|  |  |
| --- | --- |
| ICS |  |
| CCS | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
|  |

中华人民共和国卫生行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

代替 WS/T 491-2016

梅毒非特异性抗体检测操作指南

Guidelines for Non-treponemal Tests for Syphilis

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

（本草案完成时间：20211031）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

       发布

目次

[前言 III](#_Toc86653433)

[1 范围 1](#_Toc86653434)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc86653435)

[3 术语和定义 1](#_Toc86653436)

[3.1 前带现象 1](#_Toc86653437)

[3.2 贾-赫反应 1](#_Toc86653438)

[3.3 血清固定 1](#_Toc86653439)

[4 缩略语 2](#_Toc86653440)

[5 检测原理 2](#_Toc86653441)

[5.1 原理 2](#_Toc86653442)

[5.2 方法 2](#_Toc86653443)

[6 标本采集和样品处理 2](#_Toc86653444)

[6.1 标本采集器 2](#_Toc86653445)

[6.2 静脉血液采集 2](#_Toc86653446)

[6.3 CSF采集 3](#_Toc86653447)

[6.4 标本验收 3](#_Toc86653448)

[6.5 样品容器 3](#_Toc86653449)

[6.6 样品保存 3](#_Toc86653450)

[7 仪器和器材 3](#_Toc86653451)

[7.1 水平旋转仪 3](#_Toc86653452)

[7.2 反应板 4](#_Toc86653453)

[7.3 微量移液器 4](#_Toc86653454)

[7.4 抗原专用滴针 4](#_Toc86653455)

[8 试验操作步骤 4](#_Toc86653456)

[8.1 总述 5](#_Toc86653457)

[8.2 RPR/TRUST-定性试验 5](#_Toc86653458)

[8.3 RPR/TRUST-半定量试验 5](#_Toc86653459)

[8.4 VDRL试验 5](#_Toc86653460)

[9 结果描述和表示 6](#_Toc86653461)

[9.1 定性试验 7](#_Toc86653462)

[9.2 半定量试验 7](#_Toc86653463)

[9.3 报告格式 7](#_Toc86653464)

[10 质量控制 7](#_Toc86653465)

[10.1 基本要求 8](#_Toc86653466)

[10.2 试剂的检测性能验证 8](#_Toc86653467)

[10.3 对照品 8](#_Toc86653468)

[10.4 质控物 8](#_Toc86653469)

[10.5 反应板 9](#_Toc86653470)

[10.6 专用滴针 9](#_Toc86653471)

[10.7 结果判定 9](#_Toc86653472)

[10.8 室内质量控制和室间质量评价 10](#_Toc86653473)

[11 临床意义 10](#_Toc86653474)

[11.1 检测策略 10](#_Toc86653475)

[11.2 辅助诊断 10](#_Toc86653476)

[11.3 疗效监测和临床意义 10](#_Toc86653477)

[12 局限性 11](#_Toc86653478)

[12.1 概述 11](#_Toc86653479)

[12.2 假阳性反应 11](#_Toc86653480)

[12.3 假阴性反应 11](#_Toc86653481)

[12.4 前带现象 11](#_Toc86653482)

[12.5 血清固定 11](#_Toc86653483)

[12.6 血浆样品 11](#_Toc86653484)

[附录A（规范性附 录） 抗干扰性能初步评估 12](#_Toc86653485)

[A.1 干扰物质来源 12](#_Toc86653486)

[A.2 获取抗干扰信息方式 12](#_Toc86653487)

[附录B（规范性附 录） 抗干扰性能评估—验证厂家声明 13](#_Toc86653488)

[B.1 基本要求 13](#_Toc86653489)

[B.2 验证真空采集器的抗干扰能力 13](#_Toc86653490)

[B.3 验证试剂的抗干扰能力 13](#_Toc86653491)

[B.4 判断标准 13](#_Toc86653492)

[附录C（规范性附 录） 水平旋转仪关键技术参数 1](#_Toc86653493)

[C.1 基本参数 1](#_Toc86653494)

[C.2 组合反应程序 1](#_Toc86653495)

[参考文献 2](#_Toc86653496)

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：上海市皮肤病医院、复旦大学附属中山医院、厦门大学附属中山医院、华中科技大学同济医学院附属同济医院、上海市临床检验中心、四川大学华西医院、第四军医大学西京医院、中国疾病预防控制中心性病控制中心、北京大学第一医院、中国医科大学附属第一医院。

本文件主要起草人：顾伟鸣、郭玮、杨天赐、孙自镛、王庆忠、陶传敏、刘家云、尹跃平、冯珍如、赵敏。

本标准代替WS/T 491-2016《梅毒非特异性抗体检测操作指南》。与WS/T 491-2016相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

本次修订增加了“规范性引用文件”和“质量控制”，在“术语和定义”章节增加前带现象和贾-赫反应，在“仪器和器材”章节增加水平旋转仪固定反应程序，在“实验操作步骤”章节增加脑脊液样品的检测，在“结果描述和表示”章节增加报告格式，在“临床意义”部分增加检测策略，在附录C中增加水平旋转仪关键技术参数等。更改了标本采集和样品处理的部分条款，并删除缩略语中转速条款。

梅毒非特异性抗体检测操作指南

* 1. 范围

本标准规定了梅毒非特异性抗体检测的方法、试验操作步骤、结果描述与表示、结果解释、质量控制、临床意义、实验方法的局限性等。适用于定性和半定量试验对血清、脑脊液样品的检测。血浆样品在特殊情况下仅可以用于定性试验的检测，不适合半定量试的检测。

本标准适用于开展梅毒非特异性抗体检测的各类实验室。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB19489 实验室生物安全通用要求

