



# 免疫层析法在性传播感染即时诊断中的应用

隗慧林, 蒋法兴, 徐峰, 王书崎

**[摘要]** 性传播感染(STIs)给全球特别是发展中国家的公共卫生健康带来严重危害。其中,艾滋病病毒(HIV)、梅毒、沙眼衣原体以及淋球菌危害最大。为了预防和控制 STIs,世界卫生组织(WHO)要求 STIs 的试剂价廉、敏感、特异、使用方便、快速和可靠、无需设备以及普及性强,因此,我们阐述了免疫层析方法在性传播疾病中的应用。

**[关键词]** 性传播疾病,病毒性;早期诊断;免疫法

**[中国图书资料分类号]** R759;R446-39 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-140X(2012)04-0001-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-140X.2012.04.001

## Application of Immunographic Assays for Point-of-Care Diagnosis of Sexually Transmitted Infections

WEI Hui-lin<sup>1</sup>, JIANG Fa-xing<sup>2</sup>, XU Feng<sup>3,4</sup>, WANG Shu-qi<sup>5</sup> (1. Brunswick Inc, Southborough 01772, U. S. A; 2. Anhui Provincial Hospital, Dermatology, Hefei 230001, China; 3. The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University School of Life Science and Technology, Xi'an 710049, China; 4. Biomedical Engineering and Biomechanics Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 5. Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Cambridge 02139, U. S. A)

**[Abstract]** Sexually transmitted infections (STIs) such as HIV, syphilis, chlamydia trachomatis and gonorrhea confront serious threat to public health, especially in developing countries. To prevent and control of STIs, the WHO has outlined the criteria for developing rapid STI diagnostics, which are affordable, sensitive, specific, user friendly, rapid and robust, equipment-free and deliverable. Here, we reviewed the latest advances in immunographic assays for diagnosis of STIs.

**[Key words]** Sexually transmitted diseases, viral; Early diagnosis; Immunization

性传播感染 (sexually transmitted infections, STIs) 是发达国家和发展中国家均面临的一个公共卫生问题。2005 年世界卫生组织 (WHO) 估计全球 15~49 岁的成年人中可治愈的 STIs (梅毒、淋病、衣原体、人乳头瘤样病毒、生殖器疱疹和阴道毛滴虫) 每年新发病例为 4.48 亿例<sup>[1]</sup>。这一数据不包括艾滋病等对个人和社区造成持续不良影响的 STIs。某些 STIs (如淋球菌感染和/或衣原体感染) 有很大比

例的无症状病例,但会导致严重并发症(如不孕、盆腔炎、异位妊娠、宫颈癌、新生儿先天性疾病和围产期感染等)。未经治疗的 STIs (造成/不造成溃疡的 STIs) 感染传播艾滋病病毒 (HIV) 的风险会增加 10 倍<sup>[1]</sup>。由于 HIV 感染的潜伏期长,且此类人群对自身感染状况无意识,从而促进 HIV 在普通人群中的传播<sup>[2]</sup>。因此,早期诊断对控制 STIs 传播、治疗以及降低 HIV 感染的风险至关重要。鉴于即时诊断在控制与预防 STIs 中的重要性,本文综述了横流形式的免疫层析法在 STIs 即时诊断中的应用及最新进展。

## 1 概述

STIs 传统诊断方法是实验室检测。为达到早期诊断目的,WHO 已经提出了 ASSURED 标准<sup>[3]</sup>。具体包括:价廉 (affordable),敏感 (sensitive),特异 (specific),使用方便 (user friendly),快速和可靠 (rapid and robust),无需设备 (equipment free),以及普及性强 (deliverable)。相比较而言,传统诊断的“金标准”,即病原体培养,因分析费用高,周期长,对技术人员和检测设备要求高,而无法达到即时诊断 (point-of-care) 的目的。早期的快速诊断实验包括乳胶或其他颗粒凝集技术,而近年来的快速诊断

基金项目:国家杰出青年自然科学基金项目 (10825210);国家重大国际(地区)合作研究项目 (11120101002);国家自然科学基金海外青年学者合作研究基金 (31050110125);高等学校学科创新引智计划项目 (111 计划, B06024)

