

受理号：CSZ1700172

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：结核分枝杆菌特异性细胞因子检测试剂盒
(酶联免疫法)

产品管理类别：第三类 6840

申请人名称：广州迪澳医疗科技有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
产品审评摘要.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究摘要.....	6
三、 临床评价摘要.....	13
四、 风险分析及说明书提示.....	15
综合评价意见.....	18

基本信息

一、申请人名称

广州迪澳医疗科技有限公司

二、申请人住所

广州高新技术产业开发区科学城科丰路 31 号华南新材料创
新园 G7 栋 401

三、生产地址

广州高新技术产业开发区科学城科丰路 31 号华南新材料创
新园 G1 栋 903 号

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒主要组成成分见表1。

表1 试剂盒主要组成成分

组分名称	规格	数量	主要组分
白细胞介素-2 抗体预包被酶标板	96 孔板	1 块	包被了抗人白细胞介素-2 抗体
γ -干扰素抗体预包被酶标板	96 孔板	1 块	包被了抗人 γ -干扰素抗体
刺激蛋白	750 μ L/ 支	2 支	结核特异重组蛋白
阳性刺激物	750 μ L/ 支	2 支	植物血凝素
白细胞介素-2 校准品	见标签	2 瓶	白细胞介素-2 蛋白
γ -干扰素校准品	见标签	2 瓶	γ -干扰素蛋白
稀释缓冲液	30mL/瓶	2 瓶	磷酸缓冲液、牛血清白蛋白
浓缩洗液 (50 \times)	20mL/瓶	1 瓶	磷酸缓冲液、吐温 20
白细胞介素-2 酶结合物	55 μ L/支	1 支	亲和素-辣根过氧化物酶复

组分名称	规格	数量	主要组分
			合物
γ -干扰素酶结合物	55 μ L/支	1 支	亲和素-辣根过氧化物酶复合物
白细胞介素-2 检测抗体	55 μ L/支	1 支	抗人白细胞介素-2 抗体
γ -干扰素检测抗体	55 μ L/支	1 支	抗人 γ -干扰素抗体
显色液	10mL/瓶	2 瓶	四甲基联苯胺
显色终止液	10mL/瓶	2 瓶	稀硫酸
封板膜		4 张	

(二) 产品预期用途

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

本产品用于结核病的辅助诊断。

(三) 产品包装规格

28 人份/盒。

(四) 产品检验原理

结核分枝杆菌感染者外周血中存在结核特异性的 T 细胞，这些细胞再次受到结核特异性蛋白刺激后，迅速活化增殖，分

泌结核相关细胞因子。

本试剂盒选取了存在于结核分枝杆菌，但在卡介苗和大多数非结核分枝杆菌中普遍缺失的 RD1 区和 RD2 区编码的 ESAT-6、CFP-10、Rv1985c 蛋白，应用基因工程技术将其表达成为融合蛋白（ESAT-6-CFP-10-Rv1985c）。在检测时，将人外周血单个核细胞从全血样本中分离出来，消除血液本底干扰因素，通过计数单个核细胞数量，排除人群中免疫细胞数量的个体差异影响。将定量的单个核细胞与融合蛋白 ESAT-6-CFP-10-Rv1985c 在细胞培养板上共培养，结核特异性 T 细胞由于记忆反应而分泌 γ -干扰素及白细胞介素-2 因子，再利用双抗体夹心酶联免疫法，检测培养上清液中的 γ -干扰素、白细胞介素-2 的浓度，来判断其是否存在结核分枝杆菌特异性的细胞免疫反应。此方法不受卡介苗（BCG 疫苗）的影响，特异性检测结核分枝杆菌引起的结核病。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括：刺激蛋白、捕获抗体、检测抗体、阳性刺激物、标准品、酶结合物。其中刺激蛋白为申请人自制，其他原材料均为外购方式获得。申请人选择有资质的供

应商提供的原料，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商，并制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品设置情况

企业参考品包括：阳性参考品、阴性参考品、线性参考品、准确度参考品、精密度参考品。

阳性参考品为：20份临床诊断为结核病患者的新鲜外周抗凝血样本的 PBMCs（10份来源于结核分枝杆菌涂片和（或）培养阳性的结核病患者，10份来源于结核分枝杆菌涂片和（或）培养阴性的结核病患者）。阴性参考品为：15份健康志愿者的新鲜外周抗凝血样本的 PBMCs。线性参考品、准确度参考品、精密度参考品为蛋白溶液，精密度参考品还包括1份临床确诊结核病患者的新鲜外周抗凝血样本和1份无结核病临床症状的健康志愿者新鲜外周抗凝血样本。

本试剂盒要求每次检测样品均需同时进行阴性对照、阳性对照和刺激蛋白检测，用于保证检测过程中检测体系的有效性。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人对反应体系中的孵育条件、样本反应条件、检测抗体反应条件、酶结合物（HRP）反应条件、显色时间、检测抗体

洗涤次数、酶结合物（HRP）洗涤次数等进行筛选和优化，通过企业参考品进行功能性实验或验证，最终确定了最佳反应体系。

（三）分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括：最低检测限、线性范围、准确性、Hook 效应研究、精密度、阴/阳性参考品符合率、特异性研究（交叉反应和干扰试验）等。

1. 在最低检测限研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对稀释后的系列浓度 γ -干扰素、IL-2 样本进行检测，最终确定并验证了本产品的最低检测限不高于 8pg/mL。

