

网络出版时间: 2021-6-11 16:42 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0929.031.html

结核杆菌 RV1737 多肽免疫特性和诊断价值研究

宁 静^{1,2} 张万江² 陈创夫² 马雅静³ 吴江东² 程 江³

摘要 研究结核杆菌 RV1737 多肽免疫特性及在结核病中诊断鉴别能力,多肽抗原模拟干扰素 γ (IFN- γ) 释放实验 (IGRA) 刺激后潜伏结核感染 (LTBI) 组 IFN- γ 高于结核 (TB) 组 ($P < 0.05$)。A+B+C 联合组的灵敏度高于多肽 A、B、C 与融合 D ($P < 0.05$)。同时多肽建立间接 ELISA 法检测血清结核 IgG 抗体, TB 组有更好的反应性,多肽 A 的 IgG 抗体吸光度高于多肽 B、C ($P < 0.05$)。组间绘制 ROC,多肽 A 面积最大,联合 A+B+C 多肽,曲线面积升高且与单独面积比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RV1737 多肽有成为潜伏结核诊断候选抗原潜力。多肽抗原建立 ELISA 检测外周血结核 IgG 抗体可能成为血清学实验结核病筛选新抗原且多肽 A 效果较突出。

关键词 结核病; 潜伏结核感染; 多肽; 诊断性实验; 干扰素释放实验

中图分类号 R 331

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1163-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.031

结核病仍旧是影响人类健康的传染病之一,潜伏结核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) 表现变化多端^[1] 感染缺乏特异性^[2], 中国 LTBI 人数多, 早期诊断与预防治疗刻不容缓。目前 IGRA 阳性是 LTBI 诊断指标, IGRA 用早期分泌靶向抗原 (ESAT-6) 和培养滤过蛋白 (CFP-10) 作为特异抗原, 寻找并研究新的蛋白抗原对结核病发病机制的理解及 LTBI 尽早发现诊断有重要意义。

抗原 RV1737 是潜伏期结核杆菌表达蛋白之一, 是较好的 T 细胞相关候选抗原^[3], 而 Th 的表位对结核感染的诊断有很大潜力和优势^[4], 经软件预

测并合成抗原 RV1737 多肽片段, 进行 IGRA 检测方法的验证。多肽作为包被抗原建立 ELISA 检测结核抗体, 方法简便快捷, 一般病情越活跃、免疫应答反应越强, 则抗体的阳性率会越高^[5], 进一步探讨多肽血清学诊断潜力。

1 材料与方法

1.1 材料 经 DNA star、Vector NT、Bepipred 分析, 表位序列由强耀生物公司多肽技术平台合成。序列的理化性质见表 1。用 ABC 表示, 对照抗原 D 为融合抗原 ESAT6-CFP10。

表 1 多肽序列和理化性质

多肽	序列	位置	等电点	亲水性
A	CIGPLSTSYARDMSLS-NH ₂	25~39	9.0	-0.2
B	CDAPYFRPNADPVLPR-NH ₂	184~198	3.9	-0.1
C	CLVMGATYDPVDNDYT-NH ₂	350~364	9.0	-0.2

1.2 样本纳入 多肽诱导细胞免疫反应的全血样本纳入: 来自石河子大学附属医院感染科、呼吸科, 分别分为 3 组: 结核组 (tuberculosis, TB) 样本共 24 例, 诊断符合《肺结核诊断和治疗指南》^[6] 中标准: 影像学检查 + 结核中毒临床症状 + 实验室指标 + 抗结核治疗有效的人群; LTBI 组样本 18 例, 符合《WS196-2017 结核病分类》的新增分组标准: 为无免疫缺陷者测 PPD 大于 10 mm 或 IGRA 阳性者; 对照组 (healthy control, HC) 样本 17 例来自健康体检人群, 所有入选者均自愿参与研究, 知情同意后采样, 符合医学伦理规范。多肽建立间接 ELISA, 血清样本纳入: TB 组, 取患者血清作为阳性样本, 共 65 例; HC 组, 取健康体检者血清为阴性样本 110 例。

