

免疫印迹法检测 TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体表达在梅毒诊断中的应用评估

王欣俞¹, 崔凯¹, 赵晋文¹, 丁晓娜¹, 王鑫琪¹, 魏殿军¹, 张延海², 高德禄², 刘朋¹, 郭奕阳³

(1. 河北燕达医院检验科, 河北廊坊 066251; 2. 河北燕达医学研究院, 河北廊坊 066251;
3. 河北医科大学第四医院检验科, 石家庄 050000)

摘要:目的 通过对4种血清学梅毒实验方法比对, 评估免疫印迹法检测 TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体表达在梅毒诊断中的应用。方法 于2018年6月~2019年6月, 收集河北燕达医院28 417例梅毒筛查样本, 综合化学发光微粒子免疫(CMIA)检测结果S/CO值、梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)结果及快速血浆反应素环状卡片试验(RPR)检测结果进行分组, 确认实验以梅毒螺旋体抗体免疫印迹试验(TP-WB)平行测定3组标本。相关分析采用 Pearson r 距离法; 数据分类可视化采用主成分分析法。采用 Medcalc 软件进行 ROC 曲线统计分析, 计算曲线下面积, 确定 CMIA 法对梅毒诊断效能最大时的 S/CO 最佳截断点; 不同诊断方法计数资料的比较采用卡方检验。结果 以 TP-WB 结果为参照, ROC 曲线分析发现, 当 CMIA 法 S/CO 截断值为 6.79 时, 敏感度为 79.41%, 特异度为 96.05%, 此时曲线下面积最大为 0.911, 即 6.79 为 CMIA 法的最佳诊断截断值。TPN15, TPN17, TPN45 及 TPN47 抗体表达水平与 S/CO 比值均呈正相关 ($P < 0.05$), 相关系数 r 分别为 0.87, 0.81, 0.87 及 0.76。当标本中免疫印迹法检测 TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体均阳性且着色强度数值高反应性 (50~170) 时, 四种检测方法阳性符合率、总符合率为 100%, 显示评价方法和比对方法具有高度一致性 ($P < 0.01$)。结论 活动性梅毒患者 TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体表达均阳性且着色强度高反应性, 梅毒抗体单阳梅毒特异性抗体 TPN17 和 TPN47 抗体表达减少且抗体着色强度降低, 阳性率显著减少 ($P < 0.05$)。梅毒抗体结果可疑患者中 TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体表达明显减少, 梅毒血清 CMIA 法筛查 S/CO 在 6.79 以下时, 建议进一步采用梅毒免疫印迹检测法进行确证。

关键词: 梅毒螺旋体; 免疫印迹法; TPN15; TPN17; TPN45; TPN47; 评估

中图分类号: R759.1; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2019) 06-082-05

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2019.06.020

Evaluation of the Application of Immunoblotting Method for the Detection of TPN15, TPN17, TPN45 and TPN47 Antibodies in the Diagnosis of Syphilis

WANG Xin-yu¹, CUI Kai¹, ZHAO Jin-wen¹, DING Xiao-na¹, WANG Xin-qi¹, WEI Dian-jun¹,
ZHANG Yan-hai², GAO De-lu², LIU Peng¹, GUO Yi-yang³

(1. Department of Clinical Laboratory, Hebei Yanda Hospital, Hebei Langfang 066251, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Hebei Yanda Medical Research Institute, Hebei Langfang 066251, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To evaluate the application of immunoblotting method through the detection of TPN15, TPN17, TPN45 and TPN47 expression in the diagnosis of syphilis by comparing with other four serological methods. **Methods** From June 2018 to June 2019, 28 417 syphilis screening samples were collected from Yanda Hospital of Hebei province. Samples were grouped into three groups according to the results of CMIA, TPPA and RPR. Pearson r distance method was used for correlation analysis, and principal component analysis (PCA) was used for data classification visualization. The ROC curve was generated by Medcalc software, and the area under the curve was calculated to determine the optimal cut-off point of S/CO when the CMIA method was most effective in the diagnosis of syphilis. Chi-square test was used to compare the counting data of different diagnostic methods. **Results** Taking the TP-WB method as a reference, ROC curve analysis found that when the S/CO cut-off value of CMIA method was 6.79, the sensitivity was 79.41% and the specificity was 96.05%. At this time, the maximum area under the curve was 0.911, that was, 6.79 was the best cut-off value of CMIA method. The antibody expression levels of TPN15, TPN17, TPN45

