DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.013

结核分枝杆菌重组 38kD 蛋白用于新疆南疆维吾尔族和湖南湘中汉族血清学诊断的研究

杨忠华[1] 谭卫华[1] 陈 伟[2] 刘 艳[3] 袁 俐[4]

（1 湖南省涟源市人民医院检验科 湖南 涟源 417100；2 湖南省娄底市中心医院检验科 湖南 娄底 417000；3 湖南省娄底市妇幼保健医院检验科 湖南 娄底 417000；4 石河子大学民族与地方高发病教育部重点实验室 新疆 石河子 832000）

摘要 目的：对结核分枝杆菌 38kD 蛋白编码基因进行克隆表达及纯化，建立基于重组 38 kD 蛋白的酶联免疫吸附法(ELISA)检测结核病人血清标本，评价重组 38 kD 蛋白用于结核病血清学诊断抗原的价值。并比较分析其在汉族和维吾尔族人群中的血清学诊断的差异。**方法：**用 PCR 方法扩增 38 kD 蛋白的编码基因，构建重组质粒，转化到大肠杆菌 BL21 中，经 IPTG 诱导表达，得到纯化的 38 kD 蛋白，建立以 38 kD 蛋白为包被抗原的 ELISA，并检测临床确诊的结核病人血清标本。**结果：**ELISA 检测结核病患者血清标本的维吾尔族阳性率为 34%(52/153)，汉族为 52.4%(65/124)，两者对比有统计学差异(X^2= 9.538，P< 0.005)。在阴性对照中的维吾尔族特异度为 96.4%(159/165)，汉族为 98. 8%(130/133)，结果无统计学意义(X^2= 0.111，P> 0.5)。**结论：**重组 38kD 蛋白用于血清学诊断的敏感度在维吾尔族和汉族中有差异，而其诊断特异度无差别。

关键词：结核分枝杆菌；38kD 蛋白；血清学诊断

中图分类号：R378.911，Q75 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2014)03-448-03

The Serodiagnosis of Recombinant 38kD Protein from Mycobacterium Tuberculosis between the Uygur nationality from the South of Sinkiang and the Nan Nationality from the Middle of Hunan

YANG Zhong-hua[1], TAN Wei-hua[1], CHEN Wei[2], LIU Yan[3], YUAN Li[4]

(1 Department of Laboratory Medicine, the people's hospital of lian yuan of hunan, Lianyuan, Hunan, 417100, China;

2 Department of Laboratory Medicine, Loudi Municipal Central Hospital of hunan, Loudi, Hunan, 417000, China;

3 Department of Laboratory Medicine,The Maternal and Child Health Hospital of Loudi, Loudi, Hunan, 417000, China;

4 Ministry of Education Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Disease, Shihezi, Xinjiang, 832000, China)

ABSTRACT Objective: The encoding gene 38 kD protein of Mycobacterium tuberculosis was cloned, expressed and purified. Established the ELISA assay with recombinant 38kD protein for detecting the specific antibodies in serum samples of patients and evaluating the value of recombinant 38kD protein for diagnose the tuberculosis. Analysis the variability was analyzed by comparing the Han nationality to the Uygur nationality. **Methods:** Amplify the piece of genes coding 38 kD by PCR was amplified, Recombinant plasmid was constructed, then transformed into *E coli* BL21 strain, and induced by IPTG. The purified 38KD protein was obtained and established ELISA assay with 38kD protein as the coating antigen and used to detecting blood serum from the TB patients. **Results:** The positive rate of Uygurnationality is 34%(52/153), and Han nationality is 52.4%(65/124), the result have statistical significance.The specificity of Uygur nationality is 96.4%(159/165), and Han nationality is 98.8%(130/133), the result has not statistical significance. **Conclusion:** The sensitivity of recombinant 38 kD protein using serodiagnosis have statistical significance compare the Han nationality to the Uygur nationality and the specificity haven't difference.

