

## 基于全自动管式化学发光免疫检测系统的人结核感染 T 细胞检测方法的建立

陈鹭颖<sup>1</sup> 林海军<sup>2</sup> 翁祖星<sup>2</sup> 徐飞海<sup>2</sup> 葛胜祥<sup>2</sup> 张军<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 建立基于化学发光平台的人结核感染 T 细胞检测方法。方法 将一株  $\gamma$ -干扰素单抗标记在磁微粒上,另一株  $\gamma$ -干扰素单抗标记在吖啶酯上,然后将检测体系与已有的细胞刺激培养体系相结合。结果 本研究成功建立基于化学发光平台的人结核感染 T 细胞检测方法。以 ELISA 平台检测试剂的检测结果作为参考,该方法的灵敏度为 98.3%,特异性为 99.2%,总体符合率达到 98.8%。结论 该方法具有更高的分析灵敏度(可达 0.27 pg/mL)、更宽的线性范围(1 pg/mL~5 000 pg/mL)、更好的重复性(批内与批间变异系数均 <6.0%)及更易实现高通量检测,为临床诊断结核感染提供了有力的工具。

**[关键词]** 结核感染 T 细胞;  $\gamma$ -干扰素定量检测; 化学发光

Development of detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer

CHEN Luying<sup>1</sup>, LIN Haijun<sup>2</sup>, WENG Zuxing<sup>2</sup>, XU Feihai<sup>2</sup>, GE Shengxiang<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>2\*</sup>

(1. Fujian Food and Drug Administration, Fuzhou, Fujian, China, 350003; 2. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361012)

**[ABSTRACT]** Objective To develop the detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer. Methods An antiIFN- $\gamma$  Mab was coated on the surface of microparticle. Another anti IFN- $\gamma$  Mab was labelled to acridinium ester. After that, the detection system was combined with the *in vitro* cell culture system. Results This research developed the detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer. Compared with the testing results of the ELISA kit, the sensitivity, specificity and total matching ratio of the CLIA kit was 98.3%, 99.2% and 98.8%, respectively. Conclusion The CLIA kit has better sensitivity (0.27 pg/mL), wider linear range (1 pg/mL ~ 5 000 pg/mL), and better repeatability (intra and inter coefficient of variation < 6.0%). It makes a high throughput detection available. It will contribute to the clinical diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*.

**[KEY WORDS]** T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis*; IFN- $\gamma$  quantitative detection; Chemiluminescent immunoassay

目前全球约有三分之一的人感染了结核分枝杆菌,其中约 10%会进一步发展成为活动性结核<sup>[1]</sup>。临床上用于判断结核分枝杆菌感染的最常见

方法是结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test, TST)。但 TST 的特异性较差,阳性结果不能排除非结核分枝杆菌(*Nontuberculous mycobacteria*,

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA02A101)

