

研究报告

牛分枝杆菌 CFP-10 单克隆抗体的制备及其竞争 ELISA 方法的建立与应用

李昕^{1,2}, 夏爱鸿¹, 翟伟², 谢宇晴¹, 申峻松², 徐正中^{1,2}, 陈祥^{*1,2}, 焦新安^{*1,2}

1 扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

2 扬州大学 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州 225009

李昕, 夏爱鸿, 翟伟, 谢宇晴, 申峻松, 徐正中, 陈祥, 焦新安. 牛分枝杆菌 CFP-10 单克隆抗体的制备及其竞争 ELISA 方法的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1701-1712.

LI Xin, XIA Aihong, ZHAI Wei, XIE Yuqing, SHEN Junsong, XU Zhengzhong, CHEN Xiang, JIAO Xin'an. Preparation of a monoclonal antibody against *Mycobacterium bovis* CFP-10 and establishment and application of a competitive ELISA for bovine tuberculosis detection[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1701-1712.

摘要:【背景】牛结核病是一种重要的人兽共患传染病, 主要由牛分枝杆菌引起, 阻碍养殖业发展, 并在世界范围内造成巨大经济负担。【目的】制备牛结核分枝杆菌 CFP-10 蛋白单克隆抗体, 建立牛结核病竞争 ELISA 方法并对其进行初步应用与评估。【方法】以 rHis-CFP-10 蛋白作为免疫原, 采用小鼠杂交瘤融合技术获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 选用杂交瘤细胞株制备单克隆抗体, 并对其纯化后进行辣根过氧化物酶标记。基于 CFP-10 单克隆抗体建立牛结核病竞争 ELISA 方法, 对 155 头奶牛采用商品化 BOVIGAMTM 试剂盒与建立的竞争 ELISA 检测方法进行同步检测, 验证该方法适用性。【结果】获得一株稳定分泌 CFP-10 特异性抗体的阳性杂交瘤细胞株 8E6, 获得酶标抗体 HRP-8E6 并建立竞争 ELISA 方法。棋盘法确定包被抗原 CFP-10-ESAT-6 融合蛋白的工作浓度和酶标抗体 HRP-8E6 的稀释倍数分别为 0.75 µg/mL 和 1:8 000, 该方法 Cut-off 值为 47.10%, 检测限为 0.800 µg/mL; 其重复性良好, 批间与批内试验变异系数均小于 10%; 敏感性为 54.55%, 特异性为 100.00%。临床检测显示, 与 BOVIGAMTM 试剂盒相比, 阳性符合率为 78.57%, 阴性符合率为 82.35%, 总符合率为 80.65%。【结论】制备一株 CFP-10 特异性抗体, 并使用特异性高的 CFP-10-ESAT-6 融合蛋白建立竞争 ELISA 检测方法, 该方法准确、可靠, 可应用于牛结核病的检测。

关键词: 牛结核分枝杆菌; 单克隆抗体; 竞争 ELISA; CFP-10

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800403); 江苏省农业科技自主创新基金[CX(21)1004]; 江苏省科技计划(BE2021331); 高等学校学科创新引智计划(D18007); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800403), the Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund of Jiangsu Province (CX(21)1004), the Science and Technology Program of Jiangsu Province (BE2021331), the Higher Education Discipline Innovation and Introduction Program (111 Project, D18007), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xiang, chenxiang@yzu.edu.cn; JIAO Xin'an, jiao@yzu.edu.cn

Received: 2023-08-05; Accepted: 2023-11-06; Published online: 2024-03-11

Preparation of a monoclonal antibody against *Mycobacterium bovis* CFP-10 and establishment and application of a competitive ELISA for bovine tuberculosis detection

LI Xin^{1,2}, XIA Aihong¹, ZHAI Wei², XIE Yuqing¹, SHEN Junsong², XU Zhengzhong^{1,2}, CHEN Xiang^{*1,2}, JIAO Xin'an^{*1,2}

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis/Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Bovine tuberculosis is a zoonotic infectious disease mainly caused by *Mycobacterium bovis*, which hinders the development of breeding industry and causes huge economic burden worldwide. [Objective] To prepare monoclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 protein and establish a competitive ELISA for the detection of bovine tuberculosis. [Methods] With rHis-CFP-10 protein as the immunogen, the mouse hybridoma fusion technique was employed to establish stable hybridoma cells that secreted antibodies. A monoclonal antibody was obtained from the hybridoma cell line 8E6 and subsequently conjugated with horseradish peroxidase after purification. A competitive ELISA for the detection of bovine tuberculosis was established based on the anti-CFP-10 monoclonal antibody. To assess the applicability of the established method, we employed the commercial BOVIGAMTM kit and the established competitive ELISA assay to detect 155 dairy cows. [Results] A hybridoma cell line 8E6 stably secreting specific antibodies against CFP-10 was obtained. A competitive ELISA method was established based on the HRP-8E6 antibody. The working concentration of the coating antigen CFP-10-ESAT-6 and the dilution factor of HRP-8E6 were 0.75 µg/mL and 1:8 000, respectively. The established method showed the Cut-off of 47.10%, the limit of detection of 0.800 µg/mL, and good reproducibility (inter and intra-batch coefficients of variance being below 10%). The established method showed the sensitivity of 54.55% and the specificity of 100.00% in the detection of the serum samples from cattle with bovine tuberculosis and healthy cattle. In the clinical trial, the established method showed a positive coincidence rate of 78.57%, a negative coincidence rate of 82.35%, and a total coincidence rate of 80.65% compared with the BOVIGAMTM kit. [Conclusion] An anti-CFP-10 antibody was successfully prepared and a competitive ELISA method was established using a CFP-10-ESAT-6 fusion protein with high specificity. The method is accurate and reliable and can be preliminarily applied to the detection of bovine tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium bovis*; monoclonal antibody; competitive ELISA; CFP-10

牛结核病(bovine tuberculosis, bTB)主要由结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) 成员——牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)感染引起^[1-3]。该病不仅严重阻碍养牛业发展,而且威胁生态平衡和食品卫生安全^[4-5]。同时,牛结核是人结核的重要传染源^[6]。所有人类结核病例中约有 10%是由牛分枝杆菌感染引起,大多数病例发生在发展中国家^[7-8]。

