

## 双抗原夹心时间分辨荧光免疫法检测梅毒螺旋体特异性总抗体的性能研究<sup>\*</sup>

谭玉华<sup>1</sup>, 雷泽洪<sup>2</sup>, 郑 丹<sup>3</sup>, 刘 灿<sup>1</sup>, 赵凡一<sup>1</sup>

(1. 广州市丰华生物工程有限公司体外诊断试剂研发中心, 广州 510730;

2. 江门市中心医院检验科, 中山大学附属江门医院, 广东江门 529000;

3. 中山大学附属第一医院东院检验科, 广州 510700)

**摘要:**目的 对双抗原夹心时间分辨荧光免疫法(TRFIA)检测梅毒螺旋体(TP)特异性总抗体的性能进行研究。方法 采用重组 TP 优势多表位嵌合抗原,应用双抗原夹心 TRFIA 检测 TP 特异性总抗体。评价该方法学的精密度、检测下限、准确度、线性、参考品符合率等分析性能指标,并进行临床比对试验研究,方法间结果差异比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。结果 该方法的批内与批间的 CV 均不高于 10%;检测下限可达 0.05 mIU/ml;检测国家标准物质的相对偏差不超过 10%;在 1.50~155.00 mIU/ml 内,线性相关系数可达 0.999 9;检测国家参考品能达到检定要求;检测标化的血清盘结果符合率为 100%;与梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)平行比对试验,总符合率为 99.56%,Kappa 指数为 0.990 6。结论 该方法精密度好、灵敏度高、准确性好、线性范围宽,临床符合率高,能满足临床检测需要。

**关键词:** 梅毒螺旋体;多表位嵌合抗原;双抗原夹心法;时间分辨荧光免疫法;性能评估

中图分类号:R377.1;R446.61 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)02-097-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.027

## Evaluation of Double Antigen Sandwich Time-resolved Fluoroimmunoassay for Specific Total Antibodies to *Treponema Pallidum*

TAN Yu-hua<sup>1</sup>, LEI Ze-hong<sup>2</sup>, ZHENG Dan<sup>3</sup>, LIU Can<sup>1</sup>, ZHAO Fan-yi<sup>1</sup> (1. Reagent Research and Development Center of IVD Reagents, Guangzhou Fenghua Bioengineering Co. Ltd., Guangzhou 510730, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Jiangmen Central Hospital, Affiliated Jiangmen Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Jiangmen 529000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Eastern Hospital of the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510700, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluation the performance of double antigen sandwich time-resolved fluoroimmunoassay(TRFIA) for specific total antibody to *Treponema pallidum*(TP). **Methods** Specific total antibody to TP was detected by a double antigen TRFIA based on recombinant multi-epitope chimeric antigen. The methodological precision, low limit of detection, accuracy, linearity, reference standard coincidence rate and other analytical performance indicators were evaluated, and clinical comparison research trials were completed. The  $\chi^2$  test was used for the difference between two methods results, the  $P < 0.05$  which represents the difference was statistically significant. **Results** The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were both less than 10% respectively. The low limit of detection was 0.05 mIU/ml. The relative deviation of detecting the national standard was not exceed 10%. The linear range was 1.50~155.00 mIU/ml and the linear correlation coefficient could be reached 0.999 9. The performance of detection national reference could meet the national accreditation requirements. The consistent rate was 100% when the TRFIA methodology detected the standardized serum plate. The parallel test of TRFIA and treponema pallidum gelatin agglutination test (TPPA) were completed, the total coincidence rate was 99.56%, and the Kappa index was 0.990 6. **Conclusion** Their result showed that the TRFIA methodology is high sensitivity, accuracy, wide linear range, and highly clinical coincidence rate, which is valuable for clinical application.

