Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Designing of Indirect ELISA system using secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for Diagnosis of paratuberculosis

Mona Hatamifar[1], Nader Mosavari[2], Javad Kazemi[1]

1. Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran
2. Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

Article Information

Article history:
Received: 2017/02/04
Accepted: 2017/04/16
Available online: 2017/06/07

Article Subject:
Zoonoses Research

IJMM 2017; 11(2): 26-33

Corresponding author:

Dr. Nader Mosavari

Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Tel: 0989122611438

Email:
nmosavari@gmail.com

Abstract

Background and Aims: *Mycobacterium avium* subsp. *paratubercuiosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis, also called as Johne's disease and is considered as the cause of irrecoverable economic losses in livestock industry. For the detection of the paratuberculosis, indirect ELISA has been highly considered as a simple method with high sensitivity and specificity. Accordingly, this study aims at designing a system of indirect ELISA for the detection of paratuberculosis.

Materials and Methods: A total of 100 serum samples from 10 herds, in Tehran and Alborz provinces in 2015, in which paratuberculosis has been proven by culture, were selected and surveyed using the standard kit and the internal system was designed according to the standard kit. To design ELISA system, by using secretory antigens and confirmed positive and negative serum samples were used and checkerboard titration was performed. To determine the cutoff point, the results of the commercial kit were used as gold standard.

Results: According to the commercial ELISA kit results (15 positive samples and 85 negative samples), the best concentration of antigen and antibody dilution were evaluated as 1.2 µg and 1.100 per well, respectively. Furthermore, the cutoff point was determined as 0.44. The sensitivity and specificity were evaluated as 70% and 100%, respectively.

Conclusions: Secreted antigens in *M. avium* subsp. *paratubercuiosis* are sensitive to detect the infected animals but it is difficult to detect bacteria from feces in the early stages of disease. Therefore, by using indirect designed ELISA, it can be detected antibodies in the early stages of the disease.

KeyWords: *Mycobacterium avium*, Paratuberculosis, Indirect ELISA, Secreted Antigens

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Final

How to cite this article:

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

طراحی سیستم الیزای غیرمستقیم با استفاده از پادگن‌های ترشحی *مایکوباکتریوم آویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* برای تشخیص پاراتوبرکلوزیس

مونا حاتمی فر[۱]، نادر مصوری[۲]، جواد کاظمی[۱]

۱. مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران

۲. آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷

موضوع:

بیماری های مشترک انسان- دام

IJMM 1396; 11(2): 26-33

نویسنده مسئول:

دکتر نادر مصوری

آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۲۶۱۱۴۳۸

پست الکترونیک:

nmosavari@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: *مایکوباکتریوم آویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* (MAP)، عامل به وجود آورنده پاراتوبرکلوزیس است که به عنوان بیماری یون نیز نامیده می‌شود و علت ضررهای اقتصادی جبران‌ناپذیر در صنعت دامپروری به‌حساب می‌آید. جهت تشخیص آلودگی به پاراتوبرکلوزیس، الیزای غیرمستقیم به‌عنوان یک روش ساده با حساسیت و ویژگی بالا بیشتر مورد توجه بوده است. از این‌رو هدف از این مطالعه طراحی یک سیستم الیزای غیرمستقیم جهت تشخیص بیماری پاراتوبرکلوزیس می‌باشد.

مواد و روش کار: تعداد ۱۰۰ نمونه سرم از ۱۰ گله در سال ۱۳۹٤ در استان های تهران و البرز که پاراتوبرکلوزیس توسط کشت در آن‌ها به اثبات رسیده با کیت استاندارد مورد مطالعه قرار گرفت و سیستم داخلی مطابق کیت استاندارد طراحی گردید. جهت طراحی سیستم الیزا با استفاده از پادگن‌های ترشحی، سرم مثبت و منفی واقعی پلیت متقاطع تیتراسیون انجام گرفت. جهت تعیین حد آستانه از نتایج کیت خارجی به عنوان استاندارد طلایی استفاده شد.

