

基于牛分枝杆菌 PPD 的猕猴全血 IFN- γ 释放试验观察

闵凡贵¹, 郭羽², 罗挺¹, 潘金春¹, 刘助红¹, 黄树武¹, 张钰¹

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广东广州 510663;

2. 北京天坛生物制品股份有限公司, 北京 100176)

【摘要】 目的 分析全血 IFN- γ 释放试验在猕猴分枝杆菌检测中的应用价值。**方法** 首先测定结核菌素试验(TST)阳性、阴性猕猴血清样本的基础 IFN- γ 含量。然后以 PBS 为对照, 200 IU bovine-PPD 为刺激抗原, 分别与 TST 阴性和阳性猕猴肝素抗凝血共培养约 24 h, 收集血浆, 测定 IFN- γ 含量。通过分析抗原刺激前后血浆 IFN- γ 含量变化和刺激指数探讨全血 IFN- γ 释放试验的诊断效能。**结果** TST 阳性猕猴血清基础 IFN- γ 含量明显高于 TST 阴性猕猴, 但离散度都较大。PPD 刺激前后, TST 阴性猕猴血浆 IFN- γ 含量无明显变化, 而 TST 阳性猕猴血浆 IFN- γ 含量明显升高($P < 0.01$)。刺激指数结果显示, TST 阳性猕猴明显高于 TST 阴性猴($P < 0.01$)。ROC 曲线分析表明, 血浆 IFN- γ 含量和刺激指数均可作为全血 IFN- γ 释放试验的评价指标。**结论** 本研究基于小样本量的实验结果证实, 全血 IFN- γ 释放试验是猕猴分枝杆菌快速诊断的有益补充方法。

【关键词】 猕猴, 全血 IFN- γ 释放试验, PPD, 分枝杆菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.002

Performance of bovine-PPD based whole blood IFN- γ assay for rhesus macaques

MIN Fan-gui¹, GUO Yu², LUO Ting¹, PAN Jin-chun¹,

LIU Zhu-hong¹, HUANG Shu-wu¹, ZHANG Yu¹

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China; 2. Beijing Tiantan Biological Product Co. Ltd., Beijing 100176)

【Abstract】 Objective To assess the potential of whole blood IFN- γ assay for diagnosing mycobacterium in rhesus macaques. **Methods** Firstly, basic serum IFN- γ concentrations of TST-negative and -positive rhesus macaques were detected. Then, heparinized whole blood from TST-negative and -positive rhesus macaques was incubated with PBS and 200 IU bovine-PPD (tuberculin purified protein derivative) for about 24 h, respectively. The supernatant plasma were harvested and used to determine the concentrations of IFN- γ . The results of plasma IFN- γ concentrations and stimulation index (SI) were used to analyze the diagnostic potential of the whole blood IFN- γ assay. **Results** The basic serum concentrations of IFN- γ for the TST-positive monkeys were significantly higher than that of the TST-negative macaques, showing a high coefficient of variation. There was no significant effect on the production of IFN- γ in the TST-negative macaques. While significantly elevation of IFN- γ concentrations was found in stimulated plasma of TST-positive macaques ($P < 0.01$). The SI of TST-positive macaques was significantly higher than the TST-negative ones. ROC curve analysis revealed that IFN- γ concentrations and SI could be used as evaluation index of whole blood IFN- γ assay. **Conclusions** Based on a small sample experiment we have demonstrated that whole blood IFN- γ assay may be one possible auxiliary

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B020307005; 2015A030302029; 2016A030303023); 国家科技支撑计划(2013BAK11B01)。

[作者简介] 闵凡贵(1980 -), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物与比较医学研究。

[通讯作者] 张钰(1970 -), 女, 研究员, E-mail: zhangyuzh@hotmail.com。

diagnostic method for tuberculin skin test.

