مقاله پژوهشی

بررسی سطح سرمی آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6 در بیماران مبتلا به سل در مقایسه با افراد سالم

حمیرا ایزدی[۱]، نوشین سهرابی[۱*]، مجیدتبیانیان[۲]، نادر مصوری[۲]، مهدی مهدوی[۳]

۱- گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳- گروه ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: بیماری سل، نوعی عفونت مشترک بین انسان و دام است که توسط باسیلی به نام *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد می‌شود. به دلیل وجود آنتی‌ژن‌های مشترک با انواع غیر بیماری‌زای این باکتری، تشخیص دقیق و سریع این بیماری دارای پیچیدگی است؛ لذا یافتن روش تشخیصی سریع با حساسیت و ویژگی بالا در این بیماری حائز اهمیت ویژه است. هدف از این مطالعه ارزیابی عیار سرمی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6، که مختص سویه‌های بیماری‌زای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است، در بیماران مبتلا به سل است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سطح سرمی آنتی‌بادی اختصاصی برعلیه آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6، در نمونه سرم ۵۵ بیمار مبتلا به بیماری سل و ۲۸ نمونه سالم، با روش الایزای غیرمستقیم اندازه‌گیری شد. درنهایت میزان حساسیت و ویژگی این روش در مقایسه با کشت باکتری محاسبه گردید.

نتایج: میزان آنتی‌بادی برعلیه آنتی‌ژن ESAT-6 در افراد مبتلا به سل به‌صورت کاملاً معناداری از افراد سالم بالاتر بود. درنتیجه آزمون الایزای انجام‌شده در این تحقیق، حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۸۵/۴۵ و ۸۰/۹ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از روش الایزا برای تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن ESAT-6 می‌تواند به‌عنوان روش تشخیصی دقیق و سریع جایگزین آزمون‌های قدیمی تشخیصی این بیماری شود.

کلمات کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، ESAT-6، آنتی‌بادی، الایزا

مقدمه

بیماری سل (توبرکلوزیس)، که به‌عنوان یکی از معضلات مهم بهداشتی و اقتصادی به‌ویژه در کشورهای درحال‌توسعه محسوب می‌شود، توسط باسیلی به نام *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد می‌شود و ازجمله عفونت‌های مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شود (۱). در سال‌های اخیر، با توجه به ایجاد مقاومت دارویی نسبت به این باکتری و شیوع عفونت ایدز، موج جدیدی از ابتلا به این بیماری مشاهده می‌شود (۱ و ۲). به دلیل عدم وجود اقدامات فوری برای کنترل سل و وجود آمار بالای مرگ و میر در جهان در اثر این بیماری، سازمان جهانی بهداشت آن را به‌عنوان یک فوریت جهانی اعلام کرده است. با توجه به این موضوع، تشخیص دقیق و سریع بیماری، در روند مبارزه با این عفونت حائز اهمیت فراوانی است (۲ و ۳). به دلیل پیچیدگی‌های ساختاری باکتری و وجود آنتی‌ژن‌های مشترک بین سویه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای مایکوباکتریوم، تشخیص این بیماری با مشکلاتی همراه است (۲ و ۳).

قدیمی‌ترین و رایج‌ترین روش تشخیص بیماری سل، آزمون جلدی توبرکولین (Tuberculin skin tests یا TST) است که در آن از عصاره تخلیص شده کشت مایکوباکتریوم (عصاره PPD)، که ترکیبی از آنتی‌ژن‌های ساختمانی این باکتری است، استفاده می‌شود (۲-۴). در این روش عصاره PPD به‌صورت داخل جلدی تزریق می‌شود و نتیجه آن به‌صورت میزان قرمزی و التهاب ایجادشده، بررسی و تفسیر می‌شود (۳ و ۵). ازجمله معایب این روش ایجاد واکنش‌های متقاطع با سایر

*نویسنده مسئول: نوشین سهرابی، استادیار، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
Email: nsohrabi75@yahoo.com

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.6.4.13.5]

مایکوباکتریوم‌های غیر بیماری‌زا و مشاهده نتایج مثبت کاذب است (۵ و ۶). علاوه بر این روش فوق را نمی‌توان در بسیاری از افراد دارای نقص ایمنی و یا مبتلا به ناراحتی‌های پوستی، مورداستفاده قرار داد (۴-۶).

