

## 梅毒筛查中甲苯胺红不加热血清 试验改良方法与传统方法的比较<sup>\*</sup>

徐敬轩<sup>1</sup>, 夏毅<sup>1</sup>, 彭文红<sup>1</sup>, 张春芳<sup>1</sup>, 赵仙华<sup>1</sup>, 钱云芳<sup>1</sup>, 储磊<sup>2</sup>, 谢而付<sup>3</sup>

(1. 丹阳市第二人民医院检验科, 江苏丹阳 212300;

2. 丹阳市人民医院检验科, 江苏丹阳 212300; 3. 南京医科大学第一附属医院检验学部, 南京 210029)

**摘要:**目的 比较在梅毒筛查中甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)改良方法与传统方法的检测性能。方法 对TRUST高滴度的梅毒血清进行一系列稀释, 分别用改良方法与传统方法进行测试, 计算出一系列浓度下每种方法的阳性率。比较两种检测方法的 $C_{50}$ ,  $C_5 \sim C_{95}$ 区间, 以及不精密度曲线, 并对两种方法的一致性, 以及诊断性能进行比较。结果 改良方法的 $C_{50}$ 小于传统方法, 改良方法的 $C_5 \sim C_{95}$ 区间较传统方法窄, 改良方法的不精密度曲线较传统方法陡峭, 两种方法一致性程度的95%的可信区间为73.4%~95.8%。改良方法灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和诊断符合率分别为64.29%, 99.1%, 85.71%, 97.05%和96.39%, 传统方法灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、诊断符合率分别为53.75%, 98.49%, 75%, 96.18%和95%。改良方法的灵敏度、阳性预测值高于传统方法, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.25, 10.03, P$ 均 $< 0.05$ )。改良方法的特异度、阴性预测值、诊断符合率均略高于传统方法, 差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.39, 3.45, 4.03, P$ 均 $> 0.05$ )。结论 改良方法的精密度、灵敏度和特异度较传统方法高, 可以借助全自动酶免仪加样, 适用大批量样本的检测, 改良方法可代替传统方法用于梅毒筛查。

**关键词:**梅毒; 甲苯胺红不加热血清试验

中图分类号: R377.1; R446.61 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)03-133-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.037

### Comparison of the Improved Method and the Traditional Method for Toluidine Red Unheated Serum Test in Syphilis Screening

XU Jing-xuan<sup>1</sup>, XIA Yi<sup>1</sup>, PENG Wen-hong<sup>1</sup>, ZHANG Chun-fang<sup>1</sup>, ZHAO Xian-hua<sup>1</sup>, QIAN Yun-fang<sup>1</sup>,  
CHU Lei<sup>2</sup>, XIE Er-fu<sup>3</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, the Second

Hospital of Danyang, Jiangsu Danyang 212300, China; 2. Department of Clinical Laboratory,

Danyang People's Hospital, Jiangsu Danyang 212300, China; 3. Department of Clinical

Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** **Objective** To compare the detection performance of the modified serum test (TRUST) method and the traditional method in syphilis screening. **Methods** A series of TRUST high titer syphilis serum was diluted, and the positive rate of each method was calculated by using the improved method and the traditional method. Comparison of two detection methods of  $C_{50}$ ,  $C_5 \sim C_{95}$  interval, as well as the accuracy of the density curve, and the consistency of the two methods were compared, and diagnostic performance were compared. **Results** The improved method of  $C_{50}$  was less than the traditional method of  $C_{50}$ , and the improved method of  $C_5 \sim C_{95}$  range was narrower than the traditional method, compared with the traditional method. The improved method of the non precision density curve was steeper than the traditional method, and the two confidence interval of the consistency degree of the 95% methods was 73.4% to 95.8%. The diagnostic sensitivity (SEN), diagnostic specificity (SPE), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and diagnostic efficiency (DF) of the improved method were 64.29%, 99.1%, 85.71%, 97.05% and 96.39%, respectively. The SEN, SPE, PPV, NPV and DF of the traditional methods were 53.75%, 98.49%, 75%, 96.18% and 95%, respectively. The improved method was superior to the traditional methods in the two aspects of SEN and PPV ( $\chi^2 = 8.25, 10.03$ , all  $P < 0.05$ ), with the statistically significant difference. The improved method was slightly higher than the traditional method in SPE, NPV and DF ( $\chi^2 = 2.39, 3.45, 4.03$ , all  $P > 0.05$ ), with the no statistically significant difference. **Conclusion** The precision, diagnostic sensitivity and diagnostic specificity of the improved method was higher than that of the traditional method, and it can be applied to the detection of large batch samples with the aid of the full automatic enzyme immunoassay instrument. The improved method can be used to replace the traditional method for syphilis screening.