【Key words】 Rhesus macaques; Whole blood IFN- γ assay; Tuberculin purified protein derivative, PPD; Mycobacterium; Diagnosis

猕猴是目前用量最大的实验非人灵长类动物,已实现了人工规模化和标准化的生产繁育。然而,猕猴的生产繁育却长期遭受到多种病原的威胁,其中,分枝杆菌病对猕猴饲养的影响巨大,以结核分枝杆菌病最为严重,由于其病原具有强烈的人兽共患性,并且群内传播和种间传播速度快,传播途径多样,控制其传播显得尤为重要,而早期筛查与及时隔离感染猴为当前最有效的控制手段^[1]。

目前,实验猴结核诊断的金标方法是结核菌素试验(tuberculin skin test, TST),其次是病原学诊断,病理学(活体病理学)诊断应用相对较少。血清学诊断和分子生物学诊断方法也被用于猕猴结核诊断中,但多数仍处于研究阶段^[2-4]。鉴于目前常用的诊断方法缺乏足够的准确性以及不能实现快速诊断,本研究将探讨全血 IFN- γ 释放试验的可行性。全血 IFN- γ 释放试验是基于外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)对分枝杆菌抗原刺激的记忆功能而实现的,体外抗原刺激活化的 PBMC 可诱导产生 IFN- γ ,通过测定血浆 IFN- γ 的增量来初步判断机体是否感染病原。在医学领域,全血 IFN- γ 释放试验被证实具有快速、简便等特点,降低了成本要求,成为较好的辅助诊断方法。如能将该技术充分用于实验猴的检测中,则有望大大提高结核病的诊断效能。

1 材料和方法

1.1 血清

近年来,在日常检疫和监督检测中收集到 TST 阳性猕猴血清 30 份, TST 阴性猕猴血清 70 份。上述血清用于测定基础 IFN- γ 含量。

1.2 抗凝血

广东某猕猴饲养场曾多次检出 TST 阳性病例,本研究收集到 14 例阳性猕猴肝素抗凝血,参照此前建立的方法进一步测定了 PPD 抗体^[5-6],结果全部为阳性(A_{450} 值为 1.62 ± 0.70 , cutoff 值为 0.217)。在其他猕猴饲养场采集 TST 阴性且 PPD 抗体阴性猕猴的肝素抗凝血 37 头份。上述抗凝血用于全血 IFN- γ 释放试验。

1.3 抗原

Bovituber-PPD, 2 mL/瓶, 源于 Synbiotics Corp.,

批号: Lot 142574。

1.4 全血 PPD 刺激培养

取 24 h 内的抗凝血 2 mL, 分别加入 24 孔细胞培养板孔内, 1 mL/孔, 每个样本 2 孔, 然后依次加入 0.1 mL PBS 和 0.1 mL PPD (200 IU), 置 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育过夜, 约 24 h, 收集血浆 300 μ L 以上, -20℃ 保存。

1.5 血浆 IFN- γ 含量测定

通过流式细胞仪, 采用 luminex® 液相芯片技术测定血浆中 IFN- γ 含量, 检测试剂盒源于默克密理博(Merck Millipore)。

1.6 统计学方法

测得的数据用 Excel 和 SAS 8.01 软件进行统计分析, 分析方法包括随机、成对 Student's *t* test 和 ROC 曲线分析等。

2 结果

2.1 血清基础 IFN- γ 含量

分别测定 TST 阴性和阳性猕猴血清样本的 IFN- γ 含量, 检测结果见图 1, 分别为: 3.08 ± 5.67 pg/mL ($n = 70$, CV = 184%) 和 31.88 ± 85.46 pg/mL ($n = 30$, CV = 268%)。与 TST 阴性猕猴比较, TST 阳性猕猴血清 IFN- γ 水平显著升高(unpaired *t*-test, $P < 0.01$)。

