دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

شناسایی پروتئین های موجود در فیلترای کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه DT و مقایسه ی آن با پروتئین های توبرکولین انسانی توسط روش های الکتروفورتیک

داود صادقی
کارشناس ارشد بیوفیزیک ، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم و تحقیقات تهران ، گروه زیست شناسی ، تهران ، ایران

نادر مصوری
استادیار میکروبیولوزی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، کرج ، ایران

بهنام رفیعی
کارشناس ارشد میکروبیولوژی ،دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد قم ، گروه میکروبیولوژی ، قم ، ایران

محمد محمد طاهری
کارشناس ارشد باکتری ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، کرج ، ایران

شجاعت دشتی پور
کارشناس علوم آزمایشگاهی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، کرج ، ایران

عباس زارع
دانشیار بیوشیمی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، کرج ، ایران

عزت الله قهرمانلو
کارشناس ارشد شیمی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، کرج ، ایران

مجید تبیانیان
همتراز ایمنی شناسی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، کرج ، ایران

نویسنده مسئول: نادر مصوری

تلفن : 09122611438

پست الکترونیک :
nmosavari@yahoo.com

آدرس : کرج، حصارک، چهار راه اداره پست، موسسه واکسن و سرم سازی رازی ،ریاست بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالئین

وصول مقاله: 90/8/28
اصلاح نهایی: 91/1/30
پذیرش مقاله:91/2/4

www.SID.ir

چکیده

زمینه و هدف *: توبرکولین حاوی پروتئین های موجود در محیط کشت باکتری سل می باشد که توسط تری کلرواستیک اسید(TCA) و یا آمونیوم سولفات رسوب داده شده اند و جهت تشخیص آلودگی به باکتری سل از آن استفاده می شود. هدف از انجام این مطالعه مقایسه ی توبرکولین انسانی تولیدی در موسسه سرم سازی رازی با پروتئین های موجود در فیلترای کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد.*

روش بررسی*:ابتدا باکتری از محیط کشت جامد لونشتاین جانسون توسط محیط دوفازی به محیط مایع دورس هنلی منتقل شد و پس از رشد آن به مدت 6 هفته ، باکتری ها توسط فیلتر 0/22 میکرون از محیط کشت مایع حاوی پروتئین های ترشحی جدا شدند. سپس محلول حاوی پروتئین های ترشحی به صورت جداگانه توسط TCA و سولفات آمونیوم ترسیب شدند. سپس توسط اسپکتروفوتومتر و پروتئین سنجی کجلدال، وجود پروتئین در نمونه های ترسیب شده تائید گردید. در انتها پروتئین های ترسیب شده توسط SDS-PAGE و رنگ آمیزی کوماسی بلو با توبرکولین انسانی استاندارد مقایسه شدند.*

یافته‌ها*: نمونه ترسیب شده با TCA دارای باندهای بیشتری در محدوده ی بالاتر از 20 کیلودالتون بود، در حالی که نمونه ترسیب شده با سولفات آمونیوم دارای باندهای بیشتری در محدوده ی پایین تر از 20 بود. همچنین پروتئین های توبرکولین انسانی نیز بصورت اسمیر و دارای وزن کمتر از 16 کیلودالتون بودند.*

نتیجه گیری*:نتایج ما نشان داد که سولفات آمونیوم نسبت به TCA، ترسیب کننده ای مناسب تر برای پروتئین های با وزن مولکولی پایین باشد .*

واژه های کلیدی*: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، SDS-PAGE، توبرکولین*

آدرس مقاله:
صادقی د، مصوری ن، رفیعی ب، محمد طاهری م، دشتی پور ش، زارع ع، قهرمانلو ع ، تبیانیان م،" شناسایی پروتئین های موجود در فیلترای کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه DT و مقایسه ی آن با پروتئین های توبرکولین انسانی توسط روش های الکتروفورتیک ". مجله علوم آزمایشگاهی بهار و تابستان ، 1391دوره ششم(شماره1) :26-19

