



طراحی و بهینه‌سازی سیستم الایزای نقطه‌ای (Dot-blot ELISA) با آنتی‌ژن‌های اختصاصی برای تشخیص ساده و سریع مسمشه

سجاد یزدان ستاد^۱، نادر مصوری^{۲*}، کیوان تدین^۳، ایرج مهرگان^۱

- ۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۲- بخش توپرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
 ۳- بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه

مسمشه از قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیر خطرناک و مشترک بین انسان و حیوان است که با ظهور جراحات گرانولوماتوزی قرچه‌ای در پوست و غشاهای مخاطی مشخص می‌شود. با توجه به گزارش حتی یک مورد بیماری و لزوم جلوگیری از انتشار آن با شناسایی و معدوم‌سازی میزبان‌های آلوده، شناسایی زودهنگام بیماری با روش‌های حائز حساسیت و ویژگی قابل قبول، از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعه حاضر به منظور طراحی و بهینه‌سازی سیستم الایزای نقطه‌ای (Dot-blot ELISA) با آنتی‌ژن‌های اختصاصی جهت تشخیص ساده و سریع مسمشه در نمونه‌های سرمی اسب‌سانان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های بورخولدريا مالئی در محیط مایع نوترینت همراه با گلیسرول ۴ درصد کشت داده شدند. آنتی‌ژن‌های کل سلول باکتری با استفاده از روش سونیکاسیون و ترسیب با تری‌کلرو استیک اسید (TCA) استخراج شد. غلظت بهینه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با روش تیتراسیون چکر بورد معین شد. آنتی‌ژن باکتری روی کاغذ نیتروسلولز مفروش و بعد از متوقف‌سازی با شیرخشک، سرم حیوان مشکوک و سپس آنتی‌بادی کونزوگه شده با HRP اضافه گردید و با استفاده از سوپسترای TMB، سیگنال‌ها رهگیری شد.

یافته‌ها

تعداد ۴ نمونه از ۹۰ نمونه سرم با استفاده از آزمون الایزای نقطه‌ای، مثبت گزارش شد. ویژگی و حساسیت آزمون، به ترتیب ۹۶/۶۲ و ۱۰۰ درصد برآورد گردید. کشت و جداسازی بورخولدريا مالئی از نمونه‌های بالینی حیوان، اعتبار تست را تایید کرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان داد روش الایزای نقطه‌ای حائز حساسیت، ویژگی و دقت بالا در تشخیص مسمشه بوده و به دلیل سرعت، سهولت تفسیر بدون نیاز به ابزار خاص، مقرون به صرفه بودن و قابلیت کاربردی صحرائی آن، روش کاربردی و کارآمد می‌باشد.

کلمات کلیدی

بورخولدريا مالئی، مسمشه، الایزای نقطه‌ای، آنتی‌بادی

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۲۰

* نویسنده مسئول: نادر مصوری، بخش توپرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تلفن: ۹۸۹۱۲۲۶۱۱۴۳۸+

پست الکترونیک:

nmosavari@gmail.com



مقدمه

مسمشه یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیر خطرناک و مشترک بین انسان و حیوان است که با ظهور جراحات گرانولوماتوزی قرچه‌ای در پوست و غشاهای مخاطی مشخص می‌شود. علت سببی مسمشه، باسیل گرم منفی غیرمتحرک *بورخولدریا مالئی* است (۱). میزبان عمده بیماری، تک‌سمی‌ها است و انسان میزبان تصادفی *بورخولدریا مالئی* بوده و مسمشه در انسان بیماری تک‌گیر^۱ است که به‌طور معمول در افراد در تماس نزدیک و مکرر با تک‌سمی‌های آلوده یا بافت‌های آنها می‌تواند رخ دهد (۲). مسمشه از نظر سازمان جهانی بهداشت حیوانات^۲ بسیار دارای اهمیت است و مرکز مبارزه و پیشگیری از بیماری‌ها^۳ نیز عامل این بیماری را در گروه B عوامل تهدید زیستی طبقه‌بندی کرده‌اند (۱). روند بیماری در میزبان به سه شکل حاد، تحت حاد و مزمن دیده می‌شود. فرم حاد با علائم شدید تنفسی، تورم گره‌های لنفاوی و طناب لنفی همراه است. در فرم تحت حاد، علائم پوستی (سراج‌ه)، عفونت دستگاه تنفسی فوقانی و ترشحات بینی (نازال) بروز پیدا می‌کند. فرم مزمن، بدون علائم بالینی بوده و اغلب با درگیری ریه همراه است (۳). تاکنون، واکسن تجاری برای پیشگیری از مسمشه وجود ندارد و برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی بیماری بر محور شناسایی موارد بالینی مشکوک، غربالگری تک‌سمی‌های آلوده و حذف آنها است (۴). بازپدید بیماری مسمشه در سال‌های اخیر در منطقه خاورمیانه، ورود غیرمجاز تک‌سمی‌های آلوده از کشورهای همجوار که موجب شیوع فزاینده و آندمیک شدن بیماری در ایران شده است، لزوم طراحی روش تشخیص سرولوژی بیماری با قابلیت‌های ردیابی سریع، ساده، حائز اختصاصیت

و حساسیت بالا و در عین حال مقرون به‌صرفه از نظر اقتصادی را می‌طلبد.

تکنیک سنجش اتصال ایمنی بصورت لکه‌ای-نقطه‌ای^۴ یک تکنیک پایه و تکمیلی جهت بررسی واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است. تکنیک الایزای نقطه‌ای ویژگی اساسی هر دو تکنیک الایزا و وسترن‌بلات را نشان می‌دهد، با این تفاوت که نسبت به آن دو روش بسیار ساده‌تر است. بر خلاف روش الایزا مرسوم که روش کمی است و نیازمند ارزیابی چگالی نوری^۵ نمونه با دستگاه خوانشگر الایزا است، روش الایزای نقطه‌ای عموماً کیفی است و با مشاهده یک لکه یا نقطه در بستر کاغذی سفید انجام می‌گردد. همچنین این روش بر خلاف روش وسترن‌بلاتینگ به صفحات ژل پلی‌آکریل‌آمیدی^۶ نیاز ندارد. در روش الایزای نقطه‌ای، آلبومین سرم گاوی^۷ بر روی غشای کاغذی قرار داده شده و با سرم ضدآلبومین خرگوش مورد بررسی قرار می‌گیرد. آنتی‌بادی کونژوگه شده با پراکسیداز تربچه^۸ و سوبسترا جهت تشخیص آنتی‌بادی استفاده می‌شود. این آزمایش ساده در کمتر از ۳ ساعت و با کمترین تجهیزات و با استفاده از واکنشگرهای موجود قابل انجام است. روش الایزای نقطه‌ای، واکنش واقعی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را نشان می‌دهد، بنابراین اصل این آزمایش مشابه واکنشگرهایی است که در کیت‌های تشخیصی سریع بکار برده می‌شوند (۵). مطالعه حاضر با هدف تشخیص ساده و سریع بیماری مسمشه در نمونه‌های سرمی اسب‌سانان با روش بهینه شده الایزای نقطه‌ای^۹ و با استفاده از پروتئین/آنتی‌ژن‌های کل سلولی *بورخولدریا مالئی* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و خالص‌سازی آنتی‌ژن

^۵ Optical Density (OD)

^۶ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

^۷ Bovine Serum Albumin

^۸ Horseradish Peroxidase (HRP)

^۹ Dot-blot ELISA

^۱ Sporadic

^۲ World Organisation for Animal Health (OIE)

^۳ Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

^۴ Dot Immunobinding Assay/Dot blot ELISA



الایزا، ثبوت عناصر مکمل و همچنین کشت ارگانسیم و روش‌های مولکولی مقایسه و اعتبارسنجی شد.