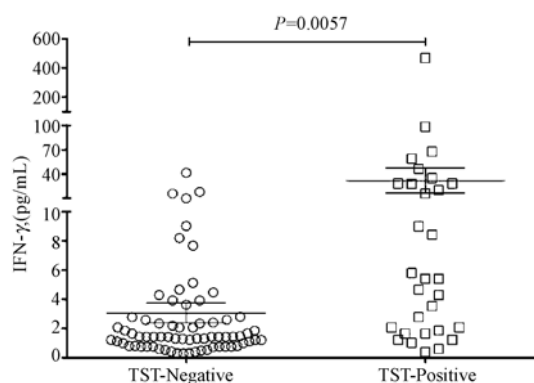
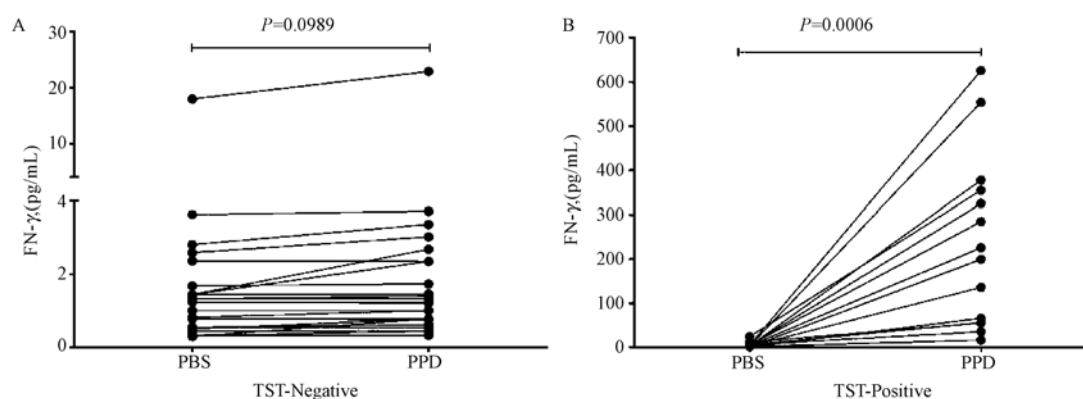
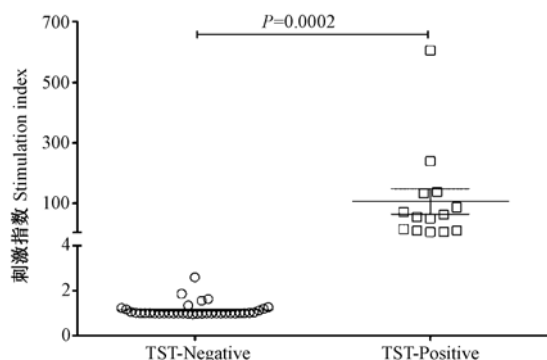


图 1 TST 阳性和阴性实验猴血清 IFN- γ 含量

Fig. 1 Basic serum IFN- γ concentrations of TST-positive and -negative macaques

2.2 体外抗原刺激全血诱导 IFN- γ 产生情况

以等体积 PBS 为阴性对照, 分析 PPD 体外刺激全血诱导 IFN- γ 产生的情况, 结果见图 2。对于 TST

图 2 PPD 刺激前后血浆 IFN- γ 含量变化Fig. 2 Changes in plasma IFN- γ pre- and post-stimulation by PPD图 3 PPD 全血 IFN- γ 释放试验的刺激指数Fig. 3 Stimulation indexes of PPD-based whole blood IFN- γ assay

阴性猕猴, PPD 刺激全血不会诱导 PBMC 产生 IFN- γ , 血浆 IFN- γ 含量不会显著升高 (paired t -test, $P > 0.05$); 而对于 TST 阳性猕猴, PPD 能显著刺激 PBMC 产生 IFN- γ , 血浆 IFN- γ 含量显著升高 (paired t -test, $P < 0.01$)。

2.3 刺激指数

鉴于 TST 阴性猕猴基础血清 IFN- γ 含量分布离

散度较大, 通过分析抗原刺激后的绝对 IFN- γ 含量来判定感染状态存在一定的风险。本研究进一步探讨了全血 IFN- γ 释放试验的刺激指数 (stimulation index, SI), 即抗原刺激后和刺激前 (PBS 对照) 血浆 IFN- γ 含量的比值。对 TST 阴性和阳性猕猴 SI 进行比较, 结果显示, TST 阳性猕猴 SI 明显高于 TST 阴性猕猴 (unpaired t -test, $P < 0.01$)。

