



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

Mona Hatamifar¹, Nader Mosavari², Javad Kazemi¹

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

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. *paratuberculosis* (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. *paratuberculosis* 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.

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



Farname Inc.

طراحی سیستم الیزای غیرمستقیم با استفاده از پادگن های ترشحي مايكوباكترىوم آويوم زيرگونه پاراتوبركلوزيس براى تشخيص پاراتوبركلوزيس

مونا حاتمی فر^۱، نادر مصوری^۲، جواد کاظمی^۱

۱. مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران
۲. آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: مايكوباكترىوم آويوم زيرگونه پاراتوبركلوزيس (MAP)، عامل به وجود آورنده پاراتوبركلوزيس است كه به عنوان بيمارى يون نيز ناميده مى شود و علت ضررهاى اقتصادى جبران ناپذير در صنعت دامپرورى به حساب مى آيد. جهت تشخيص آلودگى به پاراتوبركلوزيس، اليزاى غيرمستقيم به عنوان يك روش ساده با حساسيت و ويژگى بالا بيشتر مورد توجه بوده است. از اين رو هدف از اين مطالعه طراحى يك سيستم اليزاى غيرمستقيم جهت تشخيص بيمارى پاراتوبركلوزيس مى باشد.

مواد و روش كار: تعداد ۱۰۰ نمونه سرم از ۱۰ گله در سال ۱۳۹۴ در استان هاى تهران و البرز كه پاراتوبركلوزيس توسط كشت در آن ها به اثبات رسيده با كيت استاندارد مورد مطالعه قرار گرفت و سيستم داخلى مطابق كيت استاندارد طراحى گرديد. جهت طراحى سيستم اليزا با استفاده از پادگن هاى ترشحي، سرم مثبت و منفي واقعي پليت متقاطع تيتراسيون انجام گرفت. جهت تعيين حد آستانه از نتايج كيت خارجى به عنوان استاندارد طلايى استفاده شد.

يافته ها: با در نظر گرفتن نتايج (۱۵ نمونه مثبت و ۸۵ نمونه منفي) در ارزيابى هاى كيت تجارى، بهترين غلظت پادگن و رقت پادتن در سيستم طراحى شده به ترتيب ۱/۲ ميكروگرم و ۱/۱۰۰ به ترتيب در هر چاهك ارزيابى شد. علاوه بر اين، ميزان حد آستانه برابر با ۰/۴۴ مشخص گرديد. حساسيت و ويژگى به ترتيب ۱۰۰ و ۷۰ درصد ارزيابى شد.

نتيجه گيرى: پادگن هاى ترشحي مايكوباكترىوم پاراتوبركلوزيس حساسيت لازم را جهت تشخيص بيمارى ايجاد مى كنند، اما تشخيص باكتري از مدفوع در مراحل اوليه بيمارى، مشكل است. بنابراين با استفاده از اليزاى غيرمستقيم طراحى شده مى توان پادتن را در مراحل اوليه بيمارى رد يابى كرد.

كلمات كليدى: مايكوباكترىوم آويوم، پاراتوبركلوزيس، اليزاى غيرمستقيم، پادگن هاى ترشحي

تاريخچه مقاله

دريافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶

پذيرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۷

انتشار آنلاين: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷

موضوع:

بيمارى هاى مشترك انسان - دام

IJMM 1396; 11(2): 26-33

نويسنده مسئول:

دكتور نادر مصورى

آزمایشگاه رفرانس سل گاوی،

موسسه تحقیقات واکسن و

سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی (تات)،

تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۲۶۱۱۴۳۸

پست الكترونيك:

nmosavari@gmail.com

كپى رايست ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمى از اين مقاله براى مجله ميكروبي شناسى پزشكى ايران محفوظ است.

مقدمه

چند سال تأخير همراه است و در اين زمان انتقال باكتري به ساير حيوانات و حتى انسان ممكن است اتفاق بيافتد.

بيمارى پاراتوبركلوزيس به صورت بومى در گاو هاى شيرى ايران وجود دارد و بيمارى ناشى از باكتري در گاو شيوع بالايى دارد. دامدارى هاى ايران از اين نظر به شدت آلوده اند. باكتري از

مايكوباكترىوم پاراتوبركلوزيس يكي از اعضاى كمپلكس مايكوباكترىوم آويوم (Mycobacterium avium complex, MAC) است كه عامل بيمارى يون (Johne's disease) يا پاراتوبركلوزيس در نشخواركنندگان مى باشد. مشكل اصلى در ارتباط با بيمارى يون از اين جهت است كه گرچه حيوانات در سال هاى نخست زندگى آلوده مى شوند، اما شروع علائم بالينى با

شیر و مدفوع گاو دفع می‌شود و از این طریق آلودگی به سایر حیوانات و انسان منتقل می‌شود (۱۰۲).

