

# 结核分枝杆菌分泌蛋白 ESAT-6、CFP-10 在肺结核组织中的表达

陈雪倩, 方诗宇, 于江, 段绍琪, 孙杰, 刘凤君

(川北医学院附属医院感染科, 四川 南充 637000)

**【摘要】目的:** 探究结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6、CFP-10 在肺结核组织中的表达。**方法:** 收集经病理学诊断的 19 例石蜡包埋肺结核组织标本, 以 20 例正常肺组织 (肺癌切除标本正常组织断端) 为阴性对照, 采用免疫组化检测 ESAT-6 及 CFP-10, 并与抗酸染色进行对比。**结果:** ESAT-6 及 CFP-10 的阳性信号主要分布在结核病灶的坏死区域及其周围的巨噬细胞和多核巨细胞中, 其分布与抗酸杆菌有关, 范围更广。免疫组化检测 ESAT-6 的敏感度、特异度分别为 73.68%、90.00%; CFP-10 的敏感度和特异度分别为 63.16% 和 95.00%; 抗酸染色敏感度为 52.63%, 免疫组化的敏感度高于抗酸染色 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 采用免疫组化检测 ESAT-6 及 CFP-10 在结核诊断中有潜在的应用价值。

**【关键词】** 传染病; CFP-10; ESAT-6; 免疫组织化学染色法; 肺结核

**【中图分类号】** R521 **【文献标志码】** A

## Expression of Mycobacterium tuberculosis secreted antigen ESAT-6 and CFP-10 in pulmonary tuberculosis tissue

CHEN Xue-qian, FANG Shi-yu, YU Jiang, DUAN Shao-qi, SUN Jie, LIU Feng-jun

(Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To detect the expression of Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 and CFP-10 in pulmonary tuberculosis tissue. **Methods:** A total of 19 paraffin-embedded pulmonary tuberculosis tissue specimens were collected and pathologically diagnosed, and 20 cases of normal lung tissue (normal tissue stumps of lung cancer resection specimens) were negative controls, ESAT-6 and CFP-10 were detected by immunohistochemistry, and compared with acid-fast staining. **Results:** The positive signals of ESAT-6 and CFP-10 were mainly distributed in the necrotic area of tuberculosis lesions and the surrounding macrophages and multinucleated giant cells, and their distribution was related to acid-fast bacilli and had a wider range. The sensitivity and specificity of immunohistochemical detection of ESAT-6 were 73.68% and 90.00%, respectively, the sensitivity and specificity of CFP-10 were 63.16% and 95.00%, respectively, the sensitivity of acid-fast staining was 52.63%. The sensitivity of immunohistochemistry was higher than that of acid-fast staining ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Immunohistochemical detection of ESAT-6 and CFP-10 has potential application value in the diagnosis of tuberculosis.

**【Key words】** Infectious disease; CFP-10; ESAT-6; Immunohistochemical staining; Pulmonary tuberculosis

结核病严重威胁人类健康。据世界卫生组织 (WHO) 估算, 2020 年全球新发结核病患者 987 万例, 死亡 128 万例; 我国新发结核病 84.2 万例, 发病率约为 59/10 万, 在 30 个结核病高负担国家中我国估算结核发病数仅低于印度位居全球第二位<sup>[1]</sup>。为控制结核病, 尽早明确诊断、及时治疗尤为重要。结核最重要的确诊依据是病原学检查, 目前常用的方法包括抗酸染色、结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 培养及分子生物学检测, 但灵敏

度均不理想, 无法满足临床需求<sup>[2-3]</sup>。抗原检测也可作为病原学的诊断依据, 2017 年《中国结核病病理学诊断专家共识》<sup>[4]</sup>指出, 采用免疫组化 (immunohistochemical staining, IHC) 可以检测出结核病变组织中 MTB 特异性抗原的表达, 且操作简单, 阳性信号易于观察, 无需使用油镜, 对结核病的诊断有参考价值。