یافته‌ها: با در نظر گرفتن نتایج (۱۵ نمونه مثبت و ۸۵ نمونه منفی) در ارزیابی‌های کیت تجاری، بهترین غلظت پادگن و رقت پادتن در سیستم طراحی‌شده به ترتیب ۱/۲ میکروگرم و ۱/۱۰۰ به ترتیب در هر چاهک ارزیابی شد. علاوه بر این، میزان حد آستانه برابر با ۰/٤٤ مشخص گردید. حساسیت و ویژگی به ترتیب ۱۰۰ و ۷۰ درصد ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: پادگن‌های ترشحی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* حساسیت لازم را جهت تشخیص بیماری ایجاد می‌کنند، اما تشخیص باکتری از مدفوع در مراحل اولیه بیماری، مشکل است. بنابراین با استفاده از الیزای غیرمستقیم طراحی‌شده می‌توان پادتن را در مراحل اولیه بیماری ردیابی کرد.

کلمات کلیدی: *مایکوباکتریوم آویوم*، پاراتوبرکلوزیس، الیزای غیرمستقیم، پادگن‌های ترشحی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس یکی از اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم آویوم* (*Mycobacterium avium* complex, MAC) است که عامل بیماری یون (Johne's disease) یا پاراتوبرکلوزیس در نشخوارکنندگان می‌باشد. مشکل اصلی در ارتباط با بیماری یون از این جهت است که گرچه حیوانات در سال‌های نخست زندگی آلوده می‌شوند، اما شروع علائم بالینی با چند سال تأخیر همراه است و در این زمان انتقال باکتری به سایر حیوانات و حتی انسان ممکن است اتفاق بیفتد.

بیماری پاراتوبرکلوزیس به‌صورت بومی در گاوهای شیری ایران وجود دارد و بیماری ناشی از باکتری در گاو شیوع بالایی دارد. دامداری‌های ایران از این نظر به‌شدت آلوده‌اند. باکتری از

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

www.SID.ir

Archive of SID

شیر و مدفوع گاو دفع می‌شود و از این طریق آلودگی به سایر حیوانات و انسان منتقل می‌شود (۱،۲).

بررسی‌های انجام‌شده در مناطق مختلف ایران حضور *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* را به میزان بالایی در مدفوع و شیر حیوانات مبتلابه بیماری یون نشان داده است. علاوه بر ارتباط مستقیم بادام، تغذیه از گوشت و شیر حیوانات آلوده و حتی مصرف آب آلوده با ارگانیسم باعث انتقال باکتری به انسان می‌شود (۳).

آزمایش‌های سرم‌شناسی، پاسخ ایمنی هومورال (حضور پادتن در سرم) علیه پادگن *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* را اندازه‌گیری می‌کند. از آنجایی‌که آزمایش‌های سرم‌شناسی نسبت به کشت سریع‌تر در دسترس قرار می‌گیرد و مشکلاتی (مانند عدم رشد) را ندارد، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است.

روش‌های مرسوم برای شناسایی پاراتوبرکلوزیس شامل آزمون اسمیر مستقیم، کشت و جداسازی باکتری‌های مدفوع به روش‌های مولکولی و سرم‌شناسی است. اسمیر مستقیم مدفوع اولین انتخاب برای موارد بالینی بیماری است. حساسیت این روش بسیار کم و افتراق بین مایکوباکتریوم های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا بسیار دشوار است. کشت و جداسازی باکتری‌های مدفوع برای تشخیص پاراتوبرکلوزیس استفاده می‌شود و توانایی تشخیص عفونت با مقدار باکتری‌های موجود در مدفوع بالاتر از ۱۰۰ CFU/g را دارد. از جمله معایب این روش طولانی شدن زمان گرم‌خانه گذاری (۵ تا ۱۶ هفته)، عدم تکرارپذیری و عدم توانایی در تمایز بین *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* انتقالی و کلون شده می‌باشد (۴).

