دوره سیزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.47784.1690

مقایسه‌ی روش‌های الایزا، PCR و رنگ‌آمیزی ذیل نلسون مخاط رکتوم در تشخیص عفونت *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس* در گاو

مهدی زارعی[۱*]، مسعود قربانپور[۲]، سمانه تاج‌بخش[۳] و نادر مصوری[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۵

چکیده

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس عامل ایجاد بیماری یون در گاو و سایر نشخوارکنندگان است. این بیماری از جنبه‌ی شیوع از گسترده‌ترین و از لحاظ اهمیت اقتصادی از مهمترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری محسوب می‌شود. تشخیص سریع و دقیق بیماری اهمیت بسیار زیادی در پیش‌گیری از شیوع آن در گله دارد. در تحقیق حاضر، میزان فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس* در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز با سه روش PCR مخاط رکتوم، رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مخاط رکتوم و الایزای سرم خون مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های خون و مخاط رکتوم از تعداد ۲۰۰ رأس گاو جمع‌آوری گردید. الایزای سرم با استفاده از کیت‌های تجاری، رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون به روش متداول و PCR با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنی اختصاصی (*IS900* و *hspX*) *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس* انجام شد. آزمون PCR مخاط رکتوم، ۲۷ نمونه (شیوع ۱۳/۵ درصد)، رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مخاط رکتوم ۸ نمونه (شیوع ۴ درصد) و آزمون الایزای سرم تنها ۶ نمونه (شیوع ۳ درصد) را آلوده به *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس* تشخیص دادند. مقایسه‌ی نتایج این سه آزمون حاکی از میزان توافق متوسط (آماره کاپا: ۰/۴۲) بین نتایج آزمون‌های PCR رکتوم و رنگ‌آمیزی ذیل-نلسون و میزان توافق ضعیف بین آزمون‌های الایزا و PCR رکتوم (آماره کاپا: ۰/۰۸) و نیز بین آزمون‌های الایزا و رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون (آماره کاپا: ۰/۱۱) بود. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، جهت تشخیص سریع دام‌های آلوده به *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس*، اگر چه آزمون PCR مخاط رکتوم در مقایسه با سایر آزمون‌ها با نتایج بهتری همراه بود اما جهت دستیابی به نتایج دقیق‌تر در تشخیص سریع دام‌های آلوده و نیز در مطالعات اپیدمیولوژیکی به منظور تعیین میزان فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس*، انجام هم‌زمان آزمون‌های PCR مخاط رکتوم و الایزای سرم توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: یون، *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس*، ذیل نلسون

مقدمه

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس عامل ایجاد بیماری یون در گاو و سایر نشخوارکنندگان است. بیماری یون از جنبه‌ی شیوع از گسترده‌ترین و از لحاظ اهمیت اقتصادی از مهمترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری محسوب می‌شود (Douarre et al. 2010). این بیماری موجب اسهال شدید، لاغری مفرط، کاهش تولید شیر، از دست رفتن ارزش ژنتیکی، افزایش حساسیت به سایر بیماری‌ها، افزایش فاصله‌ی بین گوساله‌زایی و در نهایت حذف پیش از موعد دام می‌شود (Gonda et al. 2007). بیماری یون در سراسر اروپا شایع بوده و از طریق صادرات در بسیاری از کشورها گسترش یافته است. میزان شیوع بیماری یون در نروژ ۷/۷ درصد

[۱*] دانشیار گروه بهداشت موادغذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: zarei@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۳] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۴] استادیار بخش باکتری شناسی، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک، کرج

(Tharaldsen et al. 2003)، در فرانسه ۳/۳ درصد (Petit 2001)، در استرالیا ۱۹ درصد (Dreier et al. 2006)، در ایرلند ۲/۸۶ درصد (Good et al. 2009) و در سوئیس ۱۹/۸ درصد (Bosshard et al. 2006) گزارش شده است. در ایران طی گزارش‌های مختلف، میزان شیوع بیماری یون در نواحی مختلف بسیار متفاوت ارزیابی شده است، به عنوان مثال میزان شیوع در اصفهان ۱۱ درصد (Shahmoradi et al. 2009)، در شهرکرد ۳ درصد (Chaleshtari 2009)، در اهواز ۲ درصد (Haji Hajikolaei et al. 2006)، در ارومیه ۱/۹ درصد (Yousof-beygi et al. 2003) و در استان فارس ۶/۸ تا ۲۳ درصد (Haghkhah et al. 2008) گزارش شده است.

