

时间分辨免疫荧光法检测结核感染 T 细胞释放 γ -干扰素的方法建立及初步临床应用*

谭玉华, 朱应竹, 江 毅, 陶佳俊, 吴能伟

(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)

摘要:目的 建立一种检测结核感染 T 细胞释放 γ -干扰素 (IFN- γ) 的时间分辨免疫荧光法 (TRFIA) 及初步临床应用。

方法 选择 73 例结核分枝杆菌阳性的肺结核患者, 77 例结核分枝杆菌阴性的肺结核患者, 25 例肺外结核患者, 52 例呼吸道疾病以外的非结核患者, 70 例非结核呼吸疾病 (含肺癌) 患者作为研究对象。利用早期分泌抗原靶蛋白 6 (ESAT6) 和培养滤液蛋白 10 (CFP-10) 作为结核分枝杆菌特异性抗原, 刺激患者全血标本中的结核分枝杆菌抗原特异性 T 细胞释放 IFN- γ 。植物血凝素 L 作为有丝分裂原, 可非特异地刺激 IFN- γ 的产生。应用双抗体夹心 TRFIA 定量测定血浆中的 IFN- γ 浓度。评价 TRFIA 检测 IFN- γ 的精密度、检测下限、生物检测限、功能灵敏度、线性、准确度和特异度等分析性能指标, 并与酶联免疫法 (ELISA) 进行比对试验研究。方法间结果差异比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果 TRFIA 检测 IFN- γ 的捕获抗体包被浓度为 $5.0 \mu\text{g/ml}$, 生物素标记抗体使用工作稀释度为 $1:1\ 800$ 和标记物使用工作稀释度为 $1:500$; 实验内变异系数 (CV) $< 5\%$, 实验间 CV $< 10\%$; 检测下限 0.69 pg/ml , 生物检测限 0.90 pg/ml , 功能灵敏度 1.80 pg/ml ; 线性范围 $2 \sim 5\ 000 \text{ pg/ml}$; 检测国际生物标准参考品的偏倚不超过 5% ; 其他常见的细胞因子和常见内源性干扰物 (胆红素、血红蛋白和三酰甘油) 样本对该方法检测结果无明显影响。TRFIA 检测 297 例临床样本结果判断与临床诊断的一致率可达 85.19% ; TRFIA 与 ELISA 的结果具有高度一致性 ($\kappa = 0.9931$), 且 TRFIA 与 ELISA 的阳性检出率结果差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0, P > 0.05$)。

结论 TRFIA 检测 IFN- γ 的精密度好, 灵敏度高, 线性范围宽, 准确度高, 特异度强, 临床符合率高, 能满足临床检测需要。

关键词: 结核分枝杆菌; T 细胞; γ -干扰素释放试验; 时间分辨免疫荧光法; 性能评估

中图分类号: R378.911; R392.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)06-021-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.006

Establishment and Preliminary Clinical Application of Interferon Gamma Release Assays for T Cells Infected With Mycobacterium Tuberculosis Based on Time-Resolved Fluoroimmunoassay

TAN Yu-hua, ZHU Ying-zhu, JIANG Yi, TAO Jia-jun, WU Neng-wei

(R & D Center of IVD Reagents, Guangzhou Fenghua

Bioengineering Co., Ltd., Guangzhou 510730, China)