**Keywords:** syphilis; toluidine red unheated serum test

目前梅毒主要依靠实验室的血清学诊断, 检测 方法大致分为两类, 一类是针对梅毒螺旋体特异性

<sup>\*</sup> 作者简介: 徐敬轩(1978—), 男, 本科, 主管检验师, 从事免疫学检验, E-mail: xjxhy@163.com。

通讯作者: 谢而付(1979—), 男, 硕士研究生, 副主任检验师, E-mail: xieerfu791010@163.com。

抗体的检测,有酶联免疫吸附试验(ELISA)、苍白密螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验(TPPA)和化学发光免疫分析法(CLIA)等;另外一类是针对心磷脂抗体即非特异性抗体的检测,有快速血清反应素试验(RPR)、不加热血清反应试验(USR)、甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)、性病研究实验室试验(VDRL)等。国内外临床实验室多采用ELISA作为梅毒血清学诊断的初筛检测<sup>[1]</sup>。近来有报道<sup>[2~4]</sup> ELISA法会造成梅毒的漏检,并提出TRUST,TP-ELISA同时筛查,《2014版欧洲梅毒管理指南》中明确提出梅毒非特异性抗体与特异性抗体并列联合检测适合梅毒的极早期筛查。传统的TRUST用于梅毒筛查操作繁琐,结果影响因素多<sup>[5]</sup>,不利于大批量样本的操作。本实验室在TRUST改良方法<sup>[6]</sup>的基础上再改进,现操作简单,影响因素小,可同时检测94份样本,其检测性能如何?现与传统方法比较,报道如下:

## 1 材料与方

1.1 研究对象 收集本院2015年11月26日门诊梅毒病人高滴度血清一份;同时对2016年1月16日~2月6日本实验室门诊和住院病人的标本730份,用盲法进行检测,最后收集数据。

1.2 试剂与仪器 TRUST试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司产品,Uranus AE150全自动酶免仪为深圳爱康生物科技有限公司产品,KJ-201BC型振荡器、KJ-201A型振荡器为江苏康健医疗用品有限公司产品,KH120自动脱盖离心机为湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品。ELISA试剂盒购自英科新创试剂有限公司。TPPA为日本富士株式会社产品。

## 1.3 方法

1.3.1  $C_{50}$ ,  $C_5 \sim C_{95}$  区间定义:在最佳条件下对浓度恰好在临界值的标本进行一系列重复检测,结果有50%为阴性,50%为阳性,该分析物浓度称为 $C_{50}$ 。“C”表示浓度,下标(50)表示阳性结果的百分数。通常根据EP12-A2文件,近临界值浓度的标本重复检测40次,如果阳性结果百分数达到35%~65%,说明对该方法的 $C_{50}$ 估计正确。 $C_5 \sim C_{95}$ 区间定义为某一接近临界值的分析物浓度范围,浓度超过该范围,重复检测标本得到的结果持续为阳性(浓度 $>C_{95}$ )或结果持续为阴性(浓度 $<C_5$ )。由于不精密度,对该区间内浓度的标本进行重复检测,得到结果将不一致,该浓度范围称为 $C_5 \sim C_{95}$ 区间。

1.3.2 改良方法:在全自动酶免仪测试项目中加入TRUST项目,其仅有加样50  $\mu$ l一步,在判读中设置TRUST的判读程序。用全自动酶免仪对

梅毒ELISA法、TRUST改良法以及HIV-ELISA法等其他项目同时加样,加样结束后取出U型板,每孔中加入TRUST抗原悬液一滴,用封板纸封板,在振荡器上快速混匀,然后在KJ-201BC型振荡器上120 r/min,振荡8 min,2 000 r/min离心5 min,在KJ-201A型振荡器上以最小转速边振荡边判读。判断标准:阳性反应(+++~++++):可见较大的红色凝集物;弱阳性反应(+~++):可见中等或明显的均匀红色凝集物;阴性反应(-):可见均匀的抗原颗粒或颗粒沉积于底部。吸空阳性孔内的反应混合物,在酶标仪上判读结果,cutoff值为0.30(仅为区别孔内有无液体)。其结果自动传入LIS系统。

