Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 2 (07-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Design of an ELISA Kit for Detection Human Acute Q Fever

Zahra Naderipour[1], Mehdi Golchin[1] , Mohammad Khalili[1,2]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2. Research Center of Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

Article Information

Article history:
Received:2014/04/10
Accepted:2014/06/25
Available online:2014/07/20

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 1393; 8(2): P 28-34

Corresponding author at:

Dr Mehdi Golchin

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Email:
golchin@ uk.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Q fever, due to *Coxiella burnetii*, is a zoonosis with a worldwide distribution. This disease is a public health problem in many countries especially in recent years. The diagnosis of Q fever relies mainly upon serology, the most commonly used method being the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). This technique is preferred to other serological tests because of its reliability, high sensitivity and specificity. The aim of this research was to design an ELISA kit for detection of acute Q fever.

Materials and Methods: In current study, an indirect ELISA has been developed and optimized for detection of anti-human phase II *C. burnetii* antibodies. Activity of developed kit was compared with a commercial kit. Also 45 suspected serum samples were tested to evaluate its performance.

Results: The constructed ELISA kit was able to detect serum samples with high specificity and sensitivity similar to a commercial diagnostic kit. Evaluation of 45 suspected human serums by this kit revealed 9 sera (20 %) as positive, 32 sera (71.11 %) as negative and 4 sera (8.88 %) as border line.

Conclusions: These data indicated that the developed ELISA Kit can be used in diagnosis of acute Q fever in human patients

Key Words: *Diagnostic kit; Coxiella burnetii; ELISA; Acute Q fever*

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Naderipour Z, Golchin M, Khalili M. Design of an ELISA Kit for Detection Human Acute Q Fever . Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (2) :28-34

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

طراحی کیت الیزای تشخیصی فرم حاد بیماری تب کیو انسان

زهرا نادری پور[۱]، مهدی گلچین[۱]، محمد خلیلی[۱و۲]

۱. گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۳/۱۰

پذیرش:۱۳۹۳/۰۴/۲۵

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۵/۲۶

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1392; 8(2): P 28-34

نویسنده مسئول:

دکتر مهدی گلچین

گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

تلفن: ۹۸۳۴۱۳۲۰۲۹۱۳+

پست الکترونیک:

golchin@uk.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: باکتری *کوکسیلا بورنتی* عامل ایجاد بیماری تب کیو است که یک بیماری با گسترش جهانی می باشد. این بیماری یک مشکل سلامت عمومی در بسیاری از کشورها بخصوص در سال های اخیر است. تشخیص تب کیو بر اساس روش های سرولوژی می باشد. از میان روش های تشخیصی سرولوژیکی تب کیو، تکنیک الیزا نسبت به سایر تست های سرولوژی ارجحیت دارد، زیرا یک روش قابل اعتماد با حساسیت و ویژگی بالا است. هدف از تحقیق حاضر طراحی یک کیت الیزای بومی جهت تشخیص فرم حاد بیماری تب کیو در انسان می باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه، جهت تشخیص سرمی فرم حاد این بیماری در انسان، یک کیت الیزا تشخیصی آنتی بادی های ضد کوکسیلا بورنتی فاز II در انسان طراحی و بهینه سازی شد. عملکرد کیت ساخته شده با کیت تجاری مقایسه گردید و همچنین کارایی آن در تشخیص ٤٥ نمونه سرمی مشکوک به بیماری تب کیو مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بررسی عملکرد کیت ساخته شده نشان داد که این کیت توانایی تشخیص نمونه های سرمی مشکوک را داشته و حساسیت و ویژگی آن همانند کیت تجاری آن می باشد. همچنین سنجش ٤٥ نمونه سرم انسانی مشکوک در یکی از مناطق آلوده نشان داد که تعداد ۹ نمونه (۲۰٪) مثبت، ۳۲ نمونه (۷۱/۱۱٪) منفی و ٤ نمونه (۸/۸۸٪) حد مرز می باشند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که می توان از کیت طراحی شده در این مطالعه برای تشخیص فرم حاد بیماری تب کیو در انسان استفاده نمود.

