



ارزیابی کارایی پروتئین A60 باکتری مایکوباکتریوم بویس سویه BCG به عنوان پادکن تشخیصی

نفیسه شکیبا مهر^۱، نادر مصوری^۲، مهدی بابائی^۳، بهمن تبرایی^۴، ابودر عسکری^۵ و سامرند رشادی^۱

۱- آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زای دام، موسسه تحقیقاتی واکنس و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج-ایران
۲- آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زای دام، موسسه تحقیقاتی واکنس و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج-ایران،
(نویسنده مسوول: n.mosavari@rvsri.ac.ir)
۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۴- دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی
۵- بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقاتی واکنس و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج-ایران
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۰

چکیده

بیماری سل یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی است. روش‌های رایج تشخیص سل یا زمان گیر است یا از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نمی‌باشند. پادکن‌های مختلف مایکوباکتریایی در واکنش با سامانه ایمنی میزبان دخیل هستند و می‌توان از آنها برای تشخیص بیماری سل بهره جست. پادکن ۶۰، درشت مولکول و مقاوم به حرارت است که در مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد. این پادکن در طراحی سیستم‌های الیزا برای تشخیص بیماری سل استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه خالص سازی پادکن ۶۰ از سیتوپلاسم باکتری و ارزیابی و مقایسه کارایی آن با توپرکولین انسانی و استاندارد است. با کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، پادکن ۶۰ از دیگر اجزاء باکتری خالص گردید و در آگار ژل با استفاده از Anti A60، Anti BCG، ایمونودیفیوژن و باند رسوبی، تشخیص داده شد. وزن مولکولی اجزاء پادکن ۶۰ با الکتروفورز بدست آمد. با انجام کروماتوگرافی، هفت فراکسیون حاصل شد. در بررسی بلات نقطه‌ای، مشخص گردید که سیتوپلاسم و دیواره سلولی دارای پادکن ۶۰ می‌باشند. این تست نشان داد که فراکسیون یک، بیشترین شدت رنگی را ایجاد و در نتیجه بالاترین مقدار پادکن ۶۰ در این فراکسیون بود. در آگار ژل ایمونودیفیوژن نمونه سیتوپلاسم و همه فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی با Anti BCG واکنش مثبت نشان دادند و فراکسیون یک، بیشترین میزان رسوب را در بین هفت فراکسیون دیگر ایجاد نمود. وزن مولکولی اجزای پادکن ۶۰ در محدوده ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۳۸، ۶۵ و ۶۵ کیلو دالتون تشخیص داده شد. نتایج واکنش‌های حاصل از تزریق پادکن ۶۰ و توپرکولین انسانی استاندارد بیانگر تأثیر گذاری مناسب این پادکن در قیاس با توپرکولین انسانی استاندارد بود. جستجوی پادتن در سرم بیماران روشی سریع و قابل تکرار است که با حساسیت ۸۹٪ و اختصاصیت ۹۴٪ می‌تواند ماده مناسبی برای تشخیص سل باشد. با این روش می‌توان بدون مواد یا تجهیزات پیشرفته و گران قیمت، نتایج را به سرعت فراهم کرد.

واژه‌های کلیدی: پادکن ۶۰، مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، کروماتوگرافی

مقدمه

سل می‌باشد. بنابراین ردیابی IgG با استفاده از پادکن مخلوط اساس تست‌های سرولوژیک گردید (۱). با ابداع روش‌های ایمونو الکتروفورز دو جهت در حضور سرم خرگوش ایمن شده با گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم، قدم بزرگی در شناسایی آنتی مایکوباکتریوم‌ها برداشته شد. با استفاده از این تکنیک‌ها حدود ۲۰ پادکن در مایکوباکتریوم لپره^۱، ۴۰ پادکن در مایکوباکتریوم‌های لپره آموریوم^۲، اسمگماتیس^۳، سیمیه^۴ و مایکوباکتریوم پارا توبرکلوزیس^۵ مشاهده گردید و حدود ۸۶ خط رسوبی و پادکن در مایکوباکتریوم بویس^۶ و توپرکلوزیس^۷ نشان داد شد (۱۰). پادکن ۶۰ در مایکوباکتریوم بویس اندازه‌های بزرگتر از ۲/۵×۱۰^۶ دالتون دارد. همچنین نشان داده شده این پادکن‌ها مقاوم به حرارت هستند و قادرند خط رسوبی را در ژل ایمونو الکتروفورز دو جهتی بعد از ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد ایجاد کنند. به‌طور کلی پادکن‌های مقاوم به حرارت، پادکن‌های عمده مایکوباکتریایی هستند. آنها اولین ترکیباتی هستند که سنتز پادتن را بدنال ایمونیزاسیون با باکتری لیز شده القاء می‌کنند (۱۰). اولین بار، کوکیتو و ونلیندن پادکن ۶۰ را از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بویس سویه BCG تخلیص کردند. برای این