**Keywords:** *Treponema pallidum*; multi-epitope chimeric antigen; double antigen sandwich method; time-resolved fluoroimmunoassay; performance evaluation

梅毒是由梅毒螺旋体(*treponema pallidum*, TP)感染引起的传染性强、危害较大的人类性传播疾病。梅毒可引起神经、心血管等多系统损害,甚

至威胁生命,梅毒可通过胎盘传染胎儿,导致自发性流产、死产或先天梅毒等,并且感染梅毒可促进艾滋病的传播。90年代末以来,中国梅毒报告病

<sup>\*</sup> 作者简介:谭玉华(1980—),男,医学硕士,临床医学检验技师,医疗器械工程师,二级企业培训师,主要从事医疗器械(体外诊断试剂)的研发、应用、质量管理和医学检验工作, E-mail: tanywhy@aliyun.com。

例数明显增加,流行呈现快速上升趋势。2009年梅毒报告病例数在我国甲乙类传染病报告中居第三位。感染 TP 后及早地发现并进行规范治疗可以达到临床治愈,加强对梅毒的普查,已成为防止该疾病蔓延的重要手段。TP 的体外培养技术迄今仍未解决,因此微生物检查和血清学筛查成为目前筛选和确诊梅毒感染的主要途径。随着 TP 全基因序列的破译以及基因工程技术的进步,当前 TP 重组抗原的基因研究已由单基因发展到多表位嵌合基因,部分基因研究已通过原核生物表达成功,解决了 TP 血清学研究的抗原瓶颈问题。有研究<sup>[1]</sup>报道 TP 基因重组抗原在梅毒筛查中具有相当高的灵敏度和特异度。笔者对应用多表位嵌合重组抗原的双抗原夹心时间分辨荧光免疫法(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)检测 TP 特异性总抗体的性能进行了研究,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 按《梅毒诊断标准》<sup>[2]</sup>诊断,选择具有 TP 感染症状/体征、相似症状或与传染源有密切接触史的就诊病人血清样本 458 例用于临床比对试验研究。

1.2 主要试剂 梅毒甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)诊断试剂(北京万泰生物药业股份有限公司),TP 抗体检测试剂盒(胶体金法,CGT)[英科新创(厦门)科技有限公司],TP 抗体检测试剂盒(凝集法,TPPA)(日本富士瑞必欧株式会社),TP 抗体诊断试剂盒(酶联免疫法,ELISA)(上海科华生物工程股份有限公司),TP 抗体测定试剂盒(TRFIA)(广州市丰华生物工程有限公司);TP,心磷脂 IgG 抗体检测试剂盒(欧蒙印迹法-免疫印迹法,WB)(德国欧蒙医学诊断有限公司);第二套 TP 抗体国家参考品(中国食品药品检定研究院);TP IgG 和 IgM 抗体血清(冻干)标准物质 GBW09158,TP 抗体临床科研血清盘(中国卫生部

临床检验中心);TP 抗体血清(液体)标准物质 GBW(E) 090157, GBW(E) 090081, GBW(E) 090082, GBW(E) 090083(北京康彻思坦生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 AutoTRFIA-8 型自动荧光免疫分析仪(广州市丰华生物工程有限公司),RT-2100C 型酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.4 方法 检测方法严格按照试剂盒和仪器说明书操作,并按试剂盒说明书对结果进行判读。TRFIA 试剂的参考值采用 2.50 mIU/ml。TP 抗体临床科研血清盘样本 40 份经 TRUST, CGT, ELISA, TPPA 和 WB 5 种方法标化,以 WB 检测结果为标准,然后再用 TRFIA 法对比检测。TRFIA 试剂与 TPPA 试剂进行临床样本比对试验研究,比对不符的样本再经 CGT 和 ELISA 2 种方法进行复测。