常见牛结核病检测包括分子生物学检测、细菌学检测和免疫学检测^[9]。免疫学方法是临床应用广泛的诊断方法,包括结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test, TST)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、 γ -干扰素释放试验(interferon-gamma release assay, IGRA)、免疫胶体金技术(immune colloidal gold technique, GICT)等。

TST 是当前检验牛结核病的最主要方法,也是世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOA)指定的标准方法,操作简单,但在使用结核菌素纯蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD)检测时,其工艺及人为操作均可影响 TST 结果,常产生假阳性反应^[10-14]。IGRA 是检测结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*)感染的常规方法^[15-16],也是 WOA 指定的替代试验,广泛用于 TST 辅助诊断^[17-18]。用牛 PPD 作为刺激原的检测结果显示存在一定非特异性反应^[19]。同时商品化 BOVIGAMTM试剂盒的昂贵价格,限制了其在我国的推广应用。

竞争 ELISA 抗体检测方法是一种血清学检验方法,可用来辅助迟发型过敏反应试验的检测^[20]。研究人员使用结核分枝杆菌蛋白建立方法并进行改进,以提高检测的敏感性和特异性。培养滤液蛋白 10 (culture filtrate protein-10, CFP-10) 是 1998 年鉴定的低分子量蛋白^[21],是效应性 T

细胞的主要靶抗原之一^[22-23]。CFP-10 融合蛋白与天然蛋白具有相同的抗原性,可诱发 PPD 皮肤试验阳性者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)出现增殖反应和产生 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)^[24]。因此,CFP-10 可作为检测牛分枝杆菌的特异性抗原,利用 CFP-10 单克隆抗体能够区分牛分枝杆菌的自然感染、卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG)免疫接种以及非结核分枝杆菌感染,从而增加对结核病诊断的特异性^[23]。

因此,研制快速检测抗体的竞争 ELISA 方法是牛结核病检测中亟待解决的问题之一。本研究建立针对牛分枝杆菌特异性融合蛋白 CFP-10-ESAT-6 的竞争 ELISA 检测方法,并进行初步临床应用,以期对牛结核病的诊断提供新的辅助检测手段。

1 材料与方法

1.1 试剂及实验动物

rHis-CFP-10 蛋白、rGST-CFP-10 蛋白^[25]、CFP-10-ESAT-6 融合蛋白^[3]、结核阳性牛血浆和阴性牛血浆,以及牛支原体(*Mycoplasma bovis*)、牛病毒性腹泻黏膜病病毒(bovine viral diarrhea mucosal disease virus, BVD-MDV)、口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)和牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)阳性血浆, BL21(DE3)-pET-30a(+), BL21(DE3)-pET-30a(+)-*lhp*、BL21-pGEX-6p-1-*lhp*、BL21(DE3)、BL21、BL21(DE3)-pET-30a(+)-*lhp*-linker-*esat-6*、BL21-pGEX-6p-1 和 BCG 细菌由江苏省人兽共患病学重点实验室保存。家兔、6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心。*Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle (BOVIGAMTM ELISA 试剂盒) 购自 Thermo Fisher 公司。弗氏完全佐剂、弗氏

不完全佐剂和小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购自 Sigma 公司。所有动物实验均经扬州大学动物福利与伦理委员会批准,并符合机构管理委员会和实验动物伦理委员会的指导原则(扬州大学实验动物福利伦理审查编号为 SJXY-6)。

1.2 杂交瘤细胞株的建立

参照文献[26]方法进行杂交瘤细胞株的建立。

1.2.1 动物免疫

以 rHis-CFP-10 蛋白为免疫原,腹腔注射免疫 6–8 周龄 BALB/c 小鼠,100 μg /只小鼠,每隔 2 周腹腔注射免疫 1 次,三免 3 d 后进行细胞融合。

1.2.2 细胞融合

PEG4000 化学法进行细胞融合。融合的杂交瘤细胞培养上清效价用间接 ELISA 检测。

1.3 阳性克隆的筛选

以 rGST-CFP-10 蛋白为检测原,用间接 ELISA 方法筛选阳性细胞克隆。将 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的检测抗原加入酶标板中,每孔 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST 洗涤 3 次,3–5 min/次,用含 10%胎牛血清的 PBS 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。PBST 洗涤 3 次后,每孔加入 100 μL 杂交瘤细胞培养上清,并设立阴性对照(SP2/0 细胞上清)和阳性对照(免疫鼠多抗血清),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次,每孔加入 100 μL 1:1 000 稀释后的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 洗涤后,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色液以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板中,显色 10 min 后加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的 2 mmol/L H_2SO_4 终止,10 min 内测定 OD_{450} 值。被测孔/阴性对照孔 >2 判定为阳性。

1.4 抗体的制备

采用 BALB/c 小鼠体内诱生法制备小鼠单克隆抗体的腹水并使用 Protein G 亲和层析方法进行纯化,获得抗体。将纯化的单克隆抗体采用标准辣根过氧化物酶标记法进行标记。

1.5 单抗亚类的鉴定

采用间接 ELISA 方法对抗亚类进行测定^[10]。包被过夜后封闭,每株抗体分别加入 PBS 1:1 000 稀释的羊抗鼠 IgM、IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30–40 min;二抗孵育 1 h 后显色 10 min 再终止,酶标仪检测 OD_{450} 值,判定单抗的亚类。

1.6 腹水和酶标抗体效价检测

用间接 ELISA 检测所得腹水的效价:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rGST-CFP-10 蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 16 h;PBST 洗涤 5 遍后加入 2% BSA 的 PBS,300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;PBST 洗涤 5 遍后加入腹水,首孔加入 200 μL 的 1:4 000 稀释的腹水,然后倍比稀释 14 个梯度,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;PBST 洗涤 5 遍后加入 1:8 000 稀释的羊抗鼠 IgG,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 1 h,洗涤后加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ TMB,5 min 后加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的终止液终止,用酶标仪测定 OD_{450} 。