1.3 实验步骤

1.3.1 多肽诱导细胞免疫反应的检测 ① 新鲜全血采集与保存: 血液约 5 ml 存储于室温环境 4~6 h 分装处理。多肽 A、B、C, 融合抗原 ESAT-6/CPF-10 (抗原 D) 加入分装样本, 37℃ 孵育 22 h, 3 000 r/min, 离心 5 min 取上清液。② IFN- γ 检测: 依试剂盒流程 450 nm 上机检测, OD 值计算 IFN- γ 浓度 (pg/ml)。

1.3.2 多肽建立间接 ELISA ① 多肽 A、B、C 用

2021-04-12 接收

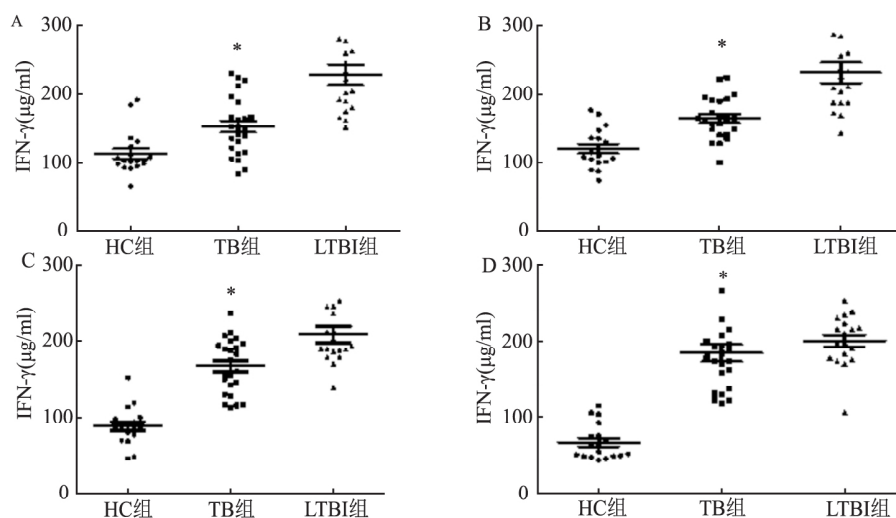
基金项目: 国家自然科学基金 (编号: U1803127); 兵团重点领域科技攻关计划项目 (编号: 2018AB019)

作者单位: 石河子大学¹ 医学院第一附属医院血液科、² 新疆地方病与民族高发疾病教育部重点实验室、³ 医学院第一附属医院检验科, 石河子 832000

作者简介: 宁 静, 女, 检验师;

程 江, 男, 副主任技师, 责任作者, E-mail: 1626117007@qq.com;

吴江东, 男, 副教授, 责任作者, E-mail: 1556874645@qq.com

图1 不同多肽抗原对全血刺激后释放 IFN- γ 水平A: 多肽 A; B: 多肽 B; C: 多肽 C; D: 融合抗原 D; 与 LTBI 组间比较: * $P < 0.05$

了碳酸盐缓冲液稀释,加入 96 孔板,100 $\mu\text{g/ml}$ 孔,一抗:血清样本(1:20,1:50,1:100 稀释),二抗:HRP 标记羊抗人 IgG(1:5 000,1:10 000,1:10 000 稀释),确定最佳血清一抗浓度在 1:100 稀释,450 nm 吸光度最佳。② 确定了最佳包被及抗体的浓度,采用棋盘滴定法, P/N 值(检测得到 OD 值后阳性血清与阴性血清的相应比值)大于 2.1 有诊断意义,多肽 A、B、C 包被浓度分别是 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.2 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。③ ELISA 方法的可靠性验证,批内实验与批间实验,变异系数均 $< 15\%$,重复性在可接受范围。其后检测不同组血清。④ 组间的不同多肽的 ROC 曲线的绘制。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 绘图,SPSS 20.0 统计学分析,两独立样本 Mann-Whitney 检验,多样本比较 Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同多肽抗原对全血刺激后释放 IFN- γ 水平

经多肽 A、B、C 和抗原 D 刺激后,LTBI 组与 TB 组 IFN- γ 水平均明显高于 HC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。经多肽 A、B、C 作用后,LTBI 组 IFN- γ 水平明显高于 TB 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。抗原 D 在 LTBI 与 TB 组间差异无统计学意义。见图 1。