در حال حاضر تکنیک‌های مولکولی مانند PCR-IS900 با توجه به ویژگی و سرعت بالا استفاده می‌شود، اما هزینه بالا، نیاز به امکانات آزمایشگاهی خاص و عدم تمایز بین *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* انتقالی و کلون شده استفاده از این تکنیک‌ها محدود می‌سازد (۵).

از میان تست‌های وابسته به ایمنی‌شناسی، تست الیزا به‌طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیص در سراسر جهان به دلیل عدم نیاز به امکانات آزمایشگاهی خاص، سرعت بالا و هزینه کم استفاده می‌شود. الیزا سیستمی ساده و چند بعدی است که امکان اندازه‌گیری پادگن یا پادتن را با دقت و حساسیت کافی فراهم می‌کند (۶).

از آنجا که کیت‌های الیزا برای تشخیص پاراتوبرکلوزیس دارای دقت بالا (۹۰ تا ۹۹٪) اما حساسیت کم (۱۳/۵ به ۴۲٪) هستند، طراحی سیستم‌های الیزا با حساسیت زیاد (با حفظ ویژگی بالا) در نظر گرفته می‌شود که این سیستم به‌شدت وابسته به انتخاب پادگن می‌باشد. بنابراین، یکی از چالش‌های اصلی در طراحی و توسعه سیستم‌های الیزا مؤثر، تشخیص پادگن مناسب است که همه مراحل عفونت، به‌خصوص در اوایل مرحله و مرحله تحت بالینی را شناسایی کند (۷).

رایج‌ترین آزمایش ایمنی‌شناسی برای تشخیص الیزا نمونه سرمی است که با پاسخ آنتی‌بادی برعلیه پادگن ارتباط دارد. الیزا به دلیل سهولت نمونه‌گیری (خون)، نتایج سریع و نسبتاً ارزان قیمت، آزمایش مطلوبی برای تشخیص پاراتوبرکلوزیس می‌باشد (۸).

بررسی پروتئین‌های ترشحی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* به‌عنوان پادگن مهم با حساسیتی بالا در تشخیص پاراتوبرکلوزیس در سیستم‌های الیزا می‌تواند روشی مفید و کارآمد باشد. با جداسازی پادگن‌های ترشحی از عامل بیماری یون (*مایکوباکتریوم آویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس*) یک سیستم الیزای غیرمستقیم طراحی و بهینه‌سازی می‌شود تا بتوان در تشخیص بیماری از طریق ردیابی پادتن در این بیماری استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰ گله از گاوداری دو استان تهران و البرز که در سال ۱۳۹۴، بیماری پاراتوبرکلوزیس توسط کشت استاندارد در این گله‌ها به اثبات رسیده بود و همچنین ۵ گله از گاوداری‌هایی که طی ۳ سال گذشته بیماری یون در آن‌ها مشاهده نشده بود، مورد بررسی قرار گرفتند. علائم بالینی گاوها شامل کاهش وزن، مدفوع آبکی و کم‌خونی بود.

نمونه‌گیری و آماده‌سازی سرم های مثبت و منفی MAP

مقدار ۶ سی‌سی خون از ورید و داج دام‌ها گرفته شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. لوله‌های حاوی خون در دور ۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سرم مثبت MAP، از ۱۰ گله که در آزمون جذب الیزا (IDEXX, Westbrook, ME) مثبت بودند و کشت مدفوع آن‌ها نیز تأییدشده بود، تهیه گردید. این سرم ها در قسمت اول و دوم از صفحه پلیت متقاطع تیتراسیون استفاده شد. سرم منفی MAP، از ۵ گله که در آزمون غیر جذبی

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

Final Proof

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

الیزا (ID Vet-France) و کشت مدفوع و PCR برای سه سال متوالی منفی بودند تهیه گردید. این سرم ها در قسمت اول از صفحه پلیت متقاطع تیتراسیون استفاده شد. سرم ها در میکروتیوب و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

آماده‌سازی پروتئین‌های ترشحی

سویه استاندارد F316 در محیط هرولداگ یولک آگار حاوی مایکوباکتین-J کشت داده شد. محیط‌های کشت حاوی باکتری در ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت حدود ۳ ماه جهت رشد، گرم‌خانه گذاری شد.