用直接 ELISA 检测酶标抗体的效价:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rGST-CFP-10 蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 16 h;PBST 洗涤 5 遍后加入 2% BSA 的 PBS,300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中封闭 2 h;PBST 洗涤 5 遍后,首孔加入 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 1:200 稀释的酶标抗体,然后倍比稀释 14 个梯度,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育 2 h;洗涤后加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ TMB,5 min 后加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的终止液终止,用酶标仪测定 OD_{450} 。

1.7 单抗特异性的鉴定

对 BL21(DE3)-pET-30a(+)-*lhp*、BL21-pGEX-6p-1-*lhp*、BL21(DE3)、BL21、BL21(DE3)-pET-30a(+)-*lhp*-linker-*esat*-6、BL21(DE3)-pET-30a(+)-BCG、BL21-pGEX-6p-1 进行液体培养,5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体,沉淀用 PBS 悬浮,超声波裂解(30 W,裂解 3 s,间隔 5 s)1 min 后 12 000 r/min 离心 10 min 取上清,使用 Dot-ELISA 试验鉴定单抗特异性^[25]。

1.8 兔血清制备和效价的检测

取 3 只健康的食用肉兔, 1 只为健康组, 2 只为实验组。将灭活的结核分枝杆菌与等量弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)乳化, 皮下免疫实验组肉兔。同时设立 PBS 组作为阴性对照组, 间隔 2 周后, 以不完全佐剂(Freund incomplete adjuvant, FIA)乳化抗原, 皮下免疫进行第 2 次免疫。两周后用不完全弗氏佐剂乳化抗原皮下免疫 1 次。三免之后, 取实验组兔子血清作为阳性对照血清, PBS 组兔子血清为阴性对照血清。

用间接 ELISA 检测阳性对照血清效价。

1.9 竞争 ELISA 检测方法的建立

采用正交矩阵方法进行滴定实验, 确定包被抗原浓度和酶标抗体稀释倍数。包被抗原浓度为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 $\mu\text{g/mL}$, 100 μL /孔包被酶标板, 酶标抗体的稀释倍数分别为 1:5 000、1:6 000、1:7 000、1:8 000、1:9 000、1:10 000。以阳性、阴性兔血清分别作为阳性对照和阴性对照, 根据阳性抑制率/阴性抑制率(P/N)选择最佳工作浓度的包被抗原浓度和酶标抗体稀释倍数。之后优化阴、阳性对照血清使用浓度、最佳包被条件、封闭液种类及封闭条件、酶标抗体与样品共孵育时间和显色时间, 建立竞争 ELISA 检测方法。

1.10 评判标准的确定

共测试 200 个健康牛血浆样品以确定临界点。结果基于空白对照(B)和测试血浆样品(S)的 OD_{450} 值使用以下公式计算: 抑制百分比(%) = $[(B-S)/B] \times 100$ 。计算样品抑制百分比的平均值(\bar{X})、标准差(SD), $\bar{X} + 3 \times \text{SD}$ 为 Cut-off 值(C_n)。如果抑制率 $\geq C_n$, 牛结核抗体反应阳性; 如果抑制率 $< C_n$, 牛结核抗体反应阴性。

1.11 竞争 ELISA 抗体检测方法的评价

1.11.1 灵敏度评价

使用已知浓度的单克隆抗体 8E6 作为标准

品对竞争 ELISA 的灵敏度进行测定。将 8E6 稀释为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 $\mu\text{g/mL}$, 分别加入到预先包被的酶标板孔中, 每孔 50 μL 。每个稀释度做 3 个重复, 每孔加入 50 μL 1:4 000 稀释的酶标抗体, 同时设定阴性、阳性和空白对照, 测定竞争 ELISA 的灵敏度。

1.11.2 重复性评价

在相同实验条件下, 用建立的方法对阳性对照和阴性对照进行稳定性评价。分别检测阳性对照和阴性对照中抗体含量, 每个对照检测 3 个复孔, 重复检测 3 次, 分别计算批内、批间抗原浓度平均值(\bar{X})、方差(SD)及批内和批间标准差系数(CV), 验证方法的重复性。

1.11.3 敏感性和特异性评价

TST 和 BOVIGAMTM 牛结核 γ -干扰素 ELISA 试剂盒检测均为阳性的奶牛判定为牛结核阳性(共 55 头), 两种方法检测均为阴性的奶牛判定为牛结核阴性(共 65 头), 选取此 55 头阳性牛和 65 头阴性牛用于评价竞争 ELISA 抗体检测方法的敏感性和特异性。

选择牛支原体、口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻黏膜病病毒阳性血浆用于评价竞争 ELISA 抗体检测方法的特异性。

1.12 竞争 ELISA 抗体检测方法的初步应用

将牛结核病竞争 ELISA 检测方法初步应用于临床牛血浆样品, 同时使用 BOVIGAMTM 牛结核 γ -干扰素 ELISA 进行同步检测。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的建立与单克隆生物学特性鉴定

筛选制备出一株能稳定分泌 CFP-10 抗体的杂交瘤细胞株, 编号为 8E6。同时使用小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒测定 8E6 的亚类是 IgG1。

2.2 8E6 腹水和 HRP-8E6 效价测定

大量制备小鼠 mAb 8E6 的腹水并使用 Protein G 亲和层析方法进行纯化,获得抗体 8E6,并对其进行辣根过氧化物酶标记。ELISA 检测结果计算出 8E6 腹水的效价为 1.024×10^7 , HRP-8E6 抗体效价为 3.28×10^6 。

2.3 单抗特异性试验

在 Dot-ELISA 试验中,单克隆抗体 8E6 与细菌的反应谱测定结果如表 1 所示,可以看出 8E6 仅与原核表达 CFP-10 融合蛋白的重组大肠杆菌 BL21(DE3)-pET-30a(+)-*lhp*、BL21-pGEX-6p-1-*lhp*、BL21(DE3)-pET-30a(+)-*lhp*-linker-*esat-6* 反应,与其余细菌无反应。反应谱测定结果证明单克隆抗体 8E6 特异性地针对 CFP-10 蛋白。

