University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 78, Number 1, 2023, 21-29

Comparison to Methods; Serum Antibody ELISA and Fecal Nested-PCR to Diagnose *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Subspecies Infection in Cattle

Ali Kolivand[1]✉, Mohammad Rahim Haji Hajikolaei[2]✉, Mohammad Nouri[2]✉, Mohammad Khosravi[3]✉, Dariush Gharibi[3]✉

[1] *Graduate from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[2] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran*

Received: *13 February 2023*, ***Accepted:*** *25 May 2023*

10.22059/jvr.2023.348764.3299 20.1001.1.20082525.1402.78.1.3.5

Abstract

BACKGROUND: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is the cause of a common disease in dairy herds. Early diagnosis of *paratuberculosis* infection can improve Johne's disease control programs.

OBJECTIVES: This study aimed to compare the sensitivity, and specificity to methods; blood serum ELISA and stool Nested-PCR for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle.

METHODS: A commercial ELISA kit was used to perform the absorbed ELISA test, which was conducted after exposing serum samples to Mycobacterium phlei antigens to limit cross-reactions. Nested-PCR test was performed using nucleotide sequences related to specific MAP gene fragments, i.e. IS900.

RESULTS: As a result of the ELISA antibodies kit, out of the total 2203 serum samples, 112 samples were positive (5.08 %) and 2091 samples were negative (94.92 %). The results of Nested-PCR tests of rectal feces showed that out of 59 cows with the positive results in serum ELISA, 47 (79.66 %) samples were positive and 12 (20.34 %) samples were negative. Moreover, out of 31 cattle with a negative result on the ELISA test, 15 (48.38%) and 16 cattle (51.62 %) had positive and negative results, respectively, on the nested PCR tests of the feces samples.

CONCLUSIONS: Due to the low sensitivity of PCR compared to ELISA, the positive and negative predictive values, and the accuracy of ELISA test, as well as the high cost and time-consuming nature of PCR and the need for more and more complex facilities than ELISA, the authors concluded that ELISA is a more suitable method for screening and epidemiological studies than PCR.

Keywords: Cattle, ELISA, Johne's, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Nested-PCR

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Mohammad Nouri, Tel/Fax: 061-33330073

How to cite this article:

Kolivand, A., Haji Hajikolaei, M. R., Nouri, M., Khosravi, M., Gharibi, D. Comparison to Methods; Serum Antibody ELISA and Fecal Nested-PCR to Diagnose *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Subspecies Infection in Cattle. J Vet Res, 2023; 78(1): 21-29. doi: 10.22059/jvr.2023.348764.3299

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequence of primers and temperature conditions of PCR reactions.
Table 2. Comparing the results of Johne's disease diagnostic tests.
Figure 1. Gel electrophoresis results of Nested-PCR product performed using IS900 specific primers. M column: bp50 gene ladder, + column: positive control, - column: negative control, 5, 4 and 2 columns: infected and positive samples, 1 and 3 columns: negative samples.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۸، شماره ۱، ۱۴۰۲، ۲۹-۲۱

مقایسه دو روش الایزای آنتی‌بادی سرم و Nested-PCR مدفوع جهت تشخیص عفونت *مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس* در گاو

علی کولیوند[۱]، محمدرحیم حاجی‌حاجیکلائی[۲]، محمد نوری[۲]، محمد خسروی[۳]، داریوش غریبی[۳]

[۱] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*
[۲] *گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*
[۳] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۴ بهمن ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۵ اردیبهشت ماه ۱۴۰۲

10.22059/jvr.2023.348764.3299 20.1001.1.20082525.1402.78.1.3.5

چکیده

زمینهٔ مطالعه: *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* عامل ایجاد بیماری شایع یون در گله‌های شیروار است. تشخیص زود هنگام عفونت پاراتوبرکلوزیس می‌تواند سبب بهبود برنامه‌های کنترلی بیماری شود.

هدف: مطالعه حاضر با هدف مقایسه حساسیت و ویژگی دو روش الایزای آنتی بادی سرم و Nested-PCR مدفوع جهت تشخیص آلودگی به *باکتری مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس* انجام شد.

روش‌کار: به منظور جستجوی پادتن ضد *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* از آزمون الایزای جذبی با استفاده از یک کیت تجاری، پس از مجاورسازی نمونه‌های سرم با آنتی‌ژن *مایکوباکتریوم فلئی* جهت کاهش واکنش‌های متقاطع انجام شد. جهت جستجوی ژنوم باکتری در مدفوع از روش Nested-PCR و با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنی اختصاصی MAP یعنی *IS900* بهره‌گیری شد.