GBT 22576.5-2021 医学实验室 质量和能力的要求 第5部分：临床免疫学检验领域的要求

WS/T 494-2017 临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求

WS/T 505-2017 定性测定性能评价指南

WS/T 641-2018 临床检验定量测定室内质量控制

WS/T 644-2018 临床检验室间质量评价

WS/T 661-2020 静脉血液标本采集指南

CNAS-RL02 能力验证规则

CNAS-CL02-A001：2021 医学实验室质量和能力认可准则的应用说明

JJG 646-2006 移液器鉴定规程

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

* + 1. 前带现象

前带现象（prozone phenomenon）一种特殊的抗原-抗体免疫反应现象。当患者的抗体过剩，所形成的免疫复合物反而减少，而不出现凝集的反应现象。

1. 部分现症患者的梅毒非特异性抗体检测发生前带现象。梅毒患者有特征性的临床表现。其血清样品的定性试验可显示阴性反应性、或弱反应性，血清经过梯度系列倍比稀释后，半定量试验的凝集反应由弱到强、再逐步减弱的现象。可见于二期梅毒、一期梅毒、晚期梅毒等。
2. 梅毒非特异性抗体检测报告中应提示该样品检测存在前带现象，以减少医疗风险。
   * 1. 贾-赫反应

贾-赫反应（Jarisch-Herxheimer reaction）指在第一次抗梅毒治疗后24小时内，其症状反应加重。这是由于抗梅毒药物杀灭了大量梅毒螺旋体，而释放大量异种蛋白及内毒素，被患者吸收后在病损处或体内发生的剧烈反应。

1. 有贾-赫反应的患者，首次治疗可能带来医疗风险。
2. 有前带现象的现症梅毒患者，更容易发生贾-赫反应。
   * 1. 血清固定

血清固定（serofast）少数患者经过规范驱梅治疗后，其梅毒非特异性抗体维持在相对恒定的低滴度状态。

1. 判断血清固定，应具备3个要素：流行病学病史和临床表现排除复发、再感染；连续2个随访周期（≥6月），血清抗体维持在±1滴度范围之内的低滴度水平（一般≤1:8），即变化趋势不明；无实验室的技术性和方法学误差。
2. 血清固定主要发生在晚期潜伏梅毒患者，发生率达35.2 %至44.4 %，个别患者可终生维持血清固定现象。
   1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

VDRL： 性病研究实验室试验（venereal disease research laboratory test）

RPR： 快速血浆反应素环状卡片试验（rapid plasma reagin circle card test）

TRUST： 甲苯胺红不加热血清试验（toluidine red unheated serum test）

CSF： 脑脊液（cerebrospinal fluid）

r/min： 每分钟转速（revolutions per minute）

s/min 每分钟秒（seconds per minute）

* 1. 检测原理
     1. 原理

感染梅毒螺旋体后，被损害的宿主细胞及梅毒螺旋体本身释放的类脂物质，引起宿主产生IgM和IgG抗类脂质抗体。这类抗体在体外与含心磷脂、卵磷脂和胆固醇的抗原溶液发生反应，产生絮状凝集现象，凝集的强弱程度与抗体浓度成正相关，在一定程度上反映了梅毒螺旋体感染宿主的活动状态。

* + 1. 方法
       1. VDRL

商品化试剂盒包含VDRL抗原、VDRL缓冲液和说明书。

VDRL抗原是含有心磷脂、卵磷脂和胆固醇的无水乙醇溶液。VDRL缓冲液含氯化钠、40％甲醛水溶液（中性）、磷酸氢二钠（无水）和磷酸二氢钾的磷酸盐溶液，pH 6.0±0.1。用缓冲液配制的VDRL抗原工作液与样品中的抗体发生反应，在显微镜下可观察到絮状凝集。

* + - 1. RPR

商品化试剂盒包含抗原、阴性对照品、阳性对照品、抗原专用滴针、反应板和说明书。

RPR是一种改良的VDRL试验，将VDRL抗原结合到作为示踪物质的炭颗粒上，当抗原与样品中的抗体发生反应，肉眼可观察到黑色的凝集颗粒。RPR抗原溶液中添加氯化胆碱起到化学灭活效果，添加EDTA起到稳定试剂性能的作用。

* + - 1. TRUST

商品化试剂盒包含抗原、阴性对照品、阳性对照品、专用滴针、反应板和说明书。

TRUST的检测原理同RPR，将VDRL抗原结合到作为示踪物质的甲苯胺红染色颗粒上，当抗原与样品中的抗体发生反应，肉眼可观察到红色的凝集颗粒。TRUST抗原溶液中所含氯化胆碱和EDTA的作用同RPR。

* 1. 标本采集和样品处理
     1. 标本采集器
        1. 采集血液标本时，宜使用无添加剂或内壁经硅化处理的真空采集器。
        2. 含有添加剂（促凝剂、抗凝剂）的真空采集器，使用前应进行抗干扰性能评估（见附录A和附录B）。
     2. 静脉血液采集
        1. 静脉血液标本的采集和处理参照WS/T 661-2020《静脉血液标本采集指南》的要求进行。
        2. 全血标本在自然凝固、血块充分收缩后，经过离心分离，直接吸取血清进行定性和半定量试验。
        3. 抗凝全血标本在充分混匀后，经过离心分离，直接吸取血浆进行定性试验。
     3. CSF采集
        1. CSF采集遵从临床诊疗操作规范。
        2. 宜使用第二支采集管CSF标本，离心后取上清进行定性和半定量试验。
     4. 标本验收

原则上不合格标本应予以退回。如标本不可替代，在与临床医师和护师充分沟通的情况下进行初步检测，报告中应注明“标本不合格，结果仅供参考”。以下标本状态可干扰检测结果的准确性：