کلمات کلیدی : کیت تشخیصی، *کوکسیلا بورنتی*، الیزا، فرم حاد تب کیو

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

مقدمه

تب کیو بیماری عفونی زئونوز ناشی از باکتری گرم منفی داخل سلولی اجباری، *کوکسیلا بورنتی*، می باشد. علاوه بر انسان این باکتری می تواند در بند پایان، حیوانات خانگی، پرندگان، پستانداران اهلی و وحشی عفونت ایجاد نماید (۱).

بیماری تب کیو برای اولین بار در سال ۱۹۳۵ شناسایی و در سال ۱۹۳۷ توسط Derrick EH به صورت یک بیماری تب دار در کارگران کشتارگاهی در بریزبان استرالیا توصیف شد (۲). تب کیو در سراسر جهان به جز نیوزلند و قطب جنوب اندمیک می باشد (۳، ۴).

بیماری تب کیو در انسان به صورت یک بیماری حاد تا یک بیماری مزمن کشنده مشاهده می شود (۵). هیچ شکل مشخص و ویژه ای از تب کیو حاد وجود ندارد و علایم بالینی از بیماری به بیمار دیگر کاملاً متفاوت است (۳). اکثریت موارد (حدود ۶۰٪) عفونت *کوکسیلا بورنتی* در انسان بدون علامت یا یک بیماری مشابه آنفلوانزای غیر اختصاصی با علایمی شامل تب، سردرد، سرفه غیر مولد، درد عضلانی و درد مفاصل در فاز حاد عفونت می باشد. بنابراین بیماری از روی علایم غیر قابل تشخیص می-باشد (۷، ۶). علایم اصلی تب، علایم تنفسی و بالا رفتن سطح

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

آنزیم های کبدی می توانند به صورت هم زمان در تب کیو حاد وجود داشته باشند (۸).

علائمی نظیر پنومونی آتیپیک، درگیری قلبی، راش های پوستی، علائم عصبی و هپاتیت ممکن است در عفونت تب کیو حاد دیده شود (۳، ۹). پنومونی عمده ترین علامت تب کیو در برخی از کشورها می باشد. تب کیو مزمن ماه ها تا سال ها بعد از عفونت حاد و در افرادی که شرایط مستعد کننده را دارند دیده می شود (۹). اندوکاردیت علامت بالینی معمول تب کیو مزمن است (۸). اندوکاردیت تب کیو اغلب یک بیماری شدید همراه با تأخیر طولانی در تشخیص است (۱۱). عفونت عروقی به عنوان دومین علامت غالب، عفونت های استخوانی و مفصلی، هپاتیت نیز در تب کیو مزمن دیده می شود (۹).

سویه های جدا شده از میزبان های یوکاریوتی واجد لیپویلی-ساکارید کامل (صاف) بوده و فاز I نامیده می شوند؛ در حالیکه سویه های پاساژ یافته در کیسه زرده تخم مرغ نطفه دار فرم خشن یا فاز II هستند که فاقد حدت اند (۵). فرم وحشی حاد، فاز I، در سلول های بدن پس از ورود به شکل بدون حدت، فاز II، تغییر می یابند اما نکته متناقض و جالب اینست که آنتی-بادی‌های ضد فاز II زودتر از فاز I مورد شناسایی قرار می گیرند. در حالی‌که مقادیر بالای آنتی بادی های ضد فاز I در طول تب کیو مزمن قابل شناسایی اند (۱۲). تشخیص تب کیو از طریق کشت، روش های مولکولی و روش های سرولوژیکی امکان پذیر است (۱۰). در حیوانات و انسان، راه ورود باکتری گوارشی-تنفسی است. ارگانیسم شدیداً عفونت‌زا است و حتی یک ارگانیسم قادر به ایجاد عفونت می باشد (۱۰). تشخیص تب کیو از طریق کشت به جمع آوری دقیق نمونه، تجربه پرسنل آزمایشگاه و ایمنی زیستی سطح۳ (BSL3) نیاز دارد. روش های مولکولی نیز باید در آزمایشگاه با ایمنی زیستی سطح ۳ انجام شوند و خیلی حساس نیستند و جهت تأیید باید آزمایشات سرولوژی نیز انجام شود. بنابراین تشخیص تب کیو عمدتاً بر اساس روش های سرولوژیکی صورت می گیرد (۵).