الایزای نقطه‌ای

غلظت بهینه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با روش تیتراسیون چکر بورد و با استفاده از نمونه‌های سرمی مثبت و منفی مشمشه ارزیابی شد. حدود ۲ میکرو گرم در میلی لیتر آنتی‌ژن تام باکتری بر روی کاغذ نیتروسولوز (Macherey-Nagel, Germany) پوشانده شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد بمدت یک شبانه‌روز تیمار شد. غشا با بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی توپین ۲۰ (۰/۵ درصد)، سه مرتبه شستشو داده شد و سپس محلول متوقف کننده (شیر خشک ۳ درصد در بافر فسفات-توپین) اضافه گردید. از نمونه‌های سرم با استفاده از محلول متوقف کننده، رقت ۱:۲۰۰ تهیه و بعد از سه مرتبه شستشو متعاقب مرحله متوقف‌سازی، اضافه شد. مجدداً غشا سه مرتبه شستشو داده شد و آنتی‌بادی ثانویه IgG کونژوگه شده با پراکسیداز تربچه (HRP) (Amersham BioSciences, UK) توسط بافر تریس نمکی توئین دار (TBS-T: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 and Tween 20, 0.05%) به نسبت ۱:۱۰۰۰۰ پس از ۵ مرتبه شستشوی نهایی، رقیق‌سازی و اضافه گردید. پس از ۵ مرتبه شستشوی نهایی، سوبسترای ۳'۵'۵'-تترا متیل بنزیدین (TMB) در شرایط تاریکی اضافه و سیگنال‌ها ردیابی شد (۷).

یافته‌ها و بحث

از ۹۰ نمونه سرم بررسی شده با آزمون الایزای نقطه‌ای (دات بلات الایزا)، تعداد ۴ مورد مثبت گزارش شد. همچنین، نمونه‌های کلینیکی جمع‌آوری شده از حیوان (ترشحات منخرین و نازال، زخم، خون) بصورت موازی جهت جداسازی احتمالی باکتری، کشت داده شد. جداسازی و شناسایی مولکولی ارگانسیم با آزمون مولکولی PCR ژن‌های اختصاصی ارگانسیم (*IS407-flip*, *BimA*) ضمن مشاهده

مطابق با استانداردهای ایمنی-زیستی سطح ۱:۳ تعداد ۴ جدایه ایرانی حاد بورخولدريا مائی و ۱ سویه استاندارد *Burkholderia mallei* Razi 325 (Razi Type Culture Collection; RTCC 2375) موجود در آرشیو میکروبی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، در محیط نوترینت براث حاوی گلیسیرویل ۴ درصد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی کشت داده شد. پس از غیرفعال‌سازی ارگانسیم در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، سوسپانسیون باکتری در $\times 12000$ g به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب باکتری با بافر فسفات نمکی (PBS 0.01 M, pH 7.2) سه مرتبه شستشو داده شد. رسوب مجدداً در بافر فسفات حاوی فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF 1 mM) حل شد. سوسپانسیون حاصل روی یخ با سه سیکل ۱ دقیقه‌ای و با شدت ۹۰ Amplitude با استفاده از دستگاه سونیکاتور، بمباران صوتی شد. مایع رویی متعاقب سانتریفوژ در $\times 12000$ g به مدت ۵ دقیقه با بافر لیز کننده ۱ مولار تیمار شد. مایع رویی با تری کلرو استیک اسید (TCA) ۴۰ درصد ترسیب داده شد و نهایتاً در بافر فسفات حل گردید. غلظت کل پروتئین‌های استخراج شده باکتری با روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی بعنوان استاندارد سنجیده شد (۶).