Abstract: Objective To establish an interferon gamma (IFN- γ) release assays for T cells infected with mycobacterium tuberculosis based on time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA), and evaluate its preliminary clinical application. **Methods** 73 patients with sputum smear-positive pulmonary tuberculosis, 77 patients with sputum smear-negative pulmonary tuberculosis, 25 patients with extrapulmonary tuberculosis, 52 patients with non-tuberculosis and non-respiratory diseases, and 70 patients with respiratory diseases (including lung cancer) and non-tuberculous were selected as the study subjects. Early secreting antigen target protein 6 (ESAT6) and culture filter protein 10 (CFP-10) were used as mycobacterium specific antigen, which stimulate effector T cells of *Mycobacterium tuberculosis* antigen in patients peripheral blood. Phytohemagglutinin L was mitogen and could stimulate the production of IFN- γ without selection. The concentration of IFN- γ was quantitatively determined by double antibody sandwich TRFIA. The precision, low limit of detection, biologic limit of detection, functional sensitivity, linear range, accuracy, specificity, and other analytical performance indicators of TRFIA were evaluated, and TRFIA was compared with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The χ^2 test was used to test the difference between self-established method and the reference method of ELISA. If P value of χ^2 test was less than 0.05, the difference was statistically significant. **Results** The TRFIA capture IFN- γ antibody coating concentration was $5.0 \mu\text{g/ml}$, the biotin-labeled IFN- γ antibody working dilution was $1:1\ 800$, and the TRFIA europium marker working dilution was $1:500$. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were less than 5% and 10% respectively, the low limit of detection was 0.69 pg/ml , the biologic limit of detection was 0.90 pg/ml , the functional sensitivity was 1.80 pg/ml , the linear range was 2

* 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。

~5 000 pg/ml, the bias compared with international biological reference standard was less than 5% and other cytokines and common endogenous interference (e. g., bilirubin, hemoglobin and triglyceride) in the plasma did not interfere the detection results. The coincidence rate between the results of TRFIA and clinical diagnosis was 85.19%. The results of TRFIA and ELISA were highly consistent ($\kappa=0.9931$), and the positive detection rate was not statistically significant ($\chi^2=0, P>0.05$). **Conclusion** The TRFIA methodology has good precision, high sensitivity, wide linear range, good accuracy, strong specificity and high clinical compliance rate, which was valuable for clinical application.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; T cell; interferon gamma release assays; time-resolved fluoroimmunoassay; performance evaluation

全球结核病 2016 年度报告发布, 近年全球结核病患者数量仍呈上升趋势, 我国结核发病人数再居全球第三位, 全球结核病疫情仍然处于较高状态, 控制形势依然严峻^[1]。结核病依然是十大致死原因之一, 肺结核发病率和死亡率均居第二位^[2]。世界卫生组织也再次强调了“终止结核病策略”, 但近年全球结核病的发病率仅以每年 2% 的缓慢速度下降。结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis*, TB) 感染的诊断一直是临床上的一个难点, 因此急需新的、革命性的技术应用于结核病防控。 γ -干扰素释放试验 (interferon gamma release assays, IGRAs) 作为结核感染筛查最新方法, 已在欧美国家得到全面推广, 并写入了诊疗指南, 推荐替代结核菌素皮肤试验作为结核感染检测的实验室检测方法^[3]。时间分辨免疫荧光法 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 是用三价稀土离子及其螯合物为示踪剂的超灵敏度检测技术, 已成为现代生物医学研究和临床超微量检验中最有发展前景的分析手段之一。笔者基于 IGRAs 和 TRFIA 原理, 建立了一种 TRFIA 检测结核感染 T 细胞释放 γ -干扰素 (interferon gamma, IFN- γ) 的方法, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验样本 用肝素钠抗凝管采集了 297 例患者的全血样本, 其中 175 例为已按中华医学会结核病学分会制定的《肺结核诊断和治疗指南》^[4] 确诊的结核病患者, 包括 73 例结核分枝杆菌阳性肺结核患者, 77 例结核分枝杆菌阴性肺结核患者和 25 例肺外结核患者; 另 52 例为呼吸道疾病以外的非结核患者组, 70 例为非结核呼吸道疾病 (含肺癌) 患者。

1.2 试剂和仪器 链霉亲和素购于菲鹏股份有限公司; 捕获 IFN- γ 单克隆抗体和生物素标记 IFN- γ 单克隆抗体购于荷兰 MabTech 公司; 早期分泌抗原靶蛋白 6 (early secreting antigen target 6, ES-AT6) 和培养滤液蛋白 10 (culture filtrate protein-10, CFP-10) 购于厦门万泰凯瑞生物技术有限公司; 牛血清清蛋白购于天津康源生物技术有限公司, 植物血凝素 L 和重组 IFN- γ 抗原购于美国 Sigma 公司; N¹-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙

酸铂钠购于美国 PerkinElmer 公司; 截留分子量为 10 000 的超滤离心管购于美国 Millipore 公司; 2.0 ml 无内毒素离心管购于美国 Thermo Fisher 公司; 肝素钠抗凝管购于广州阳普医疗科技股份有限公司; 96 孔微孔板购于深圳市金灿华实业有限公司; 编号 87/586 的 IFN- γ 生物参考标准品购于英国国家生物制品检定所; 丙烯葡聚糖凝胶 SephacryTM S-200 购于通用电气医疗系统贸易发展 (上海) 有限公司; 增强液、浓缩洗液和实验缓冲液由广州市丰华生物工程有限公司提供; 其他试剂为国产分析纯; 结核感染 T 细胞检测试剂盒 (体外释放酶联免疫法) 购于北京万泰生物药业股份有限公司。DHP-9052 型恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司), TDL-500C 低速离心机 (山东百欧医疗科技有限公司), DEM-III 型全自动酶标洗板和 AutoTRFIA 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)。

1.3 方法

1.3.1 校准品的制备: 以 IFN- γ 国际生物参考标准品为对照, 将重组 IFN- γ 抗原用 50 mmol/L, pH 7.80 Tris-HCl 溶液 (含 50.0 g/L 牛血清清蛋白和 0.5 g/L 叠氮钠) 配制成 A~F 的 6 个校准品溶液, 其浓度分别为 0, 10, 40, 200, 1 000, 5 000 pg/ml。单位换算为 1 IU/ml \approx 50 pg/ml。

1.3.2 固相抗体包被板的制备: 将捕获 IFN- γ 单克隆抗体用 10 mmol/L, pH 4.5 磷酸盐缓冲液稀释至最适工作浓度作为包被液。将浓缩洗液用纯化水稀释 25 倍后作为洗涤工作液。含有 10.0 g/L 牛血清清蛋白的 50 mmol/L, pH 7.8 磷酸盐缓冲液作为封闭液。在 96 孔微孔板各孔中加入 150 μ l 包被液, 2~8 $^{\circ}$ C 过夜孵育 22 \pm 2 h, 弃去包被液。用洗涤工作液洗涤 1 次, 然后每孔加入 250 μ l 封闭液, 37 \pm 1 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 3 h, 弃去封闭液, 真空抽干过塑冷藏。

1.3.3 酶标记物的制备: 将 1 mg 的链霉亲和素加入截留分子量为 10 000 的超滤离心管中, 10 000 r/min 离心 9~10 min。再用 50 mmol/L, pH 9.6 的碳酸盐缓冲液重复离心洗涤 3~5 次。将处理好的 1 mg 链霉亲和素加入含有 1 mg N¹-(P-异硫氰

基苄基)-二乙三胺四乙酸铀钠冻干粉小瓶中, 2~8℃避光缓慢振荡孵育 72 ± 2 h, 标记反应液用 50 mmol/L, pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sephacry™ S-200 柱(0.5 cm×30 cm)层析, $A_{280\text{nm}}$ 监测收集第一洗脱峰。

1.3.4 生物素标记抗体的制备: 将生物素标记 IFN- γ 单克隆抗体用 50 mmol/L, pH 7.80 Tris-HCl 溶液(含 50.0 g/L 牛血清清蛋白和 0.5 g/L 叠氮钠)稀释成工作浓度。

1.3.5 培养管的制备: 配制含有 50 g/L 牛血清清蛋白的 50 mmol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液作为刺激物稀释液。在无内毒素离心管中直接加入 10 μ l 刺激物稀释液, 作为空白对照管 N。将 ESAT6 和 CFP-10 在同一容器中分别用刺激物稀释液稀释成 3 mg/L, 然后取 10 μ l 加入无内毒素离心管中, 作为测试管 T。将植物血凝素 L 用刺激物稀释液稀释成 5 mg/L, 然后取 10 μ l 加入无内毒素离心管中, 作为阳性对照管 P。