استخراج پادگن‌های ترشحی

باکتری‌ها در محیط دورست هنلی مایع کشت داده شد. محیط حاوی باکتری در حدود ۳ ماه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری گردید. پس از مشاهده رشد باکتری، توده باکتری از محیط مایع کشت بوسیله سانتریفیوز (۱۰۰۰۰ g، ۳۰ دقیقه) جدا شد و مایع رویی با استفاده از ۰/۲ µm فیلتر گردید. پروتئین‌های موجود در مایع حاصل از فیلتراسیون با تری کلرواستیک اسید ۴۰٪ (با نسبت ۱:۹) در دمای اتاق ترسیب شد. پس از مدت یک شبانه‌روز، مایع رویی حذف گردید و رسوب آن در ۳۰۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوز شد. رسوب حاصل، در مرحله اول با تری کلرواستیک اسید ۱ درصد دو بار شسته شد و سانتریفیوز گردید و در مرحله دوم با NaCl ۱۰٪ یک‌بار شستشو داده شد و سانتریفیوژ گردید. رسوب نهایی در بافر فسفات ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ۳۴ میلی مولار حاوی NaCl، ۸۶ میلی مولار حل شد و pH محلول در محدوده ۶/۸ ±۰/۴ تنظیم گردید (۹). غلظت پروتئین با استفاده از روش لاوری تعیین شد (۱۰).

طراحی سیستم الیزای غیرمستقیم

در ابتدا، یک عدد قرص کربنات-بی کربنات تجاری را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون ارلن حل شد. pH محلول موردنظر در حدود ۹/۶ تنظیم گردید و جهت تعیین بهترین غلظت پادگن با بهترین رقت پادتن انجام پلیت متقاطع تیتراسیون در دستور کار قرار گرفت.

برای این منظور فرایند رقیق‌سازی پادگن با بافر پوشاننده (کوتینگ) با رقت‌های ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ تا ۱/۱۰۲۴ و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت و پلیت با فویل پوشانده و به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در دمای یخچال نگهداری شد و پس از این فرآیند، دو بار شستشو با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو PBST (PBS ۱۰ میلی مولار و pH=۷/۲، همراه با توئین ۲۰، ۰/۰۵٪) صورت گرفت.

مقدار ۱۵۰ میکرولیتر محلول مسدودکننده (محلول بلاکینگ) سرم آلبومین گاوی (BSA، ۲ درصد) در چاهک‌ها ریخته شد و سپس پلیت با فویل پوشانده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق گرم‌خانه گذاری شد. بعد از گذشت یک ساعت محلول مسدودکننده تخلیه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه زمان داده شد تا چاهک‌های الیزا خشک شوند.

سرم ها در رقت‌های ۱/۲۰۰ و ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰ با بافر رقیق‌کننده (PBST) همراه توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ و (BSA ۲٪) تهیه شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه گرم‌خانه گذاری صورت گردید. پلیت ۵ بار شستشو شد و از رقت ۱/۱۰۰۰۰ ضد Ig G پادتن کونژوگه با پراکسیداز (HRP Conjegate Goat anti bovine Ig G) استفاده گردید و پس از گرم‌خانه گذاری ۳۰ دقیقه‌ای در دمای اتاق مجدداً پلیت شستشو گردید.

