Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.iournalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

طراحی و بهینه‌سازی سیستم الایزای نقطه‌ای (Dot-blot ELISA) با آنتی‌ژن‌های اختصاصی برای تشخیص ساده و سریع مشمشه

سجاد یزدان ستاد[۱]، نادر مصوری*[۲]، کیوان تدین[۳]، ایرج مهرگان[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- بخش توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

مقاله کوتاه

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۲۰

* **نویسنده مسئول:** نادر مصوری، بخش توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۲۶۱۱۴۳۸+

پست الکترونیک:

nmosavari@gmail.com

چکیده

مقدمه

مشمشه از قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیر خطرناک و مشترک بین انسان و حیوان است که با ظهور جراحات گرانولوماتوزی قرحه‌ای در پوست و غشاهای مخاطی مشخص می‌شود. با توجه به گزارش حتی یک مورد بیماری و لزوم جلوگیری از انتشار آن با شناسایی و معدوم‌سازی میزبان‌های آلوده، شناسایی زودهنگام بیماری با روش‌های حائز حساسیت و ویژگی قابل قبول، از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعهٔ حاضر به منظور طراحی و بهینه‌سازی سیستم الایزای نقطه‌ای (Dot-blot ELISA) با آنتی‌ژن‌های اختصاصی جهت تشخیص ساده و سریع مشمشه در نمونه‌های سرمی اسب‌سانان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های *بورخولدریا مالئی* در محیط مایع نوترینت همراه با گلیسیرول ۴ درصد کشت داده شدند. آنتی‌ژن‌های کل سلول باکتری با استفاده از روش سونیکاسیون و ترسیب با تری‌کلرو استیک اسید (TCA) استخراج شد. غلظت بهینه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با روش تیتراسیون چکر بورد معین شد. آنتی‌ژن باکتری روی کاغذ نیتروسلولز مفروش و بعد از متوقف‌سازی با شیرخشک، سرم حیوان مشکوک و سپس آنتی‌بادی کونژوگه شده با HRP اضافه گردید و با استفاده از سوبسترای TMB، سیگنال‌ها رهگیری شد.

یافته‌ها

تعداد ۴ نمونه از ۹۰ نمونهٔ سرم با استفاده از آزمون الایزای نقطه‌ای، مثبت گزارش شد. ویژگی و حساسیت آزمون، به‌ترتیب ۹۶/۶۲ و ۱۰۰ درصد برآورد گردید. کشت و جداسازی *بورخولدریا مالئی* از نمونه‌های بالینی حیوان، اعتبار تست را تایید کرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان داد روش الایزای نقطه‌ای حائز حساسیت، ویژگی و دقت بالا در تشخیص مشمشه بوده و به دلیل سرعت، سهولت تفسیر بدون نیاز به ابزار خاص، مقرون به‌صرفه بودن و قابلیت کاربردی صحرایی آن، روش کاربردی و کارآمد می‌باشد.

کلمات کلیدی

بورخولدریا مالئی، مشمشه، الایزای نقطه‌ای، آنتی‌بادی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

