DOI: 10.22092/vj.2019.124623.1545 شماره ۱۲۵ زمستان ۱۳۹۸

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

بررسی ارزش تشخیصی آنتی‌بادی بر علیه آنتی ژن نوترکیب MPT64 مایکوباکتریوم بوویس در تشخیص سل دامی

• رضا دری اخوی

کارشناس ارشد میکروبیولوژي، ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• نادر مصوری

بخش توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• مجید تبیانیان (نویسنده مسئول)

بخش ایمونولوژي، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۱۱-۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۲-۱۴

Email: m.tebianian@rvsri.ac.ir

چکیده

سل گاوي يكي از مهم‌ترين بيماري‌هاي مشترک بين انسان و حيوان است كه علاوه بر انسان مي‌تواند دام‌هاي اهلي و وحشي را آلوده نمايد. عامل اين بيماري مايكوباكتريوم بوويس مي‌باشد. كنترل موثر اين بيماري حائز اهميت بسياري است و مستلزم تشخيص دقيق و صحيحي مي‌باشد. روش‌هاي تشخيصي معمول اين بيماري شامل؛ تست جلدي و سنجش اينترفرون گاما مي‌باشد، اما روش‌هاي سرولوژيک مبتني بر الايزا مي‌تواند نويد بخش شناسايي سريع، ازران و مناسب بيماري سل گاوي باشند. هدف ما از اين مطالعه بررسي ارزش تشخيصي آنتي بادي بر عليه آنتي‌ژن نوترکيب MPT64 مايكوباكتريوم بوويس در تشخيص سل دامي به روش الايزا مي‌باشد. تعداد ۳۲ نمونه سرمي از گاوهاي آلوده كه آلودگي در آن‌ها به وسيله تست جلدي و كالبدگشايي توسط دامپزشک مقيم در كشتارگاه تاييد شده بود و دام‌هاي سالم (به عنوان كنترل)جمع‌آوري شد. ميزان آنتي‌بادي بر عليه آنتي‌ژن نوترکيب MPT64 به روش الايزاي طراحي شده مورد ارزيابي قرار گرفت. نتايج به دست آمده همخواني تقريبا قابل قبولي با نتايج تست جلدي داشت به طوري كه از تعداد ۹ نمونه مثبت مورد استفاده در تست براي آنتي‌ژن نوترکيب MPT64 هيچ موردي از منفي كاذب ديده نشد و همه نمونه‌هاي مثبت در كيت الايزاي طراحي شده نيز مثبت شدند. اين نتايج موید آن است كه روش الايزاي مبتني بر آنتي ژن نوترکيب MPT64 مي‌تواند به عنوان يک روش تشخيصي مناسب براي شناسايي موارد عفوني گاوها در بيماري سل گاوي در نظر گرفته شود كه با استفاده از آن مي‌توان حجم زيادي از نمونه‌هاي آلوده را با سهولت، دقت و سرعت بالا مورد ارزيابي قرار داد.

كلمات كليدي: سل گاوي، مايكوباكتريوم، MPT64 ، الايزا، آنتي‌بادي

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 125 pp: 44-50

Evaluation of Mycobacterium bovis MPT-64 recombinant antigens for diagnosis of Bovine tuberculosis

By: Dorri Akhavi R., *Microbiologist, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mosavari N., Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Tebianian M. (Corresponding Author), Immunology Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.*

Received: 2019-01-29 **Accepted: 2019-03-05**

Emali: m.tebianian@rvsri.ac.ir

The bovine tuberculosis is one of the most zoonotic diseases which could be infected domestic and wild animals. The causative agent of this infection is Mycobacterium bovis. The correct diagnosis is very critical for effective control of this infection. The usual diagnosis is made by skin test and gamma interferon assay. But other serological techniques based on ELISA could be noted for development of a rapid and correct method. Here, we use MPT-64 recombinant protein as capture antigens for development of an indirect ELISA. The study population consists of thirty two infected and healthy (control) cattle. The infected animals were confirmed by resident veterinary surgeon according to skin test and clinical examination. The levels of specific antibody against MPT-64 were evaluated by indirect ELISA method. According to our results, the levels of specific antibodies against MPT-64 have great consistency with skin test. So that, all of 9 positive samples have high titer for MPT-64 specific antibody and no false negative results have been reported. This study could proposed that development of ELISA method with recombinant MPT-64 antigen could be considered as a rapid, simple and exact method for detection of BTB infected cattle.

