

Use of Low Molecular Weight Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* as a New Skin Test for Specific Diagnosis of Tuberculosis

Davoud Sadegh Garizi¹, Nader Mosavari^{2*}

¹Biology Research Center,
Faculty & Institute of Basic
Sciences, Imam Hossein
University, Tehran, Iran.

²Livestock Mycobacteria
Reference Laboratory, Razi
Vaccine & Serum Research
Institute, Agricultural
Research, Education &
Extension Organization
(TAT), Karaj, Iran.

*Corresponding Author:
Nader Mosavari, Livestock
Mycobacteria Reference
Laboratory, Razi Vaccine &
Serum Research Institute,
Agricultural Research,
Education & Extension
Organization (TAT), Karaj,
Iran.

Email:
n.mosavari@rvsri.ac.ir

Received: 5 May, 2016

Accepted: 14 Sep, 2016

Abstract

Background and Objectives: Tuberculosis (TB) is an infectious disease and about one-third of the world population are infected with latent TB infection. Active TB infection may develop in 5 to 10 percent of individuals with latent infection; therefore, detection of latent infection is of great importance in the control of the disease. The aim of this study was to develop a specific skin test based on low molecular weight proteins secreted by *M. tuberculosis* for detection of *M. tuberculosis* infection.

Methods: At this study, after extraction of secreted proteins from short-term culture filtrate of *M. tuberculosis*, low molecular weight proteins, were purified by Sephadex-G75 gel chromatography. For skin test, several groups of guinea pigs were sensitized with *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, and *M. avium* strains, and then skin test were performed using purified proteins and PPD.

Results: According to skin test data, unlike PPD, purified proteins showed a positive response in animals exposed to *M. tuberculosis*, but no significant skin responses were observed in the guinea pigs sensitized with *M. bovis* BCG and *M. avium* strains.

Conclusion: The results of this study demonstrated that new skin test is specific compared to PPD in the detection of *M. tuberculosis* infection, and could be replaced as a more specific skin test for detection of TB in large animals or human.

Keywords: Skin tests; Tuberculosis; Tuberculosis-diagnosis.

استفاده از آنتی ژن های وزن مولکولی پایین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان یک تست پوستی جدید جهت تشخیص اختصاصی سل

داود صادقی گاریز^۱، نادر مصوری^{۲*}

چکیده

زمینه و هدف: سل یک بیماری عفونی است و در حدود یک سوم مردم دنیا به عفونت نهفته سل آلوده اند. عفونت سل فعال ممکن است در ۱۰-۵٪ از افراد مبتلا به عفونت نهفته ایجاد شود؛ بنابراین تشخیص عفونت نهفته در کنترل بیماری بسیار مهم است. هدف از این مطالعه تولید یک تست پوستی اختصاصی برپایه پروتئین هایی با وزن مولکولی پایین مترشح از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جهت تشخیص عفونت این باکتری بود.

روش بررسی: در این مطالعه پس از استخراج پروتئین های مترشح در فیلترای کشت کوتاه مدت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پروتئین های دارای وزن مولکولی پایین به وسیله کروماتوگرافی ژلی سفادکس-۷۵ خالص سازی شدند. برای انجام تست پوستی، چندین گروه کوچک هندی به وسیله سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم اوویوم حساس سازی شدند و تست پوستی با پروتئین های خالص شده و PPD بر روی آنها انجام شد.

یافته ها: براساس داده های آزمون پوستی، برخلاف PPD، پروتئین های خالص شده پاسخ مثبتی را نسبت به حیواناتی که در معرض مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قرار گرفتند نشان دادند، ولی هیچ پاسخ پوستی قابل توجهی در کوچک های حساس با مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم اوویوم مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد تست پوستی جدید در مقایسه با PPD برای تشخیص آلودگی به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اختصاصی است و می تواند به عنوان یک تست پوستی اختصاصی تر برای تشخیص سل در حیوانات بزرگتر یا انسان جایگزین شود.

کلید واژه ها: تست های پوستی؛ سل؛ سل - تشخیص.