2.4 ROC 曲线分析

对 TST 阴性和阳性猕猴 PPD 刺激后血浆 IFN- γ 含量做 ROC 曲线分析, 以阳性似然比最大时对应的 IFN- γ 含量为 cutoff 值, 结果显示, 最佳 cutoff 值为 10.19 pg/mL, 敏感性为 100%, 特异性为 97.3%, ROC 曲线下面积为 0.9981 (图 4, A)。同样, 对 TST 阴性和阳性猕猴的刺激指数做 ROC 曲线分析, 显示最佳 cutoff 值为 2.230, 敏感性为 100%, 特异性为 97.3%, ROC 曲线下面积为 1.0 (图 4, B)。以上述两种 cutoff 值判定, 本研究选择的 TST 阳性猕猴均为分支杆菌感染。

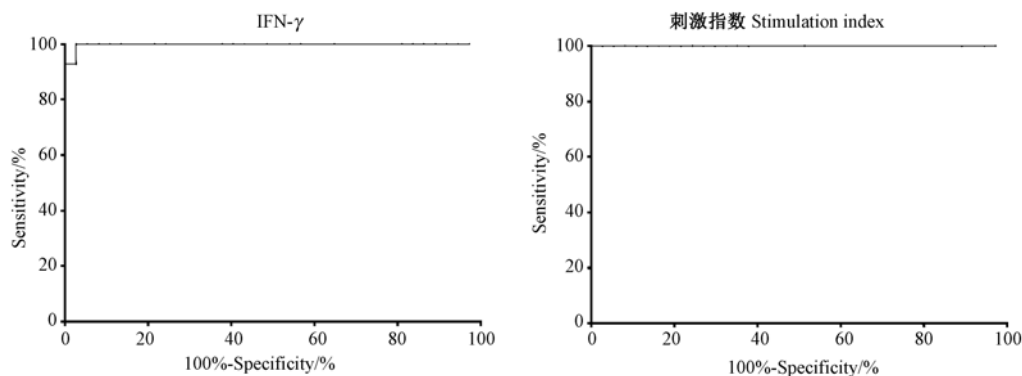


图 4 ROC 曲线分析

Fig. 4 Results of ROC curves analysis

3 讨论

IFN- γ 体外释放试验包括全血 IFN- γ 释放试验和 ELISPOT, 与 TST 相比, 具有敏感性和特异性高, 不受 TST 操作上的主观因素的影响, 结果更为客观可靠, 检测快速, 并且单次 TST 对 IFN- γ 检测结果影响不大等优点, 且该方法只需接触动物一次, 有效减少了对动物的应激, 具有很大的优越性; 因此, IFN- γ 体外释放实验被认为是 TST 理想的补充方法^[7]。全血 IFN- γ 释放试验相比 ELISPOT, 进一步优化了试验程序, 不需要分离 PBMC, 并且降低了对仪器和试剂的需求。

在结核病人全血 IFN- γ 检测方面已有商品化试剂盒 (QuantiFERON-TB Gold), 并得到了美国 FDA 和欧盟 CE Mark 的双重认可; 在牛方面, 澳大利亚于 1989 年率先推出商品化检测试剂盒 (BovigamTM), 此后被澳大利亚政府确认为根除牛结核计划的普检方法。尽管全血 IFN- γ 释放试验在人和牛结核检测中应用广泛, 但是, 其敏感性和特异性稳定性差, 相关 Meta 分析的合并敏感性 (低于 80%) 和特异性 (低于 75%) 仅为中等水平^[8-10], 尚不能替代 TST 成为结核诊断的金标准, 可以成为 TST 的有益补充。全血 IFN- γ 释放试验在非人灵长类动物结核诊断方面应用不多, 主要原因在于试剂盒用量小, 而且非人灵长类动物 IFN- γ 与人和牛 IFN- γ 不同, 具有种属特异性, 导致试剂盒成本增高。国外现有的少量研究和病例报道显示, 全血 IFN- γ 释放试验在诊断非人灵长类分枝杆菌感染方面具有较高的效能^[11-13]; 目前, 国内仅有的 1 项初步应用报道只显示出中等的敏感性^[14]。由此可见, 全血 IFN- γ 释放试验在猕猴中的应用仍需进一步验证。我国是猕猴生产繁育大国, 开展这方面研究具有重要的现实意义。