Archive of SID

مقدمه

بیماری سل یا توبرکلوزیس یکی از مهمترین و کهن ترین بیماریهایی است که بشر با آن مواجه بوده است. قدیمی ترین موارد این بیماری را در فسیل های استخوانی متعلق به 3000 سال قبل از میلاد مسیح گزارش نموده اند(1). سل یک بیماری با انتشار جهانی است. این بیماری عفونی، بسیار مسری بوده و به راحتی از شخصی به شخص دیگر منتقل می شود. طبق ارزیابی ها، یک سوم جمعیت جهان به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* آلوده شده اند(2). هرچند بسیاری از این عفونت‌ها به صورت نهان هستند ولی حدود یک دهم این عفونت‌ها نهایتا به سل آشکار تبدیل می‌شوند که اگر بدون معالجه رها شوند، بیش از نیمی از آنها منجر به مرگ می‌شود. روبرت کخ در سال 1882 میلادی عامل بیماری سل را کشف نمود، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* باکتری عامل ایجاد این بیماری می باشد(3).

توبرکولین بعنوان تست تشخیصی سل از طریق تزریق زیر پوستی و ایجاد تورم در محل تزریق، برای تشخیص عفونت نهفته و یا عفونت فعال بکار می رود. توبرکولین فرآورده پروتئینی است که از صاف و تغلیظ کردن محیط کشت مایع 6 هفته ای باکتری سل که جرم باکتری آن در دمای 120 درجه سانتیگراد کشته شده است تولید می شود. Sibert در سال 1941 روش تولید توبرکولین استاندارد را با استفاده از ترسیب با تری کلرواستیک اسید منتشر کرد. همچنین دو موسسه ی BAI در آمریکا و VLA در ویبریج از سه سویه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* DT,PN وC اقدام به تولید توبرکولین کردند(4) که هم اکنون جهت تولید توبرکولین انسانی در ایران از این سه سویه و روش ترسیب با تری کلرواستیک اسید استفاده می شود.

فیلترای کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حاوی آنتی ژن های مختلفی می باشد. بسیاری از آنها با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال شناسایی شده و مورد بررسی قرار گرفته اند. بسیاری از این آنتی ژن ها، پروتئین های ترشحی موجود در دیواره باکتری و یا پروتئین های رها شده از جسم باکتری های مرده هستند که قادر به ایجاد پاسخ ایمنی در مراحل ابتدایی ایجاد عفونت در بیمار می باشند(5). پروتئین های ترشحی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تا به امروز به شکل گسترده ای مورد بررسی قرار گرفته اند و مشخص شده است که این آنتی ژن ها قادر به القای ایمنی حفاظت بخش در حیوانات آزمایشگاهی می باشند(6). برخی از آنتی ژن های موجود در فیلترای کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* عبارتند از: 1- کمپلکس آنتی ژن 85 که این کمپلکس پروتئینی از سه پروتئین مجزا با همولوژی بالا به نام های 85A، 85B و 85C (و یا FbpA، FbpB و FbpC2) تشکیل شده است که هر کدام دارای وزن مولکولی نزدیک به 30 کیلو دالتون می باشد. 2- آنتی ژن MPT64 **که** دارای وزن مولکولی 24 کیلو دالتون می باشد(8،7). 3- آنتی ژن ESAT6 دارای وزن مولکولی 6 کیلو دالتون و کمپلکس آن CFP10 که دارای وزن مولکولی 10 کیلودالتون می باشد(9-11). در مجموع شناخت هر چه بیشتر این آنتی ژن ها می تواند در تولید واکسن و تست تشخیصی جدید علیه بیماری سل کمک شایانی کند. هدف از انجام این تحقیق، بررسی پروفایل های فیلترای کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه DT، ترسیب شده توسط تری کلرواستیک اسید و سولفات آمونیوم و مقایسه ی آن ها با توبرکولین انسانی تولیدی در موسسه سرم سازی رازی توسط روش SDS-PAGE بود.