Key words: Bovine tuberculosis, MPT-64, ELISA, antibody

مقدمه

سل (توبركلوزيس) يک بيماري عفوني شايع در سراسر نقاط جهان است که موجب صدمات اقتصادي و بهداشتي بسيار زيادي شده است. اين بيماري توسط گونه‌هاي مختلف مايکوباکتريا، به‌طور معمول در انسان توسط مايکوباکتريوم توبركلوزيس و در حيوانات توسط مايکوباکتريوم بوويس ايجاد مي‌شود (۳،۱۲).

روش‌هاي متعددي براي تشخيص سل گاوي وجود دارد. ولي با توجه به خواص آنتي‌ژن مشترك مايکوباکتريوم بوويس با ساير مايکوباکتريوم‌ها تشخيص سرولوژيکي آن بسيار مشکل بوده و کشت باکتري هنوز مطلوب‌ترين گزينه براي تشخيص قطعي اين بيماري است (۱۵، ۱۶). از آنجائي که سرعت رشد باکتري بسيار کند است و اعلام نتيجه آن بيش از شش هفته طول مي‌کشد لذا براي برنامه‌هاي مبارزه با بيماري سل که در سطح وسيعي از جمعيت انجام مي‌شود، مناسب نيست. رايج‌ترين روش، استفاده از آزمون‌هاي ازدياد حساسيت تأخيري مي‌باشد (۵). آزمايشات مختلفي بر پايه آنتي‌بادي براي تشخيص بيماري سل ابداع شده است. به خاطر در دسترس بودن توالي کامل ژنوم مايکوباکتريوم بوويس در بانک‌هاي اطلاعات ژنتيکي، شناسايي آنتي‌ژن‌هاي اختصاصي که بتواند براي تشخيص آنتي‌بادي‌ها مورد استفاده قرار بگيرد ممکن شده است (۱۳). روش‌هاي شناسايي آنتي‌بادي نيز به اشکال مختلف توسعه پيدا کرده است. با اين حال، الايزا هنوز به عنوان يك روش معتبر مطرح مي‌باشد (۱). در سال‌هاي اخير، استفاده از آنتي‌ژن‌هاي اختصاصي مايکوباکتريوم بوويس که تنها در سويه‌هاي بيماري زا وجود دارد و در ساير سويه‌ها موجود نمي‌باشد مورد توجه زيادي قرار گرفته است (۹، ۱، ۱۳).

سويه‌هاي عفوني مجموعه يا کمپلکس مايکوباکتريوم توبركلوزيس داراي ۱۶ ناحيه مختلف که نواحي تفاوت RD (Regions of Difference) نام‌گذاري شده‌اند در ژنوم خود جهت کدگذاري آنتي‌ژن‌هاي مختلف مي‌باشند (۱۱). يکي از مهم‌ترين آنتي‌ژن‌ها که در ناحيه RD۲ کد گذاري مي‌شود، آنتي ژن MPT64 يا (major protein of *M. bovis* 64) مي‌باشد. اما اين منطقه در سويه BCG و مايکوباکتريوم‌هاي غيربيماري‌زا و مايکوباکتريوم‌هاي محيطي وجود ندارد (۴، ۶).

بنابراين تشخيص سريع و دقيق سل در دامپزشکي قبل از تبديل شدن بيماري دام به فرم فعال بيماري که موجب انتقال آن به ساير دام‌ها و همنچنين انسان مي‌شود بسيار مهم و ضروري است. هدف از اين کار معرفي آنتي‌ژن نوترکيب MPT64 به عنوان يک کانديد مناسب براي تشخيص زود و سريع بيماري سل در دام‌ها مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌هاي مورد آزمايش: جمعيت مورد مطالعه در اين تحقيق شامل ۳۲

www.SID.ir

Archive of SID

گاو آلوده يا مشكوک به سل بودند که از نظر علائم باليني مورد ارزيابي دکتر دامپزشک قرار گرفته بودند و وجود بيماري در آنها مثبت گزارش شده بود. تمامي دام‌هاي فوق از نظر آزمون جلدي PPD نيز مثبت گزارش شده بودند. علاوه براين، از ۲۰ گاو سالم که فاقد هيچ گونه علائم باليني مربوط به بيماري خاصي باشند نيز به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. نمونه‌گيري از گاوها به مدت ۴ ماه از کشتارگاه‌هاي استان تهران، البرز و فارس انجام شد. سرم تهيه شده از اين نمونه‌ها پس از سانتريفيوژ تا زمان انجام آزمون الايزا با رعايت اصول ايمني در دماي ۲۰- درجه سانتي‌گراد نگهداري شد. همچنين از دام‌هاي بيمار، پس از کشتار و کالبدگشايي جهت انجام کشت از غدد لنفاوي رتروفارنژيال، مدياستينال و برونکيال نمونه‌برداري شد.