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 بادم، تغذیه از گوشت و شیر حیوانات آلوده و حتی مصرف آب آلوده با ارگاناسم باعث انتقال باکتری به انسان می‌شود (۳).

آزمایش‌های سرم‌شناسی، پاسخ ایمنی هومورال (حضور پادتن در سرم) علیه پادگن مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس را اندازه‌گیری می‌کند. از آنجایی که 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 مایکوباکتریوم‌های 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 10^5 CFU/g را دارد. از جمله معایب این روش طولانی شدن زمان گرم‌خانه‌گذاری (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 بر علیه 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 سرم‌های 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 2000 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 سرم‌ها در قسمت اول و دوم از صفحه پلیت متقاطع تیتراسیون استفاده شد. سرم منفی MAP، از ۵ گله که در آزمون غیر جذبی

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 $\text{pH}=7.2$ ، همراه با توتین ۲۰، ۰.۵٪) 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.

سرم‌ها در رقت‌های ۱/۲۰۰ و ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰ با بافر رقیق‌کننده (PBST) همراه توتین ۲۰، ۰.۵٪ 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 Conjugate 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 مشخص شده 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.

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

آماده‌سازی پروتئین‌های ترشحی

سویه استاندارد F316 در محیط هرولدگ 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.

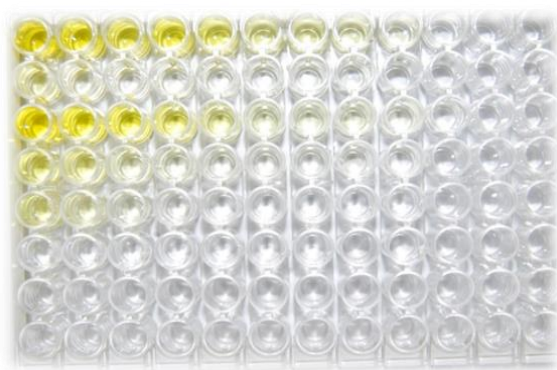
استخراج پادگن‌های ترشحی

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 به وسیله سانتریفیوژ (g ۱۰۰۰۰، ۳۰ دقیقه) جدا شد و مایع رویی با استفاده از $0.2 \mu\text{m}$ 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 g ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل، در مرحله اول با تری کلرواستیک اسید ۱ درصد دو بار شسته شد و سانتریفیوژ گردید و در مرحله دوم با NaCl ۱۰٪ یک‌بار شستشو داده شد و سانتریفیوژ گردید. رسوب نهایی در بافر فسفات ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ۳۴ میلی مولار حاوی NaCl، ۸۶ میلی مولار حل شد و pH محلول در محدوده 6.8 ± 0.4 تنظیم گردید (۹). غلظت پروتئین با استفاده از روش لآوری 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



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

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

یافته‌ها

بهترین غلظت پادگن با پادتن

براساس پروتئین سنجی لایه‌ای، 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	۲۰ μgr	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	۰/۲	۰/۲۵	۰/۳	۰/۳	۰/۴	۰/۴۵	۱/۱۰۰ منفی
۰/۲	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	۰/۲	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

جدول ۳: قرائت جذب نوری نمونه‌ها برای کیت تجاری الیزای

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

جدول ۴: قرائت جذب نوری نمونه‌ها برای کیت طراحی شده الیزای

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

با بررسی ۲۰ سرم منفی مشخص شد که این سرم‌ها در سیستم الیزای طراحی شده 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 به دست 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 به صورت جداگانه در کیت تجاری و سیستم طراحی شده مورد آزمایش قرار گرفتند به ترتیب برابر ۷۰ و ۱۰۰٪ محاسبه گردید.