作者单位:1. 福建省食品药品认证审评中心,福建,福州 350003

2. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建,厦门 361102

\*通讯作者:张军, E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

NTM)感染,也无法区分是否由接种卡介苗引起<sup>[1-2]</sup>。因此,近年来在欧美发达国家,TST已逐渐被 $\gamma$ -干扰素释放试验(interferon gamma release assay, IGRA)所取代。IGRA的方法是利用结核分枝杆菌特异性抗原与受试者的新鲜外周全血中的T细胞共同孵育刺激培养,如果受试者受到过结核分枝杆菌感染,那么激活的T细胞会分泌大量的 $\gamma$ -干扰素,通过 $\gamma$ -干扰素的定量检测可以判断受试者是否存在结核菌感染。由于IGRA采用结核分枝杆菌特异性抗原(CFP-10和ESAT-6)作为刺激原,不受卡介苗和一些非结核分枝杆菌的影响,其判断结核感染特异性明显高于TST试验<sup>[3-6]</sup>。目前国内已上市的IGRA产品主要分为2类,一类为酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospot, ELISPOT),代表试剂为英国Oxford Immnnotec的T-SPOT.TB试剂;另一类为体外释放酶联免疫法(tuberculosis interferon gamma release assay, TB-IGRA),代表试剂为澳大利亚Cellestis公司的QFT-GIT试剂和北京万泰的TB-IGRA试剂。ELISPOT方法直接测量外周血中MTB特异T细胞的含量,但需进行淋巴细胞分离培养和ELISPOT斑点计数,其技术水平和实验室条件要求较高,在我国仅能在部分科研单位及大的中心实验室使用。TB-IGRA方法通过检测T细胞在体外抗原刺激后的IFN- $\gamma$ 释放来间接检测机体特异性T细胞应答。该技术采用全血培养,仅需普通37℃温箱和实验室常规的检测仪器,便于在有一定条件的医疗单位推广使用。目前采用TB-IGRA方法的试剂在 $\gamma$ -干扰素检测部分均采用传统的酶联免疫分析,而化学发光免疫分析与传统的酶联免疫分析相比,它具有更高的灵敏度、更宽的线性范围、更好的重复性及更容易实现高通量的检测<sup>[7]</sup>。本研究基于TB-IGRA原理,采用化学发光免疫分析法<sup>[7-8]</sup>(chemiluminescent immunoassay, CLIA)建立 $\gamma$ -干扰素检测体系,并结合已有的细胞刺激培养体系建立了人结核感染T细胞检测方法,评价试剂各项性能指标,在临床检测中与国产主流试剂进行对比,其更宽检测范围等性能的实现,将为 $\gamma$ -干扰素释放试验(interferon gamma release assay, IGRA)方法在结核病的辅助诊断以及用药后的疗效监测等方面的深入研究与应用提供有力的工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

2株 $\gamma$ -干扰素单克隆抗体C6H4和8A11、 $\gamma$ -干扰素抗原、特异性刺激抗原E1C0和阳性刺激抗原PHA均来自厦门大学;磁珠购自Merck公司,吡啶酯原料来自厦门大学;检测仪器CARIS200分析仪及其配套耗材来自厦门优迈科医学仪器有限公司;对照试剂盒采用北京万泰生物药业股份有限公司的结核分枝杆菌相关 $\gamma$ -干扰素检测试剂盒(体外释放酶联免疫法)。

用 $\gamma$ -干扰素抗原配制的参考品:L系列参考品(L1~L8,浓度分别为1 pg/mL、5 pg/mL、15 pg/mL、50 pg/mL、150 pg/mL、500 pg/mL、1 500 pg/mL、5 000 pg/mL);精密度参考品CV-1(15 pg/mL)、CV-2(500 pg/mL)。临床样本来自厦门大学。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 磁珠包被单克隆抗体

取磁珠用EDC溶液(10 mg EDC溶于1 mL去离子水)活化,然后加入单克隆抗体C6H4并置于旋转混匀仪上孵育偶联,孵育后用甘氨酸溶液(pH 7.4)进行封闭,完成封闭后保存在含酪蛋白的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中。

#### 1.2.2 吡啶酯标记单克隆抗体

取单克隆抗体8A11稀释到合适浓度后加入吡啶酯(溶于甲基甲酰胺中),混匀,室温避光反应;加入赖氨酸溶液(pH 8.0)封闭;最后透析到PBS中,用含酪蛋白的PBS稀释后使用。

#### 1.2.3 刺激培养管的配制

直接在培养管中加入50  $\mu$ L 50 mmol/L的PBS,作为本底对照培养管N。用50 mmol/L的PBS将特异性结核杆菌抗原E1C0稀释至50  $\mu$ g/mL,每根培养管中加入50  $\mu$ L稀释后的E1C0,作为测试培养管T。用50 mmol/L的PBS将阳性抗原PHA稀释至1 mg/mL,每根培养管中加入50  $\mu$ L稀释后的PHA,作为阳性对照培养管P。

