

诊断抗原的纯化在牛 γ -干扰素 ELISA 法中的应用

邱美珍¹, 周望平¹, 肖兵南¹, 杜丽飞¹, 胡述光², 刘毅², 陈江²

(1.湖南省畜牧兽医研究所, 湖南 长沙 410131; 2.湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 比较皮内变态反应(TST)、抗酸染色、牛结核 ELISA(PPD-ELISA) 和 γ -干扰素 ELISA 法(IFN- γ -ELISA) 对牛结核的检测结果, 并通过比较牛 PPD、禽 PPD、亲和层析牛 PPD(牛 PPD')的 IFN- γ -ELISA 检测结果, 探索诊断抗原的纯化在牛 IFN- γ -ELISA 法中的应用。结果表明, 与抗酸染色相比, IFN- γ -ELISA 的敏感性、特异性和符合率都比较高, 分别为 83.33%(5/6), 98.14%(53/54), 98.33%(58/60); 牛 PPD、禽 PPD、牛 PPD' 3 种特异性抗原刺激产生 IFN- γ 释放反应的结果表明, 1 例抗酸染色阳性的牛, 未经亲和层析处理牛 PPD 的 IFN- γ -ELISA 检测 OD 值偏高, 判为牛结核阳性, 亲和层析纯化牛 PPD 的 IFN- γ -ELISA 检测 OD 值较低, 判为牛结核阴性, 表明亲和层析处理能排除环境分枝杆菌对试验的干扰, IFN- γ -ELISA 法有望替代 TST 法在中国推广使用。

关键词: 牛结核; 皮内变态反应; 抗酸染色; 牛结核 ELISA; γ -干扰素 ELISA 法; 亲和纯化

中图分类号: S858.23 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0082-04

Purification in antigen and application in diagnosis of IFN- γ -ELISA detection of bovine tuberculosis

QIU Mei-zhen¹, ZHOU Wang-ping¹, XIAO Bing-nan¹, DU Li-fei¹, HU Shu-guang², LIU Yi², CHEN Jiang²

(1.Hunan Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Changsha 410131, China; 2.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The test results of the bovine tuberculin skin test (TST), acid-fast stain test, ELISA test and bovine IFN- γ -ELISA diagnosis test respectively were compared for detection of tuberculosis of them, three stimulators, detected by IFN- γ -ELISA including bovine PPD, avian PPD and bovine PPD at affinity chromatography were compared in exploration for application of purification of diagnostic antigen in the IFN- γ -ELISA method. Using acid-fast staining as the standard, the sensitivity of IFN- γ -ELISA detection reached 83.33%(5/6), and its specificity reached 98.14%(53/54), the consistency reached 98.33% (58/60). As the other result, acid-fast stain detected a positive sera with high OD value and produced a positive result using bovine IFN- γ -ELISA in which the antigen was not purified at affinity chromatography, but the result was negative with low OD value using bovine IFN- γ -ELISA in which the antigen was purified at affinity chromatography. In conclusion, the miscarriage of justice caused by infected with *Mycobacterium bovis* and environmental *Mycobacterium* simultaneously could be prevented using bovine IFN- γ -ELISA in which the antigen was purified at affinity chromatography. So this method has great potential to replace TST for development and application prospects in China.

Key words: bovine tuberculosis; tuberculin skin test (TST); acid-fast stain; PPD-ELISA; IFN- γ ELISA; affinity chromatography

目前, 牛结核病的早期临床诊断仍以皮内变态反应(TST)为主, 但其检测的敏感性和特异性不高。

收稿日期: 2010-02-08

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD04A15-2)

作者简介: 邱美珍(1974—), 女, 湖南娄底人, 硕士, 助理研究员, 主要从事病原微生物研究, meizhenq@yahoo.com.cn

随着免疫机理研究的深入,建立了牛 γ -干扰素ELISA诊断法(IFN- γ -ELISA),在国外已通过临床试验,证实了用该法诊断牛结核病的可靠性^[1]。大量研究^[2-8]表明,特异性诊断抗原影响IFN- γ -ELISA诊断的灵敏度。Amadori等^[2]运用分子生物学手段,制备了特异性诊断抗原,使得IFN- γ -ELISA诊断的特异性有所提升。有研究^[8]发现,特异性抗原CFP10/ESAT6诱导的IFN- γ 释放反应的灵敏度略低于PPD诱导的IFN- γ 释放反应。笔者通过亲和层析纯化牛结核菌纯蛋白衍生物(PPD)抗原,并制备兔抗草分支杆菌抗体,将其偶联到CNBr活化的凝胶上,探讨牛结核病的IFN- γ -ELISA诊断。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 样品。无菌采集长沙某养殖场60份奶牛血。