از روش‌های دیگر تشخیص بیماری، کشت این باکتری در محیط اختصاصی لونشتن جانسون است که با وجود حساسیت بالا، به علت سخت رشد بودن باکتری روش مناسبی نیست (۴). رادیوگرافی سینه، روش تشخیصی دیگری است که علی‌رغم حساسیت بالا دارای ویژگی پایینی است (۴ و ۵). بررسی مستقیم میکروسکوپی نمونه خلط مطمئن‌ترین روش تشخیصی است ولی در مراحل اولیه ابتلا به بیماری، نمونه خلط از نظر وجود باکتری منفی است و کمکی به تشخیص سریع نخواهد کرد (۴ و ۵). از روش‌های جدید تشخیص این بیماری می‌توان به آزمون‌های سرولوژیک اشاره کرد (۷). اساس این روش‌ها ردیابی و اندازه‌گیری آنتی‌بادی ایجادشده بر علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی باکتری است که با روش‌های مختلف ازجمله الایزا انجام می‌شود (۸-۱۰). این دسته از آزمون‌ها دارای محاسن فراوانی هستند که ازجمله آن‌ها می‌توان به سهولت، سرعت و کاربردی بودن آن‌ها اشاره کرد. برای راه‌اندازی روش‌های سرولوژیک، شناسایی و به کاربردن آنتی‌ژن‌های اختصاصی و ایمنی‌زای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، نقش کلیدی دارد (۸ و ۱۰).

از بین آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آنتی‌ژن ESAT-6، با وزن مولکولی ۶ کیلو دالتون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۱-۱۳). این آنتی‌ژن در اوایل ابتلا به بیماری مورد شناسایی سیستم ایمنی قرار می‌گیرد و تنها ۷ روز پس از رشد باکتری در محیط کشت آن یافت می‌شود (۱۱ و ۱۳). آنتی‌ژن فوق تنها به مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا اختصاص دارد و در گونه‌های غیر بیماری‌زا و سویه‌های واکسینال یافت نمی‌شود؛ بنابراین برای روش‌های تشخیصی جهت تفکیک آلودگی به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سایر مایکوباکتریوم‌ها می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد (۱۱ و ۱۴). آنتی‌ژن ESAT-6، نه‌تنها از قوی‌ترین محرک‌های القا و تحریک سلول‌های T و ایمنی سلولی محسوب می‌شود، بلکه باعث القای پاسخ هومورال و ایجاد آنتی‌بادی در افراد آلوده می‌شود (۶ و ۱۳). نکته مهم درباره این آنتی‌ژن آن است که جمعیت‌های مختلف، پاسخ یکسانی به آن دارند و اغلب بیماران مبتلا به سل به این آنتی‌ژن پاسخ می‌دهند (۱۳ و ۱۴).

مجموعه ویژگی‌های فوق سبب شده است تا این آنتی‌ژن به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای طراحی روش‌های جدید تشخیص بیماری سل و همچنین طراحی واکسن‌های جدید موردتوجه قرار گیرد (۱۴ و ۱۵).

هدف ما از این مطالعه بررسی میزان آنتی‌بادی تولیدشده علیه آنتی‌ژن ESAT-6 در بیماران مبتلا به بیماری سل و پیشنهاد طراحی یک آزمون تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا و مبتنی بر تکنیک الایزا است که به تشخیص سریع و به‌موقع بیماری کمک می‌نماید.

مواد و روش‌ها

جمعیت موردمطالعه: این مطالعه از تاریخ آذرماه تا بهمن‌ماه سال ۹۲، بر روی نمونه خون ۵۵ بیمار بستری در بیمارستان‌های شهر تهران که تست خلط و رادیوگرافی سینه آن‌ها مثبت بود و ابتلای آن‌ها به بیماری سل توسط پزشک متخصص محرز گردیده و توسط کشت باکتری تائید شده بود، انجام شد. بیمارانی که نتیجه کشت آن‌ها منفی بود، از مطالعه حذف شدند. یک گروه ۲۸ نفره نیز که سالم بودند و هیچ سابقه برخورد قبلی با باکتری نداشته و آزمون جلدی توبرکولین در آن‌ها منفی بود به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. کلیه افراد تحت آزمایش، فرم رضایت‌مندی ورود به مطالعه را با آگاهی تکمیل کردند و شرایط مطالعه برای آن‌ها شرح داده شد. در طی این مدت از افراد بیمار و گروه کنترل مقدار ۵ سی‌سی خون گرفته شد و نمونه سرم آن‌ها جدا گردید و با رعایت اصول ایمنی تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه و بررسی آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6

آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6 بر طبق مطالعه انجام‌شده قبلی تهیه و مورداستفاده قرار گرفت (۱۶). جهت بررسی صحت آنتی‌ژن مذکور، آزمون‌های الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) با غلظت ۱۵ درصد از ژل جداکننده و وسترن بلات، با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد ESAT-6، انجام شد.

طراحی روش الایزا برای بررسی مقدار آنتی‌بادی برعلیه آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6

به‌منظور اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی تولیدشده علیه آنتی‌ژن ESAT-6، ابتدا غلظت‌های مناسب آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.6.4.13.5]

کونژوگه با استفاده از روش تیتراسیون جدول متقاطع تعیین شد. برای این منظور مقادیر مختلف از آنتی‌ژن فوق، به‌صورت رقت‌های سریالی، در ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوشاننده (بافر کربنات بیکربنات سدیم با pH=9.6) تهیه و به ترتیب به چاهک‌های مربوطه اضافه شد. چند چاهک نیز به‌عنوان کنترل‌های آنتی‌ژن، بافر مسدودکننده، آنتی‌بادی کونژوگه و کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

بعد از یک‌شب انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، محتویات چاهک‌ها تخلیه و سه مرتبه با محلول شستشو (بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار حاوی توئین ۲۰ با PH=7.4) شستشو داده شدند. سپس به داخل هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر محلول بلوکه کننده (سرم آلبومین گاوی ۲٪ وزنی حجمی) ریخته و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

متعاقب شستشوی مجدد، سرم‌های گروه آزمون و گروه کنترل در دو رقت مختلف ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها افزوده و مجدداً به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

بعد از شستشوی چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی نشان‌دار ضد ایمونوگلوبولین انسانی (HRP-conjugated goat anti-human immunoglobulin, Sigma Aldrich, USA) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه گردید. درنهایت، بعد از شستشوی نهائی، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (کروموژن) به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. پس از انجام واکنش، ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (اسیدسولفوریک ۰/۱ مولار) به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر Biotek مدل Elx808 (ساخت کشور آمریکا)، در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

جدول ۱- میزان جذب نوری حاصل از نمونه‌های مختلف در مجاورت آلبومین گاوی با درصدهای مختلف

درصدهای مختلف آلبومین گاوی	۱٪	۳٪	۵٪
نمونه بلانک	۰/۰۳۲	۰/۰۲۶	۰/۰۲۵
نمونه منفی	۰/۲۵۴	۰/۱۷۵	۰/۱۶۶
نمونه مثبت (رقت ۱/۱۰)	۲/۲۵۰	۲/۰۸۶	۱/۴۲۵
نمونه مثبت (رقت ۱/۱۰۰)	۰/۹۳۲	۰/۷۸۹	۰/۵۴۲

در این مطالعه از آلبومین سرم گاوی به‌منظور بافر مسدودکننده (Blocking) استفاده گردید که بهترین مقدار

تعیین نقطه برش و حساسیت و ویژگی

برای تشخیص نمونه‌های مثبت از نمونه‌های منفی، میزان نقطه برش (Cut off) به میزان میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی به‌علاوه ۳ واحد انحراف استاندارد محاسبه گردید. به‌منظور معتبرسازی روش الایزای انجام‌شده در این مطالعه، متغیرهای مختلف نظیر حساسیت و ویژگی نیز محاسبه گردید.

آزمون‌های آماری

تمام آزمایش‌ها برای سه بار تکرار شدند و نتایج به‌دست‌آمده به‌روش آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون T (تی تست) و در نرم‌افزار GraphPad Prism 7.00 (USA) مورد ارزیابی و آنالیز آماری قرار گرفتند.