آنتي‌ژن نوترکيب

در اين مطالعه از آنتي‌ژن نوترکيب MPT64 مايکوباکتريوم بوويس استفاده گرديد که قبلاً در موسسه رازي تهيه شده بود. به منظور شناسايي و تاييد پروتئين نوترکيب MPT64 از روش الکتروفورز در ژل آگارز با غلظت ۱۵٪ و روش وسترن بلات با استفاده از آنتي‌بادي اختصاصي بر عليه برچسب هيستيديني متصل به اين پروتئين نوترکيب، استفاده شد. همچنين براي تعيين غلظت مناسب از آنتي‌ژن از روش لوري استفاده شد.

کشت غده‌هاي لنفاوي

غدد لنفاوي تهيه شده از هرکدام از دام‌هاي تحت مطالعه در محيط‌هاي کشت لوانشتاين جانسون پيرووات‌دار (LP) و لوانشتاين جانسون گليسرول‌دار (LG) به روش سود در آزمايشگاه توبرکولين موسسه رازي کشت داده شد. براي اين منظور تکه‌هاي قسمت کورتکس و پاراکورتکس غدد لنفاوي با شن استريل کاملا له شد. سپس مقدار ۳۰ تا ۵۰ ميلي‌ليتر سود نرمال به آن افزوده و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقيقه انکوبه گرديد تا عمل هضم و آلودگي‌زدايي انجام گيرد. پس از طي شدن زمان فوق حدود ۵ ميلي‌ليتر از مايع فوقاني هر نمونه به لوله فالکون اضافه شد تا اسيد با سود به حالت خنثي درآيد و در نتيجه معرف برم تيمول به رنگ سبز زيتوني يا در بيايد. پس ازحدود ۲۰ دقيقه سانتريفيوژ، مايع‌رويي لوله‌ها دور ريخته و سوسپانسيون رسوب حاصل در سرم فيزيولوژي بدست امد. در انتها به ميزان ۰,۱ تا ۰,۲ ميلي‌ليتر از سوسپانسيون فوق به محيط کشت تلقيح گرديد. لوله‌هاي کشت تلقيح شـده به مدت ۸ هفته متوالي در دماي ۳۷ درجه سـانتي‌گراد در انکوباتور نگهداري شدند. در تمام اين مدت وجود هرگونه کلوني بر روي محيط کشت از نظر رنگ‌اميزي اسيد فاست مورد بررسي قرار گرفت.با توجه به نتايج بدست آمده نمونه‌ها به سه دسته مختلف تقسيم‌بندي شدند. نمونه‌هايي با تست جلدي و کشت مثبت، نمونه‌هايي با تست جلدي مثبت و کشت منفي و در نهايت نمونه‌هاي سالم که داراي تست جلدي منفي از گاوهاي سالم تهيه شده بود.