تکنیک های سرولوژی که معمولاً جهت تشخیص تب کیو استفاده می شوند شامل تست ثبوت کمپلمان (CFT)، ایمونوفلورسنس غیر مستقیم (IFA) و الیزا (ELISA) می باشند. الیزا نسبت به بقیه تست های مورد استفاده حساسیت جزئی بالاتر و ویژگی خوبی دارد (۴، ۱۳، ۱۴) و در مقیاس زیاد قابل انجام است و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه بوده و یک روش قابل اعتماد برای نشان دادن آنتی بادی های ضد *کوکسیلا بورنتی* می باشد (۴).

از کیت های تجاری آماده الیزا می توان جهت تشخیص آنتی بادی های فاز II یا آنتی بادی های فاز I و II *کوکسیلا بورنتی* استفاده کرد (۴، ۱۰).

نظر به اینکه استفاده از کیت های تجاری با مشکلاتی از قبیل عدم دسترسی آسان و همچنین هزینه بسیار زیاد آنها روبه رو است، با توجه به در اختیار داشتن آنتی ژن خالص غیر فعال شده فاز II *کوکسیلا بورنتی*، هدف از انجام این تحقیق، این بوده است که بتوان جهت تشخیص سرمی این بیماری در انسان، کیت الیزای تشخیصی آنتی بادی های ضد *کوکسیلا بورنتی* در انسان طراحی شود و بعد از بهینه سازی عملکرد آن، امکان تشخیص آزمایشگاهی این بیماری در آزمایشگاه های تشخیص طبی کشور و انجام مطالعات سرواپیدمیولوژیک فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

توسعه کیت الیزا

جهت تهیه کیت الیزای تشخیصی از روش الیزای غیر مستقیم استفاده شد. بدین منظور ابتدا کف حفره های پلیت الیزا (Nunc، دانمارک) با ۵۰ میکرولیتر (۱/۳ میکروگرم) آنتی ژن غیر فعال شده فاز II باکتری *کوکسیلا بورنتی* کاملا خالص (Dolfinin ، اسلواکی) با استفاده از بافر بی کربنات ۰/۱ مولار با pH ۹/۵ به عنوان رقیق کننده پوشانده شد و پلیت در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت یک شب نگهداری شد. پس از اتمام این مدت زمان، گوده ها سه بار با محلول PBS شستشو داده شدند و به هر گوده به میزان ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ۲/۵ درصد کازئین (Maravel ، انگلیس) با pH ۷/۳ در دو مرحله تهیه شد: ابتدا ۸۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH ، ۵۰ گرم پودر کازئین و ۲۷ میلی لیتر HCl، pH ۷/۵ ساخته شد و سپس ۵/۸۴ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار از فسفات پتاسیم مونوبازیک (KH2PO4) ، ۳۲ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار از فسفات سدیم (Na2HPO4)، به محلول مرحله قبل اضافه و pH نهایی با استفاده از HCl به ۷/۳ و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر به ۲۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد و به عنوان محلول مهار کننده اضافه گردید و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. در مرحله بعد، پس از ۳ مرتبه شستشوی حفره ها با محلول PBS، نمونه های سرمی به صورت دوگانه با رقت بهینه ۱:۵۰۰ به میزان