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* از طریق مواد غذایی آلوده و همچنین گرد و غبار آلوده می‌تواند وارد دستگاه گوارش دام شده و قسمت‌های مختلف سیستم گوارشی را آلوده کند (Eisenberg et al. 2010). همچنین به واسطه‌ی ورود به درون ماکروفاژها، به خون و بافت‌های غیرگوارشی منتقل شده و در سایر قسمت‌های بدن ایجاد آلودگی کند (Timoney et al. 1988). تشخیص سریع بیماری اهمیت بسیار زیادی در پیش‌گیری از شیوع آن در گله دارد. با وجود این که جداسازی باکتری از مدفوع یا مخاط رکتوم به عنوان روش قطعی تشخیص بیماری شناخته شده است (Blood 2000)، اما در عمل امکان انجام سریع و دقیق آن با توجه به سخت رشد بودن باکتری، حساسیت پایین روش کشت و دوره‌ی انکوباسیون ۴ الی ۶ ماهه مورد نیاز برای جداسازی باکتری، وجود ندارد؛ بنابراین به طور معمول از آزمون‌هایی نظیر PCR مخاط رکتوم، رنگ‌آمیزی ذیل– نلسون مخاط رکتوم و الایزای سرم خون برای تشخیص سریع این بیماری در دام‌های مشکوک استفاده می‌شود. همچنین در اکثر مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته جهت ارزیابی میزان شیوع این بیماری نیز، یکی از این روش‌ها مورد استفاده بوده است. تحقیق حاضر با هدف مقایسه‌ی نتایج آزمون‌های PCR مخاط رکتوم، الایزای سرم خون و رنگ‌آمیزی ذیل– نلسون مخاط رکتوم در تعیین میزان فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

طی مدت ۳ ماه با مراجعه به کشتارگاه اهواز از ۲۰۰ رأس گاو نمونه‌گیری انجام شد. روند انتخاب دام و نمونه‌برداری به صورت تصادفی انجام گرفت. از هر رأس گاو دو نمونه شامل مخاط رکتوم و نمونه‌ی خون در شرایط استریل اخذ شد. بدین ترتیب که بلافاصله بعد از کشتار و باز شدن محوطه‌ی شکمی گاو، قسمت انتهایی رکتوم به طول تقریبی ۲۰ سانتی‌متر بریده و از بدن دام خارج گردید. سپس به وسیله‌ی تیغ اسکالپل استریل بخش میانی این ناحیه باز و با کشیدن لام بر روی سطح مخاطی آن، مقداری از مخاط رکتوم تراشیده و درون یک میکروتیوب استریل ریخته شد. همچنین بلافاصله پس از باز شدن قفسه‌ی صدری لاشه، نمونه‌ی خون با استفاده از سرنگ و سرسوزن استریل از بطن چپ قلب جمع‌آوری شد و در لوله ونوجکت نگهداری شد.

سرم نمونه‌های خون با سانتریفیوژ در دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شده و تا زمان انجام آزمایش الایزا در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. حدود ۲۵۰-۲۰۰ میلی‌گرم از هر یک از نمونه‌های مخاط رکتوم جمع‌آوری شده به منظور استخراج DNA و انجام PCR جدا و در یک میکروتیوب استریل قرار داده شد و مابقی جهت رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های مخاط رکتوم تا زمان جداسازی DNA در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مخاط رکتوم بر اساس روش بیان شده توسط جمشیدیان در سال ۱۳۷۲ و Cruickshank و همکاران در سال ۱۹۷۳ انجام شد، سپس هر لام با دقت به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از عدسی ۱۰۰

میکروسکوپ نوری جهت تشخیص حضور توده‌های مقاوم به اسید باسیل یون مورد بررسی قرار گرفت.