#### 1.2.4 参考品的配制

用20%婴儿牛血清将 $\gamma$ -干扰素抗原稀释成所需浓度,-20℃保存备用。

#### 1.2.5 $\gamma$ -干扰素的体外释放

采集:每个受试者采用静脉穿刺术采集标本,使用肝素抗凝的真空采血管采集。分装:在2 h之

内将采集的全血分装到“本底对照培养管 N”、“测试培养管 T”、“阳性对照培养管 P”3个培养管中。每种培养管加入全血 1.0 mL,分装前需要将采集的全血标本颠倒混匀 3 次以上。培养:将培养管轻柔颠倒 5 次后迅速放入 37℃温箱培养 (22 ± 2)h,培养过程中保持试验管直立。离心:将培养后的全血以 3 000 r/min~5 000 r/min 离心 10 min,取血浆进行检测,注意不可吸到细胞层。

### 1.2.6 γ-干扰素的测定

通过 CARIS 系统执行测定操作:CARIS 系统先吸取样本转移到反应杯中;向反应杯中加入包被后的磁珠,混匀、孵育并冲洗反应混合物;向反应杯中加入标记后的吡啶酯,混匀、孵育并冲洗反应混合物;添加预激发液和激发液后检测反应复合物的相对发光强度(relative light unit, RLU)。

### 1.2.7 四参数拟合剂量反应曲线

用 GraphPad Prism 5.01 进行四参数拟合,拟合公式为  $Y = \frac{a-d}{1+(\frac{X}{c})^b} + d$ , Y 为测得的 RLU 均值, X 为样品浓度值。

值, X 为样品浓度值。

### 1.2.8 分析灵敏度的确定

用试剂检测 L 系列参考品,用 GraphPad Prism5.01 进行四参数拟合试剂剂量反应曲线。然后重复测定基质血清 20 次,计算其平均发光值、标准差 (standard deviation, SD),得出 M+2SD,然后将 M+2SD 的 RLU 值代入试剂盒剂量反应曲线方程中,求出对应的浓度值,即为其分析灵敏度。

### 1.2.9 精密度的测量

用 3 批试剂分别检测精密度参考品 CV-1 (15 pg/mL)、CV-2 (500 pg/mL),每份标本平行检测 10 次,计算测定值的平均值和 SD,按照公式  $CV = \frac{SD}{\text{平均值}} \times 100\%$  计算批内和批间 CV。

## 2 结果

### 2.1 分析灵敏度

以 L 系列参考品建立四参数拟合试剂剂量反应曲线,通过重复测定基质血清得出所建立化学发光试剂的检测下限 (分析灵敏度) 为 0.27 pg/mL,而 ELISA 试剂盒的分析灵敏度为 2 pg/mL。

### 2.2 剂量反应曲线

用试剂重复检测 4 次 L 系列参考品,建立四

参数拟合试剂剂量反应曲线,测量值与标定值的相关系数 (r) 为 0.99997,表明本试剂具有良好的剂量反应关系 (图 1)。

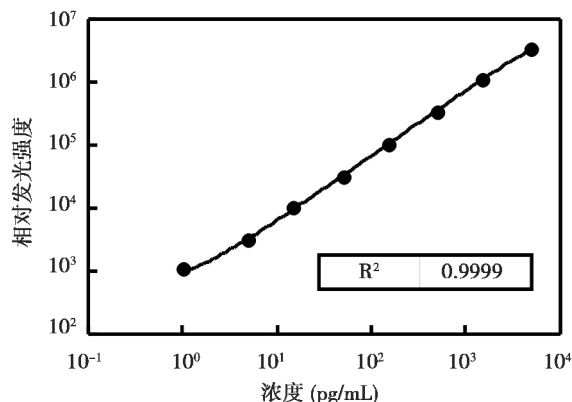


图 1 试剂剂量反应曲线

Figure 1 Dose-response curve of the reagent

### 2.3 精密度

用 3 批试剂分别检测精密度参考品 CV-1 (15 pg/mL)、CV-2 (500 pg/mL)。结果显示 3 批试剂的批内及批间精密度良好 (表 1)。

表 1 试剂的精密度评价

Table 1 The precision evaluation of reagents

	试剂批次 1	试剂批次 2	试剂批次 3	批间
CV-1	3.9%	5.2%	4.5%	4.8%
CV-2	3.6%	4.4%	3.1%	3.7%

### 2.4 抗干扰能力

分别考察溶血、黄疸、高脂、类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 等不同干扰因素对试剂检测结果的影响。