(2) 菌种与试剂。草分支杆菌购自中国科学院微生物研究所(菌种编号为4.1180);牛 γ -干扰素(IFN- γ)ELISA试剂盒购自ADL公司;溴化氰活化的凝胶(CNBr-Sepharose 4B)购自法马西亚公司;牛PPD和禽PPD均购自黑龙江省生物制品一厂。

1.2 方法

1.2.1 诊断抗原、抗体的制备

1) 草分支杆菌菌体抗原的制备。将草分支杆菌培养后,离心,收集菌泥。将菌泥充分研磨,稀释,静置过夜,将上层液体配成 $OD_{525\text{ nm}}$ 为0.4的混悬液。

2) 兔抗草分支杆菌抗体的制备。选取2只2.0~2.5 kg的健康公兔,在其皮下多点多次注射草分支杆菌进行免疫。每次免疫后于耳静脉采血,收集血清,待试管凝集价达1:800以上时将兔处死,采血并分离血清。血清用饱和硫酸铵提纯。用Bradford法^[9]测定血清抗体蛋白含量。

3) 亲和抗原的制备^[10-11]。取纯化的兔抗草分支杆菌抗体约18 mg与1 g胶(CNBr-Sepharose 4B)混匀,室温作用2 h。离心后装柱,过量的配基用偶联缓冲液洗涤。收集全部未偶联的蛋白,Bradford法^[9]测定蛋白含量。加入封闭液,室温下摇匀2 h,

弃上清,分别用pH4.0和pH8.0的缓冲液洗胶,洗3个循环。再用磷酸缓冲液(PBS)洗2次。测定最后1次洗涤液的 $OD_{280\text{ nm}}$,使 $OD_{280\text{ nm}} < 0.02$,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。加入PPD,上样量3 mg。室温感作30 min。以PBS冲洗,收集洗脱液,洗脱至 $OD_{280\text{ nm}} < 0.02$ 。将所有蛋白洗脱管合并,所得即为PPD亲和层析抗原。加pH2.4的Gly-HCl缓冲液,收集解吸下来的成分,立即以 NaHCO_3 中和。用Bradford法^[9]测定蛋白含量。

1.2.2 牛结核病的检测方法

1) 皮内变态反应(TST)检测。按常规方法^[10]对60头奶牛进行检测。参照文献^[12],仅用牛型PPD在牛颈部进行变态反应试验。剂量为2 000 IU。注射前测量皮肤厚度,注射后72 h再次测定皮肤厚度,皮厚差大于3 mm时判为牛结核病阳性,反之为牛结核病阴性。

2) 抗酸染色检测。按照常规方法^[10]对60份奶牛血清进行检测。

3) 牛结核ELISA(PPD-ELISA)法检测。首先,参照1.2.1(1)制备草分支杆菌吸收抗原,简称草吸抗原。其次,用草吸抗原处理血清:对60份奶牛血检测,取血清100 μL ,分别加入草吸抗原100 μL ,PBS 800 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 感作1 h;再取上清液100 μL ,加入700 μL PBST,混匀后取100 μL 加入到检测孔。其他步骤按试剂盒操作程序进行。

4) IFN- γ -ELISA法检测^[13]。对60份奶牛血进行检测,无菌采血,肝素抗凝。采血后8 h内检测。检测步骤按照试剂盒操作程序进行。

5) 用亲和层析抗原IFN- γ -ELISA法检测。对TST法检测有疑问的奶牛血重新进行检测,无菌采血,肝素抗凝。采血后8 h内检测。将每份检测血分为3份,分别加入禽PPD、未纯化牛PPD、亲和层析纯化的牛PPD,然后在 CO_2 (5%)培养箱37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育18 h,离心获得的血浆用于试验。以PBS为对照。其他步骤按照试剂盒操作程序进行。

1.2.3 结果判定

牛 γ -干扰素阴性对照 OD 值 < 0.130 ,牛 γ -干扰素阳性对照 OD 值 > 0.700 方可用。阴性对照重复孔差值不能大于0.040^[14]。

阳性判定 $OD_{\text{牛型提纯结核菌素}} - OD_{\text{禽型提纯结核菌素}} > 0.1$,

且 $OD_{\text{牛型提纯结核菌素}} - OD_{\text{PBS 对照}} < 0.1$ 。

阴性判定： $OD_{\text{牛型提纯结核菌素}} - OD_{\text{禽型提纯结核菌素}} < 0.1$ ，

且 $OD_{\text{牛型提纯结核菌素}} - OD_{\text{PBS 对照}} < 0.1$ 。

敏感性 = 真阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数)。

特异性 = 真阴性数 / (真阴性数 + 假阳性数)。

符合率 = (真阳性数 + 真阴性数) / 被检总数。

2 结果与分析

2.1 兔抗草分支杆菌抗体的偶联率与亲和层析结果

加入待偶联的蛋白共 18 mg，收集到未偶联的蛋白共约 3 mg，偶联率为 83.3%。亲和层析结果表明，第 1 次洗脱下来的成分主要是特异性的牛结核 PPD 抗原；第 2 次解吸附下来的成分主要是被兔抗草分支杆菌抗体吸附的抗原，是非特异性的成分，用 Bradford 法测得第 1 次洗脱和第 2 次解吸附的蛋白总量分别为 2.6、0.4 mg。