شکل۱- نمايي از يک نمونه کشت مثبت عقده لنفاوي گاو آلوده به سل

www.SID.ir

Archive of SID

طراحي الايزاي غيرمستقيم براي اندازه‌گيري آنتي‌بادي اختصاصي

ابتدا براي بدست آوردن رقت‌هاي مناسب از آنتي‌ژن و آنتي‌بادي‌هاي كنژوگه و دستيابي به حداكثر فاصله ممكن بين جذب نمونه‌هاي كنترل مثبت و منفي مورد آزمايش از جدول صفحه آزمون يا همان پليت checker board استفاده شد. براي انجام آزمون الايزا آنتي‌ژن نوتركيب MPT۶۴ در بافر كوتينگ كه حاوي ۰،۰۵۲ گرم كربنات سديم و ۰،۰۴۲ گرم بي كربنات سديم در ۱۰ سي‌سي آب مقطر مي‌باشد، حل شد. سپس به ميزان ۱۰۰ ميكروليتر از محلول آنتي‌ژن تهيه شده به هر كدام از چاهك‌ها پليت الايزا افزوده شد و در دماي ۴ درجه سانتي‌گراد به مدت يک شبانه روز انكوبه شد. بعد از تخليه محتويات ميكروپليت چاهك‌ها با بافر شستشو بافر (فسفات سالين) با pH=۷/۴ حاوي توئين ۲۰ شستشو داده شد سپس هر يك از چاهك‌ها با حجم ۳۰۰ ميكروليتر از بافر مسدود كننده كه شامل بافر PBS حاوي ۵ درصد اسكيم ميلک بود پر شد و براي يک ساعت در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد نگهداري گرديد و مراحل شتسشو مجددا تكرار شد. در مرحله بعد نمونه‌هاي سرمي در رقت يك صدم به چاهك‌ها به حجم ۱۰۰ ميكروليتر اضافه شد و براي ۲ ساعت در انكوباتور ۳۷ درجه انكوبه گرديد. بعد از اتمام انكوباسيون، شستشوي مجدد انجام شد و سپس ۱۰۰ ميكروليتر از آنتي‌بادي كونژوگه (آنتي‌بادي نشانه‌دار با آنزيم پراكسيداز) به هر يك از چاه كه اضافه گرديد و به مدت ۱ ساعت در انكوباتور ۳۷ درجه انكوبه شد. سپس چاهك‌ها براي ۵ مرتبه شستشو داده شدند و سرانجام محلول سوبسترا /كروموژن (TMB) به حجم ۱۰۰ ميكروليتر به هر يك از چاهك‌ها اضافه گرديد و براي ۳۰ دقيقه در دماي اطاق و تاريكي گذاشته شد و در آخر، واكنش با افزودن محلول متوقف‌كننده اسيد سولفوريك رقيق شده ۰/۱ مولار متوقف و جذب نوري چاهك‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گرديد. ميزان نقطه برش براي تمايز نمونه‌هاي مثبت و نمونه‌هاي منفي با فورمول زير محاسبه گرديد.

(Cut off) = ميانگين OD نمونه هاي منفي + دو واحد استاندارد (SD) نقطه برش

نتايج

پس از انجام الكتروفورز به روش SDS-PAGE و با توجه به محل قرار گرفتن باندهاي با اندازه مشخص (ماركر)، باند پروتئين نوتركيب (MPT64) در حدود ۲۴ كيلودالتون شناسايي شد. به دليل شناسايي و تاييد باند منسوب به پروتئين نوتركيب MPT64 عمل وسترن بلات در مجاورت آنتي‌بادي اختصاصي بر عليه برچسب هيستيديني Histaq انجام گرديد. با مقايسه غشاء رنگ شده وسترن بلات و ژل SDS-PAGE هم ارز آن مشاهده مي‌شود كه پروتئين‌هاي رديابي شده در روي غشاء باندهاي منسوب به پروتئين‌هاي نوتركيب مورد نظر مي‌باشد كه با آنتي‌بادي واكنش نشان داده‌اند.

همچنين در نتيجه كشت، تعداد ۹ نمونه از ۳۲ نمونه با تست جلدي مثبت، بروي محيط كشت پس از گذشت ۵ هفته بالا آمد و كشت آنها نيز مثبت شد(شكل ۱).

در محاسبه غلظت‌ها و رقت‌هاي مناسب براي آنتي‌ژن كوتينگ، سرم و آنتي‌بادي كونژوگه با روش جدول متقاطع تيتراسيون، غلظت مناسب براي آنتي‌ژن كوتينگ MPT64، ۱۸ ميكروگرم بر ميلي‌ليتر و آنتي‌ژن كوتينگ PPD، ۴۳/۹۰ ميكروگرم بر ۱۰۰ ميكروليتر بدست آمد. مناسب‌ترين رقت آنتي‌بادي كنژوگه در تيتر ۱/۵۰۰۰ بدست آمد(جدول۱). همچنين بهترين رقت براي بافر مسدود كننده (Skim milk ۵٪) مشخص گرديد (جدول ۲). براي تعيين ميزان نقطه برش و تمايز نمونه‌هاي مثبت از نمونه‌هاي منفي، تمامي نمونه‌هاي سرمي منفي در رقت يک صدم در قالب الايزاي غير

