

网络出版时间: 2018-8-2 09:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.030.html>

◇技术与方法◇

评价多种抗原在非典型脊柱结核辅助诊断中的作用

吴仁森¹, 孟晓源², 李坤^{1,2}, 车立新², 郭瑞²

摘要 采用 ELISA 法检测 63 例疑似非典型脊柱结核患者和 30 例健康体检者血清中结核杆菌热休克蛋白 10(MTB Hsp 10)、结核杆菌热休克蛋白 60(MTB Hsp 60)、热休克蛋白 16.3(Hsp 16.3) 和热休克蛋白 70(Hsp 70) 吸光度(OD) 值, 探讨这 4 种抗原在非典型脊柱结核辅助诊断中的作用。非典型脊柱结核组血清中 4 种抗原 OD 值高于脊柱其他疾病组和健康体检组($P < 0.05$); MTB Hsp 10、MTB Hsp 60、Hsp 16.3、Hsp 70 的诊断灵敏度和特异度分别是 87%、89%、70%、51% 和 73%、75%、84%、91%, 4 种抗原联合诊断灵敏度和特异度是 89%、98%; 通过绘制受试者工作特征(ROC) 曲线显示 4 种抗原中 MTB Hsp 10 和 MTB Hsp 60 的曲线下面积(AUC) 最大(分别为 0.85、0.88), 4 种抗原联合诊断时 $AUC = 0.97$ ($P < 0.001$)。4 种抗原对非典型脊柱结核的辅助诊断具有一定意义, 联合诊断价值更高。

关键词 非典型脊柱结核; 结核杆菌; 热休克蛋白; 诊断

中图分类号 R 446.6; R 529.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)09-1461-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.030

全世界大约有三分之一的人为潜伏性结核感染者, 约有 10% 的潜伏性结核感染者会发展成活动性结核患者^[1]。结核杆菌最常侵犯的是肺组织, 其次是骨与关节, 约占肺外结核 10% 左右。在骨与关节结核中, 脊柱结核约占 50% 左右^[2]。由于脊柱结核病灶较深, 发病不典型, 目前仍没有足够的证据及指南来指导脊柱结核的早期诊断^[3]。临床上, 有些脊柱结核患者症状不典型, 影像学上表现也难以和普通脊柱炎性病变及肿瘤相鉴别, 这类脊柱结核被定义为非典型脊柱结核。关于非典型脊柱结核的文献

报道较少, 多以个案报道的形式出现^[4], 因为临床少见, 症状及辅助检查不典型, 所以常常耽误了患者治疗的最佳时机。血清抗原在结核病辅助诊断方面一直备受研究人员关注, 尤其在早期快速诊断方面^[5]。热休克蛋白(heat shock proteins, Hsps) 作为抗原物质, 既可以引起细胞免疫也可以引起体液免疫^[6]。该文选取结核杆菌热休克蛋白 10(*Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 10, MTB Hsp 10)、结核杆菌热休克蛋白 60(*Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 60, MTB Hsp 60)、热休克蛋白 16.3(heat shock protein 16.3, Hsp 16.3) 和热休克蛋白 70(heat shock protein 70, Hsp 70) 4 种抗原, 通过 ELISA 技术来评估其在非典型脊柱结核辅助诊断上的价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2016 年 2 月~2017 年 3 月新疆维吾尔自治区人民医院脊柱外科收治的疑似非典型脊柱结核患者 66 例。所有患者行术前穿刺或术后病理检查, 或行病灶病原菌培养检查。最终确诊为非典型脊柱结核 37 例, 其中男 20 例, 女 17 例; 年龄 16~70(40.8 ± 11.2) 岁; 脊柱其他疾病 26 例, 其中男 14 例, 女 12 例; 年龄 24~57(43.5 ± 10.4) 岁; 诊断未明确及随访丢失共 3 例(排除试验)。以上分组由同一主治医师按照一定纳入、排除标准完成。另外选取 30 例健康体检者做空白对照组, 其中男 18 例, 女 12 例; 年龄 20~57(39.6 ± 11.3) 岁。非典型脊柱结核组纳入标准: ①单节段椎骨结核; ②脊柱附件结核; ③多节段椎骨结核; ④无明显骨质破坏, 但伴有冷脓肿形成; ⑤无明显骨质破坏, 但病理检查有结核性肉芽肿; ⑥术前或术后病理检查符合结核改变; ⑦入院前未经抗结核治疗, 入院后经正规抗结核治疗后, 患者症状好转或治愈; ⑧排除合并 HIV 感染患者; ⑨全部患者随访 ≥ 6 个月。脊柱其他疾病组纳入标准: ①排除脊柱结核可能; ②既往无结核病病史, 无结核病家族史、接触史; ③排除合并 HIV 感染患者。本研究经过医院伦理委员会批