2. 在线性范围研究中，分别将 IFN- γ 和 IL-2 高浓度样本配制成一系列梯度浓度的样品，并进行吸光度测定，依据结果逐渐减少数据点直至表现出线性关系，要求剂量-反应曲线的线性 $R^2 \geq 0.9801$ 。根据检测结果及实际样本检测需要，IFN- γ 因子线性范围定为 15.63~500pg/mL，IL-2 因子的线性范围定为 15.63~500pg/mL。

3. 在准确度研究中，申请人采用三批成品试剂盒检测准确度参考品，结果显示：结果测量值与标识值之间的偏差均在 $\pm 20\%$ 之间。

4. 在 Hook 效应研究中，采用三批成品试剂盒对浓度为 1000pg/mL、2000pg/mL、3000pg/mL、4000pg/mL 的人工样本进

行检测。结果显示：浓度不超过 3000pg/mL 时准确率较高，不存在 Hook 效应，并在说明书中添加了相关提示。

5. 在交叉反应研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- α 、IFN- γ 、IFN- β 和 TNF- α 共 13 种干扰因子进行交叉反应检测。结果显示：当干扰因子浓度不超过 100ng/mL 时，这些干扰因子对样本浓度的检测没有明显影响。

6. 在干扰物质研究中，申请人对胆红素、血红蛋白、甘油三油酸酯、类风湿因子、抗核抗体、抗线粒体抗体、环孢素、硫酸阿巴卡韦和泼尼松龙进行研究。结果显示：各干扰物的最高浓度为胆红素 0.5mg/mL、血红蛋白 12.5mg/mL、甘油三油酸酯 100mg/mL、类风湿因子 500IU/mL、抗核抗体 500ng/mL、抗线粒体抗体 500ng/mL、环孢素 2000ng/mL、硫酸阿巴卡韦 15g/mL、泼尼松龙 2000ng/mL 不会产生干扰。对其他常见分枝杆菌感染样本（鸟分枝杆菌样本、龟脬分枝杆菌样本、偶然分枝杆菌样本）进行研究，结果显示：以上常见分枝杆菌感染样本不会对本产品的检测结果产生干扰。

7. 在精密度研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对 3 例结核阳性临床样本、3 例结核阴性临床样本和精密度参考品进行检测，同时评估了批内重复性/批间差异、日内/日间以及不同

操作者之间的精密度。结果显示，精密度参考品的批内、批间变异系数 $\leq 15\%$ ，阴性样本检测结果均为阴性，阳性样本检测结果均为阳性。

8. 在阴/阳性参考品符合率：申请人采用三批试剂盒对阴性参考品和阳性参考品进行检测，阴性符合率和阳性符合率均满足要求。

9. 企业标准品溯源性

IFN- γ 企业标准品溯源至 IFN- γ 国际标准品(编号为 NIBSC 82/587)，IL-2 企业标准品溯源至 IL-2 国际标准品(编号为 NIBSC 86/500)。

(四) 阳性判断值

申请人采用 ROC 曲线法确定阳性判断值。申请人采用本产品对 1028 例临床样本进行检测，结果显示：陈旧性肺结核样本、及 IFN- γ 阳性对照差值 $< 35\text{pg/mL}$ 或 IL-2 阳性对照差值 $< 130\text{pg/mL}$ 的样本不适合用本试剂盒检测；当 IFN- γ 选择灵敏度大于 80%、IL-2 选择特异度大于 95%时所找出的 cut-off 值，与临床诊断的符合率达到最佳 (83.54%)，此时约登指数最大的值即为最佳 cut-off 值。

申请人采用申报产品对 200 例临床样本(149 例结核患者样本和 51 例非结核患者样本)进行阳性判断值的验证，结果显示：

采用确定的阳性判断值对结果进行判定时，本产品具有较好的灵敏度和特异性。

综合以上研究确认，申报产品的结果判断标准如下：

表 2 结果判断标准

分组	因子	T-N (pg/mL)	P-N (pg/mL)	判断条件	判定结果
1	γ-干扰素	≥ 7	任何值	γ-干扰素和/或白细胞介素-2 满足条件	阳性
	白细胞介素-2	≥ 20	任何值		
2	γ-干扰素	< 7	≥ 35	两个因子同时满足条件	阴性
	白细胞介素-2	< 20	≥ 130		
3	γ-干扰素	< 7	< 35	当不满足分组 1 时，其中一个因子满足条件	不确定
	白细胞介素-2	< 20	< 130		

注：T-N 代表刺激蛋白的刺激值减去阴性对照的差值；

P-N 代表阳性刺激物的刺激值减去阴性对照的差值。

检验结果解释如下：

阳性：表明样本中存在针对结核分枝杆菌的特异性细胞免疫反应。

阴性：表明样本中不存在针对结核分枝杆菌的特异性细胞免疫反应。

不确定：当阳性刺激值与阴性对照的差值较小，即 IFN- γ 差值 (P-N) < 35pg/mL，IL-2 差值 (P-N) < 130pg/mL，并且刺激蛋白与阴性对照的差值也未达到阈值时，有可能与机体免疫状态低下或操作不当有关，应该采血重新检测或者根据临床其他症状进行进一步判定。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、开瓶稳定性和样本稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。

