ORIGINAL ARTICLE

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

Mozhgan Khosrobeygi[1],
Nader Mosavari[2],
Mitra Salehi[3],
Naheed Mojgani[4],
Majid Akbari[5]

[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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 214 آبان سال 1401 (101-90)

شناسایی عفونت *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس* در انسان به روش الایزای غیرمستقیم، با استفاده از پروتئین‌های سبک‌وزن به‌دست‌آمده از فیلتراسیون کشت *Mtb* سویه *C*

مژگان خسروبیگی[1]
نادر مصوری[2]
میترا صالحی[3]
ناهید مژگانی[4]
مجید اکبری[5]

چکیده

سابقه و هدف: سل از مشکلات اصلی سلامت جهانی با مرگ‌ومیر بالاست. ایجاد یک روش شناسایی سریع و ارزان به خصوص در کشورهای درحال‌توسعه، بسیار قابل‌توجه است. ازاین‌رو در این مطالعه، طراحی سیستم الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین، جداشده از فیلتراسیون کشت مایکوباکتریوم *توبرکوزیس 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* جداشده با Sephadex-G50 به‌عنوان آنتی‌ژن هدف، در طراحی سیستم الایزا استفاده شد. سپس نمونه سرم موارد بالینی دارای نتایج تست توبرکولین، کشت، اسمیر میکروسکوپی اسید فست و PCR، باهدف ردیابی آنتی‌بادی علیه این پروتئین‌های سبک‌وزن، توسط سیستم الایزای طراحی‌شده، موردبررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از میان فرکشن های پروتئینی به‌دست‌آمده از کروماتوگرافی، فرکشن دوم (F2) با غلظت تقریبی 0/7mg/ml و باندهای پروتئینی در محدوده 40-14 کیلودالتون در آنالیز (12.5%) SDS-PAGE، به‌عنوان آنتی‌ژن هدف در طراحی سیستم الایزا مورداستفاده قرار گرفت. سیستم الایزای طراحی‌شده، 78درصد حساسیت و 92درصد ویژگی در شناسایی افراد مبتلا به سل ریوی داشت.

استنتاج: نتایج حاصل از سیستم الایزای غیرمستقیم بر پایه پروتئین‌های سبک‌وزن، با حساسیت و ویژگی به‌دست‌آمده در این مطالعه، این فرضیه را پشتیبانی می کند که آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین موجود در فیلتراسیون کشت *Mtb* می‌توانند در تست الایزا به‌عنوان ابزار شناسایی مفید در شناسایی بیماران مبتلابه سل ریوی مورداستفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، پروتئین‌های سبک‌وزن، SDS-PAGE، الایزای 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

مولف مسئول: نادر مصوری - کرج: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین E-mail: n.mosavari@rvsri.ac.ir
1 دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
2 دانشیار، بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن 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 مالئین، موسسه تحقیقات واکسن 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

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 دست‌داده و سالیانه 10 میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا می‌شوند و با وجود این که یک بیماری قابل‌پیشگیری 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 عکس‌برداری 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 قرارگرفته و مشکلاتی مانند عدم رشد را ندارد، درنتیجه 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، درحالی‌که 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 توبرکولوزیس* رمزگذاری شده‌اند، دقیق‌تر از مشتقات پروتئین تصفیه‌شده هستند و از تمامی سویه‌های BCG و بیشتر مایکوباکتریوم‌های محیطی حذف و دارای ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن‌های پروتئینی با وزن مولکولی پایین ازجمله کمپلکس آنتی‌ژنی CFP-10/ ESAT-6 می‌باشند. ترکیب ESAT-6 و CFP-10، هردو 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 خوکچه‌های هندی و انسان آلوده به *Mtb* ایجاد می‌کند(9).

یکی از روش‌های سرولوژیک در تشخیص بیماری سل که به تازگی موردتوجه قرارگرفته، 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). ازاین‌رو 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 موردمطالعه انجام شد.

مواد و روش ها

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 مورداستفاده

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، جداسازی و تلخیص شده و در طراحی سیستم الایزای غیرمستقیم در این مطالعه، مورداستفاده قرار گرفتند(11).

چکربورد *(Checker board)*

جهت تعیین بهترین غلظت آنتی‌ژن و بهترین رقت آنتی‌بادی، چکربورد انجام شد(12). به طوری‌که محلول آنتی‌ژن با استفاده از بافر کربنات_بی‌کربنات (pH:9.6) به‌عنوان بافر کوتینگ، به‌طور سریالی در عرض پلیت و محلول آنتی‌بادی کوتینگ در طول پلیت رقیق شدند. سپس یک آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم (HRP Goat Anti-Human) در یک غلظت ثابت به تمام چاهک‌ها افزوده و با کامل شدن مراحل سنجش، غلظت‌های مناسب آنتی‌ژن و آنتی‌بادی محاسبه شد(14-12).