基金项目: 河北省卫生青年科技课题项目 (20180899)。

作者简介: 王欣俞 (1983-), 女, 硕士在读, 副主任技师, 从事感染与免疫学研究, E-mail: 532161952@qq.com。

通讯作者: 高德禄 (1954-), 男, 硕士生导师, 主任技师, 研究方向: 老年病学与临床诊断。

and TPN47 were positively correlated with the S/CO ratio ($P < 0.05$), and the correlation coefficients r were 0.87, 0.81, 0.87 and 0.76, respectively. Samples with higher TPN15, TPN17, TPN45 and TPN47 antibodies expression as staining intensity values 50~170 were all syphilis positive, the positive coincidence rate and total coincidence rate of the four detection methods were 100%, indicating that the evaluation method and comparison method were highly consistent ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of TPN15, TPN17, TPN45 and TPN47 antibodies in active syphilis patients were all positive and the staining intensity was highly reactive. The expression of TPN15, TPN17, TPN45 and TPN47 antibodies in patients with suspicious syphilis antibody results were significantly reduced. When the S/CO value of syphilis serum obtained by CMIA is below 6.79, further use of syphilis western blot test is recommended for confirmation.

Keywords: *Treponema pallidum*; TPN15; TPN17; TPN45; TPN47; evaluation

梅毒是由梅毒螺旋体 (*treponema pallidum*, TP) 感染引起的, 累及全身多器官的一种疾病, 其传播途径主要是性传播^[1]。近年来梅毒的阳性检出率随着人口流动性增加及社会生活方式的改变而呈现不断上升的趋势^[2], 特别是因为早期梅毒的病变组织, 又增加了获得性传播人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的风险^[3]。其诊断主要根据病史, 临床表现和实验室血清学检测。血清学检测梅毒特异性抗体是目前国内外诊断梅毒的主要方法^[4], 在梅毒诊断方面起到重要作用^[5]。血清学检测主要分为两类: 第1类为非TP抗原血清试验, 常用方法包括快速血浆反应素环状卡片试验 (RPR)、性病研究实验室试验 (VDRL)、甲苯胺红不加热血清试验 (TRUST) 等; 第2类为TP抗原血清试验, 主要有梅毒螺旋体血凝试验 (TPHA)、梅毒螺旋体明胶凝集试验 (TPPA)、荧光密螺旋体抗体吸附试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫层析法、化学发光法及免疫印迹法等 (WB)^[6]。在梅毒血清学检测方法中, 不同检测方法学反应性结果存在不一致性。梅毒螺旋体抗体免疫印迹试验 (*treponema pallidum*-western blot, TP-WB) 采用大量高度纯化的梅毒螺旋体抗原, 是目前较为公认的梅毒特异性抗体确证方法^[7]。本研究将梅毒血清学检测初筛有反应性的临床患者入组, 拟评估免疫印迹法检测 TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体表达在梅毒诊断中的应用, 研究结果为提高梅毒血清学诊断准确性提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 回顾性纳入河北燕达医院 2018 年 6 月~2019 年 6 月 28 417 例使用化学发光微粒子免疫分析法 (CMIA) 筛查的梅毒血清样本, 选取检测结果 cutoff 值 S/CO 比值 > 15 以及 S/CO 比值 1~9 患者样本 178 例为研究对象, 其中男性 86 例, 女性 92 例, 平均年龄 56.22 ± 19.15 岁。分组: A 组 34 例标本, CMIA 检测有反应性, TPPA 阳性且 RPR 检测阳性并伴有滴度; B 组 38 例标本, CMIA 检测有反应性, cutoff 值 S/CO 比值 > 15 , TPPA 阳性, RPR 检测阴性; C 组 106 例标本 CMIA 检测有

反应性, cutoff 值 S/CO 比值 1~9, TPPA 均阳性, RPR 检测均阴性。梅毒感染诊断符合《中华人民共和国卫生行业标准 - 梅毒诊断 (WS273-2018)》^[8]。

1.2 试剂和仪器 CMIA 检测法使用的厂家配套试剂盒及 ARCHITECT i2000 仪器, 购自美国雅培公司; TPPA 检测法使用原厂配套试剂, 购自日本富士公司的瑞必欧株式会社; TP-WB 检测法使用原厂配套试剂盒, 购自德国欧蒙公司。

