

·综述·

结核病血清学诊断进展

刘来成 综述 卢贤瑜 范雄林* 审校

结核病的细菌学检查目前是结核病实验室诊断的金标准。由于痰涂片阳性率较低,镜检需要经验,难以区分环境分枝杆菌造成的假阳性;痰培养需时太长,因此细菌学检查对结核病的诊断价值有限。随着分子生物学技术的迅速发展,用高度敏感的方法检测结核分枝杆菌(简称结核杆菌)及其特异性 DNA 片段,如聚合酶链反应(PCR)、生物探针和基因芯片等,需要相应的检测设备和检测费用高而未能广泛推广。血清学诊断技术有其固有的优势,如操作简便、快速、便于推广、无需特殊精密仪器,已有很多种纯化的特异性抗原可采用,可以发展成自动化检测,尤其是对痰培养阴性和肺外结核病有较为重要的辅助诊断价值而受到广泛的重视。本文从靶抗原的选择和检测技术的改进等方面综述了结核病血清学诊断的现状和进展。

抗原的选择

特异性的抗原是提高血清学检测敏感性、特异性的重要环节。应用于血清学诊断的理想抗原应具有种的特异性和强的免疫原性。尤其是结核杆菌全基因组序列测定以后,单克隆抗体、分子生物学、蛋白质组学和比较基因组学等技术的应用已获得多种纯化和特异性的诊断抗原。现将当前最受关注的抗原及其临床评估结果归纳如下。

1. 脂阿拉伯甘露聚糖抗原 脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)是分枝杆菌细胞壁的重要组成部分,是属特异性抗原,具有较强的免疫原性和免疫调节功能,可刺激机体产生相应的抗体,因而是结核病的血清学诊断应用较广的抗原。有关 LAM 抗原的应用报道很多,Antunes 等^[1]用美国生产的结明(Mycodot TM)试剂盒检测活动性肺结核病人的敏感性为 63.0%,特异性为 92.4%,认为检测 LAM 抗体是结

核病的一项有效的辅助诊断方法。

2. A60 A60(antigen 60)是从牛分枝杆菌胞质中提取的一种大分子物质,是脂质蛋白和多糖的复合抗原。Wu 等^[2]用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测了 178 例活动性肺结核患者和 151 例其他疾病患者血清中的 IgG A60,根据受试者工作特性曲线(ROC)取 261.2 单位为截切值(cutoff point),其敏感性和特异性分别为 49.4% 和 79.5%,认为胸部 X 线片异常的患者结合 IgG A60 阳性将有助于肺结核病的准确临床诊断。

3. 结核杆菌糖脂抗原 结核杆菌糖脂(TBGL)抗原是分枝杆菌细胞壁上的糖脂类物质,具有菌属特异性。近年来的研究表明,糖脂类抗原在诊断方面有很大的优势。Maekura 等^[3]建立了糖脂类抗原抗体快速检测方法,并做了临床评价,对痰涂片阴性的活动性肺结核的敏感性为 56.8%,对痰培养阴性的活动性肺结核的敏感性为 51.2%。将 TBGL 与核酸扩增方法(NAA)联合用于检测,检出率比两者单独使用时进一步提高。Tiwari 等^[4]用脂质体颗粒作为载体,利用纯化的 TBGL 抗原特异地与结核病患者血清中的 TBGL 抗体结合,形成蓝色凝集颗粒来诊断活动性结核病,其敏感性、特异性分别达 94% 和 98.3%。该方法快速(4 min)、经济,且可以区别活动性肺结核、卡介苗(BCG)免疫接种者与健康人群,可用于人群大规模筛选肺结核患者。