1.3.3 精密度比较:将高滴度梅毒血清用生理盐水做一系列稀释,通过反复测定找到两种方法各自的 $C_{50}$ ,对其各自 $C_{50}$ 上下几个浓度用改良或传统方法严格按操作规程各测量40次。计算出该浓度下的阳性结果的百分数。以样品稀释度为横坐标,以各浓度下阳性百分数为纵坐标,拟合改良方法与传统方法的不精密度曲线。

1.3.4 方法学比较:用改良方法和传统方法同时检测730份病人标本,比较两种方法检测结果的一致性。其中360份病人标本用改良方法、传统方法和TP-ELISA法三种实验同时检测,任一种方法阳性,均用TP-PA做确诊试验<sup>[7]</sup>,以TP-PA为参比试验,对改良方法、传统方法在诊断性能上进行比较。

1.4 统计学分析 采用SPSS20.0统计软件进行分析,计算改良方法和传统方法阳性结果的符合率,用Kappa检验判断两套检测方法的一致性,采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 改良方法与传统方法稀释后的阳性率 传统方法的 $C_{50}$ 为高滴度梅毒血清的1:85倍稀释时,其阳性结果为40%(16/40);改良方法的 $C_{50}$ 为高滴度梅毒血清的1:311倍稀释时,其阳性结果为62.5%(25/40)。2个阳性结果的百分数均在35%~65%之间。

2.2 改良方法与传统方法检测TRUST的不精密度 改良方法的不精密度曲线相对传统方法的不精密度曲线陡峭,改良方法的 $C_5 \sim C_{95}$ 区间较传统方法的 $C_5 \sim C_{95}$ 区间窄。见图1。

2.3 改良方法与传统方法同时检测730份临床标本的检测结果 见表1。改良方法与传统方法检测结果一致程度百分比=(20+703)/730=99.0%,根据EP12.A2提供的公式计算,一致程度95%可信区间为[73.4%,95.8%]。Kappa值=

0.85,表明两种方法检测 TRUST 的一致性较好。

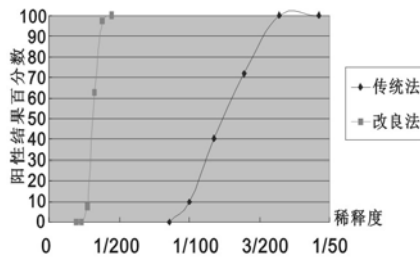


图 1 改良方法与传统方法检测 TRUST 的不精密度曲线图

表 1 改良方法与传统方法对 730 份标本 TRUST 检测结果

改良方法	传统方法		合计
	+	-	
+	20	4	24
-	3	703	706
合计	23	707	730

2.4 以 TP-PA 试验为参比试验,改良方法与传统方法的测量结果 见表 2。

表 2 改良方法与传统方法对 360 份标本 TRUST 检测结果

TP-PA	传统方法		改良方法	
	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性( $n=28$ )	15	13	18	10
阴性( $n=332$ )	5	327	3	329
合计	20	340	21	339

2.5 以 TP-PA 试验为参比试验,对改良方法与传统方法的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值以及诊断符合率进行比较 见表 3。

表 3 改良方法与传统方法灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值以及诊断符合率的比较[%( $n/n$ )]

特性	传统方法	改良方法	$\chi^2$ 值	P 值
灵敏度	53.57(15/28)	64.29(18/28)	8.25	<0.05
特异度	98.49(327/332)	99.1(329/332)	2.39	>0.05
阳性预测值	75(15/20)	85.71(18/21)	10.03	<0.05
阴性预测值	96.18(327/340)	97.05(329/339)	3.45	>0.05
诊断符合率	95.00(342/360)	96.39(347/360)	4.03	>0.05