به میکروتیوب حاوی مخاط جمع‌آوری شده از رکتوم، ۲۰۰ میکرولیتر بافر لایزکننده و ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزوده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از به هم زدن، در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، ۲۵۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشته و جهت استخراج DNA به روش متداول فنل- کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل مورد استفاده قرار گرفت. DNA استخراج شده به کمک استات سدیم و اتانول رسوب داده شد، در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید و تا زمان انجام PCR در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (Nolte et al. 1993, Sambrook and Russell 2001).

جهت انجام PCR از توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنی اختصاصی *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* یعنی *IS900* و *hspX* استفاده شد (Ellingson et al. 1998, 2005, Green et al. 1989, Miller et al. 1999). بدین ترتیب که ابتدا همه‌ی نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی *IS900* مورد بررسی قرار گرفتند و سپس جهت تأیید موارد مثبت *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس*، مجدداً PCR با بهره‌گیری از پرایمرهای اختصاصی *hspX* انجام گردید. البته نتایج این تحقیق حاکی از تطابق کامل بین هر دو PCR انجام شده بود و کلیه‌ی موارد مثبت در PCR اول (*IS900*)، در PCR دوم (*hspX*) نیز با نتیجه مثبت همراه بود. توالی پرایمرهای استفاده شده و اندازه‌ی محصولات PCR در جدول ۱ و شرایط انجام PCR در جدول ۲ آورده شده است. در پایان، محصول PCR به دست آمده با استفاده از الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. قابل ذکر است که در این مطالعه برای کنترل منفی، از آب مقطر و برای کنترل مثبت، از DNA استخراج شده از باکتری خالص *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* (تهیه شده از مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) به جای نمونه استفاده گردید.

الایزای سرم خون با استفاده از کیت الایزا (ID-Vet، فرانسه) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس*

قطعه ژنی	پرایمر	توالی	اندازه محصول
IS900	پیش‌رو	-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3′5′	۲۲۹
	معکوس	5′-AATCAACTCCAGCAGCGCGGCCTCG-3′	
hspX	پیش‌رو	5′-GACCGGCTATCTGTGGAAC-3	۲۱۱
	معکوس	5′-CTCGTCGGCTTGCACCTG-3′	

جدول ۲: برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده برای *IS900* PCR و *hspX* PCR

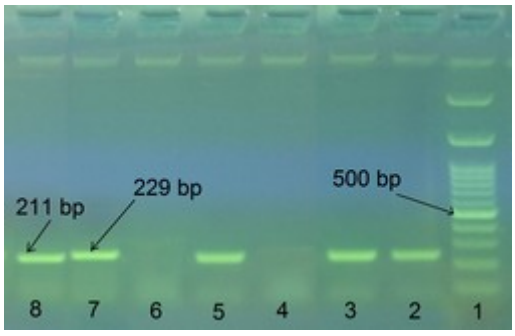
چرخه	مرحله		دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
اول	دناتوره شدن اولیه		۹۴	۱۰ دقیقه	۱
دوم	دناتوره شدن		۹۴	۱ دقیقه	۵۰
	اتصال پرایمرها	*IS900*	۶۵	۳۰ ثانیه	
		hspX	۶۰	۴۵ ثانیه	
	سنتز		۷۲	۱ دقیقه	
سوم	سنتز نهایی		۷۲	۱۰ دقیقه	۱

داده‌های حاصل از آزمون‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در ۲۰۰ رأس گاو مورد نمونه‌برداری به وسیله‌ی روش‌های تشخیصی رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون، الایزا و PCR رکتوم با در نظر گرفتن فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد محاسبه گردید. به منظور ارزیابی میزان توافق بین نتایج حاصل از آزمون‌های تشخیصی سریع بیماری از آماره کاپا استفاده گردید.