توبرکلوزیس یک مشکل بهداشت جهانی است که بوسیله یک عامل بیماری‌زای سلولی به نام مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) ایجاد می‌شود (۱۹، ۱۱). جنس مایکوباکتریوم در سال ۱۸۹۶ شناخته شد. این جنس در خانواده مایکوباکتریاسه و راسته اکتینوماستال قرار می‌گیرد و شامل دو گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و لپره است (۷). دو سال بعد مایکوباکتریوم بویس و اوپوم نیز شناخته شدند (۱۴). با شناسایی تعداد بیشتری از مایکوباکتریوم‌ها تقسیم‌بندی این جنس شکل پیچیده‌تری به خود گرفت. در سال‌های اخیر با مطالعات و تحقیقاتی که صورت گرفته است روش‌های جدید ایمونولوژیک سل طرح ریزی شده است که شاید در آینده نزدیک یکی از مؤثرترین کاربرد آزمایشگاهی جهت تشخیص سل در کشورهای جهان سوم باشد که از این جمله می‌توان به تحقیقات شارپین و همکارانش اشاره کرد که با بررسی پادکن ۵ جهت تشخیص سل ریوی به روش الیزا بر پایه اندازه‌گیری IgG سرم انجام شده است. آنها نشان دادند که بیماران مبتلا به سل حاد حامل مقادیر بالایی از IgG

1- *Mycobacterium lepraemurium*
4- *Mycobacterium avium paratuberculosis*

2- *Mycobacterium smegmatis*
5- *Mycobacterium bovis*

3- *Mycobacterium simiae*
6- *Mycobacterium tuberculosis*

باکتری، همه محیط‌ها به انکوباتور 37°C منتقل گردید. به منظور تکثیر انبوه باکتری، پرگنه‌های رشد کرده در محیط لوین اشتاین-جانسون، به محیط مایع دورست هنلی^۲ منتقل گردید. محیط کشت داده شده به مدت ۲ ماه در انکوباتور 37°C نگهداری شد.

جدا کردن توده باکتری از محیط کشت مایع

هنگامی که کشت باکتری در محیط مایع به مقدار مناسب رسید، باکتری از محیط کشت خود با عبور مایع کشت از یک کاغذ صافی جدا گردید. در این مرحله قیف شیشه‌ای روی ارلن قرار گرفت و سپس کاغذ صافی قیفی شکل داخل قیف شیشه‌ای گذاشته شد. پس از باز کردن در شیشه محیط کشت، محتویات آن به آرامی روی کاغذ صافی تخلیه شد. پس آنکه قسمت مایع به‌طور کامل از کاغذ صافی رد شد، توده باکتری سه بار با بافر فسفات‌هسته شسته شد. این عمل به‌منظور خارج نمودن مواد اضافی محیط کشت مایع از توده باکتری انجام گرفت.

تهیه باکتری لیزشده (پادگن خام)

مقدار حدود ۲۰۰ گرم از توده باکتری برداشته شد و روی کاغذ صافی در فور (ممرت آمریکا) به مدت یک ساعت در 80°C قرار گرفت تا باکتری‌ها کاملاً خشک شوند. باکتری‌های خشک شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات‌هسته با هم مخلوط گردید. سوسپانسیون باکتری موجود در لوله، به مدت ۳۰ ثانیه و با تقویت ۱۵۰-۱۰۰ kHz با فاصله زمانی ۳ دقیقه در مجاورت یخ منهدم گردید (۱۳). سپس لوله‌های حاوی سوسپانسیون سونیکه شده باکتری، به مدت ۱۵ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm و در دمای 4°C سانتریفوژ شد (سیگما، آلمان). پس از سانتریفوژ، مایع‌رویی از رسوب جدا گردید. به‌منظور جداسازی سیتوپلاسم (مایع روئی) از دیواره سلولی (رسوب پروتئین)، مایع جدا شده مجدداً در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در 4°C سانتریفوژ شد.

تغلیظ سیتوپلاسم با سولفات آمونیوم

مقدار ۵۰ گرم سولفات آمونیوم به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول حاوی سیتوپلاسم که روی شیکر (IKA، آلمان) قرار دارد به تدریج در حدود یک ساعت اضافه گردید. محلول به مدت ۶ ساعت به‌منظور ترسیب کامل در حال گردش باقی ماند. پس از ترسیب، محلول سیتوپلاسم غلیظ به مدت ۲۴ ساعت در مقابل بافر فسفات‌هسته ۰/۰۱ مولار توسط کسبه دیالیز با cut off ۳ کیلو دالتون دیالیز شد. مراحل تغلیظ و دیالیز در دمای 4°C صورت گرفت (۲۲). در ادامه مقدار پروتئین موجود در محلول مورد نظر، با استفاده از BSA به روش پروتئین سنجی Lowry تعیین شد (۱۸).