روش بررسی

در این مطالعه کلیه مواد شیمیایی مصرفی از شرکتهای سیگما و مرک آلمان تهیه گردید. سویه DT باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ATCC 35810 تهیه شده از موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج (این سویه از موسسه Weybridge انگلستان به موسسه رازی منتقل شده بود) بروی محیط کشت جامد لونشتاین جانسون گلیسرین دار کشت داده شد و پس از هشت هفته باکتری به صورت کلنی درآمد. سپس باکتری از محیط کشت جامد با واسطه محیط دو فازی سیب زمینی- دورس هنلی، به محیط مایع دورس هنلی منتقل گردید. بعد از شش هفته رشد باکتری بروی محیط کشت مایع، ظرف فرنباخ حاوی محیط کشت و باکتری بمدت 20 دقیقه در دمای 80 درجه سانتیگراد جهت کشتن جرم باکتری قرار گرفت. سپس جرم باکتری پس از عبور مایع از کاغذ

Archive of SID

www.SID.ir

صافی و فیلتر EKS از فیلتر 0/22 میکرون عبور داده شد که جرم باکتری به کلی از محیط کشت مایع حاوی پروتئین های ترشحی حذف شد.

پس از انجام فیلتراسیون، از دو روش مجزا از هم برای ترسیب پروتئین های موجود در محیط کشت مایع استفاده شد که شامل روش ترسیب با سولفات آمونیوم و روش ترسیب با تری کلرو استیک اسید(TCA) بود.

جهت جداسازی پروتئین های موجود در محیط کشت باکتری با استفاده از روش ترسیب با تری کلرو استیک اسید، حجم مایع صاف شده اندازه گیری و به میزان 9 به یک تری کلرواستیک اسید (TCA) 40 % همراه با هم زدن محلول اضافه گردید. ظرف حاوی مایع بخوبی بهم خورد و سپس محلول فوق سانتریفوژ و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب باقی مانده یکبار با TCA ده درصد و 2 بار با نمک NaCl ده درصد شسته شد، مرحله شستشو آنقدر ادامه یافت تا مایع رویی کاملاً شفاف گردد تا TCA کاملا از محلول پروتئینی حذف گردد (درهر بار شستشو محلول در 2500rpm سانتریفوژ و سوپرناتانت آن دور ریخته می شد و رسوب حاصله مجدداً شستشو داده می‌شد). سپس به رسوب باقی مانده تامپون فسفاته اضافه و pH آن روی 7 تنظیم گردید و توبرکلوپروتئینهای استحصالی از فیلتر 0/22 میکرون میلی پور عبور داده شدند.

جهت جداسازی پروتئین ها از محیط کشت مایع با استفاده از روش ترسیب با سولفات آمونیوم، میزان 561 گرم سولفات آمونیوم به ازای هر لیتر از محیط کشت مایع به آن اضافه گردید و سپس به مدت 24 ساعت محلول فوق در دمای 4 درجه سانتیگراد بهم خورد. پس از آن محلول در 2500rpm سانتریفوژ و سوپرناتانت آن دور ریخته شد. سپس به رسوب باقی مانده تامپون فسفاته اضافه و pH آن روی 7 تنظیم گردید. جهت حذف نمک های موجود در محلول پروتئینی از روش دیالیز در آب مقطر استفاده شد(12). یک کیسه دیالیز با cut off برابر با 3کیلو دالتون به مدت یک دقیقه در محلول در حال جوش EDTA 2% قرار گرفت. محلول پروتئینی در داخل این کیسه دیالیز ریخته و در آب مقطر بمدت 72 ساعت قرار گرفت(آب مقطر هر 24 ساعت تعویض می شد). سپس جهت اطمینان از حذف نمک موجود در محلول پروتئینی از کانداکتومتر استفاده گردید.

جهت اثبات وجود پروتئین در محلول، طیف جذبی آن توسط اسپکتروفوتومتر در محدوده ی UV-Visible گرفته شد. همچنین توسط روش پروتئین سنجی کجلدال میزان پروتئین در هر یک از محلول های ترسیب شده بدست آمد. در نهایت پروتئین های ترسیب شده توسط TCA و سولفات آمونیوم، به روش SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو، با توبرکولین استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام SDS-PAGE برای ژل بالا از ژل 4% و برای ژل پایین از ژل 20% استفاده گردید که علت استفاده از این درصد ژل برای ژل پایین جداسازی بهتر آن برای وزن های مولکولی پایین بود. همچنین در این مطالعه از مارکرهای Multicolor Low Range protein شرکت Fermentas استفاده شد.