实时稳定性研究：采用三批储存于 2℃ 至 8℃ 条件下的申报产品，分别在第 3、6、9、11、12、13 个月取出，检测企业参考品，结果显示：在上述各个时间点储存的申报产品，检测企业参考品时，各项性能指标均符合要求。因此确定申报产品的实时稳定性为：在 2℃ 至 8℃ 保存，有效期为 12 个月。

开瓶稳定性研究：将三批次成品试剂盒从 2℃ 至 8℃ 储存条件下取出，并开瓶数次。采用开瓶后的试剂检测企业参考品，结果显示：开瓶后放置 28 天申报产品各项性能指标均符合要求。

样本稳定性研究：申请人采用三批成品试剂盒，对（10 份为结核分枝杆菌涂片和（或）培养阳性的结核病患者的 PBMCs

细胞样本、10 份为结核分枝杆菌涂片和（或）培养阴性的结核患者的 PBMCs 细胞样本、15 份健康志愿者的 PBMCs 细胞样本）在室温分别放置 0h、4h 和 8h 后，用淋巴细胞分离液分离 PBMCs 进行检测。结果显示：新鲜外周抗凝全血样本在常温条件下保存 0h、4h、8h，各项指标均达标，说明新鲜外周抗凝全血样本在常温下放置 8 小时，不会对试剂盒检测结果有影响。

三、临床评价摘要

申请人在广州市胸科医院、湖南省胸科医院以及新疆维吾尔自治区胸科医院进行了临床试验。采用申报产品与对比试剂对临床样本进行比较研究，对所有样本根据临床诊断结果进行分析，验证本产品的临床性能。同时对比试剂选择已上市同类产品 Cellestis Limited 的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）QuantiFERON-TB Gold。

本临床试验共纳入 3891 例临床样本，剔除 293 例，均满足剔除标准，检测 3598 例有效临床血液样本。其中，（1）结核病患者 2644 例，占有效样本例数的 73.49%，涂片阳性结核患者 591 例，占结核病患者例数的 22.35%，涂片阴性结核患者 1818 例，占结核病患者例数的 68.76%，无涂片结果 235 例。其中结核病患者中有 122 例肺外结核。（2）非结核疾病患者 718 例，占有效样本例数的 19.96%，其中包含肺癌病例 227 例，非结核

分枝杆菌肺病 27 例，肺炎 92 例，支气管扩张病例 82 例，支气管炎病例 96 例，慢阻肺病例 39 例，其他肺部感染等肺部疾病 101 例，其他疾病患者 54 例。(3) 健康人 236 例，占有效样本例数的 6.56%，其中高危人群（以结核病密切接触者为主）66 例。

与临床诊断的比较结果显示，申报产品的灵敏度为 84.95% (2246/2644)，特异性为 81.76% (780/954)，总符合率为 84.10% (3026/3598)，Kappa 值为 0.6205。其中“IFN- γ (+) IL-2 (+)”的结果与临床诊断的符合率为 98.37% (1745/1774)，“IFN- γ (-) IL-2 (+)”的结果与临床诊断的符合率为 87.93% (102/116)，“IFN- γ (+) IL-2 (-)”的结果与临床诊断的符合率为 75.28% (399/530)，具体数据如下。

表 3 详细数据统计表

组别 申报产品	临床诊断		合计 (n)
	结核病组 (n)	非结核病组 (n)	
IFN- γ (+) IL-2 (+)	1745	29	1774
IFN- γ (+) IL-2 (-)	399	131	530
IFN- γ (-)	102	14	116

IL-2 (+)			
IFN- γ (-)	398	780	1178
IL-2 (-)			
合计	2644	954	3598

申报产品对涂阳结核患者的检出率为 87.31% (516/591)，对涂片阴性结核的检出率为 84.05% (1528/1818)。

与对比试剂的比较研究结果显示：申报产品与对比试剂的阳性符合率为 92.09%，阴性符合率为 81.15%，总符合率为 88.38%，kappa 值为 0.7386，说明申报产品与对比试剂检测具有较好的检测一致性。

3598 例有效样本中，申报产品与对比试剂检测结果不一致的样本有 418 例。在差异样本中，以临床诊断为金标准，待考评试剂正确率为 75.36% (315/418)，对比试剂正确率为 24.64% (103/418)。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了较全面研究，临床试验符合要求。

四、风险分析及说明书提示

参照“YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械的应用”标准，对该产品进行风险分析。经综合评价，申报产品的

受益和风险总结如下：

申报产品检测结果会受到样本类型、样本处理、实验操作、实验环境等限制，导致可能得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性。

申报产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝全血分离的淋巴细胞中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应，用于结核病的辅助诊断。使用不合理的样本类型、样本处理不满足说明书中【样本要求】的血液样本分离得到的外周血单个核细胞（PBMCs）进行检测，会导致假阳性或假阴性结果，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作。

检验结果阳性不能确诊为结核病，应进一步进行结核病的医学及诊断评估（如细菌抗酸染色涂片及培养、胸部 X 光等）。当样本被污染、实验操作不当或堪萨斯分枝杆菌、海氏分枝杆菌和苏尔加分枝杆菌等存在交叉反应，检验结果可能出现假阳性。因此当怀疑上述细菌感染时有必要进行鉴别诊断。

检验结果阴性虽然不存在针对结核分枝杆菌的特异性细胞免疫反应，但检测者淋巴细胞功能异常、实验操作不当、免疫功能受损或者发生 Hook 效应，检验结果可能出现假阴性。若怀疑检测结果因钩状效应产生假阴性，应对样本进行梯度稀释再

