

时间分辨荧光分析法测定抗原培养滤液蛋白 10 对结核性胸腔积液诊断的临床研究

王雪梅,周松林,熊国亮

(江西省胸科医院内科,江西 南昌 330006)

摘要:目的 探讨时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)测定抗原培养滤液蛋白 10(CFP10)对于早期诊断结核性胸腔积液的临床价值。**方法** 选择 106 例结核性胸腔积液病例与 40 例非结核性胸腔积液病例的胸腔积液标本。建立 TRFIA 法检测胸腔积液中 CFP10 抗原,并与酶联免疫吸附法(ELISA)的检测结果比较。**结果** TRFIA 法对 CFP10 抗原的平均回收率为 96.87%,标准曲线相关系数 $r^2=0.998$,平均批内变异系数(CV)与批间 CV 分别为 2.98% 及 4.20%,TRFIA 法检测观察组 CFP10 的 Log 浓度为 $(1.924 \pm 0.57) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,对照组为 $(0.108 \pm 0.03) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,两组比较差异有统计学意义($t=24.72, P<0.01$)。观察组 ROC 曲线的 AUC=0.923。取临界值为 $11.86 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,灵敏度与特异度分别为 95.28% 与 92.50%,均高于 ELISA 法。**结论** TRFIA 法测定结核性胸腔积液中 CFP10 蛋白具有很高的灵敏度与特异度,有利于早期诊断结核性胸腔积液。

关键词: 时间分辨荧光免疫分析法;抗原培养滤液蛋白 10;结核性胸腔积液;抗原

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.03.017

Clinical study of tuberculous pleural effusion diagnosis by detecting CFP10 with time-resolved fluorometric immuno assay

WANG Xuemei, ZHOU Songlin, XIONG Guoliang

(Department of Internal Medicine, Jiangxi Chest Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To probe the clinical value of time-resolved fluorometric immuno assay (TRFIA) in detecting CFP10 for early diagnosing tuberculous pleural effusion. **Methods** The specimen of pleural effusions from 106 patients of tuberculous pleural effusion and 40 patients of non-tuberculous pleural effusion were collected. TRFIA method was set up to detect CFP10 antigen in pleural effusion, and the results were compared with those of ELISA. **Results** The mean recovery rate of TRFIA to CFP10 was 96.87% ($r^2=0.998$). The mean inter and intra assay CVs were 2.98% and 4.20% respectively. With TRFIA method, the Log concentration of CFP10 in patients group [$(1.924 \pm 0.57) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$] was higher than that of control group [$(0.108 \pm 0.03) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$], and the difference was significant ($t=24.72, P<0.01$). AUC for ROC curve in patients group was 0.923. As the critical value was $11.86 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, the sensitivity and specificity of TRFIA were 95.28% and 92.50% respectively, both of which were higher than those of ELISA. **Conclusions** Detection of CFP10 in tuberculous pleural effusion with TRFIA has high sensitivity and specificity, and it is in favor of early diagnosis of tuberculous pleural effusion.

Keywords: time-resolved fluorometric immuno assay; culture filtrate protein antigen 10; tuberculous pleural effusion; antigen

胸腔积液是临床常见的病症,是结核性与恶性渗出性胸腔积液的主要原因。我国结核病发病率高,结核性胸腔积液是最常见的肺外结核^[1-2],胸腔积液结核杆菌培养或涂片使结核性胸腔积液的诊断与鉴别诊断比较困难,检测抗酸杆菌的阳性率偏低^[3-4]。抗原培养滤液蛋白 10(CFP10)是结核分枝杆菌感染早期分泌的蛋白,为致病型结核分枝杆菌特有,可作为活动性结核的标志物,在非致病分枝杆菌及卡介苗(BCG)中缺失^[5],检测 CFP10 能避免因感染非致病分枝杆菌或者卡介苗而出现假阳性的现象^[6]。时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)具有高灵敏度、可定量等特点,可作为一种免疫学检

查方法,其线性范围宽、成本低、稳定性强^[7]。目前国内尚未有诊断结核性胸腔积液采用 TRFIA 测定 CFP10 的相关报道,本研究旨在建立该检测方法,为结核性胸腔积液的早期诊断提供技术支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 1 月—2016 年 6 月在江西省胸科医院住院的结核性胸腔积液 106 例患者为观察组,其中男性 80 例,女性 26 例,年龄 16~85 岁,平均年龄 (55.04 ± 19.48) 岁。另选择同期住院的非结核性胸腔积液 40 例患者为对照组,包括 18 例癌性胸腔积液和 22 例其他感染性胸腔积液。其中男性 27 例,女性 13 例,年龄 15~84 岁,平均年