研究<sup>[5-6]</sup>发现, ESAT-6 和 CFP-10 是诊断结核的两种重要抗原, 其抗原编码基因位于 RD1 区, 编

**基金项目:** 南充市市校战略合作项目 (20SXQT0017); 南充市市校科技战略合作项目 (19SXHZ0055); 川北医学院附属医院科研项目 (2020ZX003)

**作者简介:** 陈雪倩 (1996 -), 女, 硕士研究生。E-mail: 2567015367@qq.com

**通讯作者:** 刘凤君, 博士, 教授。E-mail: lfj116@126.com

码 CFP-10 的基因位于 ESAT-6 的上游,两个基因共同转录,形成 1:1 的紧密复合物而发挥作用<sup>[7]</sup>。大多数非结核分枝杆菌和 BCG 菌株缺失该区段<sup>[8]</sup>,故 ESAT-6 和 CFP-10 有着较好的特异性。目前临床主要用于  $\gamma$ -干扰素释放实验(interferon gamma Release Assay, IGRA),也有学者<sup>[9]</sup>探索将 ESAT-6 和 CFP-10 融合抗原用于新型皮肤测试(EC),两种方法与结核菌素试验相比,有更好的特异性及敏感性,但均属于免疫学方法,受人体免疫反应的影响,仍存在假阳性或假阴性结果。研究<sup>[10-13]</sup>报道,在结核性脑膜炎患者的脑脊液及肾结核组织中检测到 ESAT-6,在结核患者的尿液中检测到 CFP-10,提示直接检测两种抗原可用于结核的补充诊断。关于肺结核组织中 ESAT-6 和 CFP-10 的检测仅在 2019 年全国结核病学术大会上报道,且为摘要,无法获取具体实验方法及结果<sup>[6]</sup>。本研究拟采用 IHC 检测 ESAT-6 及 CFP-10 在肺结核组织中的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集 2019 年 5 月至 2021 年 8 月川北医学院附属医院 19 例手术切除的经病理诊断为肺结核且已行抗酸染色的石蜡包埋肺组织标本,所属患者痰/肺泡灌洗液抗酸杆菌涂片结核分枝杆菌 DNA 均为阴性;选取 20 例肺癌切除标本正常组织断端为阴性对照。ESAT-6 兔多克隆抗体(bs-13107R)、柠檬酸组织抗原修复液(100 $\times$ )购于北京博奥森古生物技术有限公司;CFP-10 兔多克隆抗体(ABIN285580)购于 antibody-online 公司;即用型免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒(20 $\times$ )购于福州迈新生物技术有限公司。本研究获得川北医学院附属医院伦理委员会批准(批号:2022ER005-1)

纳入标准:(1)结核病符合 2017 年《中国结核病病理学诊断专家共识》<sup>[4]</sup> I 类或 II 类诊断标准。I 类为明确结核病诊断,病变组织及细胞病理变化符合结核病病理变化特征,且具有结核病病原学证据,可作明确诊断;II 类为提示性诊断,病变组织及

细胞病理变化具备结核病病理变化特征,但没有明确结核病病原学证据,不能排除结核病可能性的可作提示性诊断;如“符合结核”“考虑为结核”“提示为结核”“疑诊为结核”“不能排除(除外)结核”等。(2)术后抗结核治疗有效。(3)非结核组通过病理诊断为正常肺组织(肺癌切除标本正常组织断端),且均否认结核病史,IGRAs 阴性。