Archive of SID

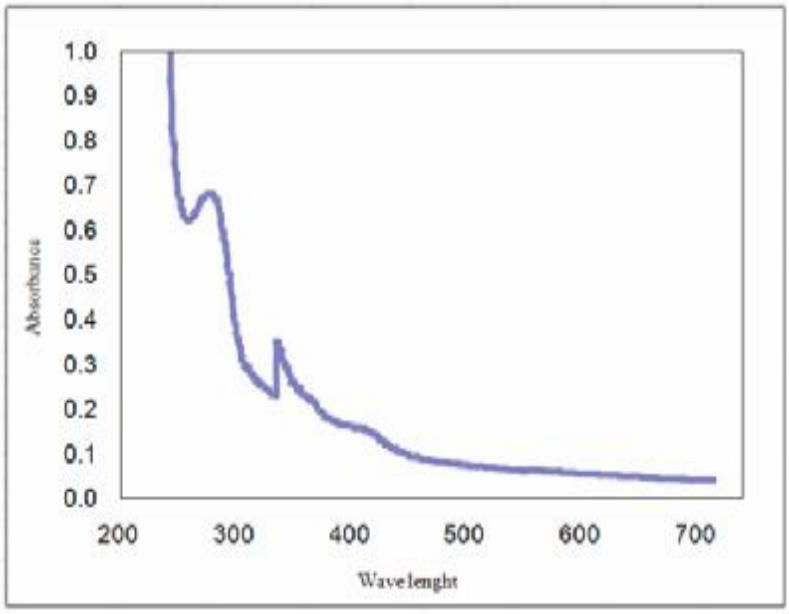
www.SID.ir

یافته ها

انتقال و رشد باکتری بر روی هر سه محیط فوق به درستی انجام گرفت (تصویر1).

تصویر1: رشد باکتری بر روی سه محیط متفاوت شامل 1- محیط کشت جامد لونشتاین جانسون. 2- محیط کشت دوفازی سیب زمینی -دورس هنلی. 3- محیط کشت مایع دورس هنلی

پس از بررسی میزان جذب محلول ترسیب شده ی فیلترای کشت، میزان جذب شدید این محلول در ناحیه 280 نانومتر نشان از غنی بودن محلول از ترکیبات پروتئینی داشت(نمودار1).

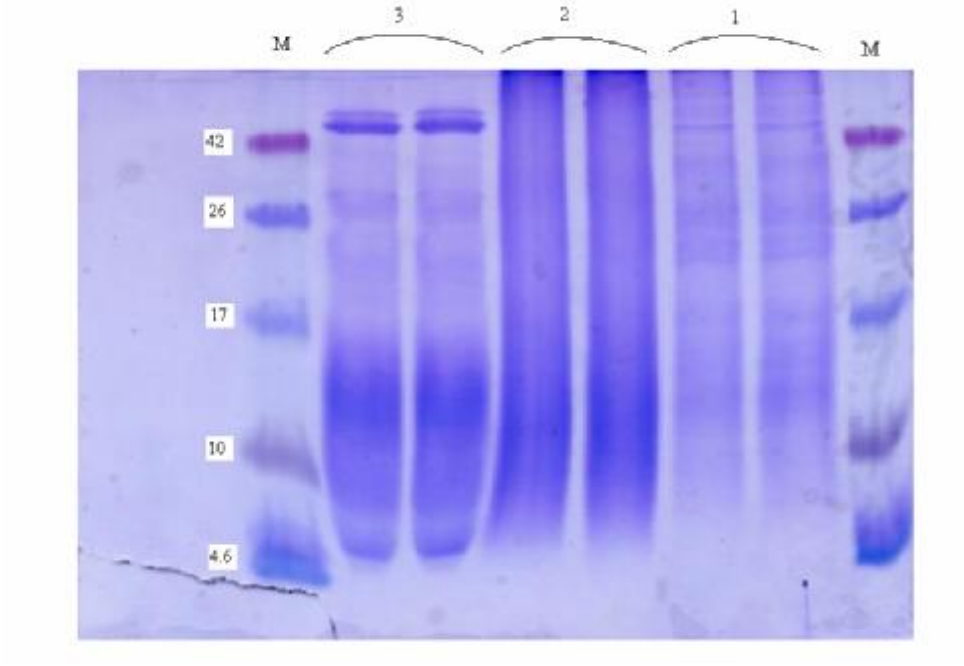


نمودار1: طیف جذبی محلول ترسیب شده ی فیلترای کشت 6 هفته ای در محدوده ی طول موج 200 تا 700 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر UV-Visible برای سولفات آمونیوم

www.SID.ir

انجام پروتئین سنجی به روش کجلدال، میزان غلظت های $2/48 mg.ml^{-1}$ و $2/88 mg.ml^{-1}$ را به ترتیب برای محلول ترسیب شده با TCA و سولفات آمونیوم نشان داد.