مقدمه

مشمشه یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیر خطرناک و مشترک بین انسان و حیوان است که با ظهور جراحات گرانولوماتوزی قرحه‌ای در پوست و غشاهای مخاطی مشخص می‌شود. علت سببی مشمشه، باسیل گرم منفی غیرمتحرک *بورخولدریا مالئی* است (۱). میزبان عمدهٔ بیماری، تک‌سمی‌ها است و انسان میزبان تصادفی *بورخولدریا مالئی* بوده و مشمشه در انسان بیماری تک‌گیر[۱] است که به‌طور معمول در افراد در تماس نزدیک و مکرر با تک‌سمی‌های آلوده یا بافت‌های آنها می‌تواند رخ دهد (۲). مشمشه از نظر سازمان جهانی بهداشت حیوانات[۲] بسیار دارای اهمیت است و مرکز مبارزه و پیشگیری از بیماری‌ها[۳] نیز عامل این بیماری را در گروه B عوامل تهدید زیستی طبقه‌بندی کرده‌اند (۱). روند بیماری در میزبان به سه شکل حاد، تحت حاد و مزمن دیده می‌شود. فرم حاد با علائم شدید تنفسی، تورم گره‌های لنفاوی و طناب لنفی همراه است. در فرم تحت حاد، علائم پوستی (سراجه)، عفونت دستگاه تنفسی فوقانی و ترشحات بینی (نازال) بروز پیدا می‌کند. فرم مزمن، بدون علائم بالینی بوده و اغلب با درگیری ریه همراه است (۳). تاکنون، واکسن تجاری برای پیشگیری از مشمشه وجود ندارد و برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی بیماری بر محور شناسایی موارد بالینی مشکوک، غربالگری تک‌سمی‌های آلوده و حذف آنها است (۴). بازپدیدی بیماری مشمشه در سال‌های اخیر در منطقهٔ خاورمیانه، ورود غیرمجاز تک‌سمی‌های آلوده از کشورهای همجوار که موجب شیوع فزایندهٔ و آندمیک شدن بیماری در ایران شده است، لزوم طراحی روش تشخیص سرولوژی بیماری با قابلیت‌های ردیابی سریع، ساده، حائز اختصاصیت و حساسیت بالا و در عین حال مقرون به‌صرفه از نظر اقتصادی را می‌طلبد.

تکنیک سنجش اتصال ایمنی بصورت لکه‌ای-نقطه‌ای[۴] یک تکنیک پایه و تکمیلی جهت بررسی واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است. تکنیک الایزای نقطه‌ای ویژگی اساسی هر دو تکنیک الایزا و وسترن‌بلات را نشان می‌دهد، با این تفاوت که نسبت به آن دو روش بسیار ساده‌تر است. بر خلاف روش الایزا مرسوم که روش کمی است و نیازمند ارزیابی چگالی نوری[۵] نمونه با دستگاه خوانشگر الایزا است، روش الایزای نقطه‌ای عموماً کیفی است و با مشاهده یک لکه یا نقطه در بستر کاغذی سفید انجام می‌گردد. همچنین این روش بر خلاف روش وسترن‌بلاتینگ به صفحات ژل پلی‌آکریل‌آمیدی[۶] نیاز ندارد. در روش الایزای نقطه‌ای، آلبومین سرم گاوی[۷] بر روی غشای کاغذی قرار داده شده و با سرم ضدآلبومین خرگوش مورد بررسی قرار می‌گیرد. آنتی‌بادی کونژوگه شده با پراکسیداز تربچه[۸] و سوبسترا جهت تشخیص آنتی‌بادی استفاده می‌شود. این آزمایش ساده در کمتر از ۳ ساعت و با کمترین تجهیزات و با استفاده از واکنشگرهای موجود قابل انجام است. روش الایزای نقطه‌ای، واکنش واقعی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را نشان می‌دهد، بنابراین اصل این آزمایش مشابه واکنشگرهایی است که در کیت‌های تشخیصی سریع بکار برده می‌شوند (۵). مطالعه حاضر با هدف تشخیص ساده و سریع بیماری مشمشه در نمونه‌های سرمی اسب‌سانان با روش بهینه شده الایزای نقطه‌ای[۹] و با استفاده از پروتئین/آنتی‌ژن‌های کل سلولی *بورخولدریا مالئی* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و خالص‌سازی آنتی‌ژن

[۱] Sporadic
[۲] World Organisation for Animal Health (OIE)
[۳] Centers for Disease Control and Prevention (CDC)
[۴] Dot Immunobinding Assay/Dot blot ELISA
[۵] Optical Density (OD)
[۶] Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)
[۷] Bovine Serum Albumin
[۸] Horseradish Peroxidase (HRP)
[۹] Dot-blot ELISA