本研究首先分析了猕猴的血清基础 IFN- γ 水平, 尽管 TST 阳性猕猴血清基础 IFN- γ 水平升高, 但是离散度大, 不足以成为诊断分枝杆菌感染的依据。然后, 分析了 PPD 体外刺激对猕猴 PBMC 诱导产生 IFN- γ 的情况, 结果表明, PPD 刺激 TST 阴性猕猴不会诱导 PBMC 产生 IFN- γ , 血浆 IFN- γ 含量刺激前后无显著性变化; PPD 刺激则可以诱导 TST 阳性猕猴 PBMC 产生大量的 IFN- γ , 导致血浆 IFN- γ 含量显著高于刺激前的测定值。进一步分析显示, PPD 刺激后的 IFN- γ 绝对含量和 SI 均可作为判定分枝

杆菌感染的依据, 其中 SI 的准确性稍高 (ROC 曲线下面积比较)。本研究结果初步证实, 全血 IFN- γ 释放试验是适于猕猴分枝杆菌感染诊断的有效补充手段, 可以弥补 TST 的不足。

在刺激抗原用量方面, 国外文献多数未提供 PPD 浓度, 国内报道的 PPD 终浓度基本不超过 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[15-16]。影响全血 IFN- γ 释放试验的因素很多, 除了动物个体差异外, 还包括 PPD 来源、用量、批次和生产厂家等^[16]。本研究选择了 Synbiotics Corp. 生产的牛分枝杆菌 PPD, 纯度很高, 预实验结果显示 200 IU/孔和 400 IU/孔无显著性差异, 故选择 200 IU/孔开展实验, 相比国产 PPD 用量偏低。

本研究基于小样本量取得了较理想的实验结果, 但仍处于初级研究阶段, 尚需要大量临床样本来验证该方法的敏感性与特异性, 尤其是 TST 检测假阴性样本的验证。

参考文献:

- [1] Lerche NW, Yee JL, Capuano SV, et al. New approaches to tuberculosis surveillance in nonhuman primates [J]. ILAR J, 2008, 49(2): 170-178.
- [2] 罕园园, 高家红, 罗志武, 等. 猕猴结核分枝杆菌 PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 78-82.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Department of Health and Human Services (HHS). Control of communicable disease; foreign—requirements for importers of nonhuman primates (NHP). Final rule [J]. Fed Regist, 2013, 78(32): 11521-11545.
- [4] Rosenbaum M, Mendoza P, Ghera BM, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in new world monkeys in Peru [J]. Ecohealth, 2015, 12(2): 288-297.
- [5] 张钰, 黄韧, 刘香梅, 等. 猴结核病毒血清抗体检测方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(1): 63-66.
- [6] Min FG, Zhang Y, Huang R, et al. Serum antibody responses to 10 *Mycobacterium tuberculosis* proteins, purified protein derivative, and old tuberculin in natural and experimental tuberculosis in rhesus monkeys [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(12): 2154-2160.
- [7] Ryan TJ, Buddle BM, DeLisle GW. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing [J]. Res Vet Sci, 2000, 69: 57-61.
- [8] Aggarwal AN, Agarwal R, Gupta D, et al. Interferon gamma release assays for diagnosis of pleural tuberculosis: a systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(8): 2451-2459.

(下转第 18 页)

象,由此表明桃核承气汤(去甘草)颗粒低、中、高剂量均能不同程度地改善 TAA 引起的 HE 大鼠的神经反射情况,降低 HE 级别,降低生化指标的指数以及使病理结果均呈现减轻的现象,其中血氨浓度的显著降低可能对 HE 症状的改善起到决定性作用,而其中尤以高剂量组为最佳($P < 0.05$),效果与阳性药相近。此结果与胡瑜等^[12]使用丹参对肝性脑病的干预结果较一致,同时对肝脏组织保护作用方面,与杨荣源等^[4]使用桃核承气汤(桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草)对肝脏保护作用的结果相一致,但本实验中的桃核承气汤(去甘草)为改良方剂,具体的改良剂量对药物的作用影响及其作用机制有待进一步研究。

