

## 微阵列芯片法在抗呼吸道病原体 IgM 抗体检测中的应用

朱子菲<sup>1</sup>, 黎村艳<sup>1</sup>, 曹友德<sup>1</sup>, 谭黎明<sup>1</sup>, 王启广<sup>1</sup>, 苏娜<sup>2</sup>, 高建业<sup>2</sup>, 李洋<sup>2</sup>, 田鑫<sup>3</sup>, 杨伟国<sup>4</sup>, 张兴旺<sup>4</sup>, 王平<sup>4</sup>, 叶华<sup>4</sup>, 马华瑜<sup>4</sup>, 刘富菊<sup>5</sup>, 上官美荣<sup>5</sup>, 李琼英<sup>5</sup>, 李梦<sup>5</sup>, 何礼凯<sup>5</sup>

[1. 湖南师范大学附属第一医院(湖南省人民医院) 检验科, 湖南省人民医院转化医学研究所 医学检验研究室, 长沙 410005; 2. 兰州大学第一医院 检验科, 兰州 730000; 3. 长沙卫实医学检验所有限公司, 长沙 410199; 4. 甘肃省人民医院 检验科, 兰州 730000; 5. 深圳市赛尔生物技术有限公司, 深圳 518055]

**摘要:** 为评价微阵列芯片法对呼吸道病原体 IgM 检测的效能及其在诊断近期呼吸道感染中的临床应用价值, 以微阵列芯片法(microarray)和 ELISA 检测 1 463 例疑似呼吸道病毒感染者(病例组)和 806 例非呼吸道病原体感染者或健康体检者(阴性对照组)的血清样本。结果显示, 与 ELISA 相比, 微阵列芯片法检测结果如下: 腺病毒(adenovirus, ADV)阳性符合率为 94.7%, 阴性符合率为 97.5%; 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)阳性符合率为 94.9%, 阴性符合率为 97.7%; 流感病毒 A 型(influenza virus type A, IFV-A)阳性符合率为 95.3%, 阴性符合率为 97.9%; 流感病毒 B 型(influenza virus type B, IFV-B)阳性符合率为 93.3%, 阴性符合率为 97.9%; 副流感病毒(parainfluenza virus, PIV)阳性符合率为 93.3%, 阴性符合率为 97.4%; 肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)阳性符合率为 94.0%, 阴性符合率为 98.0%; 肺炎衣原体(chlamydia pneumoniae, CP)阳性符合率为 93.6%, 阴性符合率为 97.3%。微阵列芯片法与 ELISA 检测急性感染期患者的阳性符合率分别为 91.2%、90.3%、86.8%、88.9%、93.5%、93.8% 和 93.8%。由此, 微阵列芯片法与 ELISA 结果相比具有较高的符合率。使用该方法可一次检测血清样本中 7 种呼吸道病原体的 IgM 滴度, 具有操作简便、通量高、灵敏度、特异度高等优点, 对近期呼吸道病原体感染的诊断和鉴别诊断有重要参考价值, 值得临床推广。

**关键词:** 呼吸道病原体; 免疫球蛋白 M; 微阵列芯片法; 酶联免疫吸附试验

**中图分类号:** R446.6

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2021)01-0032-04

呼吸道病原体的检测主要指检测人体血清中引起呼吸道感染的主要病原体的 IgM 型抗体, 因为呼吸道病原体感染人体 1 w 左右血清出现 IgM 滴度增高并急剧升至高位, 持续 1~2 w。因此, 我国临床上检测血清样本中特异性 IgM 以明确致病菌, 方法主要有: 间接免疫荧光法、ELISA 法、碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶桥联酶标法、直接免疫荧光法等, 以明确呼吸道感染致病菌, 帮助在诊断基础上对症和抗感染治疗。其中间接免疫荧光法可同时检测呼吸道多种病原体的 IgM, 特异性好, 但是对操作人员要求高, 不宜自动化、标准化; ELISA 检测抗病原体抗体的特异度和灵敏度高, 操作简便, 成本较低, 但是不能同时检测 2 种及以上抗体。