جداسازی و خالص‌سازی پروتئین A60

ستون سفارز 4B (۳×۲۰۰ cm) با بافر فسفات‌هسته ۰/۰۱ مولار pH برابر ۷/۲ به تعادل رسید. مقدار ۵ میلی‌لیتر از سیتوپلاسم غلیظ و دیالیز شده داخل ستون تزریق شد. ستون با همان بافری که به تعادل رسیده بود، شستشو گردید. با سرعت جریان در حدود ۰/۳ میلی‌لیتر در هر دقیقه، در هر لوله به مقدار ۲ میلی‌لیتر نمونه جمع‌آوری شد. کلیه مراحل

سیتوپلاسم را از انولوپ با سانتریفوژ جدا کردند. سیتوپلاسم در ایمونوالکتروفورز متقاطع مورد بررسی قرار گرفت و پادگن ۶۰ به‌عنوان نزدیکترین خط رسوبی به مبدأ معرفی شد. بنابراین Rf آن بین اجزای سیتوپلاسمی BCG کوچک‌ترین است. از آنجایی که پادگن ۶۰ بر اساس مهاجرت ایمونوالکتروفورز شناخته شده، بنابراین این روش برای پیگیری کارایی روش‌های تخلیص نیز استفاده گردید (۳). با بررسی پادگن ۶۰ با SDS-PAGE و جداسازی اجزاء پروتئینی آن و انتقال آن به کاغذ نیتروسولوز و با استفاده از پادتن منوکلونال، ترکیب ساختمانی این پادگن شناسایی شد. در آزمایش دقیق‌تر اجزای پادگن ۶۰ در الکتروفورز با ژل آکریل امید جدا و به غشاء نیترو سلولز انتقال یافتند و با پادتن‌های منوکلونال بررسی شدند که در نهایت ۴ باند مربوط به اجزای ۱۹ و ۳۵ و ۳۸ و ۴۰ کیلو دالتونی تشخیص داده شدند. این اطلاعات نشان می‌دهد که پادگن ۶۰ دارای چندین شاخص پادگنی است که با پادتن‌های منوکلونال موجود واکنش می‌دهد (۶). سرم افراد دچار سل دارای مقادیر بیشتر پادتن بر علیه پادگن ۶۰، در مقایسه با سایر ترکیبات مایکوباکتریایی هستند. پادتن‌های ضد پادگن ۶۰ می‌توانند سلول‌های BCG را آگلوتینه کنند. خاصیت پادگنی بالای این پادگن‌ها، استفاده از آن را در تشخیص بیماری مایکوباکتریایی تشویق می‌کند (۱۰). پاسخ ایمنی سلولی فاکتور عمده در مقاومت به مایکوباکتریوم‌هاست. در بررسی که روی خصوصیات ایمنی‌زایی پادگن ۶۰ انجام شد، مشاهده گردید که پادگن ۶۰ پاسخ ایمنی همورال را بیش از ایمنی سلولی القاء می‌کند و پادتن ضد پادگن ۶۰ در سرم بیماران دچار سل وجود دارد (۲،۳). در سال‌های اخیر شیوع بیماری سل در ایران و کشورهای اطراف بیشتر شده است و با توجه به بعد وسیع، بسیار بحرانی و ضرورت، تشخیص هرچه سریعتر بیماری برای اقدام درمانی سریع به یک روش تشخیص سریع که نیازمند وسایل پیچیده نباشد احساس می‌گردد. متأسفانه در کشور ایران به دلیل فراوانی عفونت با انواع مایکوباکتریوم‌ها و تزریق واکسن BCG در بدو تولد این روش از ویژگی پایینی برخوردار است. هدف این مطالعه بررسی بکارگیری روش جدید و مؤثر برای تشخیص سریع بیماری سل می‌باشد به‌طوری‌که با جستجوی پادتن با حساسیت و اختصاصیت بالا بدون مواد و یا تجهیزات پیشرفته و گران قیمت، نتایج را به سرعت بدست آورد.

مواد و روش‌ها

سوش مورد استفاده در این تحقیق BCG Working seed lot 1173 از بخش تحقیق و تولید توپرکولین و مالتین، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و در محیط‌های کریوبانک و در دمای 70°C - نگهداری گردید. ستون سفارز 4B (فارماسیا، سوئد) خریداری شد.