2.2 4 种方法对牛结核病的检测结果

4 种方法对 60 头牛结核病的检测结果为：TST 检测出阳性 3 例，阴性 44 例，疑似 15 例；抗酸染色法检出阳性 6 例，阴性 54 例；PPD-ELISA 法检出阳性 7 例，阴性 51 例，疑似 2 例；IFN- γ -ELISA 法检出阳性 6 例，阴性 54 例。可见，阳性检出率最高是 PPD-ELISA 法，为 11.6%，最低的是 TST 法，为 5%；疑似检出率最高的是 TST 法，为 21.6%，其次是 PPD-ELISA 法；抗酸染色和 IFN- γ -ELISA 法没有疑似病例。

2.3 4 种方法的检测敏感性、特异性和符合率

表 1 结果表明，与抗酸染色相比，IFN- γ -ELISA 法的敏感性、特异性和符合率都比较高；TST 法的敏感性和特异性为 100%，但符合率比较低，主要是因为疑似病例较多；PPD-ELISA 的敏感性较低，也存在疑似病例。

表 1 4 种检测方法的敏感性、特异性和符合率

检测方法	敏感性	特异性	符合率
TST	100.00	100.00	78.33
抗酸染色	100.00	100.00	100.00
PPD-ELISA	71.43	98.03	91.66
IFN- γ -ELISA	83.33	98.14	98.33

2.4 3 种抗原刺激的 IFN- γ -ELISA 检测结果

世界动物卫生组织(OIE)推荐使用牛 PPD、禽 PPD 比较 IFN- γ 释放反应，以排除环境分支杆菌对牛结核诊断的干扰。本试验中使用牛/禽结核菌素比较反应(包括皮内变态反应和 IFN- γ 释放反应)，发现 1 例抗酸染色阳性的牛(表 2)，亲和层析抗原纯化 PPD(牛 PPD')的 IFN- γ -ELISA 检测 OD 值为 0.166，判为阴性；未经亲和层析处理 PPD 的 IFN- γ -ELISA 检测 OD 值为 0.385，判为阳性，这证明 PPD 中的非特异成分，经亲和层析后被吸附，从而排除了环境分支杆菌对试验的干扰。虽然本试验中可以用禽 PPD 刺激 IFN- γ 释放反应作为对照来排除环境分支杆菌对试验的影响，但是，如果发生牛和禽结核或其他环境分支杆菌的同时感染时，亲和层析抗原刺激的 IFN- γ 释放反应就具有很大的优势。

表 2 牛 PPD、禽 PPD、牛 PPD' 的 IFN- γ ELISA 检测结果
Table 2 Results of bovine IFN- γ -ELISA with bovine PPD, avian PPD and bovine PPD'

序号	OD 值			序号	OD 值		
	牛 PPD	禽 PPD	牛 PPD'		牛 PPD	禽 PPD	牛 PPD'
对照	0.105	0.118	0.102	31	0.139	0.118	0.119
1	0.118	0.093	0.113	32	0.18	0.191	0.117
2	0.119	0.086	0.102	38	1.34	0.231	1.307
9	0.167	0.120	0.094	40	1.516	0.332	1.244
13	0.385	0.439	0.166	45	1.262	0.112	1.013
16	0.118	0.098	0.109	47	0.166	0.195	0.108
20	0.138	0.104	0.117	49	0.133	0.131	0.180
24	0.367	0.110	0.390	50	0.147	0.134	0.162

序号为 TST 法检测有疑问的奶牛血编号。

3 结论与讨论

本试验结果表明，与抗酸染色相比，IFN- γ -ELISA 的特异性、符合率较高，达 90%以上，敏感性也达到了 83.33%。该方法有望替代 TST 法^[15-19]在中国推广使用。

结核分支杆菌属于胞内寄生菌，在机体发生免疫的过程中，初期是诱发细胞免疫，并释放出各种细胞因子。IFN- γ 是结核菌感染时诱导的主要细胞因子^[11-12]，因而，检测结核菌特异抗原诱导的 IFN- γ 释放反应具有较高的灵敏度与特异性^[20]。牛结核 γ -干扰素诊断依据是 T 淋巴细胞释放的 γ -干扰素水平，因此，能在结核病早期作出诊断。本试验结果表明，与 IFN- γ -ELISA、PPD-ELISA 和抗酸染色法相比，