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

۵۰ میکرولیتر به حفره های پلیت الیزا افزوده شدند و پلیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت نگهداری شد. سپس شستشو سه بار با محلول یک دهم درصد PBS/Tween 20 (۵۰ میکرولیتر Tween 20 و ۵۰ میلی لیتر PBS) انجام شد و از رقت بهینه ۱:۵۰۰۰ آنتی بادی ثانویه کونژوگه Goat Anti Human IgG (Fc): HRP (Serotec، انگلیس) به میزان ۵۰ میکرولیتر در حفره ها ریخته و مجدداً پلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. متعاقباً پس از شستشوی حفرات، ۵۰ میکرولیتر از سوبسترای تترا متیل بنزیدین (TMB) (۹ میلی لیتر محلول ۰/۱ مولار بافر سیترات ۵ pH + ۱ میلی لیتر TMB (۱ mg/ml) + ۶ میکرولیتر آب اکسیژنه) در آنها ریخته و پلیت به مدت ۲۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و در پایان با استفاده از محلول اسید سولفوریک ۱ مولار واکنش آنزیمی متوقف و میزان جذب نوری نمونه های سرمی و کنترل ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل فیلتر رفرانس ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Anthos 2020، اتریش) قرائت شد. مقادیر و رقت های در نظر گرفته شده ی فوق پس از بهینه سازی شرایط انجام آزمایش از جمله انتخاب رقت مناسب آنتی-ژن، سرم مشکوک، آنتی بادی ثانویه کنژوگه توسط چکر بوردهای (Checkerboards) مختلف با استفاده از رقت های متفاوت آنتی ژن، سرم مشکوک، آنتی بادی ثانویه کونژوگه در روش الیزا غیرمستقیم به صورت دوگانه و همچنین انتخاب بهترین زمان انکوباسیون و بافر مناسب مهار کردن در نتیجه ی ارزیابی زمان های متفاوت انکوباسیون و بافرهای متفاوت مهار کننده به دست آمده و استفاده گردید. بافر های مهار کننده ای که در مرحله بهینه سازی مورد استفاده قرار گرفتند عبارت بودند از محلول های کازئین ۲/۵٪، آلبومین سرم گاوی ۳٪ در محلول PBS و محلول شیرخشک بدون چربی ۲٪ در محلول PBS. بهینه سازی شرایط انجام آزمایش به منظور کسب مطلوب ترین نتیجه در سنجش نمونه های سرمی، به حداقل رساندن واکنش های غیراختصاصی، صرفه جویی در مصرف مواد و همچنین به دست آوردن بهترین نتیجه در کمترین زمان ممکن و با حداقل هزینه، انجام شده است.

مقایسه کیت الیزای توسعه یافته با یک کیت تجاری

تعدادی نمونه سرمی با رقت ۱:۵۰۰ مربوط به بیماران تب-دار مشکوک به تب کیو مراجعه کننده به بیمارستان قائم شهرستان بردسیر کرمان (۱۵)، با کیت ساخته شده و با کیت تجاری (Virion/Serion، آلمان) ارزیابی شدند. سرم ها به صورت دوگانه به میزان ۵۰ میکرولیتر به حفره های پلیت الیزای فوق افزوده شدند. همچنین در یک حفره ۵۰ میکرولیتر از نمونه کنترل منفی و در حفره دیگر از نمونه کنترل مثبت کیت تجاری ریخته شد. برای تعیین عدد Cut-off کیت الیزای طراحی شده، میانگین میزان جذب نمونه های منفی با دو برابر مقدار انحراف معیار جمع و به عنوان مبنا (Cut-off) در نظر گرفته شد. همچنین حساسیت و ویژگی کیت طراحی شده نیز با کیت تجاری مقایسه گردید و جهت محاسبه ی آن از فرمول های زیر استفاده شد (۱۶).

$$Sp = \frac{d}{d+b} \times 100 \qquad Se = \frac{a}{a+c} \times 100$$

a = نمونه هایی که توسط کیت تجاری و کیت طراحی شده مثبت شدند.

b = نمونه هایی که توسط کیت تجاری منفی و توسط کیت طراحی شده مثبت شدند.

c = نمونه هایی که توسط کیت تجاری مثبت و توسط کیت طراحی شده منفی شدند.

d = نمونه هایی که توسط کیت تجاری و کیت طراحی شده منفی شدند.

بررسی نمونه های سرمی با کیت الیزای توسعه یافته

جهت ارزیابی عملکرد کیت طراحی شده، از تعداد ۴۵ نمونه سرمی اخذ شده از افراد مختلف منطقه ی کوهپایه کرمان که به طور تصادفی انتخاب شده بودند و قبلاً شواهدی حاکی از حضور بیماری در این منطقه وجود داشت (۱۷)، استفاده شد. این نمونه-ها به صورت دوگانه طبق روش کیت طراحی و بهینه سازی شده فوق مورد سنجش قرار گرفتند. جهت آنالیز آماری، از آمار توصیفی جهت داده های کیفی استفاده گردید.

