مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱۵/هفته چهارم بهمن ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۹

ارزیابی میزان آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بیماران مبتلا به سل

مینا کرمی[۱]، دکتر مجید تبیانیان[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری سل یکی از معضلات بهداشتی جامعه‌ی بشری است. روش سنتی تشخیص این بیماری مبتنی بر تست جلدی توبرکولین (TST یا Tuberculin skin test) می‌باشد که این دارای حساسیت و ویژگی پایینی است و هر گونه برخورد قبلی با مایکوباکتریوم‌های غیر بیماری‌زا نیز می‌تواند منجر به نتایج مثبت کاذب در آن شود. هدف از این مطالعه، طراحی روش تشخیص سرولوژیک دقیق و سریع با استفاده از آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10 برای تشخیص افراد مبتلا به سل از افراد غیر آلوده بود.

روش‌ها: ۵۱ نفر از بیماران مبتلا به سل به عنوان گروه تحت آزمایش و ۳۹ نفر نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند و وجود آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌ژن CFP-10، در نمونه‌های سرمی آن‌ها به وسیله‌ی آزمون ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) غیر مستقیم مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۵۱ نمونه‌ی سرم بیماران مسلول مورد بررسی (در رقت ۱/۱۰)، ۴۷ نمونه دارای آنتی‌بادی ضد CFP-10 بود و در ۳۹ نمونه‌ی سرم افراد سالم، ۳۳ نمونه فاقد آنتی‌بادی ضد این آنتی‌ژن بود ($P < ۰/۰۱$). بنابراین، میزان حساسیت روش طراحی شده در این مطالعه، ۹۲/۱۵ و اختصاصیت آن ۸۴/۶۱ درصد تعیین شد. میزان حساسیت و اختصاصیت روش در رقت ۱/۱۰۰ به ترتیب ۶۴/۷۰ و ۹۷/۴۳ درصد بود. بر همین اساس، نقطه‌ی برش نیز در رقت ۱/۱۰، ۰/۳۵۱ و در رقت ۱/۱۰۰، ۰/۲۵۰ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که میزان آنتی‌بادی اختصاصی ضد CFP-10 در گروه بیماران مبتلا به سل تفاوت معنی‌داری با گروه افراد سالم داشت. لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اندازه‌گیری آنتی‌بادی فوق می‌تواند کاندید مناسبی برای تشخیص بیماری سل و یا بررسی سیر بیماری در افراد مورد درمان باشد.

واژگان کلیدی: توبرکلوزیس، آنتی‌بادی، پروتئین نوترکیب CFP-10

ارجاع: کرمی مینا، تبیانیان مجید. **ارزیابی میزان آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بیماران مبتلا به سل.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۵): ۲۲۳۳-۲۲۲۶

مقدمه

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان باکتری ایجاد کننده‌ی بیماری سل، امروزه عامل مهم بیماری و مرگ و میر به ویژه در کشورهایی با سطح بهداشتی پایین محسوب می‌شود. این باکتری پس از ورود می‌تواند در سراسر بدن گسترش یافته، کانون‌های متعدد عفونت را ایجاد و اعضای مختلفی از بدن را گرفتار کند (۱). بیشتر آزمون‌های معمول تشخیص سل

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید تبیانیان
Email: mtebianian@yahoo.com

معایبی دارند، بنابراین تصمیم‌گیری برای درمان این بیماری بر اساس مجموعه‌ی چند آزمون تشخیصی انجام می‌گیرد (۲). یکی از روش‌های سنتی که از دیرباز در تشخیص بیماری سل مورد استفاده بوده است، آزمون جلدی توبرکولین (Tuberculin skin test یا TST) می‌باشد که هنوز به همراه سایر آزمون‌های تشخیصی مورد توجه قرار می‌گیرد. در این روش میزان ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به تزریق داخل جلدی مایع توبرکولین (Purified protein derivative یا PPD) اندازه‌گیری می‌شود، اما این روش دارای حساسیت و ویژگی پایینی است و هر گونه برخورد قبلی با مایکوباکتریوم‌های غیر بیماری‌زا نیز می‌تواند منجر به ایجاد نتایج مثبت کاذب در آن شود. با توجه به مشکلات موجود در زمینه‌ی تشخیص این بیماری، مطالعات فراوانی در حیطه‌ی آزمون‌های نوین تشخیصی و شناخت آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم صورت گرفته است (۲).

