

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

【产品名称】

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒（酶联免疫法）

【包装规格】

28 人份/盒、12 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝全血中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应。

在现有的诊断方法中，细菌学检查（包括痰涂片法和培养法）是结核病诊断的常用方法，但影像学为非特异性诊断，结果判定受主观影响较大；核酸检测法（PCR 法）虽具有较高特异性，但需要获得带菌样本（传染性强），且对实验室的技术条件要求较高。 γ -干扰素释放分析（IGRA）方法不受卡介苗接种和绝大多数非结核分枝杆菌（NTM）的干扰，受机体免疫状态影响较小，且全血样本容易获得，对实验室技术条件要求不高，临床应用方便。本产品用于临床结核病的辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒基于 γ -干扰素释放试验原理，通过检测血液中的记忆性淋巴细胞在再次接触结核分枝杆菌特异性抗原体外刺激时分泌的 γ -干扰素（IFN- γ ），判断机体内是否存在针对结核分枝杆菌的特异性 T 细胞反应。本试剂盒选择在卡介苗（BCG）菌株和大多数非结核分枝杆菌中普遍缺失的结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6 和 CFP-10 及多肽，通过基因工程技术修饰后表达成为刺激抗原，与新鲜采集的抗凝全血混合并孵育后，用酶联免疫法（ELISA）检测特异性释放的 γ -干扰素水平。IFN- γ 的检测采用双抗体夹心法，样本中的 IFN- γ 与微孔内包被的 IFN- γ 抗体和标记 HRP-IFN- γ 抗体形成夹心复合物，催化 TMB 底物生成的蓝色中间产物经 H_2SO_4 终止反应，转化为橙黄色终产物。可溶性橙色终产物在 450 nm 处达最大光吸收值，其吸光值的大小与样本中 IFN- γ 的浓度水平呈正相关，通过建立标准曲线可计算样本中 IFN- γ 的浓度。

【主要组成成分】

组份名称	主要成分	规格 (96 孔板)	规格 (48 孔板)
1. 阴性对照培养管 N	磷酸盐缓冲液（PBS）	28 支	12 支
2. 测试培养管 T	ESAT-6-CFP-10 重组抗原	28 支	12 支
3. 阳性对照培养管 P	菜豆属植物凝集素	28 支	12 支
4. 校准品(冻干粉)	重组人- γ 干扰素蛋白，牛血清白蛋白（BSA）	2 瓶	1 瓶
5. 酶标板	包被有抗人- γ 干扰素的单克隆抗体	96 孔	48 孔
6. 酶标试剂	辣根过氧化物酶标记的抗人 - γ 干扰素的单克隆抗体，防腐剂（Proclin-300）	6 mL×1 瓶	3 mL×1 瓶
7. 浓缩洗涤液(10×)	磷酸盐缓冲液（PBS），吐温-20	40 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶
8. 稀释液	磷酸盐缓冲液（PBS），吐温-20，牛血清白蛋白（BSA），酪蛋白，防腐剂（Proclin-300）	15 mL×1 瓶	8 mL×1 瓶
9. 显色剂 A 液	含过氧化氢	6 mL×1 瓶	3 mL×1 瓶
10. 显色剂 B 液	含四甲基联苯胺（TMB）	6 mL×1 瓶	3 mL×1 瓶
11. 终止液	含硫酸	6 mL×1 瓶	3 mL×1 瓶
12. 封板膜	/	2 张	2 张

注：1.封板膜不能重复使用；

2.不同批号试剂盒中组分不可以互换；

3.试剂盒中不包含，但必需的设备及试剂耗材：II 级生物安全柜、血液离心机、37℃±1℃恒温培养箱、酶标板洗板机（推荐自动洗板机）、移液器及无菌包装的一次性吸头。

【储存条件及有效期】

2-8℃保存，有效期 18 个月。

开封后的 IFN- γ 检测部分于 2-8℃保存不超过 3 周。复溶后的校准品可在 2-8℃保存 3 周。

生产日期和有效期见标签。

【适用仪器】

酶标仪（含 450 nm，630 nm 波长）。

【样本要求】

- 1、用肝素锂抗凝管无菌采集的新鲜的外周静脉全血，于 22±5℃储存和运输（全血样本不可冰浴、冰冻、剧烈振荡），16 小时内进行样本刺激。
- 2、每份检测样本的总全血量不少于 4 mL。
- 3、采集血样一旦发生污染，应按照生物安全要求销毁，重新采集血样进行检测。
- 4、经刺激后分离的血浆样品如果短期储存，可存于 2-8℃，并在 4 天内使用。样品适量分装后-20℃条件下储存 15 天，反复冻融次数不超过 3 次。

