



تشخیص توپر کلوزیس گاوی با استفاده از سیستم الایزای غیرمستقیم آنتی ژن سبک وزن مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5

ملیحه هنرمند کاشی^۱، نادر مصوری^۲، میترا صالحی^{*}^۱، ناهید مژگانی^۲

۱

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران-شمال، تهران، ایران.
^۲بخش توپر کولین موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹

چکیده

در حال حاضر تشخیص سل گاوی با چالش‌ها و محدودیت‌های خاصی روبرو است. برای تشخیص این بیماری، می‌توان پروتئین‌های آنتی ژنیک از کشت مایکوباکتریوم بوویس استخراج کرد که قادر به بهبود حساسیت و ویژگی آزمایشات تشخیصی می‌باشند. یکی از اهداف این پژوهش طراحی سیستم الایزای غیرمستقیم می‌باشد، به این منظور آنتی ژن‌های خالص شده مایکوباکتریوم بوویس AN5 برای تشخیص سل گاوی استفاده شد. هدف دیگر بررسی و مقایسه نتایج سیستم طراحی شده با سنجش اینترفرون گاما می‌باشد. آنتی ژن‌های مایکوباکتریوم بوویس AN5 جداسازی و سپس خالص سازی شدند. بهترین آنتی ژن برای طراحی سیستم الایزای غیرمستقیم استفاده شد. سرم‌های ۲۳۰ گاو از دامداری‌های مختلف با الایزای طراحی شده آزمایش شدند. سپس نتایج آنها با سنجش اینترفرون گاما به عنوان تست تاییدی تشخیص مقایسه شدند. بررسی همبستگی و مستقلی بین متغیرها با آزمون‌های Pearson و T test انجام شد. حساسیت و ویژگی سیستم الایزای غیرمستقیم طراحی شده ۷۷/۸٪ و ۸۰/۷٪ بود. میزان p value برای آزمون‌های Pearson و T test صفر درصد به دست آمد. آنتی ژن‌های سبک وزن مهمی خالص شدند که قابلیت تشخیص بیماری داشتند. با توجه به حساسیت و ویژگی بالای به دست آمده می‌توان از سیستم الایزا طراحی شده برای غربالگری اولیه در تشخیص سل گاوی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم بوویس، پروتئین آنتی ژنیک، گاما اینترفرون، الایزا غیرمستقیم.

* mitra_salehi_microbiology@yahoo.com

مقدمه

عامل سل گاوی^۱، مایکوباکتریوم بوویس^۲ می باشد که یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است. پاستوریزاسیون شیر در کشورهای توسعه یافته در سال ۱۹۳۰ به میزان زیادی انتقال بیماری را از حیوانات به انسان کاهش داد. به دلیل شیوع بیماری برنامه های ریشه کنی در بسیاری از کشورها براساس شناسایی با تست پوستی توپرکولین و سپس کشتار دسته جمعی حیوانات آلوده شده می باشد (۱-۳).

سل گاوی اثرات مهمی روی سلامت عمومی، اقتصاد، خرید و فروش حیوانات و تولیدات حیوانی دارد. در نیوزیلند تست پوستی دمی^۳ با PPD^۴ برای غربالگری و شناسایی حیوانات آلوده شده با سل استفاده شد. اما واکنش های مثبت کاذب در عفونت با مایکوباکتریوم آویوم^۵ و مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوپرکولوزیس^۶ مشاهده شدند (۲-۴). PPD شامل بسیاری از آنتی ژن های مایکوباکتریومی است که تعدادی از آنها در مایکوباکتریوم ها از جمله، مایکوباکتریوم های پاتوژن مثل کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکولوزیس^۷ (مایکوباکتریوم توپرکولوزیس، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم آفریکانیوم)، مایکوباکتریوم های غیرتوپرکولوزیسی محیطی^۸ و واکسن کالمت گرین^۹ سویه مایکوباکتریوم بوویس مشترک است. بنابراین، اگرچه واکنش به PPD به عنوان یک ابزار مهم در تشخیص بیماری می باشد، اما غالباً تشخیص واکسیناسیون BCG با مایکوباکتریوم های غیرتوپرکولوزی محیطی با استفاده از PPD غیرممکن است. برای غلبه به محدودیت استفاده از PPD، معرف جدیدتری برای تمایز و اختصاصیت مایکوباکتریوم توپرکولوزیس و مایکوباکتریوم بوویس مورد نیاز می باشد. روش ساترن بلا تینگ^{۱۰}، حضور هر دو ژن esat-6 و cfp10 را نشان داده است. این ژن ها در مایکوباکتریوم توپرکولوزیس،

مایکوباکتریوم آفریکانیوم و مایکوباکتریوم بوویس و پرولانت یا بیماریزا حضور دارند. در حالیکه این دو ژن در هیچ یک از سویه های واکسن BCG و مایکوباکتریوم های محیطی غیرتوپرکولوزی مشاهده نشده است. بنابراین مشخص شده که پروتئین های ESAT-6 و CFP-10 قادر به تمایز بین بیماران توپرکولوزیس و افراد واکسینه شده با BCG می باشند (2-5). جایگزین کردن PPD با آنتی ژن های ذکر شده بهترین گزینه برای بهبود ویژگی آزمایشات تشخیصی می باشد (۶).

