

干式荧光发光法快速检测梅毒螺旋体抗体的方法建立和初步应用与评价

吕松琴¹, 孙溪若², 黄 山¹, 段洪芬¹, 施金丽¹, 李晓非¹, 王超男³, 张 玲³, 王义娜²

(1. 昆明市第三人民医院 / 云南省传染病临床临床医学中心, 昆明 650041;

2. 上海荣盛生物药业有限公司, 上海 201108; 3. 东方海洋(北京)医学研究院, 北京 100071)

摘要: 目的 建立一种干式荧光发光法快速检测梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, TP)总抗体的检测技术,并评价其检测性能。方法 利用高活性优势表位嵌合TP抗原,基于免疫层析和荧光发光平台,采用双抗原夹心原理建立检测梅毒螺旋体总抗体的快速检测方法。应用该方法检测梅毒螺旋体抗体快速试剂国家参考品,并与酶联免疫法平行检测360例临床样本,比较评价该技术的检测性能。结果 建立了梅毒螺旋体总抗体干式荧光发光快速检测技术,检测国家参考品10份阳性参考品符合率为10/10,20份阴性参考品符合率为19/20,三批产品的批内重复性分别为12.00%,12.30%和9.10%,批间重复性为10.90%,最低检测限参考品L1和L2检测为阳性,L3检测为阴性。在临床样本评价中,该检测技术诊断梅毒患者的AUC值为0.986,敏感度和特异度分别为99.08%和94.02%,阳性预测值和阴性预测值分别为87.80%和99.58%,阳性似然比和阴性似然比分别为16.569和0.009 8。与酶联免疫法检测试剂相比较,总体符合率为98.06%(Kappa=0.965),具有高度等效性。结论 本研究建立的梅毒螺旋体抗体干式荧光发光快速检测技术是一种敏感度和特异度均高的检测方法,能够满足临床检测需要。

关键词: 梅毒螺旋体;干式荧光发光法;优势表位嵌合TP抗原;性能评价

中图分类号: R377.1; R446 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2021)06-152-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.06.033

Establishment of the Dry Fluorescence Method for Rapid Detection of *Treponema Pallidum* Antibody and Its Preliminary Application and Evaluation

LÜ Song-qin¹, SUN Xi-ruo², HUANG Shan¹, DUAN Hong-fen¹, SHI Jin-li¹, LI Xiao-fei¹,
WANG Chao-nan³, ZHANG Ling³, WANG Yi-na²

(1. the Third People's Hospital of Kunming / Clinical Center for Infectious Diseases in Yunnan Province, Kunming 650041, China; 2. Shanghai Rongsheng Biological Pharmaceutical Co. LTD, Shanghai 201108, China; 3. Medical Institute of Oriental Ocean (Beijing), Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To establish a dry fluorescent dry fluorescent luminescence technique for the detection of *Treponema pallidum*(TP) total antibody and evaluate its detection performance. **Methods** Anti-treponema pallidum total antibody was detected by the dry fluorescent dry fluorescent luminescence technique established using highly active dominant epitope chimeric TP antigen. A total of 360 clinical samples were tested in parallel with enzyme-linked immunoassay (ELISA) to evaluate the performance of the dry fluorescent luminescence technique. **Results** The coincidence rate of 10 positive reference samples was 10/10, and the coincidence rate of 20 negative reference samples was 19/20. The intra-batch reproducibility of the three batches was 12.00%, 12.30% and 9.10%, respectively, and the inter-batch reproducibility was 10.90%. The minimum limit of detection was positive for L1 and L2, and negative for L3. In clinical performance evaluation, the AUC value was 0.986, and the sensitivity and specificity of the dry fluorescent luminescence technique were 99.08% and 94.84%, respectively. The positive predictive value and the negative predictive value were 87.8% and 99.58% respectively. The positive likelihood ratio and the negative likelihood ratio were 16.569 and 0.009 8, respectively. The overall coincidence rate between dry fluorescent luminescence method and ELISA was 98.06% (Kappa=0.965). **Conclusion** The dry fluorescence luminescence technique of *Treponema pallidum* total antibody is a rapid detection method with high sensitivity and specificity, which can meet the needs of clinical detection.