1.3 方法 抽取梅毒筛查对象空腹静脉血 5ml, 3 000 r/min 离心 10min, 血清样本加样, 2~8℃保存。CMIA 法检测梅毒特异性抗体, 仪器测得样本发光值并计算反应物浓度, 结果判读标准: S/CO ≥ 1 为梅毒螺旋体抗体反应性, S/CO < 1 为非反应性。RPR 法检测非特异性抗体; TPPA 法检测梅毒特异性抗体; TP-WB 法检测梅毒特异性抗体, 该方法将含有 TPN47, TmpA, TPN45, TPN17 和 TPN15 抗原的硝酸纤维素膜测试条与 30 μ l 血清样品一起温育, 然后与辣根过氧化物酶标记的对人 IgG 特异的二抗孵育。在添加 TMB 后, 免疫复合物在条带上可视化暗带。通过与截止对照条带的强度比较来评估每个抗原条带的强度。检测膜条置于全自动免疫印迹仪 EUROBlotMasterII 上检测, 通过 EUROLInScan 软件判读结果, 当五个诊断带中至少两条特异性抗原带明确显色, 测试被判读为阳性; 一条特异性抗原带明确显色, 测试被判读为可疑。EUROLInScan 软件判读结果标准为着色强度 ≥ 24 判定为有反应性, 仪器判读检测线性为 24~255。

1.4 统计学分析 采用 MetaboAnalyst 4.0 的 Statistical Analysis 模块进行数据的统计分析, 具体步骤如下: 样本 TPN47, TPN45, TPN17 和 TPN15 及 S/CO 指标值以列的方式分别录入, 以逗号间隔的 CSV 格式文件上传, 然后进行数据完整性检查, 样本经标准化数据转换及数据正态化后进行相关分析及主成分聚类分析。其中, 相关分析采用 Pearson r 距离法; 数据分类可视化采用主成分分析法 (principal component analysis, PCA)。采用 Medcalc 软件对 CMIA 法 S/CO 做特征曲线 (ROC 曲线) 统计分析, 计算曲线下面积, 确定 CMIA 法

对梅毒诊断效能最大时的 S/CO 最佳截断点。不同诊断方法计数资料的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TP-WB 法、CMIA 法及 TPPA 法试验检测梅毒抗体结果 178 例受检者中, TPPA 法检测结果梅毒阳性共 168 例, 阳性检出率为 94.4%; TP-WB 法检测结果梅毒阳性 78 例, 阳性率为 43.8%, 两种检测方法阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=104.2$, $P < 0.01$), TP-WB 法的灵敏度为 68.29%, 特异度为 90.91%。以 TP-WB 结果为参照, 绘制 ROC 曲线, 见图 1。统计结果表明, 当 CMIA 法测得的 S/CO 截断值为 6.79 时, 敏感度为 79.41%, 特异度为 96.05%, 此时曲线下面积最大为 0.911, 即 6.79 为 CMIA 法的最佳诊断截断值。