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

جدول ۱ میزان جذب نوری به دست آمده از تست چکربورد رقت های مختلف سرم و آنتی بادی ثانویه کنژوگه، جهت انتخاب رقت بهینه ی سرم و آنتی بادی ثانویه کونژوگه درطراحی کیت الیزای غیرمستقیم تشخیصی فرمحاد بیماری تب کیو انسان

		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
	S \ I*	۱:۱۰۰۰	۱:۵۰۰۰	۱:۱۰۰۰۰	۱:۲۵۰۰۰	۱:۵۰۰۰۰	۱:۱۰۰۰۰۰	۱:۷۵۰۰۰
A	۱:۱۰۰	۱/۹۸۶	۰/۹۳۰	۰/۵۱۴	۰/۲۱۲	۰/۱۰۵	۰/۰۴۶	۰/۰۵۷
B	۱:۲۵۰	۱/۹۶۸	۰/۹۳۶	۰/۵۴۹	۰/۲۱۹	۰/۱۰۵	۰/۰۴۶	۰/۰۶۳
C	۱:۴۰۰	۱/۹۳۲	۰/۹۷۱	۰/۶۱۱	۰/۲۵۴	۰/۱۰۷	۰/۰۴۷	۰/۰۶۵
D	۱:۵۰۰	۲/۱۲۸	*۱/۰۶۷	۰/۶۲۴	۰/۳۰۹	۰/۱۳۰	۰/۰۶۰	۰/۰۸۸

I*: رقت های آنتی بادی ثانویه کونژوگه

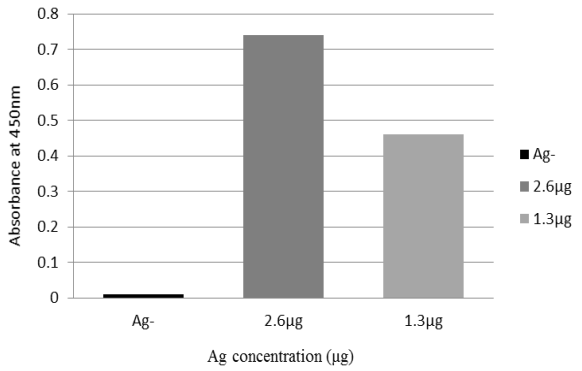
S: رقت های سرم

*: رقت انتخاب شده

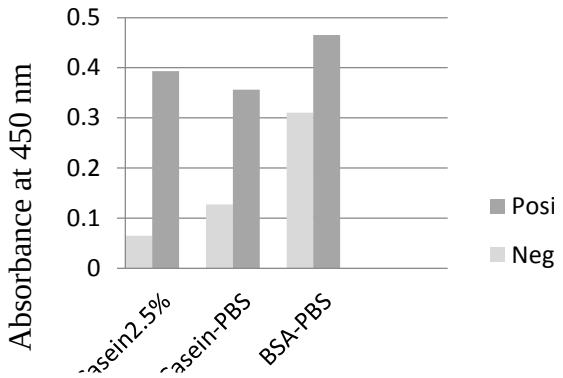
یافته‌ها

نتایج بررسی چکر بوردهای مختلف در توسعه کیت تشخیصی نشان داد که بهترین رقت های انتخابی پس از بهینه سازی شرایط انجام آزمایش، در کیت طراحی شده شامل مقدار ۱/۳ میکروگرم از آنتی ژن به جهت اینکه در این میزان ضمن اینکه در مصرف آنتی ژن صرفه جویی می شود شدت واکنش قابل قبولی را ارائه می داد انتخاب شد و همچنین رقت ۱:۵۰۰ از سرم مشکوک و رقت ۱:۵۰۰۰ از آنتی بادی ثانویه کنژوگه بودند و همچنین محلول کازئین ۲/۵٪ به عنوان بهترین بافر مهار کننده از میان ۳ بافر مهار کننده مختلف مورد بررسی، بدلیل اینکه کمترین واکنش را در مورد نمونه های منفی نشان می داد انتخاب شد. همچنین مدت زمان ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بهترین عملکرد را در مرحله ی مهار کردن داشت (جداول و نمودارهای ۱ و ۲).

پس از بهینه سازی کیت طراحی شده با استفاده از میزان جذب نوری به دست آمده از نمونه های سرمی که در طراحی کیت استفاده شده بودند، مبنای (Cut-off) کیت طراحی شده تعیین و بر اساس نتایج حاصل مشاهده شده مواردی از این نمونه ها که توسط کیت طراحی شده مثبت و منفی تشخیص داده شده و همچنین کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شده، با نتایج حاصل از کیت تجاری به طور کامل مطابقت (۱۰۰٪) داشت (نمودار ۳).



