

· 论著 ·

PstS1-ESAT-6 抗原血清学和 γ -干扰素释放试验辅助诊断结核病的价值

何秀云 黄香玉 朱传智 陈红兵 张翠英 肖漓 高钰 孔祥瑞

【摘要】 目的 分析重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 抗原血清学和 γ -干扰素释放试验辅助诊断结核病的潜在价值。**方法** 选取 40 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c 小鼠和 18 只 SPF 级豚鼠,均分别注射卡介苗(BCG)或热灭活结核分枝杆菌。选取解放军第三〇九医院全军结核病研究所于 2012 年 3—8 月收治入院的 129 例结核病患者(结核组)、54 例非结核性肺部相关疾病患者(非结核组)和 194 名健康者(健康对照组)作为研究对象。研究对象均采集外周静脉血。外周血单个核细胞(PBMC)和免疫的小鼠脾淋巴细胞经重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 体外刺激,应用酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测经抗原刺激后释放 γ -干扰素(IFN- γ)的效应 T 淋巴细胞即斑点形成细胞(SFC);应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测外周血血浆和免疫小鼠血清抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG;应用孟都法(Mantoux)检测健康者 BCG-PPD 皮试、免疫豚鼠 BCG-PPD 皮试及重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮试。**结果** 结核组 PBMC 体外经重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 刺激,分泌 IFN- γ 的 SFC 数为 $(45.02 \pm 68.03)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC,高于非结核组的 $(11.87 \pm 38.63)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC 和健康对照组的 $(5.24 \pm 15.46)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC ($F = 32.96, P = 0.000$)。ELISPOT 诊断结核患者的敏感度为 82.2% (106/129),诊断非结核组患者和健康者的特异度分别为 87.0% (47/54) 和 90.2% (175/194),两者特异度比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.45, P = 0.500$)。结核组血浆中抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 水平(平均 A_{492} 值为 0.82 ± 0.66)高于非结核组[平均 A_{492} 值为 (0.60 ± 0.30)]和健康对照组[平均 A_{492} 为 (0.36 ± 0.20)]($F = 43.60, P = 0.000$);ROC 分析确定检测临界值为 0.49,其用于诊断结核病的敏感度为 62.2% (69/111)、诊断非结核组的特异度为 40.4% (19/47)、诊断健康者的特异度为 84.5% (164/192),诊断非结核组与健康组的特异度比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 42.60, P < 0.01$)。热灭活结核分枝杆菌免疫豚鼠均产生 BCG-PPD 和重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮试反应,所有豚鼠皮肤出现红肿或硬结平均直径 > 5 mm;热灭活结核分枝杆菌免疫小鼠,重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 ELISPOT 和 ELISA 检测均为阴性。BCG 免疫豚鼠只产生 BCG-PPD 皮试反应,硬结平均直径为 (10.08 ± 0.36) mm,不产生重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮试反应;BCG 免疫小鼠,重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 ELISPOT 检测阴性,而 ELISA 检测为阳性。**结论** ELISPOT 用于结核病诊断优于血清学诊断,但其诊断活动性结核病价值还需进一步论证。

【关键词】 结核; 早期分泌抗原靶 6; 结核菌素试验; 酶联免疫斑点检测; 酶联免疫吸附测定; 对比研究

Value of IgG reactivity and IFN- γ release responses to recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 in assisting diagnosis of tuberculosis HE Xiu-yun, HUANG Xiang-yu, ZHU Chuan-zhi, CHEN Hong-bing, ZHANG Cui-ying, XIAO Li, GAO Yu, KONG Xiang-rui. Beijing Key Laboratory of Organ Transplantation and Immunology Regulation, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China
Corresponding author: HE Xiu-yun, Email: xwhe@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate potential value of the recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 based serological detection and interferon- γ release assays in diagnosis of tuberculosis. **Methods** Forty specific pathogen free (SPF) BALB/c (18—20 g) and 18 SPF guinea pigs were immunized with BCG or heat-killed *M. tuberculosis*

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.10.005

基金项目:“十二五”国家重大科技专项(2013ZX10003006-003-001)

作者单位:100091 北京,解放军第三〇九医院器官移植与免疫调节北京市重点实验室(何秀云、黄香玉、朱传智、肖漓、高钰、孔祥瑞),结核病研究所(陈红兵、张翠英)

通信作者:何秀云,Email: xwhe@sohu.com

H37Rv. And 129 tuberculosis (TB) patients (TB group), 54 non-tuberculous patients with other pulmonary diseases (non-TB patients) from the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army between March to August 2012 were selected, 194 healthy subjects were recruited as healthy control (HC group). Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and mouse spleen lymphocytes were stimulated with recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 in vitro. IFN- γ -secreting spot forming cells (SFC) in PBMC and MSL and IgG against recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 were detected with the enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The skin test was performed according to the Mantoux technique.