جدول ۱- تعيين رقت مناسب از آنتي بادي كونژوگه ضد ايمونوگلوبين گاوي جهت انجام آزمون الايزا

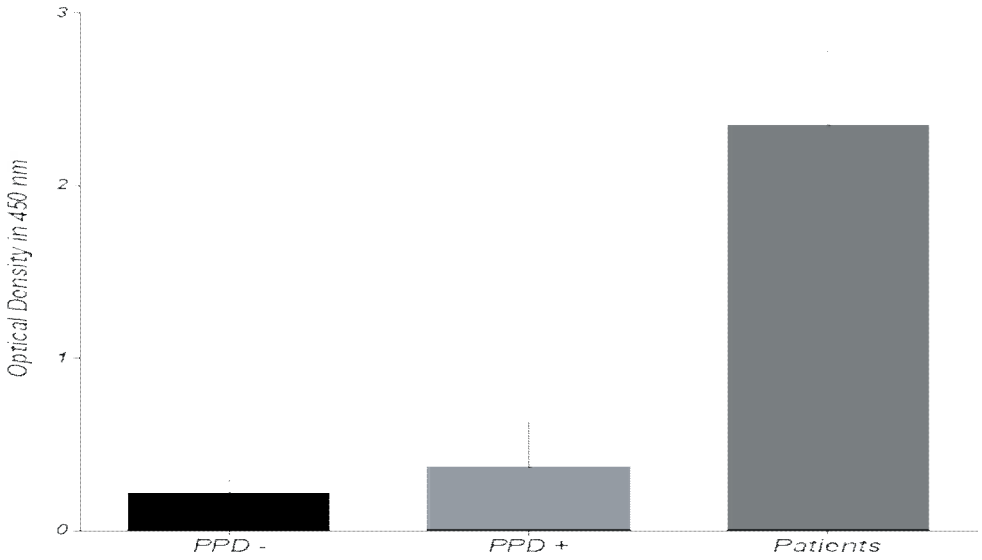
Bovine sample	۱/۵۰۰۰	۱/۱۰۰۰۰	۱/۲۰۰۰۰	۱/۴۰۰۰۰
PPD+	۱/۹۴۲	۱/۸۴۰	۲/۱۵۱	۲/۴۶۵
PPD-	۰/۲۸۳	۰/۴۸۱	۰/۵۴۰	۰/۶۷۳

جدول ۲- تعيين بهترين رقت براي بافر مسدود كننده

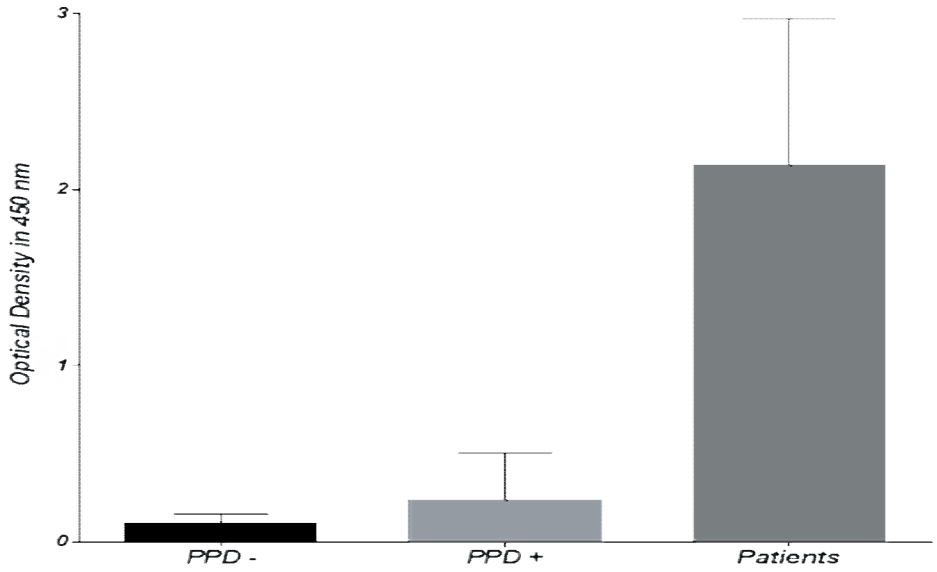
samples	skime milk ٪۲	skime milk ٪۲
Blanke (carbonate buffer)	۰/۰۵۳	۰/۰۳۵
PPD-	/۱۸۰	۰/۱۹۵

