

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

• رضا دری اخوی

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

• نادر مصوری

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

• مجید تیبانیان (نویسنده مسئول)

بخش ایمونولوژی، 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 گاوی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که علاوه بر انسان می‌تواند دام‌های اهلی و وحشی را آلوده نماید. عامل این بیماری مایکوباکتریوم بوویس می‌باشد. کنترل موثر این بیماری حائز اهمیت بسیاری است و مستلزم تشخیص دقیق و صحیحی می‌باشد. روش‌های تشخیصی معمول این بیماری شامل: تست جلدي و سنجش اینترفرون گاما می‌باشد، اما روش‌های سرولوژیک مبتنی بر الایزا می‌تواند نوید بخش شناسایی سریع، از ران و مناسب بیماری سل گاوی باشند. هدف ما از این مطالعه بررسی ارزش تشخیصی آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن نوترکیب MPT64 مایکوباکتریوم بوویس در تشخیص سل دامی به روش الایزا می‌باشد. تعداد ۳۲ نمونه سرمی از گاوهای آلوده که آلودگی در آنها به وسیله تست جلدي و کالبدگشایی توسط دامپزشک مقیم در کشتارگاه تأیید شده بود و دام‌های سالم (به عنوان کنترل) جمع‌آوری شد. میزان آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن نوترکیب MPT64 به روش الایزای طراحی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده همخوانی تقریباً قابل قبولی با نتایج تست جلدي داشت به طوری که از تعداد ۹ نمونه مثبت مورد استفاده در تست برای آنتی‌ژن نوترکیب MPT64 هیچ موردی از منفی کاذب دیده نشد و همه نمونه‌های مثبت در کیت الایزای طراحی شده نیز مثبت شدند. این نتایج موید آن است که روش الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن نوترکیب MPT64 می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی مناسب برای شناسایی موارد عفونی گاوها در بیماری سل گاوی در نظر گرفته شود که با استفاده از آن می‌توان حجم زیادی از نمونه‌های آلوده را با سهولت، دقت و سرعت بالا مورد ارزیابی قرار داد.

کلمات کلیدی: سل گاوی، مایکوباکتریوم، MPT64، الایزا، آنتی‌بادی

- 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

سال‌های اخیر، استفاده از آنتی‌ژن‌های اختصاصی مایکوباکتریوم بوویس که تنها در سویه‌های بیماری‌زا وجود دارد و در سایر سویه‌ها موجود نمی‌باشد مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۹، ۱، ۱۳).

سویه‌های عفونی مجموعه یا کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای ۱۶ ناحیه مختلف که نواحی تفاوت (Regions of Difference) RD نام‌گذاری شده‌اند در ژنوم خود جهت کدگذاری آنتی‌ژن‌های مختلف می‌باشند (۱۱). یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌ها که در ناحیه RD۲ کدگذاری می‌شود، آنتی‌ژن MPT64 یا (major protein of *M. bovis* 64) می‌باشد. اما این منطقه در سویه BCG و مایکوباکتریوم‌های غیربیماری‌زا و مایکوباکتریوم‌های محیطی وجود ندارد (۴، ۶).

بنابراین تشخیص سریع و دقیق سل در دامپزشکی قبل از تبدیل شدن بیماری دام به فرم فعال بیماری که موجب انتقال آن به سایر دام‌ها و همچنین انسان می‌شود بسیار مهم و ضروری است. هدف از این کار معرفی آنتی‌ژن نو ترکیب MPT64 به عنوان یک کاندید مناسب برای تشخیص زود و سریع بیماری سل در دام‌ها می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد آزمایش: جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۳۲

#### مقدمه

سل (توبرکلوزیس) یک بیماری عفونی شایع در سراسر نقاط جهان است که موجب صدمات اقتصادی و بهداشتی بسیار زیادی شده است. این بیماری توسط گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم‌ها به‌طور معمول در انسان توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و در حیوانات توسط مایکوباکتریوم بوویس ایجاد می‌شود (۱۲، ۳).