Keywords: *Treponema pallidum*; dry fluorescent luminescence; dominant epitope chimeric TP antigen; clinical evaluation

作者简介: 吕松琴(1975-),女,本科,主任技师,从事传染病免疫学研究, E-mail: lsqwsz@126.com。

孙溪若(1987-),女,本科,从事诊断试剂研发, E-mail: 113044454@qq.com,与第一作者同等贡献。

通讯作者: 李晓非(1971-),女,硕士研究生,从事传染病临床检测研究, E-mail: 1971069866@qq.com。

近年来梅毒的发病率逐年增加,在国家法定传染病中位居第3位,成为严重的公共卫生问题。梅毒是由梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, TP)感染引起的性传播疾病^[1-2],早期梅毒传染性最强,随后逐渐减弱;同时早期梅毒的临床治愈率显著高于二、三期梅毒,因此对梅毒的早期诊断和治疗就显得格外重要^[3-4]。梅毒的诊断主要依靠实验室检测,尤其是血清学检查^[5]。目前使用ELISA或化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体^[6-7],但这些方法检测往往需要1~2 h,不适合临床快速筛查。故本研究基于免疫层析和荧光发光平台,利用高活性优势表位嵌合TP抗原,拟建立一种干式荧光发光快速检测特异性梅毒螺旋体总抗体的检测技术,并对其检测性能进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 研究对象 109例经临床确诊的梅毒患者、44例其他疾病对照组患者和207例健康体检者血清样本由昆明市第三人民医院检验中心于2020年7月~2021年3月期间收集,保存于-80℃备用。109例经临床确诊的梅毒患者平均年龄 43.8 ± 17.2 岁,其中男性44例,女性65例;44例其他疾病对照组患者平均年龄 45.7 ± 14.5 岁,其中男性23例,女性21例;207例健康体检者平均年龄 43.8 ± 10.9 岁,其中男性85例,女性122例。三组性别和年龄比较差异无统计学意义。本研究获得昆明市第三人民医院伦理委员会批准通过。

1.2 仪器与试剂 兔IgG和羊抗兔IgG购自北京华信行生物技术有限公司;BSA购自Sigma公司;荧光微球购自上海迈普生物科技有限公司;玻璃纤维素垫、硝酸纤维素膜(NC膜)等耗材购于上海杰一生物技术有限公司;梅毒螺旋体抗体快速试剂国家参考品(批号:370035-201801)购自中国食品药品检定研究院;梅毒螺旋体抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)购自上海科华生物工程股份有限公司。ELx405深孔板洗板机和ELx-808吸收光酶标仪购自美国Bio-Tek公司;AFS-1000干式荧光免疫分析仪购自广州蓝勃生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 TP抗原的表位分析:采用BIOSUN生物信息学软件,分别输入TP47, TP17和TP15抗原氨基酸序列,然后利用B细胞表位分析功能,根据表位峰值的高低分析筛选优势表位区段。

1.3.2 高活性优势表位嵌合TP抗原的制备:根据NCBI公布的TP抗原的核酸序列,将TP47, TP17和TP15三种抗原优势表位区段的核酸序列进行连接获得基因序列,序列合成由中美泰和生物技术有限公司完成。将高活性优势表位嵌合TP抗原的

基因序列接入pET-28a载体,构建原核表达质粒pET-TP47-17-15,转化大肠埃希菌BL21,将含有测序正确目的基因的大肠埃希菌菌株进行诱导表达。收集诱导后的菌体,超声波破碎,收集上清液进行Ni柱纯化,洗脱收集目的蛋白,进行SDS-PAGE电泳鉴定。

1.3.3 干式荧光发光法TP总抗体检测卡建立:用包被稀释液将高活性优势表位嵌合TP抗原稀释至最佳包被浓度;将羊抗兔IgG稀释成最佳包被浓度;用划膜仪将两种包被液分别喷到硝酸纤维素膜上。将已包被的硝酸纤维素膜37℃干燥24 h。将最佳标记浓度的高活性优势表位嵌合TP抗原与微球按最佳比例进行偶联制得微球标记抗原溶液。将微球标记抗原溶液调整至最佳浓度,以最佳量喷至玻璃纤维垫上制备成TP微球结合垫。将TP微球结合垫室温干燥12 h。在干燥室内将反应膜、兔IgG微球结合垫、TP微球结合垫、样品垫、滤纸等装配成反应板,再用切条机切成试纸条组装成ID卡,装入铝箔袋内。检测时,阳性样本中的TP抗体先与固化在玻璃纤维上的荧光微球标记的高活性优势表位嵌合TP抗原结合形成复合物,并继续向NC膜层析,通过NC膜检测线(T线)时,被包被在NC膜上的高活性优势表位嵌合TP抗原捕获。仪器显示结果为S/CO值,S代表待测样本T线荧光值和C线荧光值比值(T/C),CO为Cut-off值,S/CO值 ≥ 1 ,结果为阳性;S/CO值 < 1 ,结果为阴性。