در سال ۱۹۹۰ سنجش اینترفرون گاما^{۱۱} برای بررسی حیوانات آلوده به سل گاوی توسعه پیدا کرد. آزمایش براساس شناسایی اینترفرون گامای آزاد شده در خون انکوبه شده با توپرکولین های PPD می باشد. ویژگی^{۱۲} آزمایش ۹۳٪ و حساسیت^{۱۳} آن ۸۵٪ بود (۳). سنجش اینترفرون گاما به عنوان آزمایش مکمل توپرکولوزیس گاوی می باشد. این سنجش در محیط *in vitro* انجام می گیرد که مشخص کننده دقیق پاسخ های ایمنی سلولی با لنفوسیت های درگیر می باشد. تحریک آنتی ژنیک باعث تولید و آزادسازی اینترفرون گاما توسط تعداد زیادی از لنفوسیت های T می شود. در مرحله بعدی، حضور اینترفرون گاما در پلاسمای شاور بر روی سطح با تکنیک ELISA اندازه گیری می شود (۵-۲).

تاکنون آزمایش استاندارد تشخیص سل گاوی، تست پوستی داخل جلدی PPD است. از جمله محدودیت های این آزمایش شامل پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری به آنتی ژن، حساسیت و ویژگی پایین می باشد، به طوری که اگر حیوان در معرض با مایکوباکتریوم بوویس، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوپرکولوزیس یا مایکوباکتریوم های محیطی مثل مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم بوده باشد، تعیین عفونت با تست پوستی PPD غیرممکن است. دیگر محدودیت آزمایش، پاسخ قوی به واسطه ایمنی سلولی حین فاز ابتدایی عفونت است که تعداد باکتری در این فاز کم

⁷ *Mycobacterium tuberculosis* complex

⁸ Environmental Nontuberculous Mycobacteria

⁹ Calmette-Guerin

¹⁰ Southern blotting

¹¹ γ -interferon

¹² Specificity

¹³ Sensitivity

¹ Bovine tuberculosis

² *Mycobacterium bovis*

³ caudal fold test

⁴ Purified protein derivative

⁵ *Mycobacterium avium*

⁶ *Mycobacterium avium* subspecies para tuberculosis

می‌باشد. همچنین حیوانات به آزمایشات ایمنی سلولی پاسخ خوبی نشان نمی‌دهند. محدودیت دیگر نتایج مثبت کاذب به دلیل در معرض بودن با مایکوباکتریوم‌های محیطی و یا واکسیناسیون BCG می‌باشد (۷). بنابراین لازم می‌باشد که آزمایشات *in vitro* بر پایه ایمنی سلولی برای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس، حساسیت بالاتر، استفاده راحت‌تر و قابلیت تمایز بین حیوانات آلوده با مایکوباکتریوم بویوس، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوپرکلوزیس و مایکوباکتریوم محیطی را داشته باشند. هدف از این پژوهش طراحی سیستم الایزای غیرمستقیم با آنتی‌ژن مایکوباکتریوم بویوس برای شناسایی عفونت، سپس بررسی و مقایسه با ترشح گاما اینترفرون در مقابل تحریک سلول‌های خونی به وسیله PPD های گاوی و مرغی برای تشخیص سل گاوی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج آنتی‌ژن

در این پژوهش برای جداسازی آنتی‌ژن از تکنیک‌های پروتئومیکس استفاده شد. برای جداسازی و تخلیص پروتئین‌های آنتی‌ژنیک سبک وزن از کشت فیلتر شده مایکوباکتریوم بویوس سویه AN5 (ATCC35726) استفاده شد. برای رسوبدهی پروتئین‌ها از نمک آمونیوم سولفات و برای تبدیل محلول پروتئینی جدا شده به فراکسیون‌های مجزا از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفاکس G50 استفاده شد. برای تعیین غلظت و وزن مولکولی پروتئین‌ها به ترتیب روش لاورى و الکتروفورز SDS PAGE انجام شد (۸).

طراحی سیستم الایزای غیرمستقیم (Indirect ELISA)

چکربورد (Checkerboard)

برای طراحی سیستم برای تعیین بهترین غلظت آنتی‌ژن و بهترین رقت آنتی‌بادی، چکربورد انجام شد. به طوری که محلول آنتی‌ژن (پروتئین سبک وزن مایکوباکتریوم بویوس سویه AN5) با استفاده از بافر کربنات-بی کربنات (pH:9.6) به عنوان بافر کوتینگ، به طور سریالی در عرض پلیت

(میکروپلیت های ۹۶ خانه تست الایزا، خریداری شده از شرکت JET BIOFIL) و محلول آنتی‌بادی کوتینگ (سرم‌های حیوانات شارژ شده با مایکوباکتریوم) در طول پلیت رقیق شدند. سپس یک آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم (HRP Goat Anti-Human) (تهیه شده از شرکت Abcam) در یک غلظت ثابت به تمام چاهک‌ها افزوده و با کامل شدن مراحل سنجش، غلظت‌های مناسب آنتی‌ژن و آنتی‌بادی محاسبه شد. لازم به ذکر است که سرم‌های مورد استفاده در چکربورد به این صورت بوده است که سرم شماره ۱، سرم حیوان شارژ شده با مایکوباکتریوم بویوس سویه AN5، سرم شماره ۲، سرم حیوان شارژ شده با مایکوباکتریوم توپرکلوزیس سویه فلنی، سرم شماره ۳، سرم حیوان شارژ شده با مایکوباکتریوم توپرکلوزیس سویه سی (C) و سرم شماره ۴، سرم حیوان شارژ شده با مایکوباکتریوم/آویوم تحت گونه/آویوم سویه D4 می‌باشد. جدول ۱ نحوه چکربورد آنتی‌ژن مایکوباکتریوم بویوس سویه AN5 را نشان می‌دهد. آنتی‌ژن در راستای طولی پلیت رقیق شده است به طوری که رقت ۱/۲ تا ۱/۲۰۴۸ آنتی‌ژن بررسی شد. همچنین از رقت های ۱/۵۰ و ۱/۱۰۰ آنتی‌بادی‌ها (سرم‌های شارژ شده) استفاده شد. ستون ۱۲ به عنوان ستون بدون آنتی‌ژن در نظر گرفته شد. در تمام چاهک‌ها میزان λ ۱۰۰ از بافر کوتینگ بی کربنات اضافه شد. سپس λ ۱۰۰ از آنتی‌ژن به ستون اول ریخته و پس از پیت کردن با سمپلر، λ ۱۰۰ از چاهک‌های ستون اول به چاهک‌های ستون دوم منتقل شدند، این عمل تا ستون ۱۱ ادامه یافت و نهایتاً λ ۱۰۰ از چاهک‌های ستون ۱۱ به بیرون ریخته شدند.