2.4 兔血清效价结果

将灭活的结核分枝杆菌对实验组兔子进行皮下免疫,每隔 2 周免疫一次。同时设立 PBS 组作为阴性对照组,三免之后,取实验组兔子血清作为阳性对照血清,PBS 组兔子血清为阴性对照血清。将兔血清以首孔 1:100 稀释进行间接 ELISA 效价检测,按照 $P/N \geq 2.1$ 计算得出,阳性兔血清的效价为 1.31×10^5 ,可作为后续 ELISA 方法检测的阳性对照。

表 1 单抗 8E6 与细菌的反应谱

Table 1 The reactivities of monoclonal antibody 8E6 with different bacteria

细菌名称 Bacteria name	结果 Results
BL21(DE3)-pET-30a(+)- <i>lhp</i>	+
BL21-pGEX-6p-1- <i>lhp</i>	+
BL21(DE3)-pET-30a(+)- <i>lhp</i> -linker- <i>esat-6</i>	+
BL21(DE3)-pET-30a(+)	-
BL21-pGEX-6p-1	-
BL21(DE3)	-
BL21	-
BCG	-

+: 阳性反应; -: 阴性反应

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

2.5 牛结核病竞争 ELISA 检测方法的建立

以阳性兔血清和阴性兔血清作为样品,采用正交方阵试验进行最佳包被抗原和酶标抗体使用浓度的摸索。如图 1 所示,当包被抗原浓度为 $0.75 \mu\text{g/mL}$ 、酶标抗体稀释倍数为 1:8 000 时,其阳性抑制率大于 90%,阴性抑制率小于 10%,阳性抑制率比阴性抑制率(P/N 值)为 21.67,此时检测效果最佳。

对建立的检测方法进行条件优化的结果如图 2 所示,确定血清最佳稀释倍数为 1:20,抗

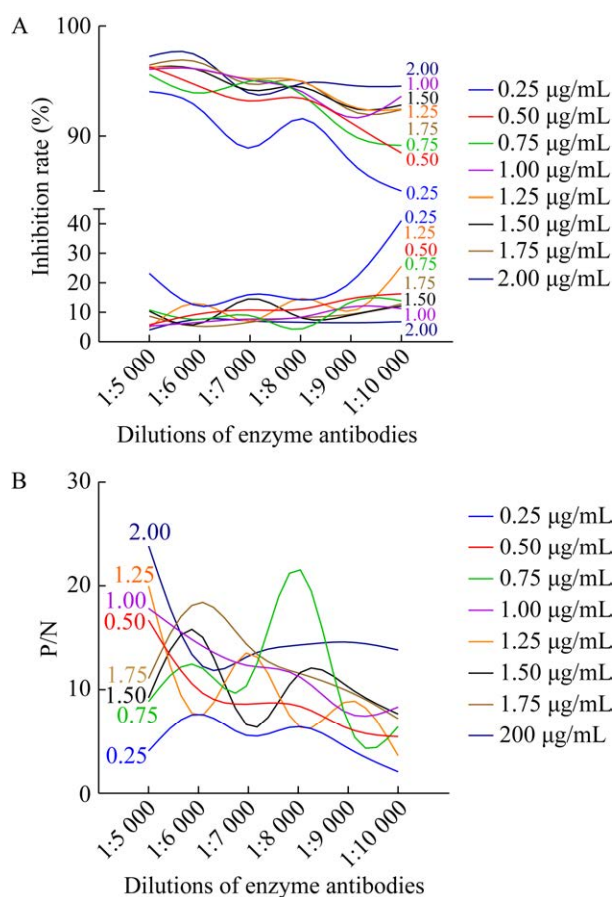


图 1 竞争 ELISA 方法的建立 A: 正交方阵试验的抑制率. B: 正交方阵试验的 P/N 值

Figure 1 Establishment of a competitive ELISA method. A: Inhibition rate of orthogonal square experiment. B: P/N of orthogonal square array experiment.