Results PBMC showed higher SFC in TB patients ($(45.02 \pm 68.03)/2.5 \times 10^5$ PBMC) than in non-TB patients ($(11.87 \pm 38.63)/2.5 \times 10^5$ PBMC) and HC ($(5.24 \pm 15.46)/2.5 \times 10^5$ PBMC) after recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 stimulation ($F=32.96$, $P=0.000$). The sensitivity of ELISPOT was 82.2% (106/129), and the specificities were 87.0% (47/54) for non-TB patients and 90.2% (175/194) for HC. There was no difference in specificity of ELISPOT between non-TB patients and HC ($\chi^2=0.45$, $P=0.50$). The A_{492} of IgG against recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 was higher in plasma from TB patients (mean, 0.82 ± 0.66) than in plasma from non-TB patients (mean, 0.60 ± 0.30) and from HC (mean, 0.36 ± 0.20) ($F=43.60$, $P=0.000$). The cutoff of A_{492} of IgG against recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 was 0.49 using ROC analysis. The sensitivity of ELISA was 62.2% (69/111); and the specificities for non-TB patients and HC were 40.4% (19/47) and 84.5% (164/192), respectively. The specificity of ELISA in non-TB patients was significantly lower than that in HC ($\chi^2=42.60$, $P<0.01$). All guinea pigs sensitized with heat-killed *M. tuberculosis* showed positive skin reactions (mean diameter of induration >5 mm) to four does of recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6 and BCG-PPD; guinea pigs sensitized with BCG showed positive and negative skin reactions to BCG-PPD (mean diameter of induration, 10.08 ± 0.36 mm) and recombinant fusion protein PstS1-ESAT-6, respectively. The ELISPOT and ELISA showed negative reaction in all mice immunized with heat-killed *M. tuberculosis*. The ELISA, not ELISPOT, showed positive reaction in all mice immunized with BCG. **Conclusion** ELISPOT is more accurate than ELISA in TB diagnosis. Further study is needed to discuss the value of ELISPOT for active tuberculosis.

【Key words】 Tuberculosis; Early secretory antigenic target-6 (ESAT-6); Tuberculin test; Enzyme-Linked immunospot assay; Enzyme-linked immunosorbent assay; Comparative study

痰涂片、细菌培养是传统的结核病实验室诊断方法,但敏感度或特异度较低。虽然基因扩增的分子生物学方法(如 Xpert MTB/RIF)极大提高了诊断敏感度^[1],但仍不能解决菌阴肺结核的诊断。

免疫学诊断可检测宿主免疫反应或免疫状态,其中血清学检测在诊断传染病(如 HIV、HBV)中发挥了重要作用。从机体感染结核分枝杆菌到发展为活动性结核病的过程与体液免疫应答相关^[2],基于此原理,出现了多种商品化结核病血清学诊断试剂盒,但其检测的敏感度和特异度波动均较大^[3]。 γ -干扰素(IFN- γ)释放试验(IGRA)和结核菌素皮肤试验(TST)可诊断细胞介导的免疫应答^[4],TST可反映机体对 PPD 产生超敏反应,IGRA 可检测分泌 IFN- γ 的 T 细胞。IGRA 所采用的抗原是卡介苗(BCG)缺失抗原,即早期分泌抗原靶 6 (Early secretory antigenic target-6, ESAT-6)、培养滤液蛋白-10(culture filtrate protein-10, CFP-10)和 TB7.7 (Rv2654c)^[5]。TST 和 IGRA 检测细胞免疫功能低下者,敏感度均降低,但 IGRA 敏感降低幅度低于 TST^[6-7]。IGRA 和 TST 均不能诊断活动性结核病、且一致性较差^[8]。Rv1985c、Rv3425、Rv0867c、Rv2389c、Rv2450c、Rv1009、Rv1884c、Rv3873、

Rv3878 和 Rv3879c 等抗原^[9-12],IFN- γ 诱导蛋白-10 (IP-10)、白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、IL-10 等细胞因子均不能区分活动性结核病和结核分枝杆菌潜伏感染^[13-14]。许多研究比较 IGRA 和 TST 诊断结核潜伏感染,而研究同一抗原血清学诊断和细胞免疫诊断的报道较少。

周质空间磷酸盐结合脂蛋白和 ESAT-6 分别是血清学和 IGRA 诊断的优势抗原之一^[3,15],笔者研究重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 血清学和细胞免疫诊断特征及其影响因素。

资料和方法

一、资料及来源

1. 动物种类及来源:试验动物为无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c 小鼠,共 40 只,6~8 周龄,18~20 g;SPF 级豚鼠共 18 只,每只体质量 300~350 g,白色雌性,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

2. 菌株:皮内注射用 BCG (fBCG, 批号:201111a063-1),购自成都生物制品研究有限责任公司。灭活结核分枝杆菌 H37Rv 菌株来自中国食品药品检定研究院。

3. 受试对象: (1) 结核组: 选取解放军第三〇九医院全军结核病研究所于 2012 年 3—8 月收治入院的疑似结核病患者作为研究对象。肺结核诊断遵循肺结核诊断标准(WS288-2008); 肺外结核诊断遵循综合诊断包括临床症状、胸腔积液或组织病理切片抗酸染色或结核分枝杆菌培养, 具体参考文献[16]。最终纳入确诊为结核病患者 129 例; 排除非结核性发热、肺部阴影等患者 17 例, 纳入结核病患者均对抗结核治疗有效。(2) 非结核组: 选取解放军第三〇九医院肿瘤科和呼吸科于 2012 年 5—6 月收住入院确诊为肺癌或肺炎的非结核性肺部相关疾病患者, 共 54 例。肺癌经组织病理确诊, 肺炎经临床症状、X 线胸部摄影、细菌培养确诊。(3) 对照组: 选取 2012 年 12 月入伍驻京部队的健康新兵 194 名作为对照组, 有 BCG 卡痕与无 BCG 卡痕的人员分别有 126 名和 68 名。本研究经解放军第三〇九医院伦理委员会批准, 所有研究对象均经知情同意。