【检验方法】

一、体外全血刺激：

- 1、操作前，确保恒温培养箱恒温 37℃。
- 2、操作前，打开生物安全柜的紫外灯，照射 15-20 分钟。
- 3、核对阴性对照培养管 N、测试培养管 T、阳性对照培养管 P，平衡至室温，5000 转/分钟离心 1 分钟，确保培养管内液体集中到底部，备用。
- 4、将采集的抗凝全血颠倒混匀 10 次，吸取 1 mL 全血(1mL±0.1mL)加入相应编号的培养管中。
- 5、盖紧盖子，将反应管上下轻柔颠倒混合 10 次，至混合均匀。
- 6、将混匀后的反应管直立向上置于 37℃的恒温培养箱中孵育 20-24 小时。
- 7、培养后的培养管以 3000-5000 转/分钟离心 5 分钟，取血浆进行 ELISA 检测，注意不可吸到细胞层。

二、 γ -干扰素检测：

D) 准备工作

检测前，将试剂盒平衡至室温（30 分钟）。使用前将液体试剂轻轻震荡混匀，使用后立即密封，放回 2-8℃保存，未用完的微孔板条须与干燥剂一起用自封袋密封。开封后的 γ -干扰素检测部分于 2-8℃保存不超过 3 周。复溶后的校准品可在 2-8℃保存 3 周。

1、标准曲线准备：

人 γ -干扰素工作液的配制：向装有校准品（冻干粉）的西林瓶中，根据标签上标示的体积加入稀释液，配制成 40 IU/mL 的 γ -干扰素校准品工作液（W1）。

注意：溶解不同批次校准品所需加入稀释液的体积可能不同。

按图 1 和表 1 进行校准品的配制：

图 1：

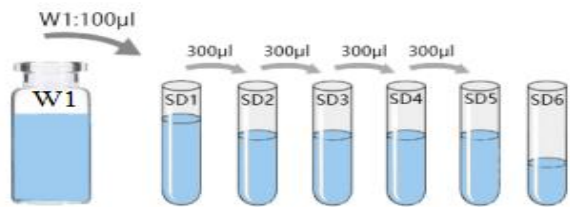


表 1

校准品	稀释液 (μL)	γ-干扰素体积 (μL)	γ-干扰素终浓度 (IU/mL)
SD1	900	W1: 100	4
SD2	300	SD1: 300	2
SD3	300	SD2: 300	1
SD4	300	SD3: 300	0.5
SD5	300	SD4: 300	0.25
SD6	300	—	—

2、1×洗涤液的制备：

将 40 mL 的浓缩洗涤液（10×）加入装有 360 mL 的去离子水的烧杯中混匀备用。

II）具体实验步骤：

1、拆封酶标板的铝箔包装，取出本次实验所需的板条，剩余部分应及时封存，避免受潮。

2、加样：

（1）分划酶标板各孔，建议布局如下表 2：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SD1	SD1	3N	5N	5T	5P	13N	13T	13P	21N	21T	21P
B	SD2	SD2	3T	6N	6T	6P	14N	14T	14P	22N	22T	22P
C	SD3	SD3	3P	7N	7T	7P	15N	15T	15P	23N	23T	23P
D	SD4	SD4	4N	8N	8T	8P	16N	16T	16P	24N	24T	24P
E	SD5	SD5	4T	9N	9T	5P	17N	17T	17P	25N	25T	25P
F	SD6	SD6	4P	10N	10T	10P	18N	18T	18P	26N	26T	26P
G	1N	1T	1P	11N	11T	11P	19N	19T	19P	27N	27T	27P
H	2N	2T	2P	12N	12T	12P	20N	20T	20P	28N	28T	28P

（2）在所有孔内每孔加入 20 μL 稀释液。

（3）加样本：样本孔（表 2 中的 NTP 孔）每孔入 50 μL 样本。

（4）标准曲线：标曲孔（表 2 中的 SD 孔），各取 50 μL 的 SD1、SD2、SD3、SD4、SD5、SD6，按顺序加入板孔中，双孔。

（5）加酶：所有孔每孔加入 50 μL 酶标试剂，轻微震荡混匀。注意：血浆样品在温育前需要混合均匀，以保证 γ-干扰素在酶标板孔内均匀分布。

3、温育：用封板膜封板后，在 37℃的恒温培养箱中温育 2 小时。

4、洗涤：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤 5 遍（250 μL/孔），最后一次尽量扣干。