4. 38×10^3 蛋白 38×10^3 蛋白是一定位在质膜上的磷酸盐转运蛋白,只在分枝杆菌复合体中表达,BCG 合成 38×10^3 蛋白的量仅为结核杆菌的 1/10。 38×10^3 蛋白为一分泌蛋白,可刺激 T 细胞和 B 细胞免疫反应,广泛应用于结核病的血清学试验。英国公司生产的 OMEGA 结核抗体定量检测 Myco G、A、M 试剂盒联合应用 38×10^3 和脂多糖(LPS)抗原,而 TB Complex Plus 试剂盒选用的是 38×10^3 和 16×10^3 抗原。Butt 等^[5]对 OMEGA 试剂盒进行了评价,认为具有种特异性的 TB Complex Plus 和有属特异性的 Myco M 联合应用可取得最好的效果,检测肺结核的敏感性和特异性分别为 87% 和 93%。 $38 \times$

作者单位:400016 重庆,重庆医科大学临床免疫学教研室; * 华中科技大学同济医学院微生物学教研室

通讯作者:卢贤瑜, E-mail: lxy0627@sina.com

10^3 对活动性肺结核的诊断非常有效,但和大肠埃希菌(简称大肠杆菌)同源蛋白有 30% 以上的交叉,所以对不同人群的敏感性波动较大,尤其对涂片阴性和合并人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的结核病患者效果较差^[6]。

5. 抗原 85 复合体 抗原 85 复合体(Ag85)是一组具有较强细胞免疫及体液免疫活性的分枝杆菌分泌性蛋白,相对分子质量(M_r)为 $(30 \sim 32) \times 10^3$ 。分枝杆菌各菌株均可分泌 Ag85。结核杆菌 Ag85 中至少包括 3 种蛋白成分——Ag85A、Ag85B 和 Ag85C,其中有免疫作用的主要为 Ag85A 和 Ag85B。Ag85 具有分枝菌酸转移酶的活性,在分枝杆菌细胞壁合成的最后阶段发挥必要的作用^[7]。它还能与人纤连蛋白(FN)相结合,有助于结核杆菌入侵宿主细胞。Ag85 可能发展成为结核病的血清学诊断抗原。活动性结核患者血清中的 Ag85 抗体平均水平比其他分枝杆菌疾病患者和健康对照者高 50~150 倍,可通过检测血循环中 Ag85 抗体,对活动性结核加以诊断。Kashyap 等^[8]用间接 ELISA 检测 89% 疑似结核性脑膜炎患者,其脑脊液中存在 Ag85 抗体,认为检测 Ag85 抗体为结核性脑膜炎的早期和确定性诊断提供了一个更灵敏的选择。

6. ESAT-6 和 CFP10 ESAT-6 即 6×10^3 早期分泌性抗原靶,是从结核杆菌短期培养滤液中分离纯化出的一种低 M_r 分泌性蛋白,具有较强的细胞免疫活性,在抗结核感染的免疫回忆应答中起重要作用。ESAT-6 仅存在于致病性分枝杆菌中,包括结核杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌以及苏尔加分枝杆菌、海水分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌^[9]等非典型分枝杆菌,而 BCG 及其他非致病性分枝杆菌缺失。CFP-10 即培养滤液蛋白 10,与 ESAT-6 位于同一基因簇上,两者分布相同,都是 RDI 区编码的^[10]。ESAT-6 和 CFP10 能刺激机体产生特异性 IgG,利用 ESAT-6 和 CFP10 抗原能与结核杆菌感染者血中特异性 IgG 结合的特点,采用 ELISA 等方法可特异性区分是真正的结核杆菌感染或是接种 BCG 后所致敏,该方法明显优于 PPD 作包被抗原的 ELISA。陈全等^[11]以 CFP10-ESAT-6 融合蛋白为抗原,用 ELISA 检测豚鼠血清中抗结核杆菌抗体,11 份 H37Rv 感染豚鼠血清全部呈阳性反应,11 份 BCG 免疫豚鼠血清仅 1 份呈阳性反应。