1.3.4 临界值(Cut-off值)的确定:选取120例经酶联免疫法检测确认为TP抗体阴性的健康体检血清样本,采用本研究检测技术进行检测,分别记录T线荧光值和C线荧光值,并计算比值(T/C),然后计算T/C的平均值(\bar{X})和标准差(S),以 $\bar{x} \pm 2s$ 为Cut-off值。

1.3.5 干式荧光发光法TP总抗体检测试剂性能评估:根据国家食品药品监督管理局《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》和中国合格评定国家认可委员会颁布实施的《临床免疫学定性检验程序性能验证指南》,采用梅毒螺旋体抗体快速试剂国家参考品评估阳性符合率、阴性符合率、最低检测限、批内重复性、批间重复性;采用临床样本评估临床敏感度、特异度、阴性预期值、阳性预期值、似然比。梅毒螺旋体抗体快速试剂国家参考品包含10份阳性参考品(P1~P10),20份阴性参考品(N1~N20),3份最低检测限参考品(L1~L3)和1份重复性参考品(CV)。

1.3.6 临床样本检测

1.3.6.1 酶联免疫法:应用双抗原夹心原理,检测人血清或血浆中的梅毒螺旋体抗体。严格按照试剂

盒说明书进行操作,用酶标仪读数,波长 450 nm。以 S/CO 值 ≥ 1.0 为阳性, S/CO 值 < 1.0 为阴性。

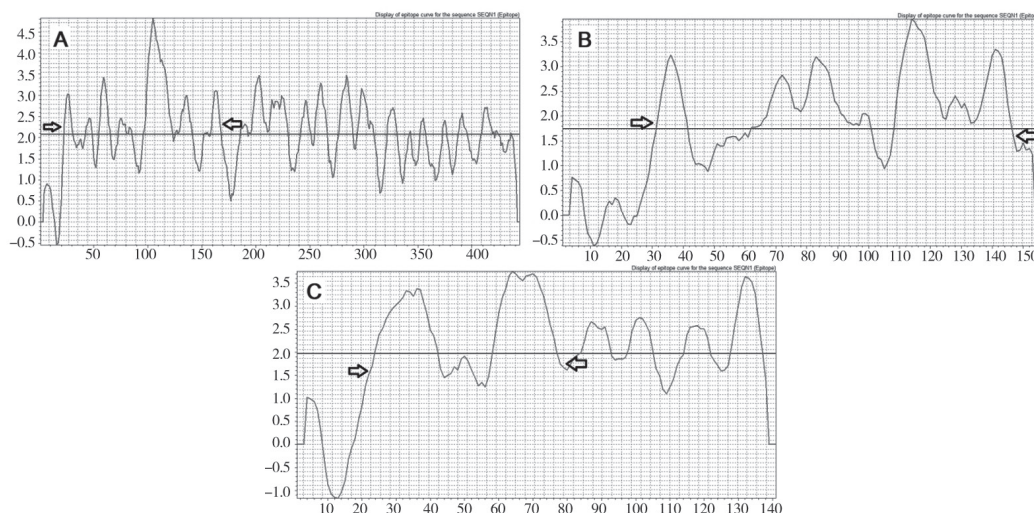
1.3.6.2 干式荧光发光法:应用双抗原夹心原理,检测人血清或血浆中的梅毒螺旋体抗体。用移液器分别吸取 100 μ l 血清/血浆样本,加入到检测卡上加样孔中。检测卡加样反应 15 min 后立即上机检测分析结果并输出报告。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 19.0 统计软件进行处理,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计数资料比较采用 Kruskal-Wallis 检验,两组间比较

采用 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。运用 GraphPad Prism 5 软件绘制 ROC 曲线,并计算敏感度与特异度。等效性采用 Kappa 检验, Kappa 值在 0~1 之间,越接近 1 说明两种试剂检测结果的一致性越好。