کوتینگ

بعد از جداسازی و تلخیص، آنتی‌ژن F2 با غلظت تقریبی 0/7 mg/ml (از پروتئین کل با غلظت 1/662mg/ml) به‌عنوان آنتی‌ژن هدف، به‌صورت سریالی در عرض پلیت (میکروپلیت‌های 96 خانه تست الایزا، خریداری‌شده از شرکت JET BIOFIL) رقیق شد. ازآنجایی‌که در فرایند چکربورد معمولاً آنتی‌ژن را با غلظت اولیه 20µg/ml کوت می‌کنند، با توجه به فرمول زیر غلظت F2 اولیه برای شروع فرایند کوتینگ در تست چکربورد تعیین شد:

F2 = 0.7 mg/ml = 700 µg/ml

M1V1 = M2V2 1000 X 20 = 700 X F2 ~30 λ / Plate

بنابراین میزان 30 لاندا از آنتی‌ژن F2 در 970 لاندا بافرکوتینگ رقیق شد. سپس در چاهک‌های ردیف اول، مقدار 200 لاندا از این محلول آنتی‌ژن و به بقیه چاهک‌ها فقط 100 لاندا بافر کوتینگ اضافه شد. در مرحله بعد از چاهک‌های ستون اول، 100 لاندا به چاهک‌های ستون دوم انتقال داده شد. در مرحله بعد 100 لاندا از چاهک‌های ستون دوم به ستون سوم انتقال داده شد و الی‌آخر... تا یک سریال رقت افقی ایجاد شود. درنهایت 100 لاندا از چاهک‌های ستون یازدهم برداشته و دور ریخته شد. به‌این‌ترتیب، آنتی‌ژن در طول پلیت از رقت 1 تا 1/1024 رقیق شد. بعد از پایان رقیق‌سازی، چاهک‌های ردیف اول حاوی فقط آنتی‌ژن و چاهک‌های ردیف آخر، حاوی فقط بافر کوتینگ بودند. بعد از رقیق‌سازی، پلیت با فویل پوشانده و به مدت 16 تا 18 ساعت بر روی یک سطح صاف در سردخانه در دمای 4 نگه‌داری شد.

بلاکینگ

روز بعد پلیت‌ها از سردخانه خارج و محتویات آن‌ها به‌آرامی خالی شد. پلیت‌ها سه بار و هر بار به‌اندازه 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 سی‌سی بافرفسفات حل شد. بعد از ریختن بلاکر، روی پلیت‌ها فویل کشیده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس پلیت‌ها خالی و 20 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شوند.

مرحله رقیق‌سازی سرم‌های انسانی

سرم‌های انسانی به‌عنوان آنتی‌بادی 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 چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده و به مدت سی دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از گذشت سی دقیقه، چاهک‌ها خالی و با بافر شستشو (بافر فسفات با توئین 0/01 درصد به‌عنوان Washing Buffer) 5 بار و هر بار به میزان 300 لاندا، شستشو داده شد.

اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه

برای آنتی‌بادی ثانویه، میزان 100 لاندا آنزیم

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

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

متوقف کردن واکنش و خواندن OD

در این مرحله 100 لاندا TMB (Tetramethylbenzidine) به‌عنوان سوبسترای رنگ‌زا به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت 10 دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شدند. با مشاهده رنگ آبی داخل چاهک‌ها، 100 لاندا محلول STOP جهت توقف واکنش به هر چاهک اضافه شد. بعد از اضافه کردن STOP، رنگ آبی میکروپلیت‌ها، تبدیل به رنگ زرد شد. سپس OD چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر Bio Rad در طول‌موج 450 نانومتر خوانده شد.