作者单位:01772 Southborough, Brunswick Inc. U. S. A (隗慧林);230001 合肥,安徽省省立医院皮肤科(蒋法兴);710049 西安,西安交通大学生命科学与技术学院,生物医学信息工程教育部重点实验室(徐峰);710049 西安,西安交通大学生物医学工程和生物力学中心(徐峰);02139 Cambridge, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School. U. S. A (王书崎)

通讯作者:徐峰, E-mail: fengxu@mail. xjtu. edu. cn; 王书崎, E-mail: swang24@rics. bwh. harvard. edu

实验大多采用基于横流形式的免疫层析法 (lateral flow immunochromatography)。该方法将相关液体试剂 (抗原或抗体、酶或有色粒子如胶体金、胶体硒等) 加载到滤纸和各种微孔膜的吸水材料内, 并干燥。多数免疫层析检测时间为 10~30 min, 并且无需实验室装备。医务人员可通过观察向患者解释检测结果。根据不同的生产商和样本量, 检测所需的标本量为 10~50  $\mu\text{l}$ 。有些检测试剂无需冷藏且保质期长, 更适于在资源匮乏地区使用。免疫层析法对快速诊断和治疗 STIs 有重要的临床意义, 具有快速、敏感、价廉的优点, 同“金标准”相比准确性好、结果重复性好。目前, 免疫层析法已广泛应用于艾滋病、梅毒、淋病以及衣原体等 STIs 的快速诊断。尽管最新的量子点 (quantum dots) 能够提高灵敏度<sup>[4,6]</sup>, 但该方法依赖于荧光检测设备, 因此不适于基层医院以及现场筛查。

## 2 免疫层析法在 STIs 即时诊断中的应用

### 2.1 艾滋病

艾滋病是目前危害人类健康的重大传染病之一, 主要通过性传播、母婴传播和血液传播。截至 2010 年底, 在世界范围内已有 6000 万人感染 HIV-1, 其中 2500 万人已死亡<sup>[7]</sup>。虽然抗反转录病毒疗法能够有效控制 HIV 在患者体内的扩增并延缓发病时间, 但耐药株最终能够逃避药物控制, 而导致患者死亡。该病发病体征不明显, 潜伏期长, 造成 HIV 广泛传播, 给疾病防疫部门带来前所未有的挑战。目前广泛采用的策略是早期诊断、早期治疗, 延缓发作时间, 提高人群对该病的认识, 从而减少传播<sup>[8,9]</sup>。在现场调查中, 应用最为广泛的诊断方法是免疫层析法。该方法主要用来检测 HIV 特异性抗体和 HIV 自身组分 (p24 蛋白)。见表 1。

表 1 美国食品药品监督管理局批准艾滋病毒快速诊断试剂

快速诊断试剂	标本类型	灵敏度 (%)	特异性 (%)
OraQuick	唾液	99.3	99.8
	指尖血或静脉血	99.6	100.0
	血浆	99.6	99.9
Uni-Gold	指尖血或静脉血	100.0	99.7
	血清或血浆	100.0	99.8
Reveal G-3	血清	99.8	99.1
	血浆	99.8	98.6
MultiSpot	血清	100.0	99.9
	血浆	100.0	99.9
	血清或血浆	99.7	99.9
Clearview STAT-PAK	指尖血或静脉血	99.7	99.9
	血清或血浆	99.7	99.9
Clearview COMPLETE	指尖血或静脉血	99.7	99.9
	血清或血浆	99.7	99.9

注: 摘自美国疾病预防控制中心报告<sup>[10]</sup>

免疫层析法准确、快速且价廉, 但诊断 HIV 早期感染比较困难<sup>[11]</sup>。HIV 特异性抗体通常是在感染后 3~8 周才能被检测出来, 甚至推迟到感染后半年。所以, HIV 免疫层析法检测阳性的患者, 还需经免疫印记法进行确诊。同时, 该方法对诊断经母婴传播感染的婴幼儿 (<18 个月) 无效, 因为 HIV 感染的孕妇体内的 HIV 特异性抗体可通过胎盘进入胎儿体内。相比较而言, HIV 核酸诊断可以在 HIV 感染早期 (大约 1 周后) 得到确诊。