4. 试剂和仪器: 结核感染 T 淋巴细胞酶联免疫斑点试验(T-SPOT, TB) 试剂盒购自英国 UK 公司[该试剂盒自带抗原 A(ESAT-6) 和抗原 B(CFP-10)]; AIM 培养液购自上海复星长征医学科学有限公司; RPMI-1640 培养液(Gibco) 购自北京索莱宝科技有限公司; 重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 为本实验室研制; HRP 标记的抗人或抗鼠 IgG 抗体购自美国 Jackson Immuno Research 公司; 人和小鼠 IFN- γ ELISpotPLUS(ALP) 试剂盒购自瑞典 Machete 公司; 人全血淋巴细胞分离液和小鼠脏器淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; BCG-PPD 购自成都生物制品研究所。

二、试验方法

1. 传代培养 BCG(cBCG) 制备: 生理盐水溶解皮内注射用 BCG(fBCG) 接种于改良罗氏培养基(L-J 培养基)、37 °C 培养至菌落形成, 菌落转接到 L-J 培养基培养 2~3 周, 收集菌膜、研磨菌体、洗涤菌体、称湿重, -80 °C 保存备用。

2. 外周血单个核细胞(PBMC) 分离和血浆保存: 所有受试者抽取静脉血 2~4 ml, 于肝素锂抗凝管常温保存, 离心半径 15.6 cm、1500 r/min 离心 10 min, 取 200 μ l 血浆于 -30 °C 保存; 补加 200 μ l 无菌生理盐水于静脉血中, 然后加入等体积无菌生理盐水、上下颠倒混匀, 用无菌吸管吸取上述稀释外周血, 缓慢加入到与外周血等体积的人单个核细胞分离液上面, 常温, 离心半径 15.6 cm、1700 r/min 离心 20 min。用无菌吸管吸起环状乳白色 PBMC

层, 用 10 ml RPMI-1640 培养基洗涤 2 次, 离心半径 15.6 cm、15 000 r/min 离心 10 min; 用 0.5 ml AIM 培养液悬浮细胞, 取 10 μ l 细胞悬液稀释 50 倍, 台盼蓝染色, 计数, 细胞活率均在 90% 以上, 调整细胞浓度至 2.5×10^6 个/ml。

3. 动物免疫: BALB/c 小鼠分成 4 组, 每组 10 只, 分别皮下注射免疫 20 mg 热灭活结核分枝杆菌 H37Rv、500 μ g cBCG、生理盐水、静脉注射 250 μ g fBCG。免疫 5 周, 取脾和血清, 同 PBMC 分离制备脾淋巴细胞用于酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT) 检测经抗原刺激后释放 IFN- γ 的效应 T 淋巴细胞即斑点形成细胞(SFC)。BCG-PPD 皮试阴性的白色雌性 SPF 级豚鼠(300~350 g) 分成 3 组, 每组 6 只, 分别皮下免疫 0.5 mg fBCG、0.5 mg cBCG、20 mg 热灭活结核分枝杆菌 H37Rv。

4. ELISPOT: T-SPOT, TB 试剂盒检测来自 84 例结核病患者和 54 例非结核患者的 PBMC, 按说明书稍加改进, 每孔分别加入 50 μ l AIM 培养液(阴性对照)、阳性质控、ESAT-6、CFP-10 或重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6(AIM 培养液稀释, 终浓度为 5 μ g/ml), 每孔加入 100 μ l 细胞悬液, 于 5% CO₂、37 °C 孵育过夜(20~24 h)。取出微孔板弃去细胞悬液, 按说明书方法显色。

人 IFN- γ ELISpotPLUS(ALP) 试剂盒检测来自 45 例结核病患者和 194 名健康者的 PBMC, 鼠 IFN- γ ELISpotPLUS(ALP) 试剂盒检测小鼠脾细胞, 按说明书进行, 每孔分别加入 50 μ l AIM 培养液(阴性对照)、重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6(AIM 培养液稀释, 终浓度为 5 μ g/ml) 或阳性质控(小鼠脾细胞加入终浓度为 5 μ g/ml 的刀豆蛋白, PBMC 加入终浓度为 5 μ g/ml 的植物凝集素), 每孔加入 100 μ l 细胞悬液, 于 5% CO₂、37 °C 孵育过夜(20~24 h)。取出微孔板弃去细胞悬液, 显色。

显色的 96 孔板采用酶联免疫斑点测定仪 CTL Immuno Spot® UV(美国) 自动计数 SFC。当阳性质控孔中细胞斑点遍布整个反应孔为试验有效, 阳性判定标准: 阴性对照孔 SFC 数为 0~5 个时, 且 ESAT-6、CFP-10 或重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 孔的 SFC 数与阴性对照孔 SFC 数差值 ≥ 6 个; 或阴性对照孔 SFC ≥ 6 个时, 且 ESAT-6、CFP-10 或重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 孔的 SFC 数 ≥ 2 倍阴性对照孔 SFC 数。反之则为阴性。若阳性质量控制孔 SFC 数量 < 20 个, 则判定试验无效。