روش‌های متعددی برای تشخیص سل گاوی وجود دارد. ولی با توجه به خواص آنتی‌ژن مشترک مایکوباکتریوم بوویس با سایر مایکوباکتریوم‌ها تشخیص سرولوژیکی آن بسیار مشکل بوده و کشت باکتری هنوز مطلوب‌ترین گزینه برای تشخیص قطعی این بیماری است (۱۵، ۱۶). از آنجائی که سرعت رشد باکتری بسیار کند است و اعلام نتیجه آن بیش از شش هفته طول می‌کشد لذا برای برنامه‌های مبارزه با بیماری سل که در سطح وسیعی از جمعیت انجام می‌شود، مناسب نیست. رایج‌ترین روش، استفاده از آزمون‌های ازدیاد حساسیت تأخیری می‌باشد (۵). آزمایشات مختلفی بر پایه آنتی‌بادی برای تشخیص بیماری سل ابداع شده است. به خاطر در دسترس بودن توالی کامل ژنوم مایکوباکتریوم بوویس در بانک‌های اطلاعات ژنتیکی، شناسایی آنتی‌ژن‌های اختصاصی که بتواند برای تشخیص آنتی‌بادی‌ها مورد استفاده قرار بگیرد ممکن شده است (۱۳). روش‌های شناسایی آنتی‌بادی نیز به اشکال مختلف توسعه پیدا کرده است. با این حال، الیزا هنوز به عنوان یک روش معتبر مطرح می‌باشد (۱). در

### کشت غده‌های لنفاوی

غدد لنفاوی تهیه شده از هر کدام از دام‌های تحت مطالعه در محیط‌های کشت لوانشتاین جانسون پیرووات‌دار (LP) و لوانشتاین جانسون گلیسرول‌دار (LG) به روش سود در آزمایشگاه توبرکولین موسسه رازی کشت داده شد. برای این منظور تکه‌های قسمت کورتکس و پاراکورتکس غدد لنفاوی با شن استریل کاملاً له شد. سپس مقدار ۳۰ تا ۵۰ میلی‌لیتر سود نرمال به آن افزوده و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه انکوبه گردید تا عمل هضم و آلودگی‌زدایی انجام گیرد. پس از طی شدن زمان فوق حدود ۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی هر نمونه به لوله فالكون اضافه شد تا اسید با سود به حالت خنثی درآید و در نتیجه معرف برم تیمول به رنگ سبز زیتونی یا در بیاید. پس از حدود ۲۰ دقیقه سانتی‌فیوژ، مایع رویی لوله‌ها دور ریخته و سوسپانسیون رسوب حاصل در سرم فیزیولوژی بدست آمد. در انتها به میزان ۰,۱ تا ۰,۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق به محیط کشت تلقیح گردید. لوله‌های کشت تلقیح شده به مدت ۸ هفته متوالی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. در تمام این مدت وجود هرگونه کلونی بر روی محیط کشت از نظر رنگ‌آمیزی اسید فاست مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده نمونه‌ها به سه دسته مختلف تقسیم‌بندی شدند. نمونه‌هایی با تست جلدي و کشت مثبت، نمونه‌هایی با تست جلدي مثبت و کشت منفي و در نهایت نمونه‌های سالم که دارای تست جلدي منفي از گاوهای سالم تهیه شده بود.

گاو آلوده یا مشکوک به سل بودند که از نظر علائم بالینی مورد ارزیابی دکتر دامپزشک قرار گرفته بودند و وجود بیماری در آن‌ها مثبت گزارش شده بود. تمامی دام‌های فوق از نظر آزمون جلدي PPD نیز مثبت گزارش شده بودند. علاوه بر این، از ۲۰ گاو سالم که فاقد هیچ گونه علائم بالینی مربوط به بیماری خاصی باشند نیز به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. نمونه‌گیری از گاوها به مدت ۴ ماه از کشتارگاه‌های استان تهران، البرز و فارس انجام شد. سرم تهیه شده از این نمونه‌ها پس از سانتی‌فیوژ تا زمان انجام آزمون ایلیزا با رعایت اصول ایمنی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین از دام‌های بیمار، پس از کشتار و کالبدگشایی جهت انجام کشت از غدد لنفاوی رتروفارنژیال، مدیاستینال و بروکیال نمونه‌برداری شد.

### آنتی‌ژن نوترکیب

در این مطالعه از آنتی‌ژن نوترکیب MPT64 مایکوباکتریوم بوویس استفاده گردید که قبلاً در موسسه رازی تهیه شده بود. به منظور شناسایی و تایید پروتئین نوترکیب MPT64 از روش الکتروفورز در ژل آگارز با غلظت ۱۵٪ و روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه برجسب هیستیدینی متصل به این پروتئین نوترکیب، استفاده شد. همچنین برای تعیین غلظت مناسب از آنتی‌ژن از روش لوری استفاده شد.