2018-05-02 接收

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(编号: 2014211A060); 新疆维吾尔自治区人民医院内科项目(编号: 20150221)

作者单位: ¹ 安徽医科大学新疆临床学院, 乌鲁木齐 830001

² 新疆维吾尔自治区人民医院脊柱外科, 乌鲁木齐 830001

作者简介: 吴仁森, 男, 硕士研究生;

李坤, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: likun1959@163.com

准,所有受试人员签署知情同意书。

1.2 试剂 结核杆菌热休克蛋白(MTB Hsp 10、MTB Hsp 60)和热休克蛋白(Hsp 70、Hsp 16.3) ELISA 检测试剂盒由南京森贝伽生物科技有限公司生产提供。

1.3 方法 自行设计信息采集表对入选受试人员进行信息采集,包括入选人员人口学基本信息,患者临床特征,入院后患者的实验室检验结果。收集受试者静脉血 5 ml,室温下静置 20 min,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液于 -80 ℃ 冷藏待测。

采用 ELISA 技术检测血清中热休克蛋白。在酶标包被板上加入标准品,并稀释成不同浓度梯度来设置标准浓度。分别在酶标包被板剩余孔里加样品稀释液和待测血清样本,在 37 ℃ 温箱中温育 30 min 后用自动洗板机冲洗 5 次,拍干后加酶标试剂再次温育、洗涤、拍干。在酶标包被板各孔中分别加入显色剂 A、显色剂 B,混匀后放入 37 ℃ 恒温箱内避光显色 15 min。显色结束后在酶标包被板各孔内加入终止液终止反应。用酶标仪以空白孔调零,在 450 nm 波长下读取各孔吸光度(optical density,OD)值并做记录。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,正态分布数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,多组均数间两两比较采用 SNK- q 检验,多组间分类变量采用 χ^2 检验;4 种抗原的诊断敏感性和特异性通过绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线后计算获得,通过比较 ROC 曲线下面积(area under curve,AUC)来对比四

种抗原的诊断效率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入选试验对象临床特征及临床检验结果 试验入选了 66 例疑似非典型脊柱结核患者,随访 6 ~ 12 个月,其中 1 例最终未明确诊断,2 例随访丢失,最终有 63 例患者完成试验。经最终确诊非典型脊柱结核 37 例,有 32 例患者接受手术治疗,5 例保守治疗,所有患者接受正规抗结核治疗 10 ~ 12 个月;26 例其他脊柱疾病患者中,包括脊柱转移瘤 11 例,化脓性脊柱炎 7 例,脊柱原发肿瘤 4 例,布氏杆菌病 4 例;30 例健康体检者无家族结核病史,无结核病接触史。所有入选对象均接受临床特征信息采集及临床相关检验。见表 1。

2.2 非典型脊柱结核组患者影像学特征 本组 37 例患者均接受 X 线摄片和 CT 或者 MRI 检查。主要的影像学特征有:① X 线片表现为骨质增生、骨赘形成,椎间隙变窄;② MRI 可见椎体软骨终板破坏,呈虫蚀样变化;③ 单一椎体中心病变,或者单一椎体压缩性病变;④ 单侧椎弓根破坏或者棘突破坏,可累计多个部位;⑤ 影像学表现与症状不符,影像学表现较重,但患者症状表现不明显。