کشت باکتری

سویه مذکور در محیط‌های لوین اشتاین-جانسون^۱ پیرووات‌دار و گلیسرین‌دار کشت داده شد. پس از کشت

۵۰ واحدی پادگن بدست آمده در مقایسه با استاندارد بین المللی توپرکولین انسانی به صورت زیر جلدی تزریق شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت نتیجه آن قرائت گردید (۲۱).

ارزیابی کارایی پادگن ۶۰ و مقایسه آن با توپرکولین انسانی تولیدی و توپرکولین انسانی استاندارد

واحدهای پیشنهادی طبق فرانس سازمان بهداشت جهانی از پادگن ۶۰، توپرکولین انسانی تولیدی موسسه رازی و توپرکولین انسانی استاندارد تهیه شد. سپس همه رقت‌های تهیه شده به خوکیه‌های حساس با سویه گاوی و انسانی، تزریق گردید و پس از ۲۴ ساعت نتایج قرائت و با یکدیگر مقایسه شدند.

تست بی‌ضرری

مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از پادگن بدست آمده به صورت زیر جلدی به دو خوکیه هندی با وزن ۳۵۰-۲۵۰ گرم، تزریق شد و از روز شروع تزریق (روز صفر) به مدت یک هفته (روز هفتم) از نظر واکنش ناخواسته و یا کاهش وزن تحت کنترل قرار گرفتند. این تست به منظور بررسی سلامت این فراورده (از نظر توکسین و مواد شیمیایی به کار رفته در تهیه آن) انجام شد (۲۱).

نتایج و بحث

با مشاهده رشد کلنی‌های شیری رنگ میکوباکتریوم بویس سویه BCG در محیط کشت لوین اشتاین-جانسون و کشت مجدد این کلنی‌ها بر روی محیط مایع دورست هندی، این پرگنه‌ها، از سطح محیط جمع‌آوری گردید. پس از خشک شدن این پرگنه‌ها و سونیکه کردن آنها و در نهایت با استفاده از سانتریفوژ در حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر سیتوپلاسم بدست آمد و مقدار پروتئین آن، ۷/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر محاسبه شد. مقدار ۵ میلی‌لیتر سیتوپلاسم باکتری با کروماتوگرافی تفکیک گردید. با توجه به جذب نوری فراکسیون‌های خروجی از ستون کروماتوگرافی در طول موج ۲۸۰ نانومتر، ۷ پیک (فراکسیون) بدست آمد که به ترتیب F₁ تا F₇ نام‌گذاری شد. از این تعداد فراکسیون، دو فراکسیون عمده بدست آمد که اولی در ابتدای خروجی کروماتوگرافی و دیگری در مراحل آخر از ستون بدست آمد (نمودار ۱).

کروماتوگرافی در دمای ۴ °C انجام گرفت. جذب نوری نمونه‌های جمع‌آوری شده از ستون در ۲۸۰ nm به دست آمد و نمودار مربوط به آن رسم گردید.

بلات نقطه‌ای

کاغذ نیتروسولوز به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر و روی کاغذ صافی قرار داده شد تا خشک گردد. ۳۰-۴۰ میکرولیتر از فراکسیون‌های مورد نظر با فاصله مناسب روی کاغذ نیتروسولوز قرار گرفت. پس از شستشو (۳ بار هر بار ۵ دقیقه) کاغذ نیتروسولوز به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C در معرض پادتن اولیه قرار داده شد. سپس کاغذ نیتروسولوز شستشو گردید و به مدت یک ساعت در ۳۷ °C در معرض پادتن کنژوگه قرار گرفت. در نهایت، محلول سوبسترا اضافه گردید (۹،۲۰).

آگار ژل ایمنودیفیوژن

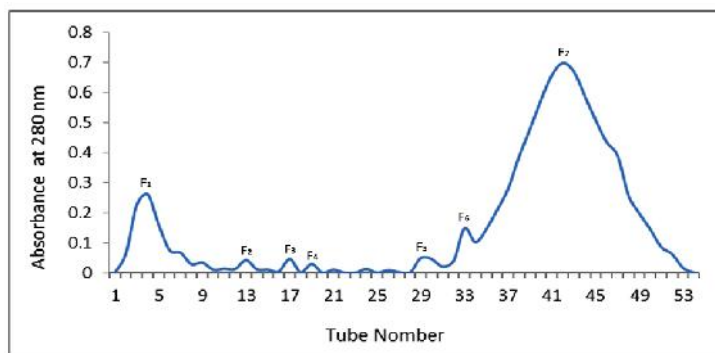
برای تهیه ژل، مقدار ۱ گرم نوبل آگار، ۸ گرم کلرید سدیم و ۰/۱ گرم سدیم آزید را در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید و توسط حرارت تا زمانی که مایع شفاف حاصل شود بخوبی حل گردید (۷/۲) (pH=) محلول به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ °C اتوکلاو شد و به میزان ۱۸ میلی‌لیتر در هر پلیت تقسیم گردید. هنگامی که ژل بسته شد گوده‌های مورد نیاز در ژل توسط پانچ به اندازه ۸ میلی‌متر ایجاد گردید. مقدار ۴۰ میکرولیتر از نمونه سیتوپلاسم با پادتن Anti A60 و پادتن Anti BCG، درون گوده‌های ژل ریخته شد و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت.

