

ESAT-6 蛋白在结核病诊断和潜伏感染中的研究进展

河北医科大学第二医院神经内科

刘士甫

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染所引起的结核病,是威胁人类健康的重要传染性疾病之一。近年来,由于器官移植、艾滋病的流行、全球移民速度的增加等原因,结核病的疫情呈明显的上升趋势。全球每年因结核病死亡的人数约有 300 万,目前我国属全球 22 个结核病高负担国家之一,结核病人数在世界排名第二,仅次于印度,约有 5.5 亿人感染过 MTB,约 450 万人患有结核病,其中 200 万人是开放性结核病,每年因结核病死亡的人数约有 13 万。结核已成为感染性疾病的头号杀手,因此,及时、准确地诊断 MTB 感染,对于结核病的控制具有重要意义^[1]。

1 结核分枝杆菌感染的诊断现状

细菌学检查目前是结核病实验室诊断的金标准^[2],但涂片抗酸染色阳性率很低,约为 10%;而结核分枝杆菌培养所需时间(1~2 月)较长,且阳性率仅 20%~30%,对临床早期诊断价值有限^[3]。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及其特异性 DNA 片段,如 PCR、生物探针和基因芯片等,需要相应的检测设备且检测费用高未能广泛推广。免疫学诊断技术因简单、快速、价廉等原因,有较好的发展前景,但缺乏特异性抗原。对 MTB 潜伏感染者的筛选,各国普遍采用结核菌素皮肤试验(TST Tuberculin Skin Test),但结核菌素纯蛋白衍生物(protein purified derivative, PPD)包含的抗原成分复杂,导致筛选特异性差,尤其易受卡介苗接种和非结核分枝杆菌感染的干扰,同时,实验灵敏度不够,临床有

10%~25%的结核病患者 PPD 试验呈阴性,晚期结核患者的阳性率更是降至 50%。90 年代后期发展起来的以 PPD 为抗原的外周血单个核细胞刺激试验或干扰素(IFN)- γ 释放试验明显提高了诊断的灵敏性,但最大的缺陷仍是缺乏特异性抗原。因此,寻找结核特异性抗原对结核病诊断至关重要^[13]。

2 Esat-6 蛋白的特性

2.1 理化特性

早期分泌性抗原靶 6(6kD early secretory antigenic target ESAT-6)为结核分枝杆菌感染早期所分泌的蛋白,由于它在 SDS2PAGE 中泳动的位置接近 6kD,因此称为 ESAT-6。ESAT-6 由 rv3875 基因编码,开放读码框(ORF) 285 bp,编码 95 个氨基酸,相对分子量约 11 kD。1998 年,Harboe 等^[4]应用前后重复多肽 ELISA 检测 ESAT-6 蛋白的结构发现其 N 末端区的 3 到 15 的氨基酸位(EQQWNFAGIEAAA)有一个亲水区,并沿着多肽链发现了另 2 个亲水区。

2.2 分布特性

2.2.1 菌内分布

通过对 MTB 的早期培养滤液(ST-CF)和不同组分进行分析^[5],发现 Esat-6 蛋白不仅存在于 ST-CF,还存在于细胞浆和细胞壁中,但细胞膜中没有。在常规普通培养基上生长时,MTB 分泌的 Esat-6 蛋白量很低,但在感染的巨噬细胞内生长时,Esat-6 蛋白表达量明显提高,这种变化被称为巨噬细胞诱导效应^[6]。与 Ag85 和 38kDa 等不同的是,Esat-6 在 MTB 增殖期和非增殖期都高水平地转录^[7],因此,无论是活动性结核患者还是 MTB 潜伏感染者,Esat-6 都能有效诱导机体的免疫应答。

2.2.2 菌间分布

通过 PCR, Southern 杂交和免疫印迹分析, 从基因和蛋白水平上揭示 ESAT-6 仅存在于致病性分枝杆菌中, 包括人型结核杆菌、牛型结核杆菌、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^[8]等非典型分枝杆菌, 而 BCG 及其他非致病性分枝杆菌缺失。