2.3 4 种抗原血清 ELISA 检测结果 93 例受试者均接受 4 种抗原血清 ELISA 测定,结果以酶标仪在 450 nm 波长下读取各孔 OD 值体现。非典型脊柱结核组、脊柱其他疾病组和健康体检组血清中的 4 种抗原 OD 值不全相等($P < 0.001$) (表 2)。非典型脊

表 1 93 例入选试验对象临床特征信息及临床检验结果

临床特征及检验项目	非典型脊柱结核组($n=37$)	脊柱其他疾病组($n=26$)	健康体检组($n=30$)	F/χ^2 值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	40.8 ± 11.2	43.5 ± 10.4	39.6 ± 11.3	0.499	0.609
性别(n)				0.300	0.861
男	20	14	18		
女	17	12	12		
临床症状(n)					
乏力	20	13	0	30.311	<0.001
盗汗	11	2	0	13.107	0.001
消瘦	8	16	0	29.469	<0.001
午后低热	11	3	0	12.311	0.001
临床体征(n)					
腰背疼	31	24	0	73.386	<0.001
下肢症状(麻木、放射痛、肌力减退)	18	11	0	25.339	<0.001
实验室检查($\bar{x} \pm s$)					
红细胞计($\times 10^{12}/L$)	4.45 ± 0.61	4.05 ± 0.91	4.35 ± 0.12	1.543	0.219
白细胞计数($\times 10^9/L$)	6.52 ± 0.82	6.85 ± 0.43	5.01 ± 0.23	79.342	<0.001
血沉(mm/h)	45.2 ± 1.21	18.3 ± 8.2	3.2 ± 1.31	697.425	<0.001
C-反应蛋白(mg/L)	18.5 ± 8.1	12.2 ± 9.2	4.3 ± 1.21	36.298	<0.001

表2 4种抗原ELISA血清学检测结果(OD_{450 nm}值)($\bar{x} \pm s$)

抗原	非典型脊柱结核组	脊柱其他疾病组	健康体检组	F 值	P 值
MTB Hsp 60	1.75 ± 0.32	1.06 ± 0.42*	1.17 ± 0.41*	30.44	<0.001
MTB Hsp 10	0.35 ± 0.24	0.15 ± 0.11*	0.13 ± 0.11*	17.73	<0.001
Hsp 70	0.39 ± 0.22	0.23 ± 0.08*	0.23 ± 0.12*	10.63	<0.001
Hsp 16.3	0.27 ± 0.18	0.10 ± 0.07*	0.08 ± 0.04*	24.76	<0.001

与非典型脊柱结核组比较: * $P < 0.05$

表3 4种抗原及联合诊断AUC、95% CI和约登指数

血清抗原	AUC	P 值	95% CI	约登指数
MTB Hsp 60	0.878	<0.001	0.810 ~ 0.945	0.64
MTB Hsp 10	0.847	<0.001	0.766 ~ 0.928	0.60
Hsp 70	0.726	<0.001	0.616 ~ 0.832	0.42
Hsp 16.3	0.818	<0.001	0.726 ~ 0.911	0.54
4种抗原联合诊断	0.972	<0.001	0.942 ~ 1.000	0.87

柱结核组血清4种抗原OD值要比脊柱其他疾病组和健康体检组高($P < 0.05$),而脊柱其他疾病组和健康体检组之间4种抗原OD值差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 4种抗原及联合诊断对非典型脊柱结核的诊断价值 根据4种抗原的OD值绘制四种抗原及联合诊断的ROC曲线(图1),根据ROC曲线计算4种抗原及联合诊断AUC、95%置信区间(confidence interval, CI)和约登指数(表3)。MTB Hsp 10诊断灵敏度和特异度分别是87%、73%, MTB Hsp 60是89%、75%, Hsp 16.3是70%、84%, Hsp 70是51%、91%, 4种抗原联合诊断灵敏度和特异度是89%、98%。