2 结果

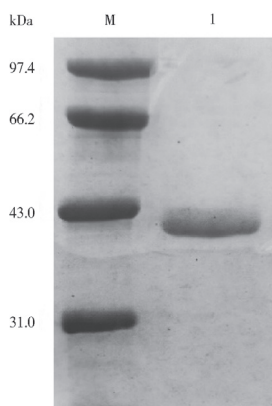
2.1 TP 抗原的优势表位筛选 见图 1。利用 BIOSUN 生物信息学软件分析确定优势表位区段分别为 20~170aa (TP47), 30~150aa (TP17) 和 22~80aa (TP15)。



A.TP47 抗原; B.TP17 抗原; C.TP15 抗原; 箭头指示区段为优势表位区段

图 1 TP 抗原的 B 细胞表位分布图

2.2 高活性优势表位嵌合 TP 抗原的制备 见图 2。高活性优势表位嵌合 TP 抗原为可溶性表达, Ni 柱纯化后获得纯化抗原,经 SDS-PAGE 电泳鉴定,结果显示抗原相对分子量约为 37.9kDa。



M. 分子量标准; L. 纯化抗原

图 2 高活性优势表位嵌合 TP 抗原 SDS-PAGE 电泳鉴定

2.3 干式荧光发光法 TP 总抗体检测技术分析性能评估 通过对 120 例经酶联免疫法检测确认为阴性的健康人群血清样本的检测,确定本研究干式荧光发光法 TP 抗体检测技术的 Cut-off 值为 0.172。以本研究技术检测梅毒螺旋体抗体快速试剂国家参

考品,结果见表 1。10 份阳性参考品检测均为阳性,符合率为 10/10; 20 份阴性参考品检测 19 份为阴性,符合率为 19/20; 三批产品的批内重复性分别为 12.00%, 12.30% 和 9.10%, 批间重复性为 10.90%, 均 $\leq 20\%$; 3 份最低检测限参考品 L1 和 L2 检测为阳性, L3 检测为阴性, 以上各项均符合国家参考品检测要求。

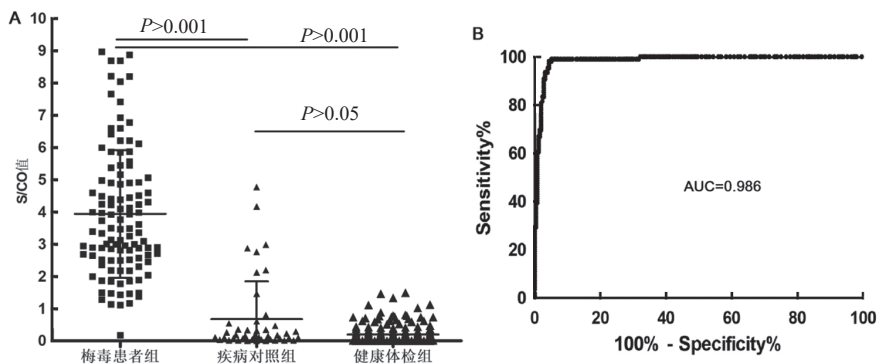
2.4 临床应用评价

2.4.1 临床样本检测:采用本研究所建立的干式荧光发光法 TP 总抗体检测技术对 360 例临床样本进行检测,结果见图 3。两组间方差分析显示,梅毒患者血清中抗 TP 总抗体水平 (S/CO: 3.942 ± 1.980) 与其它疾病对照组和健康对照组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 其它疾病对照组 (S/CO: 0.676 ± 1.169) 与健康对照组 (S/CO: 0.199 ± 0.275) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以临床诊断为金标准,根据 ROC 曲线,本研究检测技术诊断梅毒患者的 AUC 值为 0.986 (95% CI: 0.975~0.996), S/CO=1 为临界值,检测敏感度为 99.08% (95% CI: 94.99%~99.98%) (108/109), 特异度为 94.02% (95% CI: 90.37%~96.63%) (236/251); 阳性预