1. 静脉标本出现严重溶血或脂血；
2. CSF标本出现肉眼可见颗粒物质；
3. CSF标本呈现肉眼可辨粉红色，提示标本在采集过程中可能被血液污染（相当于每1 mL CSF含有≥3 μL血液，或含有4×109/L～12×109/L红细胞）。
   * 1. 样品容器
        1. 宜采用密闭、无菌容器。
        2. CSF、血清和血浆可使用玻璃和/或塑料试管保存。
        3. 采集新鲜全血标本时，不应直接注入普通塑料试管，以免血块收缩不良。
     2. 样品保存
        1. 血清、血浆和CSF样品应保存在带盖试管或其他密闭容器中以防止外源性污染、蒸发、泼撒。
        2. 血清和血浆样品在4 h内检测，可置室温存放；如8 h至48 h才检测，应置于2 ℃～8 ℃保存；预计超过48 h才检测应分离血清和血浆后置于-20℃～-80℃冻存。标本不宜反复冻融。
        3. CSF样品在4h内检测，可置室温存放；5个连续检测日内进行检测，可置2 ℃～8 ℃保存。CSF不应冻存。
4. 冻存CSF样品用于VDRL试验会降低检测敏感性。冻存CSF样品用于RPR/TRUST试验结果的影响不明确，需要更多的循证依据。
   1. 仪器和器材
      1. 水平旋转仪
         1. 基本要求
            1. 水平状态转速精度符合100 ±2 r/min或180 ±2 r/min。
            2. 时间控制精度符合±1 s/min的要求。
            3. 电子控制部件可预设试验的固定反应程序。
5. VDRL-血清样品的反应程序：转速180 ±2 r/min；时间4 min±4 s；
6. VDRL-CSF样品的反应程序：转速180 ±2 r/min；时间8 min±8 s；
7. RPR/TRUST反应程序：转速100 ±2 r/min；时间8 min±8 s。
   * + - 1. 试验结束，具有蜂鸣和数显倒计时的双重提醒功能。
8. 水平旋转仪技术参数应符合附录C的规范。
9. 不应使用含有旋钮式调节装置的水平旋转仪进行试验。
10. 不应使用微量振荡器/仪进行试验。
    * + 1. 维护和校准
           1. 每年至少一次对水平旋转仪进行保养和校准，保存相应记录。最大允许误差符合7.1.1.1和7.1.1.2的要求。
           2. 可由生产厂商对水平旋转仪的“转速”和“时间”精度二项指标进行校准，并出具报告。
           3. 可自行制定相应的标准化文件进行日常维护、比对和/或检定，并保存相关记录。
      1. 反应板
         1. RPR/TRUST反应板
            1. 商品化试剂盒中的反应板上有若干个直径18 mm的反应圆圈。
            2. 沿反应圆圈内侧边缘可呈凹面，防止旋转时液体溢出。
         2. VDRL反应板
            1. 宜使用专用VDRL反应板进行试验，替代的纸质反应板应符合7.2.2.2和7..2.2.3的反应圆圈直径和防溢要求。
            2. 用于VDRL-血清样品检测的反应板上有直径14 mm的反应圆圈，沿圆圈边缘的胶漆或陶瓷防溢环可防止旋转时液体溢出，反应孔中间透明，便于直接在显微镜下观察。
            3. 用于VDRL-CSF样品检测的反应板上有直径16 mm的反应圆圈，反应孔中间为深度1.75 mm凹面，防止旋转时液体溢出。
      2. 微量移液器
         1. 基本要求
            1. 梅毒非特异性抗体试验的准确性依赖于抗原滴加量的精度。当试剂盒配套的抗体专用滴针不符合量值标化要求时，宜使用微量移液器。
            2. 宜使用50μL固定式微量移液器，吸取血清、血浆、CSF，及无菌生理盐水。
            3. 宜使用微量移液器吸取和滴加抗原，滴加抗原量应符合7.4.2和（或）7.4.3的技术要求。
         2. 维护和校准
            1. 每年至少一次对微量移液器的使用量程进行校准、日常维护和保养，并保存相关记录。最大允许误差应符合JJG646-2006移液器检定规程。
            2. 可由生产厂商或各级第三方计量机构对微量移液器进行校准，并出具报告。
            3. 可由具有资质的实验室人员按照标准化文件对微量移液器进行内部比对，并保存相关记录。
      3. 抗原专用滴针
         1. 可采用经过校准的专用滴针滴加抗原，专用滴针的内外壁宜经硅化处理。
         2. RPR/TRUST试验进行血清、血浆、CSF样品检测时，专用滴针的每滴抗原量是17μL，或符合59±1滴/mL的技术要求。
         3. VDRL试验进行血清或CSF样品检测时，专用滴针的每滴抗原量是10μL，或符合100±2滴/mL的技术要求。
    1. 试验操作步骤
       1. 总述

如使用商品试剂盒，应遵照商品试剂盒说明书结合所在实验室实际情况编写标准操作程序（SOP），并验证检测性能有效。检测时严格按SOP进行操作。所有试验都应在反应板上做好唯一标记。

* + 1. RPR/TRUST-定性试验

RPR/TRUST定性试验用于梅毒非特异性抗体的筛查。操作步骤如下：

a) 吸取50μL待检血清/血浆/CSF样品、对照品、质控物，每个样品置于反应板上的一个圆圈中；

b) 将样品均匀涂布于整个反应圆圈内；

c) 滴加抗原前，将试剂瓶沿水平方向旋转，确保抗原混匀，再用专用滴针轻缓地吹吸数次，直至抗原充分悬浮，吸入滴管；

d) 弃去针管中第一滴抗原，从第二滴开始向每个样品圈中滴加1滴抗原（17 μL）；

e) 滴加抗原后，立刻将反应板倾斜30°左右旋转数次，使抗原和样品快速混合；

f) 将卡片固定在水平旋转仪夹槽内，启动仪器的反应程序（100 r/min，8 min）；

g) 当仪器停止工作后，3 min内肉眼观察结果；

h) 按照9.1给出的定性试验反应结果的描述作出判断。

1. 涂布样品时移液吸头与卡片的夹角接近30°，避免吸头划破反应板表面防水涂层。
2. 混匀抗原悬液时勿剧烈吹吸。保持垂直状态，以自由落体方式滴加抗原。勿使用最后一滴抗原。针管中的抗原余量不足时，按8.2c)、8.2d)给出的描述重复操作。
3. 定性试验呈阳性反应时，应将样品进行系列倍比稀释后，进行半定量试验。
4. 大样本比对试验显示：采用RPR/TRUST量化体系和程序检测血清/血浆时，其结果与VDRL-CSF检测结果的符合率为97%。在VDRL试剂不可及和/或无合规的情况下，可采用RPR/TRUST替代VDRL对CSF的检测。
   * 1. RPR/TRUST-半定量试验