1.3.6 IFN- γ 体外释放: 按空白对照管 N, 测试管 T 和阳性对照管 P 的顺序, 在 3 种培养管中分别加入 1 ml 全血样本(肝素钠抗凝), 立刻颠倒混匀 6 次以上, 使内容物与血液充分混匀。将以上加有全血的 3 种培养管放入恒温培养箱(37 ± 1 ℃)中培养 16~24 h。培养结束后, 将培养管以 3 000~5 000 r/min 的转速离心 10 min, 取各培养管中的血浆以待检测 IFN- γ 浓度。

1.3.7 IFN- γ 定量检测: 将浓缩洗液用纯化水在干净的容器中按体积比 1:25 倍稀释, 作为洗涤工作液加入洗板机中备用。吸取 100 μ l 的校准品或待测样本依次加入固相抗体包被板的微孔中, 在室温下缓慢振荡孵育 45 min。用洗板机洗涤 5 次, 拍干。再向每孔中加入 100 μ l 生物素标记抗体工作液, 在室温下缓慢振荡孵育 45 min。用洗板机洗涤 5 次, 拍干。向每孔中加入 100 μ l 标记物工作液, 在室温下缓慢振荡孵育 15 min。用洗板机洗涤 6 次, 拍干。向每孔中加入增强液 100 μ l, 于室温下缓慢振荡 5 min 后在 TRFIA 仪上检测荧光计数值(counts per second, CPs), 30 min 内完成检测, 并用配套的软件进行结果分析。

1.3.8 参比方法操作: 结核感染 T 细胞检测试剂盒(体外释放酶联免疫法)作为参比试剂。严格按试剂和仪器说明书操作检测。

1.3.9 判断标准: 检测样本时, 自建 TRFIA 和体外释放酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)均按 SN/T 3312-2012 行业标准^[5]中的结果判定与报告方法, 对结果进行判读。

1.3.10 方法评价: 按参考文献[6,7]方法对自建

TRFIA 的剂量-反应曲线、精密度、检测低限、生物检测限、功能灵敏度、线性、准确度、特异度等进行评价, 并与 ELISA 进行方法学比对。

1.4 统计学分析 结果数据采用 SPSS13.0 和 Microsoft Excel 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两种方法间结果比较采用 χ^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 抗体和标记物使用浓度或稀释度 经方阵(棋盘)滴定法, 当捕获抗体浓度为 5.0 μ g/ml, 生物素标记抗体工作稀释度为 1:1 800 和铀标记物工作稀释度为 1:500 时, 本底良好(< 1 300 CPs), 校准品 B~F 的 CPs 分别与校准品 A 的 CPs 比值均趋于最大, 因此捕获抗体使用浓度为 5.0 μ g/ml, 生物素标记抗体使用工作稀释度为 1:1 800 和铀标记物使用工作稀释度为 1:500。

2.2 剂量-反应曲线 见图 1。自建 TRFIA 采用双对数(Log-LogB)数学模型及三次样条插值(spline)拟合分析, 剂量-反应曲线的线性相关系数(correlation coefficient, r)可达 0.990 0 以上。

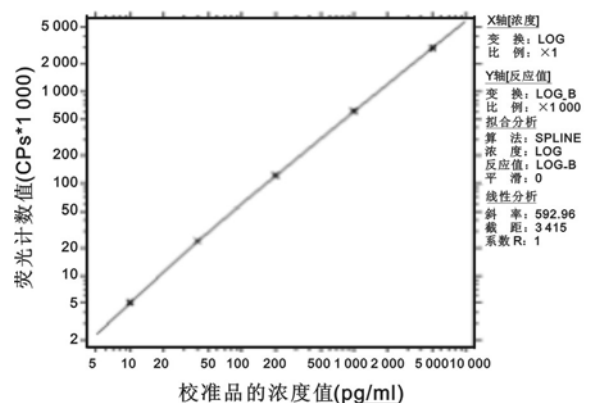


图1 TRFIA 检测 IFN- γ 的剂量-反应曲线

2.3 精密度 自建 TRFIA 实验内测定 16, 112, 325 pg/ml 的 IFN- γ 国际生物参考标准品各 20 次, 其结果分别为 16.64 ± 0.74 , 118.12 ± 2.97 和 337.14 ± 12.19 pg/ml, 实验内变异系数(coefficient of variation, CV)分别为 4.45%, 2.51% 和 3.62%。实验间测定 20 次, 其结果分别为 16.60 ± 0.95 , 110.28 ± 4.86 和 307.50 ± 26.49 pg/ml, 其实验间 CV 分别为 5.72%, 4.41% 和 8.61%。

