

Identification of Mycobacterium Tuberculosis Complex Infection in Human By Indirect ELISA Using Low Molecular Weight Proteins from Culture Filtrate of Mtb Strain C

Mozhgan Khosrobeygi¹,
Nader Mosavari²,
Mitra Salehi³,
Naheed Mojjani⁴,
Majid Akbari⁵

¹ PhD Candidate in Microbiology, Department of Biological Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Tuberculin and Mallein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Tuberculin and Mallein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received June 1, 2022 ; Accepted September 11, 2022)

Abstract

Background and purpose: Tuberculosis is one of the major global health problems with high mortality. Establishing a rapid and low-cost identification method is significant, especially in developing countries. In this study, we aimed to design an indirect ELISA system with low molecular weight antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis* strain C, for identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex infection in human.

Materials and methods: The secretory proteins from culture filtrate of *Mtb* strain C extracted by Sephadex-G50 were used as target antigen in designing an indirect ELISA system. Then, human sera with tuberculin skin test, culture, acid-fast bacilli smear, and PCR test results were selected to detect human serum antibodies against these low molecular weight proteins.

Results: During gel chromatography and SDS-PAGE (12.5%) analysis, the purified protein F2 fractions with approximately 0.7 mg/ml and molecular weights in the range of 14-40 kDa were used as the target antigen in designing the indirect ELISA system. The ELISA system designed by F2 showed 78% sensitivity and 92% specificity in identifying tuberculosis.

Conclusion: The ELISA results based on low molecular weight proteins, with the sensitivity and specificity achieved in this study, might support the hypothesis that the *Mtb* culture filtrate antigens could be used as a rapid and sensitive assay in ELISA test for detection of pulmonary TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, low-molecular weight proteins, SDS-PAGE, indirect ELISA

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (214): 90-101 (Persian).

Corresponding Author: Nader Mosavari - Department of Tuberculin and Mallein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. (E-mail: n.mosavari@rvsri.ac.ir)

شناسایی عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس در انسان به روش الیزای غیرمستقیم، با استفاده از پروتئین‌های سبک‌وزن به دست آمده از فیلتراسیون کشت *Mtb* سویه C

مژگان خسروبیگی¹

نادر مصوری²

میترا صالحی³

ناهید مژگانی⁴

مجید اکبری⁵

چکیده

سابقه و هدف: سل از مشکلات اصلی سلامت جهانی با مرگ‌ومیر بالاست. ایجاد یک روش شناسایی سریع و ارزان به خصوص در کشورهای در حال توسعه، بسیار قابل توجه است. از این رو در این مطالعه، طراحی سیستم الیزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین، جدا شده از فیلتراسیون کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C، جهت شناسایی عفونت *Mycobacterium tuberculosis Complex* در انسان، مورد هدف قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از پروتئین‌های ترشحی *Mtb* سویه C جدا شده با Sephadex-G50 به عنوان آنتی‌ژن هدف، در طراحی سیستم الیزا استفاده شد. سپس نمونه سرم موارد بالینی دارای نتایج تست توبرکولین، کشت، اسمیر میکروسکوپی اسید فست و PCR، با هدف ردیابی آنتی‌بادی علیه این پروتئین‌های سبک‌وزن، توسط سیستم الیزای طراحی شده، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از میان فرکشن‌های پروتئینی به دست آمده از کروماتوگرافی، فرکشن دوم (F2) با غلظت تقریبی 0/7mg/ml و باندهای پروتئینی در محدوده 14-40 کیلو دالتون در آنالیز SDS-PAGE (12.5%)، به عنوان آنتی‌ژن هدف در طراحی سیستم الیزا مورد استفاده قرار گرفت. سیستم الیزای طراحی شده، 78 درصد حساسیت و 92 درصد ویژگی در شناسایی افراد مبتلا به سل ریوی داشت.

استنتاج: نتایج حاصل از سیستم الیزای غیرمستقیم بر پایه پروتئین‌های سبک‌وزن، با حساسیت و ویژگی به دست آمده در این مطالعه، این فرضیه را پشتیبانی می‌کند که آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین موجود در فیلتراسیون کشت *Mtb* می‌تواند در تست الیزا به عنوان ابزار شناسایی مفید در شناسایی بیماران مبتلا به سل ریوی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پروتئین‌های سبک‌وزن، SDS-PAGE، الیزای غیرمستقیم

مقدمه

سل، بیماری عفونی حاد یا مزمنی است که باعث درگیری ارگان‌های مختلف بدن، به خصوص ریه‌ها می‌شود. تا قبل از همه‌گیری ویروس کرونا (COVID-19)، سل، عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از یک عامل عفونی

E-mail: n.mosavari@rvsi.ac.ir

مؤلف مسئول: نادر مصوری - کرج: موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالین

1. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

2. دانشیار، بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالین، موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، البرز، کرج، ایران

3. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

4. استادیار، بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالین، موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، البرز، کرج، ایران

5. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

© تاریخ دریافت: 1401/3/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/5/2 تاریخ تصویب: 1401/6/20

با وزن مولکولی پایین از جمله کمپلکس آنتی‌ژنی ESAT-6 /CFP-10 می‌باشند. ترکیب ESAT-6 و CFP-10، هر دو به تشخیص محیطی و آزمایشگاهی سل حساس هستند. در انسان‌ها، این ترکیب 73 درصد حساسیت و 93 درصد دقت نسبت به PPD داشته است (8). ESAT-6 پاسخ پوستی مثبت در خو کچه‌های هندی و انسان آلوده به *Mtb* ایجاد می‌کند (9).