ژل الکتروفورز

الکتروفورز نمونه‌های سیتوپلاسم و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی با استفاده از روش SDS-PAGE و با ژل ۱۲ درصد (در دستگاه بيو رد، آمریکا) انجام گرفت. ژل به دست آمده با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و باندهای بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

ارزیابی ردیابی ماده‌ی مؤثره

به دو سر خوکیه هندی حساس شده توسط پیکره کشته شده میکوباکتریوم بویس BCG و میکوباکتریوم توپرکلوزیس، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های معادل ۲، ۱۰ و



نمودار ۱- ژل کروماتوگرافی سیتوپلاسم باکتری با ستون سفارز 4B
Diagram 1. Gel chromatography of bacterial cytoplasm with 4B sepharose column

فراکسیون شماره یک بیشترین لکه رنگی را به خود اختصاص می‌دهد و این نشان از وجود بالاترین مقدار پادگن ۶۰ در این فراکسیون می‌باشد. غلظت لکه رنگی به ترتیب در فراکسیون های دیگر کاهش یافت (شکل ۱: ب).

با انجام بلات نقطه‌ای، طی زمان ۱۰ تا ۲۰ دقیقه رنگ ظاهر گردید. لکه تیره رنگی که ایجاد شد، به این معنی است که هر دو جزء (سیتوپلاسم و دیواره سلولی) دارای پادگن ۶۰ می‌باشند (شکل ۱: الف).



شکل ۱- بلات نقطه از دیواره سلولی، سیتوپلاسم (الف) و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی (ب)
Figure 1. Dot blotting from the cell wall, cytoplasm (a) and fractions of chromatography (b)

نیز نمونه سیتوپلاسم و فراکسیون شماره ۱ بیشترین میزان رسوب را در بین ۷ فراکسیون دیگر ایجاد کرد (شکل ۲: ب).

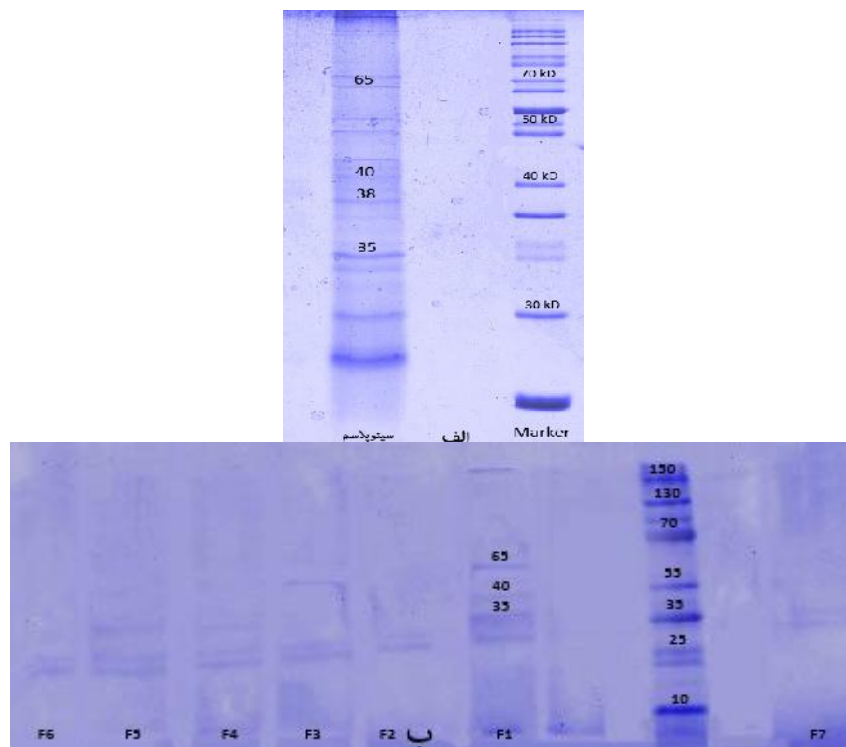
در آگار ژل ایمونودیفیوژن نمونه سیتوپلاسم و تمامی فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی با Anti BCG واکنش مثبت نشان دادند (شکل ۲: الف). در مورد Anti A60



شکل ۲- ایمونوژل دیفیوژن سیتوپلاسم و فراکسیون‌های خروجی از ستون کروماتوگرافی با استفاده آنتی BCG (الف) و آنتی A60 (ب)
Figure 1. Gel Immunodiffusion of cytoplasm and output fractions from chromatography column using anti BCG (a) and anti A60 (b).