综上所述,本实验应用桃核汤承气(去甘草)对 TAA 大鼠肝性脑病模型进行干预实验,结果表明本方剂对 TAA 引起的肝性脑病症状具有减缓作用,显著降低血氨浓度,同时对 TAA 造成的肝损伤具有一定保护作用,为该方剂用于临床肝性脑病的治疗提供坚实的动物实验支持以及为进一步作用机制的研究奠定研究基础。

参考文献:

- [1] 刘冀,朱建忠,隋月林,等.四氯化碳诱导大鼠肝性脑病模型的制备[J].中国比较医学杂志,2012,22(2):33-37.
- [2] 江文明.肝性脑病的发病机制及治疗进展[J].求医问药,2012,10(7):580-581.
- [3] 谭琳玲,潘锦瑶,郑德俊,等.硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝性脑病模型建立的用药时间研究[J].现代消化及介入诊疗,2013,18(6):344-348.
- [4] 杨荣源,黄宏强,刘云涛,等.桃核承气汤对脓毒症大鼠肝脏组织的保护作用及机制[J].新中医,2014,46(6):210-212.
- [5] 张英军,王军,徐阳,等.桃核承气汤的实验研究[J].长春中医药大学学报,2014,30(2):234-237.
- [6] Zimmermann C, Ferenci P, Pflü C, et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission [J]. Hepatology, 1989, 9: 594-601.
- [7] 王睿林,李晓娟,白云峰,等.黄连解毒汤对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用[J].中国比较医学杂志,2015,25(2):34-37,87.
- [8] 王丽卿,祝胜美,周衡俊,等.急性肝性脑病大鼠脑水肿与脑水通道蛋白4的相关性[J].中华医学杂志,2011,91(36):2573-2577.
- [9] 逢菲,胡瑾华.肝性脑病的动物模型及分子生物学机制研究进展[J].国际消化病杂志,2014,34(2):84-86.
- [10] 徐大海,张楠,高金莹,等.肝性脑病治疗进展[J].临床肝胆病杂志,2011,27(2):218-221.
- [11] 张照兰,时峰.肠毒清颗粒灌肠治疗肝性脑病 II-III 级的临床观察[J].时珍国医国药,2012,23(9):2365-2366.
- [12] 胡瑜,蔡梦婷,陈健文,等.丹参注射液对肝性脑病的防治作用及机制研究[J].中国药师,2014,17(11):1811-1814.
- [13] 张英军,王军,徐阳,等.桃核承气汤的实验研究[J].长春中医药大学学报,2014,30(4):234-237.

[修回日期]2016-04-28

(上接第8页)

- [9] Yu J, Wang ZJ, Chen LH, et al. Diagnostic accuracy of interferon-gamma release assays for tuberculous meningitis: a meta-analysis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(4): 494-499.
- [10] Lahuerta-Marin A, Gallagher M, McBride S, et al. Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms [J]. Vet Res, 2015, 46: 90.
- [11] Vervenne RA, Jones SL, van Soelingen D, et al. TB diagnosis in non-human primates: comparison of two interferon-gamma assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 100(1-2): 61-71.
- [12] Garcia MA, Yee J, Bouley DM, et al. Diagnosis of tuberculosis in macaques, using whole-blood in vitro interferon-gamma (PRIMAGAM) testing [J]. Comp Med, 2004, 54(1): 86-92.
- [13] Parsons SD, de Villiers C, Gey van Pittius NC, et al. Detection of *Mycobacterium kansasii* infection in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) using a modified QuantiFERON-TB Gold assay [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 136(3-4): 330-334.
- [14] 汪乾坤,姜勇,童胜涛,等.猕猴结核 IFN- γ 体外释放检测法的建立与初步应用[J].中国兽医学报,2015,35(9):1488-1494.
- [15] 廖娟红.新型牛结核 IFN- γ 体外释放检测法的建立和应用[D].武汉:华中农业大学,2010:38-44.
- [16] 杨新婷,杨扬,杜凤娇,等.肺结核患者全血 γ 干扰素释放试验影响因素的探讨[J].中国防痨杂志,2013,35,(12):1007-1012.

[修回日期]2016-03-19