5. 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 IgG 抗体:包被液稀释重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 为 $5 \mu\text{g/ml}$, 每孔加 $100 \mu\text{l}$, 4°C 过夜 ($15 \sim 16 \text{ h}$)。含 0.05% Tween 20 的磷酸缓冲盐液(PBS-T)洗板 3 次, 每次 5 min ; 每孔加 $200 \mu\text{l}$ 含 10% 牛血清白蛋白的 PBS (PBS-B), 37°C 孵育 1 h ; 同上洗板 3 次加 $100 \mu\text{l}$ PBS-B 稀释外周血血浆 ($1:100$) 或小鼠血清 ($1:500$), 37°C 孵育 2 h ; 同上洗板 3 次, 加 PBS-B 稀释 HRP 标记的抗人或抗鼠 IgG 抗体 $100 \mu\text{l}$ ($1:30\,000$), 37°C 孵育 2 h ; 同上洗板 3 次, 每孔加 $100 \mu\text{l}$ 底物溶液, 避光显色 $20 \sim 30 \text{ min}$, 加 $50 \mu\text{l}$ 2 mmol/L H_2SO_4 终止反应, 测量波长 492 nm 的吸光度值(A_{492})。

6. 结核菌素皮肤敏感性试验(简称“皮试反应”):采用孟都法(Mantoux)于对照组研究对象的前臂掌侧皮内注射 0.1 ml (5 IU) BCG-PPD, 72 h 后测量注射部位红肿或硬结平均直径, 以 $>5 \text{ mm}$ 确定为皮试反应阳性, 若无红肿、硬结或红肿、硬结平均直径 $<5 \text{ mm}$ 则为皮试反应阴性。每只豚鼠背部去毛, 在背部两侧分别同时皮内注射 0.1 ml (5 IU) BCG-PPD 或 4 种剂量重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 (4 种剂量分别是皮内注射 $0.1 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ 和 $5.0 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$), 24 h 测量注射部位红肿或硬结平均直径 $>5 \text{ mm}$ 确定为皮试反应阳性, 若 $<5 \text{ mm}$ 则为皮试反应阴性。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 受试者工作特征曲线(ROC)确定临界值, 两组平均数($\bar{x} \pm s$)比较采用双尾 t 检验(如 ESAT-6 抗原和 CFP-10 抗原分别刺激结核病患者和非结核病患者 PBMC 分泌 IFN- γ 的 SFC 数比较, 有无 BCG 卡痕组 ELISPOT、重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 IgG、TST 检测结果的分别比较等), 3 组和 3 组以上平均数($\bar{x} \pm s$)比较采用一元方差分析(如重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 刺激结核病患者、非结核病患者和健康者(HC)的 PBMC 分泌 IFN- γ 的 SFC 数比较, 结核病患者、非结核病患者和 HC 血浆中抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 比较, 及动物实验结果比较等), 敏感度和特异度比较采用卡方检验, 一致性分析采用 Kappa 分析, 相关性分析采用双变量相关分析(bivariate correlations), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。散点图采用 Prism 5 软件制作, 柱形图采用 Sigma Plot 10.0 软件制作。

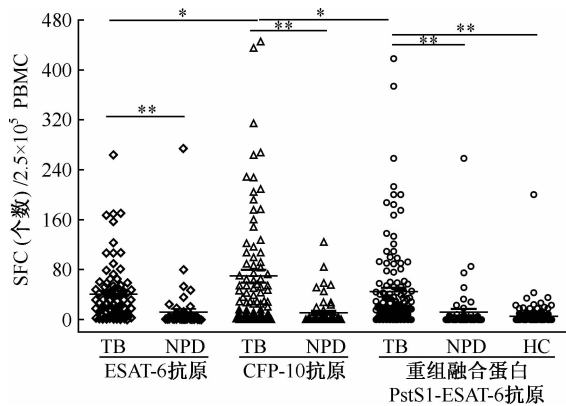
结 果

一、PBMC 体外经重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 刺激培养后释放 IFN- γ 的 SFC 数

ELISPOT 和 T-SPOT. TB 同时检测了 84 例结核病患者和 54 例非结核病患者; 另外 ELISPOT 还检测了 45 例结核病患者和 194 名健康者。结核病患者 PBMC 体外经重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 刺激, SFC 数量明显高于非结核病组和健康组(重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 刺激后检测分别为 $(45.02 \pm 68.03)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC、 $(11.87 \pm 38.63)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC 和 $(5.24 \pm 15.46)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC; $F = 32.96$, $P = 0.000$; 结核病患者与非结核病患者比较 $P = 0.000$; 结核病患者与健康组比较 $P = 0.000$) (图 1)。结核病患者 PBMC 体外经 ESAT-6、或 CFP-10 刺激, SFC 数量明显高于非结核病患者 (图 1), ESAT-6 抗原刺激后检测分别为 $(40.86 \pm 47.09)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC 和 $(11.94 \pm 39.33)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC, $t = 3.90$, $P < 0.01$; CFP-10 抗原刺激后检测分别为 $(69.56 \pm 93.52)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC 和 $(10.74 \pm 23.79)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC, $t = 5.49$, $P < 0.01$ 。结核病患者, CFP-10 抗原刺激后检测的 SFC 数为 $(69.56 \pm 93.52)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC, 高于 ESAT-6 刺激后检测 SFC 数的 $(40.86 \pm 47.09)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC 和重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 刺激后检测 SFC 数的 $(45.02 \pm 68.03)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC, 差异有统计学意义 ($F = 4.13$, $P = 0.017$; CFP-10 抗原与 ESAT-6 抗原比较 $P = 0.01$, CFP-10 抗原与重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 比较 $P = 0.015$)。三种抗原刺激非结核病患者后的 SFC 数量 [ESAT-6 抗原为 $(11.94 \pm 39.33)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC; CFP-10 抗原为 $(10.74 \pm 23.79)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC; 重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 为 $(11.87 \pm 38.63)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC] 比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.02$, $P = 0.980$) (图 1)。