در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای TMB (tetra-methyl benzidine) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی گرم‌خانه گذاری گردید. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (اسید هیدروکلریک، یک نرمال) در چاهک‌ها ریخته و جذب نوری به کمک دستگاه خوانش جذب نوری الیزا، در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

تعیین حد آستانه (Cut off)

برای این منظور جذب نوری تعداد ۱۰۰ سرم منفی مشخص‌شده با کیت خارجی IDEXX در یک جدول اکسل جمع‌آوری شده و مقدار استاندارد انحراف معیار (SD) و میانگین آن مشخص گردید. سپس حد آستانه آن با استفاده از فرمول حد آستانه= (میانگین + 2SD) محاسبه گردید.

تعیین حساسیت و ویژگی

تعداد ۱۰۰ سرم آماده در این مرحله با استفاده از کیت خارجی و سیستم طراحی شده مورد ارزیابی قرار گرفت و حساسیت و ویژگی آن با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید.

Final Proof

www.SID.ir

Archive of SID

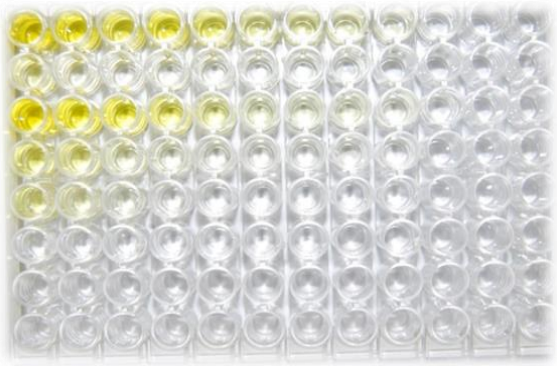
$$\text{حساسیت} = \frac{\text{موارد مثبت واقعی}}{\text{موارد منفی کاذب} + \text{موارد مثبت واقعی}}$$

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{موارد منفی واقعی}}{\text{موارد منفی واقعی} + \text{موارد مثبت کاذب}}$$

یافته‌ها

بهترین غلظت پادگن با پادتن

براساس پروتئین سنجی لاوری، میزان پروتئین محلول نهایی ۱/۱ mg/mL به دست آمد و بهترین غلظت پادگن ۱/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و بهترین رقت پادتن ۰/۰۱ مشخص گردید.



شکل ۱: پلیت متقاطع تیتراسیون برای بهترین غلظت پادگن و بهترین رقت پادتن

جدول ۱: پلیت متقاطع تیتراسیون برای تعیین غلظت مناسب پادگن-پادتن به غلظت پادگن مختلف MAP

بدون پادگن	۰/۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۵	۱۰	۲۰µgr	رقت پادتن
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۱	۲/۲	۲/۴	۲/۷	۲/۹	۳/۱	۱/۵۰ مثبت
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶۵	۰/۷	۱/۵۰ منفی
۰/۲	۰/۲۵	۰/۳	۰/۳	۰/۳۵	۰/۴	۰/۸	۲/۲	۲/۲	۲/۵	۲/۶	۲/۸	۱/۱۰۰ مثبت
۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲۵	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۴	۰/۴۵	۱/۱۰۰ منفی
۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸۵	۰/۹	۱	۱/۲۰۰ مثبت
۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲۵	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵	۱/۲۰۰ منفی
۰/۱	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	بدون پادتن

با بررسی ۲۰ سرم منفی مشخص شد که این سرم ها در سیستم الیزای طراحی‌شده و در کیت تجاری آن‌هم منفی شدند.

تعیین حد آستانه

بر اساس تعداد ۲۰ عدد سرم که با کیت تجاری IDEXX کاملاً منفی ارزیابی شده بودند مقدار میانگین و انحراف معیار به ترتیب ۰/۳ و ۰/۰۷۲ محاسبه گردید. بر این اساس مقدار میانگین برابر با ۰/۳ به‌دست آمده و انحراف معیار برابر با ۰/۰۷۲ می‌باشد.

$$\text{Cut off} = (\text{Mean}+2\text{SD})$$

$$\text{Cut off} = (0.3 + 2(0.072)) = \%\ 44$$

$$\text{Cut off} = 0.44$$

تعیین حساسیت و ویژگی

حساسیت و ویژگی برای ۱۰۰ نمونه سرم که به‌صورت جداگانه در کیت تجاری و سیستم طراحی شده مورد آزمایش قرار گرفتند به ترتیب برابر ۷۰ و ۱۰۰٪ محاسبه گردید.