آزمایش الایزای غیرمستقیم نمونه‌ها

برای انجام الایزای غیرمستقیم با توجه به بهترین رقت آنتی‌ژن به دست آمده از چکربورد از بافر کربنات-بیکربنات استفاده شد. برای تهیه بافر ۱ gr پودر تجاری کربنات بی کربنات در ۱۰۰ μ l آب مقطر حل شد و pH برای کوتینگ آنتی‌ژن در کف پلیت‌ها روی ۹٫۶ تنظیم شد.

جدول ۱. نحوه‌ی چکربورد آنتی‌ژن مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5

		رقت Ag	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
شماره سرم	رقت Ab	ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۱	1/100	A												No Ag
۱	1/50	B												No Ag
۱	1/100	C												No Ag
۲	1/100	D												No Ag
۲	1/50	E												No Ag
۳	1/100	F												No Ag
۳	1/50	G												No Ag
۴	1/50	H												No Ag

های نوری در ۴۵۰ nm به کمک دستگاه الایزا ریدر خوانده شدند.

تعیین Cut off

برای تعیین Cut off جذب‌های نوری در نرم افزار Excel جمع‌آوری شدند و میزان استاندارد انحراف معیار (SD) و میانگین (Mean) حاصل از داده‌ها مشخص و سپس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

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

سنجش اینترفرون گاما

برای بررسی اینترفرون گاما (γ-interferon assay)، ساندویچ الایزا بر روی نمونه‌های مورد بررسی با کیت Bovigam انجام شد. در ابتدا جمع‌آوری نمونه‌های خون هپارین زده شده، انتقال و ذخیره‌سازی در کمتر از ۸ h در دمای ۱۶-۲۲ °C انجام شد. در آزمایشگاه ۱,۵ ml از نمونه‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کیت ریخته شدند. سپس ۱۰۰ μl از

پلیت‌ها با فویل پوشانده و به مدت ۱۶ h تا ۱۸ h در دمای یخچال نگهداری شدند. سپس، سه مرحله شستشو (۰,۱٪ PBS همراه باتوئین ۰,۵٪) انجام شد. محتویات پلیت خالی و با استفاده از محلول ۲٪ BSA (سرم آلبومین گاوی) فضاهای خالی گودها بلاک و پوشانده شدند و ۱ h انکوباسیون در دمای اتاق انجام شد. محلول بلاکینگ خالی و طی گذشت ۲۰ min چاهک‌ها کاملاً خشک شدند. سرم‌ها در رقت‌های به دست آمده از چکربورد تهیه و در دمای اتاق به مدت ۳۰ min انکوبه شدند. سپس، پلیت‌ها ۵ بار با بافر شستشو بدون توئین شستشو داده شدند. از رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی آنتی‌بادی کوئزوگه با پراکسیداز (Horse Radish Peroxidase (HRP) Goat pAb to cow IgG, abcam استفاده و پس از ۳۰ min انکوباسیون در دمای اتاق مجدداً پلیت‌ها ۵ بار شستشو داده شدند. ۱۰۰ μl محلول سوبسترای TMB (۳,۳', 5,5'-Tetramethylbenzidine) در هر چاهک، اضافه و به مدت ۱۰ min در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شدند. سپس، محلول متوقف‌کننده اضافه شد و جذب

برای تعیین حساسیت و ویژگی سیستم الایزای طراحی شده، سنجش اینترفرون گاما به عنوان استاندارد طلایی (standard Gold) در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج حاصل از این استاندارد و مقایسه آنها با نتایج حاصل از الایزای غیرمستقیم نمونه‌ها، حساسیت و ویژگی طبق فرمول های ۲ تا ۵ تعیین شد.

تحلیل آماری

در این مطالعه برای تحلیل آماری از نرم افزار آماری IBM SPSS Statistics (version 26.0) استفاده شد. به طوری که همبستگی (Correlation) و ارتباط بین آنتی ژن خالص شده با استاندارد طلایی سنجش اینترفرون گاما، آزمون Pearson و برای بررسی مستقلی بین متغیرهای مثبت و منفی، آزمون T test استفاده شد.

برای آزمون T test شاخص S/P برای تمام نمونه‌ها تعریف شد که طبق فرمول ۶ محاسبه شد.