改良方法的灵敏度、阳性预测值高于传统方法,差异有统计学意义( $\chi^2=8.25,10.03,P$  均<0.05)。改良方法的特异度、阴性预测值、诊断符合率均略高于传统方法,差异无统计学意义( $\chi^2=2.39,3.45,4.03,P$  均>0.05)。

3 讨论 本科室依据 EP12-A2 文件,参考黄妮姣等<sup>[8]</sup>的《CLSI EP12-A2 文件在 HBeAb 定性检测

性能评价中的应用》对改良方法进行性能确认。本实验中改良方法的  $C_{50}$  浓度低于传统方法的  $C_{50}$  浓度,说明改良方法的检测敏感度高于传统方法。其原因可能是传统方法中心磷脂抗体在低浓度时可与心磷脂结合,由于浓度过低,彼此间距离较远不能进一步结合成肉眼可见的凝集颗粒,通过改良方法的离心缩短了彼此的距离而形成肉眼可见的凝集。

$C_5 \sim C_{95}$  区间代表重复检测结果不一致的范围浓度,其宽度反映定性试验的精密度,其宽度越窄代表其精密度越高,方法越好。改良方法的不精密度曲线以及  $C_5 \sim C_{95}$  区间较传统方法陡峭窄,因此改良方法的精密度高于传统方法。其原因可能为传统方法操作大量样本时,样本的涂布面积以及样本与试剂混匀不能达到试剂要求的标准,而影响结果判断<sup>[5]</sup>。而改良方法可借助全自动酶免仪或自动加样器加样,同时可测试 94 份标本,用封板纸封板,保证各孔的反应条件一致,不再受涂布面积以及液体蒸发等因素影响。

改良方法在临床诊断方面随灵敏度提高,并没有降低临床特异度,因此改良方法优于传统方法。在随机抽取的 730 例标本中改良方法与传统方法有较好的一致性,其原因可能是处于临界浓度的标本较少。

总之,改良方法较传统方法在实验方面具有更高敏感度、精密度;在临床诊断具有更高的灵敏度、特异度;在操作上更简单,更容易判读,结果可直接传入 LIS 系统,适用大批样本操作,有利于实验室的标准化操作。其优点:①在 ELISA 法存在漏检的条件下,同时做 TRUST 可作为有力补充,做到早发现早治疗。②依据阳性孔最后凝集的颗粒大小可作为梅毒滴度的评估。③用于梅毒的普查<sup>[9]</sup>,较梅毒 ELISA 法与化学发光法快速、方便、成本低;较传统方法更准确、快速、简便、高通量。其缺点:不能用酶标仪直接判读,需先借助肉眼来判读,才可用酶标仪判读。

参考文献:

[1] Cole MJ, Perry KR, Parry JV. Comparative evaluation of 15 serological assays for the detection of syphilis infection[J]. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, 2007, 26(10):705-713.

[2] 李韶深,焦春梅,刘春莉,等. 4 例梅毒感染病例 TP-ELISA 阴性的报告[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(3):163.

Li SS, Jiao CM, Liu CL, et al. Four cases of syphilis infection TP-ELISA negative reported[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(3):163.

