

• 论 著 •

结核分枝杆菌蛋白抗原诊断试剂的临床价值研究^{*}罗 霖,徐国红,朱 玛,曾义岚,刘 勇,罗东霞,吴桂辉[△]

(四川省成都市公共卫生临床医疗中心 610066)

摘要:目的 研究和评估基于结核分枝杆菌蛋白抗原(TB-SA)研制的结核诊断试剂盒在结核病诊断中的应用价值。方法 运用胶体金法分别检测结核组、非结核其他呼吸系统疾病组、健康对照组血清 TB-SA 结核抗体。结果 TB-SA 结核抗体检测结核的灵敏度为 72.2%,特异度 95.8%,检测结核病患者阳性率(72.2%)明显高于涂片法(44.9%)和培养法(37.1%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 TB-SA 抗体检测具有较好的敏感性和特异性,对结核病诊断和鉴别诊断有较高的临床应用价值。

关键词:结核分枝杆菌; 结核分枝杆菌蛋白抗原; 诊断; 免疫胶体金技术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.005 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)14-1917-03

Clinical value of a diagnostic reagent for mycobacterium tuberculosis special antigen^{*}LUO Mei, XU Yuanhong, ZHU Ma, ZENG Yilan, LIU Yong, LUO Dongxia, WU Guihui[△]

(Public Health Clinical Center of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610066, China)

Abstract: **Objective** To research and evaluate the clinical value of a diagnostic reagent for tuberculosis(TB) antibodies based on mycobacterium tuberculosis special antigen(TB-SA). **Methods** Serum levels of TB-SA of TB group, non-TB respiratory disease group and healthy control group were detected by immune colloidal gold technique. **Results** The sensitivity of TB-SA for detection of TB was 72.2% and the specificity was 95.8%. The positive rate of TB-SA antibodies (72.2%) was higher than sputum smear (44.9%) and culture (37.1%), the differences had statistical significance($P<0.05$). **Conclusion** The TB-SA antibody detection has high sensitivity and specificity, which has good clinical application value for diagnosis and differential diagnosis of TB.

Key words: mycobacterium tuberculosis; tuberculosis special antigen; diagnosis; immune colloidal gold technique

结核病是引起世界范围内人类死亡的主要原因之一,严重危害人类健康^[1]。目前结核病的诊断主要依靠胸片/胸部CT、以涂片和培养为主的细菌学检测以及患者的临床表现等多方面进行综合评估。在结核病诊断常用的方法中,结核菌素纯蛋白衍化物(PPD)皮试因其敏感性高使用多年,但由于 PPD 中含有 200 多种蛋白成分,与卡介苗(BCG)有交叉反应,特异性不够高^[2];细菌学检测是结核病诊断的“金标准”,但涂片查抗酸杆菌阳性率低,仅有 44%的初治结核病患者能通过痰涂片查抗酸杆菌进行诊断^[3],分枝杆菌培养周期较长,最长需 8 周,已经成为延误结核病诊断和治疗的重要因素之一^[4],而且仍然有 20%的活动性肺结核和所有的潜伏感染不能通过传统方法检出^[5],因此这些方法远不能满足临床医生早诊断、早治疗的迫切需求。结核杆菌蛋白抗原 TB-SA 是一种由结核杆菌分泌到细菌体外的蛋白抗原,具有极高的敏感性和特异性,当结核杆菌在培养液中生长时, TB-SA 被释放到细菌体外。TB-SA 容易被抗体免疫系统识别而产生特异性抗体,这一点已通过动物免疫实验得到证实。世界卫生组织提出的诊断结核的策略要有可推广性^[6],因此,研发简便、快速、准确的诊断方法对结核病防治有重大的积极意义。本研究通过采用纯化结核分枝杆菌分泌型 TB-SA 抗原研发的胶体金法试剂盒,研究和评估结核分枝杆菌 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)检测结核病的特异性和敏感性等,为临床推广应用提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次研究共纳入患者 301 例,其中男 192 例、