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

مطابق با استانداردهای ایمنی-زیستی سطح ۳[1]، تعداد ۴ جدایهٔ ایرانی حاد *بورخولدریا مالئی* و ۱ سویهٔ استاندارد *Burkholderia mallei* Razi 325 (Razi Type Culture Collection; RTCC 2375) موجود در آرشیو میکروبی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، در محیط نوترینت براث حاوی گلیسیرول ۴ درصد در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی کشت داده شد. پس از غیرفعال‌سازی ارگانیسم در ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه، سوسپانسیون باکتری در × ۱۲۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب باکتری با بافر فسفات نمکی (PBS 0.01 M, pH 7.2) سه مرتبه شستشو داده شد. رسوب مجددا در بافر فسفات حاوی فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF 1 mM) حل شد. سوسپانسیون حاصل روی یخ با سه سیکل ۱ دقیقه‌ای و با شدت Amplitude ۹۰ با استفاده از دستگاه سونیکاتور، بمباران صوتی شد. مایع رویی متعاقب سانتریفوژ در g ×۱۲۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه با بافر لیز کنندهٔ ۱ مولار تیمار شد. مایع رویی با تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۴۰ درصد ترسیب داده شد و نهایتا در بافر فسفات حل گردید. غلظت کل پروتئین‌های استخراج شدهٔ باکتری با روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی بعنوان استاندارد سنجیده شد (۶).

نمونه‌های سرم

تعداد ۹۰ نمونه سرم از اسب‌های مشکوک به مشمشه با توجه به علائم بالینی، از مناطق مختلف ایران (آذربایجان غربی، البرز، اصفهان، کرمانشاه، فارس و خراسان رضوی) جمع‌آوری شد. وضعیت مثبت و یا منفی بودن سرم‌ها با استفاده از روش الایزای نقطه‌ای (دات بلات الایزا) بررسی گردید و با روش‌های ترکیبی شامل آزمون‌های مالئیناسیون، الایزا، ثبوت عناصر مکمل و همچنین کشت ارگانیسم و روش‌های مولکولی مقایسه و اعتبارسنجی شد.

الایزای نقطه‌ای

غلظت بهینهٔ آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با روش تیتراسیون چکر بورد و با استفاده از نمونه‌های سرمی مثبت و منفی مشمشه ارزیابی شد. حدود ۲ میکرو گرم در میلی لیتر آنتی‌ژن تام باکتری بر روی کاغذ نیتروسلولز (Macherey-Nagel, Germany) پوشانده شد و در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد بمدت یک شبانه‌روز تیمار شد. غشا با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار حاوی توین ۲۰ (۰/۰۵ درصد)، سه مرتبه شستشو داده شد و سپس محلول متوقف کننده (شیر خشک ۳ درصد در بافر فسفات-توین) اضافه گردید. از نمونه‌های سرم با استفاده از محلول متوقف کننده، رقت ۱:۲۰۰ تهیه و بعد از سه مرتبه شستشو متعاقب مرحله متوقف‌سازی، اضافه شد. مجدداً غشا سه مرتبه شستشو داده شد و آنتی‌بادی ثانویه IgG کونژوگه شده با پراکسیداز تربچه (HRP) (Amersham BioSciences, UK) توسط بافر تریس نمکی توئین‌دار (**TBS-T**: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 and Tween 20, 0.05%) به‌نسبت ۱:۱۰۰۰۰ رقیق‌سازی و اضافه گردید. پس از ۵ مرتبه شستشوی نهایی، سوبسترای ۳و'۳و۵و'۵-تترا متیل بنزیدین (TMB) در شرایط تاریکی اضافه و سیگنال‌ها ردیابی شد (۷).

یافته‌ها و بحث

از ۹۰ نمونهٔ سرم بررسی شده با آزمون الایزای نقطه‌ای (دات بلات الایزا)، تعداد ۴ مورد مثبت گزارش شد. همچنین، نمونه‌های کلینیکی جمع‌آوری شده از حیوان (ترشحات منخرین و نازال، زخم، خون) بصورت موازی جهت جداسازی احتمالی باکتری، کشت داده شد. جداسازی و شناسایی مولکولی ارگانیسم با آزمون مولکولی PCR ژن‌های اختصاصی ارگانیسم (*BimA*، IS*407-flip*) ضمن مشاهدهٔ