2.2 LTBI 组与 TB 组 ROC 曲线评估抗原的诊断价值

多肽 A、B、C 之间的特异性与灵敏度比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); A + B + C 联合组的灵敏度明显高于多肽 A、B、C 与融合 D,差异有统计学

意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 LTBI 组与 TB 组的 IFN- γ 值的 ROC 曲线数据

抗原	AUC	SE	Sig	95% CI	约登值 (%)	特异性 (%)	灵敏度 (%)
多肽 A	0.859	0.055	0.000	0.750 ~ 0.967	0.58	83	75
多肽 B	0.850	0.06	0.000	0.732 ~ 0.968	0.57	94	62
多肽 C	0.725	0.078	0.014	0.571 ~ 0.878	0.44	94	50
融合 D	0.677	0.037	0.052	0.854 ~ 1.000	0.36	61	75
A + B + C	0.928	0.085	0.000	0.510 ~ 0.844	0.70	78	92

2.3 多肽抗原在阳性和阴性血清中 IgG 测定与散点图

TB 组中多肽 A 的 IgG 抗体吸光度明显大于多肽 B、C,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 HC 组中多肽 A 的 IgG 抗体吸光度明显小于多肽 B、C(图 2)。HC 组中多肽 A、B、C 的 IgG 抗体吸光度均值分

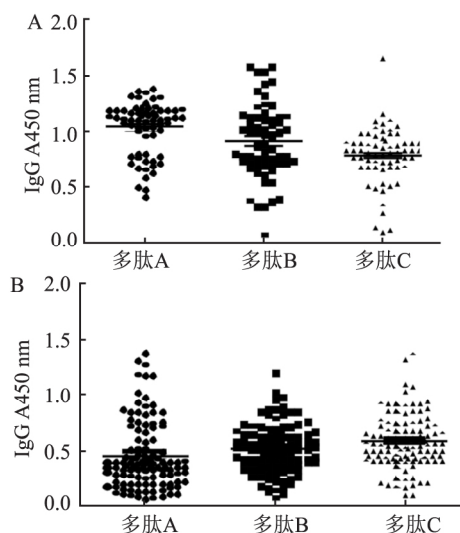


图2 HC 组与 TB 组中不同多肽的抗体 IgG 分布

A: TB 组; B: HC 组

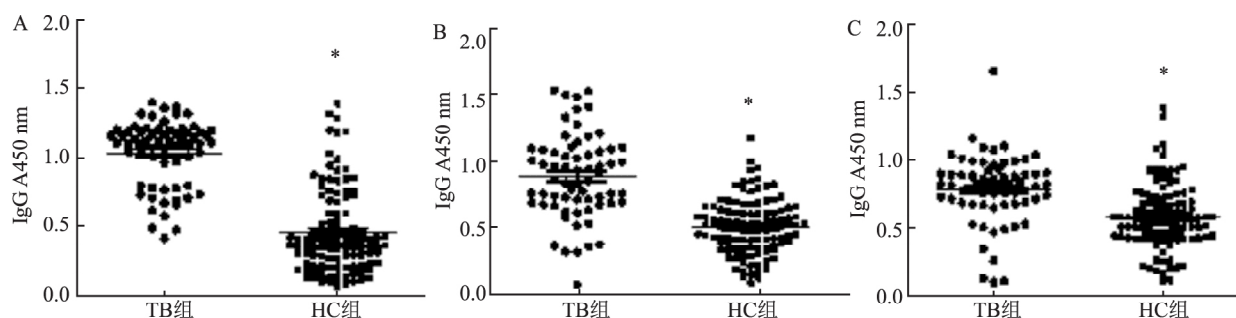


图3 HC与TB组中同种多肽检测血清抗体IgG吸光度值分布

A、B、C: 分别是多肽A、B、C在TB和HC两组中结核抗体IgG吸光度值的比较情况;与TB组比较: * $P < 0.05$

别为0.448 8、0.527 7、0.578 5,分别明显低于TB组的1.139 1、0.915 2、0.781 9,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。