Key words: Mycobacterium tuberculosise; Protein 38 kD; Serodiagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R378.911，Q75 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)03-448-03

前言

由结核分枝杆菌引起的结核病是世界上主要的传染病之一，全世界每年有 500 至 800 万新发结核病例。而近年来随着耐药和耐多药结核的不断出现，以及结核与人类免疫缺陷病毒的合并感染，结核病疫情愈发严峻，成为当前严重危害人类健康的公共卫生问题之一[1]。而目前临床上对结核病检出率较低，在我国有近 2/3 的活动性结核病患者及 3/5 的涂阳患者未被发现，从而导致病人延误治疗和结核病的耐药率逐年上升，因此早期诊断和早期治疗对控制耐药结核病的蔓延至关重要[2]。目前医疗机构的诊断方法主要依靠细菌学和血清学检查。细菌学检查是结核病确诊的金标准，但阳性率很低，通常只能达到 20%-40%，血清学方法具有简单、快速、廉价且不需要特殊仪器

作者简介：杨忠华(1976-)，男，主管检验师，本科，主要研究方向：感染免疫

（收稿日期：2013-06-05 接受日期：2013-06-30）

的优点,对痰涂片阴性的肺结核、肺外结核及不易获得痰标本的儿童结核的诊断具有重要价值,但是目前应用于临床的血清学指标特异性不高,且假阳性率较高,对临床上诊断结核带来一定的困难[3]。近年来随着基因重组与蛋白纯化技术的不断发展,已经有 20 多种蛋白抗原和菌体抗原被纯化并应用于研究与临床诊断,其诊断的敏感度和特异度显著提高[4,5]。本实验拟通过基因克隆、表达及纯化结核分枝杆菌特异的 38kD 蛋白,分析其在结核病血清学诊断方面的价值。目前国内外对结核病血清学的研究主要集中在对其特异度和敏感度的研究上,对不同地域和不同民族之间的对比研究较少,本研究拟通过比较在新疆维吾尔族与湘中汉族病例中的敏感度和特异度来探讨 38 kD 重组蛋白在不同民族和不同地域之间的差异。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

结核分枝杆菌标准株 H37Rv、质粒 pET-30a 由中国药品生物制品检定所菌苗室提供。大肠杆菌 BL21 购自天根生物科技有限公司。153 份维吾尔族结核病患者和 165 份健康对照血清标本采自新疆南疆阿克苏地区和喀什地区;124 份汉族结核患者和 133 份健康对照血清标本采自湖南娄底地区。

1.2 酶和试剂

限制性核酸内切酶、DNA Marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶 (2.5U/μL)、T4 DNA 连接酶、异丙基-β -D- 硫代半乳糖苷(IPTG)、Ni-NTA Agarose 试剂盒均购自天根生化(北京)科技有限公司;卡那霉素(Kan)购自中国药品生物制品检定所;牛血清白蛋白(BSA)、辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自美国 Sigma 公司;引物合成及重组质粒目的基因测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。PowerWave XS-2 吸光度检测仪购自 BioTek 公司。

1.3 表达载体的建立

通过 GenBank 查找 38kD 蛋白编码基因 (Psts1) 序列,primer5.0 软件设计引物,合成引物,引物序列:P1:5'-CATGC-CATGGAAATTCGTTTGCATACGC-3',P2:5'-CCGGAATTCG CTGGAAATCGTCGC-3',5' 端含有 NcoI 酶切位点,3' 端含有 EcoRI 酶切位点,扩增体系:H_2O 18.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,dNTP 1 μL,Buffer 2.0 μL,Taq 酶 0.5 μL,模板 2 μL。PCR 反应循环参数:94℃ 5min;94℃ 30s, 62℃ 40s, 72℃ 30s, 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。回收 PCR 产物,将产物及表达载体质粒 pET-30a 分别用 *Nco*I、*Eco*RI 双酶切,T4 连接酶连接 PCR 产物和载体质粒,转化至大肠杆菌 BL21,涂布于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养平皿中,37℃ 培养过夜,筛选出阳性菌落,送公司测序。