TST 法有着本身固有的缺陷:操作和结果判断主观,非特异性反应现象常见,疑似病例较多。PPD-ELISA 的敏感性较低,也存在疑似病例。抗酸染色法无法区分死菌和活菌,结果受试验条件和检验人员镜检技术水平的影响较大,灵敏度低(通常需要 5 000~10 000 个/mL 抗酸杆菌才能得到阳性结果),特异性差(各种抗酸杆菌均可着色,需通过进一步试验才能确定是否为结核菌)^[16-18]而 IFN- γ -ELISA 法的敏感性、特异性和符合率都比较高。

牛感染结核杆菌与环境分支杆菌可以分为以下 3 种情况:只感染牛结核菌,只感染环境分支杆菌,同时感染牛结核菌与环境分支杆菌。在前 2 种情况下,牛/禽结核菌素比较反应值与牛结核菌感染呈正相关,即比较反应结果为正值时表示牛结核菌感染,比较结果为负值时为环境分支杆菌感染;后一种情况,IFN- γ 比较释放反应值与牛结核菌感染实际情况严重不符。混合感染时,牛/禽 PPD 的 IFN- γ 比较释放反应灵敏度低,准确度差,阴性牛被判为假阳性。相比之下,亲和层析抗原被吸附掉分支杆菌及类属抗原成分,所诱导的 IFN- γ 释放反应很大程度降低了环境分支杆菌感染的影响,亲和抗原诱导的 IFN- γ 释放水平不比牛 PPD 低,所以,该反应具有很高的灵敏度与特异性。

参考文献:

- [1] 李彤,张以芳,罗佳琴.牛 γ -干扰素在牛结核检测中的研究应用[J].中国畜牧兽医,2006,33(11):53-56.
- [2] Amadori M, Lyashchenko K P, Genaro M L, et al. Use of recombinant protein in antibody test for bovine tuberculosis [J]. Vet Microbiol, 2002, 85(4): 379-389.
- [3] Liu S, Guo S, Wang C, et al. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2006, 87(3): 212-217.
- [4] Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, et al. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(12): 4326-4335.
- [5] Cockle P J, Gordon S V, Hewinson R G, et al. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(10): 1119-1124.
- [6] 郭设平,刘思国,张秀华,等.牛分支杆菌抗原 MPB70、MPB83和ESAT-6的融合表达及重组蛋白的初步应用[J].畜牧兽医学报,2006,37(7):676-680.
- [7] 吴波,张书环,邓铨涛,等.牛分支杆菌特异性四联融合蛋白在牛结核病诊断中的临床应用[J].中国人兽共患病学报,2007,23(11):1123-1126.
- [8] 陈颖钰,邓铨涛,郭爱珍,等.基于结核菌素与 CFP10/ESAT6的牛IFN- γ 检测法在牛结核病诊断中的比较研究[J].中国奶牛,2008(6):12-14.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [10] 杨冲卫.牛结核病诊断技术的研究进展[J].中国人兽共患病杂志,2004,20(12):1090-1093.
- [11] 高云航,何昭阳,单晓枫,等.ELISA 检测牛结核抗体时假阳性反应的消除[J].中国兽医学报,2004,9(5):419-420.
- [12] GB/T18645—2002 动物结核病诊断技术[S].
- [13] 谢莉. γ -干扰素与结核病[J].结核病与胸部肿瘤,2005(1):7-13.
- [14] 李川,谭亚娣,胡巧云,等.牛IFN- γ 原核表达、单克隆抗体制备及其ELISA检测方法的建立[J].生物工程学报,2007,23(1):40-45.
- [15] Andersen P, Munk M E, Pollock J M, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis[J]. Lancet, 2000, 356: 1099-1104.
- [16] Barnes P F. Diagnosing latent tuberculosis infection: Turning glitter to gold[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170: 5-6.
- [17] Lalvani A. Spotting latent infection the path to better tuberculosis control[J]. Thorax, 2003, 58: 916-918.
- [18] Dockrell H M, Weir R E. Whole blood cytokine assays—a new generation of diagnostic tests for tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 1998(2): 441-442.
- [19] Lein A D, Von Reyn C F. *In vitro* cellular and cytokine responses to mycobacterial response to mycobacterial vaccines[J]. Am J Med Sci, 1997, 31: 364-371.
- [20] Connell T G, Rangaka M X, Curtis N, et al. Qusmti-FERON-TB Gold: State of the art for the diagnosis of tuberculosis infection[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2006, 6(5): 663-677.

责任编辑:王赛群

英文编辑:罗文翠