微阵列芯片法(microarray)是近年来兴起的一项技术, 可用于食品分析、蛋白质组学、药物筛选等方

面。临床上, 微阵列芯片法可用于检测幽门螺杆菌<sup>[1]</sup>、肿瘤标志物<sup>[2]</sup>和自身抗体<sup>[3]</sup>等。它可同时检测的 7 种呼吸道感染病原体分别为: 腺病毒(adenovirus, ADV)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、流感病毒 A 型(influenza virus type A, IFV-A)、流感病毒 B 型(influenza virus type B, IFV-B)、副流感病毒(parainfluenza virus, PIV)、肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)和肺炎衣原体(chlamydia pneumoniae, CP)。本研究旨在用微阵列芯片法和 ELISA 同时检测 2 269 例临床样本呼吸道病原体 IgM 滴度, 两者检测结果不一致时, 用间接免疫荧光法确认, 以评价微阵列芯片法在检测呼吸道病原体 IgM 滴度中的应用价值。此外, 用微阵列芯片法和对照方法检测 234 例急性呼吸道感染者样本, 以评价微阵列芯片法对急性感染者的检测能力。

### 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集 2013 年 5 月至 2018 年 1 月于湖南省人民医院、甘肃省人民医院和兰州大学第一医院门诊或病房就医的疑似呼吸道病毒感染者 1 463 例(病例组)及对照组 806 例(为同期确诊的非呼吸道病原体感染者或健康体检者); 另收集湖南省人民医院

收稿日期: 2019-10-16

基金项目: 湖南省科技厅技术创新引导计划临床医疗技术创新引导项目(2017TT96)

作者简介: 朱子菲(1996-), 女, 硕士生, 主要从事抗感染免疫及自身抗体相关基础研究

通信作者: 黎村艳(E-mail: zjilcy@csu.edu.cn)

7 种呼吸道病原体急性感染者样本各单项至少 30 例, 共 234 例, 具体信息如下(表 1)。采集各组对象外周血, 离心后收集血清, 将完成临床检测的剩余样本置  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备检。病例组纳入标准: 临床诊断为上呼吸道感染、急性喉气管支气管炎、支气管炎、肺炎等疾病的呼吸道病原体感染者; 临床症状为发热、咳嗽、咽痛、气喘、哮喘、头痛、声音嘶哑、咳痰、鼻

塞等的疑似呼吸道病原体感染者。对照组为确诊非呼吸道病原体感染者或健康体检者。急性感染组纳入标准: 具有危险因素及典型症状体征可诊断为急性呼吸道感染的患者。排除标准: 严重心脑血管疾病患者; 严重精神疾病或其他情况导致的不能配合者。本研究经 3 家医院医学伦理委员会批准(由于样本为剩余样本, 故有知情同意豁免)。

表 1 研究对象一般资料

类目	例数/n	男性		女性	
		例数/n	年龄/岁	例数/n	年龄/岁
病例组	1 463	782	29.65±28.49	681	26.53±24.78
对照组	806	410	38.98±27.72	396	34.20±24.26
急性感染组	234	135	35.12±31.14	99	35.46±26.55

**1.2 试剂与仪器** 呼吸道病毒 IgM 抗体联检试剂盒(微阵列芯片法), 购自深圳市赛尔生物技术有限公司; 7 种呼吸道病原体感染 IgM 抗体检测试剂盒(ELISA), 购自北京贝尔生物工程股份有限公司; 9 项呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测试剂盒(间接免疫荧光法), 购自 Vircell 公司; PCR 检测试剂盒, 购自中山大学达安基因股份有限公司; IgG 检测试剂盒, 购自北京贝尔生物工程股份有限公司; 生物芯片阅读仪 SCIARRAY-I, 购自深圳市赛尔生物技术有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 样本的制备** 从  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱取出样本, 平衡复融至室温, 摇匀备用。

**1.3.2 微阵列芯片法检测血清样本 IgM 水平** 操作按呼吸道病毒 IgM 抗体联检试剂盒说明书进行, 用生物芯片阅读仪检测、判读结果。

**1.3.3 ELISA 检测血清样本 IgM 水平** 按各呼吸道病原体感染 IgM 抗体检测试剂盒说明书进行。

**1.3.4 间接免疫荧光法判定歧义结果** 对于 2 检测结果不一致的样本, 按 9 项呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测试剂盒(间接免疫荧光法)操作说明书进行, 反应完成后判读结果。

