Archive of SID

Original Article

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

Davoud Sadegh Garizi[1], Nader Mosavari[2*]

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

[2]Livestock 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 to10 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 was 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.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

www.SID.ir

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره اول، فروردین ۹۷
صفحه ۶۳ الی ۷۱

Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

استفاده از آنتی‌ژن‌های وزن مولکولی پایین *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به‌عنوان 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 یک‌سوم مردم دنیا به عفونت نهفته سل آلوده‌اند. 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 پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین مترشحه از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جهت تشخیص عفونت این باکتری بود.

روش بررسی: در این مطالعه پس از استخراج پروتئین‌های مترشحه در فیلترای کشت کوتاه‌مدت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، پروتئین‌های دارای وزن مولکولی پایین به‌وسیله کروماتوگرافی ژلی سفادکس-G75 خالص‌سازی شدند. برای انجام تست پوستی، چندین گروه خوکچه‌هندی به‌وسیله سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، *مایکوباکتریوم بوویس* BCG و *مایکوباکتریوم اوویوم* حساس‌سازی شدند و تست پوستی با پروتئین‌های خالص‌شده و PPD بر روی آن‌ها انجام شد.

یافته‌ها: براساس داده‌های آزمون پوستی، برخلاف PPD، پروتئین‌های خالص‌شده پاسخ مثبتی را نسبت به حیواناتی‌که در معرض *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* قرار گرفتند نشان دادند، ولی هیچ پاسخ پوستی قابل‌توجهی در خوکچه‌های حساس با *مایکوباکتریوم بوویس* BCG و *مایکوباکتریوم اوویم* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد تست پوستی جدید در مقایسه با PPD برای تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* اختصاصی است و می‌تواند به‌عنوان یک تست پوستی اختصاصی‌تر برای تشخیص سل در حیوانات بزرگتر یا انسان جایگزین شود.

کلید واژه‌ها: تست‌های پوستی؛ سل؛ سل- تشخیص.

[۱]مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

[۲]آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماریزای دام، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
نادر مصوری، آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماریزای دام، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی 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 به‌صورت 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]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

مقدمه

بیماری سل یا توبرکلوز (Tuberculosis, TB)، یک بیماری با انتشار جهانی است. این بیماری عفونی، بسیار مسری بوده و به‌راحتی قابل انتقال از شخصی به شخص دیگر می‌باشد. طبق بررسی‌ها، یک‌سوم جمعیت جهان به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* آلوده‌اند (۱) هرچند بسیاری از این عفونت‌ها به‌صورت 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 به‌موقع بیماری (با استفاده از تکنیک‌های تزریق تست توبرکولین، کشت و تکنیک‌های مبتنی بر ژنوم)، بهترین شیوه مبارزه با سل است. واکسن BCG تنها واکسن ضدسل بوده که به‌طور گسترده در بیشتر کشورها ازجمله 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 مایکوباکتروم‌های غیرتوبرکلوزیس و افرادی‌که واکسن BCG دریافت کرده‌اند می‌باشد، لذا تزریق واکسن فوق در بدو تولد به کودک، تشخیص بیماری را دچار مشکل می‌کند (۴،۳). بنابراین، استفاده از ترکیبات جدید مختص گونه بیماریزا نیاز است تا بتواند در تشخیص عفونت نهفته به *مایکوباکتروم توبرکلوزیس* به‌صورت اختصاصی عمل کند. تاکنون آنتی‌ژن‌های مختلفی در پروتئین‌های ترشحی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شناسایی شده‌اند که قادرند به‌طور اختصاصی سیستم ایمنی سلولی را تحریک کنند. از این میان، می‌توان به آنتی‌ژن‌هایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۵ کیلودالتون اشاره کرد که تحریک‌کننده‌های قوی ترشح اینترفرون گاما بوده و شناخته‌شده‌ترین 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 هترودایمر ۱:۱ را با ESAT6 تشکیل می‌دهد و نقش یک چاپرون یا شبه‌چاپرون 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 (۹-۷).

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 به‌عنوان 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 آنتی‌ژنیسیتی بالای خانواده ESAT6، می‌توان آن‌ها را به‌عنوان کاندیدی برای تست‌های تشخیصی وابسته به سلول T، نظیر تست‌های جلدی درنظر داشت و در تشخیص انواع عفونت‌های مزمن از آن‌ها استفاده کرد (۱۲)، پاسخ آنتی‌بادی علیه آن‌ها را نیزمی‌توان در مطالعات تشخیصی مدنظر قرارداد (۱۸).