2.4 检测低限 自建 TRFIA 平行检测校准品 A 20 次的荧光值($\bar{x} \pm s$)为 $1\ 030 \pm 132$ CPs; 95% 的可信限($\bar{x} \pm 2s$)为 1 294 CPs, 在剂量-反应曲线上拟合得到的浓度值 0.69 pg/ml, 即检测低限。

2.5 生物检测限 检测限样品 0.45, 0.90, 1.80, 3.60 和 7.20 pg/ml, 采用自建 TRFIA 日间检测 20 次, 在 0.90 pg/ml IFN- γ 组 99.7% 的可能性出现的最低荧光值为 (1 365 - 3 × 296) CPs, 即 477 CPs, 已大于空白荧光值平均值可能有的最高值 (132 × 3) CPs, 即 396 Cps, 说明 0.90 pg/ml 的样品 CPs 值有 99.7% 的可能性, 一定大于空白的 CPs 值, 能定量地报告结果。0.90 pg/ml 为自建 TRFIA 检测 IFN- γ 的生物检测限。

2.6 功能灵敏度 检测限样品 0.45, 0.90, 1.80, 3.60 和 7.20 pg/ml, 采用自建 TRFIA 日间检测 20 次, 在 1.80 pg/ml IFN- γ 组的荧光值为 1 744 ± 318 CPs, 日间 CV 为 18.23%, 小于并接近 20%。因此, 自建 TRFIA 检测 IFN- γ 的功能灵敏度为 1.80 pg/ml。

2.7 线性 自建 TRFIA 检测 2, 10, 40, 200, 1 000 和 5 000 pg/ml 的 IFN- γ 线性评价样品, 实测浓度与理论浓度的线性回归方程为 $Y = 0.9938X + 1.3166$, $r = 1$ 。

2.8 准确度 自建 TRFIA 检测浓度为 2, 10, 40, 200, 1 000 和 5 000 pg/ml 的 IFN- γ 国际生物参考标准品, 实测值与标示值的相对偏倚在 -1.79% ~ 4.60% 内。

2.9 干扰试验 自建 TRFIA 检测添加以下干扰物的血浆样本与添加等体积生理盐水的对照样本, 结果间偏倚在 ±10% 范围内。干扰物质: 肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素 (interleukin, IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IL-21, IL-32, IFN- ω , IFN- α , 胆红素, 血红蛋白和三酰甘油, 干扰限浓度分别达 116 pg/ml, 790 pg/ml, 62 pg/ml, 44 pg/ml, 1 034 pg/ml, 2 192 pg/ml, 13 pg/ml, 476 pg/ml, 442 pg/ml, 2 050 pg/ml, 280 pg/ml, 56.6 pg/ml, 500 pg/ml, 3 600 pg/ml, 818 μ mol/L, 180 g/L 和 21.54 mmol/L。

2.10 方法学比对试验 检测 297 例临床样本, 以临床诊断为金标准, 自建 TRFIA 在结核病组的灵敏度可达 85.71%, 在非结核病组人群中的特异度可达 84.43%, 一致率可达 85.19%。自建 TRFIA 与 ELISA 检测临床样本阳性符合率达 100%, 阴性符合率达 99.22%, 总符合率为 99.66%, κ 为 0.9931, 具有高度一致 ($\kappa > 0.75$)。自建 TRFIA 与 ELISA 的阳性检出率结果差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0$, $P > 0.05$)。1 例自建 TRFIA 检测阳性而 ELISA 检测阴性的标本为住院结核分枝杆菌阴性肺结核组患者样本。见表 1。

表 1

TRFIA 与 ELISA 的检测结果比较

临床诊断分组	受检人数	TRFIA		ELISA	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
结核分枝杆菌阳性肺结核组(a)	73	66	90.41	66	90.41
结核分枝杆菌阴性肺结核组(b)	77	64	83.12	63	81.82
肺外结核组(c)	25	20	80.00	20	80.00
呼吸道疾病以外的非结核患者组(d)	52	7	13.46	7	13.46
非结核呼吸道疾病(含肺癌)组(e)	70	12	17.14	12	17.14
合计	297	169	56.90	168	56.57