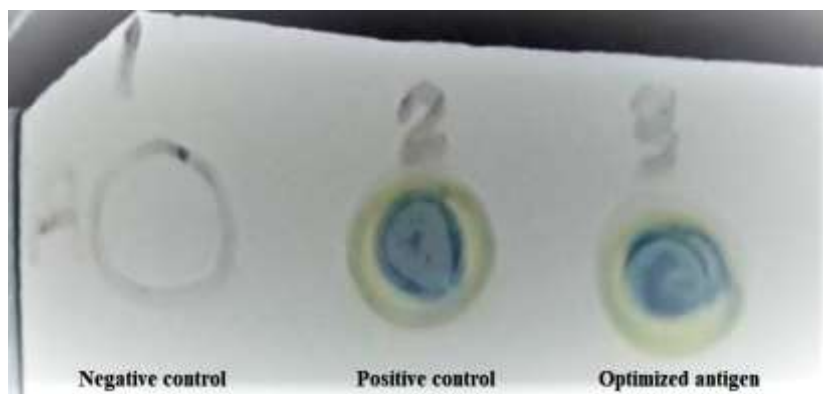
نمونه‌های سرم

تعداد ۹۰ نمونه سرم از اسب‌های مشکوک به مشمشه با توجه به علائم بالینی، از مناطق مختلف ایران (آذربایجان غربی، البرز، اصفهان، کرمانشاه، فارس و خراسان رضوی) جمع‌آوری شد. وضعیت مثبت و یا منفی بودن سرم‌ها با استفاده از روش الایزای نقطه‌ای (دات بلات الایزا) بررسی گردید و با روش‌های ترکیبی شامل آزمون‌های مالئیناسیون،

^۱ Biosafety level 3 (BSL-3)

علائم بالینی حیوان و تشخیص اولیه با آزمون مالئیناسیون و نیز تایید تشخیص با آزمون‌های ثبوت عناصر مکمل^۱ و الایزا حساسیت و ویژگی آزمون الایزی نقطه‌ای اعتبارسنجی شد. به استناد آزمون‌های تاییدی تشخیص و بنا بر فرمول محاسبه حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، تعداد ۳ نمونه سرم، مثبت کاذب گزارش شد. ویژگی و

حساسیت آزمون الایزی نقطه‌ای به ترتیب ۹۶/۶۲ و ۱۰۰ درصد برآورد شد. ارزش اخباری مثبت^۲ و ارزش اخباری منفی^۳ آزمون نیز به ترتیب ۵۷/۱۴ و ۱۰۰ درصد تخمین زده شد. آزمون دات بلات الایزا برای سرم‌های تست و سرم‌های مثبت و منفی مسمشه (به عنوان کنترل) در شکل ۱ نشان داده شد.



شکل ۱- الایزی نقطه‌ای سرم‌های کنترل و تست. (۱) سرم کنترل منفی (۲) سرم کنترل مثبت (۳) سرم مثبت مسمشه

در این مطالعه، روش بهینه شده و کاربردی جهت تشخیص عفونت بورخولدريا مالئی با استفاده از نمونه‌های سرم، ارائه شده است. مطالعه حاضر نشان داد که روش الایزی نقطه‌ای یک روش سریع و با حساسیت و اختصاصیت بالا جهت تشخیص مسمشه است. این روش در موارد کمبود زمان و به ویژه در مرزهای کشور که امکانات و شرایط آزمایشگاهی مطلوبی نیست و یا زمان کافی برای آزمون‌های تشخیصی وجود ندارد، توصیه می‌شود. تردیدی نیست که قطعی ترین راه تشخیص مسمشه، جداسازی عامل عفونی است. با این حال، جداسازی بورخولدريا مالئی بسیار مخاطره آمیز و دشوار است و در شرایط خاص ایمنی زیستی مقدور است. از طرف دیگر، جداسازی باکتری از موارد مزمن و مخفی مسمشه به سادگی میسر نیست و در چنین مواردی باید از

روش‌های تشخیصی مانند آزمون‌های آلرژیک و یا آزمون‌های سرولوژیکی استفاده کرد (۸). هم‌اکنون تشخیص بیماری مکی بر آزمون آگلوتیناسیون، ثبوت عناصر مکمل و واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری^۴ به دنبال تلقیح داخل پوستی مالئین است (۹-۱۱). آزمون مالئیناسیون حداقل ۴۸ ساعت زمان لازم دارد و تزریق ارگانسم کشته شده برای انجام آن ممکن است باعث تولید آنتی‌بادی علیه بورخولدريا مالئی شده و منجر به مثبت شدن ناخواسته سایر آزمون‌های سرولوژیکی به ویژه آزمون ثبوت عناصر مکمل گردد. بنا به توصیه OIE، آزمون ثبوت عناصر مکمل تنها آزمون سرمی رسمی برای تشخیص مسمشه و در موارد تجارت جهانی تک‌سمی‌ها است. مطالعات مختلف نشان داده است که روش ثبوت عناصر مکمل از حساسیت ۹۵-۹۰ درصدی برای تشخیص سرمی مسمشه برخوردار بوده و

