

• 临床检验研究论著 •

SELEX 适配子抗体检测在结核病早期诊断中的应用研究

白广红,焦向阳,袁志敏,古翠姣,李 静

(陕西省结核病防治院检验科,陕西西安 710100)

摘要:目的 用 SELEX 技术筛选结核杆菌特异性分子的标志物的适配体,建立酶联寡核苷酸吸附试验方法检测结核菌 SELEX 适配子抗体,探讨 SELEX 适配子抗体检测在结核病早期诊断中的应用价值。**方法** 将临床确诊的肺结核病 483 例与对照组 446 例标本同步接受结核杆菌 SELEX 适配子 IgG 抗体寡核苷酸酶联免疫法检测,将测定结果与金标判定的结果进行比较。**结果** 活动性结核患者用寡核苷酸酶联免疫法检测 SELEX 适配子抗体总的敏感度为 59.6%,其中菌阳肺结核敏感度为 83.8%,菌阴肺结核敏感度为 48.1%,肺外结核的敏感度为 64.7% ($P<0.05$),诊断结核病的总的特异度为 94.4%,在非结核呼吸系统疾病中特异度为 95.2%,在健康人群组中特异度为 94.0%。**结论** 酶联寡核苷酸吸附试验检测法操作简便、快速,灵敏性高、特异性好,对结核病的早期诊断有着较高的参考价值。

关键词:分枝杆菌,结核;寡核苷酸类;早期诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)23-2848-02

The application of SELEX technology in aptamer antibody testing in early diagnosis of tuberculosis

Bai Guanghong, Jiao Xiangyang, Yuan Zhimin, Gu Cuijiao, Li Jing

(Department of Clinical Laboratory, Tuberculosis Prevention and Treatment Hospital of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710100, China)

Abstract: **Objective** To screen the typical aptamer of distinctiveness of tubercle bacillus through SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment aptamers IgG antibodies) technology; To establish the enzyme-linked oligonucleotide assay to test the typical aptamer antibody; To explore the application value of SELEX technology in aptamer antibody testing in early diagnosis of tuberculosis. **Methods** 483 cases clinically diagnosed as tuberculosis patients were compared and contrasted with 446 cases on trial. ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) was performed synchronically on the aptamer antibody tested by SELEX technology from these cases. The results were compared with those from gold standard. **Results** The total sensitivity of active pulmonary tuberculosis through immune method was 59.6%, among which positive tuberculosis sensitivity was 83.8%, negative tuberculosis sensitivity was 48.1%, extra-pulmonary tuberculosis patients was 64.7% ($P<0.05$). The specificity of the tuberculosis patients and no-tuberculosis were 94.4% and 95.2%, the specificity of the healthy group was 94.4%. **Conclusion** Enzyme-linked oligonucleotide assay detection method is simple, rapid, of high sensitivity and specificity, and of high reference value for early diagnosis of tuberculosis.

Key words: mycobacterium tuberculosis; oligonucleotides; early diagnosis

自发现结核分枝杆菌以来,人类对结核病的发病机制、药物治疗、诊断方法的研究取得了很大的进展,但现有实验室诊断方法难以满足临床需要^[1]。为了探寻快速、灵敏度高、实用的结核病血清学诊断方法,同济大学附属上海市肺科医院承担了国家科技重大专项 2008ZX10003-003“结核病药敏及快速诊断技术和产品的研究”的科研课题,本院是协作单位,负责结核杆菌 SELEX 适配子 IgG 抗体检测的寡核苷酸酶联免疫检测法的临床验证项目。现将该项目对结核病的诊断进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 标本来源 临床确诊为肺结核患者的 483 例血清标本为活动性结核组(包括菌阳肺结核 148 例,菌阴肺结核 318 例,肺外结核 17 例)。对照组分为 2 组。1 组是非结核呼吸系统疾病患者组,选择易于本病相混淆的肺癌、肺炎、支气管扩张等疾病患者血清标本 146 例。另 1 组是健康人群组,选择经体检正常的健康人群血清标本 300 例。