1.4 目的蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳

将含 38 kD 基因片段载体质粒的大肠杆菌接种于含有 50 mg / L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养至 D600 为 0.6 左右,加 IPTG 使其终浓度为 1 mmol / L,37℃ 诱导表达 3～4 h,收集菌体,进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。选 38kD 处有明显蛋白表达的菌株测序分析。

1.5 重组蛋白 Western-blot 检测

将 SDS-PAGE 中的重组蛋白转印至 NC 膜上,用 West-ern-Blot 膜封闭液封闭,37℃ 温育 1 h 后 TBST 洗涤 3 次(每次 10 min),加入 1:1000 稀释的小鼠抗 His 单克隆抗体,37℃ 温育 1h;TBST 洗涤 3 次(每次 10 min),加入 1∶ 500 稀释的辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠 IgG,作用 1 h,TBST 洗涤 3 次(每次 10 min),加入 DAB 底物显色液进行显色反应,加蒸溜水终止反应。

1.6 重组蛋白的纯化

重组蛋白纯化采用天根生物公司的 Ni-NTA Agarose 试剂盒。加入 5 mL Buffer B 于沉淀的菌体中,混匀后 4℃ 超声破碎。12000 r/min 离心 30 min,收集上清液,加入到 Buffer B 平衡过的 Ni-NTA 琼脂糖珠中,4℃ 轻柔震荡 30 min 后用漂洗缓冲液 Buffer C、D 依次清洗 Ni-NTA 琼脂糖珠;最后用 Buffer E 对 Ni-NTA 琼脂糖珠进行洗脱,收集洗脱液,进行 SDS-PAGE 电泳检测。纯化后的目的蛋白放入含尿素的 PBS 中透析,复性蛋白。

1.7 重组蛋白酶联免疫吸附试验

取纯化的重组 38kD 蛋白用包被液 1:500 倍稀释后加入酶标反应板中,每孔 100 μL,37℃ 水浴 1 h 后放 4℃ 过夜,用磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤 3 次;每孔加入 300 μL 封闭液,37℃ 温育 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次;每孔加入 100 μL 稀释的待检血清,37℃ 温育 1 h 后 PBST 洗涤 3 次;每孔加入 100 μL 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体(对照孔不加),37℃ 温育 1 h 后 PBST 洗涤 3 次;每孔加入 100 μL 新鲜配置的底物液,37℃ 避光温育 30 min,最后每孔加入 50 μL 终止液终止反应,用酶标仪在 450nm 波长下检测各孔 OD 值。结果判定如下:

阳性:(标本 OD 值)/(阴性对照 OD 值)≥ 2.1

阴性:(标本 OD 值)/(阴性对照 OD 值)< 2.1

2 结果

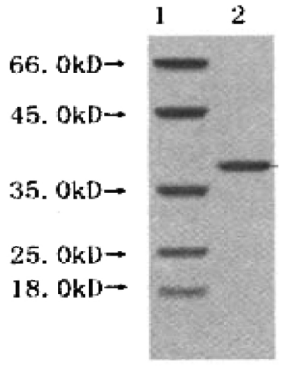

图 1 重组 38kD 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of recombinant 38kD protein

(1: the marker 2: recombinant 38kD protein)

3 讨论

近年来,随着基因测序、克隆、表达及蛋白纯化等分子生物学技术的发展,许多结核分枝杆菌的特异度抗原被用于结核病的血清学诊断研究。由 psts1 基因编码的 38kD 蛋白是一种磷酸盐转运蛋白(属于结核菌的膜蛋白),与结核分枝杆菌磷酸盐特异度转运系统有关。38kD 蛋白是一种脂蛋白,占早期分泌蛋白的 10%,结核病患者体内抗 38kD 蛋白抗体水平较高[6]。该蛋

表 1 重组 38kD 蛋白 ELISA 检测血清标本结果

Table1 The result of serum specimen of recombinant 38kD protein by ELISA

	敏感度 (Sensitivity)[a]	特异度 (Specificity)[b]
维吾尔族(Uygur nationality)	34%(52/153)	96.4%(159/165)
汉族(Han nationality)	52.4%(65/124)	98.8%(130/133)

* 注:a 重组 38kD 蛋白的诊断敏感度在维吾尔族和汉族病例中有差异($X^2=9.538$,$P<0.005$);

b 重组 38kD 蛋白的诊断特异度在维吾尔族和汉族健康对照中没有差异($X^2=0.111$,$P>0.5$)。

*Note: a The sensitivity of recombinant 38 kD protein using serodiagnosis have statistical significance compare the Han nationality to the Uygur nationality;

b The specificity of recombinant 38 kD protein using serodiagnosis haven't statistical significance compare the Han nationality to the Uygur nationality.