[3] 王婷婷,李 琴,虞竞峰,等. TRUST, TP-ELISA 和 TPPA 3 种方法在 16 375 例梅毒血清学诊断中的应

- 用[J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(11): 1020-1022.
- Wang TT, Li Q, Yu JF, et al. Application of TRUST, TP-ELISA and TPPA in the serologic diagnosis of syphilis[J]. National Journal of Andrology, 2012, 18(11): 1020-1022.
- [4] 丁国良, 商发奎, 延义芹, 等. 采供血机构对梅毒螺旋体检测的最佳方案探讨[J]. 国际输血及血液学杂志, 2014, 37(3): 222-225.
- Ding GL, Shang FK, Yan YQ, et al. The best proposal of treponema pallidum detection for blood services[J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2014, 37(3): 222-225.
- [5] 邓晓琴, 杨茂, 毛建军. TRUST法检测梅毒的影响因素探讨[J]. 临床输血与检验, 2006, 8(2): 141.
- Deng XQ, Yang M, Mao JJ. To explore the factors influencing the detection of Treponema pallidum by TRUST method[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2006, 8(2): 141.
- [6] 徐敬轩, 夏毅, 彭文红, 等. 对甲苯胺红不加热血清试验改良的探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3): 111-112.
- Xu JX, Xia Y, Peng WH, et al. To investigate the toluidine red unheated serum test improved[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 111-112.
- [7] 邵先兵, 张燕, 张娜. 酶联免疫吸附试验、梅毒螺旋体颗粒凝集试验及甲苯胺红不加热血清试验在梅毒检测中的检验效能评价[J]. 中国性科学, 2015, 24(5): 49-52.
- Shao XB, Zhang Y, Zhang N. Comparison of different serological diagnosis of syphilis antibody test results[J]. The Chinese Journal of Human Sexuality, 2015, 24(5): 49-52.
- [8] 黄姣姣, 黄宪章, 庄俊华, 等. CLSI EP12-A2 文件在HBeAb定性检测性能评价中的应用[J]. 检验医学, 2012, 27(11): 900-903.
- Huang WJ, Huang XZ, Zhuang JH, et al. Application of CLSI EP12-A2 document in the performance evaluation of qualitative test of HBeAb[J]. Laboratory Medicine, 2012, 27(11): 900-903.
- [9] 徐敬轩, 夏毅, 谢而付, 等. 丹阳地区农民梅毒感染状况调查[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(2): 141-143.
- Xu JX, Xia Y, Xie EF, et al. Investigation on the status of farmers of syphilis infection in Danyang area[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(2): 141-143.
- 收稿日期: 2016-10-25 修回日期: 2017-03-27
- 
- (上接 132 页)
- Li DP, Li Z, Wang G, et al. Dynamic observation and value of plasma level of thrombomodulin in rats with traumatic hemorrhagic shock[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(1): 116-117, 120.
- [7] 李雪萍, 齐晓林, 叶长青, 等. 血必净干预对水下爆炸致兔急性肺损伤血清和支气管肺泡灌洗液 NF- $\alpha$  表达的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 119-112.
- Li XP, Qi XL, Ye CQ, et al. Investigation to the expression of NE and TNF- $\alpha$  in serum and BALF of rabbits with acute lung injury interposed by Xue Bijing in underwater explosion[J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(2): 119-122.
- [8] Bae HB, Li M, Lee SH, et al. Propofol attenuates pulmonary injury induced by collapse and reventilation of lung in rabbits[J]. Inflammation, 2013, 36(3): 680-688.
- [9] 黄璟, 周毅. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  及其抑制剂的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2015, 42(1): 63-68.
- Huang J, Zhou Y. Research progress on tumor necrosis factor  $\alpha$  and its inhibitors[J]. International Journal of Stomatology, 2015, 42(1): 63-68.
- [10] 张国玉, 王春鲜, 王建星, 等. 乌司他丁对血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用及机制[J]. 中国临床研究, 2016, 29(2): 193-198.
- Zhang GY, Wang CX, Wang JX, et al. The protective effect of ulinastatin on oxidative stress injury of vascular endothelial cells and its mechanism in vitro[J]. Chinese Journal of Clinical Research, 2016, 29(2): 193-198.
- [11] 王海峰, 郭伟新, 谢南姿, 等. 乌司他丁注射液改善急性肺损伤兔循环内皮祖细胞成血管能力及对 PKB/eNOS/NO 通路的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(10): 1250-1252.
- Wang HF, Guo WX, Xie NZ, et al. Ulinastatin injected improving the ability of angiogenesis in circulating endothelial progenitor cells of acute lung injury and the effect of PKB/eNOS/NO pathway[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio/Cerebrovascular Disease, 2014, 12(10): 1250-1252.
- [12] 秋楠, 党小军, 刘晓斌, 等. IL-6 和 TNF- $\alpha$  在出血性脑卒中患者继发性损伤的应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(5): 35-37.
- Qiu N, Dang XJ, Liu XB, et al. Application research of IL-6, TNF-alpha in hemorrhagic stroke patients with secondary injury[J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(5): 35-37.
- [13] 姜远旭, 徐世元, 张雪萍, 等. 右美托咪定联合乌司他丁减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(1): 96-101.
- Jiang YX, Xu SY, Zhang XP, et al. Protective effect of dexmedetomidine-ulcinastatin combination on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2014, 30(1): 96-101.
- 收稿日期: 2017-01-16 修回日期: 2017-02-05