هدف از انجام این مطالعه بررسی تولید یک تست جدید به‌وسیله پروتئین‌های سبک وزن مترشحه از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جهت تشخیص سل با قابلیت تمایز بین خوکچه‌های واکسینه‌شده با واکسن BCG و آلوده به *مایکوباکتریوم اوویوم* (به‌عنوان 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 گلیسرین‌دار کشت داده شد. سپس باکتری از محیط کشت جامد با واسطه محیط دو فازی دورس هنلی - سیب‌زمینی، به محیط مایع دورس هنلی منتقل گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

بعد از ۶ هفته رشد باکتری بر روی محیط کشت مایع، ظرف فرنباخ 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 پروتئین‌های ترشحی)، کاغذ صافی و فیلتر ۰/۲۲ میکرون حذف شد. جهت جداسازی پروتئین‌ها از محیط کشت مایع، از روش ترسیب با سولفات آمونیوم استفاده گردید؛ بدین ترتیب که ابتدا مقدار ۵۶۱ گرم سولفات آمونیوم به‌ازای 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 ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ و سوپرناتانت آن دور ریخته شد. در ادامه، به رسوب باقیمانده، تامپون فسفاته اضافه و pH آن روی ۷ تنظیم گردید. نمک‌های موجود در محلول پروتئینی به‌وسیله 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 پروتئین‌سنجی لوری تعیین شد و قبل از انجام کروماتوگرافی، ابتدا محلول پروتئینی با استفاده از پلی‌اتیلن گلایکول تغلیظ گردید. برای خالص‌سازی پروتئین از ستون کروماتوگرافی (به ارتفاع ۱۵۰ سانتی‌متر، قطر ۲ سانتی‌متر با حجم پک‌شده ۴۷۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. جهت انجام کروماتوگرافی از سفادکس G-75 به‌عنوان فاز ثابت و از آمونیوم استات ۰/۱ مولار به‌عنوان فاز متحرک استفاده گردید. حجم محلول پروتئینی، ۵ میلی‌لیتر و غلظت آن ۱۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود. پس از انجام کروماتوگرافی، طیف جذبی محلول‌های پروتئینی جداسازی‌شده به‌وسیله اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر خوانده و کروماتوگراف آن رسم گردید و به کمک کروماتوگراف، جداسازی فراکسیون‌ها صورت گرفت. سپس جهت تأیید جداسازی پروتئین‌های وزن مولکولی پایین، روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو 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 سرم‌سازی رازی تهیه و جهت انجام حساس‌سازی، خوکچه‌ها در سه گروه ده‌تایی دسته‌بندی 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 سویه‌های DT, C, PN) حساس‌سازی شدند. حساس‌سازی با تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حساس‌سازی (شامل ۴ میلی‌گرم از عصاره مایکوباکتریومی کشته‌شده در ۱ میلی‌لیتر پارافین مایع) به پشت عضله ران هر خوکچه انجام شد. پس از گذشت ۴۵ روز جهت انجام تست جلدی، پشت خوکچه‌ها از دو طرف موزدایی و حیوان آماده تزریق شد. در این مطالعه از توبرکولین انسانی تولیدی در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی (به‌عنوان تست مرجع) و پروتئین‌های سبک وزن تخلیص‌شده (به‌عنوان تست تشخیصی جدید) استفاده گردید که سه غلظت ۱۰، ۲ و ۰/۴ میکروگرم برمیلی‌لیتر از هر تست تهیه شد (جهت رقیق‌سازی از تامپون فسفات توئین‌دار استفاده گردید.) تزریق داخل جلدی از رقت‌های تهیه‌شده به‌صورت تصادفی (طبق جدول رندوم) نزدیک به مهره کمری خوکچه‌ها انجام گرفت. تزریقات با سرنگ انسولین و به‌صورت داخل جلدی انجام شد و میزان هر تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر بود. ۲۴ ساعت پس از تزریق، واکنش پوستی حاصل از تزریق آنتی‌ژن‌ها که به‌صورت هاله‌ای قرمز در اطراف محل تزریق ایجاد شده بود، اندازه‌گیری و نتیجه برحسب میلی‌متر گزارش شد. میزان حساسیت تست تشخیصی جدید در مقایسه با توبرکولین انسانی برای خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در مقایسه با خوکچه‌های حساس‌شده با *مایکوباکتریوم آویوم* و *مایکوباکتریوم بوویس* BCG مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردید.

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

یافته‌ها

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

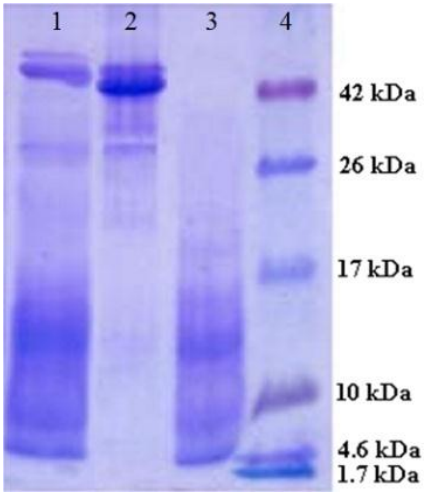
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

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

بنابراین، ۶۵/۳٪ ازمجموع پروتئین‌های ترشحی 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 ترشحی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* محسوب می‌شود (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: پروفایل پروتئین‌های مختلف خارج‌شده از ستون سفادکس G-75، با استفاده از SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو (مختص پروتئین‌ها). ۱) نمونه پروتئینی ترسیب‌شده با سولفات آمونیوم؛ ۲) فراکسیون ۱؛ ۳) فراکسیون ۲ و ٤) مارکر می‌باشد.