شکل ۱- نمایی از یک نمونه کشت مثبت عقده لنفاوی گاو آلوده به سل

نقطه برش برای تمایز نمونه‌های مثبت و نمونه‌های منفی با فورمول زیر محاسبه گردید.

(Cut off) = میانگین OD نمونه های منفی + دو واحد استاندارد (SD) نقطه برش

### نتایج

پس از انجام الکتروفورز به روش SDS-PAGE و با توجه به محل قرار گرفتن باندهای با اندازه مشخص (مارکر)، باند پروتئین نوترکیب (MPT64) در حدود ۲۴ کیلودالتون شناسایی شد. به دلیل شناسایی و تایید باند منسوب به پروتئین نوترکیب MPT64 عمل وسترن بلات در مجاورت آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه برچسب هیستیدینی Histaq انجام گردید. با مقایسه غشاء رنگ شده وسترن بلات و ژل SDS-PAGE هم ارز آن مشاهده می‌شود که پروتئین‌های ردیابی شده در روی غشاء باندهای منسوب به پروتئین‌های نوترکیب مورد نظر می‌باشد که با آنتی‌بادی واکنش نشان داده‌اند.

همچنین در نتیجه کشت، تعداد ۹ نمونه از ۳۲ نمونه با تست جلدي مثبت، بروی محیط کشت پس از گذشت ۵ هفته بالا آمد و کشت آنها نیز مثبت شد (شکل ۱).

در محاسبه غلظت‌ها و رقت‌های مناسب برای آنتی‌ژن کوتینگ، سرم و آنتی‌بادی کونزوگه با روش جدول متقاطع تیتراسیون، غلظت مناسب برای آنتی‌ژن کوتینگ MPT64، ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آنتی‌ژن کوتینگ PPD، ۴۳/۹۰ میکروگرم بر ۱۰۰ میکرولیتر بدست آمد. مناسب‌ترین رقت آنتی‌بادی کونزوگه در تیترا ۱/۵۰۰۰ بدست آمد (جدول ۱). همچنین بهترین رقت برای بافر مسدود کننده (۵% Skim milk) مشخص گردید (جدول ۲). برای تعیین میزان نقطه برش و تمایز نمونه‌های مثبت از نمونه‌های منفی، تمامی نمونه‌های سرمی منفی در رقت یک صدم در قالب الایزای غیر

### طراحی الایزای غیرمستقیم برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی اختصاصی

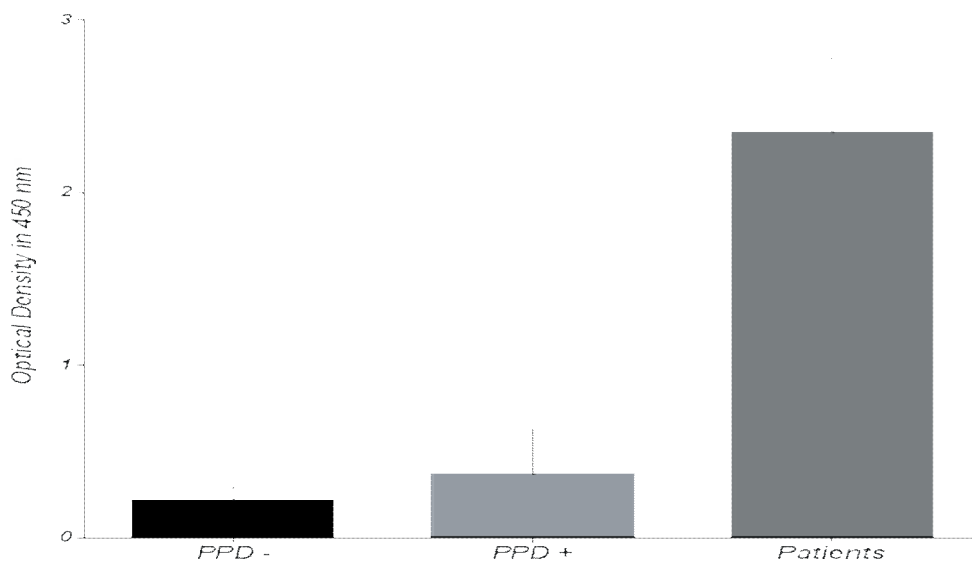
ابتدا برای بدست آوردن رقت‌های مناسب از آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌های کونزوگه و دستیابی به حداکثر فاصله ممکن بین جذب نمونه‌های کنترل مثبت و منفی مورد آزمایش از جدول صفحه آزمون یا همان پلیت checker board استفاده شد. برای انجام آزمون الایزای آنتی‌ژن نوترکیب MPT64 در بافر کوتینگ که حاوی ۰,۰۵۲ گرم کربنات سدیم و ۰,۰۴۲ گرم پی کربنات سدیم در ۱۰ سی‌سی آب مقطر می‌باشد، حل شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌ژن تهیه شده به هر کدام از چاهک‌ها پلیت الایزای افزوده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز انکوبه شد. بعد از تخلیه محتویات میکروپلیت چاهک‌ها با بافر شستشو بافر (فسفات سالین) با pH=۷/۴ حاوی توئین ۲۰ شستشو داده شد سپس هر یک از چاهک‌ها با حجم ۳۰۰ میکرولیتر از بافر مسدود کننده که شامل بافر PBS حاوی ۵ درصد اسکیم میلک بود پر شد و برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و مراحل شستشو مجدداً تکرار شد. در مرحله بعد نمونه‌های سرمی در رقت یک صدم به چاهک‌ها به حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و برای ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه گردید. بعد از اتمام انکوباسیون، شستشوی مجدد انجام شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کونزوگه (آنتی‌بادی نشانه‌دار با آنزیم پراکسیداز) به هر یک از چاه که اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس چاهک‌ها برای ۵ مرتبه شستشو داده شدند و سرانجام محلول سوبسترا /کروموژن (TMB) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی گذاشته شد و در آخر، واکنش با افزودن محلول متوقف‌کننده اسید سولفوریک رقیق شده ۰/۱ مولار متوقف و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. میزان