### 1.2 方法

肺结核标本已由病理科行抗酸染色;蜡块连续切片 3 张(厚度 4  $\mu$ m),1 张用于苏木精-伊红染色(HE)染色,2 张用于免疫组化染色。(1)HE 染色:二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,苏木素染色 5~10 min 后水洗,盐酸-乙醇分化后水洗,1% 氨水返蓝 5~10 s 后水洗,0.5% 伊红染色 1~3 min 后水洗,二甲苯透明后中性树胶封片。(2)免疫组织化学染色(SP 法):切片脱蜡、微波修复抗原、内源性过氧化物酶阻断、非特异性染色阻断剂血清封闭、一抗 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜、加二抗后湿盒内室温孵育 10 min、加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶、DAB 显色、苏木素复染、封片。用 PBS 溶液代替一抗作阴性对照。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS25.0 软件对数据进行处理与分析。计数资料以[n(%)]表示,采用 Fisher 精确概率法检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 抗酸染色及 IHC 染色结果

HE 染色显示,肺结核组织呈慢性肉芽肿改变伴凝固性坏死;抗酸染色显示,结核病灶中可见红色细长、略弯曲、杆状的抗酸杆菌;ESAT-6 及 CFP-10 免疫组化染色显示,阳性信号为深棕色颗粒,呈点状、点簇状或小斑片状分布,着色部位中心颜色较深、周围较浅,主要分布在结核病灶的坏死区及周围巨噬细胞和多核巨细胞中,极少数见于淋巴细胞、上皮样细胞中。而阴性对照的免疫组化染色未见阳性信号或仅可见少许浅淡棕色信号,且分布无特殊规律。见图 1。

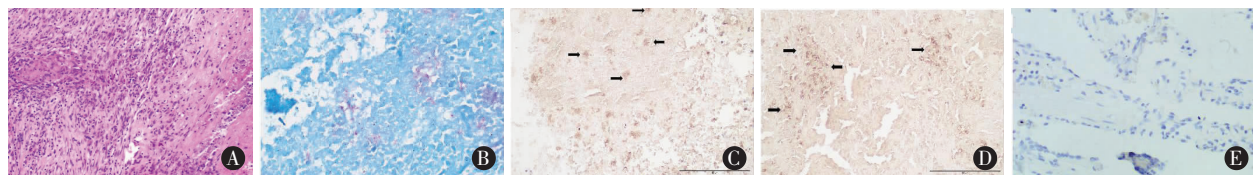


图 1 肺结核组织 HE 染色、抗酸染色及免疫组化染色

A. 肺结核组织 HE 染色;B. 肺组织抗酸染色(油镜);C-D. ESAT-6、CFP-10 免疫组织化学染色,结核坏死病灶中均可见典型棕色颗粒物;E. 阴性对照。

## 2.2 ESAT-6、CFP-10 免疫组化染色结果

19 例肺结核组织标本中 ESAT-6、CFP-10 阳性分别有 14 例、12 例, 敏感度分别为 73.68%、63.16%。20 例正常肺组织标本中 ESAT-6、CFP-10 阳性分别有 2 例、1 例, 其特异度分别为 90.00%、95.00%。见表 1。

表 1 ESAT-6、CFP-10 免疫组化染色敏感度与特异度 [n(%)]

指标	结核组 (n=19)	正常肺组织 (n=20)	敏感度 (%)	特异度 (%)
ESAT-6			73.68	90.00
阳性	14(73.68)	2(10.00)		
阴性	5(26.32)	18(90.00)		
CFP-10			63.16	95.00
阳性	12(63.16)	1(5.00)		
阴性	7(36.84)	19(95.00)		

## 2.3 抗酸染色与 ESAT-6、CFP-10 免疫组化的敏感度比较

19 例肺结核标本中有 10 例抗酸染色阳性, 敏感度为 52.63%; 10 例抗酸染色阳性的标本中两种抗原免疫组化全部阳性, 而在 9 例抗酸阴性的标本中, ESAT-6 免疫组化阳性 4 例, CFP-10 阳性 2 例。IHC 检测 ESAT-6 及 CFP-10 的敏感度分别为 73.68% (14/19)、63.16% (12/19), 高于抗酸染色, 差异有统计学意义 ( $P=0.011, 0.001$ )。见表 2。