ELISPOT 和 T-SPOT. TB 诊断结核患者的敏感度分别为 82.2% ($106/129$) 和 86.9% ($73/84$), 诊断一致性为 91.8% ($\kappa = 0.71$, $P = 0.112$), ELISPOT 和 T-SPOT. TB 诊断结核病患者其 SFC 值变化趋势呈正相关 ($r = 0.73$, $P < 0.01$); 诊断非结核患者的特异度分别为 87.0% ($47/54$) 和 75.9% ($41/54$), 诊断一致性为 89.3% ($\kappa = 0.68$, $P = 0.130$), ELISPOT 和 T-SPOT. TB 检测非结核

患者 PBMC 分泌 IFN- γ 的 SFC 数或判定为阳性或阴性者高度一致($r=0.72, P<0.01$)。两者敏感度和特异度分别比较,差异均无统计学意义($\chi^2=0.85, P=0.360$ 和 $\chi^2=2.21, P=0.140$)。ELISPOT 诊断健康者的特异度为 90.2%(175/194),与诊断非结核病患者特异度比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.45, P=0.500$)。



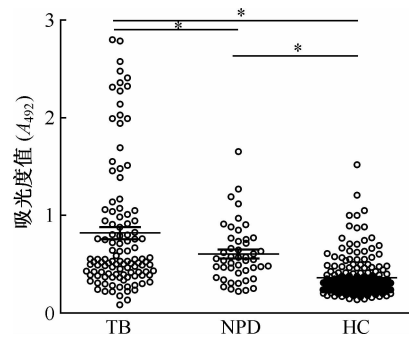
TB:结核病患者;NPD:非结核病患者;HC:健康者。*: $P<0.05$, **: $P<0.01$

图1 ELISPOT 检测外周血单个核细胞分泌 IFN- γ 的 SFC 数量

二、研究对象血浆抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 水平检测

结核病患者血浆中抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 水平[平均 A_{492} 为 (0.82 ± 0.66)]高于非结核病患者[平均 A_{492} 为 (0.60 ± 0.30)]和对照组[平均 A_{492} 为 (0.36 ± 0.20)]($F=43.60, P=0.000$)(图 2)。

ROC 分析确定检测临界值为 0.49,血浆抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 水平用于结核病的敏感度和 62.2%(69/111)、诊断非结核病的特异度为 40.4%(19/47)、诊断健康者特异度为 84.5%(164/192),非结核病患者与健康者血浆抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 水平的诊断特异度比较,差异有统计学意义($\chi^2=42.60, P<0.01$)。



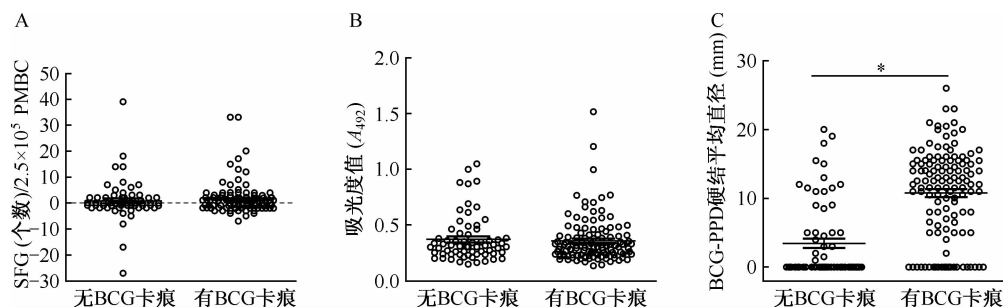
TB:结核病患者;NPD:非结核病患者;HC:健康者。*: $P<0.01$

图2 ELISA 测血浆中抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 的 A_{492} 值

三、BCG 接种对 ELISPOT 和抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测特异度的影响

无 BCG 卡痕的健康者 ELISPOT 检测的 SFC 为 $(0.87 \pm 7.39)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC,与有 BCG 卡痕的健康者比较[$(1.67 \pm 5.69)/2.5 \times 10^5$ 个 PBMC],差异无统计学意义($t=-0.78, P=0.439$)(图 3A);无 BCG 卡痕的健康者抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测的 A_{492} 值为 0.37 ± 0.20 ,与有 BCG 卡痕的健康者[A_{492} 值为 (0.36 ± 0.19)]比较,差异无统计学意义($t=0.48, P=0.636$)(图 3B);有 BCG 卡痕的健康者 BCG-PPD 硬结平均直径为 (10.76 ± 6.56) mm,高于无 BCG 卡痕健康者 BCG-PPD 硬结平均直径 (3.45 ± 5.59) mm,差异有统计学意义($t=7.77, P<0.01$)(图 3C)。