یکی از روش‌های سرولوژیک در تشخیص بیماری سل که به تازگی مورد توجه قرار گرفته، تست الایزا، جهت ردیابی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی *Mtb* در نمونه سرم افراد مسلول هست. تست الایزا به دلیل سهولت نمونه‌گیری و نتایج سریع و نسبتاً ارزان، آزمایش مطلوبی برای شناسایی عفونت سل است. برای انجام الایزا به آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با درجه خلوص بالا نیاز است (10). از این رو در این پژوهش، طراحی سیستم الایزا، جهت شناسایی عفونت *Mtb Complex* در انسان، به کمک ردیابی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های استخراج شده با وزن مولکولی پایین (از فیلتراسیون کشت *Mtb* سویه C) در سرم بیماران مورد مطالعه انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و آماده‌سازی خون

مقدار 3 سی‌سی خون وریدی از بیماران مراجعه کننده به مرکز درمانی گرفته و بعد از سانتریفیوژ، سرم بیماران جدا و در فریزر 20- نگه‌داری شدند. لازم به ذکر است نمونه‌های انسانی در این مطالعه پس از تأیید کمیته اخلاق در پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک، با اخذ کد اخلاقی IR.ARAKMU.REC.1397.273 و رضایت آگاهانه از بیماران جمع‌آوری شدند.

آنتی‌ژن‌های آنتی‌ژن سبک‌وزن مورد استفاده

آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین، از فیلتراسیون کشت 6 الی 8 هفته‌ای *Mtb* سویه C با شماره ATCC 35808 TMC 116 در موسسه تحقیقات و ساخت

بود که بالاتر از HIV/AIDS قرار داشت (1). طبق آخرین آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) روزانه 4000 نفر در اثر بیماری سل جان خود را از دست داده و سالانه 10 میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا می‌شوند و با وجود این که یک بیماری قابل پیشگیری و درمان است، 1/5 میلیون نفر در سال از سل می‌میرند و این آمار آن را به قاتل عفونی دنیا تبدیل کرده است (2،3). *Mycobacterium tuberculosis*، عامل بیماری سل، گونه‌ای بیماری‌زا از خانواده *Mycobacteriaceae* و جنس مایکوباکتریوم است. روش‌های آزمایشگاهی رایج در تشخیص سل شامل؛ تست پوستی توبرکولین، کشت از نمونه بالینی بیمار، رنگ‌آمیزی اسید فست و عکس برداری اشعه ایکس از قفسه سینه (4)، محدودیت‌های بی‌شماری از جمله ویژگی و حساسیت پایین تست پوستی توبرکولین، حساسیت بسیار پایین اسمیر اسیدفست، زمان طولانی جهت کشت و هزینه‌های بالا در روش‌های مولکولی مانند PCR دارد (5) آزمایش‌های سرولوژیک، پاسخ ایمنی هومورال، یعنی حضور آنتی‌بادی در سرم، علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی *Mtb* را اندازه‌گیری می‌کند. آزمایش‌های سرولوژیک نسبت به کشت سریع‌تر در دسترس قرار گرفته و مشکلاتی مانند عدم رشد را ندارد، در نتیجه از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (6). تعیین مناطق ژنوم *Mtb* که در BCG و بیش‌تر مایکوباکتری‌های غیرتوبرکلوزیس دیده نمی‌شود، فرصتی برای توسعه ابزار تشخیصی جدید فراهم می‌کند. بررسی DNA ژنومی، حضور دو ژن ESAT-6 و CFP-10 را در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس نشان می‌دهد، در حالی که این دو ژن نمی‌توانند در هر سویه واکسن BCG و در (NTM *Non-Tuberculosis Mycobacteria*) دیده شوند (7). این پروتئین‌ها که در ناحیه RD-1 ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس رمزگذاری شده‌اند، دقیق‌تر از مشتقات پروتئین تصفیه‌شده هستند و از تمامی سویه‌های BCG و بیشتر مایکوباکتریوم‌های محیطی حذف و دارای ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن‌های پروتئینی

واکسن و سرم سازی رازی کرج، جداسازی و تلخیص شده و در طراحی سیستم الیزای غیرمستقیم در این مطالعه، مورد استفاده قرار گرفتند (11).

چکربورد (Checker board)

جهت تعیین بهترین غلظت آنتی ژن و بهترین رقت آنتی بادی، چکربورد انجام شد (12). به طوری که محلول آنتی ژن با استفاده از بافر کربنات بی کربنات (pH:9.6) به عنوان بافر کوتینگ، به طور سریالی در عرض پلیت و محلول آنتی بادی کوتینگ در طول پلیت رقیق شدند. سپس یک آنتی بادی ثانویه نشان دار شده با آنزیم (HRP Goat Anti-Human) در یک غلظت ثابت به تمام چاهک ها افزوده و با کامل شدن مراحل سنجش، غلظت های مناسب آنتی ژن و آنتی بادی محاسبه شد (12-14).

کوتینگ

بعد از جداسازی و تلخیص، آنتی ژن F2 با غلظت تقریبی 0/7 mg/ml (از پروتئین کل با غلظت 1/662mg/ml) به عنوان آنتی ژن هدف، به صورت سریالی در عرض پلیت (میکروپلیت های 96 خانه تست الیزا، خریداری شده از شرکت JET BIOFIL) رقیق شد. از آنجایی که در فرایند چکربورد معمولاً آنتی ژن را با غلظت اولیه 20µg/ml کوت می کنند، با توجه به فرمول زیر غلظت F2 اولیه برای شروع فرایند کوتینگ در تست چکربورد تعیین شد:

$$F2 = 0.7 \text{ mg/ml} = 700 \text{ µg/ml}$$

$$M1V1 = M2V2 \quad 1000 \times 20 = 700 \times F2 \quad \sim 30 \lambda / \text{Plate}$$

بنابراین میزان 30 لاندا از آنتی ژن F2 در 970 لاندا بافر کوتینگ رقیق شد. سپس در چاهک های ردیف اول، مقدار 200 لاندا از این محلول آنتی ژن و به بقیه چاهک ها فقط 100 لاندا بافر کوتینگ اضافه شد. در مرحله بعد از چاهک های ستون اول، 100 لاندا به چاهک های ستون دوم انتقال داده شد. در مرحله بعد 100 لاندا از چاهک های ستون دوم به ستون سوم انتقال داده شد و الی آخر... تا یک سریال رقت افقی ایجاد

شود. در نهایت 100 لاندا از چاهک های ستون یازدهم برداشته و دور ریخته شد. به این ترتیب، آنتی ژن در طول پلیت از رقت 1 تا 1/1024 رقیق شد. بعد از پایان رقیق سازی، چاهک های ردیف اول حاوی فقط آنتی ژن و چاهک های ردیف آخر، حاوی فقط بافر کوتینگ بودند. بعد از رقیق سازی، پلیت با فویل پوشانده و به مدت 16 تا 18 ساعت بر روی یک سطح صاف در سردخانه در دمای 4 نگه داری شد.