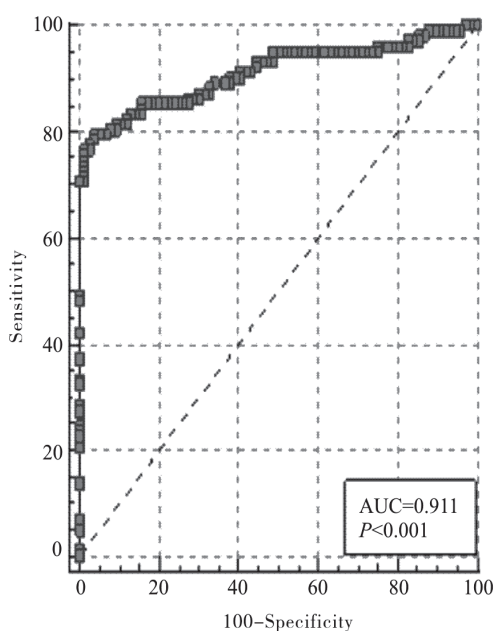


图1 S/CO 比值 ROC 曲线分析

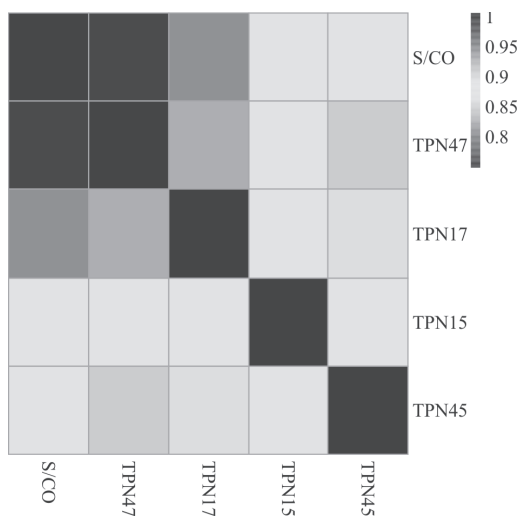


图2 TP-WB 法四种抗体着色强度和 S/CO 比值相关性

2.2 TP-WB 检测 TPN15, TPN17, TPN45 及 TPN47 抗体表达与 CMIA 法相关性分析 TP-WB 法检测 TPN15, TPN17, TPN45 及 TPN47 抗体表达着色强度和 CMIA 法 S/CO 比值相关性分析结果见图 2。同一样本 TPN15, TPN17, TPN45 及 TPN47 抗体表达水平与 S/CO 比值均呈正相关 ($P < 0.05$), 四种抗体表达水平与 S/CO 比值相关系数 r 分别为 0.87, 0.81, 0.87 及 0.76。

2.3 TP-WB 法着色强度分组的结果分析 按照 TP-WB 法读取着色强度值将 178 例样本进行分析, A 组 34 例着色强度 50~170, B 组 38 例着色强度 24~90, C 组 106 例着色强度 24~50, 组别及主成分分析聚类结果见表 1 及图 3。当第一主成分为 90.6%, 第二主成分为 3.9% 时, 将三组分别聚类分开。分组因子贡献分析见图 4 所示, 5 个分组因子夹角为锐角, 贡献率从高到低依次为 TPN15, TPN45, TPN17, TPN47 和 S/CO 比值。A 组, TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体均反应性且着色强度高数值, 显示评价方法和比对方法阳性符合率、总符合率为 100%, 具有高度一致性。B 组, TPN15, TPN17, TPN45 和 TPN47 抗体阳性率均减少, 分别为 92.1%, 65.8%, 86.8% 和 36.8%。TPN17 和 TPN47 抗体阳性率显著降低 ($P < 0.05$)。C 组, TPN15 和 TPN17 抗体表达为主。TP-WB 法检测 30 例结果反应性 (检测出 6 例结果阳性, 24 例结果可疑阳性), 76 例结果阴性。TPPA 法复验, 检测出 96 例结果 1:80 阳性, 10 例结果阴性 (TP-WB 确证时, 2 例结果判定可疑); TPPA 与 TP-WB 法相比, 显示阳性符合率 29.2%。

表1 CMIA,TPPA,RPR,TP-WB 及其抗体表达检测结果

组别	n	CMIA	TPPA	RPR	TP-WB	TPN15	TPN17	TPN45	TPN47
A	34	34	34	34	34	34	34	34	34
B	38	38	38	0	38	35	25	33	14
C	106	106	96	0	30	17	8	6	4

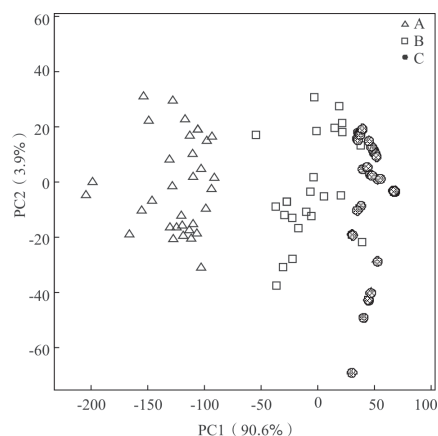


图3 TP-WB 免疫印迹法样本着色强度分组主成分聚类结果

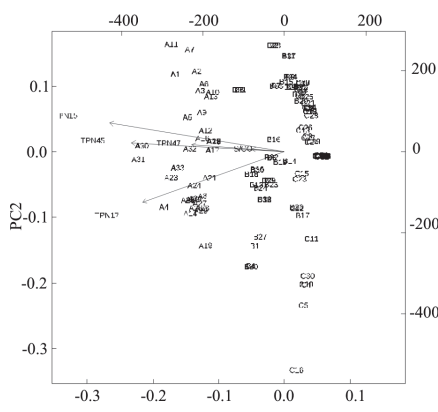


图4 TP-WB免疫印迹法样本着色强度分组因子贡献分析

3 讨论

近年来,梅毒作为严重威胁公共健康的传染性疾病之一^[9-10],具有极强的侵袭性,它通过黏附、定植、穿过组织屏障、累及全身各器官^[11]。据报道,无症状梅毒的发生率高达64.6%以上^[12],尽管梅毒的发现和诊治已有数十年的历史,但是初期梅毒确诊和晚期梅毒治疗仍具有挑战性^[13]。TP侵入机体后可诱导产生针对其不同抗原成分的抗体,主要包括抗心磷脂抗体和抗TP特异性抗体,是临床血清学检验诊断是否携带梅毒的基础。TP蛋白是梅毒感染的重要因素,在感染梅毒时,检测患者血清中的TP蛋白对梅毒的诊断具有重要价值^[14]。TP外膜蛋白是免疫的主要靶点,相关研究已发现9种具有免疫活性的蛋白,即TPN15,TPN17,TPN33,TPN37,TPN39,TPN43,TPN45,TPN47和TPN97,而其中的TPN15,TPN17,TPN45和TPN47抗体表达水平被认为在梅毒的致病与诊断中起重要作用^[15]。