用本试剂盒检验，以排除 Hook 效应影响。

申报产品在检测过程中涉及细胞分离，请在可控的实验室进行检测操作，操作人员需进行专业培训，非专业的操作及操作不当会影响检测质量。

通过环境控制、生产监控、成品检验和增加说明书警示内容等防范措施，对该产品的已知和可预见的安全风险进行控制和降低，剩余风险可以被控制在验收准则规定的可接受范围内，同时没有带来新的危害与安全风险。在目前认知水平上，认为该产品上市带来的获益/受益大于风险。

尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中提示以下信息：

1. 适用范围：本产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝全血分离的淋巴细胞中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应。本产品用于结核病的辅助诊断。

2. 警示及注意事项：产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，属于优先审批项目（编号：20180007）。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第680号）、《体外诊断试剂注册管理办法》（国家食品药品监督管理总局令2014年第5号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。

2020年01月03日

附件：产品说明书

结核分枝杆菌特异性细胞因子检测试剂盒（酶联免疫法）

说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌特异性细胞因子检测试剂盒（酶联免疫法）

【包装规格】

28 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分离的淋巴细胞中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应。

本产品用于结核病的辅助诊断。

结核分枝杆菌可侵犯全身各组织器官，但以肺部感染最多见，临床症状主要表现为长期咳嗽、咳痰、咯血、胸痛、呼吸困难、低热或高热、疲乏、无力、消瘦、盗汗等。目前临床上结核病病原学诊断主要采用分枝杆菌抗酸涂片染色、培养和分子诊断方法。

【检验原理】

结核分枝杆菌感染者外周血中存在结核特异性的 T 细胞，这些细胞再次受到结核特异性蛋白刺激后，迅速活化增殖，分泌结核相关细胞因子。

本试剂盒选取了存在于结核分枝杆菌，但在卡介苗和大多数非结核分枝杆菌中普遍缺失的 RD1 区和 RD2 区编码的 ESAT-6、CFP-10、Rv1985c 蛋白，应用基因工程技术将其表达成为融合蛋白（ESAT-6-CFP-10-Rv1985c）。在检测时，将人外周血单个核细胞从全血样本中分离出来，消除血液本底干扰因素，通过计数单个核细胞数量，排除人群中免疫细胞数量的个体差异影响。将定量的单个核细胞与融合蛋白 ESAT-6-CFP-10-Rv1985c 在细胞培养板上共培养，结核特异性 T 细胞由于记忆反应而分泌 γ -干扰素及白细胞介素-2 因子，再利用双抗体夹心酶联免疫法，检测培养上清中的 γ -干扰素、白细胞介素-2 的浓度，来判断其是否存在结核分枝杆菌特异性的细胞免疫反应。此方法不受卡介苗（BCG 疫苗）的影响，特异性检测结核分枝杆菌

引起的结核病。

【主要组成成分】

1. 试剂盒组分（不同批号试剂盒中各组分不得混用或互换）

表 1 试剂盒组成成分

组分名称	规格	数量	主要组分
白细胞介素-2 抗体预包被酶标板	96 孔板	1 块	包被了抗人白细胞介素-2 抗体
γ -干扰素抗体预包被酶标板	96 孔板	1 块	包被了抗人 γ -干扰素抗体
刺激蛋白	750 μ L/支	2 支	结核特异重组蛋白
阳性刺激物	750 μ L/支	2 支	植物血凝素
白细胞介素-2 校准品	见标签	2 瓶	白细胞介素-2 蛋白
γ -干扰素校准品	见标签	2 瓶	γ -干扰素蛋白
稀释缓冲液	30mL/瓶	2 瓶	磷酸缓冲液、牛血清白蛋白
浓缩洗液（50 \times ）	20mL/瓶	1 瓶	磷酸缓冲液、吐温 20
白细胞介素-2 酶结合物	55 μ L/支	1 支	亲和素-辣根过氧化物酶复合物
γ -干扰素酶结合物	55 μ L/支	1 支	亲和素-辣根过氧化物酶复合物
白细胞介素-2 检测抗体	55 μ L/支	1 支	抗人白细胞介素-2 抗体
γ -干扰素检测抗体	55 μ L/支	1 支	抗人 γ -干扰素抗体
显色液	10mL/瓶	2 瓶	四甲基联苯胺
显色终止液	10mL/瓶	2 瓶	稀硫酸
封板膜		4 张	

2. 试剂盒未提供但实验必需的试剂：

细胞培养板（厂家：NEST，货号：701001，规格：96 孔）；

无菌的细胞培养基：RPMI-1640 培养基（厂家：天津灏洋，货号：HY1640，规格：500mL/瓶）、无血清培养基（完全培养基，即用型，厂家：深圳达科为，货号：6115012，规格：100mL）；