有 BCG 卡痕的健康者 ELISPOT 检测的特异度为 88.7%(113/126),与无 BCG 卡痕的健康者(91.2%, 62/68)比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.35, P=0.550$);有 BCG 卡痕的健康者抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测的特异度为 86.5%(114/126),与无 BCG 卡痕的健康者(83.8%, 57/68)比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.87, P=0.170$);有 BCG 卡痕的健康者 BCG-PPD



A:ELISPOT;B:抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测;C:BCG-PPD 皮肤试验;*: $P<0.01$

图3 有无 BCG 卡痕对 ELISPOT、抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测和 BCG-PPD 检测特异度的影响

皮试反应的特异度为 18.3%(23/126), 低于无 BCG 卡痕者(72.1%, 49/68), 差异有统计学意义($\chi^2 = 57.93, P < 0.001$)。

四、BCG 免疫小鼠或豚鼠诱导重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 特异性免疫应答

热灭活结核分枝杆菌免疫豚鼠皮试结果显示: BCG-PPD 硬结平均直径为(10.08 ± 0.36) mm, 高于 0.5 μg 重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮肤试验的(6.42 ± 0.74) mm, 差异有统计学意义($t = 4.37, P = 0.003$); 而与 0.1 μg 重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮肤试验的(6.58 ± 1.45) mm、2.5 μg 重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮肤试验的(8.0 ± 3.83) mm 和 5 μg 重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮肤试验的(7.67 ± 1.29) mm 比较, 差异均无统计学意义($F = 1.28, P = 0.310$) (图 4A)。BCG 免疫豚鼠诱导 BCG-PPD 皮试反应、而不诱导重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮肤试验反应(图 4A)。BCG 免疫小鼠, 抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测阳性, 而 ELISPOT 检测均为阴性(图 4B, 4C)。热灭活结核

分枝杆菌免疫小鼠不诱导重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 特异性体液和细胞免疫应答(图 4B, 4C)。

讨 论

重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 可作为候选抗原建立 IGRA 诊断结核病。重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 刺激后 IFN- γ 释放试验采用 ELISPOT 检测的敏感度明显高于 Rv1978、NrdF1、CFP-21、PPE57 和 PPE59, 而与 E6 (ESAT-6 18~32 位氨基酸)、E7 (ESAT-6 25~39 位氨基酸)、Rv1985c 和 MPT64 刺激后 IFN- γ 释放试验采用 ELISPOT 检测的敏感度相似, 这些抗原刺激后 IFN- γ 释放试验采用 ELISPOT 检测的敏感度为 47%~78.4%^[15, 17-18]。T-SPOT. TB 和 ELISPOT 诊断活动性结核病的敏感度相似, 但 TST 诊断特异度明显低于 ELISPOT。

商品化血清诊断试剂盒仍在许多国家销售, 每年销售约 150 万个试剂盒^[19-20]; 商品化血清学诊断试剂盒的敏感度和特异度非常不稳定^[3]。PstS1 和 ESAT-6 抗原的血清学诊断敏感度分别为 49.3% 和