بلاکینگ

روز بعد پلیت ها از سردخانه خارج و محتویات آن ها به آرامی خالی شد. پلیت ها سه بار و هر بار به اندازه 300 لاندا با بافر فسفات بدون توئین شستشو داده شد. سپس به هر چاهک، میزان 150 لاندا Blocking Buffer اضافه شد. جهت تهیه بلاکر، میزان 2 گرم سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin) در 100 سی سی بافر فسفات حل شد. بعد از ریختن بلاکر، روی پلیت ها فویل کشیده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس پلیت ها خالی و 20 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شوند.

مرحله رقیق سازی سرم های انسانی

سرم های انسانی به عنوان آنتی بادی اولیه، با استفاده از Serum Diluent به میزان 1/20، 1/50 و 1/100 در طول پلیت رقیق شدند. سپس 100 لاندا از هر نمونه به چاهک ها اضافه شد. پلیت ها با فویل آلومینیومی پوشانده و به مدت سی دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از گذشت سی دقیقه، چاهک ها خالی و با بافر شستشو (بافر فسفات با توئین 0/01 درصد به عنوان Washing Buffer) 5 بار و هر بار به میزان 300 لاندا، شستشو داده شد.

اضافه کردن آنتی بادی ثانویه

برای آنتی بادی ثانویه، میزان 100 لاندا آنزیم

یافته ها

نتایج چکربرد

در طراحی سیستم الایزای غیرمستقیم، آنتی ژن F2 با غلظت تقریبی 0/7 mg/ml (از پروتئین کل با غلظت 1/662mg/ml) به عنوان آنتی ژن اصلی استفاده شد. با توجه به غلظت اولیه 20µg/ml از آنتی ژن F2 جهت شروع فرایند کوتینگ، به ازای هر پلیت 96 تایی، 30 لاند آنتی ژن خالص با 970 لاند بافر کوتینگ رقیق و به صورت سریالی در پلیت الایزا رقیق شد. سپس به صورت دوتایی با استفاده از رقت های 1/20، 1/50 و 1/100 سرم انسانی فرد TB مثبت و فرد سالم (مشخصات نمونه ها در جدول شماره 1 آورده شده) چکربرد انجام شد، به طوری که آنتی ژن F2 در عرض پلیت و سرم انسانی در طول پلیت رقیق شدند (تصویر شماره 1). سپس با محاسبه میانگین داده ها در هر گروه با استفاده از نرم افزار Excel و با توجه به نتایج حاصل از چکربرد (جدول شماره 2)، میزان Signal/Noise برای هر گروه از داده ها تعیین و بهترین غلظت آنتی ژن برای هر چاهک (Per Well) 2/5 µg/ml و بهترین رقت آنتی بادی (Per Well) 1/100 به دست آمد (نمودار شماره 1 و جدول شماره 3).

جدول شماره 1: مشخصات نمونه های استفاده شده در چکربرد

Samples	مشخصات	Sputum Culture	PPD	.S
Pos Sample	M* 81	+	> 15 mm	+
Neg Sample	F** 49	-	1 mm	-

*Male

**Female

جدول شماره 2: نتایج چکربرد حاصل از میانگین داده ها

Ag (µg)	1	2	3	4	5	6
A(20µg)	1/959	0/495	0/645	0/2275	0/555	0/1635
B(10)	1/253	0/3115	0/597	0/19	0/501	0/1255
C(5)	1/143	0/309	0/567	0/176	0/492	0/1155
D(2.5)	1/013	0/287	0/536	0/1695	0/485	0/1135
E(2)	1/012	0/277	0/524	0/164	0/466	0/108
F(1.5)	1/948	0/2585	0/505	0/1595	0/452	0/104
G(1)	0/884	0/2315	0/443	0/1525	0/426	0/1025
H(No Ag)	0/142	0/121	0/226	0/1105	0/216	0/0795
	1/20 pos	1/20 neg	1/50 pos	1/50 neg	1/100 pos	1/100 neg

HRP Goat Anti-Human با رقت 1/10000 تهیه شده از شرکت Abcam استفاده شد. بعد از ریختن آنتی بادی ثانویه، پلیت ها به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و مجدداً شستشو داده شدند.

متوقف کردن واکنش و خواندن OD

در ایمن مرحله 100 لاندا TMB (Tetramethylbenzidine) به عنوان سوپسترای رنگزا به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت 10 دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شدند. با مشاهده رنگ آبی داخل چاهک ها، 100 لاندا محلول STOP جهت توقف واکنش به هر چاهک اضافه شد. بعد از اضافه کردن STOP، رنگ آبی میکروپلیت ها، تبدیل به رنگ زرد شد. سپس OD چاهک ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر Bio Rad در طول موج 450 نانومتر خوانده شد.

تعیین Cutoff

جهت تعیین کات آف تعداد 30 نمونه سرم از افراد سالم تهیه و تست الایزا با استفاده از آنتی ژن های استخراج شده، برای این نمونه ها انجام شد. لازم به ذکر است بهترین غلظت آنتی ژن و مناسب ترین رقت آنتی بادی جهت انجام تست، با توجه به نتایج حاصل از چکربرد به دست آمد. به طوری که برای 30 چاهک میزان 375 لاندا F2 در 3000 لاندا بافر کوتینگ حل و به هر چاهک، 100 لاندا از این مخلوط اضافه شد. سرم افراد نیز به میزان 1/100 رقیق شدند. بعد از انجام تست الایزا، داده ها در فایل اکسل جمع آوری، میزان استاندارد انحراف معیار (SD) و میانگین (Mean) حاصل از داده ها توسط نرم افزار Excel مشخص و مقدار کات آف با استفاده از فرمول $Cut\ off = (Mean + 2SD)$ محاسبه شد. همچنین، حساسیت و ویژگی تست الایزای طراحی شده با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

$$Sensitivity = \frac{\text{True Positives}}{\text{True Positives} + \text{False Negatives}}$$

$$Specificity = \frac{\text{True Negatives}}{\text{True Negatives} + \text{False Positives}}$$

مثبت و منفی است، در تست‌های بعدی، OD های بالاتر از کات آف، مثبت و OD های پایین تر از آن به عنوان منفی در نظر گرفته شدند.