نتایج

در این تحقیق ۲۰۰ رأس گاو با وضعیت نامعلوم از نظر ابتلای به بیماری یون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون‌های تشخیصی سریع بیماری یون در جدول ۳ آورده شده است. همان‌گونه که مشخص است، نتایج آزمون PCR مخاط رکتوم حاکی از وجود ۲۷ رأس گاو آلوده به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* بود (تصویر ۱). در مقابل، نتایج رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مخاط رکتوم تنها ۸ رأس و نتایج آزمون الایزای سرم تنها ۶ رأس گاو را آلوده تشخیص داد. مقایسه‌ی نتایج آزمون‌های تشخیصی انجام شده در جدول ۴ آورده شده است. از ۲۷ رأس گاوی که نتایج PCR مخاط رکتوم آن‌ها مثبت بود، در مخاط رکتوم ۸ رأس (۲۹/۶ درصد) باکتری از طریق رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون نیز مشاهده شد و آزمون الایزای سرم ۲ رأس (۷/۴ درصد) نیز مثبت بود.

تمام ۸ رأس گاوی که با رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مخاط رکتوم، مثبت تشخیص داده شده بودند در PCR مخاط رکتوم نیز مثبت تشخیص داده شدند اما تنها یکی از این ۸ رأس (۱۲/۵ درصد)، نتیجه‌ی مثبت در آزمون الایزای سرم نشان داد. از ۶ رأس گاوی که نتیجه‌ی مثبت در آزمون الایزای سرم داشتند، در یک رأس (۱۶/۷ درصد) نتیجه‌ی رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مخاط رکتوم و در ۲ رأس (۳۳/۳ درصد) نتیجه‌ی PCR مخاط رکتوم مثبت بود. نکته‌ی قابل توجه این که تنها در یک رأس گاو نتیجه هر سه آزمون تشخیصی سریع مثبت بود.



تصویر ۱: نتایج ژل الکتروفورز محصول PCR انجام شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *IS900* و *hspX*. ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰bp، ستون ۲ و ۳: نمونه‌ی مثبت با پرایمرهای *IS900*، ستون ۴: نمونه‌ی منفی، ستون ۵: نمونه‌ی مثبت با پرایمرهای *hspX*، ستون ۶: کنترل منفی، ستون ۷: کنترل مثبت با پرایمرهای *IS900* (۲۲۹ جفت باز)، ستون ۸: کنترل مثبت با پرایمرهای *hspX* (۲۱۱ جفت باز).

جدول ۳: میزان فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز با استفاده از سه روش تشخیصی سریع

آزمون	تعداد نمونه	تعداد موارد مثبت	درصد شیوع	فاصله اطمینان ۹۵ درصد
PCR مخاط رکتوم	۲۰۰	۲۷	۱۳/۵	۸/۸–۱۸/۲
رنگ‌آمیزی مخاط رکتوم	۲۰۰	۸	۴	۱/۳–۶/۷
الایزای سرم	۲۰۰	۶	۳	۰/۷–۵/۴

جدول ۴: مقایسه‌ی نتایج آزمون‌های تشخیصی سریع بیماری یون

آزمون			الایزای سرم		PCR مخاط رکتوم		رنگ‌آمیزی مخاط رکتوم	
	نتایج	کل/ تعداد	+	–	+	–	+	–
PCR مخاط رکتوم	+	۲۷/۲۰۰					۸	۱۹
	–	۱۷۳/۲۰۰					۰	۱۷۳
الایزای سرم	+	۶/۲۰۰			۲	۴		
	–	۱۹۴/۲۰۰			۲۵	۱۶۹		
رنگ‌آمیزی مخاط رکتوم	+	۸/۲۰۰	۱	۷				
	–	۱۹۲/۲۰۰	۵	۱۸۷				

جهت سنجش میزان توافق بین نتایج آزمون‌های مختلف تشخیصی بیماری یون از آماره‌ی کاپا استفاده گردید. آماره‌ی کاپا بین دو آزمون رنگ‌آمیزی ذیل–نلسون و PCR مخاط رکتوم، ۰/۴۲ (فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد، ۰/۶۲– ۰/۲۲) محاسبه گردید همچنین میزان آماره‌ی کاپا بین دو آزمون الایزای سرم و PCR مخاط رکتوم، ۰/۰۸ (فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد، ۰/۲۲– ۰/۰) و بین دو آزمون الایزای سرم و رنگ‌آمیزی ذیل–نلسون، ۰/۱۱ (فاصله اطمینان ۹۵ درصد، ۰/۳۶– ۰/۰) محاسبه شد.