TP是迄今为止无法在体外培养的病原微生物,感染后其表面的膜蛋白对宿主的固有免疫系统具有很强的调控作用,因此被认为是TP重要的毒力因子^[16-17]。随着医学分子生物学技术的发展,TP膜蛋白的相关研究报道及应用不断涌现^[18]。在蛋白质印迹诊断测试中TPN45脂蛋白(TmpA; tp0768基因产物)和嵌合大肠埃希菌表达TPN15,TPN17,TPN45和TPN47抗原(Meridian Life Science, Inc., Memphis, Tennessee USA)作为免疫原性抗原的组合,被证实对获得性梅毒具有高度敏感度和特异度^[19]。其中TPN47,TPN17,TPN15以及TmpA脂蛋白具有强大的前炎症活性,与TP引起的梅毒免疫反应密切相关^[20]。KUBANOV等^[19]报道TPN15和TPN17免疫原性抗原是关键成员,在梅毒感染期间诱导高抗体反应并且不与来自患有其他螺旋体病的患者的血清交叉反应。CHAN等^[21]提出TPN17在

菌体外膜表面的分布具有随意性的特点。它可能通过激活细胞间黏附分子1(ICAM-1),E-选择素和单核细胞趋化蛋白-1的表达,在蛋白质配体结合,密螺旋体膜结构维持^[22]或梅毒发病机制中起作用。另一种强免疫原TPN47,具有较强的免疫原性和反应性,通过刺激微血管内皮细胞合成细胞间黏附分子并诱导血管细胞黏附分子在宿主-病原体相互作用中发挥作用^[19, 23]。

本项研究中显示活动性梅毒患者中免疫印迹梅毒特异性抗体TPN15,TPN17,TPN45和TPN47抗体均具反应性且EUROLineScan软件判读结果着色强度数值高反应性,与梅毒活动进展呈正相关性;CMIA检测S/CO值>15时,梅毒抗体单阳者中免疫印迹梅毒特异性抗体TPN15,TPN17,TPN45和TPN47阳性率均减少,其中TPN17和TPN47抗体阳性率显著降低($P<0.05$);CMIA检测S/CO值在1~9之间反应性结果时,通过免疫印迹检测确认显示阳性及可疑患者中TPN15,TPN17,TPN45和TPN47抗体的表达明显减少且反应曲线着色强度均呈低水平。CMIA,TPPA与WB-Tp之间检测结果不一致,其阳性符合率仅为29.2%,并且临床最终判定结果阳性占20%(6/30),可疑阳性结果占80%(24/30)。

综上所述,基于重组脂蛋白技术的密螺旋体特异度检测显著改善了梅毒的诊断,为临床实验室提供血清学检测确证的依据。本研究结果显示,梅毒患者分期处于不同的阶段时,梅毒特异性抗体TPN15,TPN17,TPN45和TPN47抗体表达存在差异。当梅毒血清初筛检测结果弱反应性以TPPA复核时,TPPA检测结果并不能作为临床确证的诊断,实验室血清学确证方法应首选梅毒免疫印迹法进行确证。

参考文献:

- [1] 刘凤辉,郑碧英,张俊爱,等.固有免疫在梅毒螺旋体感染免疫致病中的作用和机制[J].山西医药杂志,2019,48(3):312-316.
LIU Fenghui,ZHENG Biying,ZHANG Junai,et al. The role and mechanism of innate immunity in immune pathogenesis of *Treponema pallidum* infection [J]. Shanxi Medical Journal,2019,48(3):312-316.
- [2] 吴奇,王丽,季灵婷,等.上海闸北地区妊娠梅毒分子流行病学特征分析[J].检验医学,2016,31(6):486-490.
WU Qi,WANG Li,JI Lingting,et al.Molecular epidemiological analysis for pregnant women with syphilis in Zhabei district of Shanghai [J]. Laboratory Medicine,2016,31(6):486-490.
- [3] STAMM L V. Syphilis: antibiotic treatment and resistance[J]. Epidemiology and Infection, 2014.143(8):1567-1574.

(下转89页)