^۱مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

^۲آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم های بیماریزای دام، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

نادر مصوری، آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم های بیماریزای دام، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

n.mosavari@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۳

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Sadeghi Gariz D, Mosavari N. Use of low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* as a new skin test for specific diagnosis of tuberculosis. Qom Univ Med Sci J 2018;12(1):63-71. [Full Text in Persian]

مقدمه

بیماری سل یا توبرکلوز (Tuberculosis, TB)، یک بیماری با انتشار جهانی است. این بیماری عفونی، بسیار مسری بوده و به راحتی قابل انتقال از شخصی به شخص دیگر می‌باشد. طبق بررسی‌ها، یک سوم جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده‌اند (۱) هرچند بسیاری از این عفونت‌ها به صورت نهفته هستند، ولی حدود یک‌دهم آنها در نهایت، به سل آشکار تبدیل شده و اگر بدون معالجه رها شوند بیش از نیمی از آنها منجر به مرگ می‌شود. پیشگیری (کنترل، بهداشت و واکسیناسیون بر ضدبیماری) و تشخیص به موقع بیماری (با استفاده از تکنیک‌های تزریق تست توبرکولین، کشت و تکنیک‌های مبتنی بر ژنوم)، بهترین شیوه مبارزه با سل است. واکسن BCG تنها واکسن ضد سل بوده که به طور گسترده در بیشتر کشورها از جمله ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. واکسن BCG می‌تواند از گستردگی بیماری سل جلوگیری کند، ولی نمی‌تواند ایمنی کاملی را در افراد برای جلوگیری از بیماری سل ایجاد کند (۲). در کشور تست توبرکولین در مراکز بهداشتی تزریق می‌شود، ولی این تست دارای واکنش‌های متقاطع در افراد آلوده به مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس و افرادی که واکسن BCG دریافت کرده‌اند می‌باشد، لذا تزریق واکسن فوق در بدو تولد به کودک، تشخیص بیماری را دچار مشکل می‌کند (۳، ۴). بنابراین، استفاده از ترکیبات جدید مختص گونه بیماریزا نیاز است تا بتواند در تشخیص عفونت نهفته به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به صورت اختصاصی عمل کند. تاکنون آنتی ژن‌های مختلفی در پروتئین‌های ترشحی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شده‌اند که قادرند به طور اختصاصی سیستم ایمنی سلولی را تحریک کنند. از این میان، می‌توان به آنتی ژن‌هایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۵ کیلودالتون اشاره کرد که تحریک کننده‌های قوی ترشح اینترفرون گاما بوده و شناخته شده‌ترین آنها از خانواده ESAT6 (یکی از پروتئین‌های ترشحی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس)، می‌باشد و نام ژن کدکننده آن esxA است که بر روی منطقه ژنومی RD-1 قرار دارد (۵). CFP10 نیز که شکل یک هتروداپمر ۱:۱ را با ESAT6 تشکیل می‌دهد و نقش یک چاپرون یا شبه چاپرون را برای ESAT6 بازی می‌کند؛ از پروتئین‌های ترشحی این منطقه ژنومی می‌باشد (۶).

منطقه ژنومی RD-1 در سویه‌های بیماریزای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم آفریکانوم حفظ شده و در سویه‌هایی مانند مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم آویوم موجود نیست (۷-۹).

با توجه به یافته‌های موجود در مورد اهمیت پروتئین‌های ترشحی سبک وزن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در القای پاسخ‌های ایمنی قوی و از طرفی، عدم وجود آن در سویه واکسینال BCG و مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس، ارزش این پروتئین‌ها در مطالعات تشخیصی مورد توجه قرار گرفته است (۱۴-۱۰)، لذا می‌توان آنها را به عنوان شاخصی در تشخیص افراد مبتلا به بیماری از افراد غیربیمار که واکسن BCG را دریافت کرده‌اند، مورد استفاده قرار داد (۱۷-۱۵). همچنین با توجه به آنتی ژنیستی بالای خانواده ESAT6، می‌توان آنها را به عنوان کاندیدی برای تست‌های تشخیصی وابسته به سلول T، نظیر تست‌های جلدی در نظر داشت و در تشخیص انواع عفونت‌های مزمن از آنها استفاده کرد (۱۲)، پاسخ آنتی‌بادی علیه آنها را نیز می‌توان در مطالعات تشخیصی مدنظر قرارداد (۱۸).