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۱- ميزان آنتي بادي ايجاد شده برعليه پروتئين نوتركيب MPT64 درگروه هاي تحت مطالعه



نمودار ۲- ميزان آنتي بادي ايجاد شده برعليه پروتئين PPD درگروه هاي تحت مطالعه

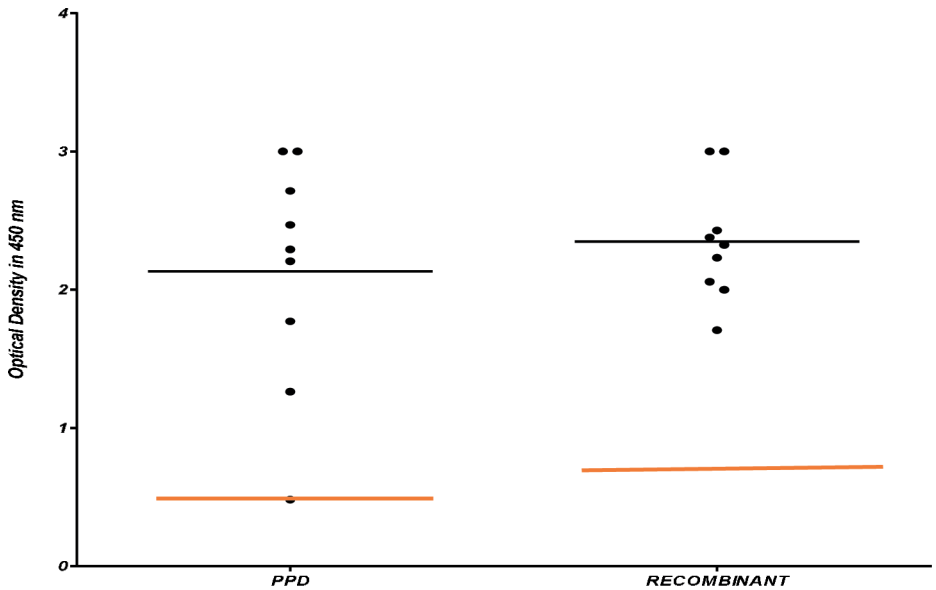
www.SID.ir

Archive of SID

مستقیم بهینه شده مورد آزمایش قرار گرفتند.
میزان جذب نوري نمونه‌هاي كنترل منفي در طول موج ۴۵۰ نانومتر محاسبه شد و ميانگين آن‌ها براي رقت يک صدم ۰,۲۱۵ محاسبه گرديد. كه اين ميزان در مجاورت آنتي‌ژن PPD، ۰,۱۰۲ مي‌باشد. ميانگين نمونه‌هاي بيمار نيز در رقت يک صدم ۲,۳۴۷ محاسبه گرديد كه اين عدد در مجاورت آنتي‌ژن PPD، ۲,۱۳۳ مي‌باشد (نمودار ۳،۲،۱). انحراف استاندارد نمونه‌هاي فوق نيز به ميزان ۰,۳۷۸ محاسبه گرديد. با استفاده از فرمول cut off، نقطه برش در رقت يک صدم براي آنتي‌ژن نوتركيب MPT64، ۰,۳۶۹ بود و براي آنتي‌ژن PPD، ۰,۲۰۴ محاسبه گرديد.
با توجه به اينكه در نمونه‌هاي آلوده مورد آزمايش در حضور آنتي‌ژن PPD تعداد يک نمونه كمتر از نقطه برش بودند لذا اين نمونه به عنوان منفي كاذب در نظر گرفته شد.