تعیین Cutoff

جهت تعیین کات آف تعداد 30 نمونه سرم از افراد سالم تهیه و تست الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده، برای این نمونه‌ها انجام شد.لازم به ذکر است بهترین غلظت آنتی‌ژن و مناسب‌ترین رقت آنتی‌بادی جهت انجام تست، با توجه به نتایج حاصل از چکربورد 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، داده‌ها در فایل اکسل جمع‌آوری، میزان استاندارد انحراف‌معیار (SD) و میانگین (Mean) حاصل از داده‌ها توسط نرم‌افزار Excel مشخص و مقدار کات آف با استفاده از فرمول Cut off= (Mean+2SD) محاسبه شد. هم‌چنین، حساسیت و ویژگی تست الایزای طراحی‌شده با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

Sensitivity= True Positives /(True Positives+False Negatives)

Specificity = True Negatives /(True Negatives+False Positives)

یافته ها

نتایج چکربورد

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

جدول شماره 1: مشخصات نمونه‌های استفاده‌شده در چکربورد

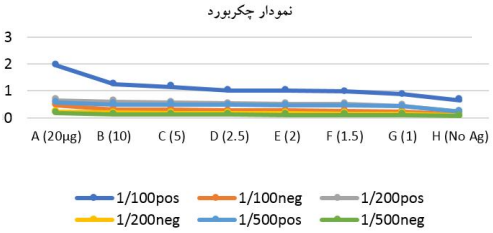
S.	*PPD*	*Sputum Culture*	*مشخصات*	*Samples*
+	> 15 mm	+	M* 81	*Pos Sample*
-	1 mm	-	F** 49	*Neg Sample*

*Male
**Female

جدول شماره 2: نتایج چکربورد حاصل از میانگین داده‌ها

6	5	4	3	2	1	*Ag (µg)*
0/1635	0/555	0/2275	0/645	0/4595	1/959	*A(20µg)*
0/1255	0/501	0/19	0/597	0/3115	1/253	*B(10)*
0/1155	0/492	0/176	0/567	0/309	1/143	*C(5)*
0/1135	0/485	0/1695	0/536	0/287	1/013	*D(2.5)*
0/108	0/466	0/164	0/524	0/277	1/012	*E(2)*
0/104	0/452	0/1595	0/505	0/2585	1/948	*F(1.5)*
0/1025	0/426	0/1525	0/443	0/2315	0/884	*G(1)*
0/0795	0/216	0/1105	0/226	0/121	0/142	*H(No Ag)*
1/100neg	1/100pos	1/50neg	1/50pos	1/20neg	1/20 pos	

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]



نمودار شماره 1: نتایج چکربورد حاصل از میانگین داده‌ها

تصویر شماره 1:پلیت طراحی چکربورد برای آنتی‌ژن 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 µg
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 الایزای 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. ازآن جایی که کات آف مشخص‌کننده مرز بین مثبت و منفی است، در تست‌های بعدی، OD های بالاتر از کات آف، مثبت و OD های پایین‌تر از آن به‌عنوان منفی در نظر گرفته شدند.

جدول شماره4: نتایج الایزا 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 الایزا بعد از گرفتن کات آف

بعد از جمع‌آوری نمونه‌های انسانی، F2 به میزان 1/8 و سرم افراد نیز به میزان 1/100 رقیق و الایزا انجام شد. در چاهک شماره چهل‌وچهار نمونه کنترل منفی، در چاهک شماره شصت، کنترل مثبت و چاهک آخر بدون سرم بارگزاری شدند. نتایج تست الایزا در جدول شماره 5 و مشخصات بیماران در جدول شماره 6 آورده شده است. در تست الایزای انجام‌شده، 27/5 درصد (n=22) از نمونه‌ها دارای OD≥Cut off بودند که از این میان، با توجه به نتایج تست PPD، الایزا، اسمیر میکروسکوپی، کشت و PCR برای هر بیمار که در جدول شماره 7 نشان داده‌شده است، 20 درصد (n=16) مبتلابه TB فعال، 2/5 درصد (n=2) مبتلابه 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 الایزا و کشت

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

جدول شماره 5: نتایج تست الایزا

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

جدول شماره 6: مشخصات بیماران استفاده‌شده در تست الایزا

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	-	M 3	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	
	present	absent		
60	6	54	Absent	VAR00001
20	16	4	present	
80	22	58	Total	

جهت بررسی همبستگی بین ELISA و Culture از آزمون Chi-Square Test به روش Fisher's Exact Test استفاده شد. مقدار P نزدیک به صفر (با توجه به جدول شماره 8) حاکی از رابطه بسیار معنی‌دار 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 الایزای طراحی‌شده

جهت تعیین حساسیت و ویژگی تست الایزای طراحی شده در این مطالعه، از نتایج آخرین تست الایزا با 80 نمونه سرم استفاده شد. تفسیر نتایج حاصل از آخرین الایزای انجام‌شده برای جامعه آماری موردمطالعه، با توجه به نتایج حاصل از کشت نمونه بالینی، به‌عنوان استاندارد تشخیص و نتایج حاصل از تست توبرکولین، در جدول شماره 9 نشان داده‌شده است.