جدول ۳: قرائت جذب نوری نمونه‌ها برای کیت تجارتی الیزای غیرمستقیم

نمونه	میانگین (Mean)	انحراف معیار (SD)	درصد تغییرات (CV)
منفی	۰/۲۲	۰/۳۳	۱/۵
مثبت ضعیف	۰/۹	۰	۰
مثبت قوی	۱/۵۷	۰/۶۶	۰/۴۲

جدول ۴: قرائت جذب نوری نمونه‌ها برای کیت طراحی‌شده الیزای غیرمستقیم

نمونه	میانگین (Mean)	انحراف معیار (SD)	درصد تغییرات (CV)
منفی	۰/۲	۰/۰۵	۰/۲۵
مثبت ضعیف	۰/۵	۰/۲۴	۰/۴۸
مثبت قوی	۱/۴۶	۰/۳۵	۰/۲۴

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

Final Proof

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

جدول ۵: سرم های انتخاب‌شده برای تعیین ویژگی

	کاذب		مثبت	تعداد
منفی	−	+		
۹۶	۰	۰	۴	۱۰۰ کیت الیزای تجارتی
۶۷	۰	۲۹	۴	۱۰۰ الیزای طراحی‌شده

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{موارد مثبت واقعی}}{\text{موارد منفی کاذب} + \text{موارد مثبت واقعی}} = \frac{4}{4} \times 100 = 100$$

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{موارد منفی واقعی}}{\text{موارد منفی واقعی} + \text{موارد مثبت کاذب}} = \frac{67}{29+67} \times 100 = 70$$

بحث

نزدیک به ۶۰ سال از شناسایی بیماری پاراتوبرکلوزیس در ایران می‌گذرد، اما بااین‌حال اطلاعات موجود در مورد همه‌گیرشناسی این بیماری در گله‌های گاو، گوسفند و بز در ایران اندک می‌باشد (۱۱). مشکلات مرتبط با کشت و جداسازی باکتری از یک‌طرف و هزینه بالای کیت الیزای وارداتی از طرف دیگر باعث عدم برنامه مشخص جهت بررسی همه‌گیرشناسی و به دنبال آن کنترل بیماری در این کشور شده است از این‌رو طراحی سیستم‌های الیزا برای این منظور همواره مورد توجه مرکز تحقیقاتی در کشورهای مختلف شده است که در این مطالعات همواره مهم‌ترین اصل آن استخراج پادگن مناسب می‌باشد. در واقع هر چقدر این پادگن‌ها دارای اپی توپ‌های اختصاصی بیشتر و اپی توپ‌های غیراختصاصی کمتر باشند باعث افزایش حساسیت و ویژگی تست خواهند بود.

بر این اساس پادگن‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است که بیشتر تمرکز بر روی پادگن‌های سلولی می‌باشد (۱۲). در این تحقیق نیز پادگن‌های ترشحی با استفاده از روش‌های ترسیب و تغلیظ جداسازی شده و برای تعداد ۱۰۰ سرم حساسیت و ویژگی تست در مقایسه با کیت تجاری IDEEX به‌عنوان تنها کیت تجاری مورد تائید سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) به دست آمد. از پادگن‌های سلولی مورد استفاده می‌توان به پادگن‌های پروتوپلاسمی پاراتوبرکلوزیس (PPA) که توسط Marassi در سال ۲۰۰۵ گزارش شد اشاره نمود (۱۳). حساسیت و ویژگی به‌دست‌آمده در مطالعه Marassi به ترتیب برابر ۷۶/۹ و ۷۰٪ به دست آمد این در حالی بود که این حساسیت و ویژگی در سیستم ما به ترتیب. ۱۰۰ و ۷۰٪ بود که یکی از دلایل مهم کاهش ویژگی تست ما به دلیل وجود پادتن‌های غیراختصاصی بود که در مطالعات مختلف توانسته با استفاده از پادگن‌های *مایکوباکتریوم فلئی* این پادتن‌های غیراختصاصی را حذف و باعث افزایش ویژگی تست شوند (۱۴).