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آنتی‌ژن‌های پروتئینی متعددی دارد که برخی از آن‌ها در سیتوپلاسم و دیواره‌ی سلولی قرار دارند و تعداد دیگری نیز ترشح می‌شوند (۳). یکی از پروتئین‌های اختصاصی و ترشحی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آنتی‌ژن ۱۰ کیلودالتونی به نام CFP-10 است که توسط ژن esxB کدگذاری می‌شود (۴). آنتی‌ژن CFP-10 در منطقه‌ی RD1 از ژنوم باکتریایی بیان می‌گردد و با استفاده از سیستم ترشحی خاصی، عامل بیماری‌زای خود را به درون ماکروفاژهای میزبان و سلول‌های مونوسیت خون وارد می‌کند و باعث عفونت می‌گردد. این آنتی‌ژن دارای خاصیت آب‌گریز و ساختار آن α-helical است (۴). پروتئین‌های بیان شده توسط RD1 باعث تخریب غشای سلول میزبان می‌شوند و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس این پروتئین‌ها را برای لیز کردن سلول میزبان و انتشار و عبور از سلولی به سلول دیگر استفاده می‌کند. آنتی‌ژن CFP-10 به همراه ESAT-6 (Early secretory antigenic target-۶) در تمام مایکوباکتریوم‌های پاتوژن وجود دارد، ولی در سویه‌های مولد واکسن BCG (Bacillus calmette-guerin) و مایکوباکتریوم‌های فرصت‌طلب وجود ندارد (۵). بنابراین بسیار اختصاصی هستند و می توانند به عنوان عامل مناسبی در تشخیص عفونت های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مطرح باشند (۶-۵).

با توجه به مشکلات اشاره شده در روش تشخیص سل و با توجه به این‌که امروزه کاربرد روش‌های سرولوژیک افزایش فراوانی یافته است، هدف از این مطالعه بررسی میزان آنتی‌بادی‌های اختصاصی موجود بر علیه آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10 در بیماران مبتلا به سل بود تا با استفاده از نتایج به دست آمده بتوان روش تشخیصی دقیق و حساسی برای بیماران مبتلا ارایه نمود.

روش‌ها

در مطالعه‌ی حاضر ۵۱ نفر بیمار مبتلا به سل که در بیمارستان مسیح دانشوری بستری بودند، به عنوان گروه بیمار و ۳۹ نفر از افراد سالم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند و ضمن بررسی سوابق و انجام معاینه های بالینی توسط پزشک متخصص، از آن‌ها ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد. بعد از جداسازی سرم این افراد به وسیله‌ی سانتریفوژ، نمونه‌ها تا انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری

گردید. تمام بیماران شرکت کننده شامل افرادی بودند که بعد از بررسی بالینی و میکروبیولوژیک از نظر وجود باسیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مبتلا به سل شناخته شدند. نتایج به دست آمده از کشت، حداقل در یکی از نمونه‌های کسب شده از بیماران مثبت بود.

آنتی‌ژن CFP-10 پیش‌تر به صورت نوترکیب تهیه و تخلیص شده بود. به منظور شناسایی و تعیین هویت آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10، الکتروفورز عمودی در ژل پلی‌آکریلامید (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis یا SDS-PAGE) ۱۵ درصد انجام شد. سپس نمونه‌های موجود در ژل به یک غشای نیتروسلولزی مخصوص منتقل گردید و باندهای پروتئینی دارای برچسب هیستیدین با استفاده از آنتی‌بادی ضد CFP-10 مورد شناسایی قرار گرفت.