2.4 不同多肽在HC组与TB组血清中IgG抗体分布与ROC的绘制 HC组与TB组绘制多肽A、B、C的ROC,分别为0.908、0.847和0.752。多肽A的ROC较高,提示多肽A诊断效能可能优于多肽B和多肽C。联合多肽的曲线面积与单一面积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4。提示联合多肽诊断曲线面积与特异性上升。单独多肽A、B、C测定结核抗IgG的特异性是83.6%、69.1%、43.6%,灵敏度是87.7%、89.2%、86.2%。联合使用A+B+C多肽,特异性是92.7%,灵敏度是67.7%。若抗体均是阳性为阳性结果,有一个阴性为阴性结果,则不同抗原组合检测结核抗IgG特异性、灵敏度,阴阳性结果分布的例数情况。见表3。

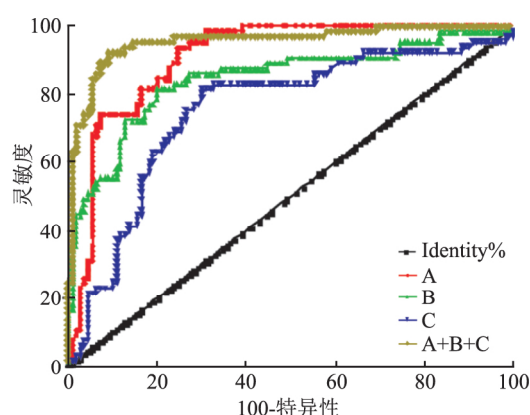


图4 HC与TB组间不同多肽检测抗体IgG吸光度绘制ROC曲线

3 讨论

中国结核病疫情呈现“三高一低”(感染率高、患病率高、农村疫情高、年递减率低)的态势,新疆发病率位居前列^[7]。中国发病率逐年递降而结

核治疗率无显著线性变化,若无更强防治措施难达

表3 不同多肽及组合后相关实验诊断指标

抗原	TB组		HC组		灵敏度 (%)	特异性 (%)	符合率 (%)
	阳	阴	阳	阴			
A	57	8	18	92	87.7	83.6	85.1
B	58	7	34	76	89.2	69.1	76.6
C	56	9	62	48	86.2	43.6	59.4
A+B	50	15	10	100	76.9	90.9	85.7
A+C	49	16	19	91	75.4	82.7	85.7
B+C	50	15	10	100	76.9	90.9	85.7
A+B+C	44	21	8	102	67.7	92.7	83.4

到WTO的2035年终止结核病战略目标^[8]。结核分枝杆菌感染主要是“带菌免疫”,以细胞免疫机制为主,感染的演变也是多因素的^[9]。结核感染检测金标准为抗酸染色后结核菌痰涂片和细菌培养。结核菌素试验(TST)采用纯蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD)检测,方法简易,可能高估潜伏感染率^[10],IGRA阳性可被认为是潜在感染的指标^[11]。目前广泛应用的IGRAs商品化试剂有: QuantiFERON-TB Gold In-Tube(QFT-IT)和T-SPOT.TB(T-SOPT),有检测成本较高、操作相对复杂的特点,IGRA对活动性和非活动性的结核均有检出能力,在临床诊断和疗效评价方面的意义仍需探讨。以LTBI时高表达蛋白抗原RV1737为切入点,此抗原在LTBI产生较高水平免疫反应。RV1737多肽为基础的IGRA检测,在不同结核感染状态组检测多肽刺激后IFN- γ ,与对照融合蛋白ESAT-6/CFP-10刺激后IFN- γ 释放量相比高低差异大^[12]。联合多肽诊断绘制ROC曲线面积比起单一抗原面积增加。多肽对ATB与LTBI有区分作用,有诊断LTBI候选抗原潜力。

应用RV1737多肽为包被抗原建立间接ELISA,检测结核IgG抗体在TB血清组有较高反应

性,多肽 A 效果突出,观察在多肽组合后情况下结核 IgG 特异性有所提高。有文献^[13]指出高度疑似结核病的患者痰涂片联合抗体检测会降低漏诊率和误诊率的发生,一般认同抗体产生的多少与疾病的活动程度呈正相关。多肽的血清学检测对于疑似结核感染可能有排筛意义。间接 ELISA 是常用检测抗体的方法,包被抗原特异性越强,实验整体特异性和稳定性会提高,多肽作为包被抗原提升检测的特异性,成本减低且方法便于掌握。人为因素也会对检测干扰,严格规范步骤与操作,吸光度值测量等环节都是必要的。