در مطالعه حاضر به‌منظور طراحی سیستم الیزا، از پادگن‌های ترشحی *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه *پاراتوبرکولوزیس* بهره گرفته شد. بدین منظور از سویه F316 که برای رشد به مایکوباکتین J نیازمند نیست استفاده شد. انتخاب سویه به این دلیل بود که از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه می‌باشد و از سوی دیگر سرعت رشد بیشتری از سویه‌های وابسته به مایکوباکتین دارد.

در خصوص کم بودن ویژگی تست ذکر این نکته لازم می‌باشد که کیت‌های تجاری موجود به دو صورت طراحی می‌شوند که به ترتیب الیزا های جذبی و غیر جذبی می‌باشد تفاوت این دو نوع سیستم در وجود یک سری پادگن‌ها در محلول رقیق‌کننده سرم است و سرم ها قبل از مجاورت با پلیت اصلی ابتدا با این پادگن‌ها مجاور می‌شوند. در این میان یک سری پادتن‌های غیراختصاصی که برعلیه برخی پادگن‌های مایکوباکتریوم های ساپروفیت (مخصوصاً *فلئی*) می‌توانند با پادگن‌های اصلی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* واکنش داده و ویژگی تست را کاهش دهند (۱۵). در واقع گرم‌خانه گذاری اولیه باعث حذف این پادتن‌های غیراختصاصی و افزایش ویژگی تست الیزا شود که در این مطالعه علت پائین بودن این ویژگی به نسبت کیت خارجی که یک الیزای جذبی در مقابل تست ما که یک الیزای غیر جذبی بود همین موضوع می‌تواند باشد. البته حساسیت این سیستم کاملاً منطبق با کیت خارجی بود که در برنامه کنترل و غربالگری بیماری از اهمیت زیادی برخوردار می باشد.

در انتخاب تست مذکور با هدف غربالگری گله، قطعاً سهل‌الوصول بودن آن از مواردی است که در انتخاب آن مؤثر می‌باشد. در حالی‌که کشت مدفوع از حساسیت و ویژگی بالاتری در مقایسه با الیزا برخوردار است، ولی زمان طولانی برای پاسخگویی، از نقاط ضعف آن به شمار می‌آید.

از نقطه‌نظر مطالعات دیگر محققین، آلودگی واقعی بر اساس حساسیت و روش آزمایش مستقیم در مقایسه با کشت ۲۶/۴ درصد ، در گاوهای اصیل ماده گاوداری‌های اطراف تهران تخمین زده شد؛ این برآورد با احتساب حساسیت ۲۰ درصد

Final Proof

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

آزمایش مستقیم و ۹۶ درصد کشت بر اساس نتایج مطالعات اخیر صورت گرفته است (۱۶،۱۷).

به نظر می‌رسد با تخمین حساسیت تست‌ها، برآورد فراوانی حقیقی با تقسیم فراوانی حاصل از تست بر حساسیت ممکن خواهد شد، در غیر این صورت تعداد کل موارد بالینی مشکوک در ۱۲-۶ ماه گذشته در هر گاوداری همراه با موارد قطعی تشخیص داده شده بالینی، نشان‌دهنده وقوع موارد بالینی در گله بومی است و احتمالاً عدد واقعی شیوع ۱۰ تا ۲۰ برابر این مجموع خواهد بود.