بحث

همان گونه که در بخش نتایج نشان داده شد، برآورد میزان فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در سه روش تشخیصی سریع استفاده شده در این تحقیق منتهی به ارائه سه میزان فراوانی متفاوت برای این بیماری گردید. مقایسه‌ی نتایج این سه آزمون حاکی از میزان توافق متوسط (آماره کاپا: ۰/۴۲) بین نتایج آزمون‌های PCR رکتوم و رنگ‌آمیزی ذیل– نلسون و میزان توافق ضعیف بین آزمون‌های الایزا و PCR رکتوم (آماره کاپا: ۰/۰۸) و نیز بین آزمون‌های الایزا و رنگ‌آمیزی ذیل– نلسون (آماره کاپا : ۰/۱۱) بود به طوری که از ۲۷ رأس گاوی که نتایج PCR مخاط رکتوم آن‌ها مثبت بود، تنها در مخاط رکتوم ۸ رأس (۲۹/۶ درصد) باکتری به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی ذیل– نلسون مشاهده شد. عدم مشاهده‌ی باکتری در رنگ‌آمیزی دلیل قطعی بر عدم وجود باکتری نیست چرا که لازمه‌ی رنگ-پذیری و بقای خاصیت اسیدفاست، سالم بودن باسیل و همچنین سیتوپلاسم آن است (تاج‌بخش ۱۳۶۸). از طرف دیگر به طور معمول در موارد پیشرفته‌ی بیماری، باکتری مخاطات رکتوم را آلوده می‌سازد که ممکن است منفی شدن آزمایش ذیل– نلسون مخاط رکتوم در موارد PCR

مثبت به این دلیل باشد. همچنین از ۲۷ رأس گاوی که نتایج PCR مخاط رکتوم آن‌ها مثبت بود، تنها دو مورد نتیجه‌ی مثبت در آزمون الایزای سرم نشان دادند. بر اساس نتایج مطالعات مختلف آزمون‌های سرولوژی تنها قادر به تشخیص موارد پیشرفته‌ی بیماری هستند، زیرا پاسخ ایمنی هومورال آهسته توسعه یافته و به شدت وابسته به تعداد کل مایکوباکتریوم است (Cocito et al. 1994, Mihajlovic et al. 2011). همچنین الایزا در تشخیص بیماری در دام‌های جوان و تازه آلوده شده، حساسیت کمی دارد زیرا در این دام‌ها به علت عدم تولید آنتی‌بادی، الایزا قادر به تشخیص عفونت از سرم خون آن‌ها نیست. با پیشرفت بیماری و افزایش تولید آنتی-بادی، قدرت تشخیصی الایزا نیز افزایش می‌یابد (Sweeney et al. 1995).

تمام ۸ رأس گاوی که با رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون مخاط رکتوم، مثبت تشخیص داده شده بودند در آزمون PCR مخاط رکتوم نیز به عنوان موارد مثبت مشخص شدند. این یافته با توجه به حساسیت و ویژگی آزمون PCR قابل انتظار بود. در بین این ۸ رأس تنها یک نمونه نتیجه‌ی مثبت در آزمون الایزای سرم نشان داد. از ۶ رأس گاوی که نتیجه‌ی مثبت در آزمون الایزای سرم داشتند، در یک رأس نتیجه‌ی رنگ‌آمیزی ذیل-نلسون و PCR مخاط رکتوم و در ۱ رأس فقط نتیجه‌ی PCR مخاط رکتوم مثبت مشاهده گردید. در ۴ نمونه صرفاً نتیجه‌ی الایزا مثبت بود. بر اساس نظر برخی محققین، جهت تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* به وسیله‌ی آزمون‌های سرولوژیکی نظیر الایزا، احتمال بروز واکنش متقاطع با باکتری‌های مشابه و حصول نتیجه‌ی مثبت کاذب وجود دارد (Cocito et al. 1994). یک فرضیه‌ی دیگر این است که سیر بیماری‌زایی *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* ممکن است که روند افزایشی نداشته، بلکه افزایش و کاهش متناوب در میزان باکتری و آنتی‌بادی در خون در اثر آلودگی مجدد و عود پی‌درپی صورت گیرد (Juste et al. 2005). به نظر می‌رسد که آزمون‌های تشخیصی سریع، هر کدام شکل یا مرحله‌ی متفاوتی از عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* (باکتری و آنتی‌بادی) را تشخیص می‌دهند.