نتایج: از مجموع ۲۲۰۳ نمونه سرمی آزمایش شده با الایزا، ۱۱۲ مورد مثبت (۵/۰۸ درصد) و ۲۰۹۱ مورد منفی (۹۴/۹۲ درصد) بود. نتایج آزمون Nested-PCR مدفوع رکتوم نشان داد از ۵۹ رأس گاو با نتیجه مثبت در الایزای سرم، ۴۷ رأس (۷۹/۶۶ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها مثبت و در ۱۲رأس (۲۰/۳۴ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها منفی بود. همچنین از ۳۱ رأس گاو با نتیجه منفی در آزمون الایزا، در ۱۵رأس (۴۸/۳۸ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها مثبت و در ۱۶رأس (۵۱/۶۲ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها منفی بود.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به حساسیت پائین PCR در مقایسه با ELISA، ارزش اخباری مثبت و منفی و صحت تست ELISA و همچنین هزینه‌بر و زمان‌بر بودن و نیاز به امکانات آزمایشگاهی بیشتر و پیچیده‌تر PCR نسبت به ELISA، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که آزمون ELISA نسبت به PCR روش مناسب‌تری برای بررسی‌های غربال‌گری و مطالعات اپیدمیولوژیک می‌باشد.

کلمات کلیدی: الایزا، گاو، *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس*، یون، Nested PCR

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *محمد نوری، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*

مقدمه

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* عامل ایجاد بیماری یون می‌باشد. این بیماری در گله‌های شیروار شیوع بالایی دارد (۱). میزبان دائمی این ارگانیسم گاو، گوسفند و دیگر نشخوارکنندگان می‌باشد (۲). راه اصلی انتقال عامل بیمای یون مدفوعی - دهانی است، باکتری از طریق مدفوع دام‌های درگیر به شکل بالینی و تحت بالینی بیماری دفع می‌شود و در تماس با آب، غذا و سرپستانک‌ها قرار می‌گیرد (۳، ۴). بیماری یون از جنبه شیوع از گسترده‌ترین و از لحاظ اهمیت اقتصادی از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری محسوب می‌شود (۵). بیماری

در کشورهای در حال توسعه آندمیک است (۶). در بسیاری از کشورها وقوع بیماری باید به مقامات بهداشتی و دامپزشکی گزارش گردد (۷، ۸). علائم بالینی بیماری پس از ۵-۲ سال آشکار می‌گردد (۹). شباهت‌های موجود در علائم بالینی و نیز علائم کالبدگشایی بیماری یون در دام‌ها و بیماری کرون در انسان، احتمال نقش داشتن بیماری فوق در ابتلا به بیماری کرون در انسان را قوت می‌بخشد (۱۰، ۱۱). کنترل پاراتوبرکلوزیس با توجه به خسارات اقتصادی و همچنین نقش آن در بیماری کرون در انسان مهم است (۱۲). تشخیص زودهنگام عفونت پاراتوبرکلوزیس امکان‌پذیر بوده و می‌تواند برنامه‌های کنترلی را تحت تأثیر قرار دهد (۱۳).

از روش‌های متفاوتی برای تشخیص بیماری و آلودگی مانند کشت مدفوع، آزمایش میکروسکوپی مدفوع یا بافت، الایزا، PCR و غیره استفاده می‌شود. حساسیت و ویژگی هر کدام از روش‌های فوق با یکدیگر متفاوت است (۱، ۳). کشت و جداسازی *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* از مدفوع، روش قطعی اثبات حضور این باکتری در گله می‌باشد و روش مناسبی برای تشخیص دام‌های آلوده متوسط یا دفع‌کننده‌های خفیف باکتری است (۱۴). از اشکالات این روش می‌توان به اشتباه در حین نمونه‌گیری، رشد سایر باکتری‌های موجود در نمونه یا آلودگی قارچی و طولانی شدن نتیجه کشت به دلیل رشد آهسته این باکتری اشاره کرد. با توجه به سیر بیماری، با پیشرفته‌تر شدن ضایعات مخاط روده، میزان دفع باکتری نیز افزایش می‌یابد. لذا آزمایش رنگ‌آمیزی مستقیم گسترش مدفوع به خصوص طی دوره‌ای که دام دچار اسهال است، به دلیل دفع بیش‌تر سلول‌های اپی‌تلیالی دارای باکتری، با ارزش است (۱۵).