نتایج

برای انجام این مطالعه ابتدا آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6 تهیه‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج به‌دست‌آمده مشابه نتایج ارائه‌شده در مقاله قبلی نگارنده بود (۱۶). بر همین مبنا آنتی‌ژن نوترکیب فوق در محدوده حدود ۱۰ کیلودالتون بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید که با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد ESAT-6 کونژوگه با آنزیم HRP واکنش نشان می‌داد (به دلیل مشابهت با نتایج قبلی، تصاویر ارائه نشده است).

برای محاسبه بهترین مقادیر جهت انجام آزمون الایزا، آزمون صفحه متقاطع انجام شد. درنتیجه غلظت مناسب آنتی‌ژن جهت کوتینگ، ۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.6.4.13.5]

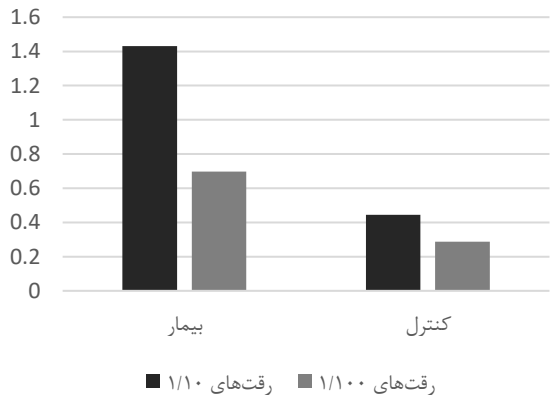
برای آن ۳ درصد تعیین شد (جدول ۱). بهترین رقت مورداستفاده از آنتی‌بادی کونژوگه نیز رقت ۱/۲۰۰۰ است (جدول ۲).

۰/۳۱۱± و ۰/۰۹۶±۰/۲۰۰ به دست آمد (نمودار ۱). میانگین جذب نوری گروه‌های بیماران و افراد سالم تحت مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بوده است (p=0.01).

جدول ۲- میزان جذب نوری حاصل از نمونه‌های مختلف در مجاورت رقت‌های مختلف آنتی‌بادی کونژوگه

رقت‌های مختلف آنتی‌بادی کونژوگه	۱/۲۰۰۰	۱/۵۰۰۰	۱/۱۰۰۰۰	۱/۲۰۰۰۰
نمونه بلانک	۰/۰۴۶	۰/۰۴۱	۰/۰۳۵	۰/۰۳۶
نمونه منفی	۰/۴۱۰	۰/۲۲۱	۰/۱۹۷	۰/۱۷۵
نمونه مثبت (رقت ۱/۱۰)	۲/۸۷۰	۲/۲۱۰	۱/۵۱۱	۱/۰۱۴
نمونه مثبت (رقت ۱/۱۰۰)	۱/۲۴۱	۱/۱۰۵	۰/۷۰۹	۰/۶۴۱

رقت‌های سرمی مورداستفاده در گروه آزمون و گروه کنترل رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ می‌باشند. پس از انجام تست و خوانش توسط دستگاه الایزا ریدر، جذب نوری نمونه‌های گروه آزمون (سرم‌های آلوده) برای هر دو رقت قرائت گردید و نمودار آن‌ها رسم شد.



نمودار ۱- نمودار حاصل از جذب نوری نمونه‌های بیمار و کنترل در رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰

از جمع میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی با یک برابر انحراف معیار، نقطه برش آزمون محاسبه شد. میانگین جذب نوری نمونه‌های گروه آزمون برای رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ به ترتیب ۱/۴۳۰±۰/۴۴۵ و ۰/۶۹۱ ±۰/۲۸۷ محاسبه گردید. همچنین میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی، در رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ محاسبه گردید و به ترتیب، مقادیر ۰/۱۰۵

با توجه به نتایج حاصله رقت سرمی ۱/۱۰ مورد ارزیابی نهایی قرار گرفت که براین اساس، نقطه برش آن به مقدار ۰/۴۱۶ و میزان حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۸۵/۴۵٪ و ۸۰٪/۹ محاسبه گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