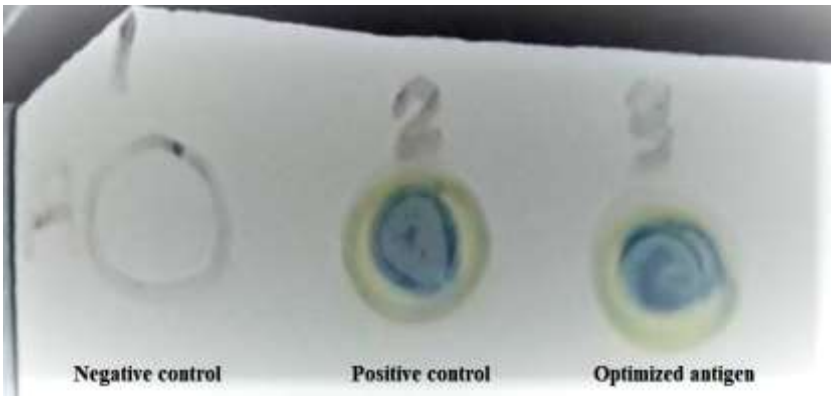
[1] Biosafety level 3 (BSL-3)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

علائم بالینی حیوان و تشخیص اولیه با آزمون مالئیناسیون و نیز تایید تشخیص با آزمون‌های ثبوت عناصر مکمل[1]و الایزا حساسیت و ویژگی آزمون الایزی نقطه‌ای اعتبارسنجی شد. به استناد آزمون‌های تاییدی تشخیص و بنا بر فرمول محاسبه حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، تعداد ۳ نمونه سرم، مثبت کاذب گزارش شد. ویژگی و حساسیت آزمون الایزای نقطه‌ای به‌ترتیب ۹۶/۶۲ و ۱۰۰ درصد برآورد شد. ارزش اخباری مثبت[2]و ارزش اخباری منفی[3] آزمون نیز به‌ترتیب ۵۷/۱۴ و ۱۰۰ درصد تخمین زده شد. آزمون دات بلات الایزا برای سرم‌های تست و سرم-های مثبت و منفی مشمشه (به‌عنوان کنترل) در شکل ۱ نشان داده شد.



شکل ۱- الایزای نقطه‌ای سرم‌های کنترل و تست. ۱) سرم کنترل منفی ۲) سرم کنترل مثبت ۳) سرم مثبت مشمشه

در این مطالعه، روش بهینه شده و کاربردی جهت تشخیص عفونت *بورخولدریا مالئی* با استفاده از نمونه‌های سرم، ارائه شده است. مطالعهٔ حاضر نشان داد که روش الایزای نقطه‌ای یک روش سریع و با حساسیت و اختصاصیت بالا جهت تشخیص مشمشه است. این روش در موارد کمبود زمان و به‌ویژه در مرزهای کشور که امکانات و شرایط آزمایشگاهی مطلوبی نیست و یا زمان کافی برای آزمون‌های تشخیصی وجود ندارد، توصیه می‌شود. تردیدی نیست که قطعی‌ترین راه تشخیص مشمشه، جداسازی عامل عفونی است. با این حال، جداسازی *بورخولدریا مالئی* بسیار مخاطره‌آمیز و دشوار است و در شرایط خاص ایمنی‌زیستی مقدور است. از طرف دیگر، جداسازی باکتری از موارد مزمن و مخفی مشمشه به سادگی میسر نیست و در چنین مواردی باید از روش‌های تشخیصی مانند آزمون‌های آلرژیک و یا آزمون-های سرولوژیکی استفاده کرد (۸). هم‌اکنون تشخیص بیماری متکی بر آزمون آگلوتیناسیون، ثبوت عناصر مکمل و واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری[4]به‌دنبال تلقیح داخل پوستی مالئین است (۱۱-۹). آزمون مالئیناسیون حداقل ۴۸ ساعت زمان لازم دارد و تزریق ارگانیسم کشته شده برای انجام آن ممکن است باعث تولید آنتی‌بادی علیه *بورخولدریا مالئی شده* و منجر به مثبت شدن ناخواسته سایر آزمون‌های سرولوژیکی به‌ویژه آزمون ثبوت عناصر مکمل گردد. بنا به توصیه OIE، آزمون ثبوت عناصر مکمل تنها آزمون سرمی رسمی برای تشخیص مشمشه و در موارد تجارت جهانی تک‌سمی‌ها است. مطالعات مختلف نشان داده است که روش ثبوت عناصر مکمل از حساسیت ۹۵-۹۰ درصدی برای تشخیص سرمی مشمشه برخوردار بوده و