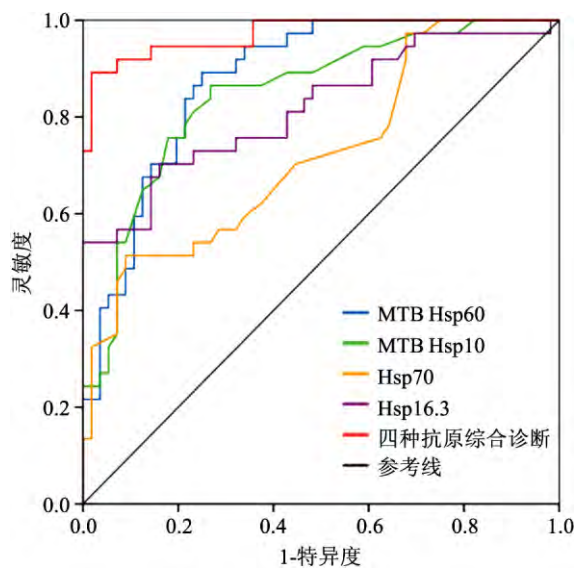


图1 MTB Hsp 10、MTB Hsp 60、Hsp 70和Hsp 16.3
四种抗原及联合诊断的ROC曲线

3 讨论

在脊柱结核的早期,脊柱“僵”是一个重要阳性

体征^[4]。本试验纳入的37例非典型脊柱结核中,有31例出现腰背部肌肉僵硬、钝痛、叩击疼等不适症状。但这些症状不是脊柱结核特有体征,包括低热、盗汗、纳差、消瘦等症状在脊柱化脓性病变和脊柱肿瘤也有发现。影像学检查是脊柱结核诊断中不可或缺的方法,但在脊柱结核诊断中X线片的诊断价值有限,尤其在部分非典型脊柱结核患者X线片上仅表现为骨质增生。CT和MRI在脊柱结核早期诊断中具有一定价值,可发现骨质的细微变化,尤其是MRI在脊柱结核早期诊断上具有很高的敏感性。但最终确诊仍需病灶组织切片或者细菌培养。红细胞沉降率、C-反应蛋白和白细胞计数在感染活动期对结核诊断有一定指导意义,本研究显示非典型脊柱结核组与脊柱其他疾病组比较,红细胞沉降率、CRP等炎性指标较高,但是红细胞沉降率、C-反应蛋白主要反应炎性反应,诊断结核病特异性差。

由于非典型脊柱结核所表现出的症状不典型,往往更容易被误诊,从而延误治疗的最佳时机。如果非典型脊柱结核早期被诊断并参照一般脊柱结核的治疗原则,将会达到和一般脊柱结核相同的治疗效果。所以寻找一种快速、经济、准确的诊断方法非常重要。近年来对结核杆菌抗原上的研究催生了很多对结核疾病新的诊断方法。Hsps是具有调控蛋白降解、耐热、免疫调节等功能的一类抗原蛋白^[5]。人在结核杆菌感染过程中,Hsps诱导免疫反应,激活Toll样受体的作用^[6]。研究人员利用Hsps这些特性来研究其对结核病诊断作用。

本研究通过ELISA技术检测人血清中两种结核杆菌热休克蛋白(MTB Hsp 10、MTB Hsp 60)和两种宿主热休克蛋白(Hsp 16.3、Hsp 70)在450 nm处OD值显示,非典型脊柱结核患者血清中4种抗原

OD 值明显高于脊柱其他疾病和健康人。Shekhawat et al^[1] 通过检测结核患者脑脊液和血清发现,与对照组对比多种热休克蛋白均增高。这种变化反映了宿主对结核杆菌感染的免疫应答,同时也反映了结核杆菌自身对宿主免疫对抗作用^[1]。

通过绘制四种抗原的 ROC 曲线,计算 AUC、约登指数、灵敏度和特异度发现,MTB Hsp 60 的诊断效率最高,虽然 MTB Hsp 10 和 MTB Hsp 60 诊断灵敏度较高,但是 Hsp 16.3 和 Hsp 70 的诊断特异性较高。联合 4 种抗原绘制 ROC 曲线,计算 AUC = 0.97,灵敏度和特异度分别为 89% 和 98%,可以认为联合 4 种抗原对非典型脊柱结核诊断效率要高于任意一种单独抗原。