هدف از انجام این مطالعه بررسی تولید یک تست جدید به وسیله پروتئین‌های سبک وزن مترشحه از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جهت تشخیص سل با قابلیت تمایز بین خوکچه‌های واکسینه شده با واکسن BCG و آلوده به مایکوباکتریوم آویوم (به عنوان مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس) از خوکچه‌های آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود.

روش بررسی

در این تحقیق یک سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس DT (به شماره ATCC35810) از بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالئین مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، تهیه و بر روی محیط کشت جامد لونشتاین جانسون گلیسرین دار کشت داده شد. سپس باکتری از محیط کشت جامد با واسطه محیط دو فازي دورس هنلی - سیب زمینی، به محیط مایع دورس هنلی منتقل گردید.

بعد از ۶ هفته رشد باکتری بر روی محیط کشت مایع، ظرف فرناخ حاوی محیط کشت و باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد (جهت کشتن جرم باکتری) قرار گرفت (۱۹). سپس جرم باکتریایی پس از عبور محیط کشت مایع (حاوی پروتئین های ترشحی)، کاغذ صافی و فیلتر ۰/۲۲ میکرون حذف شد. جهت جداسازی پروتئین ها از محیط کشت مایع، از روش ترسیب با سولفات آمونیوم استفاده گردید؛ بدین ترتیب که ابتدا مقدار ۵۶۱ گرم سولفات آمونیوم به ازای هر لیتر از محیط کشت مایع به آن اضافه شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت محلول فوق در دمای ۴ درجه سانتیگراد هم زده شد. پس از آن محلول در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ و سوپرناتانت آن دور ریخته شد. در ادامه، به رسوب باقیمانده، تامپون فسفات ه اضافه و pH آن روی ۷ تنظیم گردید. نمک های موجود در محلول پروتئینی به وسیله دیالیز در آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت گرفته شد و حذف نمک از محلول پروتئینی با کانداکتومتر بررسی گردید. میزان غلظت پروتئین محلول با روش پروتئین سنجی لوری تعیین شد و قبل از انجام کروماتوگرافی، ابتدا محلول پروتئینی با استفاده از پلی اتیلن گلیکول تغلیظ گردید. برای خالص سازی پروتئین از ستون کروماتوگرافی (به ارتفاع ۱۵۰ سانتی متر، قطر ۲ سانتی متر با حجم پک شده ۴۷۰ میلی لیتر) استفاده شد. جهت انجام کروماتوگرافی از سفادکس G-75 به عنوان فاز ثابت و از آمونیوم استات ۰/۱ مولار به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. حجم محلول پروتئینی، ۵ میلی لیتر و غلظت آن ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. پس از انجام کروماتوگرافی، طیف جذبی محلول های پروتئینی جداسازی شده به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده و کروماتوگراف آن رسم گردید و به کمک کروماتوگراف، جداسازی فراکسیون ها صورت گرفت. سپس جهت تأیید جداسازی پروتئین های وزن مولکولی پایین، روش SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو به کار برده شد. در این مطالعه از مارکرهای Multicolor Low Renge Protein (ساخت شرکت Fermentas) استفاده شد.

در مرحله بعد، تعداد ۳۰ خوکچه نر (با وزن تقریبی ۷۰۰-۵۰۰ گرم) از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و جهت انجام حساس سازی، خوکچه ها در سه گروه ده تایی دسته بندی شدند.