白含有特异的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞抗原决定簇,对小鼠、豚鼠和人类 B 细胞具有免疫优势,能诱导早期反应。38kD 蛋白广泛用于结核病的血清学诊断试验,检测的敏感度和特异度均较高。国内外研究表明 38kD 的诊断特异度在 88%-100%之间,痰检阳性病人诊断敏感度为 36%-89%,痰检阴性病人敏感度为 16%-54%、肺外结核诊断敏感度为 12%-56%[7]。张萍等[8]研究重组 38kD 蛋白用于结核病血清学诊断,结果表明:重组 38kD 蛋白检测结核病的敏感度为 65.5%,特异度为 98.4%,且与痰检阳性的一致率为 69.8%。

本研究中重组 38kD 蛋白用于血清学诊断的敏感度和特异度与国内外的报道一致,维吾尔族病例中的敏感度和特异度分别为:34%和 96.4%,汉族病例中的敏感度和特异度分别为:52.4%和 98.8%。对比重组 38kD 蛋白诊断的敏感度,发现维吾尔族病例中的诊断敏感度低于汉族($X^2=9.538$,$P<0.005$)。而其诊断的特异度在维吾尔族和汉族中没有差异($X^2=0.111$,$P>0.5$)。1995 年 Van Soolingen 等[9]首次发现中国独特的北京基因型菌株,在其后 10 多年北京基因型菌株迅速在世界范围内传播,已达到全球分离结核菌株的 13%,全世界约有 1/3 的结核病由北京基因型菌株引起[10]。在我国,北京家族基因型是主要的流行菌株,而吴长东等报道新疆维吾尔族中北京基因型菌株感染率低于汉族[11]。在本文作者的前期研究中发现北京基因型菌株 38kD 蛋白编码基因表达量低于非北京基因型菌株[12],国外 Pheiffer 等[13]也发现北京基因型菌株中的 38kD 蛋白表达显著减少。新疆南疆维吾尔族结核病患者中 38kD 蛋白诊断的敏感度低于湘中汉族是否与北京基因型菌株的流行情况有关有待进一步的研究。

由于结核分枝杆菌抗原多且复杂,在宿主体内表达的数量、种类及时机随个体的免疫背景和身体状况而不同,从而表现出不同的抗体谱。抗原免疫识别在不同的病人之间是随机变化的,没有一种单独的抗原能被所有的病人或大多数病人所识别。综合目前已经获得了 20 多种结核分枝杆菌重组蛋白进行的研究表明,尚无任何一种用于 ELISA 检测的敏感度能达到 100 %,不同的病人需用不同的抗原进行检测,国外学者研究发现联合 32kDa 蛋白、ESAT-6 和 CFP-10 显著提高了结核病病人的诊断效率[14,15]。因此由多种具有敏感度高和特异度强的抗原组成混合抗原作为结核病血清学诊断试剂是今后的研究趋势[12]。

参 考 文 献(References)

[1] World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, finances[R]. WHO Report, 2006

[2] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2002, 24(2): 65-108
National Technical Steering Group the Epidemiological Sampling Survey for Tubercuulosis Office. Report on nationwide random survey for the epidemiology of tuberculosis in 2000[J]. The journal of the chinese antituberculosis association, 2002, 24(2): 65-108