2.2.3 免疫学特性

ESAT-6 抗原含有多个T细胞和B细胞识别表位, 能够诱导不同遗传背景的个体T细胞反应, 可以在 MTB 感染早期小鼠模型中引起T细胞反应, 在结核患者引起比其他分枝杆菌蛋白更强的免疫反应^[13]。Brondt 等^[9]发现 Esat-6 蛋白可刺激结核分枝杆菌感染小鼠的淋巴细胞增殖, 并诱导模型小鼠的淋巴细胞有效释放 IFN- γ 。Martin^[10]的研究证明 Esat-6 蛋白可诱导结核分枝杆菌感染豚鼠产生迟发型超敏反应。近年来, 多位学者采用更敏感的酶联免疫斑点(ELISPOT)技术, 证明 Esat-6 蛋白及其肽段可刺激结核病患者或潜伏感染者T细胞释放IFN- γ 。除了细胞免疫活性, Harboe等^[12]验证了 Esat-6 蛋白的抗体免疫活性, 即 Esat-6 蛋白可与单克隆抗体 HYB76-8 发生明显的阳性反应, 并据此建立了双抗 ELISA 捕获法, 以备用于对重组结核疫苗 Esat-6 蛋白表达量进行检测。

3 Esat-6蛋白在结核分枝杆菌感染诊断中的研究进展

Esat-6蛋白的分布特异性和良好免疫性决定其作为特异性抗原用于结核病诊断。

3.1 ESAT-6为基础 IFN- γ 释放试验

IFN- γ 释放试验的基础在于检测由BCG 疫苗菌株中所没有的结核分枝杆菌特异抗原 (ESAT-6 和 CFP-10) 混合物刺激致敏 T 细胞后释放出的 IFN γ 。用于诊断 TBM 感染的两种商品化血液检测试剂, 2004年12月FDA 批准了一种即 Quanti FERON-TB Gold Test, 另一种诊断试剂为 T SPOT-TB。QFT-Gold 检测需将全血样品置于肝素抗凝管内并与这

些抗原混合, 此外还需有不加抗原和丝裂原的对照管作对照。感染结核分枝杆菌的病人血中T细胞会和这些抗原反应产生IFN γ , 结果可用ELISA法检测。T-SPOT-TB技术, 2001年由 Lalvani 等发明, 是以 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白为特异性抗原, 通过 ELISPOT 检测结核感染后特异性细胞因子分泌T淋巴细胞来诊断是否存在结核感染。其诊断 MTB 感染者的敏感性超过 90%, 而健康组却未观察到该反应, 因为仅仅是来源于 MTB 感染者的 T 细胞才能识别 ESAT-6。2005年12月, 该试验获得了美国食品药品监督管理局的最终批准, 用于结核感染的辅助诊断, 现已在英国、美国及澳大利亚等国家得到广泛应用。

3.1.1 IFN- γ 释放试验对结核病的诊断

Pathan 等^[11]选用不同程度的 MTB 感染者为实验对象, 用 Esat-6-ELISPOT 方法计数外周血中分泌 IFN- γ 的 T 细胞, 结果发现除了未感染过 MTB 的人群呈阴性反应, 其余各组包括 TST 阳性的结核病密切接触者、淋巴结核患者、痰菌阴性的肺结核患者和痰菌阳性的肺结核患者均呈阳性反应。Hill等^[12]发现, 在有密切结核接触史的健康人群中, ESAT-6-ELISPOT 检测外周血可为阳性结果, 且阳性率随接触时间的增加而增高。

Lalvani 研究比较了Esat-6-ELISPOT、PPD-ELISPOT 和 TST 对结核病的诊断情况, 结果证实了 Esat-6-ELISPOT 诊断活动性结核病比 PPD-ELISPOT 和 TST 的敏感性和特异性均高, Pathan 在研究中还发现 Esat-6-ELISPOT 反应强度与体内 MTB 负荷有关, MTB 越多, Esat-6-ELISPOT 反应越强, 故结核病患者在化疗过程中分泌 IFN- γ 的T细胞逐渐降低甚至阴转, 这可能对判断病情及预后具有重要意义^[13]。我国周霞等^[14]对rCFP-10/ESAT-6 融合蛋白刺激 γ -IFN 体外释放测定与结核菌素皮试检出结核感染的敏感性进行比较。对疑似结核病患者共 229 例进行随机、双盲、平行、对照、前瞻性试验, 后经细菌培养证实患结核病的病人共129 人,

没有结核病史的非结核病患者共 100 人。以某一特定的 γ -IFN 体外释放水平及结素皮试反应硬结直径 10 mm 为阳性切割值, rCFP-10/ESAT-6 融合蛋白刺激 γ -IFN 体外释放测定的敏感性为 96%, 显著高于结素皮试 (89%) ($r=4.92; 0.025 < P$), ESAT-6 融合蛋白刺激 γ -IFN 体外释放测定替代结素皮试检出结核感染在一定条件下是可行的。