تعداد ۱۰ خوکچه با مایکوباکتریوم آویوم سویه استاندارد D4 و ۱۰ خوکچه با مایکوباکتریوم بوویس سویه BCG و ۱۰ خوکچه با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (مقادیر مساوی مخلوطی از سویه های DT, C, PN) حساس سازی شدند. حساس سازی با تزریق ۰/۵ میلی لیتر از محلول حساس سازی (شامل ۴ میلی گرم از عصاره مایکوباکتریومی کشته شده در ۱ میلی لیتر پارافین مایع) به پشت عضله ران هر خوکچه انجام شد. پس از گذشت ۴۵ روز جهت انجام تست جلدی، پشت خوکچه ها از دو طرف موزدایی و حیوان آماده تزریق شد. در این مطالعه از توبرکولین انسانی تولیدی در مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی (به عنوان تست مرجع) و پروتئین های سبک وزن تخلیص شده (به عنوان تست تشخیصی جدید) استفاده گردید که سه غلظت ۱۰، ۲ و ۰/۴ میکروگرم بر میلی لیتر از هر تست تهیه شد (جهت رقیق سازی از تامپون فسفات توتین دار استفاده گردید). تزریق داخل جلدی از رقت های تهیه شده به صورت تصادفی (طبق جدول رندوم) نزدیک به مهره کمری خوکچه ها انجام گرفت. تزریقات با سرنگ انسولین و به صورت داخل جلدی انجام شد و میزان هر تزریق ۰/۱ میلی لیتر بود. ۲۴ ساعت پس از تزریق، واکنش پوستی حاصل از تزریق آنتی ژن ها که به صورت هاله ای قرمز در اطراف محل تزریق ایجاد شده بود، اندازه گیری و نتیجه برحسب میلی متر گزارش شد. میزان حساسیت تست تشخیصی جدید در مقایسه با توبرکولین انسانی برای خوکچه های حساس به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مقایسه با خوکچه های حساس شده با مایکوباکتریوم آویوم و مایکوباکتریوم بوویس BCG مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه گردید.

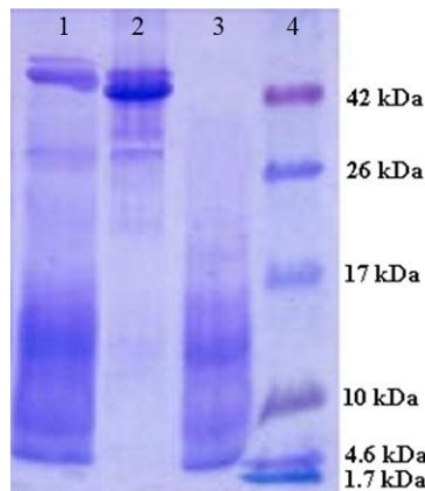
همچنین شاخص اختصاصیت (Specific Index) برای تست تشخیصی جدید در مقایسه با توبرکولین انسانی به دست آمد.

یافته ها

از شروع رشد باکتری بر روی محیط کشت جامد لونشتاین جانسون گلیسرین دار تا پایان رشد باکتری بر روی محیط کشت مایع دورس هنلی و ترشح پروتئین در محیط کشت مایع، حدود چهار ماه به طول انجامید.

پس از انجام کروماتوگرافی و رسم کروماتوگراف، دو پیک مشخص گردید. بررسی میزان پروتئین در هریک از فراکسیون‌ها نشان داد از مجموع کل ۷۵ میلی گرم پروتئین، در حدود ۱۴ میلی گرم پروتئین در فراکسیون ۱ و حدود ۴۹ میلی گرم پروتئین در فراکسیون ۲ (مجموعه پروتئین‌های دارای وزن مولکولی پایین مترشح از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) و در حدود ۱۲ میلی گرم پروتئین نیز حذف شده است.

بنابراین، ۳/۶۵٪ از مجموع پروتئین‌های ترشحاتی در محیط کشت مایع را پروتئین‌های دارای وزن مولکولی پایین تشکیل می‌داد. پس از انجام SDS-PAGE، خالص‌سازی پروتئین‌های وزن مولکولی پایین تأیید گردید و باندهای پروتئینی، نشان‌دهنده این بود که فراکسیون ۲ در محدوده زیر ۱۵ کیلودالتون می‌باشد، همچنین غلظت بالای پروتئین در محدوده ۱۴ کیلودالتون، همان کمپلکس پروتئینی ESAT6/CFP10 بود که از مهم‌ترین پروتئین‌های ترشحاتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس محسوب می‌شود (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: پروفایل پروتئین‌های مختلف خارج شده از ستون سفادکس G-75، با استفاده از SDS-PAGE و رنگ آمیزی کوماسی بلو (مختص پروتئین‌ها).
(۱) نمونه پروتئینی ترسیب شده با سولفات آمونیوم؛ (۲) فراکسیون ۱؛ (۳) فراکسیون ۲ و (۴) مارکر می‌باشد.