جدول شماره 4: نتایج الیزا نمونه‌های منفی جهت تعیین کات آف

4	3	2	1	
0/652	0/68	0/203	0/389	A
0/446	0/35	0/507	0/484	B
0/446	0/23	0/676	0/339	C
0/447	0/449	0/357	0/491	D
0/443	0/68	0/612	0/549	E
0/330	0/583	0/676	0/304	F
	0/715	0/376	0/354	G
	0/657	0/638	0/73	H

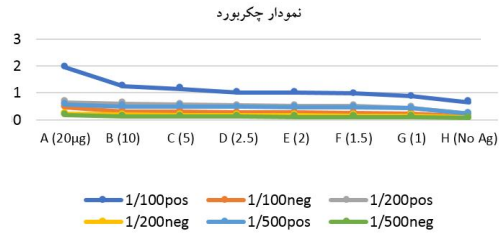
SD=0/1552101 Mean=0/5045926 Cut off=(Mean+ 2SD) = 0/81501

نتایج تست الیزا بعد از گرفتن کات آف

بعد از جمع آوری نمونه‌های انسانی، F2 به میزان 1/8 و سرم افراد نیز به میزان 1/100 رقیق و الیزا انجام شد. در چاهک شماره 4 و 5 چهار نمونه کنترل منفی، در چاهک شماره 6 مثبت و چاهک آخر بدون سرم بارگزاری شدند. نتایج تست الیزا در جدول شماره 5 و مشخصات بیماران در جدول شماره 6 آورده شده است. در تست الیزای انجام شده، 27/5 درصد (n=22) از نمونه‌ها دارای OD \geq Cut off بودند که از این میان، با توجه به نتایج تست PPD، الیزا، اسمیر میکروسکوپی، کشت و PCR برای هر بیمار که در جدول شماره 7 نشان داده شده است، 20 درصد (n=16) مبتلا به TB فعال، 2/5 درصد (n=2) مبتلا به LTBI و 5 درصد (n=4) مثبت کاذب تشخیص داده شدند. لازم به ذکر است که در تفسیر کلیه نتایج، استاندارد طلایی تشخیص، نتیجه کشت در نظر گرفته شد.

بررسی همبستگی بین نتایج الیزا و کشت

جهت بررسی نتایج حاصل از الیزا در مقایسه با کشت، کلیه نتایج با توجه به کات آف به دست آمده به صورت کیفی (مثبت و منفی) تعریف شد و توسط نرم افزار آماری IBM SPSS Statistics (version 26.0) جدول توافق 2x2 دو متغیر مطابق جدول شماره 7 به دست آمد.



نمودار شماره 1: نتایج چکربرد حاصل از میانگین داده‌ها



تصویر شماره 1: بلیت طراحی چکربرد برای آنتی ژن F2؛ بعد از اضافه کردن TMB (a) و بعد از اضافه کردن Stop (b)

جدول شماره 3: میزان Signal به Noise داده‌ها

S/N 1/100	S/N 1/50	S/N 1/20	Ag
3/4	2/8	4/263	20 μ g
3/9	3/14	4/02	10
4/259	3/22	3/6	5
4/34	3/1	3/5	2/5
4/27	3/2	3/6	2
4/31	3/16	3/8	1/5
4/1	2/9	3/8	1
2/7	2/04	1/17	No Ag

محاسبه کات آف

برای تعیین کات آف، تعداد 30 نمونه سرم افراد سالم که قطعاً منفی بودند، تهیه و الیزای غیرمستقیم با استفاده از F2، برای این نمونه‌ها انجام شد (جدول شماره 4). F2 به میزان 1/8 و سرم افراد به میزان 1/100 رقیق شد. میزان کات آف برابر با 0/81501 به دست آمد. از آن جایی که کات آف مشخص کننده مرز بین

جدول شماره 5: نتایج تست الیزا

	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
	0/197	0/539	0/575	0/408	0/657	0/687	0/486	0/219	0/551	0/416	A
	0/255	0/817	1/069	0/876	1/104	1/079	1/088	0/265	0/774	0/516	B
	0/247	0/600	0/850	0/866	0/652	0/771	1/096	0/260	0/701	0/523	C
	0/277	0/524	1/314	1/413	0/446	1/398	1/433	0/263	0/764	0/519	D
	0/258	0/902	0/821	1/086	1/246	1/221	1/149	0/265	1/010	1/312	E
	0/250	0/596	0/752	0/704	0/446	0/782	1/099	0/257	0/783	0/544	F
	0/240	0/497	0/573	0/750	0/447	0/648	0/780	0/246	0/750	0/610	G
	0/04	0/711	0/342	0/639	0/443	0/345	0/738	0/266	0/325	0/301	H

استفاده شد. مقدار P نزدیک به صفر (با توجه به جدول شماره 8) حاکی از رابطه بسیار معنی دار دو متغیر بود.

جدول شماره 8: نتیجه همبستگی بین دو متغیر Culture و ELISA

Exact Sig. (1-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Asymp. Sig. (2-sided)	df	Value
		000	1	36/865 Pearson Chi-Square
		000	1	33/438 Continuity Correctionb
		000	1	35/081 Likelihood Ratio
000	000			Fisher's Exact Test
		000	1	36/404 Linear-by-Linear Association
			80	N of Valid Casesb

a. 0 cells .0% have expected count less than 5. The minimum expected count is 5.50.
b. Computed only for a 2x2 table

تعیین حساسیت و ویژگی تست الیزای طراحی شده

جهت تعیین حساسیت و ویژگی تست الیزای طراحی شده در این مطالعه، از نتایج آخرین تست الیزا با 80 نمونه سرم استفاده شد. تفسیر نتایج حاصل از آخرین الیزای انجام شده برای جامعه آماری مورد مطالعه، با توجه به نتایج حاصل از کشت نمونه بالینی، به عنوان استاندارد تشخیص و نتایج حاصل از تست توبرکولین، در جدول شماره 9 نشان داده شده است.