RPR/TRUST半定量试验用于判定梅毒非特异性抗体相对浓度、和（或）排除前带现象。操作步骤如下：

1. 吸取50 μL生理盐水，分别加至反应板上数个连续的圆圈内；
2. 吸取50 μL待检血清/CSF样品、对照品、质控物，与反应板上第一个圆圈内的生理盐水充分混合，稀释过程中，样品与生理盐水应反复吹吸混匀≥6次，避免产生气泡，不应将样品吹出反应圆圈；
3. 吸取第一个圆圈中倍比稀释的样品50 μL，与反应板上第二个圆圈内的生理盐水充分混合；
4. 重复吸取前一个圆圈的50 μL稀释样品与后一个圆圈中生理盐水混合的操作，至最后一个生理盐水的圆圈充分混合后，吸出50 μL的稀释样品，弃去；
5. 从高稀释度往低稀释度方向，逐一将稀释样品均匀地涂满整个圆圈；
6. 按8.2c)、8.2d)给出的描述和步骤滴加抗原（17 μL）；
7. 按8.2e)和8.2f)给出的描述和步骤启动反应程序；
8. 当仪器停止工作后，3 min内肉眼观察最高稀释度凝聚反应（即9.1.3或9.1.4反应结果的描述）的检测结果作出判断，以“＋”或“±”表示检测结果；
9. 半定量试验应做到最终稀释度。
10. 半定量试验第一圆圈的样品滴度为1:2；第二圆圈的样品滴度为1:4；以此类推。
11. 血浆样品不适合半定量试验。
    * 1. VDRL试验
         1. 配制抗原工作液

在试验前应新鲜配制VDRL抗原工作液。操作步骤如下：

1. 配置抗原工作液前应测定抗原稀释液的pH=6.0±0.1范围，否则试剂失效；
2. 吸取VDRL抗原稀释液0.4 mL，加入容量为30 mL的带盖、底部直径35 mm 的平底玻璃瓶，缓慢倾斜小瓶使VDRL抗原缓冲液覆盖整个瓶底；
3. 吸取VDRL抗原0.5 mL，一边平缓地沿水平方向转动玻璃瓶（以3 r/s的速度绕5 cm的圆周直径旋转），一边在位于玻璃瓶的上1/3处，在6 s内连续地将0.5 mL VDRL抗原逐滴地流入到抗原缓冲液中；
4. 最后一滴抗原滴出后，再持续转动玻璃瓶10 s；
5. 吸取抗原稀释液4.1 mL，沿瓶壁加入（不应直接滴至抗原中）；
6. 盖上瓶盖，10 s内上下颠倒30次，抗原呈均匀悬浮后，即为抗原工作液；
7. 每次试验时平缓地旋转含抗原工作液的小瓶，让抗原均匀悬浮。
8. 新鲜配制的抗原工作液用于血清检测时8h内有效,用于CSF检测时2h内有效。
   * + 1. VDRL定性试验—血清样品

VDRL定性试验用于血清中梅毒非特异性抗体的筛查。操作步骤如下：

1. 血清样品应灭活处理（56 ℃,30 min）,灭活后的血清样品超过4 h检测，应在试验前重新快速灭活处理（56 ℃,10 min）；
2. 吸取50 μL血清，在专用反应板上均匀地涂满整个反应圆圈；
3. 按8.2c)、8.2d)给出的描述和步骤滴加抗原（17 μL）；
4. 将反应板固定在水平旋转仪上，启动仪器的反应程序（180 r/min，4 min）；
5. 当仪器停止工作后，5 min内在显微镜下观察凝集状态（10倍目镜，10倍物镜）；
6. 按照9.1关于定性试验反应结果的描述作出结果判断。
   * + 1. VDRL半定量试验—血清样品

半定量试验用于判定血清中梅毒非特异性抗体相对浓度、和（或）排除前带现象。操作步骤如下：

1. 按8.4.2a)处理血清样品；
2. 按照8.3a)、8.3b)、8.3c)、8.3d)和8.3e)给出的步骤稀释样品；
3. 按8.2c)、8.2d)给出的描述和步骤滴加抗原（17 μL）；
4. 将反应板固定在水平旋转仪上，启动仪器的反应程序（180 r/min，4 min）；
5. 当仪器停止工作后，5 min之内在显微镜下观察最高稀释度出现9.1.3或9.1.4反应结果的描述作出结果判断。
   * + 1. VDRL定性试验—CSF样品

VDRL定性试验用于CSF中梅毒非特异性抗体的筛查。CSF样品不需灭活处理。操作步骤如下：

1. 将上述VDRL抗原工作液与10%盐水按照1:1比例混合后，配制成VDRL-CSF抗原工作液，至少静置5 min以上才可使用，2h内有效；
2. 吸取50 μL CSF，注入专用反应板上的反应圆圈；
3. 按8.2c)、8.2d)给出的描述和步骤滴加VDRL-CSF抗原工作液10 μL；
4. 将反应板固定在水平旋转仪上，启动仪器的反应程序（180 r/min，8 min）；
5. 当仪器停止工作后，5 min内在显微镜下观察凝集状态（10倍目镜，10倍物镜）；
6. 按照9.1给出的定性试验反应结果的描述作出结果判断。
   * + 1. VDRL半定量试验—CSF样品