7. U1 蛋白 Mukherjee 等^[12]在收集结核杆菌 H37Rv 株静脉感染 C57BL/6 小鼠早期(10~14d)尿液时分离到 1 种结核抗原,氨基酸测序鉴定后,克隆

并表达相应的基因,纯化得到可溶的重组蛋白,命名为 U1 蛋白(urine protein 1), M_r 大约为 16.8×10^3 。进一步用 ELISA 检测肺结核患者血清中 U1 抗体的敏感性为 60%,检测合并 HIV 感染的结核病患者的敏感性为 87%,而正常人血清不与 U1 蛋白反应。将 U1 蛋白与 Mtb81 联合用于检测合并 HIV 感染的结核病患者的敏感性为 93.6%。同时检测了 12 例 HIV 感染的非结核患者,其中 9 例患者血清中无可检测的 U1 抗体,另外 3 例 U1 抗体的水平处于 ELISA 检测的临界点。因此认为,检测 U1 抗体可增加结核病血清学诊断的敏感性,尤其对合并 HIV 感染的结核病患者。

8. 其他抗原 Welding 等^[13]在大肠杆菌中克隆表达了 4 种超抗原——TB9.7、TB15.3、TB16.3 和 TB51,并用它们来检测痰涂片阳性和涂片阴性的结核患者,敏感性为 36%~93%,而特异性超过 97%,其中 TB16.3 最为有效。TB16.3 与 TB9.7 联合检测合并 HIV 感染的结核病患者,其敏感性超过 85%。Bank 等^[14]基因重组表达 Rv3369 和 Rv3874 基因,并用它们做抗原检测结核病患者的敏感性分别为 60%、74%,特异性分别为 96%、97%,表明是有价值的结核病血清学诊断抗原。其他抗原,如 MPT64、P90、TB4 等,也曾被作为快速血清学检测的候选抗原进行研究,但大多未达到诊断敏感性的要求。

血清学诊断技术的发展

在结核病血清学诊断过程中发现单一抗原无法产生令人满意的诊断结果,多克隆抗原“鸡尾酒”的应用有助于血清学诊断特异性和敏感性的提高。ELISA 简便、易行、快速又无需特殊精密仪器,在结核病血清学诊断方面研究得最多,应用也最广,并在技术上进行了多方面的改进。另外,免疫印迹技术、蛋白芯片技术等检测血清抗体方法,为结核病的诊断提供了有价值的手段。

1. 联合应用结核抗原 将结核特异性的抗原联合或者几种特异蛋白融合成多聚蛋白复合物用于检测能提高诊断能力,不影响诊断特异性,而比单一抗原法具有更高的敏感性。Okuda 等^[15]回顾性地分析了 3 种结核病血清学诊断抗原 TBGL、LAM、A60 在活动性肺结核中的应用,其敏感性分别为 70.1%、67.5%、70.9%,特异性分别为 92.5%、97.5%、95.0%。3 种抗原联合检测,其敏感性提高到 91.5%,特异性降为 87.5%。Houghton 等^[6]报道用患者的血清从结核杆菌基因组表达文库中鉴定出

Mtb11(即 CFP-10)、Mtb8、Mtb48 和 DPEP(富含脯氨酸的蛋白),并得到各自的重组蛋白。将 Mtb11、Mtb8 与 38×10^3 蛋白的编码基因重组构建经大肠杆菌表达为多表位的蛋白聚合体 TbF10,在此基础上,又加入 Mtb48 构建成蛋白聚合体 TbF6,两者用于诊断,比单一抗原法的敏感性都有所提高,再加入 DPEP 则能显著提高检测的敏感性。多抗原“鸡尾酒”诊断方法有利于节约生产和检测成本,如进一步优化抗原组合,可以在发展中国家推广使用。

2. 循环免疫复合物测定 特异性循环免疫复合物(CIC)的检测是结核病血清学诊断中的另一重要领域。活动性结核患者特异性 IgG 类免疫复合物明显增加,并随病情的好转而下降,故检测血清、脑脊液、胸腔积液、腹水中的结核特异性免疫复合物对活动性结核的诊断也有重要的意义。部分活动性肺结核患者痰菌检查阳性,而血清结核抗体测定为阴性,其原因之一就是形成 CIC 所致。因此,众多的研究者认为检测结核患者 CIC 含量有助于结核病的辅助诊断^[16]。检测 CIC 最简便的方法为酶标法。CIC-ELISA 特异性比痰涂片要高,尤其对不易得到痰标本的儿童结核和肺外结核效果较好。