حساسیت پایین و ویژگی بالای روش الایزا جهت تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در مطالعات بسیاری گزارش شده است، در این تحقیقات میزان ویژگی آزمون الایزا در محدوده‌ی ۹۷ تا ۹۹ درصد و میزان حساسیت آن در گله‌های با کشت مدفوع مثبت، کم‌تر از ۵۰ درصد (Collins 2002, McKenna et al. 2005) و در گله‌های با شیوع کم در حدود ۲۰ درصد (Mihajlovic et al. 2011) گزارش شده است. Collins و همکاران در سال ۲۰۰۵، از کیت تجاری الایزا جهت تشخیص *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در شیر، در سه آزمایشگاه مختلف استفاده کردند. آن‌ها میزان ویژگی این روش را بیش از ۹۹ درصد و میزان حساسیت آن را در حدود ۲۸ درصد بیان کردند. بر اساس مطالعات Mihajlovic و همکاران در سال ۲۰۱۱، روش PCR در تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* دارای ویژگی بالایی است و میزان حساسیت آن با پیشرفت بیماری افزایش می‌یابد.

Clark و همکاران در سال ۲۰۰۸، جهت تشخیص بیماری یون در گاو با در نظر گرفتن روش کشت مدفوع به عنوان روش قطعی تشخیص بیماری، حساسیت و ویژگی آزمون PCR مستقیم بر روی مدفوع را به ترتیب ۷۰/۲ و ۸۵/۳ درصد و حساسیت و ویژگی آزمون الایزای سرم را به ترتیب ۳۱/۳ و ۹۷/۸ درصد بیان نمودند. این محققین در مجموع آزمون PCR مدفوع را در مقایسه با الایزای سرم، روش مناسب‌تری در تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* معرفی نمودند که با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. تحقیقی توسط Juste و همکاران در سال ۲۰۰۵ جهت مقایسه‌ی توان الایزای سرم و PCR خون در تشخیص

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در ۲۷۸ گاو و ۴۹۶ گوسفند انجام گرفت. نتایج آن تحقیق نشان داد که از مجموع ۱۳۶ گاو آلوده به ارگانیسم، روش الایزای سرم، ۷۰ نمونه و روش PCR خون، ۵۶ نمونه را تشخیص داد و صرفاً ۱۰ نمونه به وسیله‌ی هر دو روش مثبت تشخیص داده شده‌اند. همچنین از مجموع ۷۴ گوسفند آلوده به ارگانیسم، روش الایزای سرم، ۱۳ نمونه و روش PCR خون، ۵۲ نمونه را تشخیص داده است و صرفاً ۹ نمونه با هر دو روش مثبت تشخیص داده شده است. این محققین بیان داشتند که در دام‌های جوان تقریباً همه‌ی موارد مثبت به وسیله‌ی PCR خون تشخیص داده می‌شود و الایزا بیش‌تر در دام‌های مسن، توان تشخیص دارد. سازمان کشاورزی آمریکا[1] نیز استفاده از PCR یا کشت مدفوع را در دام‌های با نتیجه‌ی مثبت الایزا جهت تشخیص قطعی آلودگی توصیه نموده است (Collins and Sockett 1993). Clark و همکاران در سال ۲۰۰۸ استفاده از روش PCR را به عنوان یک روش جایگزین جهت غربالگری گله برای بررسی میزان شیوع و تشخیص بیماری یون پیشنهاد کرده‌اند.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، جهت تشخیص سریع دام‌های آلوده به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس*، اگر چه آزمون PCR مخاط رکتوم در مقایسه با سایر آزمون‌ها با نتایج بهتری همراه بود اما جهت دستیابی به نتایج دقیق‌تر در تشخیص سریع دام‌های آلوده و نیز در مطالعات اپیدمیولوژیکی به منظور تعیین فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس*، انجام هم‌زمان آزمون‌های PCR مخاط رکتوم و الایزای سرم توصیه می‌گردد.