جدول ۱- تعیین رقت مناسب از آنتی‌بادی کونزوگه ضد اپی‌نوگلوبین گاوی جهت انجام آزمون الایزای

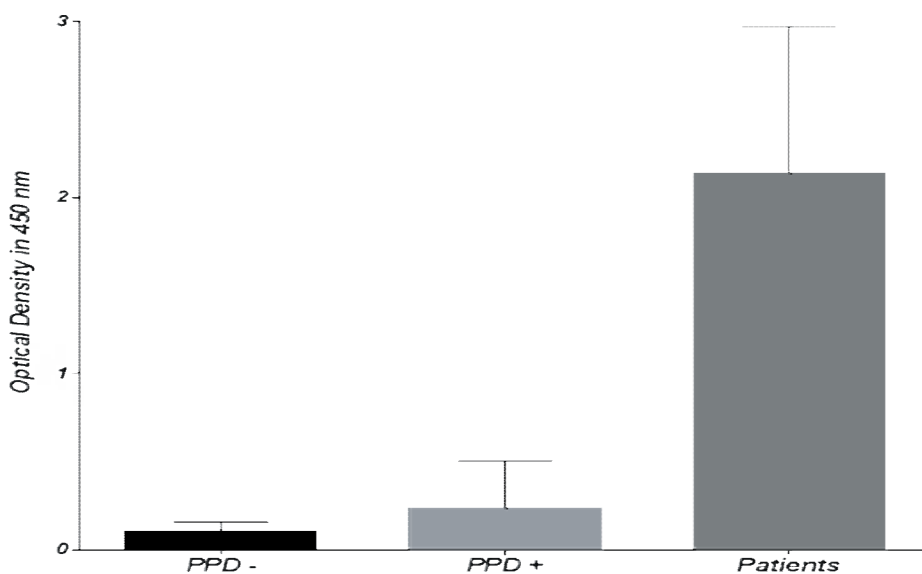
Bovine sample	۱/۵۰۰۰	۱/۱۰۰۰۰	۱/۲۰۰۰۰	۱/۴۰۰۰۰
PPD+	۱/۹۴۲	۱/۸۴۰	۲/۱۵۱	۲/۴۶۵
PPD-	۰/۲۸۳	۰/۴۸۱	۰/۵۴۰	۰/۶۷۳

جدول ۲- تعیین بهترین رقت برای بافر مسدود کننده

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



نمودار ۱- میزان آنتی بادی ایجاد شده بر علیه پروتئین نو ترکیب MPT64 در گروه های تحت مطالعه