جهت بررسی آنتی‌بادی‌های موجود بر علیه آنتی‌ژن CFP-10 از آزمون ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) غیر مستقیم و روش نیمه کمی و به همین منظور از پلیت‌های MaxiSorp™ (شرکت JET BIOFIL کانادا) ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. به منظور بهینه‌سازی مراحل آزمون و تعیین بهترین غلظت‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، صفحه‌ی آزمون انجام شد. در ابتدا هر کدام از چاهک‌ها با ۱ میکروگرم آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10 [در درون ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (کربنات، بی‌کربنات با pH = ۹/۶)] پوشانده شد و به مدت یک شب در درون یخچال (دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) انکوبه گردید. سپس چاهک‌ها به وسیله‌ی بافر شستشو [فسفات بافر سالین (Phosphate buffered saline یا PBS) به همراه ۰/۰۵ درصد از توئین (Tween) ۲۰] شسته و در مرحله‌ی بعد به هر کدام از چاهک‌ها ۲۵۰ میکرولیتر بافر مسدود کننده (Skim milk ۳ درصد) افزوده شد. تمام چاهک‌ها بعد از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق مورد شستشو قرار گرفتند.

نمونه‌های سرمی تهیه شده در دو رقت ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. بعد از شستشوی مجدد، آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی که با آنزیم پراکسیداز نشان‌دار شده و به میزان ۱/۷۰۰۰ رقیق شده بود، به چاهک‌های تحت آزمایش اضافه شد. پلیت‌های تحت آزمایش دوباره در دمای اتاق و در شرایط تاریکی و به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند و پس از شستشوی مجدد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگی تترامتیل بنزیدین (Tetramethylbenzidine یا TMB) به عنوان سوبسترای آنزیم به هر کدام از چاهک‌ها افزوده شد. بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و در شرایط تاریک، ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک رقیق) به چاهک‌ها اضافه گردید تا مراحل واکنش متوقف شود. میزان جذب نوری نمونه‌های موجود در چاهک‌ها با استفاده از دستگاه ELISA reader و در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده و نقطه‌ی برش (Cutoff)، حساسیت روش و ویژگی روش در رقت ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ تعیین شد.

یافته‌ها

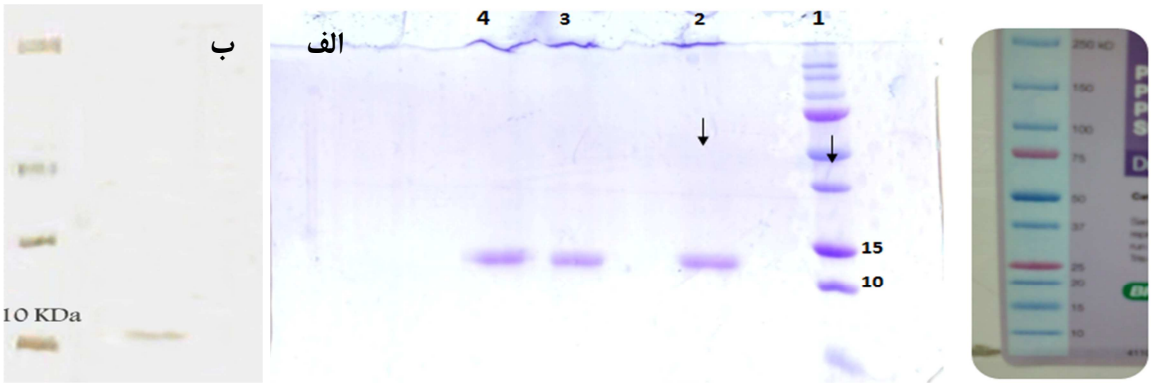
بررسی خصوصیات آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10:

آنتی‌ژن CFP-10 نوترکیب استفاده شده در تحقیق حاضر، در میدان الکتریکی و تحت تأثیر آن در

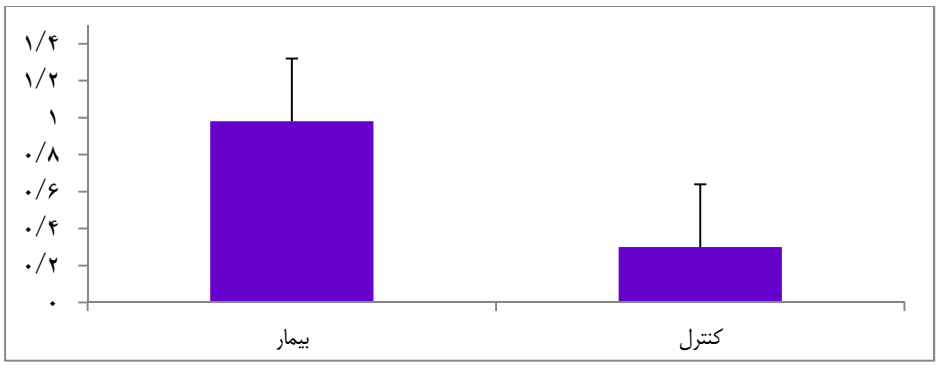
محدوده‌ی تقریبی ۱۲ کیلودالتون قرار گرفت. این آنتی‌ژن به صورت تک باند بود که نشان دهنده‌ی خلوص آن می‌باشد (شکل ۱، الف). پس از انتقال این آنتی‌ژن به غشای نیتروسلولوزی، ناحیه‌ی فوق با آنتی‌بادی ضد CFP-10 واکنش نشان داد که این امر مؤید وجود آنتی‌بادی نوترکیب CFP-10 و دارای برچسب هیستیدین می‌باشد (شکل ۱، ب).

بررسی وجود آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه آنتی‌ژن CFP-10: در روش ELISA، از مجموع ۵۱ نمونه‌ی سرم بیماران مبتلا به سل که در مطالعه‌ی حاضر مورد بررسی قرار گرفتند، ۴۷ نمونه در رقت ۱/۱۰ دارای آنتی‌بادی بر علیه CFP-10 بود و در ۳۹ نمونه‌ی سرم افراد سالم، ۳۳ نمونه فاقد آنتی‌بادی بر علیه این آنتی‌ژن بود. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، میانگین جذب نوری نمونه‌های بیماران در هر دو رقت (۱/۱۰ و ۱/۱۰۰) اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های گروه شاهد نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

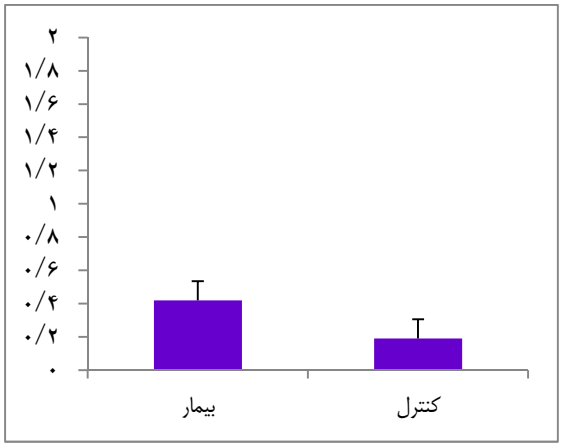
در مقایسه با آزمون میکروسکوپی (مشاهده‌ی مستقیم باکتری)، حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب در رقت ۱/۱۰، ۹۲/۱۵ و ۸۴/۶۱ درصد و در رقت ۱/۱۰۰، ۶۴/۷۰ و ۹۷/۴۳ درصد تعیین شد. بر همین اساس نقطه‌ی برش نیز در رقت ۱/۱۰ برابر با ۰/۳۵۱ و در رقت ۱/۱۰۰ برابر با ۰/۲۵۰ تعیین گردید.