پس از انجام SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو مشخص شد که فیلترای کشت ترسیب شده با TCA دارای باندهای بیشتری در محدوده ی بالاتر از 20 کیلودالتون و باندهای کمتری در محدوده ی پایین تر از آن می باشد و در مقابل، فیلترای کشت ترسیب شده با سولفات آمونیوم دارای باندهای بیشتری در محدوده ی پایین تر از 16 کیلودالتون که مربوط به پروتئین های ترشحی خانواده یESAT6 می باشد و باندهای کمتری در محدوده ی بالاتر از آن است. نکته دیگر اینکه توبرکولین انسانی دارای اسمیر باند هایی کمتر از 16 کیلودالتون بود که علت تشکیل این اسمیر پروتئینی در ژل SDS-PAGE بکار بردن دمای 120 درجه سانتیگراد جهت کشتن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تولید توبرکولین انسانی می باشد اما با بکار بردن دمای80 درجه سانتیگراد علاوه بر کشتن باکتری می توان برای نمونه های فیلترای کشت ترسیب شده با سولفات آمونیوم و TCA باندهای پروتئینی را به تفکیک مشاهده کرد (تصویر2).



تصویر2: ژل SDS-PAGE از فیلترای کشت شش هفته ای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و توبرکولین انسانی با استفاده از رنگ آمیزی کوماسی بلو

1: فیلترای کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ترسیب شده با استفاده از تری کلرواستیک اسید(TCA)

2: توبرکولین انسانی تولیدی در موسسه واکسن و سرم سازی رازی

3: فیلترای کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ترسیب شده با استفاده از سولفات آمونیوم

M : مارکر

www.SID.ir

بحث

در حال حاضر تست توبرکولین بهترین روش تشخیص سل و یکی از ساده ترین روش ها جهت ارزیابی وضعیت انسان و دام از نظر مواجهه با باکتری سل می‌باشد. در این مطالعه سعی شد به کمک SDS-PAGE، به مقایسه ی بین توبرکولین انسانی تولیدی در موسسه رازی با پروتئین های موجود در محیط کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه DT (ترسیب شده توسط سولفات آمونیوم و TCA) پرداخته شود .

در این مطالعه، جهت انتقال باکتری از محیط جامد به محیط مایع از محیط دوفازی سیب زمینی-دورس هنلی استفاده شد زیرا احتمال غرق شدن باکتری زمانی که باکتری مستقیم به محیط مایع انتقال داده می شود، افزایش خواهد یافت. بنابراین انتقال باکتری به محیط سیب زمینی-دورس هنلی و سپس انتقال آن به محیط مایع، احتمال رشد آن را در محیط مایع به دلیل شناور ماندن پرده رشد یافته باکتری در سطح بیشتر می کند.

برای تعیین مقدار پروتئین درمحلول های توبرکولین انسانی و نمونه های ترسیب شده با سولفات آمونیوم و TCA از روش پروتئین سنجی کجلدال استفاده شد. به دلیل بالا بودن غلظت پروتئین در محلول ها، روش کجلدال مناسب تر از روش برادفورد است زیرا روش پروتئین سنجی برادفورد، برای اندازه گیری مقادیر بیولوژیک در حد میکروگرم و نانوگرم در میلی لیتر و پایین تر مناسب می‌باشد و برای اندازه گیری در مقادیر بالا کاربردی ندارد. به دلیل وجود TCA در توبرکولین انسانی تولیدی موسسه و یکی از نمونه ها، از روش لوری نمی‌توان استفاده کرد، زیرا به دلیل وجود TCA پاسخ‌های روش لوری غیر واقعی است(12). بنابراین روش کجلدال با وجود اینکه یک روش قدیمی و وقت گیر است ولی دارای کارائی مناسب و قابل اطمینان جهت انجام این مطالعه بود.