نمودار ۲- میزان آنتی بادی ایجاد شده بر علیه پروتئین PPD در گروه های تحت مطالعه

با کاربران متخصص و آموزش دیده می‌باشد. از این رو تولید آنتی‌ژن‌های اختصاصی مایکوباکتریوم که فقط در انواع بیماری‌زای باکتری وجود داشته باشد بسیار قابل توجه و مهم است (۱۳). الیزا به عنوان یکی از روش‌های سرولوژیکی در اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه آنتی‌ژن انتخابی در فاز جامد محسوب می‌شود که علاوه بر دقت، سهولت و سرعت انجام آن از مزایای این روش محسوب می‌شود. وجود و انتخاب یک آنتی‌ژن مناسب برای طراحی و انجام الیزا دارای اهمیت بالایی است (۲). با توجه به این که آنتی‌ژن MPT64 یک پروتئین اختصاصی مایکوباکتریوم بوویس می‌باشد که در انواع واکسینال و سایر مایکوباکتریوم‌های محیطی و غیر بیماری‌زا وجود ندارد. از این رو این آنتی‌ژن کاندید مناسبی برای انجام آزمون الیزا جهت تشخیص نوع بیماری‌زای باکتری می‌باشد (۱۷، ۱۸).

در سال‌های اخیر در مطالعات متعددی از روش‌های سرولوژیک جهت ردیابی بیماری سل استفاده شده است. نتایج بدست آمده از این تحقیقات دانشمندان را برای توسعه و تحکیم این امر بسیار دلگرم نموده است. به عنوان یکی از مهم‌ترین مطالعات در این زمینه می‌توان به گزارشی استناد کرد که استفاده از آنتی‌ژن‌های ۶-ESAT و MPBV۰ می‌تواند با حساسیت بالای ۹۸٪ نمونه‌های آلوده به سل گاوی را تشخیص دهد (۷). در سال ۲۰۱۲ سوزا و همکارانش با استفاده از پروتئین‌های نوترکیب از جمله ۶-ESAT و CFP-۱۰ و PE۱۳ و PE۵ و MPB۸۳ و MPBV۰ و غیره به عنوان آنتی‌ژن و با روش الیزا سعی در تشخیص آنتی‌بادی ضد آن را داشت که از بین آنتی‌ژن‌های مورد استفاده تنها MPB۸۳ و MPBV۰ و ۶-ESAT رضایت بخش بود که توانست با آن‌ها دام‌های مثبت و منفی را از هم تفکیک نمایند (۱۴).

یکی از آنتی‌ژن‌هایی که در سالیان اخیر مورد توجه و استفاده تشخیصی

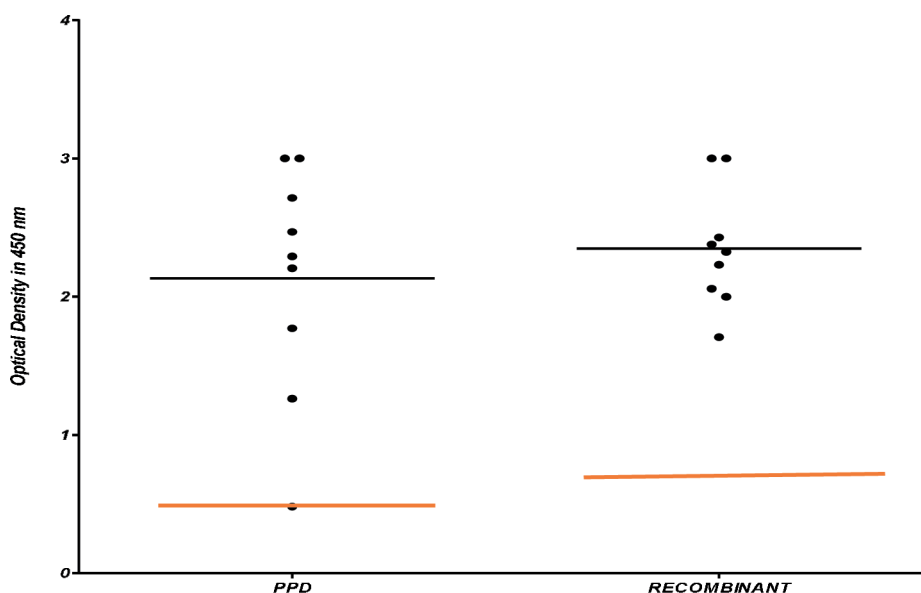
مستقیم بهینه شده مورد آزمایش قرار گرفتند.