女 109 例;年龄 14~79 岁,平均(39.5±16.6)岁;其中结核病患者 205 例(肺结核 144 例,肺外结核 61 例),其他呼吸系统疾病患者 36 例(肺部感染 18 例,肺癌 11 例,慢性阻塞性肺病 3 例,支气管扩张 3 例,尘肺 1 例),健康志愿者 60 例。入选的病例严格按照《肺结核诊断标准和分类》指南和《临床研究方案》进行结核诊断及分类,并根据临床考核项目做痰涂片抗酸染色、分枝杆菌培养、胸片/胸部 CT 等检测。

1.2 材料和试剂 本研究所使用的结核分枝杆菌 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)由成都赛普克生物科技股份有限公司研制和提供。试剂盒用纯化的 TB-SA 抗原和抗人 IgG 分别固定于硝酸纤维素膜上,以胶体金标记 SPA 蛋白,采用膜免疫层析原理制备而成。

1.3 样本的采集与保存 按照研究要求采集痰液、血液等样本,分装保存以备检测。

1.4 结核分枝杆菌 TB-SA 抗体检测(胶体金法) 将试剂条平放在操作台面上,做好标记,用移液器吸取 2 μL 血清样本加在试剂条加样处;尽快在试剂条的后端缓慢加入缓冲液 2 滴,见有液体流到膜面计时开始;5 min 后读取结果,15 min 内有效。

1.5 结果判定 测试区和质控区两条紫红色条带为阳性(+);仅质控区出现条带,测试区无条带出现为阴性(-);质控区无条带出现则视为结果无效。

1.6 统计学处理 采用医学统计学软件 Analyse-it 2.22 与 EPI Info 2002 统计软件进行数据统计分析。组间比较采用 χ^2

^{*} 基金项目:四川省医学科研青年创新课题(Q14021);成都市科技惠民应用示范项目(2014-HM01-00371-SF)。

作者简介:罗霖,女,主管检验师,主要从事临床医学检验与结核病基础研究。 [△] 通讯作者, E-mail: wghwgh2584@sina.com。

检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 入组病例基本情况 三组患者性别分布、平均年龄、PPD 结果分布以及菌阳未检和未做情况详见表 1。

2.2 结核分枝杆菌 TB-SA 抗体检测(胶体金法)与金标准比

较 分枝杆菌涂片和培养是结核病诊断的“金标准”。在 205 例结核病患者中,运用 TB-SA 结核抗体试剂盒检测阳性率为 72.2%,远高于涂片的阳性率(37.1%)和分枝杆菌培养阳性率(44.9%),差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 301 例研究对象基本情况

基本情况	结核组($n=205$)		其他呼吸系统疾病组($n=36$)	健康对照组($n=60$)
	肺结核	肺外结核		
男(n)	104	39	24	25
女(n)	40	22	12	35
平均年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	40.2 $\pm$ 17.4	32.8 $\pm$ 15.0	49.2 $\pm$ 18.3	38.8 $\pm$ 11.5
PPD				
阳性(n)	67	46	3	20
阴性(n)	8	2	10	40
菌阳未检(n)	65	9	0	0
未做(n)	4	4	23	0

表 2 205 例肺结核患者结核分枝杆菌 TB-SA 抗体检测与金标准比较[%(n/n)]

组别	阳性率
TB-SA 结核抗体检测	72.2(148/205) ^{ab}
培养	44.9(92/205)
涂片	37.1(76/205)

注:与培养法比较,^a $P<0.05$;与涂片法比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 结核分枝杆菌 TB-SA 抗体检测试剂(胶体金法)诊断和鉴别诊断结核病检测结果 本研究用 TB-SA 胶体金试剂分别对结核组、其他呼吸系统疾病组、健康对照组进行了血清 TB-SA 结核抗体的检测。结果显示, TB-SA 胶体金检测试剂盒对肺结核、肺外结核检出的阳性率分别是 77.8%(112/144)、59.0%(36/61);在其他呼吸系统疾病组检出了 4 例阳性,阳性率为 11.1%(4/36);而健康对照组未检出阳性。见表 3。

表 3 结核分枝杆菌 TB-SA 抗体诊断及鉴别诊断检测结果(n)

基本情况	结核组($n=205$)		其他呼吸 系统疾病组($n=36$)	健康对照组 ($n=60$)
	肺结核	肺外结核		
阳性	112	36	4	0
阴性	32	25	32	60