^۲ Positive Predictive Value: PPV

^۳ Negative Predictive Value: NPV

^۴ Delayed-Type Hypersensitivity: DTH

^۱ Complement fixation test: CFT



دارای قابلیت نتیجه‌دهی در کمتر از یک هفته است. به‌طور معمول سرم حیوان مبتلا به مشمشه مزمن به‌مدت طولانی از نظر پادتن ثبوت عناصر مکمل مثبت است (۱۱). از طرف دیگر، ثبوت عناصر مکمل تاحدی غیر اختصاصی و بعضاً دارای نتایج مثبت کاذب به‌دلیل واکنش متقاطع با بیماری‌هایی همچون گوروم، آنفلوآنزای اسبی و تب خونریزی پتشی است. همچنین، ثبوت عناصر مکمل را نمی‌توان در سرم‌هایی که فعالیت ضد کمپلمان دارند، بکار برد (۱۲). روش الایزای نقطه‌ای بر اساس ظهور نقطه یا لکه رنگی واضح در منطقه پوشیده‌شده از آنتی‌ژن بوده و قادر به رقابت با سایر روش‌های تشخیصی مقرون به‌صرفه است. زیرا این روش دارای حساسیت بیشتری در مقایسه با روش‌های ثبوت عناصر مکمل، هم‌اگلوتیناسیون غیرمستقیم^۱ و کانتر ایمونوالکتروفورز^۲ بوده و انجام سریع‌تر و آسان‌تر آزمایش توسط کاربر از دیگر مزایای این روش آزمایشگاهی محسوب می‌شود. همچنین عوامل بالقوه ضد کمپلمان بر روش الایزای نقطه‌ای تأثیرگذار نیستند (۱۳ و ۷).

ورما و همکاران از دات بلات الایزا جهت تشخیص مشمشه در اسب‌ها استفاده کردند. در مطالعه آنها آزمون دات بلات الایزا بر اساس تشخیص آنتی‌بادی IgG علیه آنتی‌ژن‌های بورخولدریا مالئی متصل به غشای نیتروسلولزی پوشش‌داده شده روی نوارهای پلاستیکی بود. انجام واکنش با یک سیستم آویدین-بیوتین^۳ با IgG ضد اسبی بیوتینه شده^۴ و آویدین D کونژوگه شده با HRP صورت گرفت. از تعداد ۸۱۰ سرم تست شده، تعداد ۶ مورد عفونی و ۴۸ مورد اسب حساس تشخیص داده شد. نتایج تست با آزمون‌های ثبوت عناصر مکمل، هم‌اگلوتیناسیون غیرمستقیم و کانتر ایمونوالکتروفورز مقایسه گردید. دات بلات الایزا از حساسیت بالایی برخوردار بود و نسبت به تست‌های دیگر از

جهت سرعت و سهولت و سادگی تفسیر برتری داشت. فعالیت ضدکمپلمان سرم نیز تأثیری در روند تست نداشت. از طرف دیگر می‌توانست آنتی‌بادی را در همان مراحل ابتدایی تشخیص دهد. مطالعه ورما و همکاران نشان داد که سرم‌های تست با رقت ۱:۲۰۰ جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی توصیه می‌شود (۱۳).

جان و همکاران آنتی‌ژن‌های مختلف را جهت بکارگیری در تکنیک دات الایزا برای تشخیص مشمشه استانداردسازی کردند. استانداردسازی دات الایزا با آنتی‌ژن‌های CFT، پروتئین خالص شده مالئین^۵ (PPD) و آنتی‌ژن نوترکیب غلط‌های بهینه آنتی‌ژنی به ترتیب ۱۳۱/۵۲، ۱۳۹/۹۸ و ۱۳۸/۷۲ نانوگرم را جهت پوشش‌گذاری در بستر نیتروسلولزی دات الایزا نشان داد. رقت ۱:۲۰۰ سرم‌های تست مشمشه و نیز رقت ۱:۷۰۰۰ آنتی‌بادی ثانویه (کونژوگه) توصیه شد. بررسی تست دات الایزا با آنتی‌ژن‌های ثبوت عناصر مکمل ۱۰۰ درصد حساسیت، با آنتی‌ژن نوترکیب ۹۰/۹۱ درصد حساسیت و با پروتئین خالص شده مالئین ۹۷/۴۷ درصد حساسیت را نشان داد (۱۴).