参考文献

- [1] 杨涛. 传染性肺结核患者家庭中密切接触者结核感染发病情况与预防[J]. 临床研究, 2019, 27(9): 30-1.
- [2] 常蕴青, 李传友, 唐神结, 等. 结核分枝杆菌毒素-抗毒素系统与持留相关性的研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2019, 37(3): 189-192.
- [3] Gao X, Wu C, Wang X, et al. The DosR antigen RV1737c from *Mycobacterium tuberculosis* confers inflammation regulation in tuberculosis infection[J]. *Scand J Immunol* 2019, 89(1): e12729-34.
- [4] Chen M K, Hsu H T, Lu I C, et al. Techniques for the insertion of the proseal laryngeal mask airway: comparison of the foley airway stylet tool with the introducer tool in a prospective, randomized study[J]. *BMC Anesthesiol* 2014, 14(1): 105-11.
- [5] 白雪娟, 赵亚静, 梁艳, 等. 结核潜伏感染蛋白 RV1737c B 细胞、CTL 及 Th 表位预测与分析[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(3): 5-9, 43.
- [6] 刘小利, 刘涛. 新版《肺结核诊断标准》解读[J]. 中华灾害救援医学 2018, 6(4): 181-3.
- [7] 季之森, 商敏, 沙云凤. 两种检测结核抗体方法在结核病诊断中的应用[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(6): 996-7.
- [8] 刘剑君, 赵雁林. 加大科技创新力度在结核病防治中积极推广适宜技术[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(6): 587-90.
- [9] 李霜君, 张治国, 余琴, 等. 胶体金免疫层析法检测结核分枝杆菌特异性 IgG/IgM 抗体对结核病诊断的应用价值[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(2): 139-43, 149.
- [10] Cardona P J. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis[J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2018, 36(1): 38-46.
- [11] 雷丹, 陈羽, 王功茜, 等. γ 干扰素释放试验和结核菌素皮肤试验对活动性结核病与结核感染诊断价值的 Meta 分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(20): 3056-62.
- [12] 韩荣花, 赵森林, 李应宏, 等. γ -干扰素释放试验在诊断结核分枝杆菌感染中的应用价值[J]. 实用检验医师杂志, 2019, 11(3): 137-40.
- [13] 戚应杰, 石玉如, 刘婷, 等. 抗结核分枝杆菌多表位融合抗原 IgG 抗体检测最佳临界值的建立和初步应用[J]. 检验医学, 2018, 33(10): 33-6.

Immunological characteristic of mycobacterium tuberculosis

RV1737 and domain polypeptide

Ning Jing^{1,2}, Zhang Wanjiang², Chen Chuangfu², et al

(¹ A Division of Hematology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, ² Key Laboratory of Xinjiang Endemic Diseases and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832000)

Abstract To evaluate the diagnostic and differential ability of RV1737 peptide antigens in tuberculosis and the peptide immunoreactivity which was based on the cellular immune simulated interferon gamma (IFN- γ) release test (IGRA) method. After the action of peptides A, B and C, the IFN- γ level of the latent tuberculosis (LTBI) group was significantly higher than that of the comparative Tuberculosis (TB) group ($P < 0.05$). The sensitivity of the combination group A + B + C was significantly higher than that of peptides A, B, C and fusion D ($P < 0.05$). The antibody of tuberculosis IgG was detected by indirect ELISA based on polypeptide. Better reactivity in TB group serum, the absorbance of IgG antibody of polypeptide A in the TB group was significantly greater than that of polypeptides B and C ($P < 0.05$). The area of polypeptide A was the largest when ROC was drawn between groups, and when combined with A + B + C polypeptide, the curve area increased and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). RV1737 polypeptides may be candidate antigens for the diagnosis of latent tuberculosis, ELISA may be established to detect peripheral blood TB IgG antibody by polypeptide antigen. In particular, polypeptide A may be the new antigen for screening serological experimental tuberculosis.

Key words tuberculosis; latent tuberculosis infection; peptide; evaluation of diagnostic test; IGRA