2.4 结核分枝杆菌 TB-SA 抗体检测试剂(胶体金法)诊断价值评价 TB-SA 抗体检测试剂(胶体金法)的敏感性为 72.2%,特异性为 95.8%,阳性预测值为 97.4%,阴性预测值为 61.7%,准确度为 79.7%以及约登指数为 68.0%。

3 讨 论

结核杆菌蛋白抗原 TB-SA 是一种特异性蛋白,其基因的表达和蛋白合成只有在结核杆菌在人体内生长时才进行,只存在于结核分枝杆菌和与其紧密相关的同类致病菌中,且只有一个基因拷贝^[7]。而与结核杆菌同属一个类的其他分枝杆菌,比

如分布在环境中但很少引起病的水垢分枝杆菌、龟类分枝杆菌等,不含有 TB-SA 基因和蛋白^[8]。在 GenBank 中作 DNA 和氨基酸序列搜寻也表明,此基因也不存在任何其他种类的细菌(如大肠杆菌)、真菌、病毒等微生物中。基于 TB-SA 极高的特异性,应用此蛋白作为抗原检测结核病患者体内相应抗体是结核病诊断较好的辅助手段^[9]。

结核分枝杆菌抗体检测由于抗原类型及组合不同^[10-11],机体免疫状态,甚至自身免疫性疾病都会影响结核抗体的检测结果^[12]。在本次研究中,其他呼吸系统疾病组检出 4 例阳性,这 4 例阳性病例入组诊断为肺部感染 2 例、支气管扩张 2 例。经溯源,其中 2 例患者肺部有陈旧性肺结核病灶,由于检测的结核抗体类型为 IgG,抗体在体内的消减需要一定的时间,因此对于此类患者未进一步追踪观察是本次研究一个不足之处。

对结核病做出快速、准确的诊断一直是临床工作的难点。本研究之前运用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测分枝杆菌 TB-SA 结核抗体的研究显示其具有较好的敏感性和特异性,适合在临床推广^[13]。本次临床研究验证了结核分枝杆菌 TB-SA 抗体检测试剂盒(胶体金法)同样具有较高的敏感性(72.2%)、特异性(95.8%)和准确度(79.7%),用于诊断和鉴别结核病,与金标准涂片法和培养法比较,该方法明显提高了结核病人的阳性检出率;尤其是对于较难诊断的菌阴结核、肺外结核很难检测到结核分枝杆菌的结核病患者诊断价值较高。该方法简便快速,15 min 内可完成检测,不需要仪器设备,适合在各级医疗机构中用于结核病辅助诊断和筛查等方面推广应用。

参考文献

[1] Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, et al. Tuberculosis[J]. Lancet, 2003, 362(9387): 887-899.

[2] Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection[J]. Br Med Bull, 2010, 93(1): 69-84.

(下转第 1921 页)

乳腺癌组织学分级有关^[10]。本研究结果显示,乳腺正常组织和乳腺癌组织均有 GATA3 表达。乳腺正常组织阳性表达率显著高于乳腺癌组织,有淋巴结转移患者 GATA3 阳性表达率显著低于无淋巴结转移患者,不同病理分级乳腺癌患者 GATA3 阳性表达差异明显,ER、PR 阳性患者 GATA3 阳性表达率显著高于阴性者。以上结果表明,GATA3 阳性表达与乳腺癌发生发展密切相关,GATA3 低表达患者组织分化程度更低,肿瘤组织学分级更高,淋巴结转移风险更大,可能是因为 GATA3 参与分化调节,能够促进乳腺癌组织的分化。ER、PR 阳性表达引起 GATA3 表达差异可能与 GATA3 表达缺失有关,目前研究机制尚不明确,有研究认为 GATA3 表达过低引起乳腺组织发育障碍,导致出现肿瘤细胞特征^[11]。也有研究认为 GATA3 能够抑制蛋白依赖性激酶的转录。可以认为乳腺癌组织中,GATA3 阳性表达与乳腺癌分化水平及转移能力存在相关性。GATA3 阳性表达率与肿瘤大小、直径、临床分期等无明显相关性,与以往研究报道结果相一致^[12]。关于 GATA3 预后价值的研究,结论尚存有争议。有研究认为 GATA3 是有价值的预后指标,也有研究发现 GATA3 阳性表达和阴性表达患者生存率并没有差异^[13]。本研究结果显示,中危组患者 GATA3 阳性表达显著高于高危组,提示 GATA3 阳性表达与预后存在相关性,但是能否作为独立预测因子,还需要进一步的临床研究。

综上所述,乳腺癌组织 GATA3 表达下调,GATA3 表达异常与乳腺癌发生、发展、预后有关。

参考文献

[1] 郑莹,吴春晓,张敏璐,等. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志,2013,1(8):561-569.