بیست و چهار ساعت پس از تزریق تست پوستی توبرکولین انسانی (به عنوان تست مرجع) و پروتئین‌های سبک وزن تخلیص شده (به عنوان تست تشخیصی جدید) بر روی

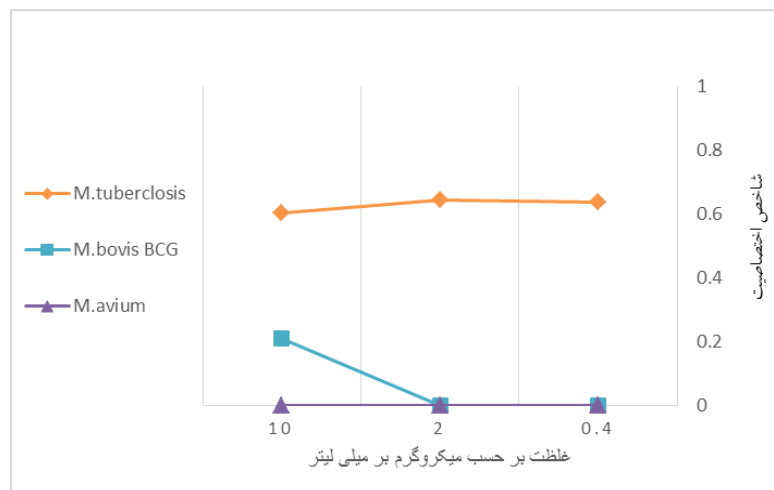
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم آویوم، هاله قرمز رنگ ایجاد شده در محل تزریق اندازه گیری و در جدول ثبت گردید.

جدول: بررسی میانگین قطر واکنش پوستی تست توبرکولین انسانی و تست پوستی جدید بر روی خوکچه‌های حساس با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس BCG و آویوم

گروه‌ها	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	تست پوستی توبرکولین	تست پوستی جدید
خوکچه‌های حساس با مایکوباکتریوم آویوم	۰/۴	۴/۷۵±۲/۱۲	-
	۲	۹/۵۰±۲/۸۳	-
	۱۰	۱۲/۲۰±۲/۷۷	۴/۱±۲/۱۲
خوکچه‌های حساس با مایکوباکتریوم بوویس BCG	۰/۴	۱۱/۳۰±۱/۹۲	-
	۲	۱۵/۰۵±۲/۶۵	-
	۱۰	۱۹/۲۰±۲/۰۳	-
خوکچه‌های حساس با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	۰/۴	۱۱/۰۵±۲/۳۶	۷/۰۵±۱/۴۸
	۲	۱۴/۵۵±۲/۶۰	۹/۳۵±۲/۳۸
	۱۰	۱۹/۴۵±۲/۱۵	۱۱/۷۰±۲/۲۱

با مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم آویوم، هاله قرمز رنگ خاصی در اطراف محل تزریق تست پوستی جدید مشاهده نشد و تنها در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر هاله‌ای با قطر ۴/۱ میلی متر مشاهده گردید که قابل چشم پوشی بود. میزان شاخص اختصاصیت تست پوستی جدید جهت تشخیص سویه‌های فوق با تقسیم میزان واکنش پوستی تست تشخیصی جدید به میزان واکنش پوستی تست توبرکلین انسانی بر روی هریک از خوکچه‌های حساس شده با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم آویوم به دست آمد (شکل شماره ۲).

طبق نتایج به دست آمده در رابطه با تست پوستی توبرکلین، بیشترین قطر هاله‌ها مربوط به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر توبرکلین انسانی با میانگین ۱۹/۴۵ میلی متر برای خوکچه‌های حساس به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و کمترین قطر مربوط به غلظت ۰/۴ میکروگرم بر میلی لیتر توبرکلین انسانی برای خوکچه‌های حساس به مایکوباکتریوم آویوم بود که تورم خاصی در اطراف محل تزریق مشاهده نشد. در رابطه با تست پوستی جدید در خوکچه‌های حساس شده با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، هاله قرمز رنگ مشاهده گردید که بیشترین قطر این هاله مربوط به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر با میانگین قطر ۱۱/۷۰ میلی متر بود. در خوکچه‌های حساس شده



شکل شماره ۲: مقایسه شاخص اختصاصیت (SpI) تست پوستی جدید در مقایسه با تست توبرکلین انسانی، جهت تمایز بین آلودگی به M.t با آلودگی به M.a و M.b BCG. (میزان SpI برای تشخیص M.t توسط توبرکلین انسانی برابر یک در نظر گرفته شده است.)