در تحقیقی که توسط محمدی و همکاران در سال 1999 انجام گرفت، حجم محلول اولیه در هر دو روش ترسیب برابر انتخاب گردید و میزان پروتئین توبرکولین های حاصل از هر دو روش با استفاده از روش کجلدال اندازه گیری شد و مشخص گردید که میزان پروتئین حاصل از روش ترسیب با سولفات آمونیوم بیشتر از روش ترسیب با TCA است(13) که در مطالعه حاضر نیز پس از پروتئین سنجی دو روش ترسیبی و تناسب بین میزان محلول اولیه و محصول و میزان پروتئین بدست آمده این موضوع تائید شد.

Alito و همکارانش در سال 2003، که بر روی مایکوباکتریوم بوویس کار کرده بودند، قبل از مرحله ی جداسازی پروتئین، جرم باکتری را توسط 20 دقیقه حرارت در 80 درجه سانتی گراد کشتند(14). در این مطالعه نیز از روش فوق جهت کشتن جرم زنده *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* قبل از انجام فیلتراسیون استفاده شد.

نتایج حاصل از انجام SDS-PAGE و مقایسه ی محدوده باندهای نمونه های ترسیب شده با TCA و سولفات آمونیوم نشان دهنده ی این موضوع بود که سولفات آمونیوم ترسیب کننده ی مناسب تری نسبت به TCA برای پروتئین های با وزن مولکولی پایین می باشد. پروتئین های با وزن مولکولی پایین مانند ESAT6 نقش مهمی را در تولید یک تست تشخیصی جدید علیه بیماری سل ایفا می کنند(11).

نکته ی دیگر اینکه دو نمونه ترسیب شده با TCA و سولفات آمونیوم جهت تولید، در دمای بالایی قرار داده نشده اند، بنابراین دیواره ی باکتری ها متلاشی نشده و پروتئین های حاصل نیز، پروتئین های ترشحی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می باشند. ولی در توبرکولین انسانی به دلیل سه ساعت حرارتی که در آغاز برای کشتن باکتری استفاده می کنند، پیکره ی باکتری متلاشی شده و پروتئین های آن وارد محلول می گردند. همچنین حرارت بالا باعث تخریب شکل فضایی پروتئین های محلول می شود تا خاطره ای پس از تست برای حیوان یا انسان تست شده باقی نماند. این مساله در ژل نیز با توجه به اینکه اسمیری از پروتئین ها در اوزان پایین دیده می شود، ثابت شده است.

در چندین مطالعه ی دیگر مربوط به خالص سازی پروتئین های وزن مولکولی پایین *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* این

Archive of SID

www.SID.ir

نکته ذکر شده است که جهت انجام SDS-PAGE از ژل 15% استفاده کرده اند(17-15). با توجه به وجود پروتئین های با وزن مولکولی پایین در محلول های پروتئینی پس از انجام SDS-PAGE با درصد های متفاوت، مشخص شد که بهترین درصد ژل جهت انجام این مطالعه ژل 20% می باشد زیرا بهترین تفکیک را انجام می دهد و ژل های با درصد های پایین تر نمی توانند بخوبی این تفکیک را در پروتئین های با وزن مولکولی پایین تر از 15 کیلودالتون انجام دهند.

همچنین استفاده از تری کلرواستیک اسید برای ترسیب توبرکلوپروتئین که در برخی از مراکز تولید کننده مانند ایران مرسوم است، عوارض واثرات منفی متعددی به دنبال خواهد داشت. این اسید، تاثیر منفی بر سلامت و بهداشت شغلی می گذارد. کار با تری کلرواستیک اسید که یکی از قوی ترین اسیدهای آلی محسوب می گردد و استنشاق بخارات آن سرطانزا می‌باشد، خطرناک است(13). روش ترسیب با سولفات آمونیوم، روش سالم تر و کم خطری برای تولید کنندگان می‌باشد. با توجه به مزایای این روش و بالا بودن میزان پروتئین استحصالی نسبت به روش ترسیب با تری کلرو استیک اسید و اینکه توبرکولین استاندارد نیز با روش ترسیب با سولفات آمونیوم تولید می شود، پیشنهاد می گردد که در مراکز تولید برای تهیه توبرکولین از این روش استفاده شود تا تولیدکنندگان کمتر در معرض مخاطره قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

از زحمات و تلاش کلیه پرسنل مؤسسه سرم سازی رازی کرج به خصوص بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین مؤسسه که از هیچ گونه کمکی در طول مدت انجام این پروژه دریغ ننموده اند، صمیمانه تقدیر و تشکر می کنم.