جدول شماره 9: تفسیر نتایج حاصل از الیزا با توجه به نتایج تست PPD

Numbers	Definition	Groups
2	Powerful immune system	PPD Pos /ELISA Pos But No Disease
15	True Positives	PPD Pos / ELISA Pos Disease
4	Culture Neg & No Symptoms: ELISA Result is False Positive	PPD Neg / ELISA Pos
1	Culture Pos: Immunosuppressive	
1	Culture Neg: PPD Result is False Positive	PPD Pos / ELISA Neg
	دریافت اخیر BCG یا آلودگی با سایر مایکوباکتریوم ها	
4	Culture Pos: ELISA Result: False Negative	
53	True Negatives	PPD Neg / ELISA Neg No Disease

بدین ترتیب حساسیت تست طراحی شده 78 درصد و ویژگی آن 92 درصد بود.

Sensitivity = 15 / (15 + 4) x 100 = 78%
Specificity = 53 / (53 + 4) x 100 = 92%

جدول شماره 6: مشخصات بیماران استفاده شده در تست الیزا

PPD(mm)	مشخصات	Num.	PPD(mm)	مشخصات	Num.
1	M 22	41	7	M76	1
>15	F 88	42	1	F 58	2
2	M 34	43	1	M 32	3
0	F 31(NC)	44	4	M 55	4
>15	M 40	45	15	F 90	5
2	M 56	46	8	F 66	6
1	F 32	47	2	F 52	7
2	F 33	48	1	M 30	8
1	M 22	49	1	F 39	9
1	F 32	50	1	F 42	10
1	F 34	51	4	M72	11
>15	F84	52	2	M 31	12
>15	M 36	53	>15	F 90	13
1	F 33	54	1	F 76	14
1	F41	55	1	M35	15
2	M 56	56	1	F40	16
2	F 33	57	2	F 26	17
15	M 45	58	8	M 63	18
2	F 23	59	1	F47	19
>15	M 81(PC)	60	1	M3	20
>15	F 33	64	2	F37	21
>15	M44	62	-	M3	22
1	M34	63	2	F46	23
1	M29	64	1	F14	24
1	M 29	65	2	F 41	25
1	F44	66	>15	M91	26
1	F 16	67	>15	F 68	27
1	M 45	68	>15	F40	28
1	M 39	69	>15	M 85	29
1	M 18	70	>15	F68	30
2	M 47	71	1	F29	31
8	F 66	72	1	F46	32
1	M 41	73	1	F 46	33
1	M 48	74	15	F 86	34
1	M 29	75	1	F 33	35
1	M 47	76	>15	F 84	36
1	F 66	77	>15	M76	37
1	M 41	78	2	F41	38
1	M 33	79	2	M 56	39
-	No Ab	80	2	F 33	40

جدول شماره 7: جدول توافقی 2 x 2 دو متغیر Culture و ELISA

VAR00001 * VAR00002 Crosstabulation				
Total	VAR00002		Count	VAR00001
	present	absent		
60	6	54	Absent	VAR00001
20	16	4	present	
80	22	58	Total	

جهت بررسی همبستگی بین Culture و ELISA از آزمون Chi-Square Test به روش Fisher's Exact Test

بحث

هدف اصلی از این مطالعه، استفاده از آنتی ژن‌های با وزن مولکولی پایین، ترشح شده از Mtb سویه C، جهت اهداف تشخیصی مانند الایزای غیرمستقیم بود. در طراحی سیستم الایزا جهت شناسایی آنتی‌بادی سرم انسانی علیه این پروتئین‌های خالص شده، حساسیت 78 درصد و ویژگی 92 درصد حاصل شد. در آزمون Chi-Square Test به روش Fisher's Exact Test نتایج تست الایزای طراحی شده در مقایسه با استاندارد طلائی کشت، با P-Value نزدیک به صفر، دارای همبستگی بالایی بود. شانس یافتن باسیل اسید فست در نمونه رنگ آمیزی شده ارتباط مستقیم با تعداد باسیل در نمونه بیمار دارد. در عین حال با کشت باکتری امکان تشخیص دقیق گونه مایکوباکتریوم با استفاده از تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی و سایر تست‌های تشخیصی میسر خواهد شد. بسیاری از بیماران مبتلا به سل دارای اسمیر منفی ولی کشت مثبت هستند. اسمیرهای منفی بیماری سل را نفی نمی‌کند. علاوه بر این در روش میکروسکوپی اسمیر امکان تمایز مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا وجود ندارد (15). در مطالعه حاضر، از میان 80 نمونه بالینی جمع‌آوری شده از بیماران، اعم از خلط، شیره معده، مایع سینوویال و ... نتیجه اسمیر رنگ آمیزی شده به روش اسید فست برای 13 نمونه (16/25 درصد) از نظر وجود باسیل اسید فست مثبت گزارش شد، این در حالی بود که 20 نفر (25 درصد) نتیجه کشت مثبت داشتند. از آنجایی که در تفسیر کلیه نتایج در مطالعه حاضر، استاندارد تشخیص، نتیجه کشت در نظر گرفته شد، 7 مورد نتیجه منفی کاذب در افراد مبتلا به TB در رنگ آمیزی اسید فست از نمونه بالینی بیماران مشاهده شد.

در روش مولکولی، موارد منفی کاذب شایع‌تر بوده و ممکن است در مواردی همچون تعداد کم باکتری در نمونه بالینی به وجود آید. در این مطالعه، در جامعه آماری مورد بررسی (n=80) تعداد 20 نفر (25 درصد) از بیماران نتیجه کشت مثبت داشتند که از این تعداد نتیجه

آنالیز مولکولی بر روی نمونه بالینی اولیه بیماران در 16 مورد مثبت ارزیابی شد. از آنجایی که در تفسیر کلیه نتایج، استاندارد طلائی، نتیجه کشت در نظر گرفته شد، 4 نفر از بیماران مثبت، از نظر آنالیز مولکولی دارای نتیجه منفی کاذب بودند. تست‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک، قادر به تمایز میکروب زنده از میکروب غیرزنده نمی‌باشند و نایستی برای پایش پاسخ درمان استفاده شوند (16، 17).