1.5 性能评价 参考文献[3,4]的方法对 TP 抗体测定试剂盒(TRFIA)的精密度、检测低限、准确度、线性、参考品符合率等分析性能指标进行评价。

1.6 统计学分析 TRFIA 测量所得荧光计数采用 TRFIA 仪上随机配备的分析软件进行数据分析。其它统计结果数据采用 SPSS13.0 和 Microsoft Excel 软件进行统计分析。2 种试剂间结果比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义;等效性采用 Kappa 检验,  $\kappa > 0.75$ , 为高度一致,认为两系统等效;  $0.4 \leq \kappa \leq 0.75$  认为一致,但需进一步进行相关统计学分析;  $\kappa < 0.4$  则认为两系统不一致,两系统不等效。

## 2 结果

2.1 精密度 见表 1。TRFIA 试剂检测 GBW(E) 090157, GBW(E) 090081, GBW(E) 090082, GBW(E) 090083 四个血清标准物质,分别进行批内和批间检测 20 次,批内和批间变异系数(coefficient of variation, CV)均小于 10%。

表 1

TRFIA 试剂检测质量控制品的精密度结果

质量控制品	靶值(mIU/ml)	批 内		批 间	
		实测均值(mIU/ml)	CV(%)	实测均值(mIU/ml)	CV(%)
GBW(E)090157	3.1	3.22	5.87	3.09	6.44
GBW(E)090081	6.3	6.05	4.56	6.19	4.61
GBW(E)090082	12.0	12.75	4.43	12.63	4.56
GBW(E)090083	21.1	23.93	2.33	21.37	2.55

2.2 检测低限 TRFIA 试剂对 0 mIU/ml 的校准品平行检测 20 次,检测荧光值为 1 541.94 ± 592.15,采用 95% 的可信限计算检测低限为 2

726.23,代入标准曲线计算浓度为 0.05 mIU/ml。

2.3 准确度与线性 将浓度为 1.27 IU/ml 的血清(冻干)标准物质 GBW09158 复溶后,用含 50 g/

L BSA 的 50 mmol/L, pH7.8 的 Tris-HCl 稀释液准确稀释成 1.50, 4.50, 13.50, 65.00 和 155.00 mIU/ml, TRFIA 试剂的实测均值与理论值的相对偏倚分别为 -4.00%, -3.33%, -5.11%, 2.63% 和 0.14%, 实测均值与理论值的线性回归方程为  $Y=1.005X-0.0351$ ,  $r=0.9999$ 。

2.4 国家参考品检测 见表 2。TRFIA 试剂检测第二套 TP 抗体国家参考品, 20 份阴性参考品 (N1~N20) 的符合率为 20/20; 10 份阳性参考品 (P1~P10) 的符合率为 10/10; 1 份精密度参考品的 CV 为 4.88% ( $n=10$ ); 4 份灵敏度样品的结果符合 L1, L2, L3 为阳性, L4 为阴性。

表 2 TRFIA 试剂检测第二套 TP 抗体国家参考品的结果

阴性参考品				阳性参考品		精密度参考品		灵敏度参考品	
编号	检测值(mIU/ml)	编号	检测值(mIU/ml)	编号	检测值(mIU/ml)	测试次数	检测值(mIU/ml)	编号	检测值(mIU/ml)
N1	0.10	N11	0.10	P1	37.61	CV1	11.51	L1	34.14
N2	0.10	N12	0.10	P2	10.91	CV2	11.71	L2	10.95
N3	0.10	N13	0.10	P3	96.81	CV3	11.31	L3	5.82
N4	0.11	N14	0.10	P4	6.25	CV4	10.61	L4	0.05
N5	0.11	N15	0.10	P5	52.41	CV5	11.91		
N6	0.10	N16	0.10	P6	6.81	CV6	10.81		
N7	0.10	N17	0.11	P7	56.81	CV7	12.21		
N8	0.11	N18	0.10	P8	38.71	CV8	11.91		
N9	0.10	N19	0.10	P9	40.21	CV9	10.81		
N10	0.10	N20	0.10	P10	174.91	CV10	11.91		

2.5 血清盘比对试验 见表 3。40 例 TP 抗体临床科研血清盘样本经 5 种方法标化后, 共 17 例 TP 抗体阴性, 23 例 TP 抗体阳性。以标化结果为标