شکل ۱. شناسایی و تعیین هویت آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10 به وسیله‌ی الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید
الف: ستون ۱ نشان دهنده‌ی مارکر پروتئینی با اندازه‌های مشخص و ستون ۲، ۳ و ۴ نشان دهنده‌ی آنتی‌ژن CFP-10؛
ب: بررسی الگوی پروتئین نوترکیب CFP-10 در مقابل مارکر پرتئینی با روش Western blot



شکل ۲. میانگین و انحراف استاندارد جذب نوری نمونه‌های تهیه شده از افراد بیمار و شاهد در رقت ۱/۱۰



شکل ۳. میانگین و انحراف استاندارد جذب نوری نمونه‌های تهیه شده از افراد بیمار و شاهد در رقت ۱/۱۰۰

بحث

بیماری سل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی کشنده در جهان است که پیش‌بینی می‌شود تا سال‌های آینده نیز همچنان به عنوان یکی از معضلات مهم بهداشتی جهان باشد (۱). تشخیص قطعی بیماری سل از طریق یافتن باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه‌های بالینی گرفته شده از بیمار به دست می‌آید. بنابراین سایر بررسی‌ها و آزمون‌های تشخیصی سل به صورت حتمی و قطعی نیست. بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که تشخیص سل بر اساس رادیوگرافی سینه و نتیجه‌ی TST از اهمیت بسیار کمتری برخوردار است (۶).

توبرکولین یک فرآورده‌ی آنتی‌ژنیک از باسیل‌های توبرکلوز می‌باشد. این واکنش نشان دهنده‌ی میزان حساسیت است و میزان مصونیت را نشان نمی‌دهد. همچنین قطر اندوراسیون پوستی حاصل از تزریق عصاره‌ی PPD در بیمار شدت بیماری را نشان نمی‌دهد، بلکه واکنش مثبت PPD ممکن است بیانگر مواردی همچون عفونت طبیعی با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آلودگی با انواع مختلف مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس و واکسیناسیون قبلی BCG باشد (۷). بر اساس نتایج مطالعات Harboe (۸) و Huebner و همکاران (۹)، اختصاصیت تست جلدی PPD ضعیف می‌باشد و این به دلیل آنتی‌ژن‌هایی است که نه تنها در PPD وجود دارد، بلکه بین بسیاری از گونه‌های دیگر مایکوباکتریوم از جمله BCG مشترک است.

از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که اهمیت فراوانی در جنبه‌های تشخیصی دارد، می‌توان به CFP-10 و ESAT-6 اشاره نمود که در بسیاری از مطالعات استفاده شده (۱۱، ۷، ۵) و به عنوان جایگزین مناسبی به جای PPD مطرح شده‌اند. آنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مانند CFP-10 می‌توانند به عنوان شاخص بسیار مناسبی در تشخیص سریع و دقیق بیماری سل کارایی داشته باشند. با توجه به این اصل می‌توان تکنیک‌های تشخیصی را طراحی نمود که با ردیابی آنتی‌بادی‌های فوق در نمونه‌های بالینی (به خصوص سرم) بیماران مبتلا به سل، ضمن تشخیص سریع و دقیق بیماری، روش اجرای راحت‌تری نیز داشته باشند. بنابراین با توجه به مشکلات فراوان در روند تشخیص بیماری سل (توبرکلوزیس)، تحقیق حاضر با استفاده از آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10، وجود آنتی‌بادی اختصاصی در بیماران را با استفاده از روش ELISA بررسی نمود.