ویژگی تست PPD برای تمایز بین Mtb و سایر مایکوباکتری‌های غیر توبرکلوزی کم است و به علت ویژگی پایین، دقت ضعیفی در افراد واکنش‌دهنده با BCG و حساسیت پایین در افراد مبتلا به ایمنی سلولی ضعیف دیده می‌شود. آزمایش‌هایی که بر اساس PPD انجام شده‌اند، نمی‌توانند میان عفونت توبرکلوز، واکنش‌های سلول و یا مواجهه با مایکوباکتریوم‌های محیطی تمایز قائل شوند (19، 18). مواردی که تست پوستی منفی کاذب می‌شود ممکن است مربوط به توبرکلین مصرف شده، خطا در روش تزریق یا خطا در خوانش اندوراسیون پوستی باشد (20). در برخی موارد منفی کاذب، ممکن است شخص با باسیل کخ آلوده شده ولی خیلی زود تست را انجام داده باشد (باید 2 تا 6 هفته از ورود باسیل به بدن بگذرد). یا ممکن است شخص آلوده شده ولی به دلیل ضعف سیستم ایمنی، بدن قادر به پاسخ نیست. هم‌چنین در اشخاص سالمی که قبلاً مبتلا به سل بوده‌اند امکان منفی شدن تست توبرکلین وجود دارد. این پدیده در اثر از بین رفتن کامل آنتی ژن به‌عنوان محرک و یا به دلیل وفور لنفوسیت‌های فرو نشاننده (Suppressor Cell) است (21، 17). از میان 80 تست پوستی، نتیجه تست 22 نفر (27/5 درصد) مثبت در نظر گرفته شد، 4 مورد (5 درصد) با قطر اندوراسیون بیش‌تر از 10 و 18 مورد (22/5 درصد) با قطر بیش‌تر از 15 میلی‌متر بودند. از این میان، 19 مورد نتیجه کشت مثبت داشتند. دو مورد تست پوستی مثبت با قطر بالای 10 میلی‌متر مربوط به کارکنان مرکز بهداشت در بخش تشخیص

سل و یک مورد مثبت کاذب در خانم 66 ساله با نتیجه کشت و سایر تست‌های تشخیصی منفی بود. یک مورد تست پوستی منفی کاذب در آقای 39 ساله با نقص سیستم ایمنی دیده شد، نتیجه کشت خلط در این بیمار مثبت شد.

در تلاش برای ایجاد آزمایش‌های سرولوژیکی، آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریایی با اوزان مولکولی مختلف 38 کیلو دالتون، 30 کیلو دالتون، LAM، Mtb81، A60، 23-24 کیلو دالتون، 19 کیلو دالتون، آنتی‌ژن‌های 14 یا 16 کیلو دالتون و ESAT-6، با استفاده از روش‌های مختلف، شناسایی و خالص‌سازی شده و به‌طور مستقل با سرم‌های به‌دست‌آمده از بیماران مبتلابه سل مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (23، 22). Espitia و همکاران در سال 1989 یک آنتی‌ژن پروتئین منحصر به فرد با وزن مولکولی 38 کیلو دالتون را از Mtb جدا کردند که این آنتی‌ژن با شستشو از غشای نیترو سلولز جدا شد و به‌عنوان یک معرف ELISA در تشخیص بیماری سل ریوی مورد آزمایش قرار گرفت. ویژگی این تست 96 درصد و حساسیت آن 68 درصد بود (24). آنتی‌ژن 38 کیلو دالتونی یک لیوپروتئین ایمنی است که باعث پاسخ قوی سلولی در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود. سطح IFN- γ در برابر آنتی‌ژن 38 کیلو دالتون Mtb در بیماران TB مثبت بالا بود و این نشان می‌دهد که پتانسیل این آنتی‌ژن برای محافظت از ایمنی و همچنین تشخیص بیماری سل ریوی بالاست (25).

C. Espitia و همکاران، آنتی‌ژن‌های تصفیه‌شده را از Mtb در محدوده 14 تا 122 کیلو دالتون خالص کردند. تجزیه و تحلیل ایمونوبلات از پاسخ آنتی‌بادی در بیماران مبتلابه سل ریوی و در افراد سالم با این آنتی‌ژن‌ها باند 31-32 کیلو دالتون با واکنش 90 درصد از سرم بیماران مبتلابه سل را نشان داد. باند آنتی‌ژن دیگری با واکنش مشابه، آنتی‌ژن 60 کیلو دالتونی بود که توسط 82 درصد از سرم‌های بیماران شناخته شد (24). آنتی‌ژن 16 کیلو دالتون حاوی اپی‌توپ‌های سلول B

خاص برای Mtb Complex است. در یک مطالعه توسط Senol و همکاران، تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان داد که 30 نفر (58 درصد) از بیماران آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG را در برابر آنتی‌ژن‌ها در محدوده 6 کیلو دالتون، 26 نفر (50 درصد) در محدوده 16 کیلو دالتون و 31 نفر (60 درصد) در محدوده 38 کیلو دالتون نشان دادند (26). در آنالیز پروفایل پروتئینی F2 در این مطالعه، باند شارپ پروتئینی در محدوده 14 کیلو دالتون بر روی ژل پلی‌آکریل آمید دیده شد (11). هم‌چنین در تست الیزای طراحی‌شده توسط آنتی‌ژن پروتئینی در محدوده 14 تا 41 دالتون، حساسیت 87 درصد و ویژگی 92 درصد در شناسایی بیماران مبتلابه سل به‌دست آمد. میزان همبستگی نتایج حاصل از الیزا در مقایسه با استاندارد طلایی کشت، با P-Value نزدیک به صفر، همبستگی بالایی را نشان داد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، تست ELISA حساسیت قابل قبول و ارزش تشخیصی بالایی در شناسایی افراد مثبت دارد و می‌توان آن را در ترکیب با سایر روش‌ها برای افزایش دقت تشخیصی، به‌ویژه در موارد منفی کشت، استفاده کرد.