توبرکلوزیس یک مشکل بزرگ جهانی است و در اکثر کشورهای درحال‌توسعه درصد بالایی از مرگ‌ومیر را شامل می‌شود (۱ و ۲). آزمون جلدی TST و کشت خلط و رادیوگرافی سینه از متداول‌ترین روش‌های تشخیص این بیماری بوده که هرکدام از آن‌ها با معایبی همراه هستند که ازجمله آن‌ها می‌توان به‌وقت گیر بودن و سختی انجام آن‌ها اشاره کرد (۵ و ۶). امروزه فن‌آوری الایزا به‌عنوان یک روش مناسب برای تشخیص اکثر بیماری‌های عفونی به کار می‌رود و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های تشخیصی قدیمی مورداستفاده قرار گیرد (۷ و ۹). از مزایای روش الایزا می‌توان به‌سرعت زیاد انجام تست، آسان بودن، قابلیت طراحی آن برای انواع آنتی‌ژن‌ها، توانایی سنجش تعداد زیاد نمونه به‌طور هم‌زمان و مقرون‌به‌صرفه بودن آن اشاره کرد (۶).

به همین دلیل، هدف از این مطالعه اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی تولیدشده علیه آنتی‌ژن ESAT-6 *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و پیشنهاد روش تشخیصی جدید با حساسیت و ویژگی بالا (نسبت به روش‌های قدیمی موجود) در تشخیص بیماری سل است.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.6.4.13.5]

پروتئین ESAT-6 یکی از آنتی‌ژن‌های ترشحی باکتری با وزن مولکولی حدود ۶ کیلو دالتون است که به دلایلی مثل دخالت در ایمنی سلولی و هومورال (دارا بودن خاصیت ایمنی‌زائی قوی) و همچنین تولید سریع آن پس از ابتلا به بیماری (۱۱ و ۱۳)، به‌عنوان آنتی‌ژن مناسب برای این آزمون انتخاب شد.

دستا و همکاران روش الایزا را برای اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی تولیدشده علیه آنتی‌ژن‌های ESAT-6 و CFP-10 انجام داده و به ویژگی ۷۰ درصد برای این روش دست یافتند.

همچنین این گروه سطح اینترفرون گامای ترشح شده از لنفوسیت‌های T را پس از گذشت هفت روز از تزریق این آنتی‌ژن‌ها بررسی کردند و مشاهده کردند که ۸۴/۸ درصد از نمونه‌ها به این آنتی‌ژن‌ها پاسخ مثبت نشان دادند (۱۷).

سانگ و همکاران با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال و روش الایزا، پاسخ‌های ایمنی علیه ESAT-6 را روی نمونه CSF بیماران مبتلا به سل بررسی کردند این گروه به نتیجه‌ای معادل ۸۲ درصد حساسیت و ۹۲ درصد ویژگی دست یافتند (۱۸).

آرایو و همکاران میزان حساسیت روش الایزا را در بررسی پاسخ ایمنی علیه پروتئین ESAT-6، ۹۶/۹ به دست آوردند. این گروه همچنین پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن Ag85A را نیز انجام دادند و به حساسیت مشابهی برابر ۹۷/۴ دست یافتند. این روش برای غربالگری افراد واکسینه و مبتلایان به سل پیشنهاد گردید (۱۹).

سوزا و همکاران با ترکیب پروتئین‌های نوترکیب CFP-10، ESAT-6، Mbp83، PE13T PE5، TB15.3، TB13.4 اقدام به انجام یک آزمون تشخیصی برای سل گاوی با روش الایزا کردند و مشاهده کردند که حساسیت روش و ویژگی این روش در مقایسه با تست جلدی، به ترتیب ۸۶/۵٪ و ۸۳/۲٪ بوده است (۲۰). ویسنتی و همکاران از آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6 در تشخیص سل فعال از سل پنهان استفاده کردند. در این مطالعه نیز از اندازه‌گیری سطح اینترفرون گاما در افراد پس از تحریک توسط پپتید ESAT-6 استفاده شد و از گروه ۲۷ نفره موردمطالعه ۲۰ نفر به این تحریک پاسخ مثبت دادند (۲۱).