### 2.2 梅毒

梅毒是由苍白 (梅毒) 螺旋体通过性接触和母婴传播引起的慢性、系统性疾病, 在临床具有严重危害性。2008 年中国疾病预防控制中心性病控制中心的调查显示有 9480 例新生儿感染梅毒, 这一数据比五年前增长了 12 倍<sup>[12]</sup>。因此, 在孕产妇中普及梅毒筛查至关重要<sup>[13]</sup>。传统的梅毒检测包括病原学检查 (暗视野显微镜检查), 非特异性血清学检测 [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反应素实验 (TRUST)] 和特异性血清学检测 [梅毒螺旋体血细胞凝集试验 (TPHA) 和梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验 (TPPA)]。在这些方法中, 以快速检测非特异性抗体较常用, 主要用于梅毒初筛和治疗监测, 但其敏感性、特异性较差, 容易造成漏检和误检。目前常用的梅毒确诊实验为特异性抗体检测, 其敏感性和特异性均高, 步骤简单, 15 min 内即可出结果, 且不需特殊仪器设备进行结果读取。梅毒特异性抗体检测的主要缺点为几乎所有梅毒患者均有阳性反应, 即使是非活动性感染也会出现阳性结果。

近年报道的螺旋体快速检测试剂盒有 30 余种, 但是通过美国食品及药物管理局 (FDA) 或欧洲产品认证 (CE) 的很少。这些检测方法中大多数是免疫层析法, 少数为卡片乳胶凝集法。上述方法均采用梅毒螺旋体重组抗原对特异性螺旋体抗体进行检测, 因此结果为特异性的确诊实验, 而不是非特异性的筛查实验。免疫层析法可检测所有抗梅毒抗体的亚型, 包括 IgG、IgM 以及 IgA 抗体。不仅可以诊断晚期感染, 对早期感染也可以快速确诊。其中 IgM 的测定是早期梅毒及先天性梅毒诊断的重要指标。重组梅毒螺旋体抗原血清检测比全血检测敏感性更高、特异性更强, 适用于性传播疾病 (STD) 门诊的梅毒检测。在梅毒低患病率区, 免疫层析法可用作筛查实验以明确对患者进行预防性治疗, 但是免疫层析法检测阳性的病例需要用非螺旋体抗体检测 (如 RPR/VDRL 方法) 加以确认, 必要时须采用暗视野

观察法 (DFM) 确诊。

为实现梅毒感染的早期诊断,刘爱英等<sup>[14-15]</sup>建立了聚合酶链反应 (PCR) 以及基因芯片等方法。在 65 例临床标本中,PCR 检查阳性 54 例 (83.1%), TPPA 检查阳性 52 例 (80.0%), 而暗视野显微镜检查阳性仅 40 例 (61.5%)。统计学分析显示 PCR 检测结果与暗视野显微镜检查结果比较,差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与 TPPA 检查结果比较,差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。因此,PCR 可特异地检测梅毒螺旋体,并具有较好的敏感性。但 PCR 和基因芯片方法不适合即时检测的需求。最近, Yang 等<sup>[5]</sup>报道量子点标记免疫层析法,以提高检测敏感性。结果显示以量子点为基础的免疫层析法比金标免疫层析法的检测灵敏度提高了 10 倍。在 50 份梅毒阳性标本和 50 份健康人群标本中,量子点标记免疫层析法的敏感度和灵敏度均达到了 100%; 金标免疫层析法的敏感度和灵敏度分别是 82% 和 100%。

**2.3 奈瑟淋球菌和生殖道沙眼衣原体** 奈瑟淋球菌 (*neisseria gonorrhoeae*, NG) 和生殖道沙眼衣原体 (*nhlamydia trachomatis*, CT) 是引起淋球菌性尿道炎和非淋球菌性尿道炎的常见病原体。约 70% 女性生殖道 CT 感染者表现为无症状感染,难以及时诊断和治疗<sup>[16]</sup>。目前确诊淋病的医技检查主要是分泌物涂片找革兰染色阴性的双球菌及淋球菌培养。涂片法对男性患者的敏感性和特异性均较高,但对女性宫颈分泌物的检测则特异性较差。淋病诊断的金标准是淋球菌培养。但是淋球菌培养需要较为严格的实验室条件、特殊的培养基和 2~3 d 的培养时间。CT 感染诊断金标准是培养法,其特异性高,但是也同样存在受培养时间所限不能做到快速诊断的缺点。