منابع

تاج‌بخش، حسن (۱۳۶۸). باکتری شناسی عمومی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحات ۹۴-۷۷، ۲۷۰، ۵۰۲.

جمشیدیان، محمود (۱۳۷۲). راهنمای تشخیص باکتریولوژی و مایکولوژی درمانگاهی دامپزشکی. تألیف: اس اس جانگ، ای ال بی برشتاین، دی سی هیرش، چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، صفحات ۲۲۳-۲۲۲.

Blood, D.C. (2000). Veterinary Medicine, 9th edition, London, Bailliere Tindall Company, Pp: 920, 923, 1099.

Bosshard, C.; Stephan, R. and Tasara, T. (2006). Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. Journal of Food Protection, 69(7): 1662-1667.

Chaleshtari, R.S. (2009). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk samples from Holstein dairy cows of Shahre Kord by PCR. Medical Laboratory Journal, 3: 15-19.

Clark, D.L.; Koziczkowski, J.J.; Radcliff, R.P.; Carlson, R.A. and Ellingson, J.L.E. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. Journal of Dairy Science, 91(7): 2620-2627.[1]

Cocito, C.; Gilot, P.; Coene, M.; De Kesel, M.; Poupart, P. and Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis, Clinical Microbiology Reviews. 7: 328-345.

Collins, M.T. and Sockett, D.C. (1993). Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. Journal of The American Veterinary Medical Association, 203(10), P: 1456.

1- United States Department of Agriculture (USDA)

Collins, M.T.; Wells, S.J.; Petrini, K.R.; Collins, J.E.; Schultz, R.D. and Whitlock, R.H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12(6): 685-692.

Collins, M.T. (2002). Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9(6): 1367-1371.

Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A. (1973). Medical Microbiology. II: The Practice of Medical Microbiology, 12th edn, Churchill Livingstone, Ltd., Edinburgh, UK.

Douarre, P.E.; Cashman, W.; Buckley, J.; Coffey, A. and O'Mahony, J.M. (2010). Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. Gut Pathogens, 2(1): 11-12.

Dreier, S.; Khol, J.L.; Stein, B.; Fuchs, K.; Gutler, S. and Baumgartner, W. (2006). Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. Journal of Veterinary Medicine Series B, Infectious Diseases and Veterinary Health, 53: 477-481.

Eisenberg, S.W.; Nielen, M.; Santema, W.; Houwers, D.J.; Heederik, D. and Koets, A.P. (2010). Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. Veterinary Microbiology, 143(2-4): 284-292.

Ellingson, J.; Anderson, J.; Koziczkowski, J.; Radcliff, R.; Sloan, S.; Allen, S. et al. (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. Journal of Food Protection, 68: 966-972.

Ellingson, J.L.; Bolin, C.A. and Stabel, J.R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosisand* application to diagnosis of paratuberculosis. Molecular and Cellular Probes, 12(3): 133-142.

Gonda, M.G.; Chang, Y.M.; Shook, G.E.; Collins, M.T. and Kirkpatrick, B.W. (2007). Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. Preventive Veterinary Medicine, 80(2): 103-119.

Good, M.; Clegg, T.; Sheridan, H.; Yearsely, D.; O'Brien, T.; Egan, J. et al. (2009). Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. Irish Veterinary Journal, 62(9): 597.

Green, E.P.; Tizard, M.L.V.; Moss, M.T.; Thompson, J.; Winterbourne, D.J.; McFadden, J.J. et al. (1989). Sequence and characteristics or IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate or *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Research, 17(22): 9063-9073.

Haghkhah, M.; Ansari-Lari, M.; Novin-Baheran, A.M. and Bahramy, A. (2008). Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. Preventive Veterinary Medicine, 86(1): 8-13.

Haji Hajikolaei, M.R.; Ghorbanpoor, M. and Solaymani, M. (2006). The prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ileocecal valve of cattle slaughtered in Ahvaz abattoir, southern Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 7(2): 77-80.

Juste, R.A.; Garrido, J.M.; Geijo, M.; Elguezabal, N.; Aduriz, G.; Atxaerandio, R. et al. (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17(4): 354-359.