淋巴细胞分离液（厂家：天津灏洋，货号：HY2015，规格：200mL/瓶）；

双蒸水或去离子水；

生理盐水。

【储存条件及有效期】

2 $^{\circ}$ C 至 8 $^{\circ}$ C 保存，有效期 12 个月。

各组分开启后需在 28 天内使用完毕。

白细胞介素-2 酶结合物、 γ -干扰素酶结合物、显色液应避光保存。

【适用仪器】

酶标仪（含 450nm、570nm 波长或含 450nm、630nm 波长）

【样本要求】

1. 适用样本类型：人外周静脉血，每份不少于 4mL。

2. 样本采集：

为保证样本组分稳定，推荐使用含有肝素（肝素锂或肝素钠）抗凝剂的采血管或真空采血管进行采集，不推荐使用乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝管。临床样本中常见的干扰物胆红素（0.5mg/mL）、血红蛋白（12.5mg/mL）和甘油三油酸酯（100mg/mL）对本产品检测结果未见有明显干扰，但为了获得可靠结果，临床上尽量避免使用黄疸、溶血和脂血标本。

3. 样本保存、处理和运输方法：

样本采集后应在 8 小时内进行外周血单个核细胞（PBMCs）的分离，分离前样本应在室温条件下放置，不得冷藏或冷冻。

分离得到的外周血单个核细胞（PBMCs）室温放置时间不应超过 4 小时。

样本经培养离心后收集的上清液于-20℃保存不应超过 30 天。

【检验方法】

1. 外周血单个核细胞（PBMCs）的分离

步骤	注意点
a. 按照说明书要求采集全血样本并保存。	a. 血液样本推荐使用含有肝素（肝素锂或肝素钠）抗凝剂的采血管或真空采血管。不推荐 EDTA 抗凝管。
b. 用 RPMI-1640 培养基或者生理盐水与等体积的血液样本混匀。按体积 2-3:1 加入到淋巴细胞分离液上层，室温（18-25℃），1000g，离心 20min。	b. 加入血液至淋巴分离液时，应沿管壁缓慢加入，避免加入到淋巴分离液液面之下，从而影响细胞分离效果。
c. 用吸液管吸取白色、云雾状 PBMCs 层并转	c. 吸液管吸取 PBMCs 时，应避免吸取得到红细

移至 15mL 离心管中,加入培养液至 10mL。	胞及血液中的其他物质。
d. 600g 离心 7 分钟, 弃去上清液用 1mL 培养液重悬细胞沉淀。	d. 本步骤推荐使用 RPMI-1640 培养基进行洗涤。
e. 加 RPMI-1640 培养基至 10mL, 350g 离心 7 分钟。	e. 要求见注意点 d。
f. 弃去上清加 0.7mL 培养液重悬细胞沉淀。	f. 本步骤加入无血清细胞培养基重悬沉淀细胞并孵育过夜。无血清培养基(完全培养基, 即用型)在本试剂盒中仅作为细胞培养液。

2. 外周血单个核细胞 (PBMCs) 的计数

步骤	注意点
a. 活细胞计数。	a. 可采用不同的方法, 包括台盼蓝染色手工计数或使用合适的设备自动计数。
b. 若采用台盼蓝染色手工计数, 重悬细胞沉淀后, 取 10 μ L 细胞悬液到 90 μ L 0.4% 台盼蓝染液中混匀。其他类型的计数板或自动细胞计数仪, 依照厂家说明书操作。	b. 注意确保细胞终溶液在稀释计数前充分混匀。细胞沉淀在离心管底部会导致计数结果与实际细胞数量发生偏差, 最终影响实验结果。
c. 计算细胞终溶液的浓度。	c. 确保正确计算细胞浓度, 过多或过少都会导致检测结果的不准确。
d. 用无血清培养基配制浓度为 2.5×10^6 个/mL 的细胞悬液至少 500 μ L 待用。	d. 稀释前确保细胞悬液充分混匀。

3. 细胞培养 (实验操作要求在 II 级生物安全柜内完成)

每份样本需设置 3 个培养孔: 1 个阴性对照孔、1 个蛋白刺激孔和 1 个阳性刺激物孔, 推荐摆放顺序如下:



步骤	注意点
a. 取出一个新的 96 孔 U 型细胞培养板, 按照每份样本 3 个培养孔。①50 μ L 无血清培养基至每个阴性对照孔内; ②50 μ L 刺激蛋白至每个蛋白刺激孔中; ③50 μ L 阳性刺激物至每个阳性刺激物孔中。	a. 按照推荐顺序依次加入阴性对照、刺激蛋白、阳性刺激物。加入不同刺激物时需要更换枪头。
b. 加入 100 μ L 配制好的浓度为 2.5×10^6 个/mL 的细胞悬液, 使得每孔加入的细胞数量为 2.5×10^5 个。	b. 吸取细胞时必须充分混匀。移液枪轻轻敲打混匀即可。
c. 将细胞培养板放入 37 $^{\circ}$ C, 5%CO ₂ 培养箱培养 16-20 小时。	c. 培养过程中应避免培养板堆叠, 否则会因培养温度的不均匀而影响培养结果。

4、 γ -干扰素、白细胞介素-2 的 ELISA 检测

(1) 试剂的配制:

步骤	注意点
a. 按照试剂盒中 γ -干扰素标准品瓶身标识体积加入稀释缓冲液, 震荡混匀, 制成 SD1 溶液。再取 5 个分别标记为 SD2、SD3、SD4、SD5、SD6 的 1.5mL EP 管。分别向标记的 5 管中加入 300 μ L 稀释缓冲液。取 300 μ L 的 SD1, 加入到 SD2 中, 震荡混匀。依次倍比稀释至 SD6。	a. 每次吸取不同浓度的标准品需更换枪头, 并且震荡混匀。以免造成标准品交叉污染, 影响标准曲线。
b. 按照试剂盒中白细胞介素-2 标准品瓶身标识体积加入稀释缓冲液, 震荡混匀, 制成 SD1 溶液。再取 5 个分别标记为 SD2、SD3、	b. 每次吸取不同浓度的标准品需更换枪头, 并且震荡混匀。以免造成标准品交叉污染, 影响标准曲线。