3.1.2 IFN- γ 释放试验对 HIV 合并结核杆菌感染的诊断

人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者的增多, 也带来结核病发病率的升高。其中一方面原因是由于 HIV 感染主要引起 T 淋巴细胞, 特别是 CD4+T 淋巴细胞的功能下降和数量减少。而 CD4+T 淋巴细胞在抗结核感染中发挥主要作用, 这样, HIV 通过使机体免疫功能的下降而增加了对结核分枝杆菌(MTB)的易感性。由于细胞免疫功能的下降, HIV 感染者的纯蛋白衍生物(PPD)皮试结果常呈阴性反应或无反应性, 尤其是 CD4+ $<50/\mu l$ 的 HIV 感染人群中的发生率高达 80%。而 Chapman 等实验结果表明 HIV 阳性患者中 ESAT-6-ELISPOT 阳性率可高达 90%, 检测结果受 HIV 影响较小^[15]。Simmons 等^[16]针对越南成年结核性脑膜炎患者应用该技术进行外周血检测, 其中 HIV 阳性患者 28 例, HIV 阴性患者 19 例。抗结核治疗前, 58% 的 HIV 阴性患者及 64% 的 HIV 阳性患者呈阳性; 健康人中 ESAT-6 及 CFP-10 特异性反应阳性率分别为 54% 和 49%, 结果显示 HIV 阳性患者、HIV 阴性患者与健康人比较无明显差异。我国张斌等^[17]利用重组表达结核杆菌 ESAT-6 蛋白做为抗原, 通过 ELISPOT 技术检测 HIV 感染者中特异性 T 细胞反应, 并以正常健康者、无 HIV 感染的结核患者作为对照。结果 ESAT-6 重组蛋白对结核患者外周血单核细胞 ELISPOT 方法检测证实其具有良好的抗原性, 斑点形成单位数(SFU/10⁶PBMC)在结核组和 HIV 合并结核感染组中显著升高, 并与无合并结核感染临床表现的 HIV 组以

及健康对照组间均存在明显的差别。可见重组结核杆菌 ESAT-6 蛋白可以作为抗原通过 ELISPOT 方法检测 HIV 感染者中结核杆菌合并感染。

S Jones 等^[18]在存在潜伏性结核感染(LTBI)危险因素的 HIV 感染人群中评估 TST 和 QFT-G 试验。QFT-G 和 TST 结果之间的一致性较低(κ 0.38), QFT-G 结果同 TST 相比与 LTBI 危险因素相关的可能性更大。认为 QFT-G 试验在 HIV 感染人群中可能较 TST 试验更有价值。

3.1.3 IFN- γ 释放试验对 MTB 潜伏感染的筛查作用

Ewer 等^[19]针对 2001 年英国一所中学里爆发的结核病疫情, 进行了不同筛查方法的比较研究。Ewer 对 963 名学生进行初访, 对其中 550 名学生进行回访, 主要考虑的因素为暴露程度、BCG 接种史、出生地, 并对他们进行 TST 和 RD1-ELISPOT 检测, 结果发现尽管两种方法的一致性很好, 但 RD1-ELISPOT 比 TST 与 MTB 暴露程度的相关性更强, TST 则与 BCG 接种更为相关, RD1-ELISPOT 不受 BCG 接种的影响。此外, RD1-ELISPOT 筛查 MTB 潜伏感染可能比 TST 更少地受环境分枝杆菌感染的影响。Lavani 等^[20]通过对英国一个诊所痰菌阳性结核患者的近期接触者进行追踪研究, 同样发现 Esat-6-ELISPOT 的阳性结果与结核分枝杆菌暴露程度强相关, 而 TST 的阳性结果与结核分枝杆菌暴露程度的相关性较弱、与 BCG 接种强相关。我国陈献雄等^[21]2008 年采用早期建立的 ESAT-6 抗原 IFN γ ELISPOT 检测技术, 对深圳市不同人群结核分枝杆菌潜伏感染的现状进行调查研究。同时对各组人群还进行结核菌素皮试(PPD 皮试)调查作为对照研究。结果: 各组人群中的 ELISPOT 检测阳性率分别为高校学生 5.88%、结核病区医务人员 55.6%、公司保安人员 31.03%、IT 公司职员 31.57%、生物公司职员 19.44%; PPD 皮试阳性率为高校学生 20.58%、结核病

区医务人员 88.9%、IT公司职员 42.11%、生物公司职员 41.67%、公司保安 41.38%。结论:ELISPOT 检测诊断潜伏期结核分枝杆菌感染优于 PPD 皮试。

3.1.4 IFN- γ 释放试验对肺外结核的诊断

孟成艳等^[22]应用该技术进行外周血检测,用于一例临床症状不典型、涂片及培养阴性的疑似结核性脑膜炎患者的诊断,根据患者 ELISPOT 检测为强阳性的结果,结合患者临床表现及实验室检查,诊断为结核性脑膜炎并对该患者采用抗结核治疗,患者病情明显好转。