جدول شماره 9: تفسیر نتایج حاصل از الایزا 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 دریافت اخیر BCG یا آلودگی با سایر مایکوباکتریوم ها	PPD Pos / ELISA Neg
4	Culture Pos: ELISA Result: False Negative	
53	True Negatives	PPD Neg / ELISA Neg No Disease

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

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

بحث

هدف اصلی از این مطالعه، استفاده از آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین، ترشح‌شده از Mtb سویه C، جهت اهداف تشخیصی مانند الایزای غیرمستقیم بود. در طراحی سیستم الایزا جهت شناسایی آنتی‌بادی سرم انسانی علیه این پروتئین‌های خالص‌شده، حساسیت 78 درصد و ویژگی 92درصد حاصل شد. در آزمون Chi-Square Test به روش Fisher's Exact Test نتایج تست الایزای طراحی‌شده در مقایسه با استاندارد طلایی کشت، با P-Value نزدیک به صفر، دارای همبستگی بالایی بود.

شانس یافتن باسیل اسید فست در نمونه رنگ‌آمیزی شده ارتباط مستقیم با تعداد باسیل در نمونه بیمار دارد. درعین‌حال با کشت باکتری امکان تشخیص دقیق گونه *مایکوباکتریوم* با استفاده از تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی و سایر تست‌های تشخیصی میسر خواهد شد. بسیاری از بیماران مبتلابه سل دارای اسمیر منفی ولی کشت مثبت هستند. اسمیرهای منفی بیماری سل را نفی نمی‌کند. علاوه بر این درروش میکروسکوپی اسمیر امکان تمایز *مایکوباکتریوم*‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا وجود ندارد(15). در مطالعه حاضر، از میان 80 نمونه بالینی جمع‌آوری‌شده از بیماران، اعم از خلط، شیره معده، مایع سینوویال و ... نتیجه اسمیر رنگ‌آمیزی شده به روش اسید فست برای 13 نمونه (16/25درصد) ازنظر وجود باسیل اسید فست مثبت گزارش شد، این در حالی بود که 20 نفر (25 درصد) نتیجه کشت مثبت داشتند. از آن‌جایی‌که در تفسیر کلیه نتایج در مطالعه حاضر، استاندارد تشخیص، نتیجه کشت در نظر گرفته شد، 7 مورد نتیجه منفی کاذب در افراد مبتلابه TB در رنگ‌آمیزی اسید فست از نمونه بالینی بیماران مشاهده شد.

درروش 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 موردبررسی (n=80) تعداد 20 نفر (25درصد) 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. ازآن‌جایی‌که در تفسیر کلیه نتایج، استاندارد طلایی، نتیجه کشت در نظر گرفته شد، 4 نفر از بیماران مثبت، ازنظر آنالیز مولکولی دارای نتیجه منفی کاذب بودند. تست‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک، قادر به تمایز میکروب زنده از میکروب غیرزنده نمی‌باشند و نبایستی 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 واکسینه شده با BCG و حساسیت پایین در افراد مبتلابه ایمنی سلولی ضعیف دیده می‌شود. آزمایش‌هایی که بر اساس PPD انجام‌شده‌اند، نمی‌توانند میان عفونت توبرکولوز، واکسیناسیون و یا مواجهه با *مایکوباکتریوم*‌های محیطی تمایز قائل شوند(18،19). مواردی که تست پوستی منفی کاذب می‌شود ممکن است مربوط به توبرکولین مصرف‌شده، خطا درروش تزریق یا خطا در خوانش اندوراسیون پوستی باشد(20). در برخی موارد منفی کاذب، ممکن است شخص با باسیل کخ آلوده‌شده ولی خیلی زود تست را انجام داده باشد (باید 2 تا 6 هفته از ورود باسیل به بدن بگذرد). یا ممکن است شخص آلوده‌شده 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 توبرکولین وجود دارد. این پدیده در اثر از بین رفتن کامل آنتی‌ژن به‌عنوان محرک و یا به دلیل وفور لنفوسیت‌های فرونشاننده (Suppressor Cell) است(17،21). 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