5、显色：显色剂临用前配制，取等体积的显色剂 A 液与显色剂 B 液于 15 mL 试管中混合混匀，然后迅速向每孔加入 100 μL，在 37℃的恒温培养箱中避光孵育 15 分钟。

6、终止：按显色的顺序和速度，向每孔中加入 50 μL 的终止液，轻轻振荡混匀。

7、测定：终止液加入后 5 分钟内用酶标仪读取 450 nm(以 630nm 为参考) 处的 OD 值。

III）结果输出：

1、标准曲线的绘制：

应用 Microsoft Office Excel 软件，以标准曲线各点浓度的自然对数（LN）作为横坐标 X，OD 均值的自然对数（LN）作为纵坐标 Y，做 XY 散点图，添加趋势线，得到标准曲线方程式 $Y=aX+b$ 。

标准曲线计算举例如下：

IU/mL	OD1	OD2	Mean OD	LN(IU/mL)	LN(mean OD)
4	2.234	2.158	2.196	1.386	0.787
2	1.205	1.116	1.161	0.693	0.149
1	0.773	0.821	0.797	0.000	-0.227
0.5	0.452	0.478	0.465	-0.693	-0.766
0.25	0.302	0.288	0.295	-1.386	-1.221
0	0.062	0.075	0.069	—	-2.681

此例中， $Y=0.7112X-0.2556$ 。

2、结果计算

分别取样本的 N（阴性对照）、T（检测）、P（阳性对照）OD 值的自然对数（LN）Y 值，然后将其带入上述标准曲线方程，计算后得到 N、T 和 P 三个浓度值，根据标准曲线公式进行计算。

计算举例：

分类	样本 OD 450nm-OD630nm			样本浓度（IU/mL）			计算（IU/mL）		
编号	N	T	P	N	T	P	P-N	T-N	0.25*N
样本 1	0.285	1.242	2.587	0.245	1.943	5.451	5.206	1.698	0.061

按照参考公式，样本 1 为阳性。

3、若实验结果出现以下任何情况均为无效，需要重复实验：（1）标准曲线 SD1 的 OD 值低于 1.5，SD6 的 OD 值不小于 0.20；（2）标准曲线线性相关系数 $r<0.9900$ 。

【参考区间】

N(IU/mL)	P-N(IU/mL)	T-N(IU/mL)	结果判定
≤8	任何值	≥0.35 且 ≥0.25N	阳性
	≥0.5	<0.35	阴性
	≥0.5	≥0.35 但 <0.25N	阴性
	<0.5	<0.35	不确定
	<0.5	≥0.35 但 <0.25N	不确定
>8	任何值	任何值	不确定

【检验结果的解释】

1、阳性：可能存在结核感染 T 细胞免疫反应；

2、阴性：可能不存在结核感染 T 细胞免疫反应；

3、不确定：不能确定是否存在结核感染 T 细胞免疫反应；

4、不确定样本的处理：不确定的结果是非常罕见的，若怀疑与 ELISA 操作上的因素有关，可将已刺激的血浆样本重新进行 ELISA 检测。若怀疑与测试者的免疫状况有关，因过低的 P 值或过高的 N 值所造成的不确定结果预计不会在复测时改变，不确定的结果应如实报告，医生可酌情采取其他程序。

【检验方法的局限性】

- 1、样品测试结果用于辅助诊断结核病，不能作为结核病确诊或排除病例的依据。
- 2、阴性检测结果不能排除结核分枝杆菌感染或结核病的可能性。导致假阴性结果的原因可能是受试者本身免疫系统缺陷，如接受免疫抑制治疗或 HIV 感染者。
- 3、当检测结果呈阳性时，也有可能因其它分枝杆菌（M.kansasii,M szulgai,M.marinum）引起，还需要同其它诊断方法相结合，如影像学诊断、痰涂片、痰培养等。