龄(58.70 ± 18.02)岁。两组的年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 纳入和排除标准 纳入标准:观察组胸膜活检可见结核结节;表现有盗汗、食欲下降、发热、全身乏力等结核症状;经抗结核治疗后症状缓解;纯化蛋白衍生物试验结节大于 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$;符合胸腔积液 Light 标准对渗出性胸腔积液的判断,胸腔积液细胞学检测主要为淋巴细胞。术前均未接受抗结核治疗。本研究获医院伦理评审委员会批准,研究对象均签署知情同意书。排除标准:患有恶性肿瘤、严重肝肾脏器病变、合并急慢性炎症感染疾病、自身免疫系统疾病。

1.3 仪器与试剂 全自动时间分辨荧光免疫分析仪(1235 Auto DELFIA,美国 Perkin Elmer 公司),全自动酶联免疫分析仪(Wellscan MK2,芬兰 Denley Dragon 公司),发光增强液(美国 Perkin Elmer 公司),Sephacryl S200 柱(美国 GE 公司), Eu^{3+} 标记试剂盒及 CFP10 单克隆抗体由杭州启泰生物技术有限公司提供,结核分枝杆菌 CFP10 ELISA 试剂盒及结核抗体试剂由上海双赢生物有限公司提供,牛血清白蛋白(BSA)由上海生物制品研究所提供。患者入院后在治疗前均抽取胸腔积液 20 mL,并采集空腹静脉血 5 mL 用于酶联免疫吸附法(ELISA)检测, -20°C 保存。

1.4 研究方法

1.4.1 固相包被抗体制备 用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH}=9.6$ 的碳酸盐缓冲液将 CFP10 单克隆抗体稀释至浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,然后于 96 孔微孔板每孔中加入 $200 \mu\text{L}$, 4°C 保存过夜,将包被液倾去并洗涤 1 次,采用去金属离子的 1% 牛血清白蛋白(BSA)加磷酸盐吐温缓冲液于 37°C 封闭 2 h。弃去封闭液,洗涤后真空抽干,于 -20°C 冷冻保存。

1.4.2 Eu^{3+} 标记抗体制备 将 Eu^{3+} -DTTA 用超纯水复融并配制成 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 Eu^{3+} -DTTA 溶液;将 CFP10 单克隆抗体于 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH}=9.5$ 的强有力的化学结合力(CBS)内透析 24 h,以 1:3 的比例将 Eu^{3+} -DTTA 溶液在搅拌条件下加入透析好的抗体内,振荡 25 min 后避光静置于 4°C 环境下标记 48 h。过 Sephacryl S200 柱分离,洗脱液以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH}=7.8$ 的 Tris-HCl 缓冲液,确定蛋白含量,合并第 1 峰各管,同时以 Eu^{3+} 标记试剂盒检测合并峰管的 Eu^{3+} 浓度。标记率测定后稀释分装并冻干保存。

1.4.3 参考标准品的设置 将 CFP10 蛋白 0.4 mL 相继等倍稀释直到确定临界点,通过对数曲线确定

线性范围为 $2.5 \sim 1\,800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,最终确定 5 个标准品,将 CFP10 配制为浓度分别为 2.5、25、100、500、 $1\,800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液,按每瓶 1 mL 分装后冻干,于 -20°C 冷冻保存。

1.4.4 TRFIA 法检测 CFP10 抗原 采用双抗体夹心法,将 $100 \mu\text{L}$ 标准品或胸腔积液标本加入包被了 CFP10 蛋白单克隆抗体的微孔中, 20°C 振荡孵育 1 h,洗涤 3 次后,加入用分析缓冲液进行 1:100 稀释的 Eu^{3+} -抗 CFP10 蛋白单克隆抗体 $100 \mu\text{L}$, 20°C 振荡孵育 1 h,洗涤 5 次。滴入增强液 $100 \mu\text{L}$,振荡 10 min,于荧光检测仪上测定荧光值,最后依据标准曲线计算出标本中 CFP10 蛋白的含量。