SD4、SD5、SD6 的 1.5mL EP 管。分别向标记的 5 管中加入 300 μ L 稀释缓冲液。取 300 μ L 的 SD1，加入到 SD2 中，震荡混匀。依次倍比稀释至 SD6。	
c. 每个检测样本需准备 3 个 1.5mL 洁净 EP 管（即阴性对照、蛋白刺激、阳性刺激物）做好相应标记，按照对应的编号从细胞培养板中吸取上清液再将上清液于 3000g，20-25 $^{\circ}$ C，离心 20min，轻拿轻放，制成检测样本。	c. 吸取上清液时，应避免不要触碰细胞沉淀，每管吸取至少 110 μ L。
d. 取试剂盒中的浓缩洗液（50 \times ）与去离子水按照体积比 1:49 稀释成 1 \times 洗液工作液。	d. 充分混匀，现配现用。
e. 按照标签标识的稀释比例，配制相应浓度检测抗体工作液。	e. 震荡混匀（建议 30s），现配现用。
f. 按照标签标识的稀释比例，配制相应浓度酶结合物工作液。	f. 震荡混匀（建议 30s），现配现用。

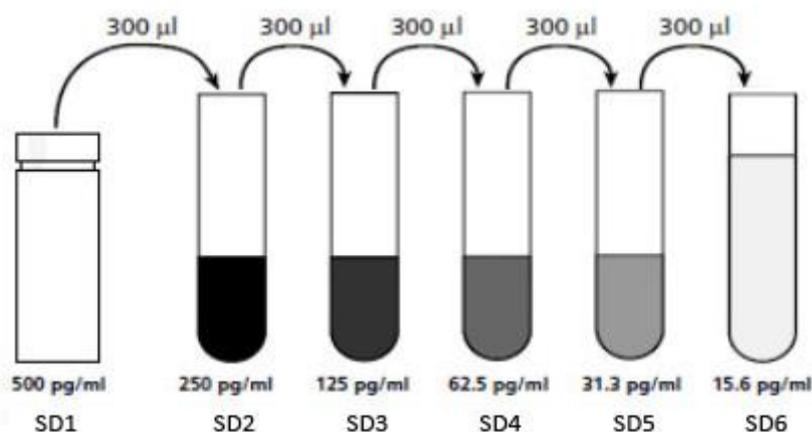


图 1. 标准品配制方法示意图

(2) 检测操作：（注意：以下步骤 γ -干扰素和白介素-2 的操作相同）

步骤	注意点
----	-----

a. 每个（阴性对照、蛋白刺激、阳性刺激物）酶标板孔中分别加入 50 μ L 稀释缓冲液，然后再加入 50 μ L 样品上清液。加样布局如表 2 所示。	a. 加入样品上清液时，应避免吸入细胞沉淀。
b. 取已配制好的校准品工作液按浓度梯度依次加入板孔中，每孔 100 μ L，平行做两孔。加样布局如表 2 所示。	b. 每加入一个浓度的标准品时，需要更换枪头，防止产生交叉污染，影响实验结果。
c. 将加完样品和校准品的酶标板加盖封板膜后，室温孵育 2 小时。	c. 孵育过程中应避免酶标板晃动。
d. 取出酶标板，倾倒孔内液体，每孔加入 1 \times 洗液 250 μ L，重复 3 次，拍干。按 100 μ L/孔加入检测抗体工作液，加盖封板膜，室温孵育 1 小时。	d. 每次洗板保证洗液在孔内浸泡 30s 左右。
e. 取出酶标板，倾倒孔内液体，每孔加入 1 \times 洗液 250 μ L，重复 4 次，拍干。并按 100 μ L/孔加入酶结合物工作液，加盖封板膜，室温避光孵育 30 分钟。	e. 每次洗板保证洗液在孔内浸泡 30s 左右。加入酶结合物工作液后避光孵育。提前拿出显色液、终止液平衡至室温。
f. 取出酶标板，倾倒孔内液体，每孔加入 1 \times 洗液 250 μ L，重复 5 次，拍干。每孔加入 100 μ L 显色液，室温显色 5 分钟，然后每孔加入 100 μ L 显色终止液。	f. 每次洗板保证洗液在孔内浸泡 30s 左右。显色期间注意避光及定时显色并观察显色程度。显色时间过久易导致标准曲线 OD 值超过酶标仪检测范围。
g. 终止后即刻测量吸光度值(OD 值)，检测波长 450nm，校正波长 570（或 630）nm。	g. 注意使用双波长检测，排除背景干扰。

表 2 γ -干扰素（或白介素 2）加样板布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A	N1	N2	N3	N4	N5	SD1	SD1	N6	N7	N8	N9	N10
B	T1	T2	T3	T4	T5	SD2	SD2	T6	T7	T8	T9	T10
C	P1	P2	P3	P4	P5	SD3	SD3	P6	P7	P8	P9	P10
D	N11	N12	N13	N14	N15	SD4	SD4	N16	N17	N18	N19	N20
E	T11	T12	T13	T14	T15	SD5	SD5	T16	T17	T18	T19	T20
F	P11	P12	P13	P14	P15	SD6	SD6	P16	P17	P18	P19	P20
G	N21	T21	P21	N22	T22	P22	N23	T23	P23	N24	T24	P24
H	N25	T25	P25	N26	T26	P26	N27	T27	P27	N28	T28	P28