آنتی ژن اختصاصی PPD گاوی و غیراختصاصی PPD مرغی اضافه شدند (یک آنتی ژن در هر خانه). از کانکاوآلین برای کنترل مثبت و از PBS (Phosphate buffered saline) برای کنترل منفی استفاده شد. نمونه‌ها در دمای 37°C به مدت ۱۶ تا ۲۴ گرماگذاری شدند. پلاسمای نمونه‌ها ($100\ \mu\text{l}$) به پلیت پوشیده شده با کیت Ruminant IFN- γ Sandwich ELISA منتقل و گرماگذاری در 37°C به مدت ۶۰ min و سپس ۵ مرحله شستن پلیت‌ها انجام شد. اضافه کردن کانجوگیت (HRP Goat pAb to cow IgG, abcam) و گرماگذاری در 37°C به مدت ۶۰ min و شستن مجدد پلیت‌ها انجام شد (۵ مرحله). سپس اضافه کردن سوبسترای TMB و گرماگذاری در 37°C به مدت ۱۰ min در تاریکی و دمای اتاق و نهایتاً متوقف کردن واکنش با محلول متوقف کننده انجام شد. جذب نوری نمونه‌ها در ۴۵۰ min به کمک دستگاه الایزا ریدر خوانده شد و شمارش نمونه/مثبت و مقایسه آن با نسبت‌های نمونه/مثبت مرجع انجام شد.

تعیین حساسیت و ویژگی

رابطه ۲ "Sensitivity= true positives/ (true positive + false negative)"

رابطه ۳ "Specificity= true negatives/ (true negative + false positives)"

رابطه ۴ حساسیت
$$\frac{\text{موارد مثبت واقعی}}{\text{موارد مثبت واقعی} + \text{موارد مثبت کاذب}}$$

رابطه ۵ ویژگی
$$\frac{\text{موارد منفی واقعی}}{\text{موارد مثبت کاذب} + \text{موارد منفی واقعی}}$$

رابطه ۶
$$\frac{\text{جذب نوری کنترل منفی} - \text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل منفی} - \text{جذب نوری کنترل مثبت}}$$

جدول ۲، مقادیر جذب نوری به دست آمده از چکریورد آنتی ژن مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5 را نشان

نتایج
نتایج چکریورد (Checkerboard)

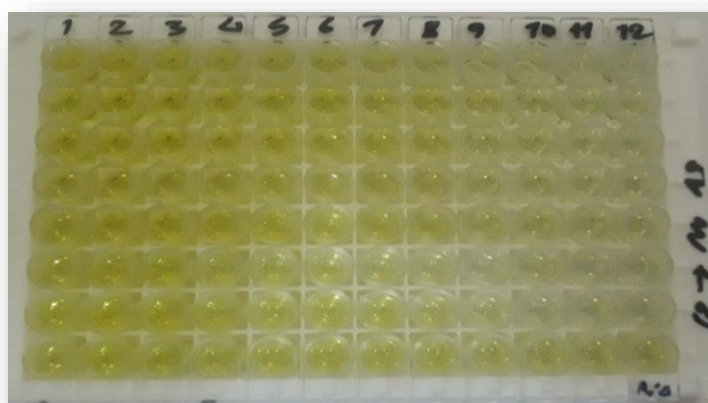
نتایج آزمایش الایزای غیرمستقیم نمونه‌ها و سنجش اینترفرون گاما

به‌طور کلی نتایج آزمایشات الایزای غیرمستقیم، سنجش اینترفرون گاما ۲۳۰ نمونه جمع‌آوری شد. موارد مثبت واقعی (True positive) مربوط به نمونه‌هایی می‌باشد که استاندارد طلایی آن (سنجش اینترفرون گاما) مثبت و الایزای غیرمستقیم ناشی از آن نمونه نیز مثبت باشد که در جدول ۳ با هایلایت‌های زرد رنگ مشخص شده‌اند. از بین ۲۳۰ نمونه، یک نمونه مثبت واقعی مشاهده شد. موارد منفی واقعی (True negative) مربوط به نمونه‌هایی می‌باشد که استاندارد طلایی آن (سنجش اینترفرون گاما) منفی و الایزای غیرمستقیم ناشی از آن نمونه نیز منفی باشد و با هایلایت‌های آبی مشخص شدند.

می‌دهد. در این چکربرد رقت ۱/۲ تا ۱/۲۰۴۸ آنتی‌ژن بررسی شد. به همان صورتی که در شکل ۱، نشان داده شده در هر ردیف واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به ترتیب از رقت بیشتر به سمت رقت کمتر (از سمت چپ به راست) اتفاق افتاده است و هرچه رقت آنتی‌ژن بیشتر بوده رنگ سوبسترا در چاهک‌ها نیز بیشتر نمایان می‌باشد. با توجه به آنتی‌ژن مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5 تخلیص شده و همچنین سه ردیف A، B و C از سرم گاو شارژ شده با مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5 استفاده شده و مقادیر OD های قابل قبولی به‌دست آمد (جدول ۲) و همچنین عدم واکنش آنتی‌ژن با سرم منفی، نشان دهنده‌ی اختصاصی بودن آنتی‌ژن با آنتی‌بادی اختصاصی موجود در سرم گاوی می‌باشد. با مقایسه‌ی مقادیر جذب نوری، رقت ۱/۸ با میزان جذب نوری ۰,۷۳۶ به عنوان بهترین رقت آنتی‌ژن (در جدول ۲ مشخص شده) و رقت ۱/۱۰۰ به عنوان بهترین رقت سرم در نظر گرفته شد.