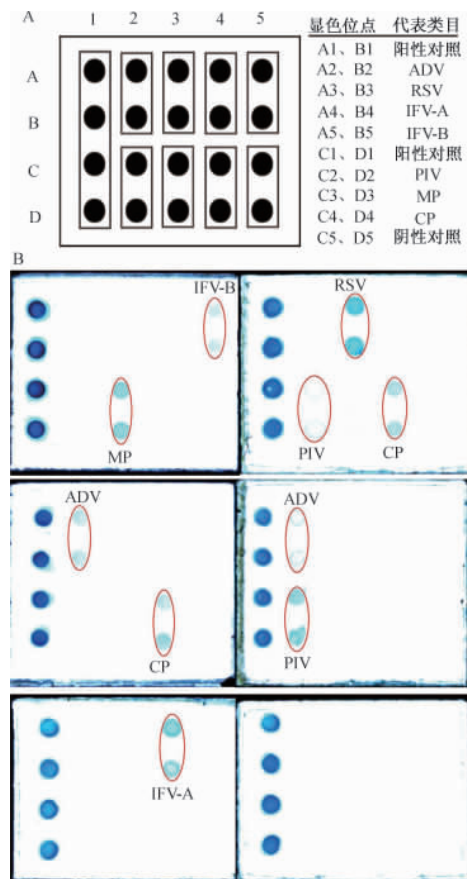
**1.3.5 急性呼吸道病原体感染者血清 IgG 水平检测** 采用 PCR 检测 IFV-A、IFV-B, 采用 IgG 检测试剂盒检测(动态检测 2 次血清 IgG) ADV、RSV、PIV、MP 和 CP。

**1.4 统计学处理** 用 SAS 9.4 软件进行统计学分析。2 种试剂盒检测结果的比较采用配对  $\chi^2$  检验, 其一致性采用 Kappa 统计分析,  $\kappa > 0.75$  表示 2 种检测结果有高度一致性。研究中阳性符合率 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性)  $\times 100\%$ ; 阴性符合率 = 真阴性 / (真阴性 + 假阴性)  $\times 100\%$ ; 总符合率 = (真阳性

+ 真阴性) / (真阳性 + 假阳性 + 真阴性 + 假阴性)  $\times 100\%$ 。数据以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 微阵列芯片法检测结果** 微阵列芯片法检测样本 IgM 结果如下, 阳性结果在相应位置显蓝色斑点, 阴性则不显色(图 1)。



注: A. 微阵列芯片表面 7 项检测结果所处位点示意图; B. 微阵列芯片法检测 IgM 抗体阴阳性结果图(共展示 6 份样本)。

图 1 微阵列芯片法检测样本 IgM 抗体滴度结果

**2.2 微阵列芯片法与 ELISA 检测结果比较** 结果显示, 2 种方法的 ADV、RSV、IFV-A、IFV-B、PIV、MP 和 CP IgM 抗体检测结果差异均无统计学

意义( $P>0.05$ )。2 269 例样本中, 7 种 IgM 的阳性符合率、阴性符合率、总符合率均大于 90.0%,  $\kappa$  值均大于 0.750 0。(表 2)

表 2 微阵列芯片法及 ELISA 检测结果 ( $n=2\ 269$ )

类目	双阳性	双阴性	阳性符合率/%	阴性符合率/%	总符合率/%	$\kappa$ 值	$\chi^2$ 值	P 值
ADV	304	791	94.7	97.5	96.7	0.919 8	0.243 2	0.742 8
RSV	314	793	94.9	97.7	96.9	0.923 6	0.111 1	0.867 9
IFV-A	324	795	95.3	97.9	97.1	0.931 2	0.030 3	1.000 0
IFV-B	318	794	93.3	97.9	96.5	0.916 3	0.900 0	0.429 6
PIV	320	790	93.3	97.4	96.2	0.908 6	0.090 9	0.880 4
MP	360	797	94.0	98.0	96.7	0.924 7	1.256 4	0.336 8
CP	334	793	93.6	97.3	96.2	0.909 3	0.022 2	1.000 0