测值为 87.80%，阴性预测值为 99.58%；阳性似然比为 16.569，阴性似然比为 0.009 8。

表 1 梅毒螺旋体抗体快速试剂国家参考品检测结果

阳性参考品		阴性参考品				重复性参考品 CV			最低检出限参考品	
编号	S/CO	编号	S/CO	编号	S/CO	批次 1	批次 2	批次 3	编号	S/CO
P1	3.447	N1	0.132	N11	0.106	2.737	3.114	3.156	L1	2.726
P2	3.429	N2	0.139	N12	0.116	2.625	2.544	2.702	L2	1.684
P3	2.463	N3	1.037	N13	0.136	2.720	3.063	3.122	L3	0.105
P4	3.362	N4	0.131	N14	0.113	2.597	2.862	3.255		
P5	1.873	N5	0.118	N15	0.046	2.976	3.014	3.240		
P6	2.720	N6	0.105	N16	0.052	2.622	2.462	2.952		
P7	3.007	N7	0.193	N17	0.048	2.968	2.507	2.634		
P8	4.933	N8	0.157	N18	0.022	3.725	2.673	3.085		
P9	2.951	N9	0.202	N19	0.023	3.203	3.629	3.009		
P10	2.619	N10	0.138	N20	0.028	3.131	2.934	2.747		



A. 散点图; B. ROC 曲线图, 其中 AUC 值为曲线下面积

图 3 干式荧光发光法 TP 总抗体检测技术检测性能

2.4.2 干式荧光发光法与酶联免疫法比较: 见表 2。平行检测 360 例临床样本, 以酶联免疫法试剂检测结果为参考标准, 干式荧光发光法与酶联免疫法的阳性符合率为 96.77% (120/124), 阴性符合率为 98.73% (233/236), 总体符合率为 98.06% (353/360), 两种方法检测结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Kappa 指数为 0.965, 表明两种方法具有高度一致性。

表 2 360 例临床样本的平行检测结果

干式荧光发光法	酶联免疫法					
	梅毒患者组		疾病对照组		健康体检组	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	108	0	8	0	4	3
阴性	1	0	1	35	2	198
合计	109	0	9	35	6	201

3 讨论

准确快速地检测梅毒对于临床输血安全以及传染病防控具有重要作用。传统的梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验虽然是梅毒螺旋体抗体检测金标

准, 但由于天然抗原不易获得造成试剂昂贵, 限制了其在临床上的应用^[6,8]。近年来, 采用基因重组技术制备的 TP 抗原逐渐代替天然抗原, 基于重组抗原建立起来的酶联免疫法、化学发光法、胶体金免疫层析法等检测技术也在临床上得到广泛应用^[9-11]。

梅毒螺旋体抗原中 TP47, TP17 和 TP15 三个脂蛋白具有较强的抗原性。TP47 被认为是梅毒螺旋体丰度最高、免疫性最强和特异度最好的抗原, TP17 和 TP15 虽然含量较低, 但无论在人体内还是动物实验都表明具有很强的免疫原性, 单独或联合作为包被抗原表现出较好的敏感度和特异度^[12-14]。在本研究中所采用高活性优势表位嵌合 TP 抗原是经过 B 细胞表位分析预测确定 TP47, TP17 和 TP15 的优势表位区段, 并将其串联融合表达为涵盖三种抗原优势表位的嵌合抗原, 既保持了抗原的大部分活性表位, 又去除了 TP47 中和人纤维蛋白存在较高同源性的区段。本研究基于此抗原所建立的干式荧光发光法 TP 总抗体快速检测技术检测国家参考品, 阳性参考品、阴性参考品、最低检出限和重复性检

测结果均符合要求。在临床性能评价中,以临床诊断为金标准,ROC曲线分析显示本研究技术具有较高检测性能,但特异度有待进一步提高。

本研究的干式荧光发光法 TP 总抗体快速检测技术基于免疫层析和荧光发光平台,采用双抗原夹心法原理设计。将该检测技术与临床广泛使用的酶联免疫法检测试剂相比较,具有高等效性。但是本研究检测技术仅需一步检测,可在 15 min 内获得结果,简便快捷,检测时间显著缩短,更加适合术前快速检测的要求。与胶体金免疫层析技术相比,敏感度更高,荧光信号通过设备读取,保证结果的准确性、客观性,容易进行实验室质控,避免了人为判断的误差^[15]。因此,本研究检测技术是一种敏感度和特异度均高的现场快速简便的检测方法,能够满足临床检测需要。

参考文献:

- [1] GHANEM K G, RAM S, RICE P A. The modern epidemic of syphilis[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(9): 845-854.
- [2] WONG N S, HUANG Shujie, ZHENG Heping, et al. Stages of syphilis in South China – a multilevel analysis of early diagnosis[J]. BMC Public Health, 2017, 17(1): 135.
- [3] PEELING R W, MABEY D, KAMB M L, et al. Syphilis[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2017, 3: 17073.
- [4] 王可玲, 于艳妮, 刘鹏. 梅毒的临床分期特征及其实验室检测方法 [J]. 医学信息, 2020, 33(6): 27-30.
WANG Keling, YU Yanni, LIU Peng. Clinical staging characteristics of syphilis and its laboratory detection methods [J]. Medical Information, 2020, 33(6): 27-30.
- [5] WANG Kedi, XU Dongjiang, SU Jianrong. Preferable procedure for the screening of syphilis in clinical laboratories in China[J]. Infectious Diseases (London, England), 2016, 48(1): 26-31.
- [6] 王欣俞, 赵晋文, 张延海, 等. 四种梅毒血清学检测方法在梅毒抗体不确定样本的分析及评价 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(3): 109-111, 114.
WANG Xinyu, ZHAO Jinwen, ZHANG Yanhai, et al. Analysis and evaluation of four syphilis detection methods in uncertain samples of syphilis antibody [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(3): 109-111, 114.
- [7] 金晶, 潘玥, 边春红, 等. 梅毒螺旋体特异性抗体试验方法探讨及临床应用价值评估 [J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(1): 27-31.
JIN Jing, PAN Yue, BIAN Chunhong, et al. An evaluation of *Treponema pallidum* specific antibody test method and its clinical application value [J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2021, 28(1): 27-31.
- [8] 谢广澍. 梅毒螺旋体抗体血清学检测方法 [J]. 医疗装备, 2019, 32(14): 39-40.
XIE Guangshu. Serological methods for detection of *Treponema pallidum* antibody [J]. Chinese Journal of Medical Device, 2019, 32(14): 39-40.
- [9] 杨浩, 蒙国煌, 张洪福, 等. 不同梅毒检验方法检测梅毒螺旋体准确率比较 [J]. 现代诊断与治疗, 2018, 29(10): 1529-1530.
YANG Hao, MENG Guohuang, ZHANG Hongfu, et al. Comparison of different syphilis examination methods for detection of *Treponema pallidum* accuracy[J]. Modern Diagnosis and Treatment, 2018, 29(10): 1529-1530.
- [10] 蓝蔚蔚, 陈颖, 蓝海鹰. 不同检测法对血清梅毒螺旋体抗体的检测价值 [J]. 现代实用医学, 2020, 32(5): 479-481.
LAN Weiwei, CHEN Ying, LAN Haiying. Clinical value comparison of different methods for the detection of serum *Treponema pallidum* antibody [J]. Modern Practical Medicine, 2020, 32(5): 479-481.
- [11] 赖玉玲, 黄丽芳, 雷兴. 时间分辨荧光免疫法检测梅毒螺旋体抗体的临床应用研究 [J]. 中国医药科学, 2019, 9(7): 111-115.
LAI Yuling, HUANG Lifang, LEI Xing. Research on clinical application of time-resolved fluorescence immunoassay for detection of *Treponema pallidum* antibody[J]. China Medicine and Pharmacy, 2019, 9(7): 111-115.
- [12] 王欣俞, 崔凯, 赵晋文, 等. 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 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 82-85, 89.
WANG Xinyu, CUI Kai, ZHAO Jinwen, et al. Evaluation of the application of immunoblotting method for the detection of TPN15, TPN17, TPN45 and TPN47 antibodies in the diagnosis of syphilis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(6): 82-85, 89.
- [13] 雷雪, 林勇平, 向波, 等. 多表位融合蛋白对减少梅毒抗体测定假反应性的作用 [J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(2): 197-201.
LEI Xue, LIN Yongping, XIANG Bo, et al. Effect of multi-epitope fusion protein for resolving false reactivity in syphilis antibody test[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2021, 42(2): 197-201.
- [14] MCGILL M A, EDMONDSON D G, CARROLL J A, et al. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(6): 2631-2643.
- [15] 谭玉华, 雷泽洪, 郑丹, 等. 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 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 97-100.
TAN Yuhua, LEI Zehong, ZHENG Dan, et al. Evaluation of double antigen sandwich time-resolved fluoroimmunoassay for specific total antibodies to *Treponema pallidum* [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(2): 97-100.

收稿日期: 2021-05-10

修回日期: 2021-07-06