جدول ۲. میزان جذب‌های نوری به‌دست آمده (۴۵۰ nm) در چکربرد آنتی‌ژن مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	۰,۹۰۳	۰,۹۰۵	۰,۷۳۶	۰,۵۸۱	۰,۵۵۵	۰,۵۳۴	۰,۴۸۲	۰,۳۹۹	۰,۲۷۲	۰,۲۳۶	۰,۱۹۱	۰,۱۶۸
B	۰,۹۸۵	۰,۹۴۹	۰,۸۱۲	۰,۷۲۱	۰,۶۷۵	۰,۶۴۲	۰,۴۶۰	۰,۵۱۲	۰,۴۰۷	۰,۳۰۰	۰,۲۵۱	۰,۲۶۳
C	۱,۰۲۲	۰,۸۹۴	۰,۷۸۱	۰,۶۶۸	۰,۶۵۷	۰,۶۴۲	۰,۵۶۴	۰,۴۸۷	۰,۳۵۱	۰,۲۷۶	۰,۲۴۲	۰,۲۱۴
D	۰,۷۳۱	۰,۶۷۹	۰,۶۰۹	۰,۵۷۷	۰,۵۲۴	۰,۵۴۲	۰,۴۷۶	۰,۴۱۴	۰,۳۰۰	۰,۲۵۰	۰,۲۲۶	۰,۲۳۲
E	۰,۷۹۳	۰,۸۲۰	۰,۷۶۱	۰,۷۱۹	۰,۶۹۶	۰,۶۸۹	۰,۶۰۲	۰,۴۹۰	۰,۳۶۰	۰,۲۹۴	۰,۲۶۴	۰,۲۴۴
F	۰,۷۶۱	۰,۷۴۱	۰,۶۹۲	۰,۵۱۵	۰,۴۸۶	۰,۴۹۷	۰,۴۵۲	۰,۳۵۴	۰,۲۸۹	۰,۲۳۳	۰,۱۹۲	۰,۱۷۳
G	۰,۹۹۰	۰,۹۳۸	۰,۸۸۱	۰,۶۷۴	۰,۶۳۸	۰,۶۵۸	۰,۵۷۳	۰,۱۶۴	۰,۳۳۳	۰,۲۳۸	۰,۱۹۷	۰,۱۹۸
H	۰,۹۴۴	۰,۹۵۹		۰,۷۴۹	۰,۷۸۲	۰,۸۴۱	۰,۸۲۰	۰,۷۰۳	۰,۵۶۹	۰,۵۱۰	۰,۴۵۲	۰,۴۴۵



شکل ۱. نتیجه ی چکربرد آنتی ژن مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5

جدول ۳. نتایج آزمایشات الایزای غیرمستقیم و سنجش اینترفرون گاما

					Gamma	
number	sam NO	S/P	OD	ELISA	avian	Bovine
1	8434	0.344	0.212	Neg	Neg	Neg
2	9836	1.155	0.358	Pos	Neg	Neg
3	9820	1.127	0.353	Pos	Neg	Pos
4	8286	0.905	0.401	Neg	Neg	Pos

نتایج تعیین حساسیت و ویژگی

با توجه به فرمول های محاسبه حساسیت و ویژگی، تعداد نمونه های مثبت و منفی واقعی، همچنین نمونه های مثبت و منفی کاذب، حساسیت الایزای غیرمستقیم طراحی شده با آنتی ژن مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5 به میزان ۷۷/۸٪، در حالی که ویژگی آن ۸۰،۷٪ به دست آمد.

نتایج تحلیل آماری

برای بررسی نتایج حاصل از الایزادر مقایسه با سنجش اینترفرون گاما، کلیه نتایج با توجه به cut off به دست آمده به صورت کیفی (مثبت و منفی) تعریف شد و توسط نرم افزار آماری IBM SPSS Statistics (version 26.0) محاسبه شد. برای بررسی همبستگی بین ELISA و سنجش اینترفرون

تعداد نمونه های منفی واقعی ۱۸۲ نمونه بوده است. موارد مثبت کاذب (False Positive) مربوط به نمونه هایی می باشد که استاندارد طلایی آن (سنجش اینترفرون گاما) منفی و الایزای غیرمستقیم ناشی از آن نمونه مثبت باشد که در جدول ۳ با هایلالت های قرمز رنگ مشخص شده اند که تعداد آن ها ۴۵ نمونه بوده است. موارد منفی کاذب (False negative) مربوط به نمونه هایی می باشد که استاندارد طلایی آن (سنجش اینترفرون گاما) مثبت و الایزای غیرمستقیم ناشی از آن نمونه منفی باشد و در جدول ۳ با هایلالت های سبز رنگ مشخص شده اند و تعداد ۲ نمونه از ۲۳۰ نمونه بررسی شده است.

گاما، آزمون Pearson و نیز بررسی مستقلی بین متغیرهای مثبت و منفی، آزمون T test استفاده شد، مقدار P-Value نزدیک به صفر به دست آمد که حاکی از رابطه بسیار معنی دار دو متغیر بود.

بحث

در خون سلول‌هایی به نام APC¹ وجود دارند که بیشتر از نوع مونوسیت‌ها می‌باشند. اگر این سلول‌ها قبلاً با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یا مایکوباکتریوم بوویس آلوده شده باشند، سیستم ایمنی علیه آنها خاطره دارد. سلول‌های خاطره در بدن در حالت آماده‌باش می‌مانند و در صورت برخورد مجدد با همان آنتی‌ژن، به سرعت سیستم ایمنی تحریک شده و شروع به ترشح آنتی‌ژن می‌کنند و مبارزه با شدت بیشتری انجام می‌شود. اگر سلول‌های APC حیوان با پروتئین‌های اختصاصی مایکوباکتریوم مجاور شوند، از آنجایی که در خون گاو مبتلا علیه آن‌ها خاطره وجود دارد، سیستم ایمنی شروع به آزاد کردن اینترلوکین می‌کند. یکی از مهمترین اینترلوکین‌های رها شده، گاما اینترفرون می‌باشد. در سنجش اینترفرون گاما اگر در نمونه‌ای با PPD گاوی گاما اینترفرون بیشتری تحریک شد یعنی با گروه مایکوباکتریوم پاتوژن درگیر می‌باشد اما اگر نمونه‌ای با PPD مرغی گاما اینترفرون بیشتری تحریک و تولید کند یعنی حیوان با مایکوباکتریوم آنتیپیک آلوده می‌باشد. در نمونه‌های مثبت، گاما اینترفرون PPD گاوی بیشتر از PPD مرغی بوده است که نشان‌دهنده‌ی آلودگی این نمونه‌ها با گروه مایکوباکتریوم پاتوژن (کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) می‌باشند. عدم تحریک اینترفرون گاما و عدم افزایش میزان آن در صورت وجود کانکاوآلین A، به این معنا است که سیستم ایمنی حیوان سرکوب شده و قادر به برانگیختن گاما اینترفرون نمی‌باشد. این حالت ممکن است به دلیل حاملگی حیوان، بیماری ویروسی و یا لکوز باشد. برخی از بیماری‌های ویروسی سرکوب کننده سیستم ایمنی می‌باشند، ولی برخی دیگر تنها سبب برانگیختن گاما اینترفرون می‌شوند. بالارفتن