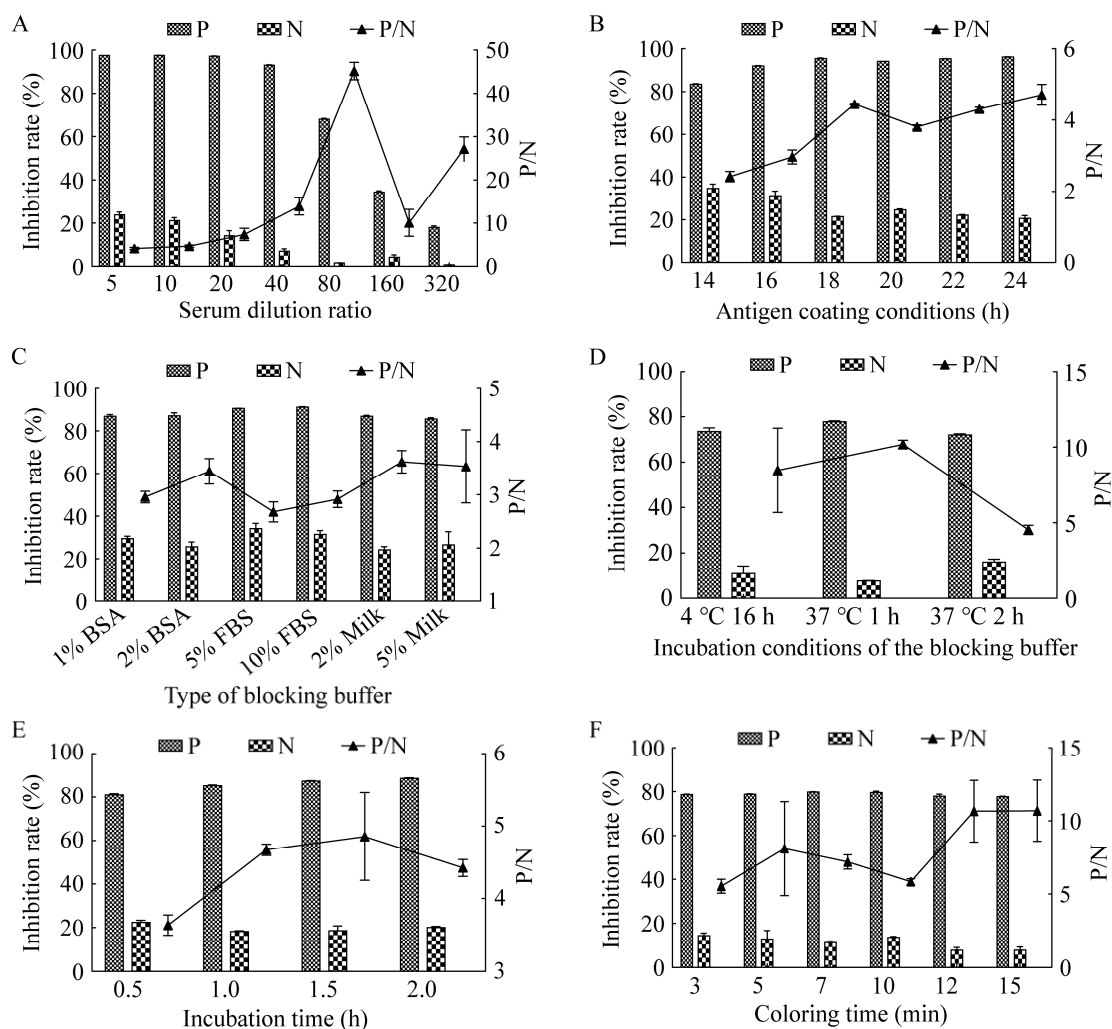


图 2 竞争 ELISA 方法的优化 A: 最佳血清稀释倍数. B: 最佳抗原包被条件. C: 最佳封闭液种类. D: 最佳封闭条件. E: 最佳样品反应时间. F: 最佳显色条件

Figure 2 Optimization of the competitive ELISA method. A: Optimal serum dilution ratio. B: Optimal antigen coating conditions. C: Optimal type of blocking buffer. D: Optimal incubation conditions of the blocking buffer. E: Optimal incubation time. F: Optimal coloring time. Mean \pm SEM is represented by error bar.

原包被条件为 4 °C 18 h, 封闭条件为含 2% 脱脂奶粉的 PBS 于 37 °C 水浴锅孵育 1 h, 样品反应时间为 37 °C 1 h, 显色条件为 37 °C 7 min。

2.6 评判标准的确定

检测 200 份健康牛血浆样品的 OD_{450} 值, 平均抑制率为 26.45%, SD 为 6.87%, C_n 值为 47.10%。因此确定结果判定标准为: 样品抑制率 \geq 47.10%时, 牛结核抗体反应阳性; 样品抑制

率 $<$ 47.10%, 则牛结核抗体反应阴性。

2.7 竞争 ELISA 抗体检测方法的评价结果

2.7.1 灵敏度评价结果

将已知浓度单克隆抗体 8E6 稀释为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 $\mu\text{g/mL}$ 进行测定。当 8E6 蛋白质量浓度为 0.800 $\mu\text{g/mL}$ 时, OD_{450} 值为 0.923, 抑制率为 51.19%, 仍然判定为阳性, 初步确定建立的方法检测限为 0.800 $\mu\text{g/mL}$ (图 3)。

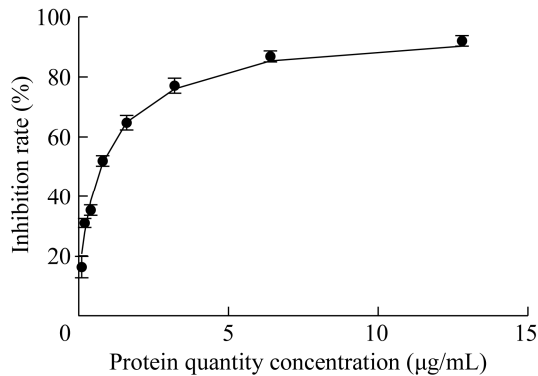


图3 竞争 ELISA 抗体检测方法灵敏度评价

Figure 3 Sensitivity evaluation of the competitive ELISA method. Mean±SEM is represented by error bar.

2.7.2 重复性评价结果

对建立的牛结核病竞争 ELISA 检测方法进行批内和批间重复性评价,如表 2 所示,阳性对照和阴性对照的批内 CV 分别为 0.39%和 3.16%,批间 CV 分别为 0.79%和 8.64%,均<10.00%,表明该方法重复性良好,检测结果准确可靠。

2.7.3 敏感性和特异性评价结果

以 TST 和 BOVIGAMTM 牛结核 γ-干扰素 ELISA 试剂盒检测结果为标准,对建立的牛结核病竞争 ELISA 检测方法进行敏感性和特异性

评价。以上两种方法检测均为阳性的奶牛判定为牛结核阳性(共 55 头),两种方法检测均为阴性的奶牛判定为牛结核阴性(共 65 头),结果显示对建立的牛结核病竞争 ELISA 检测方法的敏感性达到 54.55% (30/55),特异性达到 100.00% (65/65)。

选择牛支原体、口蹄疫病毒、牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻黏膜病病毒阳性血浆检测,结果抑制率均小于 20%,特异性为 100%。

2.8 牛结核病竞争 ELISA 检测方法的初步应用

对 155 头实验牛进行 TST 以及临床诊断观察,其中 85 头实验牛 TST 为阳性,且身体消瘦,乳房有肿块,伴有间歇性咳嗽。将这 85 头实验牛使用商品化 BOVIGAMTM 试剂盒进行检测,结果为阳性。将 155 头实验牛同时使用商品化 BOVIGAMTM 试剂盒和牛结核病竞争 ELISA 方法进行检测,比较其符合率。结果显示,竞争 ELISA 与商品化 BOVIGAMTM 试剂盒的阳性符合数为 55 头,阳性符合率为 78.57%;阴性符合数为 70 头,阴性符合率为 82.35%,两者总符合率为 80.65%,结果见表 3。

表 2 竞争 ELISA 方法重复性评价

Table 2 Repeatability evaluation of the competitive ELISA method

对照 Control	批内 Inter-batch (n=3)			批间 Intra-batch (n=3)		
	\bar{X} (%)	SD (%)	CV (%)	\bar{X} (%)	SD (%)	CV (%)
阳性 Positive	93.00	0.37	0.39	93.46	0.73	0.79
阴性 Negative	18.12	0.57	3.16	14.26	1.23	8.64