پروتئین‌های نوترکیب مایوباکتریوم توبرکلوزیس در ایران نیز به‌صورت مجزا و یا همراه با هم با موفقیت کلون و بیان شده‌اند (۲۲ و ۲۳) و در زمینه تشخیصی نیز مورداستفاده قرار گرفته‌اند. در مطالعه صورت گرفته توسط آقای همتی و همکاران وی ارزش تشخیصی پروتئین‌های نوترکیب ESAT-6 و CFP-10 در آزمون ELISPOT مورد تأکید قرار گرفته است (۲۴). خانم مرادی و همکاران وی نیز از پروتئین نوترکیب ESAT-6 در آزمون جلدی در مدل خوکچه‌هندی استفاده کردند و نتایج به‌دست‌آمده نشان از اختصاصیت بالای این پروتئین داشته است (۲۵).

با توجه به محاسبات به‌دست‌آمده در این مطالعه و مقایسه آن با حساسیت و ویژگی تست جلدی و همچنین در نظر گرفتن مزایای روش الایزا مانند سهولت انجام، نیاز کم به نمونه، مقرون‌به‌صرفه بودن و قابلیت جواب دهی این روش در اوایل ابتلا به بیماری سل، می‌توان اندازه‌گیری آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن ESAT-6 در بیماری سل را به‌عنوان راهکار مناسبی برای تشخیص سریع و دقیق این بیماری پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم حمیرا ایزدی است. بدین‌وسیله از کلیه همکاران و پرسنل گرامی دانشگاه پیام نور و موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و بیمارانی که در این تحقیق شرکت داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Glaziou P, Falzon D, Floyd K, Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis. Semin Respir Crit Care Med. 2013;34(1):3-16

2. Cheon SA, Cho HH, Kim J, Lee J, Kim HJ, Park TJ. Recent tuberculosis diagnosis toward the end TB strategy. J Microbiol Methods. 2016; 123:51-61.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.6.4.13.5]