انجام روش دات بلات الایزا در مواردی که حیوان تحت آزمون مالئین بوده است باید با تأخیر صورت گیرد، زیرا انجام مالئیناسیون در حیوانات تا مدت شش هفته در نتایج الایزای نقطه‌ای تداخل ایجاد می‌کند. مقادیر کم پادتن (عیار کمتر از ۱:۱۰۰) می‌تواند در جمعیت سالم و طبیعی اسب دیده شود. تک‌سمی‌های مبتلا به عفونت طبیعی و نیز تک‌سمی‌های حساس شده (از جمله به‌دنبال آزمون مالئین) دارای عیارهای پادتنی ۱:۴۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ در آزمایش الایزای نقطه‌ای می‌باشند. ممکن است عیارهای مثبت الایزای نقطه‌ای در عرض چهار الی شش روز بعد از آلوده شدن تک‌سمی مشاهده شده و به حداکثر عیار خود

^۳ Avidin-Biotin^۴ Biotinylated anti-horse IgG^۵ Purified Protein Derivative: PPD^۱ Indirect Hemagglutination: IHA^۲ Counter Immunoelectrophoresis: CIE



تفسیر، قابلیت کاربردی صحرائی آن در مناطق آندمیک بیماری و به‌ویژه در مناطق مرزی کشور جهت شناسایی و معدوم‌سازی تک‌سمی‌های آلوده، روش کاربردی و کارآمد به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام گرفت. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بعمل می‌آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تعارض منافی ندارند.

(۱:۲۰۰۰) برسد و حداقل تا هفت هفته دوام داشته و قابلیت شناسایی داشته باشد (۱۵ و ۱۰).

نیکولز و همکاران نیز اظهار داشتند که تیتراژ نقطه‌ای برای زمان طولانی‌تری (هفته یازدهم) مثبت باقی می‌ماند. این در حالی است که تیتراژ آزمون‌های ثبوت عناصر مکمل و هم‌اگلوتیناسیون غیرمستقیم و کانتر ایمونوالکتروفورز سریع‌تر کاهش پیدا می‌کند (۱۶).

نتیجه‌گیری

کارایی آزمون‌های تشخیصی مبتنی بر سرم، به حساسیت، اختصاصیت، دقت، ارزش اخباری و قابلیت کاربردی صحرائی آنها دارد (۱۷). مطالعه ما نشان داد که روش الایزای نقطه‌ای حائز ویژگی‌های مذکور بوده و دارای بیشترین مقدار حساسیت است و به‌دلیل سرعت، سهولت

References

1. Smith ME, Gossman WG. Glanders and Melioidosis. 2019. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846298>
2. Van Zandt KE, Greer MT, Gelhaus HC. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:131.
3. Inglis TJJ, Merritt AJ. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxtron I, Schwartzman J (Eds). *Molecular Medical Microbiology*. 2nd ed. Academic Press; 2014. p. 769-91.
4. Khan AS, Sage MJ. Centers for Disease Control and Prevention. Biological and Chemical Terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2000;49(RR-4):1-26. Available from: <https://www.cdc.gov/MMwr/preview/mmwrhtml/rr4904a1.htm>
5. Renart J, Behrens MM, Fernández-Renart M, Martinez JL. 23-IMMUNOBLOTTING TECHNIQUES. In: Eleftherios D, Theodore C (Eds). *Immunoassay*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 537-54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780122147302500248>
6. Dohre SK, Kamthan A, Singh S, Alam SI, Kumar S. Identification of a new diagnostic antigen for glanders using immunoproteome analysis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2017;53:26-32.
7. Gerbig Jr DG, Fenk CJ, Goodhart AS. The Dot Blot ELISA: A Rapid & Simple Experiment to Demonstrate Antibody-Antigen Interactions. *Am Biol Teach* 2000;62(8):583-7.
8. Neubauer H, Sprague LD, Zacharia R, Tomaso H, Al Dahouk S, Wernery R, *et al*. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005;52(5):201-5.
9. Naureen A, Saqib M, Muhammad G, Hussain MH, Asi MN. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J Vet Diagn Invest* 2007;19(4):362-7.
10. Sprague LD, Zachariah R, Neubauer H, Wernery R, Joseph M, Scholz HC, *et al*. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Vet Res* 2009;5(1):32.
11. Jamooli S, Mosavari N, Assmar M. Evaluation of indirect immunofluorescence assay for the diagnosis of bacterial agent of glanders. *Iran J Med Microbiol* 2016;10(3):1-10.