注: 临床诊断分组中, TRFIA 与 ELISA 的阳性检出率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。临床诊断分组间, TRFIA 的阳性检出率: a 与 b, a 与 c, b 与 c, d 与 e 间差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 1.725, 1.034, 0.003, 0.308$, 均 $P > 0.05$); a 与 d, a 与 e, b 与 d, b 与 e, c 与 d, c 与 e 之间差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 74.015, 77.371, 60.856, 63.912, 32.828$ 和 32.582 , $P < 0.05$); ELISA 的阳性检出率: a 与 b, a 与 c, b 与 c, d 与 e 之间差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 2.298, 1.034, 0.009$ 和 0.308 , 均 $P > 0.05$); a 与 d, a 与 e, b 与 d, b 与 e, c 与 d, c 与 e 间差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 74.015, 77.371, 58.438, 61.375, 32.828$ 和 32.582 , 均 $P < 0.05$)。

3 讨论 目前诊断结核病的常见方法有镜检法、菌培养法、结核菌素试验、血清学检测方法和影像学检查等。镜检法的阳性率低, 培养法试验周期长, 不能满足临床的要求^[8,9]。结核菌素试验是目前广泛应用且可以辅助诊断潜伏性结核菌感染的方法, 然而, 有些感染者对结核菌素是无反应的。此外, 接种卡介苗, 感染非致病性分枝杆菌, 以及其他因素, 会导致非结核分枝杆菌感染者结核菌素试验阳性。血清学检测方法中的抗体免疫反应的延迟性导致早期结核病诊断结果易产生假阴性, 同时共同抗原导致的交叉反应以及不能区分非结核分枝杆菌都会导致假阳性患者接受不必要的治疗, 耽

误了真正治疗时机^[9], 世界卫生组织也发出正式声明, 要求禁止将血清学检测方法用于肺结核和肺外结核的诊断^[10]。影像学检查仅对活动性肺结核诊断具有参考价值, 对肺外结核诊断存在困难。因此, 寻找一种敏感度高、特异度高、快速、简便的结核诊断方法成为人们研究的焦点^[8]。

TB-IGRAs 是通过结核分枝杆菌特异抗原所引发的免疫应答反应来实现的, 使用 ESAT6 和 CFP-10 作为特异性刺激抗原, 所有的卡介苗菌株及绝大部分的非结核分枝杆菌 (堪萨斯分枝杆菌, 苏尔加分枝杆菌, 海氏分枝杆菌除外) 不含有这 2 种蛋白质。感染结核分枝杆菌复合群患者的血液

中通常含有能够识别这2种蛋白质和其它分枝杆菌抗原的淋巴细胞,这一识别过程伴随着IFN- γ 的合成和分泌。定量检测和分析免疫应答反应产生的IFN- γ 的浓度,可以判断受试者是否具有针对结核分枝杆菌特异的T细胞免疫反应。2018年实施的《中华人民共和国卫生行业标准—肺结核诊断》中在免疫学检查中增加了IGRAs^[11],肯定了IGRAs的临床价值。

目前市面上的TB-IGRAs试剂盒有两大类,一种为酶联免疫斑点法,另一种为体外释放ELISA。酶联免疫斑点法作为集细胞生物学和免疫学检测技术为一体的新型检测技术,对实验条件、操作技术和质量控制要求很高,其实验体系中的外周血单个核细胞分离、加入活体细胞数量、细胞孵育条件、结果判定等全程质量控制,是决定实验成败的关键所在^[12]。体外释放ELISA操作相对简便,但采用酶作为检测示踪物,灵敏度较低,线性范围较窄。本研究基于TRFIA建立的TB-IGRAs,采用全血培养,无需分离外周血单个核细胞,操作相对简便,自动化程度高,检测精密度良好,灵敏度高,优于ELISA参比试剂(分析灵敏度为2 pg/ml);线性范围宽,上限明显高于ELISA参比试剂(检测上限为400 pg/ml),有利于高值样本的准确检测,准确度高,特异度强,自建TRFIA检测临床样本与ELISA参比试剂在临床试验中具有等效性,自建TRFIA可以满足临床需要。