خود به خودی گاما اینترفرون در گروه نیل (حالتی که هیچ آنتی‌ژنی اضافه نشده)، به معنای درگیری حیوان با بیماری است. در دو مورد ذکر شده (گروه نیل و گروه دریافت کننده محرک) آزمایش مخدوش و قابل قبول نمی‌باشد. سنجش اینترفرون گاما برای موفقیت بیشتر در تشخیص سل استفاده شد که براساس کیفیت آزاد سازی سیتوکین (گاما اینترفرون) پس از مجاورت با PPD های گاوی و مرغی می‌باشد. این سنجش می‌تواند حیواناتی که به صورت آزمایشگاهی آلوده شده‌اند در مراحل اولیه پس از عفونت (۱۴ روز ابتدایی)، یعنی سریعتر از تست پوستی توبرکولین شناسایی کند (۹-۱۰)

هدف اصلی از این مطالعه، استفاده از آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی پایین، ترشح شده از مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5، جهت اهداف تشخیصی مانند الایزای غیرمستقیم بود. در طراحی سیستم الایزا جهت شناسایی آنتی‌بادی سرم حیوانی علیه این پروتئین‌های خالص شده، حساسیت ۷۷٫۸٪ و ویژگی ۸۰٫۷٪ حاصل شد. در آزمون T Test نتایج تست الایزای طراحی شده در مقایسه با استاندارد طلایی سنجش اینترفرون گاما، با P-Value نزدیک به صفر، دارای همبستگی بالایی بود.

در سال ۱۹۹۱، Wood و همکارانش مقایسه‌ی زمینه‌ای بر روی آزمایش اینترفرون گاما و تست داخل جلدی توبرکولین برای تشخیص سل گاوی انجام دادند. ویژگی آزمایش اینترفرون گاما بین ۹۶٫۲ تا ۹۸٫۱٪ تعیین شد. به این صورت که بیش از ۶۰۰۰ حیوان اهلی در گله‌هایی که عاری از توبرکلوزیس بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. حساسیت آزمایش اینترفرون گاما به طور ویژه‌ای بسیار بالاتر از تست داخل جلدی توبرکولین بود که میزان آن بین ۷۶٫۸ تا ۹۳٫۶٪ گزارش شد. به طور کلی در هر دو آزمایش اینترفرون گاما و تست توبرکولین بیشینه حساسیت ۹۵٫۲٪ بود. حساسیت بیشتر آزمایش اینترفرون گاما، امکان ریشه‌کنی سل در استرالیا را فراهم کرد (۱۱). Wood و همکارانش در پژوهشی دیگر (۱۹۹۲) برای بررسی پاسخ‌های سرولوژیکی از آنتی‌ژن

¹ Antigen Presentation Cell

درصدهای مشابهی از حیوانات آلوده به مایکوباکتریوم بوویس آشکار کرد، به همان صورتی که تست اینترفرون گاما بر پایه PPD نشان داد، اما واکنش های مثبت کاذب کمتری را ایجاد کرد. آزمایش اینترفرون گاما بر پایه PPD در متمایز کردن حیوانات واکسینه شده در برابر بیماری John که تست پوستی آنها مثبت بود از حیواناتی که به سل گاوی آلوده بودند، بسیار موثر بود. مشابه با پژوهش حاضر مصرف PPD یا آنتی ژن های اختصاصی مایکوباکتریایی شمار واکنش های مثبت کاذب را در حیوانات توبرکلوزیس پوستی به حداقل رساند (۳-۴).

چندین پژوهش حساسیت و ویژگی سنجش اینترفرون گاما را در دام های آلوده به سل بررسی کردند. در این مطالعات حساسیت بین ۵۵ تا ۹۷٪ و ویژگی تا ۹۷٪ گزارش شده بود (۲۰-۱۲).

Oslen و همکارانش (۲۰۰۵) طی انجام مطالعه ای دریافتند که سلول های کشنده طبیعی^۱ باعث ترشح گاما اینترفرون در پاسخ به آنتی ژن های ESAT-6 کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، MPP14 مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتویرکلوزیس و PPD مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ۳۰٪ از گاوهای سالم شدند؛ در حالی که، هیچ پاسخی در برابر MPB-70 در آزمایشاتشان مشاهده نشد (۲۱). اما برخلاف مطالعات انجام شده، در این پژوهش با توجه به آنتی ژن های سبک وزن مورد استفاده (خالص شده از کشت فیلتر شده مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5) در سیستم الایزای غیرمستقیم، تنها دو مورد منفی کاذب (۰.۸۷٪) از بین ۲۳۰ نمونه ملاحظه شد. به طور شگفت انگیزی حساسیت مورد قبول ۷۷.۸٪ و ویژگی نسبتاً بالای ۸۰٪ به دست آمد که این مقادیر حساسیت و ویژگی بهبودیافته ای را در مقایسه با حساسیت و ویژگی تست پوستی توبرکولین (۷۵٪) و بسیاری از مطالعات دیگر نشان می دهد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، تست ELISA حساسیت قابل قبول و ارزش تشخیصی بالایی در شناسایی حیوانات مثبت دارد و