表 2 肺结核组织抗酸染色与 ESAT-6、CFP-10 免疫组化的敏感度比较

组别	ESAT-6		CFP-10		合计
	+	-	+	-	
抗酸					
+	10	0	10	0	10
-	4	5	2	7	9
敏感度 (%)	73.68		63.16		52.63*

\* 为抗酸染色敏感度。

## 3 讨论

病理学检查是除病原学检查外另一重要诊断方法, 结核病的基本病理改变是渗出、增生及坏死, 特征性病理改变为肉芽肿的形成伴干酪样坏死, 但这种改变也存在于其他感染性与非感染性疾病中<sup>[4]</sup>。因此, 病理学联合病原学检测对结核的诊断更有意义。抗酸染色阳性率为 15.28% ~ 37.30%<sup>[14-17]</sup>, 且需使用油镜, 寻找抗酸杆菌费时费力。研究<sup>[18]</sup>证明, 分子病理学敏感性较抗酸染色有所提高, 但因气溶胶污染容易出现假阳性结果, 对实验室及操作人员要求较高, 在基层医院难以广泛开展。

除了细菌和核酸以外, 抗原也是病原学诊断的

重要依据。朱雅娟等<sup>[10]</sup>在结核性脑膜炎 (tuberculous meningitis, TBM) 患者的脑脊液中发现抗结核治疗前及治疗 1、2、4 周后, TBM 患者脑脊液中 ESAT-6 均高于非 TBM 患者, 且脑脊液中 ESAT-6 水平随病情改善而逐渐下降; 孙立等<sup>[11]</sup>发现肾结核病灶中 ESAT-6 表达增强; 另有研究<sup>[19]</sup>发现, 在淋巴结核病灶中可检测到 ESAT-6。本研究发现, ESAT-6 及 CFP-10 抗原阳性信号沉积在结核病灶坏死区及其周围巨噬细胞和多核巨细胞中, 极少数见于淋巴细胞、上皮样细胞中。信号分布与抗酸杆菌有关, 范围更广, 符合分泌蛋白不仅存在于 MTB 细胞内, 还分泌到细胞周围的特点。以上研究提示直接检测抗原可能可作为结核病原学诊断依据之一。

孙立等<sup>[11]</sup>发现, 免疫组化检测肾结核组织中 ESAT-6 的敏感度和特异度分别为 100% 和 83%; 满昌军等<sup>[12]</sup>发现, 肾结核组织中 ESAT-6 的敏感度和特异度分别为 100% 和 87.13%; 二者结果相似; Sumi 等<sup>[19]</sup>发现, ESAT-6 在淋巴结核组织中的敏感度为 88.6%、特异度为 100%。本研究结果发现, ESAT-6 在肺结核组织中的敏感度为 73.68%、特异度为 90.00%。上述结果的差异可能与组织来源的不同有关, 也可能与 IHC 结果判读标准不完全一致有关。对于 CFP-10 在组织中的表达情况, 李晓霞等<sup>[6]</sup>曾以文献摘要的形式报道在肺结核组织中检测到该抗原, 但无敏感性及特异性的数据。本研究研发, CFP-10 在肺结核组织中的敏感度是 63.16%、特异度是 95%。本研究首次在肺结核病变组织中检测到 ESAT-6 及 CFP-10, 为探讨两种抗原在肺结核诊断的意义提供了基础。

本研究结果显示, 肺结核组织中抗酸染色敏感度为 52.63%, 而免疫组化检测 ESAT-6、CFP-10 在抗酸阳性标本的敏感度均为 100%, 而抗酸阴性的标本中还有部分阳性, 总体敏感度分别为 73.68%、63.16%, 提示免疫组化的敏感性较抗酸染色更高, 该特点可能在菌阴肺结核及肺外结核的诊断中更有意义。另外免疫组化阳性信号易于观察, 不需要使用油镜, 可以有效提高工作效率。因此, 采用免疫组化检测 MTB 特异性抗原 ESAT-6、CFP-10 在结核诊断中有潜在的应用价值。