3. Oftung F, Borka E, Kvalheim G, Mustafa AS. Mycobacterial crossreactivity of M. tuberculosis reactive T cell clones from naturally converted PPD positive healthy subjects. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998; 20(3):231-8.
4. Arias Guillén M. Advances in the diagnosis of tuberculosis infection. Arch Bronconeumol. 2011; 47(10):521-30.
5. Turetz ML, Ma KC. Diagnosis and management of latent tuberculosis. Curr Opin Infect Dis. 2016;29(2):205-11.
6. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosisinfection. Health Technol Assess. 2007; 11(3):1-196.
7. She RC, Litwin CM. Performance of Tuberculosis Serologic Assay in Various Patient Populations. Am J Clin Pathol. 2015; 144(2):240-6.
8. Kim CK, Choi SW, Park MS. Utilization of laboratory tests for tuberculosis and mycobacterial disease in Korea. Osong Public Health Res Perspect. 2014; 5(Suppl):S24-9.
9. Tiwari D, Tiwari RP, Chandra R, Bisen PS, Haque S. Efficient ELISA for diagnosis of active tuberculosis employing a cocktail of secretory proteins of Mycobacterium tuberculosis. Folia Biol (Praha). 2014; 60(1):10-20.
10. Moon HW, Hur M. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosisinfection: an updated review. Ann Clin Lab Sci. 2013; 43(2):221-9.
11. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends Microbiol. 2004;12(11):500-8.
12. Samten B, Wang X, Barnes PF. Immune regulatory activities of early secreted antigenic target of 6-kD protein ofMycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis vaccine design. Tuberculosis (Edinb). 2011;91 Suppl 1:S114-8.
13. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, Behr-Perst S, Colangeli R, Gennaro ML, et al. Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT6 in tuberculosis patients andhealthy donors. Eur J Immunol. 1998;28(12):3949-58.
14. Amicosante M, Ciccozzi M, Markova R. Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection: guidelines and cost effectiveness studies. New Microbiol. 2010;33(2):93-107.
15. Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. Tuberculosis (Edinb). 2008; 88(6):510-7.
16. Tebianian M, Zavaran Hoseini A, Ebrahimi SM, Rezaei Mokaram A, Taghizadeh M, Asli E. Cloning and expression of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 in prokaryotic system. Arch of Razi Instit 2009. 64(1): (2009) 1-7.
17. Kassa D, Ran L, Geberemeskel W, Tebeje M, Alemu A, Selase A, et al. Analysis of immune responses against a wide range of Mycobacterium tuberculosis antigens inpatients with active pulmonary tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2012; 19(12):1907-15.
18. Song F, Sun X, Wang X, Nai Y, Liu Z. Early diagnosis of tuberculous meningitis by an indirect ELISA protocol based on the detectionof the antigen ESAT-6 in cerebrospinal fluid. Ir J Med Sci. 2014; 183(1):85-8.
19. Araujo Z, Giampietro F, Bochichio Mde L, Palacios A, Dinis J, Isern J, et al. Immunologic evaluation and validation of methods using synthetic peptides derived from Mycobacterium tuberculosis for the diagnosis of tuberculosis infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(2):131-9.
20. Souza II, Melo ES, Ramos CA, Farias TA, Osório AL, Jorge KS, et al. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosisof bovine tuberculosis. Springer plus. 2012; 1(1):77.
21. Vincenti D, Carrara S, De Mori P, Pucillo LP, Petrosillo N, Palmieri F, et al. Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the immunodiagnosis of activetuberculosis. Mol Med. 2003; 9(3-4):105-11.
22. Tebianian M, Hoseini AZ, Ebrahimi SM, Memarnejadian A, Mokarram AR, Mahdavi M, et al. Cloning, expression, and immunogenicity of novel fusion protein of Mycobacterium tuberculosis based on ESAT-6 and truncated C-terminal fragment of HSP70. Biologicals. 2011; 39(3):143-8.
23. Mahmoudi Sh, Mamishi S, Ghazi M, Hosseinpour Sadeghi R, Pourakbari B. Cloning, expression and purification of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 antigens. Iran J Microbiol. 2013; 5(4): 374–378.
24. Moradi J, Mosavari N, Ebrahimi M, Arefpajohi R, Tebianian M. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis Early Secreted Antigenic Target 6 Recombinant Protein as a Diagnostic Marker in Skin Test. Osong Public Health Res Perspect. 2015; 6(1):34-8.
25. Hemmati M, Seghatoleslam A, Rasti M, Ebadat S, Mosavari N, Habibagahi M. Expression and Purification of Recombinant Mycobacterium Tuberculosis (TB) Antigens, ESAT-6, CFP-10 and ESAT- 6/CFP-10 and Their Diagnosis Potential for Detection of TB Patients. Iran Red Crescent Med J. 2011; 13(8): 556–563.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.6.4.13.5]

Original Article

Evaluation of Serum Specific Antibody against Recombinant ESAT-6 Antigen in Patients with Tuberculosis and Comparing to Normal Controls

Izadi H[1], Sohrabi N[1]*, Tebianian M[2] Mosavari N[2], Mahdavi M[3]

1- Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2- Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 18 Jun 2016 Accepted: 01 Nov 2016

Abstract

Background & Objective: Tuberculosis (TB) is a zoonotic disease which is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Because of common structural and secretory antigens between pathogen and nonpathogenic mycobacterium, the specific diagnosis of TB is difficult. Therefore, it is very important to find a new method with high specificity and sensitivity for accurate and rapid diagnosis of tuberculosis. In this study, the serodiagnostic potential of Mycobacterium tuberculosis recombinant ESAT-6 in TB infected patients was evaluated by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).
Materials & Methods: 55 TB patients with active disease and 28 healthy controls have been collected and evaluated in different dilutions in ELISA methods for the presence of specific anti-ESAT-6 antibody. The specificity and the sensitivity of this method was compared with the culture test.
Results: TB patients have high levels of specific antibody against ESAT-6 antigens. The specificity and the sensitivity of this method was calculated as 80.90% and 85.45%, respectively.
Conclusion: These findings provide useful information on the importance of ESAT-6 protein and suggested this serologic test as a good alternative method for rapid and prefect diagnosis of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6, Antibody, ELISA

***Corresponding author: Nooshin Sohrabi,** Department of Biology, Payame Noor Universtiy, Tehran, Iran
Email: nsohrabi75@yahoo.com

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-15]

Journal of Fasa University of Medical Sciences 6 (2017): 474-480

[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.6.4.13.5]