بیست و چهار ساعت پس از تزریق تست پوستی توبرکولین انسانی (به‌عنوان تست مرجع) و پروتئین‌های سبک وزن تخلیص‌شده (به‌عنوان تست تشخیصی جدید) بر روی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم بوویس* BCG و *مایکوباکتریوم آویوم*، هاله قرمز رنگ ایجادشده در محل تزریق اندازه‌گیری 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 برمیلی‌لیتر)	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	۱۴/۵۵۰±۲/۶۰	۹/۳۵±۲/۳۸
	۱۰	۱۹/۴۵±۲/۱۵	۱۱/۷۰±۲/۲۱

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

طبق نتایج به‌دست‌آمده در رابطه با تست پوستی توبرکولین، بیشترین قطر هاله‌ها مربوط به غلظت ۱۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر توبرکولین انسانی با میانگین ۱۹/۴۵ میلی‌متر برای خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و کمترین قطر مربوط به غلظت ۰/۴ میکروگرم برمیلی‌لیتر توبرکولین 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 حساس‌شده با *مایکوکوباکتریوم توبرکلوزیس*، هاله قرمز رنگ مشاهده گردید که بیشترین قطر این هاله مربوط به غلظت ۱۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر با میانگین قطر ۱۱/۷۰ میلی‌متر بود. در خوکچه‌های حساس‌شده 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 برمیلی‌لیتر هاله‌ای با قطر ۴/۱ میلی‌متر مشاهده گردید که قابل‌چشم‌پوشی بود.

میزان شاخص اختصاصیت تست پوستی جدید جهت تشخیص سویه‌های فوق با تقسیم میزان واکنش پوستی تست تشخیصی جدید به میزان واکنش پوستی تست توبرکولین انسانی بر روی هریک از خوکچه‌های حساس‌شده با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، *مایکوباکتریوم بوویس* BCG و *مایکوباکتریوم آویوم* به دست آمد (شکل شماره ۲).

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

در کل، نتایج نشان‌دهنده این بود که تست پوستی توبرکولین 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 باوجود اینکه نتایج ضعیف‌تری نسبت به تست پوستی توبرکولین 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 مراحل اولیه عفونت مایکوباکتریایی، پاسخ Th1 را گسترش می‌دهد، اما با گسترش بیماری، شیفتی از برتری Th1 به سمت Th2 که همراه با پاسخ ایمنی هومورال است، پیدا می‌شود، از این موضوع می‌توان برای تشخیص استفاده کرد (۲۰). تست توبرکولین، 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 توبرکولین، تستی ساده و ارزان‌قیمت بوده که می‌تواند بدون نیاز به تخصص آزمایشگاهی خاصی انجام شود (۲۱).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

براساس مطالعه‌ای که توسط Huebner و همکاران صورت گرفت، تست جلدی توبرکولین توسط واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری، به‌وسیله مخلوطی از آنتی‌ژن‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد شد (۲۲). Huebner و همکاران و Harboe در مطالعه‌ای نشان دادند اختصاصیت تست جلدی توبرکولین ضعیف بوده و این به دلیل آنتی‌ژن‌هایی 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 (۲۳،۲۲). خانواده مهمی از پروتئین‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*مربوط به پروتئین‌های سبک وزن و با وزن مولکولی کمتر از ۱۵ کیلودالتون) تحریک‌کننده‌های 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 به‌وسیله واکسن BCG و آلوده به مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس وجود ندارد. مطالعات فراوانی جهت تولید یک تست تشخیصی جدید علیه بیماری سل توسط آنتی‌ژن‌های موجود بر روی ناحیه ژنتیکی RD-1 صورت گرفته است. نکته قابل‌توجه در رابطه با این پروتئین‌ها، بیان اندک بسیاری از آنها در محیط کشت و به شکل in vitro است (۲۵). به‌همین دلیل برای به‌دست‌آوردن این پروتئین‌ها، بیشتر از روش‌های کلونینگ و بیان ژن استفاده می‌شود، ولی پروتئین‌هایی که به‌صورت نوترکیب تولید شده‌اند قابلیت‌های پروتئین‌های طبیعی را ندارند (۲۶). بنابراین در این تحقیق برای خالص‌سازی 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 تحقیقی‌که 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).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تست توبرکولین انسانی تولیدی در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی 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 تخلیص‌شده فیلترای کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* توانست بین عفونت به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با *مایکوباکتریوم بوویس* BCG (به‌عنوان کاندیدای واکسن BCG) و *مایکوباکتریوم آویوم* (به‌عنوان کاندیدای مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس) تمایز ایجاد کند، ولی با این وجود قطر هاله‌های ایجادشده 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 به‌صورت تست اختصاصی جهت تشخیص عفونت نهفته و فعال سل، در مواقعی‌که نتایج حاصل از تست توبرکولین مشکوک است به‌کار رود.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

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, Bruneswic 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 autocalaved Mycobacterium bovis BCG studied by crossed immunoelectrophiresis. 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.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:01 IRDT on Monday April 9th 2018

www.SID.ir