از آنجا که حساسیت و ویژگی روش الیزا برای تشخیص آنتی‌بادی در سرم افراد، به‌طور جدی توسط اتصال غیر اختصاصی ایمونوگلوبولین‌های غیر مرتبط در سرم، به فاز جامد تحت تأثیر قرار می‌گیرد، این مشکل باید به حداقل برسد. در مورد آنتی‌بادی‌های ضد سل، پاسخ ایمنی ناهمگن مشاهده شده، همراه با عدم واکنش به یک آنتی‌ژن واحد، یا با یک گروه خاص از آنتی‌ژن‌ها، حاکی از وجود تغییرات در افراد و همچنین تنوع با توجه به مرحله بیماری است. یکی از احتمالات برای جبران تغییر پاسخ ایمنی و تأثیر مرحله بیماری، ترکیب آنتی‌ژن‌ها با بالاترین حساسیت‌های فردی در یک آزمایش واحد است. این ترکیب آنتی‌ژن با اجازه دادن به شناختن هم‌زمان اپی‌توپ‌های مختلف هر یک از پروتئین‌ها، عملکرد آزمایش را بهبود می‌بخشد. با استفاده از کمپلکس‌های آنتی‌ژنی به‌منظور تقویت

در برابر آنتی‌ژن‌ها در محدوده 6 کیلو دالتون، 26 نفر (50 درصد) در محدوده 16 کیلو دالتون و 31 نفر (60 درصد) در دامنه 38 کیلو دالتونی تولید می‌کنند. بهترین نتایج ELISA با ترکیب آنتی‌ژن TbF6/DPEP به دست آمد که با 85 درصد حساسیت و 91 درصد ویژگی همراه بود (در مقایسه با حساسیت 78 درصد و ویژگی 92 درصد در سیستم الایزای طراحی شده در این مطالعه) (28).

فرج‌اللهی و همکاران در سال 2012 در طراحی سیستم الایزای خود از BCG به‌عنوان سیستم فاز جامد استفاده کردند. حساسیت و ویژگی آزمون طراحی شده توسط آن‌ها به ترتیب 90 درصد و 93/5 درصد بود. ویژگی و حساسیت روش آن‌ها با نتایج حاصل از گروه‌های مطالعات قبلی قابل مقایسه بود. استفاده مشابه از BCG قبلاً در تشخیص سل گاوی گزارش شده بود و مشخص شد که در مقایسه با Ag85 و MPT-51، استفاده از BCG بالاترین ویژگی و حساسیت را نشان می‌دهد (13). در مطالعه حاضر برای تعیین Cut off در سیستم الایزای طراحی شده از روش Mean+2SD استفاده شد که به نسبت ROC Curve راحت‌تر بود و از طرفی برای استفاده از این روش نیاز به تعداد بیش‌تری سرم منفی بود که به علت عدم دسترسی مقدور نشد.

بررسی‌ها به‌وضوح پیشنهاد می‌دهند که ترکیب آنتی‌ژن‌های خاص مایکوباکتریایی از جمله آنتی‌ژن‌هایی مانند ESAT-6 و CFP-10 می‌توانند در شناسایی TB فعال در انسان و دام‌ها نقش ایفا کنند. در مطالعه حاضر، ترکیب آنتی‌ژن پروتئینی ESAT6-CFP10 در آنالیز پروفایل پروتئینی بر روی ژل پلی‌آکریل آمید 12/5 درصد، در ناحیه حدود 30 کیلودالتون نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس پروتئینی سبک‌وزن در این ناحیه بود (11).

در این مطالعه و با انگیزه طراحی یک سیستم غربالگری اولیه، از آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین استخراج شده از فیلتراسیون کشت Mtb استفاده شد که به علت حساسیت بالا توانستند در شناسایی اولیه مورد استفاده قرار گیرند. آنتی‌ژن‌های سبک‌وزن Mtb حساسیت

حساسیت آزمایش و استفاده از انواع خاص‌تر آنتی‌ژن‌ها برای کاهش اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها به فاز جامد، می‌توان مشکل را تا حدودی کم کرد (22، 13). از این‌رو در این مطالعه از کمپلکس آنتی‌ژن‌های پروتئینی اختصاصی Mtb با وزن مولکولی پایین در محدوده 14 تا 41 کیلودالتون، استفاده شد تا پاسخ‌های غیراختصاصی به حداقل برسد. در واقع استفاده از آنتی‌ژن‌های اختصاصی سبک‌وزن Mtb، سبب حذف اتصال آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی و در نتیجه افزایش ویژگی تست شد.

در سال 2001 Devi و همکاران، سیستم الایزایی جهت تخمین میزان آنتی‌بادی‌های IgG، IgA و IgM ضد آنتی‌ژن پروتئینی خالص 38 کیلودالتون Mtb در سرم افراد، طراحی کردند. تست الایزا برای بیماران سل با اسمیر و کشت مثبت، برای آنتی‌بادی‌های IgG، IgA و IgM ضد پروتئین 38 کیلودالتون، به ترتیب دارای حساسیت 61 درصد، 30 درصد و 10 درصد و با ویژگی 100 درصد برای IgG بود (27). پروتئین 38 کیلو دالتونی یک آنتی‌ژن ایمنی است که با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی جدا شده و فقط مختص کمپلکس Mtb است (22). در مطالعه Beck و همکاران در سال 2005، آنتی‌ژن نو ترکیب TbF6 و TbF6/DPEP را در مقایسه با آنتی‌ژن‌های به‌دست‌آمده از فیلتراسیون کشت Mtb در ترکیب تست الایزا و وسترن بلات، جهت شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG علیه این آنتی‌ژن‌ها در سیستم ایمنی هومورال علیه باسیل سل، در سرم بیماران مبتلابه سل ریوی به کار گرفتند. آنتی‌ژن نو ترکیب TbF6 شامل 4 پلی پروتئین 11 MTB، 38 kDa، MTB8 و 48 MTB و آنتی‌ژن نو ترکیب DPEP نیز شامل پروتئین ریچ پروتئین 32 MPT بود. در طراحی سیستم الایزا از میکروپلیت‌های کوت شده با آنتی‌ژن‌های نوترکیب و تست وسترن بلات با آنتی‌ژن‌های خالص شده از فیلتراسیون کشت سویه وحشی Mtb استفاده شد. تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان داد که 30 نفر (58 درصد) از بیماران، آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG را

از همدیگر افتراق دهند. با این حال، مطالعات بیشتری در شرایط *in vivo* برای تأیید این نتایج و بهینه‌سازی آن جهت استفاده در فیلد مورد نظر، نیاز است.