综上, 肺结核组织中可以检测到结核分泌抗原 ESAT-6、CFP-10 的表达, 且敏感性高于抗酸染色, 在结核诊断中尤其对于菌阴肺结核及肺外结核有潜在的应用价值。

## 参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021 [EB/

- OL]. [2021-11-02]. <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>
- [2] 陆恩词,朱颖蔚. T-SPOT. TB 在肺结核合并糖尿病患者诊断中的价值[J]. 山西医科大学学报,2015,46(4):334-336.
- [3] Walzl G,McNerney R,du Plessis N, *et al.* Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers [J]. *The Lancet Infectious Diseases*,2018,18(7):e199-e210.
- [4] 中华医学会结核病学分会,结核病理学诊断专家共识编写组. 中国结核病病理学诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志,2017,40(6):419-425.
- [5] Siddiqui KF, Amir M, Agrewala JN. Understanding the biology of 16 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*; scope in diagnosis, vaccine design and therapy[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011,37(4):349-357.
- [6] 李晓霞,康丽菲,卜静,等. ESAT-6 和 CFP-10 在肺结核及其它肉芽肿性疾病中的诊断价值[C]//中华医学会结核病学分会 2019 年全国结核病学术大会论文汇编. 苏州,2019:452.
- [7] Renshaw PS,Lightbody KL,Veverka V, *et al.* Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6 [J]. *The EMBO Journal*,2005,24(14):2491-2498.
- [8] Arend SM,Geluk A, Van Meijgaarden KE, *et al.* Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides[J]. *Infection and Immunity*,2000,68(6):3314-3321.
- [9] Yang Y,Fang Z,Huang W, *et al.* Safety of a Novel ESAT6-CFP10 skin test compared with tuberculin skin test in a double-blind, randomized, controlled study [J]. *BMC Infectious Diseases*,2022,22(1):780.
- [10] 朱雅娟,樊丽超. 脑脊液 ESAT-6 在结核性脑膜炎病程中的动态变化及其诊断意义[J]. 临床医药文献电子杂志,2015,2(3):477,480.
- [11] 孙立,冯江敏,姚丽,等. 结核杆菌早期分泌性抗原靶在肾结核患者肾组织中的表达及意义[J]. 山东医药,2009,49(23):68-69.
- [12] 满昌军,董香玉,王啸,等. 结核分枝杆菌分泌性抗原 Ag85 与 ESAT-6 在肾结核感染诊断中的应用分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(18):4660-4662.
- [13] Seifert M,Vargas E,Ruiz-Valdepeñas MV, *et al.* Detection and quantification of *Mycobacterium tuberculosis* antigen CFP10 in serum and urine for the rapid diagnosis of active tuberculosis disease [J]. *Scientific Reports*,2021,11:19193.
- [14] 董宇杰,张莉,王宇轩,等. 免疫组织化学及 PCR 技术在淋巴结结核病理诊断中的应用价值[J]. 中国防痨杂志,2018,40(4):348-352.
- [15] 陈辉娥,姜训忠,聂鸿,等. 免疫组织化学及 PCR 技术对淋巴结结核病的诊断价值[J]. 实用临床医学,2020,21(3):4-5,8.
- [16] 李雪,孟禹彤,周翔,等. 结核病理诊断的新方法研究[J]. 诊断病理学杂志,2020,27(5):300-305.
- [17] 张继伟,李钦丽,聂秀. 石蜡包埋组织结核分枝杆菌检测方法的对比分析[J]. 临床与实验病理学杂志,2021,37(3):362-365.
- [18] Machado D,Couto I,Viveiros M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: from probes to genomes[J]. *Infection, Genetics and Evolution*,2019,72:93-112.
- [19] Sumi S,Radhakrishnan VV. Evaluation of immunohistochemistry with a panel of antibodies against recombinant mycobacterial antigens for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis [J]. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*,2009,1(5):215-219.

(收稿日期:2023-05-29)

修回日期:2023-08-22