نمودار ۱: میزان جذب نوری به دست آمده از تست چکربورد در دو میزان ۱/۳ و ۲/۶ میکروگرم آنتی ژن به منظور انتخاب رقت بهینه ی آنتی ژن جهت طراحی کیت الیزای غیرمستقیم تشخیصی فرم حاد بیماری تب کیو انسان با نمونه سرم کنترل مثبت.

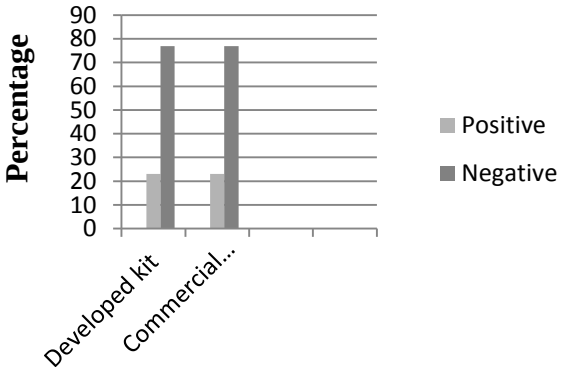


نمودار۲: میزان جذب نوری به دست آمده از تست چکربورد محلول های مختلف مهار کننده به منظور انتخاب محلول مهار کننده ی بهینه جهت طراحی کیت الیزای غیرمستقیم تشخیصی فرم حاد بیماری تب کیو انسان.

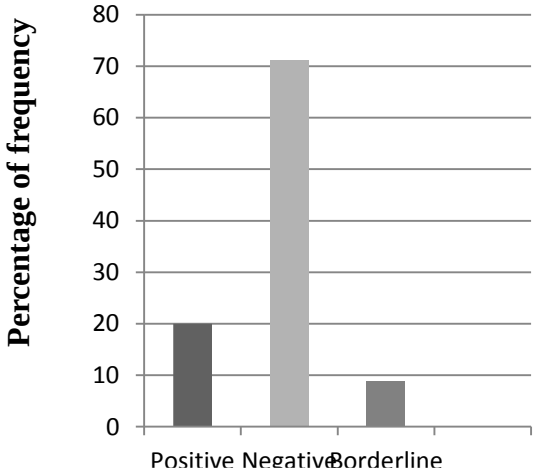
در ارزیابی عملکرد کیت طراحی شده، نتایج حاصل از سنجش ۴۵ نمونه ی سرمی ذکر شده در بالا با استفاده از کیت طراحی شده تعداد ۹ نمونه (۲۰٪) مثبت و تعداد ۳۲ نمونه (۷۱/۱۱٪) منفی و تعداد ۴ نمونه (۸/۸۸٪) Border line تشخیص داده شدند (نمودار ۴).

جدول ۲: بلانک های استفاده شده در طراحی کیت الیزای غیرمستقیم تشخیصی فرمحاد بیماری تب کیو انسان.

Component / Row	Ag	Positive serum	Conjugated Ab	Substrate solution	OD at 450nm
1	-	+	+	+	**0.017**
2	+	+	–	+	**0.007**
3	+	–	+	+	**0.009**



نمودار۳: نتایج حاصل از مقایسه عملکرد کیت طراحی شده با کیت تجاری بر حسب درصد



نمودار۴: نتایج حاصل از ارزیابی عملکرد کیت الایزا طراحی شده بر حسب درصد با استفاده از سنجش ۴۵ نمونه ی سرمی