3. 免疫印迹技术 免疫印迹技术是高分辨的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰凝胶电泳(SDS-PAGE)技术与高敏感性的酶联反应技术的结合产物。目前,该技术已被转化成产品,操作者只要通过后半步骤的酶联免疫反应,即可检出待检标本中所含的多种结核杆菌多肽抗原成分的特异性抗体。北京生产的 TB-40 结核抗体免疫印迹法检测试剂盒选取的抗原来自于结核杆菌全菌,并筛选出最具免疫原性及特异性高的蛋白成分作为诊断抗原,大幅度提高了诊断准确性,并可作为结核病诊断的确证实验。用于检测痰菌阳性结核患者、痰菌阴性结核患者、肺外结核病的敏感性分别为 93%、86%、89%,特异性超过 95%。

4. 酶联免疫斑点技术 酶联免疫斑点(ELISpot)技术是检测细胞分泌细胞因子的一种实验方法,采用可定量的夹心 ELISA,通过 ELISpot 分析系统对加底物后形成的斑点分析后得出结果。ELISpot 技术具有较高的特异性和敏感性,目前正被国内、外广泛应用。Ewer 等^[17]用 ELISpot 技术检测对结核杆菌分泌的抗原有特异性反应的 T 细胞来诊断早期结核病。这项研究共纳入了结核流行区有不同程度结核病接触史的 535 名学生,结果显示结核杆菌素皮肤试验(TST)和 ELISpot 技术的一致性达

89% ($P < 0.0001$)。但 ELISpot 技术与研究对象结核病接触程度之间的正相关性显著强于 TST。在接种过 BCG 的儿童中,TST 假阳性的可能性较大,而 BCG 接种对 ELISpot 技术结果没有影响。作者认为 ELISpot 技术可开始替代 TST,这将使更多的人能在感染仍处于隐匿期时就可进行预防,而不至于发展成为严重的结核病。

5. 蛋白芯片技术 蛋白芯片技术借助于高通量蛋白检测技术平台,将结核杆菌多种抗原固相于同一微孔滤膜并利用微孔滤膜的渗滤、浓缩、凝集作用,使抗原抗体反应在固相膜上快速进行,然后以免疫金作为标记物直接在膜上显色,再以蛋白芯片阅读仪自动扫描膜上颜色,建立多种结核抗原的蛋白芯片检测系统。该检测系统具有以下优点:操作简便、快速,患者血清分离后,只需 5 min 就可以为临床提供有价值的实验资料;敏感性高,特异性强,符合临床辅助诊断要求;结果的判断采用芯片识别阅读仪,避免了人为判读时的主观误差。

6. 体液中结核抗原或抗体的检测 结核抗体检测技术已日趋成熟,测定的标本除血清外还有脑脊液、胸腔积液、腹水、痰、灌洗液、尿液等。Singh 等^[18]联合检测尿液和血清中抗体诊断结核病有很高的敏感性,为进一步研究检测尿液中的抗体诊断结核病打下了基础。由于机体受到结核杆菌感染后,体内首先出现的是结核抗原,而结核抗体则要感染后 8 周起逐渐产生,因此检测结核抗原具有早期诊断价值。尤其对结核性脑膜炎的快速诊断、器官移植术后并发结核感染的确定和肺结核与肺癌的鉴别诊断等尤为重要。目前,有关结核抗原检测的研究国内外均有报道,其中以脑脊液结核抗原检测的研究较多。Song 等^[19]用抗结核杆菌过氧化氢酶-过氧化物酶(mKatG)单克隆抗体,采用蛋白印迹技术来检测患者组织中的 mKatG 抗原,其敏感性为 55%,特异性为 100%。痰标本中的结核抗原检测也有报道,但技术问题较多,因为痰是不均匀的粘胶样半流性液体,很难准确测定。