[3] 刘艳, 杨忠华, 姜路明. 结核分枝杆菌蛋白抗原的研究进展[J].现代生物医学进展, 2010, 10(24): 4792-4795
Liu Yan, Yang Zhong-hua, Jiang Lu-ming. Research on Protein Antigens of Mycobacterium Tuberculosis [J]. Progress in modern biomedicine, 2010, 10(24): 4792-4795

[4] 王甦民.应重视结核病的实验诊断[J].中华检验医学杂志, 2005, 28(8): 769-770
Wang Su-min. Pay more attention to laboratory diagnosis of tuberculosis [J]. Chinese Journal of Laoratory Medicine, 2005, 28(8): 769-770

[5] Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, et al. Progress in serodiagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection [J]. Scan J Immunol, 2007, 66(1): 176-191

[6] Zielonka TM. Duties of physicians and other medical personnel connected with diagnosis, treatment, dissemination of information, assessment and registration of TB patients[J]. Wiadomosci Lekarskie, 2011, 64(3): 239-250

[7] Esther Julian, Lurdes Matas, Jose Alcaide, et a1. Comparison of antibody responses to a potential combination of specific Glycolipids and proteins for test sensi tivity improvement in tuberculosis serodiagnosis [J]. Clinicl and Diagnosistic Laboratory Immunology, 2004, 11(1): 70-76

[8] 张萍, 曾肖芃, 丁建祖,等. 结核杆菌可溶性细胞壁抗原与重组 38Kd 蛋白用于结核病血清学诊断的价值 [J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(1): 73-74
Zhang Ping, Zeng Xiao-fan, Ding Jian-zhu, et al. Evaluation of the cell wall antigen and recombinant 38Kd protein of Mycobacterium tuberculosis for serodiagnostic tests [J]. Chinese Journal of Microecology, 2009, 21(1): 73-74

[9] Van Soolingen D, Qian L, De Haas PE. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(12): 3234-3238

[10] 沈鑫, 梅建, 高谦. 结核病分子流行病学研究进展[J].中华结核与呼吸杂志, 2006, 29(2): 118-120
Shen Xin, Mei Jian, Gao Qian. Advances in the study of molecular epidemiology of tuberculosis[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory diseases, 2006, 29(2): 118-120

(下转第 460 页)

Electrophysiol, 2009, 2: 626-633

[7] Bertaglia E, Zoppo F, Tondo C, et al. Early complications of pulmonary vein catheter ablation for atrial brillation: A multicenter prospective registry on procedural safety[J]. Heart Rhythm, 2007, 4: 1 265-1271

[8] Cappato R, Calkins H, Chen SA, et al. Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial ? brillation [J]. Circulation, 2005, 111: 1100-1105

[9] Holmes DR, Monahan KH, Packer D. Pulmonary vein stenosis complicating ablation for atrial fibrillation: clinical spectrum and interventional considerations [J]. J Am Coll Cardiol Cardiovasc Interv, 2009, 2: 267-276

[10] Arentz T, Jander N, Von Rosenthal J, et al. Incidence of pulmonary vein stenosis 2 years after radiofrequency catheter ablation of refractory atrial fibrillation[J]. Eur Heart J, 2003, 24: 963-969

[11] Neumann T, Kuniss M, Conradi G, et al. Pulmonary vein stenting for the treatment of acquired severe pulmonary vein stenosis after pulmonary vein isolation: clinical implications after long-term follow-up of 4 years[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2009, 20: 251-2 57

[12] Steliga MA, Ghouri M, Massumi A, et al. Lobectomy for pulmonary vein occlusion secondary to radiofrequency ablation [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2010, 21: 1055-1058

[13] Saad EB, Rossillo A, Saad CP, Martin DO, et al. Pulmonary vein stenosis after radiofrequency ablation of atrial ?brillation. Functional characterization, evolution, and influence of the ablation strategy [J]. Circulation, 2003, 107: 2710-2716

[14] Baranowski B, Saliba W. Our approach to management of patients with pulmonary vein stenosis following AF ablation [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2011, 22(3): 364-367

[15] De Potter TJ, Schmidt B, Chun KR, et al. Drug-eluting stents for the treatment of pulmonary vein stenosis after atrial fibrillation ablation [J]. Europace, 2011, 13(1): 57-61