本研究也有许多不足之处,如纳入样本量较少,结核患者均为成年人,没有纳入儿童非典型脊柱结核患者,Hsps 在儿童脊柱结核血清中表达尚不清楚等。总之,运用 ELISA 技术测定非典型脊柱结核患者血清中特异性抗原的含量是一种简单、快速、廉价的结核诊断方法,MTB Hsp10、MTB Hsp60、Hsp16.3 和 Hsp70 4 种抗原在非典型脊柱结核辅助诊断中具有一定价值。

参考文献

- [1] Shekhawata S D, Purohitb H J, Taoria G M, et al. Evaluation of heat shock proteins for discriminating between latent tuberculosis

infection and active tuberculosis: A preliminary report [J]. J Infect Public Health, 2016, 9(2): 143–52.

- [2] Polley P, Dunn R. Noncontiguous spinal tuberculosis: incidence and management [J]. Eur Spine J, 2009, 18(8): 1096–101.
- [3] Chen C H, Chen Y M, Lee C W, et al. Early diagnosis of spinal tuberculosis [J]. J Formos Med Assoc, 2016, 115(10): 825–36.
- [4] Wang L N, Wang L, Liu L M, et al. Atypical spinal tuberculosis involved noncontiguous multiple segments: Case series report with literature review [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(14): e6559.
- [5] Zhang C, Song X, Zhao Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* secreted proteins as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis and latent tuberculosis infection [J]. J Clin Lab Anal, 2015, 29(5): 375–82.
- [6] McNulty S, Colaco C A, Blandford L E, et al. Heat-shock proteins as dendritic cell – targeting vaccines – getting warmer [J]. Immunology, 2013, 139(4): 407–15.
- [7] 张光铂. 脊柱结核诊断中的几个问题 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(11): 645–7.
- [8] Rutherford S, Hirate Y, Swalla B J. The Hsp90 capacitor, developmental remodeling, and evolution: the robustness of gene networks and the curious evolvability of metamorphosis [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007, 42(5): 355–72.
- [9] Bulut Y, Michelsen K S, Hayrapetian L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll – like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals [J]. J Biol Chem, 2005, 280(22): 20961–7.
- [10] Shekhawat S D, Jain R K, Gaherwar H M, et al. Heat shock proteins: possible biomarkers in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis [J]. Hum Immunol, 2014, 75(2): 151–8.

Combined detection of multiple antigens in the diagnosis of atypical spinal tuberculosis

Wu Rensen¹, Meng Xiaoyuan², Li Kun^{1,2}, et al

(¹ Xinjiang Clinical College of Anhui Medical University, Urumqi 830001; ² Dept of Spinal Surgery, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001)

Abstract ELISA was used to detect the optical density (OD) values of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 10 (MTB Hsp10), *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 60 (MTB Hsp60), heat shock protein 16.3 (Hsp16.3) and heat shock protein 70 (Hsp70) level in 63 cases with suspected atypical spinal tuberculosis and 30 healthy volunteers, to explore the role of four antigens in the diagnosis of atypical spinal tuberculosis. The OD values of four antigens in serum of atypical spinal tuberculosis were higher than that in the other spinal diseases group and health control group ($P < 0.05$). The diagnostic sensitivity and specificity of MTB Hsp10, MTB Hsp60, Hsp16.3 and Hsp70 were 87%, 89%, 70%, 51% and 73%, 75%, 84%, 91%, respectively. The sensitivity and specificity of combined four antigens were 89% and 98%. The plot of receiver operating characteristic (ROC) plots showed that the area under the curve (AUC) of MTB Hsp 10 and MTB Hsp 60 among the four antigens was the highest (0.85 and 0.88, respectively) and the AUC was 0.97 ($P < 0.001$). Combined detection of four antigens on the diagnosis of atypical spinal tuberculosis is more valuable.

Key words atypical spinal tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; heat shock proteins; diagnosis