注：1. 其中 N 表示阴性对照孔样本，T 表示蛋白刺激孔样本，P 表示阳性刺激物孔样本；

2. γ -干扰素和白介素 2 检测是分别在两块酶标板上进行，但两块酶标板的加样布局一致。

(3) 计算方法和质量控制

a. 计算方法

计算每个酶标板中各浓度标准液所测得之平均 OD 值。

以平均 OD 对数值为 y 轴，标准液 IFN- γ 浓度 (pg/mL) 对数值为 x 轴，作 log-log 图。用回归分析，求出标准液 IFN- γ 的最佳回归线。

按照每个样本的 OD 值，利用此 IFN- γ 标准品曲线来推定每个检测样本的 IFN- γ 浓度 (pg/mL)。

以平均 OD 对数值为 y 轴，标准液 IL-2 浓度 (pg/mL) 对数值为 x 轴，作 log-log 图。用回归分析，求出标准液 IL-2 的最佳回归线。

按照每个样本的 OD 值，利用此 IL-2 标准品曲线来推定每个检测样本的 IL-2 浓度 (pg/mL)。

注意每个样本均稀释了一倍检测，计算结果应乘以稀释倍数 2。

此计算可以通过统计软件（如：Microsoft Excel）完成。

b. 质量控制标准曲线的准确性直接影响检测结果的准确性，因此检验标准品的结果非常重要。符合以下条件检测是有效的：

经过 200 μ L 体积矫正后，标准品 SD1 的平均 OD 值 > 1.6；

标准曲线 SD1、SD2 重复测定的 OD 值变异系数 $CV < 15\%$;

由各标准品平均 OD 值的双对数计算的标准曲线其相关系数 $R^2 > 0.9801$;

若结果不符合上述条件，则本次检测无效，须重新进行检测。

【阳性判断值】

利用 ROC 曲线法得出 cut-off 值，具体判断标准如下：

表 3 判断标准

分组	因子	T-N (pg/mL)	P-N (pg/mL)	判断条件	判定结果
1	γ -干扰素	≥ 7	任何值	γ -干扰素和/或白细胞介素-2 满足条件	阳性
	白细胞介素-2	≥ 20	任何值		
2	γ -干扰素	< 7	≥ 35	两个因子同时满足条件	阴性
	白细胞介素-2	< 20	≥ 130		
3	γ -干扰素	< 7	< 35	当不满足分组 1 时，其中一个因子满足条件	不确定
	白细胞介素-2	< 20	< 130		

注：T-N 代表刺激蛋白的刺激值减去阴性对照的差值；

P-N 代表阳性刺激物的刺激值减去阴性对照的差值。

【检验结果解释】

1. 阳性：表明样本中存在针对结核分枝杆菌的特异性细胞免疫反应。
2. 阴性：表明样本中不存在针对结核分枝杆菌的特异性细胞免疫反应。
3. 不确定：当阳性刺激值与阴性对照的差值较小，即 $IFN-\gamma$ 差值 (P-N) $< 35\text{pg/mL}$ ，IL-2 差值 (P-N) $< 130\text{pg/mL}$ ，并且刺激蛋白与阴性对照的差值也未达到阈值时，有可能与机体免疫状态低下或操作不当有关，应该采血重新检测或者根据临床其他症状进行进一步判定。

【检测方法的局限性】

1. 本产品的检测结果仅供临床参考，不作为治疗或其他临床管理的唯一依据，应对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 检验结果阳性不能确诊为结核病，应进一步进行结核病的医学及诊断评估（如细菌抗酸染色涂片及培养、胸部 X 光等）。当样本被污染、实验操作不当或堪萨

斯分枝杆菌、海氏分枝杆菌和苏尔加分枝杆菌等存在交叉反应，检验结果可能出现假阳性。因此当怀疑上述细菌感染时有必要进行鉴别诊断。

3. 检验结果阴性虽然不存在针对结核分枝杆菌的特异性细胞免疫反应，但检测者淋巴细胞功能异常、实验操作不当、免疫功能受损或者发生 Hook 效应，检验结果可能出现假阴性。若怀疑检测结果因 Hook 效应产生假阴性，应对样本进行梯度稀释再用本试剂盒检验，以排除钩状效应影响。

4. 改变细胞洗涤、计数方法、孵育时间或温度，可能影响最终的结果，因此应严格按照说明书要求操作。

5. 本产品的适用对象不包括陈旧性肺结核患者。

6. 部分阳性刺激物样本的检测结果，其 OD 值有时会落在酶标仪能检测范围之外，这并不会对检测结果造成影响。

7. 在检测过程中，若出现阴性对照孔与蛋白刺激孔检测浓度（乘以稀释倍数 2 后）超过 1000pg/mL，则必须对此样本阴性对照、蛋白刺激孔样本进行梯度稀释后重新检测。