بحث

عليرغم همه تلاش‌ها براي كنترل سل دامي، اين بيماري همچنان باعث وارد كردن بار اقتصادي زيادي بروي صنايع و دامداران و همچنين سلامت انسان مي‌شود(۱۲). برنامه ريشه‌كني با استفاده از روش تست جلدي و كشتار دام مثبت در بسياري از كشورهاي پيشرفته موفق بوده است. با اين حال، فقط يک روش تست جلدي به صورت تنها داراي حساسيت و اختصاصيت كمي است (۱۵). همچنين چون اين روش وابسطه به شخص مي‌باشد، امكان خطا و اشتباه نيز بالا مي‌رود. كشت باكتري نيز طولاني مدت است. از اين رو تكنيک‌هاي مولكولي مي‌توانند به طور مستقيم مايكوباكتريوم بوويس را شناسايي كنند، اما اين روش‌ها هزينه‌بر و نياز به دستگاه‌هاي پيشرفته با كاربران متخصص و آموزش ديده مي‌باشد.از اين رو توليد آنتي‌ژن‌هاي اختصاصي مايكوباكتريوم كه فقط در انواع بيماري‌زاي باكتري وجود داشته باشد بسيار قابل توجه و مهم است (۱۳). الايزا به عنوان يكي از روش‌هاي سرولوژيكي دراندازه‌گيري ميزان آنتي‌بادي اختصاصي بر عليه آنتي‌ژن انتخابي در فاز جامد محسوب مي‌شود كه علاوه بردقت، سهولت و سرعت انجام آن از مزاياي اين روش محسوب مي‌شود. وجود و انتخاب يک آنتي‌ژن مناسب براي طراحي و انجام الايزا داراي اهميت بالايي است (۲). با توجه به اين كه آنتي ژن MPT64 يک پروتئين اختصاصي مايكوباكتريوم بوويس مي‌باشد كه در انواع واكسينال و ساير مايكوباكتريوم‌هاي محيطي و غير بيماريزا وجود ندارد. از اين رو اين آنتي‌ژن كانديد مناسبي براي انجام آزمون الايزا جهت تشخيص نوع بيماري‌زاي باكتري مي‌باشد (۱۸,۱۷).
در سال‌هاي اخير در مطالعات متعددي از روش‌هاي سرولوژيك جهت رديابي بيماري سل استفاده شده است. نتايج بدست آمده از اين تحقيقات دانشمندان را براي توسعه و تحكيم اين امر بسيار دلگرم نموده است. به عنوان يكي از مهم‌ترين مطالعات در اين زمينه مي‌توان به گزارشي استناد كرد كه استفاده از آنتي‌ژن‌هاي ۶-ESAT و MPBV۷۰ مي‌تواند با حساسيت بالاي ۹۸٪ نمونه‌هاي آلوده به سل گاوي را تشخيص دهد(۷). در سال ۲۰۱۲ سوزا و همكارانش با استفاده از پروتئين‌هاي نوتركيب از جمله ۶-ESAT و ۱۰-CFPو PE۱۳ و PE۵ و MPB۸۳ و MPBV۷۰ و غيره به عنوان آنتي‌ژن و با روش الايزا سعي در تشخيص آنتي‌بادي ضد آن را داشت كه از بين آنتي‌ژن‌هاي مورد استفاده تنها MPB۸۳ و MPBV۷۰ و۶-ESAT رضايت بخش بود كه توانست با آن‌ها دام‌هاي مثبت و منفي را از هم تفكيک نمايند (۱۴).
يكي از آنتي‌ژن‌هايي كه در ساليان اخير مورد توجه و استفاده تشخيصي



نمودار ۳- مقايسه بين ميزان آنتي بادي ايجاد شده برعليه پروتئين نوتركيب و آنتي ژن PPD دردام هاي بيمار

www.SID.ir

Archive of SID

در سل گاوي قرار گرفته، پروتئين MPT64 بوده است. لي يو و همكارانش در مطالعه‌اي كه در سال ۲۰۱۲ مبني بر استفاده از پروتئين MPT64 درتشخيص بيماران مبتلا به سل انجام دادند، به اين نكته پي بردند كه استفاده از اين پروتئين روشي سريع و كارآمد جهت تشخيص بيماري سل در افراد مي باشد(۸). در مطالعه ديگري از پروتئين MPT64 بروش روماتوگرافي در تشخيص جدايه‌هاي كشت منفي استفاده شد و نتايج اميدوارکننده‌اي را در تشخيص نمونه‌هاي مجموعه مايكوباكتريوم‌هاي توبركلوزيس كمپلكس (MTBC) از غير توبركلوزيس (NTM) به همراه داشت (۱۰).