#### 2.4.1 溶血

选取 3 份临床确诊为肺结核的标本 (编号分别为 1#~3#),在进行刺激培养前将采集的新鲜血分成 2 组,其中一组进行正常刺激培养,另外一组进行溶血处理后刺激培养,然后检测每份标本的 γ-干扰素含量,从而对检测结果进行判定,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,正常培养的 3 份标本检测结果均为阳性,但溶血后对标本进行培养,阳性对照管没有反应,结果判定为不确定,这可能是由于溶血

表 2 溶血对检测的影响  
Table 2 The influence of hemolysis

标本类型	检测结果		
	1#	2#	3#
溶血前	阳性	阳性	阳性
溶血后	不确定	不确定	不确定

标本中 T 细胞破裂死亡导致。因此,溶血对本试剂检测结果有较大影响,在标本处理时应避免溶血现象的出现。

#### 2.4.2 黄疸

选取 3 份临床确诊为肺结核和黄疸的标本(编号分别为 4#~6#)、3 份临床确诊为非结核但有黄疸的标本(编号分别为 7#~9#)进行培养,然后检测每份标本的  $\gamma$ -干扰素含量,从而对检测结果进行判定,结果如表 3 所示。

表 3 黄疸对检测的影响  
Table 3 The influence of jaundice

标本编号	4#	5#	6#	7#	8#	9#
结果判定	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

由表 3 可知,临床确诊为肺结核和黄疸的标本用本试剂检测均为阳性,非结核但患有黄疸的标本本试剂检测均为阴性,表明黄疸不会对本试剂检测结果造成影响。

#### 2.4.3 高脂

选取 3 份临床确诊为肺结核的高脂标本(编号分别为 10#~12#)、3 份临床确诊为非结核的高脂标本(编号分别为 13#~15#)进行培养,然后检测每份标本的  $\gamma$ -干扰素含量,从而对检测结果进行判定,结果如表 4 所示。

表 4 高脂对检测的影响  
Table 4 The influence of hyperlipemia

标本编号	10#	11#	12#	13#	14#	15#
结果判定	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

由表 4 可知,3 份肺结核标本检测结果为阳性,3 份非结核标本检测为阴性,从而表明高脂不会对本试剂结果造成影响。

#### 2.4.4 类风湿因子

为考察标本中的 RF 是否会对本试剂的检测结果造成影响,收集 3 份 IFN- $\gamma$  阳性 RF 阳性标本(编号为 16#~18#)、3 份 IFN- $\gamma$  阴性 RF 阳性标本(编号为 19#~21#)用本试剂进行检测,结果如表 5 所示。

表 5 类风湿因子对检测的影响  
Table 5 The influence of RF

标本编号	16#	17#	18#	19#	20#	21#
结果判定	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

由表 5 可知,3 份肺结核标本检测结果为阳性,3 份非结核标本检测为阴性,从而表明类风湿因子不会对试剂结果造成影响。

#### 2.5 与同类产品的比较

用本试剂与北京万泰生物药业股份有限公司的结核分枝杆菌相关  $\gamma$ -干扰素检测试剂盒(体外释放 ELISA)进行特异性、灵敏度的比较。

用本试剂和 ELISA 试剂分别检测 241 份临床标本。由表 6 结果可知,以北京万泰生物药业股份有限公司的结核分枝杆菌相关  $\gamma$ -干扰素检测试剂盒(体外释放 ELISA)的检测结果为对照,本试剂的特异性为 98.3%、灵敏度为 99.2%。总符合率达到 98.8%。

表 6 与 ELISA 试剂盒的符合率  
Table 6 Coincidence rate with the ELISA kit

	ELISA 检测阳性	ELISA 检测阴性	合计	符合率
CLIA 检测检测阳性	117	1	118	98.8%
CLIA 检测阴性	2	121	123	
合计	119	122	241	