اختصاصی مایکوباکتریوم بوویس (MPB-70) در سیستم الایزا استفاده کردند. حساسیت آزمایش آنها فقط ۱۸.۱٪ و ویژگی ۹۶.۴٪ بوده است. آنها همچنین سنجش اینترفرون گاما را نیز بررسی کردند که حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۸۱/۸ و ۹۹/۱٪ بود. متفاوت از سیر پژوهش ها، در این مطالعه استفاده از آنتی ژن MPB-70 در سنجش اینترفرون گاما باعث کاهش حساسیت آزمایش شد و هیچ تغییری در ویژگی ایجاد نکرده بود (۱۲).

Pinxteren و همکارانش (۲۰۰۰) در پژوهشی مشابه با مطالعه حاضر، برای تشخیص سل از دو آنتی ژن ESAT-6 و CFP-10 استفاده کردند. اما حساسیت بیشتری در هنگام استفاده ترکیبی از دو آنتی ژن نسبت به استفاده مجزا از آنتی ژن مشاهده شد. آنها حساسیت خیلی کم به دست آمده را به عنوان نتیجه منفی مطالعاتشان مطرح کردند (۵).

برخلاف پژوهش حاضر، Buddle و همکارانش، در مطالعه ای دیگری (۲۰۰۳) از پپتیدها و پروتئین های نو ترکیب مایکوباکتریایی مختلفی استفاده کردند که برای تشخیص سل گاوی در حیوانات با تست پوستی مثبت استفاده شد. همچنین، گزارش کردند که برای سنجش حیوانات با واکنش مثبت به تست پوستی توبرکولین، آزمایش های دقیق تری مورد نیاز می باشد. به این منظور، از آنتی ژن های مایکوباکتریایی مختلفی شامل MPB59، MPB64، MPB70، MPB83، ESAT-6 و CFP10 هم به عنوان پروتئین های نو ترکیب و هم پپتیدهای سنتتیک در آزمایش گاما اینترفرون استفاده کردند. حیوانات با توبرکلوزیس پوستی، حیوانات واکسینه شده در برابر بیماری John و حیوانات مثبت در آزمایش اینترفرون گاما بر پایه PPD بررسی شدند. دو گروه مورد مطالعه در نظر گرفته شد. یک گروه شامل ۷۴ حیوان دارای کشت مثبت به مایکوباکتریوم بوویس و گروه دیگر شامل ۷۲ حیوان غیر عفونی بود، که همه ی آنها با تست پوستی مثبت بودند. استفاده ترکیبی از آنتی ژن های ESAT-6 و CFP10 به صورت پپتید و پروتئین نو ترکیب

¹ Natural Killer Cells

دارند، بنابراین آنتی ژن استفاده شده در این پژوهش نیز توانایی و قابلیت تشخیص سل گاوی دارد و با در نظر گرفتن حساسیت و کاربردی بودن آن، می تواند برای تشخیص سل گاوی در موارد بالینی مورد استفاده باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش به عنوان بخشی از پایان نامه دکتری توسط ملیحه هنرمند کاشی و با حمایت گروه تولید و تحقیقات توبرکولین و مالئین در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام شد.

منابع

1. Vordermeier, H. M., Chambers, M. A., Cockle, P. J., Whelan, A. O., Simmons, J., & Hewinson, R. G. (2002). Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infection and immunity*, 70: 3026-3032.
2. Bernitz, N., Kerr, T. J., Goosen, W. J., Chileshe, J., Higgitt, R. L., Roos, E. O., et al. (2021). Review of diagnostic tests for detection of *Mycobacterium bovis* infection in South African wildlife. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 588697.
3. Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H. O., Al-Gaabary, M., & Matsumoto, T. (2022). Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant *Mycobacterium* Species. *Pathogens*, 11(7), 715.
4. Buddle, B. M., McCarthy, A. R., Ryan, T. J., Pollock, J. M., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., ... & De Lisle, G. W. (2003). Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Veterinary Record* 153: 615-620.
5. Van Pinxteren, L. A., Ravn, P., Agger, E. M., Pollock, J., & Andersen, P. (2000). Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7: 155-160.
6. Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H. M., Palmer, M. V., Harris, B. N., Orloski, K. A., 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: 205-220.
7. Koo, H. C., Park, Y. H., Ahn, J., Waters, W. R., Palmer, M. V., Hamilton, M. J., et al. (2005). Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and

می توان از آن در ترکیب با سایر روش ها برای افزایش دقت تشخیصی، به ویژه در موارد منفی PPD، استفاده کرد. بنابراین، آنتی ژن های سبک وزن مهمی (ESAT-6 و CFP10) استفاده شده در این پژوهش، قابلیت تشخیص بیماری داشتند. با توجه به حساسیت و ویژگی بالا و مورد قبول به دست آمده می توان از سیستم الایزا طراحی شده برای غربالگری اولیه در تشخیص حیوانات آلوده به سل گاوی استفاده کرد.