1.2 试剂与仪器 结核杆菌 IgG 抗体检测试剂盒(寡核苷酸酶联免疫法)试剂,上海市肺科医院结核基础实验室研制生产,RF6100 酶标分析仪。

1.3 方法

1.3.1 SELEX 适配子 IgG 抗体检测技术原理 该检测技术采用了酶联寡核苷酸吸附试验方法,用结核抗体的一种特异性适配子作为捕获适配子包被酶联板,待检血清中的 TB 抗体与捕获适配子反应,再与生物标记的另 1 种抗体适配子(检测适配子)结合,形成“捕获适配子-抗体-生物素标记检测适配子”复合物,加入链亲核素标记的辣根过氧化物酶,与复合物反应后,加底物(TMB)显色,在酶标仪上测定后根据 OD 值判定有无结核抗体的存在。

1.3.2 SELEX 适配子 IgG 抗体检测 将试剂盒移至室温平衡 30 min,每次试验设阳性对照 2 孔,阴性对照 2 孔,分别加入阳性、阴性对照每孔 100 μ L;在其余微孔反应板条孔中加入样品稀释液,每孔 100 μ L,加入待检血清 10 μ L,充分混匀后,贴上封口胶,置 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;将 20 倍浓缩洗液用蒸馏水或离子水 20 倍稀释备用;弃去各孔中样品,拍干。每孔加满洗液,静置 3 min 弃去,重复洗 5 次,拍干。每孔加入生物素标记检测适配子工作液 100 μ L,贴上封口胶;置 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;弃去各孔中检测液,用洗液反复洗涤 5 次;每孔加入链亲和素标记的辣根过氧化物酶工作液 100 μ L,贴上封口胶,置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min;弃去各孔中酶液,用洗液反复洗涤 5 次;每孔加入显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B 50 μ L,轻拍混匀,置 37 $^{\circ}$ C 避光 10

min, 显色完毕后, 每孔加入终止液 50 μ L, 轻拍混匀, 置酶标仪双波长 450/630 nm 波长处测定 OD 值。

1.3.3 结果判断 进行结果判断的 OD 值应为 OD450 nm 与 OD630 nm 的差值。本试剂盒 Cutoff 值为阴性对照均值的 2.1 倍。样本 OD 值大于或等于 Cutoff 值判为阳性。阳性对照 OD 值应大于 0.5, 阴性对照 OD 值应小于 0.1, 否则试验不成立。

1.3.4 质量控制 血清要求清亮, 无沉淀, 标本采集后 48 h 内检测, 标本贮存温度为 2~8 $^{\circ}$ C, 标本采集 48 h 后检测应将

标本冷冻。两次拿出检测之前标本必须完全解冻, 并充分混匀, 恢复置室温, 离心后检测, 避免反复冻融。要严格按照生物安全有关规定操作, 遵循实验室操作的常规规定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 进行统计分析, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

SELEX 适配子 IgG 抗体检测诊断结核病的特异度和敏感度, 见表 1。

表 1 SELEX 适配子 IgG 抗体检测结核病的特异度和敏感度

项目	活动性结核组			对照组	
	菌阳肺结核 (<i>n</i> =148)	菌阴肺结核 (<i>n</i> =318)	肺外结核 (<i>n</i> =17)	非结核呼吸系统疾病 (<i>n</i> =146)	健康人群 (<i>n</i> =300)
阳性(<i>n</i>)	124	153	11	7	18
阴性(<i>n</i>)	24	165	6	139	282
敏感度(%)	83.8*	48.1	64.7	—	—
特异度(%)	—	—	—	95.2	94.0