准, TRFIA 试剂检测的阴性符合率为 17/17, 阳性符合率为 23/23。

表 3 临床科研血清盘 40 份样本的比对结果

标化方法					标化结果	n	TRFIA 法	
TRUST 法	CGT 法	ELISA 法	TPPA 法	WB 法			+	-
-	-	-	-	-	-	17	0	17
-	-	+	+	+	+	3	3	0
未检测	-	+	+	+	+	1	1	0
-	-	+	-	+	+	1	1	0
-	+	+	+	+	+	6	6	0
+	-	+	+	+	+	1	1	0
+	+	+	+	+	+	11	11	0

2.6 临床比对试验 TRFIA 试剂与 TPPA 试剂平行比对检测 458 例临床样本, 以 TPPA 试剂结果为参考标准, 阳性符合率为 100% (170/170); 阴性符合率为 99.31% (286/288), 总符合率为 99.56% (456/458), 两种方法结果间差异无统计学意义 ( $\chi^2=0$ ,  $P>0.05$ ); Kappa 指数为 0.9906, 表明两种方法检测结果间具有高度一致性, 见表 4。2 种方法检测不符合的 2 例样本, TRFIA 试剂检测浓度分别为 6.35, 3.46 mIU/ml, 经 CGT 试剂复测均为阴性, 经 ELISA 试剂复测浓度 6.35 mIU/ml 的样本为弱阳性, 3.46 mIU/ml 的样本为阴性。

表 4 458 份临床样本的比对试验评价结果

TRFIA 试剂	TPPA 试剂		合计
	+	-	
+	170	2	172
-	0	286	286
合计	170	288	458

3 讨论 目前 TP 抗体的非特异性反应素抗体试验有性病研究实验室试验 (VDRL)、快速血浆反应素试验 (RPR) 和 TRUST; 特异性抗体试验常用 TP 血凝试验 (TPHA)、荧光密螺旋体抗体吸收试验 (FTA-ABS), TPPA, CGT, ELISA 和 WB。

VDRL 法为微量玻片法,是以心磷脂为抗原,加入了适量胆固醇和卵磷脂以提高敏感度,对神经梅毒的诊断具有重要的价值,但对一期梅毒的敏感度不高;RPR 和 TRUST 等非 TP 试验操作简便、费用较低,目前仍为许多实验室用于梅毒血清学筛查试验,但假阳性率较高,阳性结果需用特异性 TP 试验确认。TPHA 法、TPPA 法、FTA-ABS 法的特点是方法特异、假阳性率低等,三者检测试剂成本高、操作较繁琐、耗时较长,因此不适合大量标本的筛查。CGT 法快速、简便、敏感、特异,且无需特殊的仪器设备,适用于性病门诊的快速检测、献血者的筛查及紧急用血的筛检,但灵敏度需进一步提高。ELISA 法有敏感度高、特异度好、自动化程度高、结果客观准确、易于推广等优点,是目前检验科常用的免疫学检测方法,适合梅毒的大规模筛查,但灵敏度和特异度不及 TPHA,TPPA,FTA-ABS 法,且存在一定的假阳性<sup>[5,6]</sup>,WB 法操作简便快捷,结果易于判断,但检测成本较高。铕(Eu)标记 TRFIA 法是一种非放射标记超微量免疫检测技术,降低了非特异性信号,达到了极高的信噪比,具有敏感度高、重复性好、特异度强、定量范围宽、标记物稳定等突出优点。