12. Khan I, Wieler LH, Melzer F, Gwida M, Santana VL d. A, de Souza MMA, *et al.* Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. *Vet Rec* 2011;169(19):495.
13. Verma RD, Sharma JK, Venkateswaran KS, Batra HV. Development of an avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines. *Veterinary Microbiology* 1990;25(1):77-85.
14. John IM, Kapoor PK, Malik PK. Serodiagnosis of glanders by dot-ELISA using various antigens. *Indian J Anim Sci* 2010;80(10):1084-6.
15. Elschner MC, Scholz HC, Melzer F, Saqib M, Marten P, Rassbach A, *et al.* Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet Res* 2011;7:4.
16. Nichols WS, Nakamura RM. Agglutination and Agglutination inhibition assays. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL (Eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington: ASM Press; 1986. p. 49-56.
17. OIE. World Organization for Animal Health [OIE]. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. In Paris; 2018. Available from: <http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/>



Design and optimization of Dot-blot ELISA system using specific antigens for simple and rapid diagnosis of glanders

Sajjad Yazdansetad¹, Nader Mosavari^{2*}, Keyvan Tadayon³, Iraj Mehregan¹

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Tuberculin & Mallein, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Department of Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Short Communication Article

Received: 14 May 2019

Accepted: 10 Oct 2019

*Corresponding Author:

Nader Mosavari, Department of Tuberculin & Mallein, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
TEL: +98 9122611438
Email: nmosavari@gmail.com

ABSTRACT

Introduction

Glanders is one of the oldest contagious and dangerous zoonotic diseases manifesting ulcerative granulomatous lesions on the skin and mucous membranes. Early methods possessing desirable sensitivity and specificity is important to diagnose the disease considering the just only one case report and preventing disease by identification and eradication. The present study was aimed to design and optimize Dot-blot ELISA system using specific antigens for simple and rapid detection of glanders using equine sera samples.

Materials & Methods

Burkholderia mallei strains were cultured in nutrient broth supplemented with glycerol 4%. Whole cell antigens of bacterial strains were precipitated by trichloroacetic acid (TCA) followed by sonication method. The optimum concentrations of antigen-antibody were determined by checkerboard titration. The nitrocellulose membrane was coated by antigen, then stopped by skimmed milk as a blocker. The suspicious equine serum was added to the membrane following HRP-conjugated antibody, the signals were detected by TMB as a substrate.

Results

4 out of 90 sera samples were positive by Dot-blot ELISA. The specificity and sensitivity of the test were evaluated 96.62% and 100%, respectively. *B. mallei* culture and isolation from clinical specimens of the horses validated the test.

Conclusion

Our study showed that the Dot-blot ELISA is specific and sensitive in glanders diagnosis and it seems to be practical and efficient test due to the rapid, easy interpretation without any special tools, cost-effective and also field-friendly.

Keywords

Burkholderia mallei, glanders, Dot-blot ELISA, antibody

► Please cite this article as: Yazdansetad S, Mosavari N, Tadayon K, Mehregan I. Design and optimization of Dot-blot ELISA system using specific antigens for simple and rapid diagnosis of glanders. Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(2):15-22.