*: $P<0.05$, 与菌阴肺结核和肺外结核敏感性比较。—:无数据。

3 讨 论

SELEX 技术即指数富集配体的系统化技术, 利用 SELEX 技术筛选这些标志物的适体, 可用于结核病的诊断研究^[2-3]。目前已有报道, 上海市结核病(肺)重点实验室成功建立了酶联板为介质的 SELEX 体系, 并在此筛选获得了结核分枝杆菌特异性分泌抗原 ESAF6、CFP-10、MPT64 等高的亲和性适体, 为进一步利用适体进行结核病的诊断打下了基础^[4-5]。

本研究 SELEX 适配子抗体诊断活动性结核病的总敏感度为 59.6%。但在确诊的 483 例结核患者中, 40.4% 的病例 SELEX 适配子抗体检测为阴性。分析原因可能是不同人群免疫水平存在差异, 患者处于临床感染的初期, 结核抗体的产生处在“窗口期”, 研究中的 148 例菌阳患者阳性检出率为 83.8%, 明显高于菌阴患者血清阳性检出率 48.1% ($P<0.05$) 可能是由于菌阳患者体内含大量的结核杆菌, 使人体免疫系统容易发生受到结核杆菌抗原刺激, 引起比较强的免疫反应^[6]。SELEX 适配子抗体诊断结核的特异性; SELEX 适配子抗体检测诊断结核病的总特异度为 94.4%, 在非结核呼吸系统病患组, 的阳性率为 4.8%, 在健康人群组阳性率为 6%。对照组中有 5.6% 的 SELEX 适配子抗体阳性, 我国为结核病高感染国家, 不排除受试者感染的结核杆菌引起血液中结核抗体存在的可能; 也可能是由于非结核呼吸系统疾患导致机体免疫应答紊乱。评价实验方法在临床的诊断价值依赖于其阳性预测值和阴性预测值^[7]。

本研究通过酶联免疫法检测 SELEX 适配子抗体用于诊断和鉴别诊断结核病, 与传统的涂片法和培养法比较, 该方法的阳性预测值和阴性预测值明显高, 该方法可明显提高结核病的阳性检出率, 尤其适用于菌阴肺结核及不易取得细菌学检查标本的肺外结核病的诊断和鉴别诊断^[8-12]。

2005, 27(1):6-9.

[2] 张慧卿, 方念, 张焜和. 适配子筛选技术[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1):113-118.

[3] 秦莲花, 马占忠, 郑瑞娟, 等. 结核分枝杆菌 MPT64 蛋白适体的筛选与鉴定[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(1):453-458.

[4] 蔡江丽, 秦莲花, 刘忠华, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 64 抗体适体的获得及血清学检测[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(4):309-310.

[5] 蔡江丽, 秦莲花, 刘中华, 等. MPT64 抗体的适体在结核病血清学检测中的应用[J], 中华微生物学与免疫学杂志, 2010, 30(2):180-184.

[6] 端木宏谨, 屠德华, 张培元, 等. 临床技术操作规范结核病分册[M]. 北京:人民军医出版社, 2004:25-41.

[7] 王海英, 于春宝, 王燕, 等. TB-SA 抗体检测对结核病临床诊断价值的研究[J]. 中国防痨杂志, 2008, 30(1):33-35.

[8] 陈文学, 张煜和, 邹学森, 等. SELEX 法筛选鼻咽癌核酸适配子的研究[J]. 山东医药, 2012, 52(23):31-33.

[9] 邵可可, 王惠民, 马达. SELEX 技术中分离方法的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(6):463-465.

[10] 雷建平. 菌阴肺结核病诊断思考[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(12):820-821.

[11] 柏文娟, 胡忠义, 刘忠华, 等. 结核患者血清 IgG 抗体适体的制备及特异性鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(12):1111-1114.

[12] 李琳芸. 血清结核分枝杆菌抗体检测对结核病的诊断价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12):1217-1218.

(收稿日期:2012-06-19)

参考文献

[1] 胡忠义. 结核病免疫学诊断技术研究进展[J]. 中国防痨杂志,