McKenna, S.L.B.; Keefe, G.P.; Barkema, H.W. and Sockett, D.C. (2005). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. Veterinary Microbiology, 110(1): 105-111.

Mihajlovic, B.; Klassen, M.; Springthorpe, S.; Couture, H. and Farber, J. (2011). Assessment of sources of exposure for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in food and water. International Food Risk Analysis Journal, 1(2): 1-22.

Miller, J.M.; Jenny, A.L. and Ellingson, J.L. (1999). Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 11(5): 436-440.

Nolte, F.S.; Metchock, B.; McGowan, Jr J.E.; Edwards, A.; Okwumabua, O.; Thurmond, C. et al. (1993). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 31(7): 1777-1782.

Petit, E. (2001). Enquete serologique sur la paratuberculose bovine menee dans l'Yonne lors de la campagne 98-99 (in French, with English abstract). Epidemiologie et Sante Animale. 40: 23-39.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). In vitro mutagenesis using double-stranded DNA templates: selection of mutants with DpnI. Molecular Cloning, 2: 13-19.

Shahmoradi, A.H.; Mosavari, N.; Pajouhi, A.; Heidari, M.R.; Noamaan, V.; Nabinejad, A.R. et al. (2009). Study of John's disease in industrlal & semi industrial cattle husbandry of Esfahan province. Veterinary Researches in Pajouhesh and Sazandegi, 6: 13-17.

Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H.; Buckley, C.L. and Spencer, P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 7(4): 488-493.

Tharaldsen, J.; Djonne, B.; Fredriksen, B.; Nyberg, O. and Siguroardottir, O. (2003). The National Paratuberculosis Program in Norway. Acta Veterinaria Scandinavica. 44: 243-246.

Timoney, J.F.; Gillespie, J.A.; Scott, F.W. and Barlough, J.E. (1988). Hagan and Bruner's infectious disease of domestic animals 8th ed, Ithaca, United States: 270-289.

Yousof-Beygi, G.; Ramin, A.G. and Faraji-Vand, A.R. (2003). Study on the prevalence of subclinical cattle Johne's disease in the Urmia abattoir. Archives of Razi Institute, 55: 63-70.

Comparison of ELISA method, PCR and Ziehl-Neelsen staining of the rectal mucosa for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle

Zarei, M.[1]; Ghorbanpour, M.[2]; Tajbakhsh, S.[3] and Mosavari, N.[4]

Received: 31.01.2016 Accepted: 14.06.2016

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the etiologic agent of Johne's disease in cattle and other ruminants. This disease is considered the most extensive, in terms of incidence, and the most important disease, in terms of economic importance, in the animal husbandry industry. Rapid and accurate diagnosis of disease is extremely important in preventing the spread of disease in the herd. In the present study, the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in slaughtered cows in Ahvaz slaughterhouse was evaluated and compared using three methods, rectal scraping PCR, acid-fast staining and serum ELISA. In this study, blood and rectal scraping samples were collected from 200 cows. Serum ELISA was performed with a commercial ELISA kit, Ziehl-Neelsen staining was done based on conventional method, and PCR was performed using *IS900* and *hspX* specific primers for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Rectal scraping PCR detected 27 of 200 cows (13.5%) infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, acid-fast staining of the rectal mucosa detected 8 cows (4%), and serum ELISA detected only 6 cows (3%). Comparing the results of these three tests shows moderate agreement between acid-fast staining and rectal scraping PCR tests (kappa score, 0.42), low agreement between ELISA vs. rectal scraping PCR (kappa score, 0.08), and ELISA vs. acid-fast staining (kappa score, 0.11). According to the results of the present study, although the rectal scraping PCR showed better results in rapid diagnosis of the infected cows, but in order to achieve a more precise result for rapid diagnosis of the infected cows and also in epidemiological studies for determining the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection, simultaneous conduct of rectal scraping PCR and serum ELISA can be recommended.

Key words: Johne's disease, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Ziehl-Neelsen

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- MSc Graduated of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hessarak, Karaj, Iran
Corresponding Author: Zarei, M., E-mail: zarei@scu.ac.ir