半定量试验用于判定CSF中梅毒非特异性抗体相对浓度、和/或排除前带现象。操作步骤如下：

1. 按8.3a)、8.3b)、8.3c)、8.3d)和8.3e)给出的步骤稀释样品；
2. 按8.2c)、8.2d)给出的描述和步骤滴加抗原（10 μL）；
3. 将反应板固定在水平旋转仪上，启动仪器的反应程序（180 r/min，8 min）；
4. 当仪器停止工作后，5 min之内在显微镜下观察最高稀释度出现9.1.3或9.1.4反应结果的描述作出结果判断。
   1. 结果描述和表示
      1. 定性试验
         1. 强阳性反应：RPR/TRUST肉眼（VDRL镜下）显见团块状絮状凝集物，悬液背景清亮。以符号“＋＋＋”或“＋＋＋＋”表示；
         2. 阳性反应：RPR/TRUST肉眼（VDRL镜下）显见比较小絮状凝集物，悬液背景较清亮。以符号“＋＋”表示；
         3. 弱阳性反应：RPR/TRUST肉眼（VDRL镜下）可辨细小散在絮状凝集物，悬液背景浑浊。以符号“＋”表示；
         4. 临界阳性反应：RPR/TRUST肉眼（VDRL镜下）可辨较粗糙抗原颗粒，悬液背景浑浊。以符号“±”表示；
         5. 阴性反应：RPR/TRUST肉眼（VDRL镜下）抗原颗粒均匀分布。以符号“－”或“阴性”表示。
5. 以分级方式表示免疫反应的敏感性差异。用符号“-”表示定性试验阴性反应；用符号“＋”表示定性试验阳性反应，并且用不同数量的“＋”表示反应强弱程度。
   * 1. 半定量试验
        1. 大部分患者仅用定性试验分级方式不能满足免疫反应敏感性巨大的差异性，通过梯度倍比稀释来放大敏感性，以呈现弱阳性反应或临界阳性反应的最高稀释倍数，为半定量试验的滴度。
        2. 以1:N+或1:N±格式表示（其中N为稀释倍数值）。
     2. 报告格式

梅毒非特异性抗体的滴度与凝集的强弱程度相关，反映了患者特定的病程、疾病分期等状态。其检测报告应提示患者的免疫特征，比如“前带现象”（详见9.3.2。）。梅毒非特异性抗体试验有前带现象的患者，更容易发生贾-赫反应，检测报告中包含前带现象的信息，有利于临床医生采取适当措施来降低医疗风险。

定性试验阳性反应用符号“＋”表示，用不同数量的“＋”表示免疫反应的强弱程度（符合9.1.1至9.1.4描述）。半定量试验要有最终稀释滴度、和反应强弱程度（符合9.1.3或9.1.4描述）。

* + - 1. 阴性反应的检测报告

应有“试验方法”（如RPR或TRUST或VDRL）和“结果表示”两部分组成。

1. RPR -（阴性）
2. “试验方法”为RPR；原始样品定性试验符合9.1.5给出的细节。提示：阴性反应。
   * + 1. 阳性反应的检测报告

应有“试验方法”、“定性”（原倍）结果和“半定量”结果（滴度）共3个部分组成。

1. RPR＋＋＋＋，1:64＋
2. TRUST－，1:256＋
3. “试验方法”为RPR；原始样品“定性试验”符合9.1.1给出的细节；“半定量试验”中，经过系列倍比稀释至1:128符合9.1.5给出的细节，而1:64符合9.1.3给出的细节。提示：定性试验强阳性反应，无前带现象，呈高滴度状态，半定量试验已经至最终稀释度。
4. “试验方法”为TRUST；原始样品“定性试验”符合9.1.5给出的细节；“半定量试验”中，经过系列倍比稀释至1:512符合9.1.5给出的细节，而1:256符合9.1.3给出的细节。提示：定性试验有前带现象，呈高滴度状态，半定量试验已经至最终稀释度。
   1. 质量控制

应符合WS/T 494-2017临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求、WS/T 505-2017定性测定性能评价指南、WS/T 641-2018临床检验定量测定室内质量控制、WS/T 644-2018临床检验室间质量评价、CNAS-RL02能力验证规则、CNAS-CL02-A001：2021 医学实验室质量和能力认可准则的应用说明等文件的总体要求。

* + 1. 基本要求
       1. 温度
          1. RPR/TRUST试验区域温度宜在18℃～29℃之间。VDRL试验区域温度宜在23℃～29℃之间。过低的环境温度可增加假阴性。
          2. 所有从低温环境下取出的标本、样品、试剂、对照品、质控物等，应放置在室温至少30 min才可以进行试验。
       2. 生物安全

