

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ

RSA 4780023

ชื่อโครงการ

การประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ของเชื้อวัณโรคในการช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค และระยะของโรค

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน

ดร.พญ. บุษัน เชื้ออินทร์

สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

E-mail Address

boosbun@gmail.com

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 1. เพื่อค้นหาเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี เพื่อนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของน้ำยาทดสอบผิวหนังและน้ำยาทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยวินิจฉัยแยกโรคการติดเชื้อวัณโรคจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ 2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (การผลิต interferon-gamma และ การผลิต antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 กับระยะของโรค (activity of disease) ในผู้ป่วยวัณโรค เพื่อพัฒนาชุดทดสอบช่วยวินิจฉัยแยกโรคระหว่างวัณโรคระยะกำเริบ กับวัณโรคระยะสงบ 3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง (การผลิต antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 เพื่อวินิจฉัยแยกโรคการติดเชื้อวัณโรคจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ 4. เพื่อศึกษาการตอบสนองของ antibody ในน้ำช่องปอด ในการวินิจฉัยแยกผู้ป่วยวัณโรคปอดจากผู้ป่วยโรคปอดอื่นๆ 5. เพื่อค้นหาผู้สัมผัสโรคที่เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดเป็นวัณโรคในภายหลัง เพื่อผู้สัมผัสโรคกลุ่มนี้จะได้รับการเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด หรือได้รับยาป้องกันการเกิดโรค

วิธีการวิจัย

1. ทำการทดสอบการตอบสนองของ IFN- γ ต่อเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบและผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบเพื่อหาเปปไทด์ที่กระตุ้นการตอบสนองที่ดี 2. ทำการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity, CMI) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 โดยเทคนิค Proliferation Assay และ IFN- γ ELISA ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ (active) ที่มีผลการตรวจเสมหะเป็นบวก และลบ และผู้ป่วยวัณโรคระยะสงบ (inactive) ผู้ป่วยโรคเรื้อรัง ผู้ป่วยติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ และผู้สัมผัสโรค 3. ทำการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง (antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ HIV ที่เป็นวัณโรคระยะต่างๆ และที่ติดเชื้อ non-

tuberculous mycobacteria โดยเทคนิค ELISA 4. ทำการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง(antibody) ในน้ำช่องปอดของผู้ป่วยวัณโรคและไม่ใช้วัณโรคต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 โดยเทคนิค ELISA 5. ติดตามผู้สัมผัสโรคที่มีผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 เหมือนผู้ป่วยโรควัณโรค เพื่อดูการกลายเป็นวัณโรคภายในระยะเวลา 2 ปี

ผลวิจัย 1. เปปไทด์ที่กระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบและผู้สัมผัสโรค (ผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ) คือ 5 เปปไทด์ จาก ESAT-6 (p1-16, 9-24, p17-32, 57-72 และ p81-96) และ 3 เปปไทด์ จาก CFP-10 (p13-28, p55-72 และ p75-92) จำนวนผู้ป่วยและผู้สัมผัสโรคที่ตอบสนองต่อส่วนผสมของเปปไทด์ (Peptide mixtures) ของ ESAT-6 และ CFP-10 มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนผู้ตอบสนองต่อ ESAT-6 recombinant protein แต่มากกว่า individual peptide เพื่อผลการตอบสนองเปรียบเทียบ mixtures,***, individual 2. พบมีการตอบสนองของ IFN- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ ในระยะการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งที่ 24 ชั่วโมง และ 6 วัน แต่ไม่พบการตอบสนองที่ 24 ชั่วโมง ในผู้สัมผัสโรค แต่ยังไม่พบการตอบสนองที่ 6 วัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยวัณโรคระยะกำเริบจากระยะสงบ 3. พบว่าการตอบสนองของ antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็นวัณโรคประเภทต่างๆในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าสนใจว่าไม่พบการตอบสนองต่อโปรตีนทั้ง 2 ในผู้ป่วยติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ ต่อการติดเชื้อวัณโรค และ ประโยชน์ของการนำโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบทางน้ำเหลืองเพื่อช่วยการวินิจฉัยแยกวัณโรคจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ 4.พบมีการตอบสนองของ antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในน้ำช่องปอดในผู้ป่วยวัณโรคโดยมีความไวร้อยละ 63.6 และ 54.5 ตามลำดับ และความจำเพาะร้อยละ 70.4 และ 81.5 ตามลำดับ 5. ในกลุ่มผู้สัมผัสโรค คน มี คน (.....%) ที่มีการตอบสนองของ IFN- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่ 24 ชั่วโมงและ 6 วัน

สรุปและวิจารณ์

ข้อเสนอแนะ

Abstract

Project Code RSA 4780023

Project Title Evaluation of immune responses to peptides of
Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 proteins in
diagnosis of tuberculosis and activity of disease

Investigator Dr Boosbun Chua-Intra
Bamrasnaradura Infectious Disease Institute
Department of Disease Control Ministry of Public Health

E-mail Address boosbun@gmail.com

Fast and accurate diagnosis of tuberculosis is a very important element of global measure to control the disease. Current diagnostic tests for tuberculosis based on tuberculin have relatively poor specificity. Early secreted antigenic target 6 kDa protein (ESAT-6) and culture filtrate protein (CFP-10) are antigens of interest because they are expressed by *M.tuberculosis* but absent from *M. bovis* bacilli Calmette-Guerin (BCG) and most environmental mycobacteria. However, recently the homologues of these two proteins were identified in *M.leprae*. Thus, this study aims to identify the *Mycobacterium tuberculosis*-specific immunogenic peptides for the development of a species-specific skin test or IFN- γ blood tests for diagnosis of active tuberculosis and latent infection. The objectives of this preliminary study were 1) to identify the permissive *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and CFP-10 peptides 2) to compare the pattern of T cell recognition between active and latent tuberculosis and 3) to compare the T cell responses between to individual peptides, peptide mixtures and recombinant proteins. Peripheral blood mononuclear cells from 22 active tuberculosis patients and 19 healthy tuberculosis contacts with positive tuberculin reactions were tested for stimulation with 11 peptides from *M.tuberculosis* ESAT-6 protein and 5 peptides from *M.tb* CFP-10 protein, ESAT-6 peptide mixtures, CFP-10 peptide mixtures and ESAT-6 recombinant protein using the lymphocyte proliferation assay and IFN- γ ELISA assay. The results showed that five peptides (p1-16, 9-24, p17-32, 57-72 and p80-95) from ESAT-6 and 3 peptides from CFP-10 (p13-28, p55-72 and p75-92) were identified to be permissive in

both active tuberculosis patients and latent tuberculosis infected subjects. The frequency of lymphoproliferative and IFN- γ responses to ESAT-6 peptide mixtures were comparable to the ESAT-6 recombinant protein but higher than individual peptides. The application of the mixture of individual permissive peptides in combination with easily read-out systems like skin tests and IFN- γ ELISA assays could benefit the epidemiological estimation of the numbers of humans exposed to the tubercle bacilli. However, the differentiation between active and latent tuberculosis and confirmation of species-specificity of the identified permissive peptides require further evaluation.