可在体外用 E. coli 培育方法大量制备，但粗制梅毒螺旋体蛋白只能在兔动物模型中生长的密螺旋体中提取，并且提取物中含有大量的其他大分子，可能对检测结果产生影响。因此粗制蛋白检测常会出现假阳性结果<sup>[8]</sup>。

采用重组蛋白是个新选择，可提高免疫检测的准确性和灵敏度。以往一些研究表明重组蛋白能提高梅毒的血清学诊断<sup>[9-12]</sup>，并且还可能用于区分新近感染和既往感染<sup>[11]</sup>，可用于人群梅毒的筛查。另外在 90 例可能有交叉反应的患者血清检测中，Tp0608 重组蛋白特异度为 99.1%，也高于常规的 RPR + TPPA 方法。

本研究结果提示 Tp0608 重组蛋白是非常有前景的梅毒筛查的诊断性抗原，但这个抗原在细胞内的位置和保护性反应还未确定，还有待进一步研究和验证。

参考文献

[1] TUCKER J D, CHEN X S, PEELING R W. Syphilis and social upheaval in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(18): 1658-1661.  
 [2] LI Y, ZHU L, DU L, et al. Effects on preventing mother-to-child transmission of syphilis and associated adverse pregnant outcomes: a longitudinal study from 2001 to 2015 in Shanghai[J]. China BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 626-630.  
 [3] LUO Z, ZHU L, DING Y, et al. Factors associated with syphilis treatment failure and reinfection: a longitudinal cohort study in Shenzhen[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 620-625.  
 [4] LIU L, XIE Y, DAI Z, et al. establishment and evaluation of a One-Step microplate chemiluminescence immunoassay to de-

tect IgG antibody against treponema pallidum[J]. J Clin Lab Anal, 2015, 29(6): 493-497.  
 [5] XU M, XIE Y, JIANG C, et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis[J]. Int J Infect Dis, 2016, 43: 51-57.  
 [6] SMITH B C, SIMPSON Y, MORSHED M G, et al. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(1): 105-111.  
 [7] MCGILL M A, EDMONDSON D G, CARROLL J A, et al. Characterization and serologic analysis of the Treponema pallidum proteome[J]. Infect Immun, 2010, 78(6): 2631-2643.  
 [8] KUBANOV A, RUNINA A, Deryabin D, et al. Novel treponema pallidum recombinant antigens for syphilis diagnostics: current status and future prospects[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 1436080.  
 [9] KE W, MOLINI B J, LUKEHART S, et al. Treponema pallidum subsp. pallidum TP0136 protein is heterogeneous among isolates and binds cellular and plasma fibronectin via its NH2-terminal end [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(3): e0003662.  
 [10] XIE Y, XU M, WANG C, et al. Diagnostic value of recombinant Tp0821 protein in serodiagnosis for syphilis [J]. Lett Appl Microbiol, 2016, 62(4): 336-343.  
 [11] HUNTER M G, ROBERTSON P W, POST J J. Significance of isolated reactive treponemal chemiluminescence immunoassay results[J]. J Infect Diseases, 2013, 207(9): 1416-1423.  
 [12] POZZOBON T, FACCHINELLO N, BOSSI F, et al. Treponema pallidum(syphilis) antigen TpF1 induces angiogenesis through the activation of the IL-8 pathway[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18785-18789.

(收稿日期: 2018-09-12 修回日期: 2018-12-28)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 05. 027

## 集束化护理策略在中消化道出血中的临床应用

周 爽, 罗珍利, 赵 蓉, 汪兴伟, 陈东风

(陆军军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科, 重庆 400042)

**摘要:**目的 探讨集束化护理策略在中消化道出血中的临床应用价值。方法 选择 2017 年 1 月至 2018 年 1 月收治的确诊为中消化道出血的 80 例患者, 采用便利抽样法随机分为常规护理对照组和集束化护理干预组, 每组 40 例。比较两组患者的临床疗效、止血时间、平均住院时间、并发症的发生率及护理满意度方面的差异。结果 集束化护理干预组在患者的临床疗效、止血时间、平均住院时间、并发症的发生率及护理总满意度方面均优于常规护理对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 通过制订集束化护理管理策略, 根据循证证据, 将有利于减少中消化道出血患者的再出血率和提高抢救成功率的护理措施整合为一体, 制订方案并实施, 可以改善患者的结局。通过提高集束化护理在中消化道出血患者临床中的应用, 为患者提供最优化的治疗和护理, 提高患者的生存质量。

**关键词:**集束化护理; 中消化道出血; 护理管理

中图分类号: R473.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)05-0671-04

消化道出血是临床常见的消化系统急危重症, 病

因众多、复杂且变化快, 并发症发生率高, 严重危及患