نتیجه گیری

با توجه به نحوه اجرای برنامه های کنترل و ریشه کنی بیماری سل گاوی و کشتن حیوان بعد از انجام آزمایشات و همچنین محدودیت های استفاده از آنتی ژن های موجود (PPD) در تشخیص درست و وجود موارد کاذب، آنتی ژن های تشخیصی سل مورد نیاز می باشند. با توجه به مشکلات ذکر شده، هدف این پژوهش شناسایی سل گاوی با پروتئین های آنتی ژنی سبک وزن از کشت فیلتر شده باکتری *مایکوباکتریوم بوویس* سویه AN5 با طراحی سیستم الایزا بود. این آنتی ژن ها در مطالعات پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال استفاده شدند که می توانند باعث بهبود تشخیص سل گاوی با آزمایشات ایمونولوژیکی مثل سنجش اینترفرون گاما و الایزا شوند و یا حتی باعث پیشرفت و بهبود کیفیت واکسن های انسانی و دامی و همچنین پتانسیل افزایش حساسیت و ویژگی این آزمایشات دارند. بنابراین، آزمایشات برپایه ایمنی سلولی کاربرد مهم تر و ارزشمندتری در تشخیص سل گاوی دارند. معقوله می باشد اگر از این آنتی ژن های تخلیص شده برای موارد حیوانی استفاده شود. در این پژوهش و با انگیزه طراحی یک سیستم غربالگری اولیه، از آنتی ژن های با وزن مولکولی پایین استخراج شده از فیلتراسیون کشت آنتی ژن *مایکوباکتریوم بوویس* سویه AN5 استفاده شد که به علت حساسیت بالا توانستند در شناسایی اولیه استفاده شود، همچنین آنتی ژن به دست آمده دارای بهترین غلظت پروتئینی و وزن مولکولی مورد نظر بود. از آنجایی که آنتی ژن های سبک وزن مانند ESAT-6/CFP10 به طور گسترده در سنجش های تشخیصی ایمونولوژیکی کاربرد

18. Ryan, T. J., Buddle, B. M., & De Lisle, G. W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in veterinary science*, 69: 57-61.
19. Scacchia, M., Lelli, R., Petrini, A., Prencipe, V., Calistri, P., & Giovannini, A. (2000). Use of innovative methods in the eradication of bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 47: 321-327.
20. Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, I. L., Poli, G., & Bonizzi, L. (2000). Evaluation of the specificity of the γ -interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *The Veterinary Journal*, 160: 17-24.
21. Olsen, I., Boysen, P., Kulberg, S., Hope, J. C., Jungersen, G., & Storset, A. K. (2005). Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infection and immunity*, 73: 5628-5635.
- latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 43: 4498-4506.
8. Kashi, M. H., Mosavari, N., Salehi, M., & Mojgani, N. (2020). Detection and characterization of purified antigenic proteins from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* strain AN5. *Iranian Journal of Microbiology*, 12: 25.
9. Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., & Wood, P. R. (1992). The gamma- γ -interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma- γ -interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*, 69: 1-4.
10. Daniel, T. M., & Janicki, B. W. (1978). Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiological reviews*, 42: 84.
11. Wood, P. R., Corner, L. A., Rothel, J. S., Baldock, C., Jones, S. L., Cousins, D. B., et al. (1991). Field comparison of the interferon γ -gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 68: 286-290.
12. Wood, P. R., Corner, L. A., Rothel, J. S., Ripper, J. L., Fifis, T., McCormick, B. S., et al. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology*, 31: 71-79.
13. Dondo, A., Goria, M., Scicluna, M. T., Amadori, M., & Lodetti, E. (1993). Comparative evaluation of skin-test and gamma-interferon (IFN) assay for the diagnosis of TB in cattle. *Veterinaria Italiana*, 28: 14-19.
14. Ameni, G., Miörner, H., Roger, F., & Tibbo, M. (2000). Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Tropical animal health and production*, 32: 267-276.
15. Llamazares, O. G., Martín, C. G., Nistal, D. A., De La Puente Redondo, V. A., Rodríguez, L. D., & Ferri, E. R. (1999). Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon- γ assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary microbiology*, 70: 55-66.
16. Whipple, D. L., Palmer, M. V., Slaughter, R. E., & Jones, S. L. (2001). Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 13: 117-122.
17. Neill, S. D., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, D. P., Pollock, J. M., Clements, A., et al. (1994). Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *The Veterinary Record*, 135: 134.

Detection of bovine tuberculosis using indirect ELISA method of low molecular weight antigen of *Mycobacterium bovis* strain AN5

Malihe Honarmand Kashi¹, Nader Mosavari², Mitra Salehi^{1*}, Naheed Mojgani²

¹Department of Biology, Islamic Azad University of North Tehran Branch, Tehran, Iran.

²Department of PPD Tuberculin, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Abstract

The determination of bovine tuberculosis is made with different tests and with certain limitations. Antigenic proteins can be extracted from *Mycobacterium bovis* culture that can improve the sensitivity and specificity of diagnostic tests. One of the targets of this study is to design an indirect ELISA. For this reason, purified *Mycobacterium bovis* AN5 antigen were utilized to distinguish bovine tuberculosis. Another goal is to review and compare the results of the system designed to Interferon- γ (IFN- γ) assay. *Mycobacterium bovis* AN5 antigens were isolated and purified. The selected antigen was then used to design the indirect ELISA system. The sera of 230 cows from different farms were tested with designed ELISA. Their results were at that point compared with interferon-gamma test as a corroborative diagnostic test. Correlation and independent study between variables were performed by Pearson and T test. The sensitivity and specificity of the designed indirect ELISA system were 77.8% and 80.7%, respectively. The p value for Pearson and T test was zero percent. Noteworthy lightweight antigens were purified that might analyze the disease. Due to the high sensitivity and specificity gotten, the ELISA system outlined for starting screening within the diagnosis of bovine tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, antigenic protein, gamma interferon, indirect ELISA.

* mitra_salehi_microbiology@yahoo.com