用本试剂与 ELISA 试剂分别检测 82 份临床血浆,由图 2 可知,两者的定量值经过直线回归后,得到的线性回归方程为  $y=0.9930x+0.01128$ ,相关系数  $r$  达到 0.9833,表明两试剂有良好的相关性。

本试剂与 ELISA 试剂的主要性能指标对比如表 7 所示。

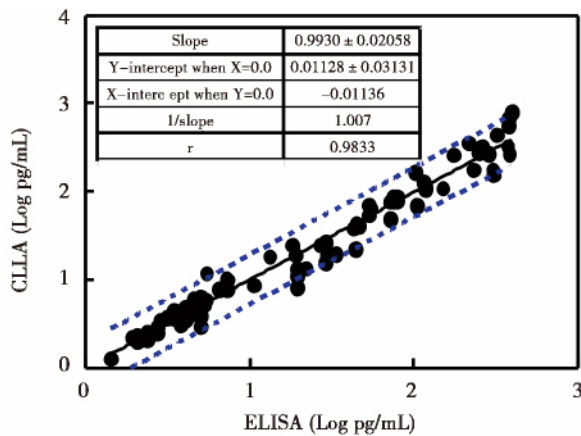


图2 CLIA试剂与ELISA试剂的定量相关性分析

Figure 2 The quantitative correlation analysis between CLIA kit and ELISA kit

表7 CLIA试剂与ELISA试剂的比较

Table 7 Comparison of the CLIA kit and the ELISA kit

	灵敏度	剂量反应曲线范围	两者符合率
CLIA法	<0.5 pg/mL	1 pg/mL~5 000 pg/mL	98.8%
ELISA法	2 pg/mL	12.5 pg/mL~400 pg/mL	

### 3 讨论

结核病作为可通过空气传播的疾病，其传播能力很强，不易控制。在临床上，TB-IGRA方法在结核诊断与防治上的应用已经越来越被认可并采用<sup>[9-11]</sup>。

本研究所建立的人结核感染T细胞检测方法基于全自动管式化学发光免疫检测系统进行γ-干扰素释放量的定量检测。全自动化学发光免疫检测系统是一个高度集成和自动化的免疫分析系统，包括了免疫反应及光检测系统，样本、试剂和耗材装载系统，液体管路和电器控制系统，用户操作界面等系统，能够实现检测多种项目的一体化操作，大大提高了临床检测的通量与效率。另外，由于其通过反应释放的光子数来只是分析物的浓度，与传统的ELISA相比，其具有更高的灵敏度，更宽的线性范围及更好的重复性。

在临床应用中，现有采用ELISA方法测定γ-干扰素释放量的商品化试剂盒（北京万泰生物药业股份有限公司）对结果阴阳性的判定中最为重要的一个条件是测试培养管T的γ-干扰素释放

量相对于本底对照培养管N的γ-干扰素释放量升高14 pg/mL，而N管的检测值一般是趋近于检测下限的。该ELISA试剂的剂量反应曲线范围为12.5 pg/mL~400 pg/mL，浓度为14 pg/mL样本的检测已经接近其线性范围下限，所以在临床使用中对于操作人员就有较高的要求，对于T管实际γ-干扰素含量在14 pg/mL附近的样本的检测需要足够的准确，轻微的误差就可能引起对样本阴阳性的判定的不同。而本研究所建立的基于全自动管式化学发光免疫检测系统的γ-干扰素释放量的定量检测，其检测的线性范围为1 pg/mL~5 000 pg/mL，能够对绝大多数的临床样本的T管作出准确的定量检测。

本方法与现有采用ELISA方法测定γ-干扰素释放量的商品化试剂盒（北京万泰生物药业股份有限公司）的主要性能对比如表7所示，其灵敏度、线性范围均有大幅提高，且具有良好的抗干扰能力。该方法的建立可为临床检测结核感染提供更加强有力的工具。