سپاسگزاری

این مطالعه به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه دکتری توسط مژگان خسروبیگی و با حمایت گروه تولید و تحقیقات توبرکولین و مالین در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شد.

لازم را جهت شناسایی عفونت سل ایجاد نمودند و روش الیزای غیرمستقیم روشی است که می‌تواند در ردیابی آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن‌های سبک‌وزن مورد استفاده قرار گیرد. البته این مطالعه روی جمعیت کوچکی انجام شد و جهت تخمین حساسیت و دقت، مطالعه بر روی جامعه بزرگ‌تر نیز پیشنهاد می‌شود. یافته‌های به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که آنتی‌ژن‌های پروتئینی استخراج و شناسایی شده در محدوده 30 تا 41 کیلو دالتون می‌توانند عفونت‌های NTM و MTBC را

References

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2021. World Health Organization. Geneva; 2021.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2019. World Health Organization. Geneva; 2019.
3. Zhang L, Jiang X, Pfau D, Ling Y, Nathan CF. Type I interferon signaling mediates Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage death. *J Exp Med* 2021; 218(2): e20200887.
4. Hall GS, Bailey, Scott. Diagnostic Microbiology. 13th Ed. American Society for Clinical Pathology, Chicago; 2015.
5. El-Masry S, El-Kady I, Zaghloul MH, Al-Badrawey MK. Rapid and simple detection of a mycobacterium circulating antigen in serum of pulmonary tuberculosis patients by using a monoclonal antibody and Fast-Dot-ELISA. *Clin Biochem* 2008; 41(3): 145-151.
6. Marassi CD, De Souza Fonseca L, Ristow P, Ferreira R, Lilenbaum W, Oelemann WMR. Improvement of an in-house ELISA for bovine paratuberculosis serology in Brazil. *Brazilian J Microbiol* 2005; 36(2): 118-122.
7. Abdel-Samea SA, Ismail YM, Fayed SMA, Mohammad AA. Comparative study between using QuantiFERON and tuberculin skin test in diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *Egypt J Chest Dis Tuberc* 2013; 62(1): 137-143.
8. Józefowski S, Sobota A, Kwiatkowska K. How mycobacterium tuberculosis subverts host immune responses. *Bioessays* 2008; 30(10): 943-954.
9. Wu X, Zhang L, Zhang J, Zhang C, Zhu L, Shi Y. Recombinant early secreted antigen target 6 protein as a skin test antigen for the specific detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Exp Immunol* 2008; 152(1): 81-87.
10. Crowther JR. The ELISA Guidebook. Methods Mol Biol. New York: Humana Press; 2000.
11. Khosrobeygi M, Mosavari N, Salehi M, Mojangani N, Akbari M. Isolation and Purification of Low Molecular Weight Proteins from Culture Filtrate of Mycobacterium Tuberculosis Strain C. *Arch Razi Inst* 2021; 76(2): 273-281.
12. Kohl TO, Ascoli CA. Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harb Protoc* 2017; 2017(5): 396-402.
13. Farajollahi M, Hamzehlou S. Development of a New Indirect ELISA Method for Detection of Anti-Tuberculosis Antibodies in

- Human Serum. *J Med Bacteriol* 2012; 1(1): 37-43 (Persian).
14. Hatamifar M, Mosavari N, Kazemi J. Designing of Indirect ELISA system using secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for Diagnosis of paratuberculosis. *Iran J Med Microbiol* 2017; 11(2): 26-33 (Persian).
 15. Mekonen A, Ayele Y, Berhan Y, Woldeyohannes D, Erku W, Sisay S. Factors which contributed for low quality sputum smears for the detection of acid fast bacilli (AFB) at selected health centers in Ethiopia: A quality control perspective. *PLoS One* 2018; 13(6): e0198947.
 16. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. Rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 2007; 11(3): 1-196.
 17. Azadi D, Shojaei H. The role of the laboratory in the diagnosis of tuberculosis. *Iran J Med Microbiol* 2016; 10(2): 1-15 (Persian).
 18. van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 7(2): 155-160.
 19. Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: New tools to tackle an old enemy. *Chest* 2007; 131(6): 1898-1906.
 20. Anand M, Nayyar E, Concepcion B, Salani M, Schaefer H. Tuberculosis in kidney transplant recipients: A case series. *World J Transplant* 2017; 7(3): 213-221.
 21. Diaz G, Wolfe LM, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Sci Rep* 2016; 6: 37975.
 22. Beck ST, Leite OM, Arruda RS, Ferreira AW. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(4): 587-596.
 23. 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 Expr Purif* 2002; 24(2): 188-195.
 24. Espitia C, Cervera I, Gonzalez R, Mancilla R, Biomedicas I. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol* 1989; 77(3): 373-377.
 25. Abebe F, Belay M, Legesse M. IFN- γ against the 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* discriminates pulmonary tuberculosis from infection and infection from exposure: evidence from a study of human population in a high endemic setting. *APMIS* 2018; 126(2): 135-142.
 26. Senol G, Erer OF, Yalcin YA, Coskun M, Gündüz AT, Biçmen C, et al. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *Eur Respir J* 2007; 29(1): 143-148.
 27. Devi KRU, Ramalingam B, Brennan PJ, Narayanan SPR, Raja A. Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2001; 81(3): 249-253.
 28. Beck ST, Leite OM, Arruda RS, Ferreira AW. Combined use of Western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 2005; 9(1): 35-43.