[16] Nehra D, Liberman M, Vagefi PA, et al. Complete pulmonary venous occlusion after radiofrequency ablation for atrial fibrillation [J]. Ann Thorac Surg, 2009, 87(1): 291-295

[17] Barrett CD, Di Biase L, Natale A. How to identify and treat patient with pulmonary vein stenosis post atrial fibrillation ablation [J]. Curr Opin Cardiol, 2009, 24(1): 42-49

[18] Baman TS, Jongnarangsin K, Chugh A, et al. Prevalence and predictors of complications of radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2011, 22(6): 626-631

[19] Di Biase L, Wang Y, Horton R, et al. Ablation of atrial fibrillation utilizing robotic catheter navigation in comparison to manual navigation and ablation: single-center experience [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2009, 20(12): 1328-1335

[20] Caponi D, Corleto A, Scaglione M, et al. Ablation of atrial fibrillation: does the addition of three-dimensional magnetic resonance imaging of the left atrium to electroanatomic mapping improve the clinical outcome?: a randomized comparison of Carto-Merge vs. Carto-XP three-dimensional mapping ablation in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation [J]. Europace, 2010, 12(8): 1098-1104

[21] Stabile G, Scaglione M, del Greco M, et al. Reduced fluoroscopy exposure during ablation of atrial fibrillation using a novel electroanatomical navigation system: a multicentre experience [J]. Europace, 2012, 14(1): 60-65

[22] Bai R, DI Biase L, Valderrabano M, et al. Worldwide experience with the robotic navigation system in catheter ablation of atrial fibrillation: methodology, efficacy and safety [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2012, 23(8): 820-826

[23] Lorgat F, Pudney E, van Deventer H, et al. Robotically controlled ablation for atrial fibrillation: the first real-world experience in Africa with the Hansen robotic system [J]. Cardiovasc J Afr, 2012, 23(5): 274-280

[24] De Greef Y, Tavernier R, Raeymaeckers S, et al. Prevalence, characteristics, and predictors of pulmonary vein narrowing after isolation using the pulmonary vein ablation catheter [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2012, 5(1): 52-60

（上接第 450 页）

[11] 吴长东, 米利古, 龚天美, 等. RD105 缺失基因检测法用于结核分枝杆菌新疆“北京家族”临床分离株的鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(3): 161-163

Wu Chang-dong, Mi Li-gu, Gong Tian-mei, et al . Identification of the "Beijing family" strains of clinically isolated Mycobacterium tuberculosis in Xinjiang using an RD105 deletion test [J]. Journal of Pathogen Biology, 2010, 5(3): 161-163

[12] 陈伟, 王远志, 李永祥, 等. qRT-PCR 检测结核分枝杆菌蛋白抗原编码基因表达水平[J]. 中国实验诊断学杂志, 2011, 15(9): 1359-13 63

Chen Wei, Wang Yuan-zhi, Li Yong-xiang, et al. The coding gene’s expression level of proteantigen in Mycobacterium tuberculosis by qRT-PCR[J]. Journal of Pathogen Biology, 2011, 15(9): 1359-1363

[13] Pheiffer C, Betts JC, Flynn HR, et al. Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and Mycobacterium tuberculosis H37Rv[J]. Microbiology, 2005, 151(4): 1139-1150

[14] 李香兰, 李建行, 张广宇, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白及血清学诊断应用前景[J]. 中国防痨杂志, 2006, 28(5): 313-316

Li Xiang-lan, Li Jian-xing, Zhang Guang-yu, et al. The application of serodiagnosis from the excrete protein of Mycobacterium tuberculosise [J]. The Journal of The Chinese Antituberculosis Association, 2006, 28(5): 313-316

[15] Kumar G, Dagur PK, Singh PK, et al. Serodiagnostic efficacy of Mycobacterium tuberculosis 30/32-kDa mycolyl transferase complex, ESAT-6, and CFP-10 in patients with active tuberculosis [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2010, 58(1): 57-65