[1] Complement fixation test: CFT

[2] Positive Predictive Value: PPV
[3] Negative Predictive Value: NPV
[4] Delayed-Type Hypersensitivity: DTH

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

دارای قابلیت نتیجه‌دهی در کمتر از یک هفته است. به‌طور معمول سرم حیوان مبتلا به مشمشه مزمن به‌مدت طولانی از نظر پادتن ثبوت عناصر مکمل مثبت است (۱۱). از طرف دیگر، ثبوت عناصر مکمل تاحدی غیر اختصاصی و بعضاً دارای نتایج مثبت کاذب به‌دلیل واکنش متقاطع با بیماری-هایی همچون گوروم، آنفولانزای اسبی و تب خونریزی پتشی است. همچنین، ثبوت عناصر مکمل را نمی‌توان در سرم‌هایی که فعالیت ضد کمپلمان دارند، بکار برد (۱۲).

روش الایزای نقطه‌ای بر اساس ظهور نقطه یا لکه رنگی واضح در منطقه پوشیده‌شده از آنتی‌ژن بوده و قادر به رقابت با سایر روش‌های تشخیصی مقرون به‌صرفه است. زیرا این روش دارای حساسیت بیشتری در مقایسه با روش‌های ثبوت عناصر مکمل، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم[۱] و کانتر ایمونوالکتروفورز[۲] بوده و انجام سریع‌تر و آسان‌تر آزمایش توسط کاربر از دیگر مزایای این روش آزمایشگاهی محسوب می‌شود. همچنین عوامل بالقوه ضد کمپلمان بر روش الایزای نقطه‌ای تأثیرگذار نیستند (۷و۱۳).

ورما و همکاران از دات بلات الایزا جهت تشخیص مشمشه در اسب‌ها استفاده کردند. در مطالعهٔ آنها آزمون دات بلات الایزا بر اساس تشخیص آنتی‌بادی IgG علیه آنتی‌ژن‌های *بورخولدریا مالئی* متصل به غشای نیتروسلولزی پوشش‌داده شده روی نوارهای پلاستیکی بود. انجام واکنش با یک سیستم آویدین-بیوتین[۳] با IgG ضد اسبی بیوتینه شده[۴] و اویدین D کونژوگه شده با HRP صورت گرفت. از تعداد ۸۱۰ سرم تست شده، تعداد ۶ مورد عفونی و ۴۸ مورد اسب حساس تشخیص داده شد. نتایج تست با آزمون‌های ثبوت عناصر مکمل، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و کانتر ایمونوالکتروفورز مقایسه گردید. دات بلات الایزا از حساسیت بالایی برخوردار بود و نسبت به تست‌های دیگر از جهات سرعت و سهولت و سادگی تفسیر برتری داشت. فعالیت ضدکمپلمان سرم نیز تاثیری در روند تست نداشت. از طرف دیگر می‌توانست آنتی‌بادی را در همان مراحل ابتدایی تشخیص دهد. مطالعهٔ ورما و همکاران نشان داد که سرم‌های تست با رقت ۱:۲۰۰ جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی توصیه می‌شود (۱۳).

جان و همکاران آنتی‌ژن‌های مختلف را جهت بکارگیری در تکنیک دات الایزا برای تشخیص مشمشه استانداردسازی کردند. استانداردسازی دات الایزا با آنتی‌ژن‌های CFT، پروتئین خالص شدهٔ مالئین[۵](PPD) و آنتی‌ژن نوترکیب غلظت‌های بهینه آنتی‌ژنی به ترتیب ۱۳۱/۵۲، ۱۳۹/۹۸ و ۱۳۸/۷۲ نانوگرم را جهت پوشش‌گذاری در بستر نیتروسلولزی دات الایزا نشان داد. رقت ۱:۲۰۰ سرم‌های تست مشمشه و نیز رقت ۱:۷۰۰۰ آنتی‌بادی ثانویه (کونژوگه) توصیه شد. بررسی تست دات الایزا با آنتی‌ژن‌های ثبوت عناصر مکمل ۱۰۰ درصد حساسیت، با آنتی‌ژن نوترکیب ۹۰/۹۱ درصد حساسیت و با پروتئین خالص شدهٔ مالئین ۹۷/۴۷ درصد حساسیت را نشان داد (۱۴).