بحث

بیماری تب کیو در انسان و دام در سالهای اخیر در سراسر جهان و از جمله ایران و کشورهای خاورمیانه شیوع گسترده ای داشته است و یک نگرانی سلامت عمومی در سراسر دنیا به شمار می رود. در قسمت های مختلف ایران مطالعات سرولوژیک انجام گرفته و حضور باکتری ثابت شده است. از آن جمله در مطالعه ای که Khalili و Sakhaee در سال ۲۰۰۹ در کرمان انجام دادند شیوع سرولوژیک تب کیو در گاوها را ۱۰/۷۷٪ گزارش نمودند. نتایج حاصل از مطالعات تب کیو در ایران تفاوت بالایی را بین بزها (۶۳/۷۱٪) و گاوها (۱۰/۷۷٪) نشان می دهد (**۱۷**). همچنین در مطالعات دیگری که Khalili و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی نمونه های انسانی مربوط به بیماران تب دار انجام دادند نشان دادند که ۲۴٪ از این بیماران واجد آنتی بادی های ضد فاز I و ۳۶ درصد واجد آنتی بادی های ضد فاز II در سرم خود بودند (**۱۵**). همچنین این محققین شیوع سرمی تب کیو در گوسفندان را ۲۹/۴۲٪ برآورد کردند (**۱۸**). طبق تحقیقات Rahimi و همکاران میزان حضور باکتری در شیر مخزن گله های گاو استان چهارمحال و بختیاری ۶/۲٪ گزارش شده است (**۱۹**). Kargar و همکاران شیوع *کوکسیلا بورنتی* در سال ۲۰۱۲ در شیر مخزن گله های گاو جنوب ایران ۱۱٪ گزارش کرده اند (**۲۰**). در مطالعه ی وسیعی که در سال ۲۰۱۲ توسط Asadi و همکاران روی ۱۱۳۷ نمونه ی سرمی جمع آوری شده از ۴۳ گله ی گوسفند و بز از مناطق مرکز، جنوب غرب و غرب ایران، انجام شده است، شیوع سرمی تب کیو در این مناطق به ترتیب ۲۶/۹٪، ۲۰/۶٪ و ۱۹/۸٪ گزارش شده است (**۲۱**).

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

تشخیص تب کیو از طریق آزمون الیزا همانطور که در مقدمه ذکر شده است نسبت به سایر روش های تشخیصی ارجحیت دارد. بنابراین در دسترس بودن کیت های الیزای تشخیصی کمک شایانی در جهت تشخیص صحیح بیماری، نحوه انتقال آن بین انسان و دام و همچنین سایر مطالعات اپیدمیولوژیک می نماید. با توجه به ضرورت فوق، طراحی و ساخت یک کیت الیزا در جهت تشخیص آنتی بادی های ضد فاز حاد *کوکسیلا بورنتی* در انسان در این تحقیق انجام گرفت.

در تهیه کیت حاضر همانند سایر کیت های تجاری حاضر، بعنوان آنتی ژن از عامل *کوکسیلا بورنتی* فاز II غیر فعال و خالص سازی شده استفاده گردید. قبلا نیز نشان داده است که این نوع آنتی ژن کارایی لازم جهت تشخیص عامل بیماری را بخوبی دارد (**۲۲**). البته در سالهای اخیر برخی از محققین بدنبال شناسایی پروتئین هایی در ساختار باکتری *کوکسیلا بورنتی* بوده اند که بتوانند آنها را بشکل نوترکیب تهیه نموده و مشکلاتی که از لحاظ مخاطرات آلودگی انسان به عامل بیماری در زمان تهیه آنتی ژن وجود دارد را مرتفع نمایند اما تاکنون در این زمینه موفقیتی حاصل نشده است (**۲۳ ، ۲۴**).

در مراحل بهینه سازی شرایط انجام آزمایش جهت تهیه کیت طراحی شده از مقادیر و رقت های مختلف سرم مشکوک، آنتی بادی ثانویه کنژوگه، آنتی ژن و همچنین بافرهای مهار کننده متفاوتی استفاده شد و مناسب ترین رقت از هر یک از این موارد و مناسب ترین بافر مهار کننده توسط چکربوردهای مختلف انتخاب و در طراحی کیت استفاده شدند که نتایج برخی از آنها در قسمت نتایج آورده شد.