本文件涉及传染性生物样品，应在二级或二级以上生物安全实验室内开展相关操作，配备相应的个人防护用品。分级要求符合GB19489 实验室生物安全通用要求。

* + - 1. 隐私保护

本文件涉及性传播感染，应保护患者信息和试验结果等个人隐私。

* + - 1. 技术人员
         1. 技术人员应有医学和/或检验和/或生物专业教育背景，取得检验或相关卫生专业技术资格，上岗前应通过性病实验技术培训和考核。
         2. 在岗人员应每年参加专业机构组织的性病实验技术的复训。
         3. 定期对岗位技术人员进行能力评估。可采用人员比对、专业测评、检测特定样品或外部质控物等方式进行。能力评估频次宜不低于一年一次。
         4. 对缺乏判读反应结果经验的技术人员，可将高滴度的样品进行系列倍比稀释，观察每个反应圆圈中的抗原抗体凝集状态，根据9.1给出的描述细节，掌握辨别弱阳性结果的能力。
    1. 试剂的检测性能验证
       1. 首次使用检测试剂应做性能验证。至少包括符合率、最低检测限等指标。应保存验证数据记录。
       2. 新批次试剂可采用新旧批次试剂平行测定患者样品和/或质控物等方式进行验证，至少应包括阴性、弱阳性和阳性样品和/或质控物。定性试验比对结果的阴阳性结果应一致，半定量试验阳性结果≤±1个滴度。
    2. 对照品
       1. 对照品应随试剂盒保存，不应冻存。
       2. 不同试剂盒中的对照品不应混用。
       3. 对照品不应作为监测检测质量稳定性的质控物。
       4. 应记录每次对照品的检测结果，并保存记录。
       5. 每一次试验时，应随待检样品同步检测阳性反应和阴性反应的2种对照品。
       6. 对照品检测符合预期结果，说明本次检测有效；对照品检测不符合预期结果，说明本次检测无效，应进行重复检测；如重复检测仍然不符合预期结果，提示该试剂盒失效，应更换新试剂盒。
    3. 质控物
       1. 可选用商品化质控物或自制质控物。质控物为已知阳性和阴性反应的血清制品。性状的稳定期应≥1年。阳性反应质控物的滴度宜为1:8或1:16。
       2. 若使用自制质控物，需确认其他感染性标志物结果为阴性，避免有交叉反应。质控物适用于定性和半定量试验。

1. 由于CSF样品冻存后的稳定性需要循证依据，采用血清基质的阳性和阴性质控物可以基本满足评估RPR/TRUST试验的评估。
   * + 1. 每一个批次质控物采购，至少满足一年的使用计划，质控品应保存在带密封胶圈的螺口冻存管中于-20 ℃或更低温度保存。根据使用频次来确定分装体积，每支分装≥150 μL。分装后的需标记质控物名称、分装时间、分装人等信息。
       2. 连续5个检测日内使用的质控物，应置于2℃～8℃保存，避免反复冻融。
       3. 应记录每次实验时质控物的指定值、批号、生产日期、失效日期、当日检测结果，并保存记录。
       4. 每个检测日应随待检样品、对照品同步检测质控物一次及以上。如果当日发生更换批号的情况，应增加一次质控频率。
       5. 质控物的检测符合预期结果，表明检测系统受控，检测有效。可发送临床检测报告。
       6. 质控物的检测不符合预期结果，本次检测失控。不应发送临床检测报告。查找并纠正失控原因，重新检测样品，且质控正常后，方可发送报告。
     1. 反应板
        1. 反应板正面为样品的反应区，避免直接接触和污染。
        2. RPR/TRUST试剂盒开封后，纸质反应板应放置于密封袋内防止污染、损坏，并存储在干燥室温下，不应置于冰箱保存。
        3. 反应板应整体平坦，储藏和检测时不会凸起或凹陷。
        4. 纸质反应板表面因覆盖塑料涂层而具有适当的表面张力，即液体在反应圆圈内既不会自由流动，也不会呈荷叶上露滴状。如样品不能均匀地涂布样品到整个圆圈，应更换反应板。
        5. VDRL专用反应板重复使用前应洁净处理。
     2. 专用滴针
        1. 宜使用符合滴量标化要求专用滴针的试剂品牌。
        2. 对不符合标化要求专用滴针的试剂品牌，应另外购买合格的专用滴针。
        3. 专用滴针随试剂用尽，更换新的专用滴针。
        4. 初次使用的专用滴针，应验证是否符合6.6.2和6.6.3给出的要求。保存相关记录。
        5. 当日检测完成后，宜用蒸馏水或去离子水冲洗针管后自然晾干。勿擦拭针头，避免磨损硅涂层影响滴加抗原的准确性。
     3. 结果判定
        1. 应在明亮的光线下用肉眼观察RPR/TRUST结果，不应使用显微镜观察。
        2. VDRL试验应在显微镜下观察结果。
        3. 少数样品在检测后，其反应圆圈周边出现均匀悬浮的细小凝集颗粒，而中心部位呈现阴性反应。可反应板倾斜30 °，轻轻转动数周，有助于对临界阳性反应的结果识别。
        4. 当送检单的“临床诊断”提示“一期梅毒”、或“二期梅毒”、或现症“晚期梅毒”的病例，即使定性试验呈阴性反应，也应将样品进行系列倍比稀释到1:16进行半定量试验，排除前带现象。
        5. 当判断为前带现象时，应进一步稀释样品进行检测，报告最终滴度。
        6. 当无前带现象时，报告中应注明1:16呈阴性反应。
        7. 使用纸质反应板替代玻璃片进行VDRL试验时，反应结束后吸取反应液置载玻片上，覆上盖玻片，在显微镜下观察
     4. 室内质量控制和室间质量评价
        1. 作为人工操作和判读的检测项目，每年至少一次进行实验室内部的人员能力比对。不同工位、人员的比对结果，可以进一步评估实验室内部质量。
        2. 应开展梅毒非特异性抗体的室内质控。
        3. 应每年至少2次参加由专业管理机构组织的室间质量评价活动。每次至少5份样品，包含阴性、弱阳性和阳性反应。描述有关回报结果的分析、不合格结果的纠正措施、系统偏移的预防措施等内容。
        4. 定性试验的检测结果与预期值一致，为合格。半定量试验阳性检测结果≤±1滴度预期值的范围，为合格。
   1. 临床意义
      1. 检测策略
         1. 应根据梅毒疾病发生发展自然规律、结合患者的病史和特征检查，申请适当的检测方法。
         2. 没有限定必须采用梅毒非特异性抗体试验还是梅毒特异性抗体试验用于筛查。由于梅毒疾病的复杂性和特殊性，临床诊疗大部分情况需要这两类抗体联合检测，才能达到提高鉴别、诊断的效率。
      2. 辅助诊断
         1. 感染梅毒螺旋体后，人体会产生抗类脂物质的抗体。梅毒非特异性抗体检测呈阳性反应，与活动性梅毒有关，是判断“现症感染”的指标。结合梅毒特异性抗体检测结果可确诊梅毒。
         2. 由于超过10 %的静脉药瘾者的梅毒非特异性抗体的滴度＞1:8，部分早期梅毒和潜伏梅毒的滴度＜1:8。应重视低滴度值的鉴别诊断。
         3. VDRL是传统的诊断神经梅毒的标准方法，对CSF有较高的特异性。大样本临床比对数据显示：VDRL较RPR/TRSUT有更高的敏感性。RPR/TRUST作为替代试验对CSF检测时，阳性反应具有与VDRL相同临床价值；阴性反应的患者不能排除神经梅毒。
         4. 在梅毒特异性抗体检测阳性的前提下，RPR/TRUST/VDRL有如下结果可作为判断先天梅毒的参考依据：
2. 出生时，新生儿的血清、CSF梅毒非特异性抗体水平高于同期母亲2个滴度；
3. 或新生儿CSF-VDRL呈阳性反应；
4. 或出生后3个月内，血清、CSF梅毒非特异性抗体由阴转阳，或者滴度水平比出生时增加2个滴度；
   * 1. 疗效监测和临床意义
        1. 对同一个病例治疗效果的监测，应采用与初次检测相同的方法和试剂。
        2. 在治疗当日，应掌握初诊患者定性和半定量试验的基础数据，将每次随访的定性和半定量试验结果，分别与前一次和/或初诊时的滴度水平进行动态的比较，给予临床合理解释。
        3. 在连续的疗效监测过程中，抗体滴度水平和变化趋势有着不同的临床意义：
5. 抗体下降≥2个滴度（例：从1:64下降至1:16，4倍），判断治疗有效。
6. 抗体下降≥2个滴度，并且连续2个监测周期的定性试验呈阴性反应，判断治愈。
7. 抗体滴度下降或上升＜2个滴度，在排除再感染和实验技术性误差的情况下继续随访监测。
8. 抗体上升≥2个滴度（例：从1:16上升至1:64，4倍），或定性试验从阴性反应转变成阳性反应，应结合流行病学史和临床体征，可判断复发、或再感染、或治疗失败。
   1. 局限性
      1. 概述