**2.3 微阵列芯片法检测急性感染期样本结果** 微阵列芯片法与对照方法相比, ADV、RSV、IFV-A、IFV-B、PIV、MP 和 CP 的阳性符合率分别为: 91.2%、90.3%、86.8%、88.9%、93.5%、93.8%和 93.8%, 急性感染期样本阳性符合率均大于临床效能评价标准要求的急性感染期患者阳性样本检出率应 $\geq 80.0\%$ (表 3)。

表 3 急性感染期样本 2 种方法检测的符合率

类目	两者同时阳性	例数/n	阳性符合率/%
ADV	31	34	91.2
RSV	28	31	90.3
IFV-A	33	38	86.8
IFV-B	32	36	88.9
PIV	29	31	93.5
MP	30	32	93.8
CP	30	32	93.8

**2.4 检测结果不一致样本分析** 对 274 例微阵列芯片法与 ELISA 检测结果不一致的样本, 经间接免疫荧光法确认, 微阵列芯片法中 141 例与之一致, 133 例不一致; ELISA 中 133 例与间接免疫荧光法结果一致, 141 例不一致。

### 3 讨论

呼吸道感染是一种常见病, 其病原体种类繁多。研究结果显示<sup>[4]</sup>, 非典型病原体(除肺炎链球菌等常见细菌以外的病毒、衣原体、支原体等病原体)占呼吸道感染病原体中的很大比例, 且容易出现混合感染, 而因地区、季节、年龄变化引起的呼吸道疾病病原体也不同。导致呼吸道疾病的病原学比较复杂, 传统病毒检测分离操作繁琐, 目前临床医

生判定呼吸道病原体感染尚无金标准。因此, 我国采用多种免疫标记技术检测血清中特异性 IgM 滴度以明确致病菌, 各种方法灵敏度、特异度不同, 结果判定存在差异。

蛋白微阵列芯片是继基因芯片后新兴的蛋白质检测载体, 根据性能不同可分为蛋白质捕获芯片(蛋白质检测芯片)、蛋白质功能芯片和蛋白质反相芯片。蛋白微阵列芯片法是一种高通量、高灵敏度、特异度、高重复性且微量化的蛋白分析技术, 根据检测目的将各种蛋白(如抗原、抗体、酶、配体等)按设计的阵列有序固定于固相载体(如硅片、凝胶、玻璃片、尼龙膜等), 分析检测样本中能与探针蛋白特异性结合的靶蛋白。微阵列芯片不仅具有体积小、所需样本和试剂量少、分析准确迅速、过程自动化、成本低等优点, 还可进行一块芯片多项指标联合检测并可整合检测结果等优点, 以便于对不同抗体检测结果的比较<sup>[5]</sup>。李铸衡等<sup>[6]</sup>研究发现, 相比于传统的 ELISA, 蛋白质微阵列芯片法具有较高的检测灵敏度和极少的试剂消耗量。在相同反应条件下, 抗原芯片对血清中抗体的识别灵敏度远高于 ELISA, 相应的检测灵敏度通常能提高 1~2 个数量级。另外, 蛋白质芯片的检测通量要远高于 ELISA, 有助于获得有关临床表现形式和病理亚型的所有生物标志物数据集合, 从而帮助进一步提高诊断及治疗的准确性。

研究通过微阵列芯片法和 ELISA 分别检测 ADV、RSV、IFV-A、IFV-B、PIV、MP 及 CP 的 IgM 抗体滴度, 发现其阳性符合率分别为: 94.7%、94.9%、95.3%、93.3%、93.3%、94.0%和 93.6%;

阴性符合率分别为: 97.5%、97.7%、97.9%、97.9%、97.4%、98.0%和 97.3%; 两者的一致性系数( $\kappa$ 值)分别为: 0.919 8、0.923 6、0.931 2、0.916 3、0.908 6、0.924 7 和 0.909 3, 各值均大于 0.750 0, 提示两者的一致性较好。另外, 本研究急性病毒感染检测阳性符合率均大于要求的 80.0%。

以玻璃为载体的微阵列芯片法作为兴起的检测技术, 具有简单、准确、特异度高等优点, 且为硬基质芯片, 容易自动化操作。它是检出单一感染、混合感染中病原体的实用方法, 为临床早期诊断、治疗提供了依据, 还可配合其他检测方法检测呼吸道感染病原体, 值得在临床上推广使用。