1.4.5 Eu^{3+} 标记抗体标记率测定 将做好标记的抗体原液在紫外分光光度计上测吸光度 OD 值,以 280 nm 为标准,OD 值为 0.51。采用增强液将标记原液稀释后测定荧光值,参考试剂盒提供的标准品。

1.5 统计学方法 应用 SPSS22.0 统计软件分析纳入数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以独立样本 t 检验;计数资料以例(%)表示,用 Pearson χ^2 检验;并采用 ROC 曲线进行诊断效能分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 回收率比较 取含量为 $116.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CFP10 蛋白的胸腔积液依次加入浓度为 25、100、500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准参考品中进行回收试验,回收率分别为 96.84%、96.32%、97.45%,平均回收率为 96.87%。

2.2 剂量-反应曲线 CFP10 抗原-TRFIA 剂量-反应曲线的标准低点与标准高点的荧光计数相差大于 2 个数量级,荧光计数值与被测物的含量成算术级数正比例关系,曲线拟合相关系数 $r^2=0.998$,见图 1。

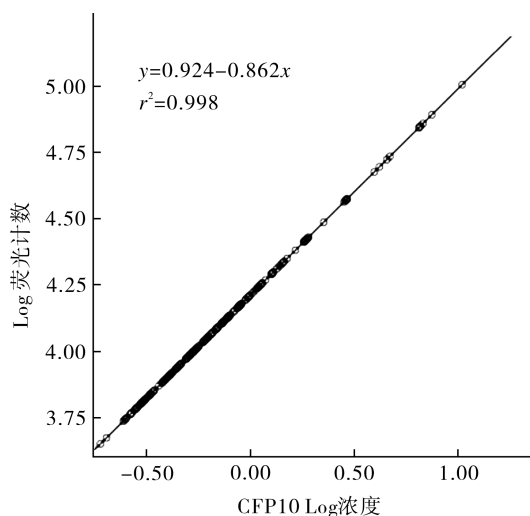


图1 CFP10 抗原的 TRFIA 标准曲线

2.3 精确度 TRFIA 法的平均批内 CV 与平均批

表1 TRIFA 与 ELISA 的精确度比较 (n = 25)

浓度	ELISA		TRFIA		ELISA		TRFIA	
	批内 A 值	批内 CV/%	批内浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	批内 CV/%	批间 A 值	批间 CV/%	批间浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	批间 CV/%
高	2.764	5.02	627.75	3.24	2.834	6.34	708.26	4.67
中	1.823	6.23	284.67	2.67	1.861	7.52	297.04	3.48
低	0.912	7.56	42.84	3.04	0.973	9.35	45.47	4.15

间 CV 分别为 2.98% 及 4.20%, 分别优于 ELISA 法的 6.27% 及 7.74%, 且 TRFIA 法不同浓度的批内 CV 与批间 CF 均低于 ELISA 法的相应浓度值, 见表 1。

2.4 灵敏度 以浓度不同的 CFP10 蛋白(2.5、5、10、25、50、100、500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行检测, TRFIA 法的最低检出浓度为 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 ELISA 法的最低检出浓度为 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取检测荧光值较高的 1 例结核性胸腔积液患者的胸腔积液标本, 倍比稀释至 1:32 768, 同时用 ELISA 法与 TRFIA 法检测 CFP10 蛋白抗原, TRFIA 法在 1:16 384 结果仍为阳性, 有检测出抗原; 而 ELISA 法的结果在 1:4 096 时已为阴性。

2.5 TRFIA 法临界值 TRFIA 法检测观察组 CFP10 的 Log 浓度为 (1.924 ± 0.57) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对照组的 Log 浓度为 (0.108 ± 0.03) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 两组比较差异有统计学意义 ($t = 24.72, P < 0.01$)。对观察组绘制 ROC 曲线, 曲线下面积 (AUC) 为 0.923, 见图 2。取临界值为 11.86 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 灵敏度与特异度分别为 95.28% 与 92.50%, 总一致率为 94.52%; 阳性预测值与阴性预测值分别为 97.12% 和 88.10%。ELISA 法以 29.52 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为临界值时, 灵敏度与特异度分别为 86.79% 和 85.00%, 低于 TRFIA 法。具体数据见表 2。