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 سرم های به‌دست‌آمده از بیماران مبتلابه سل مورد ارزیابی قرارگرفته‌اند(۲۲،23). Espitia و همکاران در سال 1989 یک آنتی‌ژن پروتئین منحصربه‌فرد 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 لیپوپروتئین 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. تجزیه‌وتحلیل ایمونوبلات از پاسخ آنتی‌بادی در بیماران مبتلابه سل ریوی و در افراد سالم با این آنتی‌ژن‌ها باند 32-31 کیلو دالتون با واکنش 90درصد از سرم بیماران مبتلابه سل را نشان داد. باند آنتی‌ژن دیگری با واکنش مشابه، آنتی‌ژن 60 کیلو دالتونی بود که توسط 82درصد 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، تجزیه‌وتحلیل وسترن بلات نشان داد که 30 نفر (58درصد) از بیماران آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG را در برابر آنتی‌ژن‌ها در محدوده 6 کیلو دالتون، 26 نفر (50 درصد) در محدوده 16 کیلو دالتون و 31نفر (60درصد) در محدوده 38 کیلو دالتون نشان دادند(26). در آنالیز پروفایل پروتئینی F2 در این مطالعه، باند شارپ پروتئینی در محدوده 14 کیلودالتون بر روی ژل پلی‌آکریل آمید دیده شد(11). هم‌چنین در تست الایزای 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 الایزا 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 قابل‌قبول 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.

ازآنجاکه حساسیت و ویژگی روش الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی در سرم افراد، به‌طورجدی توسط اتصال غیراختصاصی ایمونوگلوبولین‌های غیر مرتبط در سرم، به فاز جامد تحت تأثیر قرار می‌گیرد، این مشکل باید به حداقل برسد. درمورد آنتی‌بادی‌های ضد سل، پاسخ ایمنی ناهمگن مشاهده‌شده، 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 اپی توپ‌های مختلف هر یک از پروتئین‌ها، عملکرد آزمایش را بهبود می‌بخشد. با استفاده از کمپلکس‌های آنتی‌ژنی به‌منظور تقویت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

حساسیت آزمایش و استفاده از انواع خاص‌تر آنتی‌ژن‌ها برای کاهش اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها به فاز جامد، می‌توان مشکل را تا حدودی کم کرد(۱۳،22). 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. درواقع استفاده از آنتی‌ژن‌های اختصاصی سبک‌وزن Mtb، سبب حذف اتصال آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی و درنتیجه 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 61درصد، 30درصد و 10درصد و با ویژگی 100درصد برای IgG بود(27). پروتئین 38 کیلو دالتونی یک آنتی‌ژن ایمنی است که با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی جداشده و فقط مختص کمپلکس Mtb است(22). در مطالعه Beck و همکاران در سال 2005، آنتی‌ژن نوترکیب 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 نوترکیب TbF6 شامل 4 پلی پروتئین MTB8, 38 kDa, MTB11 و 48 MTB و آنتی‌ژن نوترکیب DPEP نیز شامل پرولین ریچ پروتئین 32 MPT بود. در طراحی سیستم الایزا از میکروپلیت‌های کوت شده با آنتی‌ژن‌های نوترکیب و تست وسترن بلات با آنتی‌ژن‌های خالص‌شده از فیلتراسیون کشت سویه وحشی Mtb استفاده شد. تجزیه وتحلیل وسترن بلات نشان داد که 30 نفر (58درصد) از بیماران، آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG را در برابر آنتی‌ژن‌ها در محدوده 6 کیلو دالتون، 26 نفر (50درصد) 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 85درصد حساسیت و 91درصد ویژگی همراه بود (در مقایسه با حساسیت 78 درصد و ویژگی 92 درصد در سیستم الایزای طراحی‌شده 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 طراحی‌شده توسط آن‌ها به ترتیب 90درصد و 93/5 درصد بود. ویژگی و حساسیت روش آن‌ها با نتایج حاصل از گروه‌های مطالعات قبلی قابل‌مقایسه بود. استفاده مشابه از BCG قبلاً در تشخیص سل گاوی گزارش‌شده 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 طراحی‌شده 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 می‌دهد که ترکیب آنتی‌ژن‌های خاص مایکوباکتریایی ازجمله 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 باانگیزه طراحی یک سیستم غربالگری اولیه، از آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین استخراج‌شده از فیلتراسیون کشت Mtb استفاده شد که به علت حساسیت بالا توانستند در شناسایی اولیه مورد استفاده قرار گیرند. آنتی‌ژن‌های سبک‌وزن Mtb حساسیت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

لازم را جهت شناسایی عفونت سل ایجاد نمودند و روش الایزای 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 به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که آنتی‌ژن‌های پروتئینی استخراج و شناسایی‌شده در محدوده 30 تا 41 کیلو دالتون می‌توانند عفونت‌های NTM و MTBC را از همدیگر افتراق دهند. بااین‌حال، مطالعات بیشتری در شرایط in vivo برای تأیید این نتایج و بهینه‌سازی آن جهت استفاده در فیلد موردنظر، نیاز است.

سپاسگزاری

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

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, Mojgani 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]

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-c 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 tubercolosis. 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-27]