انجام روش دات بلات الایزا در مواردی که حیوان تحت آزمون مالئین بوده است باید با تأخیر صورت گیرد، زیرا انجام مالئیناسیون در حیوانات تا مدت شش هفته در نتایج الایزای نقطه‌ای تداخل ایجاد می‌کند. مقادیر کم پادتن (عیار کمتر از ۱:۱۰۰) می‌تواند در جمعیت سالم و طبیعی اسب دیده شود. تک‌سمی‌های مبتلا به عفونت طبیعی و نیز تک‌سمی‌های حساس شده (از جمله به‌دنبال آزمون مالئین) دارای عیارهای پادتنی ۱:۴۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ در آزمایش الایزای نقطه‌ای می‌باشند. ممکن است عیارهای مثبت الایزای نقطه‌ای در عرض چهار الی شش روز بعد از آلوده شدن تک‌سمی مشاهده شده و به حداکثر عیار خود

[۱] Indirect Hemagglutination: IHA
[۲] Counter Immunoelectrophoresis: CIE
[۳] Avidin-Biotin
[۴] Biotinylated anti-horse IgG
[۵] Purified Protein Derivative: PPD

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

(۱:۲۰۰۰) برسد و حداقل تا هفت هفته دوام داشته و قابلیت شناسایی داشته باشد (۱۰و۱۵).

نیکولز و همکاران نیز اظهار داشتند که تیتر الایزای نقطه‌ای برای زمان طولانی‌تری (هفته یازدهم) مثبت باقی می‌ماند. این در حالی است که تیتر آزمون‌های ثبوت عناصر مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و کانتر ایمونوالکتروفورز سریع‌تر کاهش پیدا می‌کند (۱۶).

نتیجه‌گیری

کارایی آزمون‌های تشخیصی مبتنی بر سرم، به حساسیت، اختصاصیت، دقت، ارزش اخباری و قابلیت کاربردی صحرایی آنها دارد (۱۷). مطالعهٔ ما نشان داد که روش الایزای نقطه‌ای حائز ویژگی‌های مذکور بوده و دارای بیشترین مقدار حساسیت است و به‌دلیل سرعت، سهولت تفسیر، قابلیت کاربردی صحرایی آن در مناطق آندمیک بیماری و به‌ویژه در مناطق مرزی کشور جهت شناسایی و معدوم‌سازی تک‌سمی‌های آلوده، روش کاربردی و کارآمد به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

مطالعهٔ حاضر، با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام گرفت. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بعمل می‌آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تعارض منافعی ندارند.

References

1.Smith ME, Gossman WG. Glanders and Melioidosis. 2019. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846298

2. Van Zandt KE, Greer MT, Gelhaus HC. Glanders: an overview of infection in humans. Orphanet J Rare Dis 2013;8:131.

3. Inglis TJJ, Merritt AJ. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxtron I, Schwartzman J (Eds). Molecular Medical Microbiology. 2nd ed. Academic Press; 2014. p. 769-91.

4. Khan AS, Sage MJ. Centers for Disease Control and Prevention. Biological and Chemical Terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response. Morb Mortal Wkly Rep. 2000;49(RR-4):1-26. Available from: https://www.cdc.gov/MMwr/preview/mmwrhtml/rr4904a1.htm

5. Renart J, Behrens MM, Fernández-Renart M, Martinez JL. 23-IMMUNOBLOTTING TECHNIQUES. In: Eleftherios D, Theodore C (Eds). Immunoassay. San Diego: Academic Press; 1996. p. 537-54. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780122147302500248

6. Dohre SK, Kamthan A, Singh S, Alam SI, Kumar S. Identification of a new diagnostic antigen for glanders using immunoproteome analysis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2017;53:26-32.