مراحل اولیه عفونت مایکوباکتریایی، پاسخ Th1 را گسترش می‌دهد، اما با گسترش بیماری، شیفی از برتری Th1 به سمت Th2 که همراه با پاسخ ایمنی همورال است، پیدا می‌شود، از این موضوع می‌توان برای تشخیص استفاده کرد (۲۰). تست توبرکلین، تست عمومی جهت تشخیص عفونت نهفته و یا عفونت فعال سل بوده که در سطح جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تست در ایران در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، تولید و در مراکز درمانی جهت تشخیص عفونت سلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تست پوستی توبرکلین، تستی ساده و ارزان قیمت بوده که می‌تواند بدون نیاز به تخصص آزمایشگاهی خاصی انجام شود (۲۱).

در کل، نتایج نشان‌دهنده این بود که تست پوستی توبرکلین تولیدی در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی قادر به تمایز بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم آویوم نیست، اما تست پوستی جدید با وجود اینکه نتایج ضعیف‌تری نسبت به تست پوستی توبرکلین جهت تشخیص عفونت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشت، قادر به تمایز بین عفونت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم آویوم بود.

بحث

طیفی از پاسخ‌های ایمنی در عفونت سل وجود دارد که در

براساس مطالعه‌ای که توسط Huebner و همکاران صورت گرفت، تست جلدی توبرکولین توسط واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری، به وسیله مخلوطی از آنتی ژن‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد شد (۲۲). Huebner و همکاران و Harboe در مطالعه‌ای نشان دادند اختصاصیت تست جلدی توبرکولین ضعیف بوده و این به دلیل آنتی ژن‌هایی است که نه تنها در PPD وجود دارد؛ بلکه بین بسیاری از گونه‌های دیگر مایکوباکتریوم (شامل مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس) نیز مشترک است (۲۲، ۲۳). خانواده مهمی از پروتئین‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (مربوط به پروتئین‌های سبک وزن و با وزن مولکولی کمتر از ۱۵ کیلودالتون) تحریک کننده‌های قوی ترشح اینترفرون گاما هستند. عملکرد دقیق این پروتئین‌ها ناشناخته بوده و این پروتئین‌ها توسط ناحیه RD-1 در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس کد می‌شوند که این ناحیه در مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس BCG حذف شده، بنابراین این خانواده پروتئینی در این مایکوباکتریوم‌ها بیان نمی‌شوند و تنها در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس بیان می‌شوند (۲۴). لذا ایمنی علیه آن‌ها در افراد واکسینه به وسیله واکسن BCG و آلوده به مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس وجود ندارد. مطالعات فراوانی جهت تولید یک تست تشخیصی جدید علیه بیماری سل توسط آنتی ژن‌های موجود بر روی ناحیه ژنتیکی RD-1 صورت گرفته است. نکته قابل توجه در رابطه با این پروتئین‌ها، بیان اندک بسیاری از آنها در محیط کشت و به شکل *in vitro* است (۲۵). به همین دلیل برای به دست آوردن این پروتئین‌ها، بیشتر از روش‌های کلونینگ و بیان ژن استفاده می‌شود، ولی پروتئین‌هایی که به صورت نو ترکیب تولید شده‌اند قابلیت‌های پروتئین‌های طبیعی را ندارند (۲۶). بنابراین در این تحقیق برای خالص سازی پروتئین‌های طبیعی، باتوجه به بیان اندک این پروتئین‌ها در محیط کشت در شرایط *in vitro*، باکتری‌ها در حجم بالایی از محیط کشت مایع کشت داده شدند.

همچنین با توجه به اینکه جهت تولید PPD، محیط کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در دمای بالا و به مدت ۳ ساعت