در ارزیابی عملکرد کیت طراحی شده با استفاده از ۴۵ نمونه ی سرمی اخذ شده از بیماران مشکوک به تب کیو، میزان جذب نوری حاصل از سنجش نمونه ها با عدد Cut-off تعیین شده برای کیت، مقایسه و در نتیجه تعداد ۹ نمونه مثبت بودند که از این تعداد ۵ نفر از آن ها اعضاء یک خانواده و واجد گله بز آلوده به بیماری تب کیو بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه در مجموع می توان نتیجه گرفت که کیت الیزای تشخیصی طراحی شده در مقایسه با کیت تجاری، دارای حساسیت و همچنین ویژگی مشابه کیت تجاری Virion/Serion است و می تواند جهت تشخیص سرمی بیماران مشکوک به تب کیو حاد در انسان در آزمایشگاه های تشخیص طبی کشور و انجام مطالعات سرواپیدمیولوژیک استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی و معنوی حوزه پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان و همچنین مرکز تحقیقات بیماری های عفونی گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گردیده است. لذا محققین بر خود لازم می دانند که از زحمات و حسن همکاری مسئولین مربوطه کمال تشکر و قدردانی خود را ابراز نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Rodolakis A. Q fever, state of art: epidemiology, diagnosis and prophylaxis. Small Ruminant Research. 2006; 62: 121–124.
2. Derrick EH. Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Medical Journal of Australia. 1983; 2: 281–99.
3. Alicia A, Henk B, Pierre-Edouard F, Stephen G, Joshua H, Gilbert JK, et al. Diagnosis and management of Q fever-United States. Recommendations and Reports. 2013; Vol 62, No 3.
4. OIE terrestrial manual 2010. Chapter 2.1.1.2 Q fever [Internet]. Paris: OIE; 2010 [update 2010 may 2010; cited 2012]. Available from: http://www.OIE.int. 1-13
5. Jan Kazar. *Coxiella burnetii* Infection. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005; 1063: 105–114.
6. Waag DM. *Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection. Vaccine. 2007; 25(42): 7288-95.
7. Chmielewski T and Tylewska-Wierzbanowska S. Q Fever at the Turn of the Century. Journal of Microbiology. 2012; 61: 81–93
8. Vodkin MH, Williams JC. Overlapping deletion in two spontaneous phase variants of *Coxiella burnetii*. Journal of General Microbiology. 1986; 132: 2587-2594.
9. Angelakis E, Raoult D. Q fever. Veterinary Microbiology. 2010; 140: 297–309.
10. Maurin M, Raoult D. Review of Q fever. Clinical Microbiology Reviews 1999; 12(4): 518-553.

Downloaded from ijmm.ir at 0:39 +0430 on Thursday July 19th 2018

11. Brouqui P, Raoult D: New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2006; 47: 1-13.
12. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis. 2005; 5(4): 219–26
13. OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, birds and bees), Sixth Edition 2008.
14. Rousset EL, Durand BE, Berri MV, Touatier AN. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herd. Veterinary Microbiology. 2008; 124: 280-297.
15. Khalili M, Shahabi-Nejad N, Golchin M. Q fever serology in febrile patients in southeast Iran. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2010; 104: 623-624.
16. Carrico R, Adam L, Aurden K, Fauerbach L. APIC text of infection control and epidemiology, 3rd Edition. 2009.
17. Khalili M, Sakhaee E. An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2009; 80: 1031-1032.
18. Sakhaee E, Khalili M. The first serological study of Q fever in sheep in Iran. Tropical Animal Health and Production. 2010; 42: 1561-1564.
19. Rahimi E, Doosti A, Ameri M, Kabiri E, Sharifian B. Detection of Coxiella burnetii by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. Zoonoses Public Health. 2010; 57: 38-41.
20. Kargar M, Rashidi A, Doosti A. Prevalence of Coxiella burnetii in bovine bulk milk samples in southern Iran. Comparative Clinical Pathology 2013; 22(3), 331-334
21. Asadi J, Khalili M, Kafi M, Ansari-Lari M, Hosseini SM. Risk factors of Q fever in sheep and goat flocks with history of abortion. Comparative Clinical Pathology. 2014; 23(3), 625-630
22. Behymer DE, Ruppanner R, Brooks D, Williams JC, Franti CE. Enzyme immunoassay for surveillance of Q fever . American Journal of Veterinary Research. 1985; 46(11), 2413-2417
23. Beare PA1, Chen C, Bouman T, Pablo J, Unal B, Cockrell DC, Brown WC, Barbian KD, Porcella SF, Samuel JE, Felgner PL, Heinzen RA. Candidate antigens for Q fever serodiagnosis revealed by immunoscreening of a *Coxiella burnetii* protein microarray. Clinical Vaccine Immunology 2008; 15(12), 1771-1779
24. Zhang G, Kiss K, Seshadri R, Hendrix LR, Samuel JE. Identification and cloning of immunodominant antigens of *Coxiella burnetii.* Infection & Immunity. 2004; 72(2), 844–852