با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌توان گونه‌ی بیماری‌زا را از سایر انواع غیر بیماری‌زا تشخیص و تمییز داد. علاوه بر این می‌توان سیر بیماری را پیگیری کرد و در درمان از آن استفاده نمود. این اصل توسط محققان

مختلفی در سال‌های اخیر مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج بسیار با ارزشی نیز ارایه کرده است. از جمله این مطالعات می‌توان به van Pinxteren و همکاران اشاره نمود که نشان دادند استفاده‌ی ترکیبی از CFP-10 و ESAT-6 ویژگی تشخیص را (بدون از دست دادن حساسیت) توسعه می‌دهد و جایگزینی واقعی برای PPD ارایه می‌کند. در انسان‌ها این ترکیب حساسیت زیادی (۷۳/۰۰ درصد) داشت و از نظر ویژگی حدود ۹۳ درصد نسبت به PPD (۷ درصد) بالاتر بود (۱۰) و با حساسیت و ویژگی مطالعه‌ی حاضر که به ترتیب در رقت ۱/۱۰، ۹۲/۱۵ و ۸۴/۶۱ درصد تعیین شد، همخوانی داشت و جایگزینی واقعی برای PPD بود.

آزمون کوانتی‌فرون (QuantiFERON test یا QFT) بر اساس یافتن اینترفرون گامای آزاد شده از سلول‌های T در شرایط آزمایشگاهی و در برخورد با آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام می‌شود. این اندازه‌گیری میزان پاسخ سلول‌های T را به دو آنتی‌ژن ESAT-6 و CFP-10 نشان می‌دهد. مطالعات مختلف نشان دهنده‌ی اختصاصی بودن این آزمون جهت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. سازمان غذا و دارو (Food and Drug Administration یا FDA) در آمریکا و مرکز پیشگیری و کنترل بیماری‌ها (Centers for Disease Control and Prevention یا CDC) انجام QFT در بزرگسالان را به عنوان آزمون کمکی در همه‌ی مناطقی که TST در حال انجام می‌باشد، توصیه کرده است. در کودکان آزمون جلدی از حساسیت کمتری برخوردار است و انجام QFT توصیه می‌شود (۱۱).

Mori و همکاران از آنتی‌ژن ESAT-6 به عنوان روش تشخیص سل در افراد واکسینه شده با BCG استفاده کردند (۱۲). به دلیل نبودن استاندارد صحیح جهت تأیید آزمون‌های جدید برای تشخیص عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، اختصاصیت QFT برای افرادی که با توبرکلوزیس تماس نداشتند، برآورد گردید. حساسیت این آزمون بر اساس داده‌های آماری ۱۱۸ بیمار کشت مثبت که کمتر از یک هفته مورد درمان قرار گرفتند، تخمین زده شد. با استفاده از ترکیب پاسخ‌های CFP-10 و ESAT-6، اختصاصیت آزمون برای افراد با خطر پایین برابر با ۹۸/۱۰ درصد و حساسیت آن برای بیماران آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۸۹/۰۰ درصد تعیین شد. نتیجه این‌که، حساسیت و اختصاصیت آزمون QFT بالا است و تحت تأثیر واکسن BCG قرار نمی‌گیرد (۱۲).

یافته‌های مطالعه‌ی Arend و همکاران بر روی ارزش تشخیصی آنتی‌ژن CFP-10 در روش ELISA جهت شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تأکید داشت و ویژگی و حساسیت آزمایش‌های انجام شده به ترتیب ۸۴ و ۱۰۰ درصد به دست آمد (۱۳) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد.

به این ترتیب، نتایج حاصل شده از روش ELISA در بیشتر مطالعات به ویژه در مطالعه‌ی حاضر از حساسیت و ویژگی قابل توجهی برخوردار می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پروتئین نوترکیب CFP-10 به علت اختصاصی بودن، گزینه‌ی مناسبی برای تشخیص سل می‌باشد و آنتی‌ژن نوترکیب CFP-10 با استفاده از روش مذکور و آزمون ELISA طراحی شده می‌تواند با دقت قابل قبولی نمونه‌های افراد بیمار را از افراد سالم تشخیص و تمییز دهد.