اتوکلاو می‌شود، تمامی پروتئین‌های موجود، ساختار و شکل فضایی خود را از دست می‌دهند؛ لذا اختصاصیت این تست جهت تمایز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سایر گونه‌های مایکوباکتریوم کاهش می‌یابد. در تحقیقی که توسط Alito و همکاران صورت گرفت جهت کشتن جرم باکتری و جداسازی پروتئین‌های مایکوباکتریوم بوویس، محیط کشت باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در این تحقیق برای کشتن جرم باکتری و جداسازی پروتئین‌های ترشحی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از این روش استفاده شد تا پروتئین‌های ترشحی، ساختار و عملکرد کلی خود را از دست ندهند و بتوان در تشخیص اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از آن‌ها بهره برد (۱۹).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تست توبرکولین انسانی تولیدی در مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی، قادر به تمایز عفونت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم آویوم نیست، ولی با این حال دارای اختصاصیت بیشتری در تمایز بین عفونت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم آویوم در مقایسه با مایکوباکتریوم بوویس BCG می‌باشد. از طرف دیگر، تست پوستی حاوی پروتئین‌های سبک وزن تخلیص شده فیلترای کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توانست بین عفونت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با مایکوباکتریوم بوویس BCG (به عنوان کاندیدای واکسن BCG) و مایکوباکتریوم آویوم (به عنوان کاندیدای مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس) تمایز ایجاد کند، ولی با این وجود قطر هاله‌های ایجاد شده با این تست کمتر از تست توبرکولین بود که می‌توان با افزایش غلظت پروتئین موجود در تست این مشکل را برطرف کرد، همچنین می‌توان در تحقیقات بعدی این تست را بر روی حیوانات بزرگتر و انسان نیز مورد بررسی قرار داد و در کل این تست می‌تواند به صورت تست اختصاصی جهت تشخیص عفونت نهفته و فعال سل، در مواقعی که نتایج حاصل از تست توبرکولین مشکوک است به کار رود.

References:

1. Baumann S, Nasser Eddine A, Kaufmann SH. Progress in tuberculosis vaccine development. *Curr Opin Immunol* 2006;18(4):438-48.
2. Barreto ML, Pereira SM, Ferreira AA. BCG vaccine: Efficacy and indication for vaccination and revaccination. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(3 Suppl):S45-54.
3. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test Using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of Active Tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(4):491-6.
4. [No authors listed]. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4 Pt 2):S221-47.
5. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen PT, Cole S. ESAT-6 proteins: Protective antigens and virulence factors?. *Trends Microbiol* 2004;12(11):500-8.
6. Lein AD, von-Reyn CF, Ravn PC, Horsburgh L, Alexander N, Andersen P. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(4):606-9.
7. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(11):883-91.
8. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356(9235):1099-104.
9. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1996;64(1):16-22.
10. Crofton J, Horne N, Miller F. *Clinical tuberculosis*. 2nd ed. London: MacMillan Education; 1998.
11. Frothingham R, Meeker-O'connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998;144(Pt 5):1189-96.
12. Agger EM, Anderson PA. Novel TB vaccine: Toward a strategy based on our standing of BCG failure. *Vaccine* 2002;21:7-14.
13. Roberts AD, Sonnenberg MG, Ordway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT, et al. Characterization of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 1995;85(3):502-8.
14. Sheiky YA, sadoff JC. Advance in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(6):469-76.
15. Baker PJ, Wilson JB. Chemical composition and biological properties of the Endotoxin of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 1965;90(4):895-902.
16. Betts M, Beining P, Brunswic M, Inman J, Angus RD, Hoffman T, et al. Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* behaves as a T-cell-independent type 1 carrier in murine antigen-specific antibody responses. *Infect Immun* 1993;61(5):1722-9.
17. Moreno E, Sherelly L, Jones LM, Berman DT. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect Immun* 1981;31(1):214-22.

18. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney MA, Meikle PJ, Perry MB, Peters T. Definition of Brucella A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* 1989;57(9):2829-36.
19. Alito A, McNair J, Cirrin RM, Zumarraga M, Bigi F, Pollock JM, et al. Identification of Mycobacterium bovis antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(11):1523-31.
20. Welsh MD, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, Skuce RA, et al. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 2005;114(1):101-11.
21. De La Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 2006;81(2):190-210.
22. Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993;17(6):968-75.
23. Harboe M. Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved Mycobacterium bovis BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. *Am Rev Respir Dis* 1981;124(1):80-7.
24. Boesen H, Jensen BN, Wilcke T, Andersen P. Human T cell responses to secreted antigen fraction of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1995;63(4):1491-7.
25. Syhre M, Chambers ST. The scent of Mycobacterium Tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2008;88(4):317-23.
26. Anne L, Sorensen Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a Low-Molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1995;63(5):1710-17.