يافته‌هاي اين تحقيق نشان مي‌دهد كه در مقايسه با روش سنتي تشخيص سل گاوي كه مبتني بر انجام آزمون جلدي با استفاده از عصاره خام آنتي‌ژن‌هاي مايكوباكتريوم است، روش الايزا روشي مناسب با اختصاصيت و حساسيت بالاست كه بسيار مورد توجه قرار مي‌گيرد و به همين دليل مي‌تواند همسو و همراه با تست جلدي به عنوان يک تست غربالگر مهم، مفيد و با سرعت بيشتر در دام‌هاي آلوده مورد استفاده قرار گيرد. همچنين روش انجام شده در اين مطالعه و آزمون الايزاي طراحي شده با استفاده از آنتي‌ژن نوتركيب MPT64 مي‌تواند با دقت نسبتا قابل قبولي نمونه‌هاي دام‌هاي بيمار را از سالم تشخيص و تميز بدهد.

در مجموع نتايج بدست آمده در اين تحقيق ضمن هم‌خواني و تاييد مطالعات و گزارش‌هاي همسوي انجام شده قبلي مي‌تواند موید اين نكته باشد كه آنتي‌ژن نوتركيب MPT64 را مي‌توان به علت اختصاصي بودن، براي طراحي روش‌هاي سريع تشخيصي بيماري سل گاوي مورد استفاده قرار داد.

منابع مورد استفاده

1. Bezos J., C. Casal, B. Romero, B. Schroeder, R. Hardegger, A.J. Raeber, L. et al. 2014. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97, S44-52.

2. Casal C., A. Díez-Guerrier, J. Álvarez, S. Rodriguez-Campos, A. Mateos, R. Linscott, et al. 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology* 170, 342-51.

3. Collins J.D. 2006. Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. *Veterinary Microbiology* 112, 369-381.

4. Fu R., C. Wang, C. Shi, M. Lu, Z. Fang, J. Lu, F. Wang et al. 2009. An improved whole-blood gamma interferon assay based on the CFP21-MPT64fusion protein. *Clinical and Vaccine Immunology* 16, 686-91.

5. Good M and A.Duignan.2011. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Veterinary Medicine International* 2011,410470.

6. Jørstad M.D., M. Marijani, A.M. Dyrhol-Riise, L. Sviland and T. Mustafa. 2018. MPT64 antigen detection test improves routine diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis in a low-resource setting: A study from the tertiary care hospital in Zanzibar. *PLoS One* 13, e0196723.

7. Koo H.C., Y.H. Park, J. Ahn, W.R. Waters, M.V. Palmer, M.J. Hamilton, et al. 2005. Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4498-506.

8. Liu Z., C. Zhu, H. Yang, H. Hu, Y. Feng, L. Qin, et al. 2012. Clinical value of ELISA-MPT64 for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Current Microbiology*. 65:313-8.

9. Lyashchenko K.P., A. Grandison, K. Keskinen, A. Sikar-Gang, P. Lambotte, J. Esfandiari, G.C. et al. 2017. Identification of Novel Antigens Recognized by Serum Antibodies in Bovine Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* e00259-17

10. Nerurkar V., S. Kattungal, S. Bhatia. 2016. Utility of MPT64 antigen test for differentiating mycobacteria: Can correlation with liquid culture smear morphology add further value? *Clinical and Vaccine Immunology* 59:185-7.

11. Parkash O., B.P. Singh and Pai M. 2009. Regions of differences encoded antigens as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans. *Scandinavian Journal of Immunology* 70: 345-57.

12. Ramos D.F., P.E. Silva and O.A. Dellagostin. 2015. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Brazilian Journal of Biology* 75: 830-7.

13. Schiller I., B. Oesch, H.M. Vordermeier, M.V. Palmer, B.N. Harris, K.A. Orloski, B.M. et al. 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases* 57:205-20.

14. Souza I.I., E.S. Melo, C.A. Ramos, T.A. Farias, A.L. Osório, K.S. Jorge, et al. 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springerplus* 1:77.

15. Torgerson P.R. and D.J. Torgerson. 2010. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends in Microbiol* 18: 67-72.

16. Une Y and T. Mori. 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 30: 415-25.

17. Vordermeier M., S.V. Gordon and R.G. Hewinson. 2011. Mycobacterium bovis antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Veterinary Microbiology* 151:8-13.

18. Yan Z.H., L. Yi, P.J. Wei, H.Y. Jia, J. Wang, X.J. Wang, B. et al. 2018. Evaluation of panels of Mycobacterium tuberculosis antigens for serodiagnosis of tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 22: 959-965.

www.SID.ir