表 3 竞争 ELISA 方法与 BOVIGAMTM 试剂盒的比较结果

Table 3 Comparative result of the competitive ELISA method and BOVIGAMTM kit

		BOVIGAM TM 试剂盒 BOVIGAM TM kit		总数 Sum	阳性符合率 Positive coincidence rate (%)	阴性符合率 Negative coincidence rate (%)	总符合率 Total consistent rate (%)
		+	-				
竞争 ELISA	+	55	0	55	78.57		
Competitive ELISA	-	30	70	100		82.35	
	总数 Sum	85	70	155			80.65

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

3 讨论与结论

牛结核病是影响养殖业和人类健康的重要传染病^[27],因此牛结核病的检测尤为重要。牛分枝杆菌进入机体之后,首先与肺组织中的巨噬细胞相互作用,然后这些巨噬细胞被激活,并通过 Th1 型细胞因子(主要是 IFN- γ)来控制感染;此外,大量的促炎和抗炎级联细胞因子和趋化因子被释放,在感染部位免疫细胞的激活和“招募”中发挥作用,以获得有效的适应性免疫反应;而在疾病的后期,主要以体液免疫为主,并与增加的细菌负担和病理相关^[28]。血清学检测就是检测血液中抗体,目前最普遍的方法是 ELISA 方法,通过固定特异性的抗原检测血清特异的抗体。血清学检测方法与 IGRA 相比更简便、成本更低且用时短,但传统血清学检测的特异性较低,需选择特异性较好的抗原来优化^[29-30]。

目前,结核病的血清学检测主要是采用基于 MPB70、MPB83、HSP65、HBHA 蛋白及多肽等抗原的间接 ELISA 方法^[31]。用 MPT63、MPB70、MPB83 分别建立的间接 ELISA 方法具有较高的特异性,在区分牛分枝杆菌和环境分枝杆菌感染方面有一定优势^[32-34]。INGENASA 公司的 MPB83 双识别 ELISA 与 BOVIGAMTM 试剂盒联合使用时表现出较高的敏感性,达到 95.4%^[35]。混合抗原的包被也常被用于间接 ELISA 方法的建立,IDEXX 公司建立了以 MPB83 和 MPB70 为抗原的牛结核病间接 ELISA 方法,该方法的敏感性因地理区域而异,在英国为 77%,而在墨西哥仅为 9%^[36]。利用基于 MPB83、MPB70、ESAT-6、CFP-10 和 Rv3616c 等 7 种抗原的多重 ELISA 方法检测经组织病理学或细菌培养证实感染牛分枝杆菌,但 TST 显示为阴性或不确定的牛,阳性率可达 88.3%,

减少了牛结核病的漏诊^[37]。

间接 ELISA 方法易出现交叉反应导致假阳性,而竞争 ELISA 具有更好的特异性。以 Ag85A 单克隆抗体建立牛结核病的竞争 ELISA,对临床牛结核病血清和健康牛血清进行检测,其敏感性为 54.2%,特异性为 83.5%^[38]。在诊断抗原方面,有研究表明将 CFP-10 作为检测抗原时可以提高检测的准确性^[39-40]。因此,本实验室制备结核分枝杆菌 CFP-10 蛋白单克隆抗体 8E6,并基于 CFP-10-ESAT-6 融合蛋白作为检测抗原,建立了牛结核竞争 ELISA 检测方法,对其进行判定标准的确定。当样品抑制率 $\geq 47.10\%$ 时,牛结核抗体反应阳性;反之,当样品抑制率 $< 47.10\%$ 时,则牛结核抗体反应阴性。本研究建立的牛结核病竞争 ELISA 检测方法的敏感性达到 54.55%,特异性达到 100.00%。相较于现有文献报道的抗原建立的竞争 ELISA 方法,具有更好的特异性,但是敏感性仍有缺陷。较低的敏感性可能与结核病感染早期细胞免疫为主而感染晚期以体液免疫为主有关^[5]。未来仍需要挖掘有效的抗原种类并对不同种类抗原组合以提高竞争 ELISA 方法的敏感性。以 TST 和商品化 BOVIGAMTM 试剂盒检测结果作为参考,将建立的牛结核竞争 ELISA 检测方法对临床实验牛进行初步应用,与商品化 BOVIGAMTM 试剂盒和皮试变态 TST 相比,总符合率为 80.65%,高于常规的血清学检测方法^[5-6,38]。结果表明,建立的牛结核竞争 ELISA 方法检测效果较好。

本研究建立的牛结核竞争 ELISA 检测方法减少了 TST 操作和解释上的主观性,使结果更为客观、可靠。而且与商品化 BOVIGAMTM 试剂盒相比,建立的牛结核竞争 ELISA 检测方法成本较低,适合国内推广。通过将建立的方法与 TST 或 IGRA 联合,有助于提高感染的检出