همراه با دیگر فراکسیون‌ها در شکل ۳ (ب) به نمایش در آمده است.

با انجام الکتروفورز، نمونه پروتئین‌های سیتوپلاسم در کنار مارکر پروتئینی مشاهده شد (شکل ۳: الف). وزن‌های مولکولی باند اول مربوط به فراکسیون شماره یک (پادگن ۶۰)



شکل ۳- الکتروفورز نمونه پروتئین‌های سیتوپلاسم (الف) و فراکسیون‌های حاصل از آن (ب)
 Figure 3. Electrophoresis of the cytoplasm proteins sample (a) and its fractions (b)

توبرکلوزیس، پس از طی ۲۴ ساعت نتایج آن به صورت رؤیت
 هاله قرمز رنگ در محل تزریق مشاهده گردید (شکل ۴).

با تزریق مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از استاندارد بین المللی
 توبرکولین انسانی و پادگن A60 به دو خوکچه حساس
 شده توسط مایکوباکتریوم بویس BCG و مایکوباکتریوم



شکل ۴- تزریق پادگن ۶۰ و استاندارد توبرکولین انسانی و مشاهده نتایج تزریق به شکل هاله قرمز رنگ)
 Figure 4. Injection of antigen 60 and human tuberculin standard and observation of the injection results in the form of a red zone

می‌باشد و در نهایت در خوکچه حساس با سویه انسانی نتایج
 واکنش‌های حاصل از تزریق پادگن ۶۰ و توبرکولین انسانی
 استاندارد بیانگر تاثیرگذاری مناسب این پادگن در قیاس با
 توبرکولین انسانی استاندارد می‌باشد (جدول ۱).

بر اساس اعداد بدست آمده در خوکچه حساس با سویه
 گاوی، پادگن ۶۰ در مقایسه با توکولین انسانی استاندارد در
 رقت‌های یکسان از کارایی بالایی برخوردار است. در خوکچه
 حساس با سویه انسانی، پادگن ۶۰ در مقایسه با توکولین
 انسانی تولیدی موسسه رازی نیز از کارایی مناسبی برخوردار

جدول ۱- مشخصات و نتایج تزریق آنتی ژن ۶۰ توبرکولین انسانی ساخت موسسه رازی و توبرکولین انسانی استاندارد
Table 1. Specifications and results of injection of antigen 60 human tuberculin from the Razi institute and standard human tuberculin

نوع ماده تزریقی	نوع ماده تزریقی	رقت‌های پیشنهادی WHO			نوع ماده تزریقی	رقت‌های پیشنهادی WHO		
		۱/۳۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۵۰۰		۱/۳۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۵۰۰
حیوان حساس به ب‌ت ژ	A 60	۲۳	۱۵	۸	استاندارد	۲۰	۱۰	۸
حیوان حساس به توبرکلوزیس	A 60	۱۸	۱۰	۱۰	توبرکولین انسانی	۱۵	۱۳/۵	۱۱
حیوان حساس به توبرکلوزیس	A 60	۱۵	۱۰	۸	استاندارد	۱۵	۱۳	۷

مایکوباکتریوم بویوس می‌باشد و بیشتر اجزای مایکوباکتریوم بویوس که با سرم بیماران سلی واکنش می‌دهند، در پادگن ۶۰ موجود است (۴). جدا شدن پادگن ۶۰ در اولین فراکسیون‌های ستون سفارز 4B و نتایج مطالعات قبلی تأییدی بر وزن بالای حدود ۱۰^۶ دالتون این پادگن دارد. باندهای پروتئینی پادگن ۶۰ در ژل الکتروفورز، تفکیک گردید. با آنالیز باندها وزن‌های ۳۵، ۳۸، ۴۰ و ۶۵ کیلودالتون ظاهر شدند که این نتایج تأییدی بر درستی نتایج الکتروفورز در این تحقیق است (۱۰). در سال ۱۹۹۴، با استفاده از پادتن منوکلونال آنتی ریبوآرینومانان، حالت اسمیر در ناحیه ۳۵ تا ۴۰ کیلو دالتون مشاهده شد. این تحقیق و دیگر تحقیقات در این زمینه بیانگر وجود ترکیبات متعدد پروتئینی و لیپیدی و لیپو پروتئینی و لیپو پلی ساکاریدی در پادگن ۶۰ می‌باشد (۵،۶).