【产品性能指标】

- 1.阴性参考品符合率：阴性参考品符合率不低于 80%。
- 2.阳性参考品符合率：阳性参考品符合率不低于 80%。
- 3.检测限：最低检测限不大于 0.125 IU/mL。
- 4.准确度：对 γ -干扰素准确度参考品 Z01 重复检测 3 次，3 次测量浓度与理论值的结果偏差均在 $\pm 15\%$ 以内。
- 5.线性：在 0.25-6 IU/mL 浓度范围内，相关系数 $r \geq 0.9900$ 。
- 6.精密度：对精密度参考品 J1、J2 分别进行 10 次重复检测，检测结果的批内变异系数(CV) $\leq 15\%$ ；批间变异系数(CV) $\leq 15\%$ 。
- 7.分析特异性：
- a) 交叉反应：
- 细胞因子(IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α 1b, IFN- β 1b, IFN- α 2a, TNF- α) 在 50 ng/mL 以下时，实验组与对照组偏差在 $\pm 15\%$ 以内，无交叉反应。
- b) 干扰物质：
- 胆红素 $< 625 \mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白 $< 312.5 \mu\text{g/mL}$ 、肝素锂 $< 15.6 \mu\text{g/mL}$ 、环孢素 $< 312 \mu\text{mol/L}$ 、类风湿因子 $< 31 \text{ IU/mL}$ 、抗线粒体抗体 $< 1.25 \mu\text{g/mL}$ 、甘油三酯 $< 3.125 \text{ mmol/L}$ 、抗核抗体 $< 1:16$ 时，实验组与对照组相对偏差在 $\pm 15\%$ 以内，检测不受干扰。
- 8.境内临床试验数据总结：临床样本 1050 例，本产品与对比试剂的阳性符合率为 90.2%（580/643），阴性符合率为 96.4%（371/385），总符合率为 91.4%（960/1050）。

【注意事项】

- 1、本品仅供体外诊断使用，操作应严格按照说明书进行。
- 2、不能混用其他制造商的产品。
- 3、取出需要数量的微孔板，剩下的微孔板放入自封袋，保存于 2-8℃。
- 4、操作前应仔细阅读本说明书并严格按照其指标操作，否则可能会导致错误的检验结果。
- 5、本试剂必须使用肝素锂抗凝的真空采血管，部分采血管内毒素含量较高，可能会引起严重的异常结果。
- 6、请严格遵照试剂盒各组分的储存条件储存，并避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶须盖紧以防止蒸发。
- 7、加样时第一个孔与最后一个孔之间的间隔时间太长，会导致不同的预温育时间，从而可能影响测量值的准确性及重复性。
- 8、加液时必须用移液器，并定期校准移液器。加入不同样品或试剂组分时，应更换移液器枪头和加样槽，防止交叉污染。
- 9、加酶时，移液器枪头禁止接触液面，防止交叉污染。
- 10、洗涤时各孔均需加满液，防止孔口有游离物不能彻底洗脱。
- 11、酶标板在读取结果时，应擦干酶标板底部，且孔内不能有气泡。不要触碰孔底的外壁，指印或划痕都可能影响到读值。
- 12、全血样本和血浆应被视为具有潜在感染性的物质，操作时应进行必要的生物安全防护。
- 13、废弃样本和废液的处理应遵循相应的生物安全和有毒有害物质管理规定。

【标识的解释】

	有效期		查阅使用说明
	批次代码		体外诊断医疗器械
REF	产品编号		温度极限
	生产日期		

【参考文献】

1. Berthet F X, Rasmussen P B, Rosenkrands I, et al. A mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology, 1998, 144(11):3195.
2. Arend S M, Geluk A, van Meijgaarden K E, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrateprotein 10 and to mixtures of synthetic peptides. Infection & Immunity, 2000, 68(6):3314..
3. O'Garra A, Redford P S, McNab F W, et al. The Immune response in tuberculosis. Annual Review ofImmunology, 2013, 31(31):475.
4. Philips J A, Ernst J D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. Annual Review of Pathology, 2012,7(1):353.
5. Mehra S, Foreman T W, Didier P J, et al. The DosRregulon modulates adaptive immunity and is essential for Mycobacterium tuberculosis persistence. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 2015, 191(10):1185.
6. Mantegani P, Piana F, Codecasa L, et al. Comparison of an in-house and a commercial RD1-based ELISPOT-IFN-gamma assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. Clinical Medicine & Research, 2006, 4(4):266.
- 7.Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. Annals of Internal Medicine, 2008, 149(3):177.
- 8.Doberne D, Gaur R L, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(8):3061.
9. Fan L, Chen Z, Hao X H, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis.Fems Immunology & Medical Microbiology, 2012, 65(3):456-66.
10. 结核分枝杆菌 γ -干扰素释放试验及临床应用专家意见（2021 年版）

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京先声祥瑞生物制品股份有限公司

住所：北京市怀柔区雁栖经济开发区雁栖北三街 17 号

联系方式：4001 166 301、010-61666668

售后服务单位名称：北京先声祥瑞生物制品股份有限公司

联系方式：4001 166 301、010-61666668

生产地址：北京市怀柔区雁栖经济开发区雁栖北三街 17 号

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】：国械注准 20253400362

【说明书核准及修改日期】：2025 年 2 月 14 日