本研究的 TRFIA 试剂应用了含 TPN15, TPN17 和 TPN47 重组 TP 优势表位的嵌合抗原,采用双抗原夹心法原理检测 TP 特异性总抗体,在一定程度上解决了以往临床上应用间接法检测 TP 抗体的许多缺点,如间接法采用二抗作标记抗体,血清中 IgG 含量高,故少量的非特异吸附即可造成假阳性结果,血清中类风湿因子等也可能干扰检测结果,并且间接法只能检测抗体中的 IgG 组分,对其他抗体类型尤其是 IgM 无法检出,延长了窗口期;嵌合抗原的应用也解决了目前国内市面上绝大部分产品检测 TP 抗体以单一 TP 重组抗原的缺点,这种单一基因重组 TP 抗原对潜伏晚期、并发 HIV 感染或经过治疗的梅毒病人反应性差,常出现假阴性结果。

本研究 TRFIA 试剂批内与批间的 CV 均不高于 10%;检测低限可达 0.05 mIU/ml;检测国家标准物质的相对偏差不超过 10%;在 1.50~155.00 mIU/ml 内,线性相关系数可达 0.999 9;检测国家参考品能符合检定要求<sup>[7]</sup>;在与标化的血清盘比对试验中,TRFIA 法试剂结果与标化的血清盘结果的总符合率为 100%;在临床样本比对试验中,本方法与 TPPA 法结果的总符合率为 99.56%,2 种方法结果间差异无统计学意义( $\chi^2=0$ ,  $P>0.05$ ),Kappa 指数为 0.990 6,表明 TRFIA 试剂检测 TP 抗体与 TPPA 试剂具有等效性,能满足临床检测

需要。

#### 参考文献:

- [1] 许美蓉,韦善求.梅毒螺旋体基因重组抗原研究及其临床应用[J].右江民族医学院学报,2013,35(1):90-92.  
Xu MR, Wei SQ. *Treponema pallidum* gene recombinant antigen research and clinical application[J]. Journal of Youjiang Medical University for Nationalities, 2013, 35(1): 90-92.
- [2] 中华人民共和国卫生部.中华人民共和国卫生行业标准 WS 273-2007 梅毒诊断标准[S].北京:人民卫生出版社,2007:1-16.  
People's Republic of China Ministry of Health. Health Industry Standards of the People's Republic of China WS 273-2007 Syphilis diagnostic criteria[S]. Beijing: People's Health Publishing House, 2007: 1-16.
- [3] 徐伟文.体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估[J].分子诊断与治疗杂志,2010,2(2):140-144.  
Xu WW. Evaluation index for in vitro diagnostic products (IVD) during R&D[J]. Journal of Molecular Diagnosis and Therapy, 2010, 2(2): 140-144.
- [4] 罗立梅,张彬,陈刚.化学发光微粒子免疫分析法检测性激素 6 项的性能验证[J].国际检验医学杂志,2017,38(9):1214-1216,1219.  
Luo LM, Zhang B, Chen G. Performance verification of chemiluminescent microparticle immunoassay for 6-indicator sex hormones[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2017, 38(9): 1214-1216, 1219.
- [5] 田庆华,李天君,李延伟,等.梅毒螺旋体实验室检测技术概述[J].中国性科学,2013,22(4):37-40.  
Tian QH, Li TJ, Li YW, et al. An overview of laboratory detection technology of *Treponema pallidum* [J]. The Chinese Journal of Human Sexuality, 2013, 22(4): 37-40.
- [6] 赵花,李军民,张红.TP-ELISA 法检测梅毒抗体假阳性结果的影响因素[J].武警医学,2014,25(10):1003-1005,1007.  
Zhao H, Li JM, Zhang H. Uncertain factors of detecting *Treponema pallidum* antibody by enzyme linked immunosorbent assay[J]. Med J Chin PAPF, 2014, 25(10): 1003-1005, 1007.
- [7] 曾明,王薇,玄山山,等.第二套梅毒螺旋体抗体诊断试剂国家参考品的研制[J].中国生物制品学杂志,2006,19(4):397-399.  
Zeng M, Wang W, Yao SS, et al. Development of a second set of national reference materials for *Treponema pallidum* antibody diagnostic reagents[J]. Chin J Biologicals, 2006, 19(4): 397-399.

收稿日期:2017-12-07

修回日期:2018-01-12