امروزه برای افزایش اختصاصیت تست سعی بر آن است که پروتئین‌هایی که در پادگن ۶۰ خاصیت پادگنیسته بیشتری دارند و اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشند (مانند پروتئین ۳۸ کیلو دالتون) را با روش‌های نو ترکیبی تهیه نمایند و برای تهیه کیت الایزا جهت تشخیص سل بکار ببرند (۱۲). اجزای پادگن ۶۰ اجزایی با رنج وزن مولکولی ۴۴-۵۶ کیلو دالتون و ۲۸-۳۵ کیلو دالتون طی بیماری سل، تولید اینترفرون گاما را القا می‌کنند و می‌توانند کاندیداهای مناسبی برای تهیه واکسن القا کننده پاسخ ایمنی محافظت کننده باشند (۱۶،۸).

تشکر و قدردانی

این کار از نظر مالی توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مورد حمایت قرار گرفت. با سپاس فراوان از تمام کارکنان موسسه رازی که در این تحقیق ما را یاری کردند

با مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از A60، در پایان ۷ روز هیچ گونه کاهش وزن یا مشکلی از نظر سلامت حیوانات مشاهده نگردید که بیانگر بی‌ضرر بودن این فراورده می‌باشد. مایکوباکتریوم‌ها بواسطه داشتن پادگن‌های متعدد با سیستم ایمنی میزبان واکنش دارند. شناسایی این پادگن‌ها نقش مهمی را در شناسایی و حفاظت علیه مایکوباکتریوم‌ها ایفا می‌کنند. از جمله پادگن‌های مایکوباکتریایی که نقش مهمی را در این پدیده ایفا می‌کنند، پادگن‌های مقاوم به حرارت می‌باشند. در تحقیقات قبلی کوکیتو و همکارانش در سال ۱۹۸۶، BCG را که از انستیتو پاستور فرانسه تهیه شده بود، در محیط دوبوس کشت دادند. نتایج حاصل از آن پژوهش مشابه تحقیق موجود می‌باشد. کوکیتو و همکارانش از ستون سفارز 6B به برای جداسازی آنتی ژن استفاده کردند که نتایج حاصل از آن با جداسازی در این تحقیق مشابه می‌باشد (۴). از آنجایی که پادگن ۶۰، سنگین‌ترین جزء سیتوپلاسم باکتری می‌باشد، جزء اولین فراکسیون‌هایی است که از ستون خارج می‌شود (۳). برای تأیید این مطلب و بررسی خلوص پادگن جدا شده، با انجام بلات نقطه‌ای از اجزاء جدا شده از ستون با استفاده از پادتن Anti A60 وجود پادگن ۶۰ در فراکسیون‌های اولیه جدا شده از ستون کروماتوگرافی تأیید گردید. ایمونوژل دیفیوژن با استفاده از Anti BCG نشان داد که در محل تلاقی پادگن با پادتن باند رسوبی ایجاد می‌شود. طبق تحقیقات قبلی پادگن ۶۰ دارای اجزای لیپیدی، پلی ساکاریدی و پروتئینی می‌باشد که هر سه جزء پادگن توانایی اتصال با پادتن‌های مربوطه را دارند و خطوط رسوبی را تشکیل می‌دهند که این مسئله در مورد اجزای لیپوپروتئینی و لیپو پلی ساکاریدی قابل توجیه است و در مورد جزء لیپید آزاد خاصیت ایمنی کمتری مشاهده می‌شود (۳). ۸۵ درصد پادتن‌های ضد مایکوباکتریایی در سرم بیماران مبتلا به سل بر علیه پادگن‌های مقاوم به حرارت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و