میزان جذب نوری نمونه‌های کنترل منفی در طول موج ۴۵۰ نانومتر محاسبه شد و میانگین آن‌ها برای رقت یک صدم ۰,۲۱۵ محاسبه گردید. که این میزان در مجاورت آنتی‌ژن PPD، ۰,۱۰۲ می‌باشد. میانگین نمونه‌های بیمار نیز در رقت یک صدم ۲,۳۴۷ محاسبه گردید که این عدد در مجاورت آنتی‌ژن PPD، ۲,۱۳۳ می‌باشد (نمودار ۳). انحراف استاندارد نمونه‌های فوق نیز به میزان ۰,۳۷۸ محاسبه گردید. با استفاده از فرمول cut off، نقطه برش در رقت یک صدم برای آنتی‌ژن نوترکیب MPT64، ۰,۳۶۹ بود و برای آنتی‌ژن PPD، ۰,۲۰۴ محاسبه گردید.

با توجه به اینکه در نمونه‌های آلوده مورد آزمایش در حضور آنتی‌ژن PPD تعداد یک نمونه کمتر از نقطه برش بودند لذا این نمونه به عنوان منفی کاذب در نظر گرفته شد.

### بحث

علیرغم همه تلاش‌ها برای کنترل سل دامی، این بیماری همچنان باعث وارد کردن بار اقتصادی زیادی بروی صنایع و دامداران و همچنین سلامت انسان می‌شود (۱۲). برنامه ریشه‌کنی با استفاده از روش تست جلدی و کشتار دام مثبت در بسیاری از کشورهای پیشرفته موفق بوده است. با این حال، فقط یک روش تست جلدی به صورت تنها دارای حساسیت و اختصاصیت کمی است (۱۵). همچنین چون این روش وابسته به شخص می‌باشد، امکان خطا و اشتباه نیز بالا می‌رود. کشت باکتری نیز طولانی مدت است. از این رو تکنیک‌های مولکولی می‌توانند به طور مستقیم مایکوباکتریوم بوویس را شناسایی کنند، اما این روش‌ها هزینه‌بر و نیاز به دستگاه‌های پیشرفته



نمودار ۳- مقایسه بین میزان آنتی‌بادی ایجاد شده بر علیه پروتئین نوترکیب و آنتی‌ژن PPD در دام‌های بیمار



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.

در سل گاوی قرار گرفته، پروتئین MPT64 بوده است. لیو و همکارانش در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ مبنی بر استفاده از پروتئین MPT64 در تشخیص بیماران مبتلا به سل انجام دادند، به این نکته پی بردند که استفاده از این پروتئین روشی سریع و کارآمد جهت تشخیص بیماری سل در افراد می‌باشد (۸). در مطالعه دیگری از پروتئین MPT64 بروش روماتوگرافی در تشخیص جدایه‌های کشت منفی استفاده شد و نتایج امیدوارکننده‌ای را در تشخیص نمونه‌های مجموعه مایکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس کمپلکس (MTBC) از غیر توبرکلوزیس (NTM) به همراه داشت (۱۰). یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که در مقایسه با روش سنتی تشخیص سل گاوی که مبتنی بر انجام آزمون جلدی با استفاده از عصاره خام آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم است، روش الیزا روشی مناسب با اختصاصیت و حساسیت بالاست که بسیار مورد توجه قرار می‌گیرد و به همین دلیل می‌تواند همسو و همراه با تست جلدی به عنوان یک تست غربالگر مهم، مفید و با سرعت بیشتر در دام‌های آلوده مورد استفاده قرار گیرد. همچنین روش انجام شده در این مطالعه و آزمون الیزای طراحی شده با استفاده از آنتی‌ژن نو ترکیب MPT64 می‌تواند با دقت نسبتاً قابل قبولی نمونه‌های دام‌های بیمار را از سالم تشخیص و تمیز بدهد. در مجموع نتایج بدست آمده در این تحقیق ضمن هم‌خوانی و تایید مطالعات و گزارش‌های همسوی انجام شده قبلی می‌تواند موید این نکته باشد که آنتی‌ژن نو ترکیب MPT64 را می‌توان به علت اختصاصی بودن، برای طراحی روش‌های سریع تشخیصی بیماری سل گاوی 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-MPT64 fusion 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. Marjani, 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.