سیستم‌های مبتنی بر الیزای بسیار زیادی در دنیا تدوین و طراحی‌شده است که منجر به دست آمدن سیستم‌های الیزای داخلی (In-house) شده است. در این تکنیک‌ها از پادتن‌هایی با ویژگی متعدد استفاده شده است که معمولاً یا حساسیت کم و یا ویژگی بسیار پائین در مقایسه با کیت‌های تجارتی دارند.

در این تحقیق و با انگیزه طراحی یک تست غربالگری اولیه از تمام پادتن‌های ترشحی باکتری استفاده شد که به علت حساسیت بالا توانستند در غربالگری اولیه مورد استفاده قرار گیرند پادگن‌های ترشحی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* حساسیت لازم را جهت تشخیص بیماری ایجاد نمودن و روش الیزای غیرمستقیم روشی است که می‌تواند در ردیابی پادتن در مراحل اولیه بیماری با استفاده از این پادگن مورداستفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

در این مطالعه مراتب قدردانی و تشکر خود را از موسسه تحقیقات و سرم‌سازی رازی به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌داریم.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Ansari-Lari M, Haghkhah M, Bahramy A, Baheran AMN. Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. Trop Anim Health Prod 2009;41(4):553-7.
2. Scanu MA, Bull TJ, Cannas S, Sanderson JD, Sechi LA, Dettori G, et al. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Infection in Cases of Irritable Bowel Syndrome and Comparison with Crohn's Disease and Johne's Disease: Common Neural and Immune Pathogenicities. J Clin Microbiol 2007;45(12):3883-90.
3. Sadati R, Jafarpour M, Mirinargesi M, Nazemi A, Barghi A. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in dairy cattle bred in northern Iran by nested PCR. Glob Vet 2012;8(3):259-63.
4. Seyyedin M, Salehi TZ, Tadjbakhsh H, Najafi MF, Rabbani M. Isolation and Identification of *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* from Milk, Manure and Fecal of Holstein- Friesian Dairy Cattle. Pak J Biol Sci 2008;11(24):2639-44.
5. Englund S, Bölske G, Johansson KE. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 2002;209(2):267-71.
6. Crowther JR. The ELISA guide book. 2nd ed. New Jersey: Humana Publishers; 2001.
7. Trangoni MD, Gioffré AK, Cerón Cucchi ME, Caimi KC, Ruybal P, Zumárraga MJ, et al. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis.* Braz J Microbiol 2015;46(2):1-6.
8. Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, et al. Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine serum. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2008;121(56):203-10.
9. Steadham EM, Martin BM, Thoen CO. Production of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* purified protein derivative (PPD) and evaluation of potency in guinea pigs. Biol J 2002;30(2):93-5.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.
11. Sadati R, Jafarpour M, Mirinargesi M, Nazemi A, Barghi A. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Dairy Cattle Bred in Northern Iran by Nested-PCR. Glob Vet 2012;8(3):259-63.
12. Facciuolo A, Kelton DF, Mutharia L M. Novel Secreted Antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* as Serodiagnostic Biomarkers for Johne's Disease in Cattle. Clin Vaccine Immunol 2013;20(12):1783-91.

Final Proof

www.SID.ir

Archive of SID

13. Marassi C, Fonseca L, Ristow P, Ferreira R, Walter L. Improvement of an in-house elisa for bovine paratuberculosis serology in brazil. Braz J Microbiol 2005;36(2):118-22.

14. Bech-Nielsen S, Jorgensen JB, Ahrens P, Fled NC. Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. J Clin Microbiol 1992;30(3):613-8.

15. Collins MT, Sockett DC, Ridge S, Cox JC. Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Johne's Disease. J Clin Microbiol 1991;29(2):272-6.

16. Todd JA. Etiology of type 1 doanetes. Immunity 2010;32(4):457-67.

17. Whittington RJ, Marsh IB, Saunders V, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, et al. Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* isolates from different hosts. J Clin Microbiol 2011;49(5):1822-30.

Downloaded from ijmm.ir at 11:19 +0330 on Tuesday November 21st 2017

Final Proof

www.SID.ir