### 参考文献

- [1] 朱明飞, 赵丽娟, 王立军. 应用蛋白芯片技术检测幽门螺杆菌分型及其根除率影响研究[J]. 临床军医杂志, 2018, 46(11): 1379-1380.
- [2] 陈静静, 陈建民, 孙泉. 多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统在直结肠癌诊断中的临床意义[J]. 现代免疫学, 2016, 36(4): 319-322.
- [3] Lin MW, Ho JW, Harrison LC, *et al.* An antibody-based leukocyte-capture microarray for the diagnosis of systemic lupus erythematosus[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58199.
- [4] 夏丽君, 巫雯嘉, 杨瑾. 9种呼吸道病原体 IgM 抗体联合检测的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(9): 1477-1479.
- [5] 黎村艳, 陆建国, 肖金红, 等. 玻璃载体微阵列芯片法在 ENA 抗体检测中的应用[J]. 现代免疫学, 2017, 37(4): 331-334.
- [6] 李铸衡, 刘霞, 刘殿骏, 等. 蛋白质微阵列芯片在临床分析中的应用[J]. 应用化学, 2016, 33(11): 1253-1264.
- [1] 朱明飞, 赵丽娟, 王立军. 应用蛋白芯片技术检测幽门螺杆菌

## The clinical application of protein microarray in the detection of serum IgM against common respiratory pathogens

ZHU Zi-fei<sup>1</sup>, LI Cun-yan<sup>1</sup>, CAO You-de<sup>1</sup>, TAN Li-ming<sup>1</sup>, WANG Qi-guang<sup>1</sup>, SU Na<sup>2</sup>, GAO Jian-ye<sup>2</sup>, LI Yang<sup>2</sup>, TIAN Xin<sup>3</sup>, YANG Wei-guo<sup>4</sup>, ZHANG Xing-wang<sup>4</sup>, WANG Ping<sup>4</sup>, YE Hua<sup>4</sup>, MA Hua-yu<sup>4</sup>, LIU Fu-ju<sup>5</sup>, SHANGGUAN Mei-rong<sup>5</sup>, LI Qiong-ying<sup>5</sup>, LI Meng<sup>5</sup>, HE Li-kai<sup>5</sup>[1. *Department of Clinical Laboratory, Translational Medicine Research Institute, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University (Hunan Provincial People's Hospital), Changsha 410005, China*; 2. *Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*; 3. *Changsha Weishi Medical Laboratory Co. Ltd., Changsha 410199, China*; 4. *Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China*; 5. *Shenzhen Sciarray BioTech Co. Ltd., Shenzhen 518055, China*]

**Abstract:** This study was aimed to estimate the efficacy of protein microarray technology for the detection of serum IgM against common respiratory pathogens and its clinical value in the diagnosis of recent respiratory infections. Protein microarray method was employed to detect IgM for 7 common respiratory pathogens in the serum of 1 463 patients with suspected respiratory viruses infection (case group) and 806 healthy controls (negative control group). A parallel detection was undergone by ELISA, and the results from each assay were compared. The positive coincidence rate and negative coincidence rate were respectively as follows: adenovirus (ADV) (94.7% vs 97.5%), respiratory syncytial virus (RSV) (94.9% vs 97.7%), influenza virus type A (IFV-A) (95.3% vs 97.9%), influenza virus type B (IFV-B) (93.3% vs 97.9%), parainfluenza virus (PIV) (93.3% vs 97.4%), mycoplasma pneumoniae (MP) (94.0% vs 98.0%) and chlamydia pneumoniae (CP) (93.6% vs 97.3%). Compared with the control method, the microarray technology was used to detect acute infections: ADV, RSV, IFV-A, IFV-B, PIV, MP and CP positive coincidence rates were: 91.2%, 90.3%, 86.8%, 88.9%, 93.5%, 93.8% and 93.8%. Therefore, the protein microarray assay has a high compliance rate with ELISA. The microarray chip method can detect IgM titers of 7 respiratory pathogens in serum at one time, with high diagnostic value for respiratory virus infection. It shows that protein microarray technology has manipulation convenience, high throughput, high sensitivity and specificity, and it can be used in clinical diagnosis of recent respiratory pathogen infections.

**Key words:** : respiratory pathogen; immunoglobulin M; microarray chip method; enzyme linked immunosorbent assay