率与准确性,可为我国牛结核病的检疫和根除提供一种实用、有效的检测手段。

REFERENCES

- [1] ZEWUDE A, MOHAMMED T, TERFASSA L, HUNT WG, PAN XL, BALADA-LLASAT JM, GEBREYES W, TORRELLES JB, WANG SH, AMENI G. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan antigen assay and rapid serology blood test for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 1-8.
- [2] DOYLE LP, COURCIER EA, GORDON AW, O'HAGAN MJH, STEGEMAN JA, MENZIES FD. Bovine tuberculosis in Northern Ireland: quantification of the population disease-level effect from cattle leaving herds detected as a source of infection[J]. Epidemiology and Infection, 2017, 145(16): 3505-3515.
- [3] MENG C, WAN T, XU ZZ, SHAN F, XIE XL, SHEN JS, CHEN X, JIAO XA. Fusion expression of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10 protein and its cellular immuno-properties[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2015, 46S: 84-89.
- [4] 彭永崇, 朱小洁, 王子健, 陈颖钰, 郭爱珍. 牛结核病免疫学诊断研究进展[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(6): 1250-1254, 1259.
- PENG YC, ZHU XJ, WANG ZJ, CHEN YY, GUO AZ. Advance on immunological diagnosis techniques of bovine tuberculosis in cattle[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(6): 1250-1254, 1259 (in Chinese).
- [5] 夏爱鸿, 李昕, 冯莉, 全娟娟, 姚志鸿, 陆梦君, 徐正中, 陈祥, 焦新安. 牛分枝杆菌 Mb0950c 的免疫特性及其血清学检测方法的建立[J]. 微生物学报, 2021, 61(2): 379-387.
- XIA AH, LI X, FENG L, QUAN JJ, YAO ZH, LU MJ, XU ZZ, CHEN X, JIAO XA. Immunogenicity evaluation of *Mycobacterium bovis* Mb0950c protein and establishment of serological diagnostic method for bovine tuberculosis detection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(2): 379-387 (in Chinese).
- [6] 孟闯, 万婷, 徐正中, 单法, 范峰, 陈祥, 焦新安. 结核分枝杆菌 MPT83 的免疫原性及其奶牛结核病血清学检测方法的建立[J]. 微生物学报, 2015, 55(2): 220-226.
- MENG C, WANG T, XU ZZ, SHAN F, FAN F, CHEN X, JIAO XA. Immunogenicity evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* MPT83 protein and establishment of serological diagnostic method for bovine tuberculosis detection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(2): 220-226 (in Chinese).
- [7] AAGAARD C, GOVAERTS M, MEIKLE V, VALLECILLO AJ, GUTIERREZ-PABELLO JA, SUAREZ-GÜEMES F, McNAIR J, CATALDI A, ESPITIA C, ANDERSEN P, POLLOCK JM. 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]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(12): 4326-4335.
- [8] MÜLLER B, DÜRR S, ALONSO S, HATTENDORF J, LAISSE CJM, PARSONS SDC, van HELDEN PD, ZINSSTAG J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans[J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(6): 899-908.
- [9] 李昕, 徐正中, 单法, 夏爱鸿, 孟闯, 沈也驰, 陈义平, 南文龙, 陈祥, 焦新安. 牛结核 γ -干扰素夹心 ELISA 检测试剂盒的研制与评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(12): 1060-1065.
- LI X, XU ZZ, SHAN F, XIA AH, MENG C, SHEN YC, CHEN YP, NAN WL, CHEN X, JIAO XA. Development and evaluation of gamma-interferon sandwich ELISA kit in herds infected with *Mycobacterium bovis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2017, 33(12): 1060-1065 (in Chinese).
- [10] KATALE BZ, MBUGI EV, KENDAL S, FYUMAGWA RD, KIBIKI GS, GODFREY-FAUSSETT P, KEYYU JD, van HELDEN P, MATEE MI. Bovine tuberculosis at the human-livestock-wildlife interface: is it a public health problem in Tanzania? A review[J]. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2012, 79(2): 1-8.
- [11] DOAN TN, EISEN DP, ROSE MT, SLACK A, STEARNES G, McBRYDE ES. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection: a latent-class analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188631.
- [12] SMITH K, KLEYNHANS L, WARREN RM, GOOSEN WJ, MILLER MA. Cell-mediated immunological biomarkers and their diagnostic application in livestock and wildlife infected with *Mycobacterium bovis*[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 639605.
- [13] 张成全, 陈祥, 牛中伟, 杨卫冲, 徐正中, 孟闯, 潘

- 志明, 黄金林, 焦新安. 重组牛 γ -干扰素单克隆抗体的研制[J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17(4): 15-19.
- ZHANG CQ, CHEN X, NIU ZW, YANG WC, XU ZZ, MENG C, PAN ZM, HUANG JL, JIAO XA. Development of monoclonal antibodies against recombinant bovine interferon-gamma[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2009, 17(4): 15-19 (in Chinese).
- [14] 解晓莉, 徐正中, 孟闯, 单锋丽, 单法, 陈祥, 焦新安. 梅花鹿 γ 干扰素双单抗夹心 ELISA 方法的初步建立[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(12): 989-992.
- XIE XL, XU ZZ, MENG C, SHAN FL, SHAN F, CHEN X, JIAO XA. Development of sandwich ELISA for the detection of cervine interferon-gamma[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(12): 989-992 (in Chinese).
- [15] PETRUCCIOLI E, CHIACCHIO T, PEPPONI I, VANINI V, URSO R, CUZZI G, BARCELLINI L, CIRILLO DM, PALMIERI F, IPPOLITO G, GOLETTI D. First characterization of the CD4 and CD8 T-cell responses to QuantiFERON-TB Plus[J]. The Journal of Infection, 2016, 73(6): 588-597.
- [16] LI G, LI F, ZHAO HM, WEN HL, LI HC, LI CL, JI P, XU P, WU K, HU ZD, LU SH, LOWRIE DB, LV JX, FAN XY. Evaluation of a new IFN- γ release assay for rapid diagnosis of active tuberculosis in a high-incidence setting[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 117.
- [17] MENG C, WAN T, XU ZZ, LIU Y, SHAN F, SUN L, YIN YL, CHEN X, JIAO XA. Screening putative antigens as stimulators in the *Mycobacterium bovis* interferon-gamma release assay for cattle[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2015, 168(1/2): 111-117.
- [18] BEZOS J, CASAL C, ROMERO B, SCHROEDER B, HARDEGGER R, RAEHER AJ, LÓPEZ L, RUEDA P, DOMÍNGUEZ L. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis[J]. Research in Veterinary Science, 2014, 97: S44-S52.
- [19] ESMAIL H, BARRY CE, YOUNG DB, WILKINSON RJ. The ongoing challenge of latent tuberculosis[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2014, 369(1645): 20130437.
- [20] 刘志勇, 李春芳, 董长兴, 李旭颖. 浅析牛结核病诊断方法及在疫病净化中的应用[J]. 农业技术与装备, 2022(7): 106-108.
- LIU ZY, LI CF, DONG CX, LI XY. The diagnostic method of bovine tuberculosis and its application in epidemic disease purification[J]. Agricultural Technology & Equipment, 2022(7): 106-108 (in Chinese).
- [21] BERTHET FX, RASMUSSEN PB, ROSENKRANDS I, ANDERSEN P, GICQUEL B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10)[J]. Microbiology (Reading, England), 1998, 144 (Pt 11): 3195-3203.
- [22] ANDERSEN P, ANDERSEN AB, SØRENSEN AL, NAGAI S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950), 1995, 154(7): 3359-3372.
- [23] DILLON DC, ALDERSON MR, DAY CH, BEMENT T, CAMPOS-NETO A, SKEIKY YA, VEDVICK T, BADARO R, REED SG, HOUGHTON R. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(9): 3285-3290.
- [24] MUNK ME, AREND SM, BROCK I, OTTENHOFF THM, ANDERSEN P. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2001, 183(1): 175-176.
- [25] 申峻松. 结核分枝杆菌 *lhp* 基因的原核表达及其产物的单克隆抗体研制[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2008.
- SHEN JS. Prokaryotic expression of *lhp* gene of *Mycobacterium tuberculosis* and preparation of monoclonal antibody against its product[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2008 (in Chinese).
- [26] 徐正中, 沈轩云, 朱兆成, 夏爱鸿, 陈祥, 焦新安. 牛干扰素诱导蛋白-10 单克隆抗体的制备及其流式检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(9): 959-964.
- XU ZZ, SHEN XY, ZHU ZC, XIA AH, CHEN X, JIAO XA. Preparation of monoclonal antibody against bovine interferon-inducible protein-10 and establishment of detection method based on flow cytometry[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(9): 959-964 (in Chinese).
- [27] 李少晗, 崔尚金, 秦彤. 牛结核病流行现状与诊断技术研究[J]. 中国奶牛, 2020(10): 38-41.
- LI SH, CUI SJ, QIN T. Study on prevalence and diagnostic techniques of bovine tuberculosis[J]. China