منابع

1. Charpin, D., H. Herbault, M.J. Gevaudan, M. Saadjian, de P. Micco, A. Arnaud, D. Vervloet and J. Charpin. 1990. Value of ELISA using A60 antigen in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 142: 380-4.
2. Cocito, C. 1987. Immunological properties of A60 of BCG induction of humoral and cellular immune reaction. *Scand J Immunol*, 25: 579-85.
3. Cocito, C. 1991. Properties of the mycobacterial antigen complex A60 and its application to the diagnosis and prognosis of TB. *Chest*, 100: 1687-93.
4. Cocito, C. and F. Vanlinden. 1986. Preparation and properties of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Exp Immunol*, 66: 262-72.
5. Cocito, C. and F. Vanlinden. 1988. Subcellular localisation and sedimentation behaviour of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Med Microbiol Immunol*, 177: 15-25.
6. Coetsier, C., M.C. Baelden, M. Coene and C. Cocito. 1994. Immunological analysis of the components of the antigen complex A60 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1: 139-144.
7. Davies, P.D.O. 1998. *Clinical Tuberculosis* Chapman and Hall. (2nd Ed.) London, UK, 55-80 pp.
8. Dupont, C., K. Thompson, C. Heuer, B. Gicquel and A. Murray. 2005. Identification and characterization of an immunogenic 22 kDa exported protein of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *J Med Microbiol*, 54: 1083-92.
9. Ferencik, M. 1993. *Hand book of Immunochemistry*, Chapman and Hall. (First Ed) New Delhi, India, 336-341.
10. Gilot, P. and M. Coene. 1994. Thermostable macromolecular antigens from mycobacteria. *Can J Microbiol*, 40: 605-11.
11. Guta, S., J. Casal, S. Napp, L. Saez, A. Garcia-Saenz, Perez, B. deVal, B. Romero, J. Alvarez and A. Alvarez. 2014. Epidemiological investigation of bovin tuberculosis herd breakdowns in Spain 2009/2011. *PLoS One*, 15: 74-81.
12. Harboe, M. and H.G. Wiker. 1992. The 38-kDa Protein of *Mycobacterium tuberculosis*: A Review. *J Infect Dis*, 166: 874-84.
13. Harris, E. and S. Angel. 1990. *Protein purification methods: A practical approach*; IRL Press at Oxford University Press. (First Ed) Oxford, pp: 200-310.
14. Hoeprich, P.D. 1983. *Infectious disease* Harper and Row. (3rd ed) Philadelphia, 122-40 pp.
15. Hubbard, R.D., C.M. Florry and C. Cocito. 1992. Immunization of mice with the Antigen A60 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin exp Immunol*, 88: 129-31.
16. Kavid, N., R. Madani, S. Hosseinkhani, N. Mosavari, F. Golchinfar, T. Emam and R. Keshavarz. 2012. Evaluation of immunogenicity of purified cell wall-associated 34 kDa antigen of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection. *Hybridoma*, 31: 163-167.
17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature*, 227: 680-685.
18. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1: 265-75.
19. Lozano, R. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380: 2095-128.
20. Raplay, R. and J. Walker. 2008. *Molecular Biomethods Hand book*. (2nd Ed) Michigan, pp: 651-60.
21. Serena, T.E. 2014. *A Global Perspective on Wound Care*, 13: 548-52.
22. Zeinali, M., M. Jammalan, S. Ardestani and N. Mosaveri. 2009. Immunological and cytotoxicological characterization of tuberculin purified protein derivative (PPD) conjugated to single-walled carbon nanotubes. *Immunology Letters*, 126: 48-53.

Evaluate the Efficiency of A60 Protein from BCG Strain of *Mycobacterium Bovis* as a Diagnostic Antigen

Nafiseh Shakibamehr¹, Nader Mosavari², Mahdi Babaie³, Bahman Tabraie⁴, Abozar Askari⁵ and Samerand Reshady¹

1- Department of Tuberculin and Mallein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute

2- Department of Tuberculin and Mallein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj (Corresponding author: n.mosavari@rvsri.ac.ir)

3- Young Researchers and Elites club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran

4- Department of Basic Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj

5- Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj

Received: January 31, 2015

Accepted: November 1, 2015

Abstract

Tuberculosis is the most common infectious diseases. Current diagnostic methods are either slow or lack enough sensitivity or specificity. Several mycobacterial antigens are involved in the complex interaction with the immune system of the host. They can be helpful for mycobacteria diagnosis. Antigen 60 (A60) is thermostable antigen found in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. This antigen, are used in ELISA systems design for diagnosis of tuberculosis. The aim of this study is purification of A60 from bacterial cytoplasm and evaluating and compare its efficiency with standard human tuberculin. With filtration chromatography, A60 were purified from other bacterial components. A60 was recognized by agar gel Immunodiffusion with anti BCG and Anti A60 antiserum, where formed immunoprecipitation line with anti BCG anti serum and anti A60 anti serum. Molecular weight components of the A60 was obtained using electrophoresis. By chromatography, seven fractions obtained. Dot blot analyzing showed that, cytoplasm and cell wall of BCG contained A60. This test showed that first fraction created maximum color intensity and as a result, the highest amount of A60 was in the fractions one. In agar gel immunodiffusion, cytoplasm sample and all fractions obtained from chromatography showed positive reaction with anti A60 anti serum and fraction one, had highest amount of sediment among the other fractions. Molecular weight components of the A60 were identified about 35, 38, 40 and 65 kD. Results of reactions from injected A60 and standard human tuberculin showed the effectiveness of this antigen in comparison with standard human tuberculin. Detection of antibody in the serum of patients is rapid and repeatable method. A60 with 89% sensitivity and 94% specificity could be an appropriate matter for the diagnosis of tuberculosis. With this method, without any advanced and expensive equipments or materials we can achieve the desired results as quickly as possible.

Keywords: Antigen 60, Chromatography, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*