یکی از نکات قابل توجه در مطالعه، همخوانی مستقیم تیتر آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه CFP-10 با سیر بیماری بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر پیام طبرسی قائم مقام مرکز تحقیقات سل بالینی و اپیدمیولوژی بیمارستان مسیح دانشوری جهت هماهنگی درجهت تهیه نمونه‌های بیماران و آقایان دکتر نادر مصوری و مهدی مهدوی جهت راهنمایی‌های علمی آنها تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Crowley L. An introduction to human disease: pathology and pathophysiology correlations. 8th ed. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Learning; 2010.
2. Mustafa AS. Mycobacterial gene cloning and expression, comparative genomics, bioinformatics and proteomics in relation to the development of new vaccines and diagnostic reagents. Med Princ Pract 2005; 14(Suppl 1): 27-34.
3. 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.
4. Hill PC, Jackson-Sillah D, Fox A, Franken KL, Lugos MD, Jeffries DJ, et al. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. J Clin Microbiol 2005; 43(5): 2070-4.
5. Porsa E, Cheng L, Seale MM, Delclos GL, Ma X, Reich R, et al. Comparison of a new ESAT-6/CFP-10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population. Clin Vaccine Immunol 2006; 13(1): 53-8.
6. Kaufmann SHE, Rubin E. Handbook of tuberculosis: molecular biology and biochemistry. Weinheim, Germany: Wiley VCH; 2008.
7. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using Mycobacterium tuberculosis-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(4): 491-6.
8. Harboe M. Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved Mycobacterium bovis BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. Am Rev Respir Dis 1981; 124(1): 80-7.
9. Huebner RE, Schein MF, Bass JB, Jr. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17(6): 968-75.
10. van Pinxteren LA, 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 2000; 7(2): 155-60.
11. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep 2005; 54(RR-15): 49-55.
12. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170(1): 59-64.
13. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, Skjot RL, Subronto YW, van Dissel JT, et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. J Infect Dis 2000; 181(5): 1850-4.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 15.10.2014
Vol. 32, No. 315, 4th Week, February 2015
Accepted: 09.01.2015

Evaluation of Specific Antibody against Recombinant CFP-10 Protein of Mycobacterium Tuberculosis in Patients with Tuberculosis

Mina Karami MSc[1], Majid Tebianian PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Tuberculosis (TB) has been remained as a major health problem. The most commonly used diagnostic tool for TB is a simple skin test. However, it has some disadvantages and it`s specificity can be compromised. Hence, detection of Mycobacterium tuberculosis specific antibodies in human sera has been considered as an important diagnostic test.

Methods: In this study, humoral immune responses against recombinant CFP-10 protein of Mycobacterium tuberculosis in 51 patients with TB and 39 healthy subjects were evaluated using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Findings: From 51 positive serum samples, 47 were positive and from 39 negative serum samples, 33 showed negative results. In this study, sensitivity and specificity of test were 92.15, 84.61 percent for dilution of 1:10 and 64.70 and 97.43 percent for dilution of 1:100, respectively. Accordingly, the estimated cut-off point was 0.351 and .025 for dilutions of 1:10 and 1:100, respectively.

Conclusion: Our data suggested that the levels of antibodies against CFP-10 antigens in patients with TB were significantly higher than those in healthy subjects. This study demonstrated that ELISA with the use of the CFP-10 recombinant antigens is simple and sensitive and can be used to analyze large numbers of samples for the serodiagnosis of TB.

Keywords: Tuberculosis, CFP-10, Recombinant Protein, Antibody

Citation: Karami M, Tebianian M. **Evaluation of Specific Antibody against Recombinant CFP-10 Protein of Mycobacterium Tuberculosis in Patients with Tuberculosis.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(315): 2226-33

1- Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University ,Tehran, Iran (IAUPS)
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
Corresponding Author: Majid Tebianian PhD, Email: mtebianian@yahoo.com