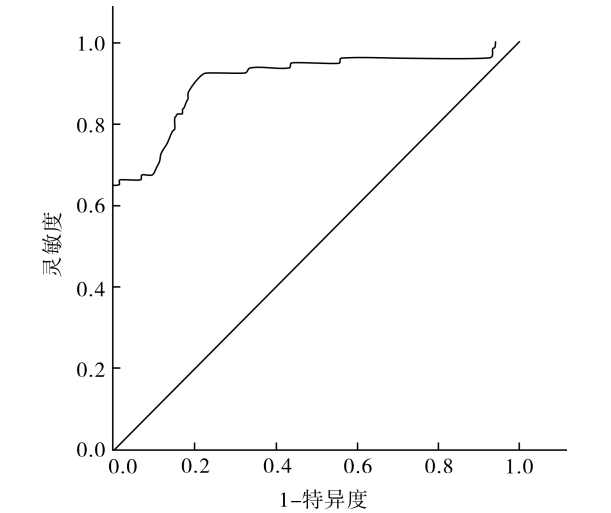


图2 TRFIA 法灵敏度与特异度

表2 TRFIA 与 ELISA 对结核性胸腔积液中 CFP10 的检出情况

检测方法	结果	确诊结果/例(%)		合计
		阳性	阴性	
TRFIA	阳性	101(95.28)	3(7.50)	104
	阴性	5(4.72)	37(92.50)	42
ELISA	阳性	92(86.79)	6(15.00)	98
	阴性	14(13.21)	34(85.00)	48
合计		106	40	146

3 讨论

胸腔积液是指由胸膜、肺脏以及肺外疾病引起的过多液体体积聚在胸膜腔内^[8], 胸腔积液可由多种因素导致, 目前临床最为常见的是结核性与恶性胸腔积液。结核性胸腔积液是引起渗出性胸腔积液的重要病因, 作为结核病的高发地区, 本病的治疗亟待解决。在胸腔积液的发展过程中, 多种因素在其中发挥着重要的调节与介导作用, 结核性与恶性胸腔积液中的差异尤其显著, 因此可以根据其鉴别胸腔积液性质。结核性分枝杆菌 CFP-10 是自结核分枝杆菌的早期培养滤液中, 可产生多种分泌性蛋白, 是一种低分子量蛋白质^[9]。其能编码产生 CFP10 这一特异性培养滤液蛋白, 具有 RD1 特异性基因序列^[10-11], 该区仅存在于极少数致病性分枝杆菌内, 包括苏尔加分枝、结核分枝杆菌复合群、堪萨斯分枝杆菌等, 并不是所有的致病性分枝杆菌与卡介苗都都特异性地缺失 RD1 序列^[12], 具有良好的抗原性, 外周血单个核细胞产生 γ -干扰素 (IFN- γ) 及发生增殖反应, 作为特异性抗原诱导结核菌素试验 (PPD) 皮肤试验阳性者的良好指示剂。感染结核分枝杆菌后, 并不是马上存在结核抗原, 而需要一定的时间, 一般感染 8 周后才逐渐出现, 因此检测快速诊断结核性胸腔积液的有效方法是对胸腔积液中的结核性分枝杆菌所分泌特异性抗原, 结核感染的诊断研究中以 CFP-10 为目标抗原检测为重要指标不断受到关注^[13-14]。

TRFIA 是一种超微量的免疫分析检测方法,采用具有独特荧光特点的镧系元素离子及其螯合物标记抗原或抗体。由于能达到原子水平标记,对标记物的影响非常低,因此其灵敏度非常高,极大程度减少了非特异性结合^[15]。TRFIA 的特异性荧光的衰变时间非常长,是传统荧光的 $10^3 \sim 10^6$ 倍,由于其具有独特的荧光特性,TRFIA 法与现有的放免法、化学发光法等临床常用检测相比,具有灵敏度高、操作简易、重复性好、标准曲线范围宽、标记物稳定、没有放射性污染、不被样本自然荧光干扰等特点与优势。对于相同批次检测的试剂,由于 TRFIA 有着稳定性,可使用两点定标或通过设定参考曲线标记,大大降低了检测成本,提高了检测效率。