【产品性能指标】

1. 阳性参考品符合率：检测 20 份临床确诊的结核病患者的新鲜外周抗凝血样本，阳性参考品符合率应不低于 75%。

2. 阴性参考品符合率：检测 15 份无结核病临床症状的健康志愿者新鲜外周抗凝血样本，阴性参考品符合率应不低于 75%。

3. 精密度：对结核阳性临床样本、结核阴性临床样本和精密度参考品进行多次重复检测，精密度参考品的批内、批间变异系数 $\leq 15\%$ ，阴性样本检测结果均为阴性，阳性样本检测结果均为阳性。

4. 交叉反应：对于细胞因子白细胞介素-1 α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-2（针对 γ -干扰素因子检测）、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-6、白细胞介素-10、白细胞介素-12、 α -干扰素、 γ -干扰素（针对白细胞介素-2 因子检测）、 β -干扰素以及肿瘤坏死因子- α 等在 100ng/mL 以下对产品检测无影响。

5. 干扰反应：临床样本中常见的干扰物（胆红素 0.5mg/mL、血红蛋白 12.5mg/mL、甘油三油酸酯 100mg/mL、类风湿因子 500 IU/mL、抗核抗体 500ng/mL、抗线粒体抗体 500ng/mL、环孢素 2000ng/mL、硫酸阿巴卡韦 15g/mL、泼尼松龙 2000ng/mL）对本产品检测结果未见有明显干扰，但为了保证试验结果的稳定可靠，建议临床尽量避免使用干扰性样本。

6. 临床试验数据

临床样本 3598 例，本产品与临床诊断的总符合率为 84.10%（3026/3598）、灵敏度为 84.95%（2246/2644）、特异性为 81.76%（780/954）。其中“IFN- γ （+）IL-2（+）”的结果与临床诊断的符合率为 98.37%（1745/1774），“IFN- γ （-）IL-2（+）”的结果与临床诊断的符合率为 87.93%（102/116），“IFN- γ （+）IL-2（-）”的结果与临床诊断的符合率为 75.28%（399/530），具体数据见表 4。

表 4 详细数据统计表

本产品 组别	临床诊断		合计（n）
	结核病组（n）	非结核病组（n）	
IFN- γ （+） IL-2（+）	1745	29	1774
IFN- γ （+） IL-2（-）	399	131	530
IFN- γ （-） IL-2（+）	102	14	116
IFN- γ （-） IL-2（-）	398	780	1178
合计	2644	954	3598

【注意事项】

1. 使用前请认真阅读说明书，操作应严格按照说明书执行，未按说明书操作可能会得到错误的结果。
2. 本产品仅适用于临床辅助判断。
3. 使用前如发现试剂瓶有任何破损或泄露现象，请勿使用。
4. 本产品不能与其他商家的试剂混合使用。

5. 浓缩洗液应该严格按照说明书配制，以免影响最终检测结果。
6. 处理剩余的样本及残液时应该按照生物安全和相应的处理方法合理处理。
7. 当配制的 5 个浓度校准品中仅有 1 份有明显升高或降低，可舍弃此点，用其它的校准品绘制标准曲线。
8. 加不同的样本时应该每次更换枪头以免交叉污染，影响实验结果。
9. 试剂盒里的各个组分应该严格按照说明书储存条件进行储存，严禁强光照射，不可使用过期产品检测。
10. 拍板时应轻拍，若使用甩板机则其转速不应超过 1200r/min。
11. 酶标仪检测时，需进行 200 μ L 体积校正，再进行标准曲线的绘制与结果计算。

【参考文献】

1. Wergeland I, Assmus J, Dyrhol-Riise AM. Cytokine Patterns in Tuberculosis Infection; IL-1ra, IL-2 and IP-10 Differentiate Borderline QuantiFERON-TB Samples from Uninfected Controls[J]. *PLoS One*. Sep 2016 ;11(9):e0163848.
2. WU Y, Woodworth JS, Shin DS, Morris S, Behar SM. Vaccine-elicited 10-kilodalton culture filtrate protein-specific CD8⁺ T cells are sufficient to mediate protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Infect Immun*. May 2008;76(5):2249-2255.
3. Stefan H.E. Kaufmann, Shreemanta K. Parida. Tuberculosis in Africa: Learning from Pathogenesis for Biomarker Identification.[J]. *Cell Host & Microbe*. 2008, 3(4): 219-228.
4. Wood PR, Corner LA, et al. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon[J]. *Res Vet Sci*. 1990;49(1):46-49.
5. Wang L , Tian X D , Yu Y , et al. Evaluation of the performance of two tuberculosis interferon gamma release assays (IGRA-ELISA and T-SPOT. TB) for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Clinica Chimica Acta*. 2018, 479:74-78.
6. Malek TR. The biology of interleukin-2[J]. *Annu Rev Immunol*. 2008, 26: 453-

479.

7. Zhang L, Cheng X, et al. Utility of Th1-cell immune responses for distinguishing active tuberculosis from non-active tuberculosis: A case-control study[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(5):e0177850.

8. Turgut T, Akbulut H, Deveci F, et al. Scrum interleukin-2 and neopterin in levels as useful markers for treatment of active pulmonary tuberculosis[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2006, 209(4):321-328.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州迪澳医疗科技有限公司

住所：广州高新技术产业开发区科学城科丰路 31 号华南新材料创新园 G7 栋 401

联系方式：

传真：

E-mail：

生产地址：广州高新技术产业开发区科学城科丰路 31 号华南新材料创新园 G1 栋 903 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】

【说明书核准及修改日期】