[2] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2013 版)[J]. 中国癌症杂志,2013,1(8):637-684.

[3] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)》编写组. 乳腺癌

HER2 检测指南(2014 版)[J]. 中华病理学杂志,2014,43(4):262-267.

[4] 陈淑芳. HSG、EGFR、GATA3 在乳腺癌组织中的表达及其与临床病理特征的相关性研究[D]. 苏州:苏州大学,2014.

[5] 高寒,姜军,杨新华,等. 5 种血清标志物的不同组合对提高乳腺癌诊断的意义[J]. 第三军医大学学报,2007,29(12):1255-1257.

[6] 易维真,汪晓明,张福忠,等. 乳腺癌中医证型与临床分期及分子标志物的关系[J]. 安徽中医药大学学报,2009,28(5):23-25.

[7] 程凯,余波,吴楠,等. GATA 3 在肿瘤中应用的研究进展[J]. 诊断病理学杂志,2015,22(7):439-442.

[8] 沈丽霞,牛建昭,王继峰,等. 应用基因芯片技术检测金雀异黄素对乳腺癌 T47D 细胞雌激素受体相关信号通路基因表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(2):100-103.

[9] 佟强,金梅,姜慧,等. 结肠管状腺癌 GATA 3 的免疫组化表达检测及其意义[J]. 中国实验诊断学,2015,(3):430-431.

[10] 闫晓飞. HSG、EGFR、GATA3 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国伤残医学,2015,23(22):35-36.

[11] 黄信,蒋光愉,李虹,等. 人乳腺癌组织中 GATA3 的表达及其临床意义[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(8):1433-1436.

[12] 谢婷婷,王芳,赵卫东. GATA 3 与恶性肿瘤的相关性研究进展[J]. 山东医药,2008,48(19):149-150.

[13] 程凯,周晓蝶,余波,等. 乳腺肿瘤组织中 GATA3 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2015,2(7):725-728.

(收稿日期:2016-01-07 修回日期:2016-03-16)

(上接第 1918 页)

[3] Lange C,Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis[J]. Respirology,2010,15(2):220-240.

[4] Anochie PI,Onyeneke EC,Ogu AC,et al. Recent advances in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis [J]. Germs,2012,2(3):110-120.

[5] Steingart KR,Henry M,Ng V,et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis:a systematic review[J]. Lancet Infec Dis,2006,6(9):570-581.

[6] World Health Organization (WHO). The Stop TB Strategy[EB/OL]. [2016-01-15]. http://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/en/

[7] 张津,赵顺英,迟巍,等. 结核分枝杆菌多抗原蛋白芯片对儿童结核病的诊断价值[J]. 首都医科大学,2006,3(1):9-14.

[8] 王海英,于春宝,王燕,等. TBSA 抗体检测对结核病临床诊断价值的研究[J]. 中国防痨杂志,2008,30(1):33-36.

[9] 王学东,董辰元,邱丽华. TB-SA 抗体检测、PPD 试验在结核性脑膜炎中的应用价值[J]. 山东医药,2009,49(49):96-97.

[10] Chen T,Lin J,Wang W,et al. Cytokine and Antibody Based Diagnostic Algorithms for Sputum Culture-Positive Pulmonary Tuberculosis [J]. PLoS One,2015,10(12):e0144705.

[11] 李坤,唐敏. 血清结核抗体对肺结核病的诊断价值初步评价[J]. 检验医学与临床,2012,9(11):1291-1292.

[12] 黄蔚,张琳,周晖,等. 自身免疫性抗体对胶体金法检测结核抗体影响的关系研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2015,18(7):1098-1100.

[13] 赵庆蓉,罗涛,朱帆,等. 血清结核分枝杆菌 TB-SA 抗体在结核病诊断中的临床价值[J]. 华西药理学杂志,2007,22(5):591-593.

(收稿日期:2016-02-13 修回日期:2016-04-21)