7. Gerbig Jr DG, Fenk CJ, Goodhart AS. The Dot Blot ELISA: A Rapid & Simple Experiment to Demonstrate Antibody-Antigen Interactions. Am Biol Teach 2000;62(8):583-7.

8. Neubauer H, Sprague LD, Zacharia R, Tomaso H, Al Dahouk S, Wernery R, *et al*. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2005;52(5):201-5.

9. Naureen A, Saqib M, Muhammad G, Hussain MH, Asi MN. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. J Vet Diagn Invest 2007;19(4):362-7.

10. Sprague LD, Zachariah R, Neubauer H, Wernery R, Joseph M, Scholz HC, *et al*. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. BMC Vet Res 2009;5(1):32.

11. Jamooli S, Mosavari N, Assmar M. Evaluation of indirect immunofluorescence assay for the diagnosis of bacterial agent of glanders. Iran J Med Microbiol 2016;10(3):1-10.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Khan I, Wieler LH, Melzer F, Gwida M, Santana VL d. A, de Souza MMA, *et al*. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. Vet Rec 2011;169(19):495.
13. Verma RD, Sharma JK, Venkateswaran KS, Batra HV. Development of an avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines. Veterinary Microbiology1990;25(1):77-85.
14. John IM, Kapoor PK, Malik PK. Serodiagnosis of glanders by dot-ELISA using various antigens. Indian J Anim Sci 2010;80(10):1084-6.
15. Elschner MC, Scholz HC, Melzer F, Saqib M, Marten P, Rassbach A, *et al*. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. BMC Vet Res 2011;7:4.
16. Nichols WS, Nakamura RM. Agglutination and Agglutination inhibition assays. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (Eds). Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. Washington: ASM Press; 1986. p. 49-56.
17. OIE. World Organization for Animal Health [OIE]. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. In Paris; 2018. Available from: http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

www.SID.ir

Arch

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

Design and optimization of Dot-blot ELISA system using specific antigens for simple and rapid diagnosis of glanders

Sajjad Yazdansetad[1], Nader Mosavari[2*], Keyvan Tadayon[3], Iraj Mehregan[1]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Tuberculin & Mallein, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Department of Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Short Communication Article

Received: 14 May 2019
Accepted: 10 Oct 2019

***Corresponding Author:**
Nader Mosavari, Department of Tuberculin & Mallein, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
TEL: +98 9122611438
Email: nmosavari@gmail.com

ABSTRACT

Introduction

Glanders is one of the oldest contagious and dangerous zoonotic diseases manifesting ulcerative granulomatous lesions on the skin and mucous membranes. Early methods possessing desirable sensitivity and specificity is important to diagnose the disease considering the just only one case report and preventing disease by identification and eradication. The present study was aimed to design and optimize Dot-blot ELISA system using specific antigens for simple and rapid detection of glanders using equine sera samples.

Materials & Methods

Burkholderia mallei strains were cultured in nutrient broth supplemented with glycerol 4%. Whole cell antigens of bacterial strains were precipitated by trichloroacetic acid (TCA) followed by sonication method. The optimum concentrations of antigen-antibody were determined by checkerboard titration. The nitrocellulose membrane was coated by antigen, then stopped by skimmed milk as a blocker. The suspicious equine serum was added to the membrane following HRP-conjugated antibody, the signals were detected by TMB as a substrate.

Results

4 out of 90 sera samples were positive by Dot-blot ELISA. The specificity and sensitivity of the test were evaluated 96.62% and 100%, respectively. *B. mallei* culture and isolation from clinical specimens of the horses validated the test.

Conclusion

Our study showed that the Dot-blot ELISA is specific and sensitive in glanders diagnosis and it seems to be practical and efficient test due to the rapid, easy interpretation without any special tools, cost-effective and also field-friendly.

Keywords

Burkholderia mallei, glanders, Dot-blot ELISA, antibody

► ***Please cite this article as:*** Yazdansetad S, Mosavari N, Tadayon K, Mehregan I. Design and optimization of Dot-blot ELISA system using specific antigens for simple and rapid diagnosis of glanders. Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(2):15-22.

www.SID.ir