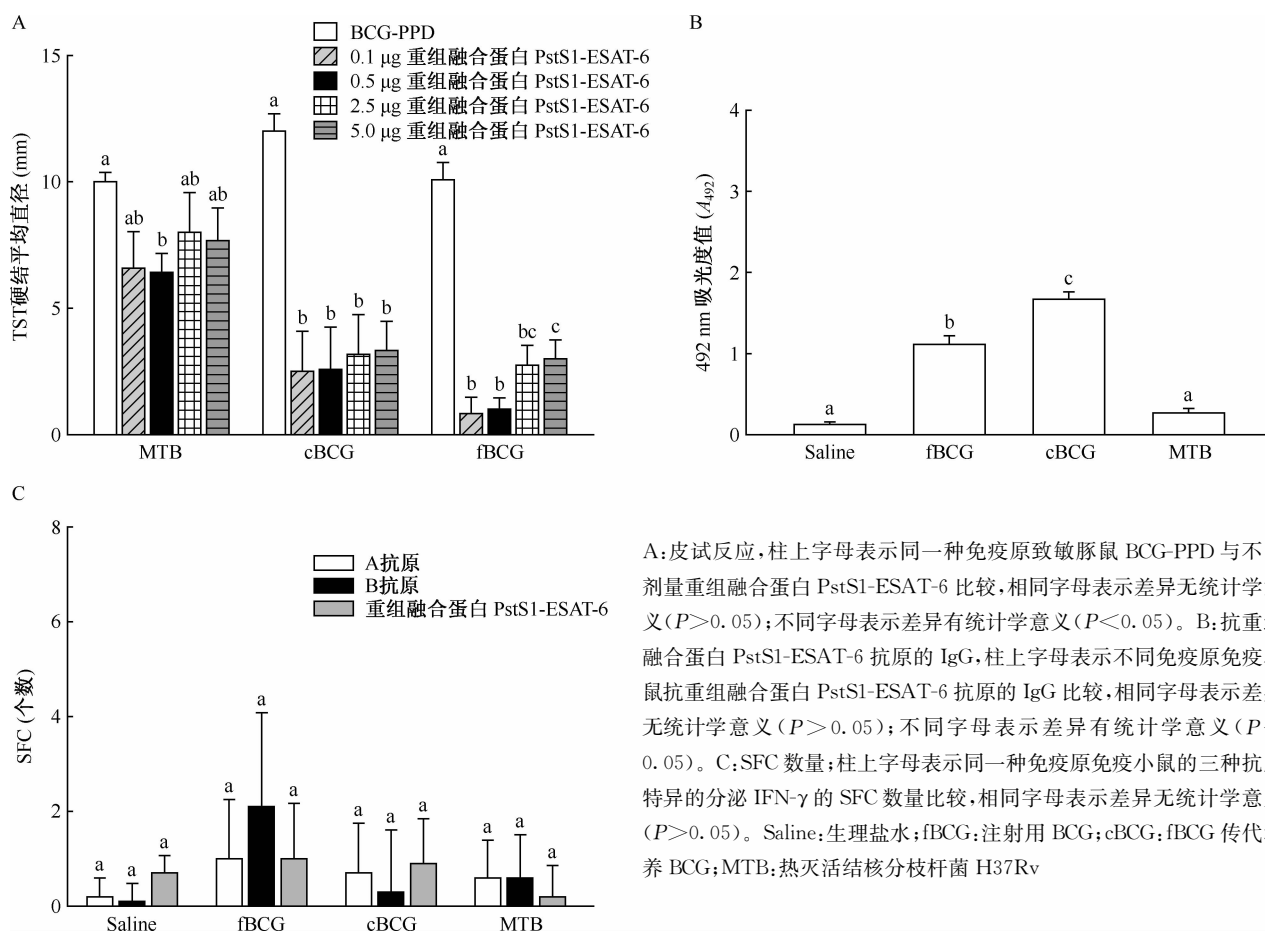


图 4 热灭活结核分枝杆菌与 BCG 免疫动物诱导重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 抗原特异的皮试反应、IgG 抗体和 SFC 数量

13%^[21-22],两者融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的血清学诊断敏感度为 62.2%,重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 血清学诊断非结核患者的特异度低于健康者,单加氧酶抗原(对应序列号为 Rv3618)血清学诊断也发现非结核病患者特异度低于皮试阴性健康者^[22]。因此,融合蛋白或“鸡尾酒”混合的抗原可以提高血清学诊断敏感度,但同时可能降低特异度^[22-23]。重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 血清学诊断与细胞学诊断一致性很低,Rv1985c 也发现了此现象^[18]。

BCG 是我国计划预防接种疫苗,BCG 接种诱导的免疫应答可能影响结核病免疫学诊断。为了提高结核病免疫学诊断特异度,IGRA 刺激抗原采用 BCG 缺失抗原,如商品化 IGRA 试剂盒采用 RD1 区抗原,检测 BCG 接种者特异度高于 TST^[24];Rv1985c(RD2)、Rv3425(RD11)和 RD1 区抗原多肽采用 ELISPOT 可以区分结核分枝杆菌感染与 BCG 接种^[10-11]。因此,IGRA 可能代替 TST 用于 BCG 接种成人和儿童结核潜伏感染诊断,然而,IGRA 不能诊断活动性结核病^[25]。PstS1 是结核分枝杆菌和 BCG 的共同抗原,本研究结果也证明 BCG 免疫豚鼠可诱导 BCG-PPD 皮试反应、不诱导重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 皮试反应,BCG 免疫小鼠诱导抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG、而不是诱导重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 特异性分泌 IFN- γ 的 T 细胞。因此,笔者推测 BCG 免疫小鼠产生抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 随时间延长逐渐降低,因为 BCG 免疫小鼠产生抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 水平相对较低,同时健康人群接种 BCG 并不影响抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测的特异度和抗体水平。