2008 年日本的 Iguchi M 等^[23]应用 QuantiFERON 技术诊断两例结核性脑膜炎(1 例 33 岁女性和 1 例 34 岁的男性),第 1 例是结核瘤合并有颅神经的损伤,第 2 例是结核性脑膜炎。早期诊断比较困难,因为涂片和 PCR 阴性。经几周后过后 2 例结核杆菌培养均为阳性。QuantiFERON 诊断早于细菌培养。可见此方法对于早期诊断结核性脑膜炎非常有益。

ELISPOT 法诊断活动性肺结核的敏感性,范围从 83%至 97%。但该技术已被证明结核性脑膜炎患者检测外周血中抗原特异性 T 细胞只有 58% 的敏感性,Losi 等报告说,ESAT-6 和 CFP-10-抗原特异性单个核细胞浓度胸腔积液中外周血中的 4.2 至 7.5 倍。他们的数据还表明,在胸腔积液中检测 ESAT-6 特异性 γ -干扰素分泌细胞对于诊断结核性胸膜炎,具有高度特异性和敏感性,是快速、准确诊断肺外结核的好方法。抗原特异性淋巴细胞在脑脊液中比外周血中高表明结核分枝杆菌特异性淋巴细胞积聚在结核性脑膜炎患者的脑脊液中。2008 年 Shuji Murakami 等通过酶联免疫斑点法检测一个昏迷病人脑脊液中 ESAT-6 抗原特异性淋巴细胞在病原体鉴定之前确诊为结核性脑膜炎^[24]。

特异性结核抗原引起的免疫反应在外周血和炎症的部位聚集,东京国立医院据此发展了更准确的诊断活动性结核性胸膜炎、腹膜炎、脑膜炎、心包炎的方法,即使用腔液

标本的 IFN- γ 释放检测方法。研究对象为 30 例细菌学证实活动性结核浆膜炎和 49 例确定无结核病因的病例。积液上清液中的单个核细胞连同生理盐水或结核分枝杆菌特异性抗原肽(ESAT-6 和 CFP-10)共同培养 18 h,用 ELISA 法分别测定培养上清液中的干扰素- γ 浓度,结果活动性结核浆膜炎患者腔液中抗原特异性干扰素- γ 的浓度显著高于非结核积液^[25]。

3.2 ESAT-6 皮肤试验在结核杆菌感染中的应用

张灵霞等^[26]将 Esat-6 作为皮肤反应试剂用于结核病诊断的研究中发现,Esat-6 皮试可以很好地区分 MTB 感染和 BCG 致敏的动物,但不能区分 MTB 活菌和 MTB 死菌致敏的动物。另有研究表明,在健康志愿者中,TST 与 BCG 接种史和排菌患者接触密切程度均呈正相关,而以 Esat-6 为抗原刺激的 IFN- γ 水平在不同 MTB 接触程度组中差异显著、但在有无 BCG 接种史组无统计学差异。以上研究说明以 Esat-6 为抗原检测 MTB 潜伏感染优于 TST。徐苗等^[13]对重组 Esat-6(rEsat-6)作为皮肤反应试剂进行了较多研究,通过系列动物试验发现:rEsat-6 可很好区分 MTB 与 BCG 和多种非结核分枝杆菌致敏的动物;而且 rEsat-6 对 MTB 活菌感染的动物皮试呈明显的阳性反应,但与 MTB 死菌致敏动物同 BCG 致敏动物一样呈阴性反应。为了进一步证实 rEsat-6 不仅能鉴别 MTB 感染和 BCG 接种,也能鉴别 MTB 活菌和 MTB 死菌,目前徐苗等正在进行 MTB 感染动物化疗过程中皮试动态分析的研究,如果随着化疗的进行,rEsat-6 皮试反应强度降低甚至阴转无疑将为该蛋白用于 MTB 潜伏感染的筛查提供更有力的证据。此外,我们在研究中还发现对 MTB 感染的动物,rEsat-6 皮试比 PPD 皮试更灵敏,可能与 Esat-6 蛋白是在 MTB 生长的早期分泌有关,这将十分有利于 rEsat-6 对 MTB 感染的早期诊断。