本研究结核性胸腔积液应用 TRFIA 方法检测 CFP10 蛋白抗原含量,检测范围远较 ELISA 法宽,最低检出浓度仅为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。灵敏度达到满意的水准,是良好的定量诊断试剂。本研究显示 TRFIA 法的灵敏度 95.28% 与特异度 92.50%,均高于 ELISA 方法检测值,与李新玲等^[6] 研究结果比较一致。总诊断一致率可高达 94.52%,说明 TRFIA 法对结核性胸腔积液能获得满意的诊断效果,检测 CFP10 抗原具有非常高的准确性。ROC 曲线不受发病率与诊断界值的影响,作为一种经典的诊断试验评价曲线,它综合反映了特异性、敏感性,曲线随诊断界值变化的动态改变,诊断价值高时 AUC 应大于 0.9,其价值可根据 AUC 的大小来评价。通过分析得出 ROC 曲线 AUC 为 0.923,提示结核性胸腔积液采用 TRFIA 法可获得较高的诊断价值。

综上所述,胸腔积液中采用 TRFIA 法测定 CFP10 蛋白含量,可提高结核性胸腔积液的诊断效率,具有早期诊断优势,且优势表现为灵敏度高、特异性强,对于鉴别恶性胸腔积液、结核性有着重要的价值,值得进一步深入探讨与应用推广。

参考文献

- [1] 余碧芸,周莹艳,邵川,等. 结核感染 T 细胞斑点试验与 ADA 活性检测对结核性胸腔积液的诊断评价[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(10):2235-2238.
- [2] 刘佳庆,张立,冯爽,等. 液相芯片技术检测多种细胞因子对结

- 核性胸腔积液诊断价值的评估[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(8):562-566.
- [3] LEE SJ, KIM HS, LEE SH, et al. Factors influencing pleural adenosine deaminase level in patients with tuberculous pleurisy[J]. Am J Med Sci, 2014, 348(5):362-365.
- [4] GOPI A, MADHAVAN SM, SHARMA SK, et al. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006[J]. Chest, 2007, 131(3):880-889.
- [5] ZHANG H, PENG P, MIAO S, et al. Recombinant Mycobacterium megmatitis expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against Mycobacterium tuberculosis challenge in mice[J]. Scand J Immunol, 2010, 72(4):349-357.
- [6] 李新玲,黄怀宇,吴俊渊,等. 时间分辨荧光免疫法检测脑脊液结核分枝杆菌特异性抗原的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(18):4168-4170.
- [7] MYRYLÄINEN T, TALHA SM, SWAMINATHAN S, et al. Simultaneous detection of Human Immunodeficiency Virus 1 and Hepatitis B virus infections using a dual-label time-resolved fluorometric assay[J]. J Nanobiotechnology, 2010, 8(1):27.
- [8] 王晓娟,施焕中. 关于胸腔穿刺术的几个问题[J]. 中华结核和呼吸杂志,2015,38(7):551-552.
- [9] 阳幼荣,吴雪琼,张俊仙,等. 结核分枝杆菌 CFP10-ESAT6 重组融合蛋白抗原血清学诊断价值[J]. 中华感染控制杂志,2011,10(4):241-243,247.
- [10] 王晓玮,程筱雯,张焰,等. 结核分枝杆菌 CFP10、ESAT6 蛋白的原核表达、纯化及 ELISPOT 检测方法的建立与应用[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(9):1347-1351.
- [11] ARLEHAMN CS, SIDNEY J, HENDERSON R, et al. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c (EsxJ)[J]. J Immunol, 2012, 188(10):5020-5031.
- [12] YANG H, CHEN H, LIU Z, et al. A novel B-cell epitope identified within Mycobacterium tuberculosis CFP10/ESAT-6 protein[J]. PLoS One, 2013, 8(1):e52848.
- [13] SUTHERLAND JS, LALOR MK, BLACK GF, et al. Analysis of host responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in a multi-site study of subjects with different TB and HIV infection states in sub-Saharan Africa[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e74080.
- [14] 袁凯,梁德,吴雪琼,等. 以 CFP10/ESAT6 融合蛋白为抗原的酶联免疫斑点技术在脊柱结核感染辅助诊断中的应用价值[J]. 中国医学科学院学报,2015,37(1):44-49.
- [15] 杭建峰,吴英松,余伟鸿,等. 癌胚抗原的时间分辨免疫荧光分析及其诊断试剂的研制[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2006,22(1):121-124.

(收稿日期:2016-12-26,修回日期:2017-05-10)