本研究结果表明,结核分枝杆菌感染,而不是热灭活的结核分枝杆菌,诱导重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 特异的体液和细胞免疫应答。BCG 接种不影响健康人群 ELISPOT 和抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测的特异度,但对非结核病患者抗重组融合蛋白 PstS1-ESAT-6 的 IgG 检测的特异度的影响高于 ELISPOT。因此,ELISPOT 用于结核病诊断优于血清学诊断,但其诊断活动性结核病的价值还需进一步确证。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2012. Geneva: World Health Organization, 2012.
- [2] Fujita Y, Ogata H, Yano I. Clinical evaluation of serodiagnosis of active tuberculosis by multiple-antigen ELISA using lipids from *Mycobacterium bovis* BCG Toyo 172. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(11):1253-1262.
- [3] Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. PLoS Med, 2011, 8(8):e1001062.
- [4] Bartalesi F, Vicidomini S, Goletti D, et al. QuantiFERON-TB gold and the TST are both useful for latent tuberculosis infection screening in autoimmune diseases. Eur Respir J, 2009, 33(3):586-593.
- [5] Connell TG, Ritz N, Paxton GA, et al. A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT. TB in children. PLoS One, 2008, 3(7):e2624.
- [6] Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Lancet, 2001, 357(9273):2017-2021.
- [7] Santin Cerezales M, Benítez JD. Diagnosis of tuberculosis infection using interferon- γ -based assays. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2011, 29(Suppl 1):26-33.
- [8] Lange C, Sester M. TB or not TB: The role of immunodiagnosis. Eur J Immunol, 2012, 42(11):2840-2843.
- [9] 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 Immunol, 2012, 188(10):5020-5031.
- [10] Chegou NN, Black GF, Loxton AG, et al. Potential of novel *Mycobacterium tuberculosis* infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting. BMC Infect Dis, 2012, 12(20):10.
- [11] Wang S, Chen J, Zhang Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* RD2 and RD11 antigens Rv1985c and Rv3425 have the promising potential to distinguish active tuberculosis patients from BCG vaccinated individuals. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(1):69-76.
- [12] Dosanjh DP, Bakir M, Millington KA, et al. Novel *M tuberculosis* antigen-specific T-cells are early markers of infection and disease progression. PLoS One, 2011, 6(12):e28754.
- [13] Borgström E, Andersen P, Atterfelt F, et al. Immune responses to ESAT-6 and CFP-10 by FASCIA and multiplex technology for diagnosis of *M. tuberculosis* infection; IP-10 is a promising marker. PLoS One, 2012, 7(11):e43438.
- [14] Kellar KL, Gehrke J, Weis SE, et al. Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with *Mycobacterium tuberculosis* antigens. PLoS One, 2011, 6(11):e26545.
- [15] Lai CC, Tan CK, Lin SH, et al. Diagnostic usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay for interferon-gamma for tuberculosis in cancer patients. Scand J Infect Dis, 2010, 42(11-12):851-856.
- [16] 中华医学会. 临床诊疗指南:结核病分册. 北京:人民文学出版社, 2005:1-46, 122.
- [17] Yang FF, Tu ZQ, Fang YM, et al. Monitoring of peptide-specific and gamma interferon-productive T cells in patients with active and convalescent tuberculosis using an enzyme-linked immunosorbent spot assay. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19(3):401-410.
- [18] Chen J, Wang S, Zhang Y, et al. Rv1985c, a promising novel antigen for diagnosis of tuberculosis infection from BCG-vaccinated controls. BMC Infect Dis, 2010, 10(17):273.
- [19] World Health Organization. Policy statement: commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2011.
- [20] Grenier J, Pinto L, Nair DS, et al. Widespread use of serological tests for tuberculosis: data from 22 high-burden countries.

- Eur Respir J, 2012, 39(2):502-505.
- [21] Beyene D, Lumc Franken K, Yamuah L, et al. Serodiagnosis of tuberculous lymphadenitis using a combination of antigens. J Infect Dev Ctries, 2010, 4(2):96-102.
- [22] He XY, Li J, Hao J, et al. Assessment of five antigens from *Mycobacterium tuberculosis* for serodiagnosis of tuberculosis. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(4):565-570.
- [23] Zhang SL, Zhao JW, Sun ZQ, et al. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis. Tuberculosis (Edinb), 2009, 89(4):278-284.
- [24] Sun L, Xiao J, Miao Q, et al. Interferon gamma release assay in diagnosis of pediatric tuberculosis; a meta-analysis. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011, 63(2):165-173.
- [25] Kobashi Y, Shimizu H, Ohue Y, et al. Comparison of T-cell interferon-gamma release assays for *Mycobacterium tuberculosis* specific antigens in patients with active and latent tuberculosis. Lung, 2010, 188(4):283-287.

(收稿日期:2016-07-26)

(本文编辑:王然 李敬文)

《中国防痨杂志》第九届编辑委员会委员名单

名誉主编 王撷秀

主 编 肖和平

常务副主编 薛爱华

副 主 编 (按姓氏汉语拼音排序)

白丽琼 郭佑民 姜世闻 秦世炳 沙 巍 谭守勇 吴雪琼 徐 飏

编 辑 委 员 (按姓氏汉语拼音排序)

白丽琼 毕利军 查 舜 陈 亮 陈海峰 陈伟生 陈晓红 陈效友
 成诗明 初乃惠 崔文玉 党丽云 丁北川 丁卫民 丁卫忠 杜 娟
 范 琳 范永德 范月玲 高 飞 高大川 高微微 戈宝学 郭佑民
 何宝明 何广学 何金戈 洪 峰 侯代伦 侯双翼 胡代玉 胡忠义
 纪滨英 姜世闻 金 锋 阙晓宏 邝浩斌 雷建平 李 琦 李传友
 李发滨 李敬文 李仁忠 林淑芳 刘存旭 刘二勇 刘飞鹰 刘剑君
 刘锦程 刘玉琴 陆 宇 陆普选 路希维 马永成 牛建军 秦世炳
 沙 巍 邵世峰 申阿东 沈 鑫 谭守勇 田 明 万康林 王 毳
 王国治 王海英 王黎霞 王甦民 王卫华 王晓林 王晓萌 王秀华
 王仲元 吴建林 吴雪琼 肖和平 谢本维 谢兰品 谢汝明 邢 进
 熊昌富 徐 飏 许卫国 薛爱华 姚 嵩 杨枢敏 杨应周 么鸿雁
 易 星 袁燕莉 张 慧 张 青 张 侠 张天华 张文宏 赵明伟
 赵雁林 钟 球 周 林 周 琳 朱 敏 竺丽梅

境 外 编 委 何秋水 Wing Wai Yew(姚荣卫)