由于胶体金免疫层析诊断试剂方法操作简单,并可以快速得到结果 (<30 min),也可应用于淋球菌的快速诊断。Alary 等<sup>[17]</sup>在 1084 名女性中测试了一种淋球菌的快速检测试剂,与核酸检测方法相比较,其灵敏度和特异性分别为 70.0% 和 97.2%。提示这种淋球菌快速检测试剂如在发病率较高的人群中应用可明显减少过度治疗,进而减少耐药菌种的出现。最近, Samarawickrama 等<sup>[18]</sup>报道了一种针对 L7/L12 核糖蛋白的快速诊断试剂。虽然这种试剂可以检测到 99.4% 的 NG 菌株,但该试剂对 NG 菌株的最低检测浓度是  $6.4 \times 10^5$  CFU/ml。并且,该试剂与 6 种奈瑟脑炎菌株有交叉反应。

目前,免疫层析法在诊断 CT 感染的价值仍有待进一步提高。在一个多中心、大样本的临床调查

中, Yin 等<sup>[19]</sup>发现 Clearview 衣原体试剂盒在检测灵敏度方面明显低于核酸扩增方法,因而不能为临床诊疗提供指导。在募集的 1497 例女性性病患者中,核酸检测确诊 197 例感染患者, Clearview 衣原体试剂检测出的阳性阴道标本仅 78 例,检测出的阳性宫颈标本 127 例。在该研究中, Clearview 衣原体试剂在检测阴道和宫颈标本的灵敏度分别为 32.8% 和 49.7%, 与之相匹配的特异性分别为 99.2% 和 97.9%。另外一项研究也发现, Clearview 衣原体试剂的敏感性较差; 在检测 CT 感染的灵敏度为 32.73%, 诊断 CT 感染的准确度为 53.74%<sup>[20]</sup>。在英国的一项研究表明,新研发的衣原体快速检测试剂灵敏度和特异性可以达到 83.5% 和 98.9%<sup>[21]</sup>。

### 3 前景展望

免疫层析法在技术上已获得极大提高,因而在 STIs 的临床诊断和预防中具有重大作用,因其操作简单、快捷、成本低,所以该方法非常适用于现场调查,满足及时诊断的需求。但由于临床样本复杂,不彻底治疗可造成病原体变异、载量过低,需要进一步发展新的生物标记物和提高样本处理效率及免疫层析法的敏感性和特异性<sup>[22-23]</sup>。随着分子生物学技术的发展,PCR 等核酸扩增方法已逐渐应用到 STIs 临床诊断<sup>[24-29]</sup>。但是核酸扩增方法经常受制于有限的研究费用,以及匮乏的实验室条件和操作人员的熟练度,而不能在咨询现场和门诊做出快速诊断。因此需要大力发展能在临床现场实现的核酸诊断方法,以提高 STIs 的诊疗和预防水平。

### [参考文献]

- [1] WHO. Sexually transmitted infections [EB/OL]. [2012-2-27]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>.
- [2] Marks G, Crepaz N, Janssen R S. Estimating sexual transmission of HIV from persons aware and unaware that they are infected with the virus in the USA [J]. AIDS, 2006, 20(10):1447-1450.
- [3] Peeling R W, Holmes K K, Mabey D. Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward [J]. Sex Transm Infect, 2006, 82(Suppl 5):v1-v6.
- [4] Wang S Q, Ip A, Xu F, et al. Development of a microfluidic system for measuring HIV-1 viral load [Proceedings of SPIE] [EB/OL]. [2012-2-27]. <http://dx.doi.org/10.1117/12.853132>.
- [5] Yang H, Li D, He R, et al. A Novel quantum dots-based point of care test for syphilis [J]. Nanoscale Research Letters, 2010, 5(5):875-881.
- [6] Kim Y G, Moon S, Kuritzkes D R, et al. Quantum dot-based HIV capture and imaging in a microfluidic channel