### 参考文献

- [1] World Health Organization. Tuberculosis [J]. Saudi Medical Journal, 2013,34(11):1205-1207.
- [2] Farris AB, Branda JA. QuantiFERON-TB gold assay for tuberculosis infection [J]. Clinical Microbiology Newsletter, 2007,29(17):129-136.
- [3] Winthrop KL. The risk and prevention of tuberculosis: screening strategies to detect latent tuberculosis among rheumatoid arthritis patients who use biologic therapy [J]. International Journal of Advances in Rheumatology, 2010,8(2):43-52.
- [4] Winthrop KL, Nyendak M, Calvet H, et al. Interferon-γ release assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection in renal dialysis patients [J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2008, 3(5):1357-1363.
- [5] Richeldi L, Losi M, D'Amico R, et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients[J]. Chest Journal, 2009, 136 (1):198-204.
- [6] Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients[J]. European Respiratory Journal, 2006,28(1):31-34.

- [7] G3miz-Gracia L, Garc3a-Campa3a AM, Soto-Chinchilla JJ, et al. Analysis of pesticides by chemiluminescence detection in the liquid phase[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005,24(11):927-942.
- [8] Tao X, Wang W, Wang Z, et al. Development of a highly sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay using enhanced luminol as substrate[J]. *Luminescence*, 2014,29(4):301-306.
- [9] 蒋英,赵蓉,张胜男,等. 干扰素释放酶联免疫法(TB-I-GRA)用于检测结核分枝杆菌的优越性[J]. *实用预防医学*, 2012,19(1):24-26.
- [10] Kleinert S, Tony HP, Krueger K, et al. Screening for latent tuberculosis infection: performance of tuberculin skin test and interferon- $\gamma$  release assays under real-life conditions[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012, 71(11):1791-1795.
- [11] Mariette X, Baron G, Tubach F, et al. Influence of replacing tuberculin skin test with ex vivo interferon  $\gamma$  release assays on decision to administer prophylactic antituberculosis antibiotics before anti-TNF therapy[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012,71(11):1783-1790.

## 2015 循环生物标志物检测与临床应用研讨会通知

各有关单位:

广东省医学会检验分会拟定于2015年11月在广州市广东大厦召开国家级继续教育项目“2015循环生物标志物检测与临床应用研讨会”,项目编号:2015-11-00-180(国)。本次大会邀请了国内外知名专家教授就循环肿瘤细胞、细胞外囊泡、循环核酸等循环生物标志物的检测及其在人类重大疾病分子诊断、个体化用药等精准医疗领域的临床应用展开学术报告与交流,为我国从事循环生物标志物分子诊断与临床应用的学者搭建专业学术平台。

现将会议相关事项通知如下:

一、会议时间:2015年11月27日-29日。11月27日10:30开始报到,11月27日下午-28日会议。

二、会议地点:广州广东大厦(广州·东风中路309号,电话:020-62739888)

三、收费标准:会务费500元/人(含资料、授课费等),住宿200元/床/天。大会统一安排食宿。住宿及交通费自理,费用回原单位报销。

四、学分授予:会后授予国家级继续教育 类学分6分,项目编号:2015-11-00-180(国)。

五、报名方式:以下任一方式均可:1. 建议登录大会官方网站在线注册;南方检验医学网([www.nflab.net](http://www.nflab.net));2. 手机微信公众号(NFLAB-NET)易信公众号(NFLABNET)注册参会;3. 邮箱注册:将下面报名表填写后发至邮箱 [nflab@126.com](mailto:nflab@126.com)。

六、学术咨询:蔡贞(134550465460),元涛(13688867078,020-62787683)。

欢迎关注大会官方网站:[www.nflab.net](http://www.nflab.net),或关注大会官方微信、易信了解大会动态。



手机扫描二维码或添加微信账号:  
NFLAB-NET 即可关注检验资讯



我们特邀请您作为正式代表出席。欢迎登陆大会官方网站在线报名参会参加会议相关活动。

广东省医学会  
2015年7月1日