- Dairy Cattle, 2020(10): 38-41 (in Chinese).
- [28] KHALID H, van HOOIJ A, CONNELLEY TK, GELUK A, HOPE JC. Protein levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines as biomarkers of *Mycobacterium bovis* infection and BCG vaccination in cattle[J]. Pathogens, 2022, 11(7): 738.
- [29] CASAL C, DÍEZ-GUERRIER A, ÁLVAREZ J, RODRIGUEZ-CAMPOS S, MATEOS A, LINSKOTT R, MARTEL E, LAWRENCE JC, WHELAN C, CLARKE J, O'BRIEN A, DOMÍNGUEZ L, ARANAZ A. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 170(3/4): 342-351.
- [30] 万洋. 奶牛结核病诊断与防控[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(17): 133-134.
- YANG W. Diagnosis and control of tuberculosis in dairy cattle[J]. Graziery Veterinary Sciences (Electronic Version), 2019(17): 133-134 (in Chinese).
- [31] 李明, 张雅娜, 林伟东, 隋修锐, 贾红, 侯绍华, 姜一瞳, 房立春, 朱鸿飞, 鑫婷. 牛分枝杆菌 PPE68 与 Mb1230 以及 PPE57 和 PE-PGRS35 的表达纯化及其在牛结核病血清学诊断中的初步应用[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(1): 20-28.
- LI M, ZHANG YN, LIN WD, SUI XK, JIA H, HOU SH, JIANG YT, FANG LC, ZHU HF, XIN T. Expression and purification of *Mycobacterium bovis* PPE68, Mb1230, PPE57 and PE-PGRS35 and their preliminary application in the serodiagnosis of bovine tuberculosis[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(1): 20-28 (in Chinese).
- [32] MANCA C, LYASHCHENKO K, WIKER HG, USAI D, COLANGELI R, GENNARO ML. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(1): 16-23.
- [33] MARASSI CD, McNAIR J, POLLOCK J, RISTOW P, FONSECA LS, OELEMANN WMR, LILENBAUM W. The use of MPB70 and MPB83 to distinguish between bovine tuberculosis and paratuberculosis[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2010, 33(6): 485-489.
- [34] REDCHUK TA, KOROTKEVICH NV, KABERNIUK AA, OLIINYK ES, LABYNTSEV AY, ROMANIUK SI, KOLIBO DV, BUSOL VA, KOMISARENKO SV. Statistical analysis of the distribution of the antibody levels to *Mycobacterium bovis* antigens for bovine tuberculosis diagnostics[J]. Cytology and Genetics, 2010, 44(5): 280-285.
- [35] CASAL C, INFANTES JA, RISALDE MA, DÍEZ-GUERRIER A, DOMÍNGUEZ M, MORENO I, ROMERO B, de JUAN L, SÁEZ JL, JUSTE R, GORTÁZAR C, DOMÍNGUEZ L, BEZOS J. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle[J]. Research in Veterinary Science, 2017, 112: 214-221.
- [36] TROST B, STUBER T, SURUJBALLI O, NELSON J, ROBBE-AUSTERMAN S, SMITH NH, DESAUTELS L, TIKOO SK, GRIEBEL P. Investigation of the cause of geographic disparities in IDEXX ELISA sensitivity in serum samples from *Mycobacterium bovis*-infected cattle[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 22763.
- [37] WHELAN C, SHURALEV E, KWOK HF, KENNY K, DUIGNAN A, GOOD M, DAVIS WC, CLARKE J. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(3): 499-503.
- [38] XU ZZ, HU T, XIA AH, LI X, LIU Z, MIN JJ, HE JJ, MENG C, YIN YL, CHEN X, JIAO XA. Generation of monoclonal antibodies against Ag85A antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and application in a competitive ELISA for serodiagnosis of bovine tuberculosis[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2017, 4: 107.
- [39] WU XQ, YANG YR, ZHANG JX, LI BY, LIANG Y, ZHANG CY, DONG M, CHENG HB, HE JF. Humoral immune responses against the *Mycobacterium tuberculosis* 38-kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in tuberculosis[J]. Clinical and Vaccine Immunology: CVI, 2010, 17(3): 372-375.
- [40] HILL PC, JACKSON-SILLAH D, FOX A, FRANKEN KLMC, LUGOS MD, JEFFRIES DJ, DONKOR SA, HAMMOND AS, ADEGBOLA RA, OTTENHOFF THM, KLEIN MR, BROOKES RH. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection by *ex vivo* enzyme-linked immunospot assay in the Gambia[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(5): 2070-2074.