جدول ۵: سرم های انتخاب شده برای تعیین ویژگی

	تعداد	کاذب		مثبت	منفی
		+	-		
کیت الیزای تجارتي	۱۰۰	۴	۰	۹۶	
الیزای طراحی شده	۱۰۰	۴	۲۹	۶۷	

کاهش ویژگی تست ما به دلیل وجود پادتن های غیراختصاصی بود که در مطالعات مختلف توانسته با استفاده از پادگن های مایکوباکتریوم فلئو این پادتن های غیراختصاصی را حذف و باعث افزایش ویژگی تست شوند (۱۴).

در مطالعه حاضر به منظور طراحی سیستم الیزا، از پادگن های ترشحي مایکوباکتریوم / اویوم تحت گونه پارتوبرکلوزیس 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 مقرون به صرفه می باشد و از سوی دیگر سرعت رشد بیشتری از سویه های وابسته به مایکوباکتین دارد.

در خصوص کم بودن ویژگی تست ذکر این نکته لازم می باشد که کیت های تجاری موجود به دو صورت طراحی می شوند که به ترتیب الیزا های جذبی و غیر جذبی می باشد تفاوت این دو نوع سیستم در وجود یک سری پادگن ها در محلول رقیق کننده سرم است و سرم ها قبل از مجاورت با پلیت اصلی ابتدا با این پادگن ها مجاور می شوند. در این میان یک سری پادتن های غیراختصاصی که بر علیه برخی پادگن های مایکوباکتریوم های ساپروفیت (مخصوصاً فلئو) می توانند با پادگن های اصلی مایکوباکتریوم پارتوبرکلوزیس واکنش داده و ویژگی تست را کاهش دهند (۱۵). در واقع گرم خانه گذاری اولیه باعث حذف این پادتن های 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 می تواند 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 سهل الوصول بودن آن از مواردی است که در انتخاب آن مؤثر می باشد. در حالی که کشت مدفوع از حساسیت و ویژگی بالاتری در مقایسه با الیزا برخوردار است، ولی زمان طولانی برای پاسخگویی، از نقاط ضعف آن به شمار می آید.

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

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{موارد مثبت واقعی}}{\text{موارد مثبت واقعی} + \text{موارد مثبت کاذب}} = \frac{4}{4+0} \times 100 = 100$$

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

بحث

نزدیک به ۶۰ سال از شناسایی بیماری پارتوبرکلوزیس در ایران می گذرد، اما با این حال اطلاعات موجود در مورد همه گیرشناسی این بیماری در گله های گاو، گوسفند و بز در ایران اندک می باشد (۱۱). مشکلات مرتبط با کشت و جداسازی باکتری از یک طرف و هزینه بالای کیت الیزای وارداتی از طرف دیگر باعث عدم برنامه مشخص جهت بررسی همه گیرشناسی و به دنبال آن کنترل بیماری در این کشور شده است از این رو طراحی سیستم های الیزا برای این منظور همواره مورد توجه مرکز تحقیقاتی در کشورهای مختلف شده است که در این مطالعات همواره مهم ترین اصل آن استخراج پادگن مناسب می باشد. در واقع هر چقدر این پادگن ها دارای اپی توپ های اختصاصی بیشتر و اپی توپ های غیراختصاصی کمتر باشند باعث افزایش حساسیت و ویژگی تست خواهند بود.

بر این اساس پادگن های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است که بیشتر تمرکز بر روی پادگن های سلولی می باشد (۱۲). در این تحقیق نیز پادگن های ترشحي با استفاده از روش های ترسیب و تغلیظ جداسازی شده و برای تعداد ۱۰۰ سرم حساسیت و ویژگی تست در مقایسه با کیت تجاری IDEEX به عنوان تنها کیت تجاری مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) به دست آمد. از پادگن های سلولی مورد استفاده می توان به پادگن های پروتوپلاسمی پارتوبرکلوزیس (PPA) که توسط Marassi در سال ۲۰۰۵ گزارش شد اشاره نمود (۱۳). حساسیت و ویژگی به دست آمده 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

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 ۶-۱۲ 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 طراحی شده 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 تجارتي دارند.

در این تحقیق و با انگیزه طراحی یک تست غربالگری اولیه از تمام پادتن‌های ترشحي باکتری استفاده شد که به علت

حساسیت بالا توانستند در غربالگری اولیه مورد استفاده قرار گیرند پادتن‌های ترشحي مایکوپلازما 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 پادتن مورد استفاده 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 میکروپزشکی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

References

1. Ansari-Lari M, Haghighi M, Bahramy A, Baheer 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. Tragoni 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. Facciolo 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.

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.