参考文献:

- [1] 李亮,唐神结,杜建,等.结核病防控年度回顾及展望(2016年)[J].中华结核和呼吸杂志,2017,40(1):11-15.
Li L, Tang SJ, Du J, et al. Annual review and outlook for tuberculosis prevention and control (2016) [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2017, 40(1): 11-15.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会疾病预防控制中心. 2016年全国法定传染病疫情概况[EB/OL]. <http://www.nhfp.gov.cn/jkj/s3578/201702/38ca5990f8a54ddf9ca6308fec406157.shtml>, 2017-02-23.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Overview of the national legal infectious disease epidemic in 2016 [EB/OL]. (2017-02-23). <http://www.nhfp.gov.cn/jkj/s3578/201702/38ca5990f8a54ddf9ca6308fec406157.shtml>.
- [3] 尹青琴,申阿东.不同国家 γ 干扰素释放试验临床应用指南的概述[J].国际呼吸杂志,2011,31(21):1663-1666.
Yin QQ, Shen AD. Outline of interferon gamma release assays clinical application guidelines in different countries [J]. International Journal of Respiration, 2011, 31(21): 1663-1666.
- [4] 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[J].中国实用乡村医生杂志,2013,20(2):7-11.
Chinese Medical Association Tuberculosis Branch. Tuberculosis diagnosis and treatment guidelines [J]. Chinese Practical Journal of Rural Doctor, 2013, 20(2): 7-11.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3312-2012 结核分枝杆菌 γ -干扰素体外检测方法[S].北京:中国标准出版社,2013:1-8.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. SN/T 3312-2012 In vitro detection for mycobacterium tuberculosis-interferon- γ [S]. Beijing: China Standard Press, 2013: 1-8.
- [6] 谭玉华,孙宝清.总免疫球蛋白E时间分辨荧光免疫分析法的建立与评价[J].重庆医学,2014,43(33):4490-4493,4497.
Tan YH, Sun BQ. Establishment and evaluation of time resolved fluoroimmuno assay for quantification of total immuno globulin E [J]. Chongqing Medicine, 2014, 43(33): 4490-4493, 4497.
- [7] 谭玉华,孙宝清. TRFIA法检测总免疫球蛋白E的分析灵敏度及可报告范围的建立[J].山东医药,2013,53(46):21-24.
Tan YH, Sun BQ. Establishment of analysis sensitivity and reportable range of total immunoglobulin E detected by time-resolved fluoroimmunoassay [J]. Shandong Medical Journal, 2013, 53(46): 21-24.
- [8] 张培莉,刘义庆,邵婧,等.结核感染T淋巴细胞IFN- γ 释放实验临床检测分析[J].现代检验医学杂志,2017,32(1):22-25,29.
Zhang PL, Liu YQ, Shao J, et al. Interferon gamma release assays from T lymphocytes in patients with tuberculosis infection [J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(1): 22-25, 29.
- [9] 居金宏.结核分枝杆菌检测技术研究进展[J].微生物前沿,2014,9(3):64-69.
Ju JH. Research progress in detection technology of *Mycobacterium Tuberculosis* [J]. Advances in Microbiology, 2014, 9(3): 64-69.
- [10] World Health Organization. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: policy statement [S]. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2011: 1-70.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS288-2017肺结核诊断[S].北京:中国标准出版社,2018:1-24.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. WS288-2017 Diagnosis for pulmonary tuberculosis [S]. Beijing: China Standard Press, 2018: 1-24.
- [12] 蒋俊.结核分枝杆菌感染T细胞斑点试验的质量控制与质量保证[J].中国防痨杂志,2014,36(5):380-384.
Jiang J. Quality control and quality assurance of T-SPOT. TB [J]. Chin J Antituberc, 2014, 36(5): 380-384.

收稿日期:2018-08-09

修回日期:2018-09-23