4 Esat-6 蛋白对诊断 MTB 感染的研究展望

Esat-6 蛋白因其高度特异性和免疫活性

为 MTB 感染筛查的特异性抗原极具潜力。至于筛查方式,皮试和 IFN- γ 释放试验各有利弊:皮试作为经典方法,简单易行、价廉是其最大优点,但判读结果带有主观性、需要回访等是不利因素;IFN- γ 释放试验是近年来发展起来的新技术,客观、灵敏、易于自动化是其优点,但所用仪器和试剂极其昂贵,在大多数低收入的结核高负担国家很难推广。上述方法均是利用 ESAT-6 蛋白的免疫活性对 MTB 感染的诊断,由于结核杆菌为胞内寄生菌在感染的巨噬细胞内生长时,Esat-6 蛋白表达量明显提高,因此采用细胞化学法检测外周血或体液中单核细胞内 Esat-6 蛋白可以作为 MTB 感染的直接证据,将有望为肺内外结核感染的诊断提供新的简便、经济、快捷的试验方法。

参考文献

- 陈全. 用抗原诊断结核分枝杆菌感染的免疫学研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(5): 456~459.
- Lodha R, Kabra SK. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. Indian J Pediatr, 2004, 71(3): 221.
- 胡忠义. 结核性脑膜炎实验室诊断进展. 中华临床医药, 2002, 3 (22) : 83~85.
- Harboe M, Malin AS, Dockrell HS, et al. B-cell epitopes and quantification of the ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998, 66: 3454~3456.
- Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995, 63(5): 1710~1717.
- Lee BY, Horwitz MA, et al. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Invest, 1995, 96(1): 245~249.
- Shi L, North R, Gennaro ML. Effect of growth state on transcription levels of genes encoding major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in the mouse lung. Infect Immun, 2004, 72(4): 2420~2424.
- 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(8): 1301.
- Brondt L, Oettinger T, Holm A, et al. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1996, 157(8): 3527~3533.
- Elhay MJ, Oettinger T, Andersen P. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. Infect Immun, 1998, 66(7): 3454~3456.
- Pathan AA, Wilkinson KA, Klennerman P, et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment J Immunol, 2001, 167(9): 5217~5225.
- Hill PC, Brookes RH, Fox A, et al. Large - scale evaluation of enzyme - linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in the Gambia. Clin Infect Dis, 2004, 38 (7): 966 ~ 973.
- 徐 苗. Esat-6蛋白在结核病诊断中的研究进展. 国外医学内科学分册, 2006, 33(11): 481~484.
- 周霞, 叶燕青. 利用 rCFP-10/ESAT-6 融合蛋白刺激 γ -IFN 体外释放测定替代结素皮试检出结核感染的可行性. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 62~65, 69.
- 杨诺. 酶联免疫点化法在结核性脑膜炎综述诊断中的应用及展望. 临床和实验医学杂志, 2007, 6(12): 183~184.
- Simmons CP, Thwaites GE, Quyen NT, et al. Pretreatment intracerebral and peripheral blood immune responses in Vietnamese adults with tuberculous meningitis: diagnostic value and relationship to disease severity and outcome. J Immunol, 2006, 176(3): 2007~2014.
- 张斌, 伦文辉, 成军. HIV 感染者中结核杆菌 ESAT-6 蛋白特异性 T 细胞反应的检测. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(2): 124~126.
- Jones S, de Gijssel D, Wallach FR, et al. 应用 QuantiFERON-TB GOLD in-tube 法检测 HIV 感染病人的潜伏性结核分枝杆菌感染. 国际结核病与肺部疾病杂志, 2008, 3(2): 63~68.
- Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen - s pecific T cells. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163 (4): 824~828.
- 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.
- 陈献雄, 陈心春, 吴宇红. 不同人群结核分枝杆菌潜伏感染特异性 IFN- γ 检测分析. 中国热带医学, 2008, 8(11): 1889~1890.
- 孟成艳, 金嘉琳, 张文宏. 酶联免疫斑点法在结核性脑膜炎诊断中的应用. 中华传染病杂志, 2006, 24(4): 276 ~ 277.
- Iguchi M, Maruyama K, Tsutsumi Y, et al. QuantiFERON: an early diagnostic tool for cerebral tuberculosis. Rinsho Shinkeigaku, 2008, 48(4): 259~262.
- Murakami S, Takeno M, Oka H, et al. Diagnosis of tuberculous meningitis due to detection of ESAT-6-specific gamma interferon production in cerebrospinal fluid enzyme-linked immunospot assay. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(5): 897~899.
- Ariga H, Harada N. Evolution of IGRA researches. Kekkaku, 2008, 83(9): 641~652.
- 张灵霞, 吴雪琼, 史迎昌, 等. 几种结核分枝杆菌重组蛋白诱发豚鼠迟发型超敏反应的研究. 中国防痨杂志, 2002, 24(3): 1162~1181.