虽然VDRL、RPR、TRUST的检测原理基本相同，但因采用的抗原原料和生产工艺的不同，各种方法和试剂之间在敏感性和特异性方面存在系统性差异。任何2种方法的定性和半定量结果，相互间不应直接比较。当梅毒非特异性抗体试验用作梅毒筛查用途时，应选择敏感性高的方法或试剂。

* + 1. 假阳性反应
       1. 个别品牌真空采血管添加剂成分，可干扰检测结果引起假阳性反应。应选择符合附录A和B要求的采血管。
       2. 与梅毒螺旋体感染无关的其他因素，如急性和慢性疾病、自然组织损伤等，也也可使梅毒非特异性抗体试验呈阳性反应。常见的疾病因素有系统性红斑狼疮、麻风病、疟疾、传染性单核细胞增多症、病毒性肝炎、肿瘤、其他螺旋体疾病等可引起假阳性反应。常见的生理性因素，如孕妇和老年，也导致假阳性反应。
    2. 假阴性反应
       1. 感染梅毒螺旋体后，机体免疫应答需要一定过程，当抗类脂质抗体浓度尚处于实验方法的检测限之下，梅毒非特异性抗体试验出现假阴性反应，称为窗口期。在此阶段可发生假阴性反应。
       2. 少数早期梅毒和神经梅毒以及部分晚期梅毒，可发生RPR/TRUST定性试验假阴性反应。
    3. 前带现象

1 %～2 % 二期梅毒、0.5 %～1 % 一期梅毒患者的血清梅毒非特异性试验可出现前带现象。

* + 1. 血清固定

部分晚期潜伏梅毒、少数其他病程梅毒患者的样品可存在血清固定现象。

* + 1. 血浆样品
       1. 血浆中的抗体浓度显著高于血清，同一个患者血清与血浆的检测结果不应直接比较。
       2. 用血浆进行检测时，应在样品类型中注明“血浆”。
       3. 血浆样品不应做VDRL试验。
       4. 仅在特殊情况下（如血库、无离心机的实验室、无法获得血清样品的状况），血浆样品可用于RPR/TRUST定性试验。。

2. （规范性附录）  
   抗干扰性能初步评估
   1. 干扰物质来源

内源性干扰物质常见于血红素、胆红素和脂质。

外源性干扰物资常见于标本处理过程中的添加物（抗凝剂、促凝剂等）、采集及处理过程中接触标本的物质（标本收集容器及塞子等）。

* 1. 获取抗干扰信息方式

向真空采集器生产商了解添加剂的成分及其对检验项目的抗干扰性能。主要添加剂成分不明确的真空采集器，应谨慎选择。

向生产商，了解其梅毒非特异性抗体检测的试剂盒对常见干扰物质的抗干扰性能。

从国家和地区质量管理控制部门，获得试剂盒、真空采集器抗干扰试验的质量评估信息。

1. （规范性附录）  
   抗干扰性能评估—验证厂家声明
   1. 基本要求
      1. 应使用新鲜样品进行抗干扰性能评估。
      2. 应选择具有溯源性的干扰物质标准物质，进行抗干扰性能评估。包括：游离型胆红素 (Bil.F)、结合型胆红素(Bil.C)、血红蛋白（Hb）和乳糜微粒（CM）。
   2. 验证真空采集器的抗干扰能力
      1. 选择10例健康人和10例不同病程的梅毒病例，应包含3份临界水平、3份低滴度、4份高滴度的样品。
      2. 使用1种无添加剂的洁净玻璃管作对照。
      3. 拟选真空采集器和对照管同时采集一个受检者静脉血，分离血清或血浆。
      4. 分别进行梅毒非特异性抗体检测的定性和半定量试验。
      5. 比较检测结果差异情况，判断真空采集器的抗干扰能力。
   3. 验证试剂的抗干扰能力
      1. 选择被评估试剂。
      2. 样品选择符合B.2.1规定。
      3. 静脉抽血，分离血清或者血浆备用。
      4. 干扰物质的标准物质复溶后，按照最高生理浓度水平，与待检的血清或血浆样品混合。
      5. 对添加干扰物质前后的血清或血浆样品，分别进行定性和半定量试验。
      6. 比较同一个受检者样品添加干扰物质前后检测结果的差异情况。
      7. 综合判断该试剂抗干扰物质影响的能力。
   4. 判断标准
      1. 相对于对照管样品的检测结果，含添加剂真空采集器的样品，其梅毒非特异性抗体定性试验结果一致；半定量试验的检测结果在预期值≤±1滴度的范围。判断真空采集器具有抗干扰能力。