展望

现有的结核病诊断方法并未能满足临床需要,未来结核病诊断试剂的发展更加强调简单、价廉、快速、敏感而且特异,且对特定的人群要有特定的检测诊断方法。目前应加强下述内容的研究:①发现更多的特异性抗原联合用于检测:由于结核杆菌抗原结构复杂,分枝杆菌属中各种细菌之间抗原性存在

广泛的交叉,因此应结合分枝杆菌基因组学和比较基因组学的成果,着重于结核杆菌特异性抗原的分析和纯化。②加强测定方法的研究,进一步提高检测方法的敏感性和特异性:要对方法的最佳测定条件、可能的影响因素等进行细致研究;要通过大量标本的测定结果比较,选择最佳测定方法,并使之在基层推广应用;要研究定量测定,尽可能用仪器判断结果,以避免人为测定误差。③加强对特定的人群如痰涂片阴性患者、合并 HIV 感染者、老年患者或隐性感染者、肺外结核病和儿童结核病等特定的检测诊断方法的研究。④加强对除痰外的多种体液检测的研究,如尿液容易收集且无创伤、特异,是未来结核病血清学诊断的方向。

参 考 文 献

- Antunes A, Nina J, David S. Serological screening for tuberculosis in the community: an evaluation of the Mycodot procedure in an African population with high HIV-2 prevalence (Republic of Guinea-Bissau). *Res Microbiol*, 2002, 153: 301 ~ 305
- Wu HP, Shieh WB, Hsien FK, et al. The significance of mycobacterium tuberculosis antibody, antigen 60 IgG in patients with abnormal chest radiography. *Chang Gung Med J*, 2004, 27: 869 ~ 876
- Maekura R, Kohno H, Hirotani A, et al. Prospective clinical evaluation of the serologic tuberculous glycolipid test in combination with the nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1322 ~ 1325
- Tiwari RP, Tiwari D, Garg SK, et al. Glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv are potential serological markers for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12: 465 ~ 473
- Butt T, Malik HS, Abbassi SA, et al. Genus and species-specific IgG and IgM antibodies for pulmonary tuberculosis. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2004, 14: 105 ~ 107
- Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, et al. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9: 883 ~ 891
- Wilson RA, Maughan WN, Kremer L, et al. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. *J Mol Biol*, 2004, 335: 519 ~ 530
- Kashyap RS, Dobos KM, Belisle JT, et al. Demonstration of components of antigen 85 complex in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patient. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12: 752 ~ 758
- Arend SM, de Haas P, Leyten E, et al. ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of *Mycobacterium kansasii*. *J Infect Dis*, 2005, 191: 1301 ~ 1310
- Pym AS, Brodin P, Brosch R, et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*, 2002, 46: 709 ~ 717
- 陈全,朱道银,骆旭东,等.重组结核分枝杆菌 CFP6-ESAT-6 融合蛋白的制备及应用研究.中华结核和呼吸杂志,2004,27:244 ~ 248
- Mukherjee S, Daifalla N, Zhang Y, et al. Potential serological use of a recombinant protein that is a replica of a *Mycobacterium tuberculosis* protein found in the urine of infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11: 280 ~ 286
- Weldingh K, Roserkrands I, Okkels LM, et al. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 57 ~ 65
- Bahk YY, Kim SA, Kim JS, et al. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics*, 2004, 4: 3299 ~ 3307
- Okuda Y, Maekura R, Hirotani A, et al. Rapid serodiagnosis of active pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by analysis of results from multiple antigen-specific tests. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 1136 ~ 1141
- Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, et al. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of free and immune complex-bound anti-30 kDa antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004, 50: 253 ~ 259
- Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet*, 2003, 361: 1168 ~ 1173
- Singh KK, Dong Y, Hinds L, et al. Combined use of serum and urinary antibody for diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis*, 2003, 188: 371 ~ 377
- Song Z, Marzilli L, Greenlee BM, et al. Mycobacterial catalase-peroxidase is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. *J Exp Med*, 2005, 201: 755 ~ 767

(收稿日期:2006-02-17)