References

1.Zink AR, Sola C,Reischl U, Grabner W, Rastogi NM ,Wolf H, et al. *Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping*. J clin microbial.2003; 41(11):5350-1.

2.Baumann S, Nasser Eddine A. Kaufmann SH. *progress in tuberculosis vaccine development*. Current Opinion in Immunology. 2006; 18(4): 438-48

3.Smith I. *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. Clinical Microbiology Reviews. 2003; 16(3): 463-96.

4.Green HH. *General articles weybridge P.P.D tuberculins.* Vet Journal. 1946; 102, 267-278.

5.Sonnenberg MG, Belisle JT. *Definition of Mycobacterium tuberculosis Culture Filtrate Proteins by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis, N-Terminal Amino Acid Sequencing, and Electrospray Mass Spectrometry*.Infection and Immunity.1997; 65(11): 4515-4524.

6.Uma Devi KR, Senthil Kumar KS, Ramalingam B, Alamelu R. *Purification and Characterization of Three Immunodominant Proteins (38, 30, and 16 kDa) of Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expression and Purification. 2002; 24 (2): 188-195.

7.Marzouk M, Kahla IB, Hannachi N, Ferjeni A, Salma WB, Ghezal S, Boukadida J**.** *Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical isolates***.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2011; 69(4): 396-399.

8.Oettinger T, Holm A, Haslov K. *Characterization of delay type hypersensitivity-inducing epitope of MPT64 from mycobacterium tuberculosis.* Journal of immunology.1997; 45: 499-503.

9-Komiya K, Ariga H, Nagai H, Kurashim A, Shoji S, Ishii H, Nakajima Y. *Reversion rates of QuantiFERON-TB Gold are related to pre-treatment IFN-gamma levels.* Journal of Infection. 2011; 63(1): 48-53.

10-Yin Y, Li H, Wu S, Dong D, Zhang J, Fu L, Xu J, Chen W. *Hepatitis B virus core particles displaying Mycobacterium tuberculosis antigen ESAT-6 enhance ESAT-6-specific immune responses.* Vaccine. 2011; 29(34): 5645-5651

11-Farshadzadeh Z, Sankian M, Yousefi F, Gholobi A, Zarif R, Naderi nasab M, Rashed T, Varasteh. *Cloning, expression and purification of early secretory antigenic target 6kDa protein (ESAT-6) of Mycobacterium tuberculosis.* Jundishapur Journal of Microbiology. 2010; 3(2): 53-60

12-Zeinali M, Jammalan M, Ardestani S, Mosaveri N. *Immunological and cytotoxicological characterization of tuberculin purifiedprotein derivative (PPD) conjugated to single-walled carbon nanotubes.* Immunology Letters.2009; 126: 48–53

13-Mohamadi A. *Research project of evaluation and preparation different methods PPD at different stages.* Department of Education and Research Publication of Agricultural (1378).

14-Alito A, Mcnair J, Cirrin RM, Zumarrage 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.* Brazilion journal of medical and Biological Research. 2003; 36(11): 1523-1531.

15-de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, Honore N, et al. *ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis Dissociates from Its Putative Chaperone CFP-10 under Acidic Conditions and Exhibits Membrane-Lysing Activity*. Journal Of Bacteriology. 2007; 189(16): 6028–6034.

Archive of SID

www.SID.ir

16-Brodin P, de Jonge MI, Majlessi L, Leclerc C, Nilges M, Cole ST, et al. *Functional Analysis of Early Secreted Antigenic Target-6, the Dominant T-cell Antigen of Mycobacterium tuberculosis, Reveals Key Residues Involved in Secretion, Complex Formation, Virulence, and Immunogenicity*. The Journal of Biological Chemistry. 2005; 280(40): 33953–33959.

17-Meher AK, Bal NC, Chary KV , Arora A. *Mycobacterium tuberculosis H37Rv ESAT-6–CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability*. FEBS Journal. 2006; 273(7): 1445–62.

Archive of SID

www.SID.ir