相对于不添加干扰物质的原始样品的检测结果，含干扰物质的血清或血浆样品，其梅毒非特异性抗体定性试验结果一致；半定量试验的结果≤±1滴度。判断该试剂具有抗干扰能力。

1. （规范性附录）  
   水平旋转仪关键技术参数
   1. 基本参数
      1. 水平旋转仪应有机械旋转部件、反应板托架、电子控制集成器、数字显示、蜂鸣报警、参数调控按钮等组成。
      2. 样品反应板托盘附有固定反应板的夹槽，避免反应板在旋转时滑动。水平托盘应带有上盖，减少外界温度、湿度的干扰，降低生物危害风险。
      3. 转速：100 ±2 r/min（RPR/TRUST）或180 ±2 r/min（VDRL）。
      4. 偏心回转直径：22 mm±2 mm。
      5. 电子数字定时：1 min±1 s。
      6. 蜂鸣和倒计时数字显示双重提示。
      7. 一键式反应程序的按键。
   2. 组合反应程序
      1. RPR/TRUST试验反应程序：转速100 r/min；8 min；
      2. VDRL-CSF样品的反应程序：转速180 r/min；8 min；
      3. VDRL-血清样品的反应程序：转速180 r/min；4 min。

参考文献

[1] 童曼莉;刘莉莉;林丽蓉等．梅毒实验诊断程序研究进展.中华检验医学杂志, 2017, 40(11):898-903.

[2] 顾伟鸣,杨阳,吴磊等.梅毒血清学试剂性能评估方案的优化及应用.医学检验. 2014 29(11):1169-1174.

[3] 杨阳,吴磊, 顾伟鸣等.梅毒非特异性类脂质反应素抗体试验标准操作程序的建立及应用评价.中华皮肤科杂志.2011,44(5):336-338.

[4] 杨阳,顾伟鸣,金月兰等.上海市梅毒血清学实验室室间质量评价.检验医学.2009,24 (12):922-926.

[5] 顾伟鸣,杨阳,金月兰等.梅毒血清学检测质量亟需提高.中华皮肤科杂志.2009,42(5):50-51.

[6] 顾伟鸣,赵根明,杨阳等.先天梅毒患儿的血清学随访.中华传染病杂志.2007,25(2):117-119.

[7] 尹跃平主编.性传播疾病实验室检测指南.北京:人民卫生出版社, 2019:11-1.

[8] Kun Gao, Xu Shen, Yong Lin, et al.. Origin of Nontreponemal Antibodies During Treponema pallidum Infection: Evidence From a Rabbit Model. The Journal of Infectious Diseases. 2018; 218:835-43.

[9].Wei-Ming Gu, Yue Chen, Lei Wu, Yang Yang. Exploring Serologic Indicators for Laboratory Diagnosis of symptomatic Neurosyphilis. J Neuroinfect Dis 2016, 7:1-6.

[10].Man-Li Tong; Li-Rong Lin, Li-Li Liu. et al. Analysis of three algorithms for syphilis serodiagnosis and implications for clinical management, Clinical Infectious Diseases. 2014, 58:1115-1124.

[11].Li-Li Liu, Li-Rong Lin, Man-Li Tong. et al.. Incidence and Risk Factors for the Prozone Phenomenon in Serologic Testing for Syphilis in a Large Cohort. Clinical Infectious Diseases, 2014, 59:183-189.

[12].Gu Wei-Ming,Yang Yang,Wu Lei,et al. Comparing the Performance Characteristics of CSF-TRUST and CSF-VDRL for Syphilis: A Cross-sectional Study. BMJ Open.2013.3(2):1-5.

[13].Gu Wei-Ming,Yang Yang,Qinzhong Wang,et al. Comparing performance of traditional non-treponemal tests on syphilis and non-syphilis serum samples. International Journal of STD & AIDS.2013,24(12):919-25

[14].Alexander S.H., Khalil G.G. The performance of cerebrospinal fluid treponemal-specific antibody tests in neurosyphilis: A systematic review.Sexually Transmitted Diseases.2012,39(4):291-297

[15].Tom Wong, editor. Section 3-laboratory diagnosis of sexually transmitted infections in canadian guidelines on sexually transmitted infections. Revised: January 2010,syphilis

[16].Castro R., Prieto E.S., da Luz Martins Pereira F.. Nontreponemal tests in the diagnosis of neurosyphilis: An evaluation of the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) and the Rapid Plasma Reagin (RPR) Tests. Journal of Clinical Laboratory Analysis.2008, 22(4):257–261

[17].Patrick R.M, Ellen J.B., James H.J., Marie L.L., Michael A.P. editors. Chapter: Treponema and Other Human Host-Associated Spirochetes. Manual of clinical microbiology, 9th edition, Washington D.C. American society for microbiology.2007:987-1003

[18] Larsen S.A., Steiner B.M., Rudolph A.H.. Laboratory Diagnosis and Interpretation of tests for Syphilis. Clinical microbiology reviews.1995,8(1):1-21

[19] Geusau A., Kittler H., Hein U., et al. Biological false-positive tests comprise a high proportion of Venereal Disease Research Laboratory reactions in an analysis of 300,000 sera. International Journal of STD & AIDS.2005,16(11):722–726.