- [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25(1):253-258.
- [7] Who, Unaid, Unicef. Global HIV/AIDS response: epidemic update and health sector progress towards universal access[EB/OL]. [2012-2-27]. [http://www.who.int/hiv/pub/progress\\_report2011/en/](http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/).
- [8] Cohen M S, Chen Y Q, McCauley M, *et al.* Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(6):493-505.
- [9] Zhou H Q, Gao S, Wang S Q, *et al.* Collaborating against AIDS: a urban chinese case study of world AIDS day awareness[J]. *Chinese Journal of Sexually Transmitted Infections*, 2004(2):115-118.
- [10] CDC. FDA-Approved Rapid HIV Antibody Screening Tests [EB/OL]. [2012-2-27]. <http://www.cdc.gov/hiv/topics/testing/rapid/rt>.
- [11] Wang S, Xu F, Demirci U. Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings[J]. *Bio-technol Adv*, 2010, 28(6):770-781.
- [12] 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.
- [13] Tucker J D, Bu J, Brown L B, *et al.* Accelerating worldwide syphilis screening through rapid testing: a systematic review[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(6):381-386.
- [14] 刘爱英, 尹跃平, 孙建方, 等. 聚合酶链反应对一期梅毒患者的诊断[J]. *临床皮肤科杂志*, 2004, 33(7):413-415.
- [15] 刘爱英, 孙建方, 尹跃平, 等. 基因芯片技术检测生殖器溃疡性性病病原体[J]. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37(5):265-267.
- [16] Molano M, Meijer C J, Weiderpass E, *et al.* The natural course of chlamydia trachomatis infection in asymptomatic colombian women: a 5-year follow-up study[J]. *J Infect Dis*, 2005, 191(6):907-916.
- [17] Alary M, Gbenafa Agossa C, Aina G, *et al.* Evaluation of a rapid point-of-care test for the detection of gonococcal infection among female sex workers in benin[J]. *Sexually Transmitted Infections*, 2006, 82:29-32.
- [18] Samarawickrama A, Alexander S, Ison C. A laboratory-based evaluation of the biostar optical immunoassay point-of-care test for diagnosing neisseria gonorrhoeae infection[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60(12):1779-1781.
- [19] Yin Y P, Peeling R W, Chen X S, *et al.* Clinic-based evaluation of clearview chlamydia MF for detection of chlamydia trachomatis in vaginal and cervical specimens from women at high risk in china[J]. *Sexually Transmitted Infections*, 2006, 82(5):33-37.
- [20] 朱德保, 潘鹏, 蔡于茂, 等. Clearview CT 快速诊断女性生殖道沙眼衣原体感染的评价[J]. *岭南皮肤性病科杂志*, 2006, 13(4):282-284, 290.
- [21] Mahilum Tapay L, Laitila V, Wawrzyniak J J, *et al.* New point of care chlamydia rapid test-bridging the gap between diagnosis and treatment: performance evaluation study[J]. *British Medical Journal*, 2007, 335(7631):1190-1194.
- [22] 王书崎, 尹跃平, 余艳华, 等. TOPO 定向克隆和表达 II 型单纯疱疹病毒 gG 基因的免疫优势表位片段[J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(5):288-290.
- [23] Coseo S E, Porras C, Dodd L E, *et al.* Evaluation of the polyclonal ELISA HPV serology assay as a biomarker for human papillomavirus exposure[J]. *Sexually Transmitted Diseases*, 2011, 38(10):976-982.
- [24] 徐敏, 尹跃平, 余艳华, 等. PCR 在阴道毛滴虫检测中的引物筛选和条件优化[J]. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37(10):603-605.
- [25] 蒋明军, 王书崎, 余艳华, 等. 人乳头瘤病毒 cp6108 的序列研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(9):543-545.
- [26] 蒋明军, 王书崎, 龚向东, 等. 尖锐湿疣皮损中人乳头瘤病毒基因分型研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(5):262-264.
- [27] Palmer H M, Higgins S P, Herring A J, *et al.* Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the united kingdom[J]. *Sexually Transmitted Infections*, 2003, 79(6):479-483.
- [28] Tang N, Huang S, Salituro J, *et al.* A real time HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples[J]. *J Virol Methods*, 2007, 146(1-2):236-245.
- [29] Levett P N, Brandt K, Olenius K, *et al.* Evaluation of three automated nucleic acid amplification systems for detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae in first-void urine specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(6):2109-2111.

(收稿时间:2012-02-27 修回时间:2012-03-09)

下期栏目预告:基础研究,临床研究,临床药学,检验与病理,影像医学,护理园地,病例报告等。