برای تشخیص آلودگی و غربالگری، سرم بهترین نمونه و الایزا مطمئن‌ترین و سریع‌ترین روش می‌باشد (۱۶، ۱۷). آزمون الایزای جذبی با یک کیت تشخیص تجاری، قابل دسترس است و با استفاده از آن استاندارد شدن کار در بین آزمایشگاه‌ها آسان‌تر انجام می‌گیرد (۱۸). الایزای سرمی معمولاً به عنوان یک آزمایش سرولوژیک سریع و کم‌هزینه مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما در حیواناتی که در مرحله عفونت تحت بالینی با انتشار باکتری از طریق مدفوع به میزان کم یا متوسط هستند نیز حساسیت این روش کم (۱۵ درصد) می‌باشد (۱۹). طبق مطالعات انجام شده، واکنش زنجیره پلیمراز روش مناسبی برای تشخیص موارد تحت بالینی آلودگی به *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* می‌باشد (۲۰). محبوبیت واکنش زنجیره پلی‌مراز برای تشخیص *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* در سال‌های اخیر افزایش یافته است. این روش سریع و حساس است و می‌تواند بـرای طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌های مختلف با ویژگی بسیار بالا طراحی شود. از سوی دیگر، واکنش زنجیره پلی‌مراز بسیار حساس به حضور مواد مهارکننده در نمونه‌ها می‌باشد و در صورت استفاده مستقیم، حساسیت آن بسیار پایین خواهد بود (۲۱).

مطالعه حاضر با هدف مقایسه نتایج آزمون‌های الایزای سرم خون و Nested-PCR مدفوع جهت تشخیص آلودگی به باکتری *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکولوزیس* انجام شد.

مواد و روش کار

روش نمونه‌گیری: در مطالعه حاضر با مراجعه به یکی از گاوداری‌های صنعتی که سابقه بیماری یون در پرونده بهداشتی آن گاوداری در ۳ -۲ سال گذشته ثبت شده بود از ۲۲۰۳ رأس گاو شکم اول نمونه‌گیری شد. نمونه خون از ورید دمی با استفاده از ونوجکت در شرایط استریل اخذ شد و به آزمایشگاه ارسال شد. سرم نمونه‌های خون با سانتریفیوژ در دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شد و تا زمان انجام آزمایش الایزا در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش انجام تست الایزای سرم خون: آزمون الایزای غیر مستقیم جذبی با استفاده از کیت محصول شرکت ID.VET فرانسه، مطابق با دستورالعمل کیت، انجام شد. به صورت خلاصه، در روش الایزای جذبی به منظور حذف آنتی‌بادی‌های ضد *مایکوباکتریوم فلئی* دارای واکنش متقاطع با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس*، ابتدا مجاورسازی نمونه‌های سرم مورد آزمون با آنتی‌ژن محلول *مایکوباکتریوم فلئی* انجام می‌شود. در ادامه نمونه‌های رقیق شده همراه با کنترل‌های مثبت و منفی به گوده‌های پلیت اضافه شد و پس از ۴۵ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه و شستشو، کونژوگه به تمام گوده‌ها اضافه گردید. در نهایت، پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه و شستشو، به گوده‌ها، کروموژن - سوبسترا افزوده شد و پس از ۱۵ دقیقه و اضافه کردن محلول متوقف کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر، جذب نوری هر چاهک با دستگاه اسپکتروفتومتر الایزا (Accureader, Taiwan) خوانش گردید. جهت تفسیر برای هر نمونه، درصد S/P طبق فرمول زیر محاسبه و با توجه به دستورالعمل کیت موارد مثبت، مشکوک و منفی تفکیک شدند.

درصدS/P = [(جذب نوری کنترل مثبت - جذب نوری کنترل منفی) / (جذب نوری نمونه- جذب نوری کنترل منفی)] ×۱۰۰

به صورت تصادفی ۵۹ رأس دام الایزا مثبت و ۳۱ رأس دام منفی در آزمون الایزای سرم، حدود ۱۵-۱۰ گرم نمونه‌های مدفوع از رکتوم جمع‌آوری شده به منظور استخراج DNA و انجام Nested-PCR جدا و در یک فالکون استریل قرار داده شد. نمونه‌های مدفوع رکتوم تا زمان جداسازی DNA در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش انجام تست Nested-PCR مدفوع (استخراج DNA): با استفاده از کیت تجاری (سیناژن، ایران) استخراج DNA از مدفوع انجام شد. برای این کار طبق دستورالعمل کیت، ابتدا ۱۵۰ میلی‌گرم مدفوع را به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری انتقال داده و به آن ۲ میلی‌لیتر PBS استریل اضافه کرده سپس مدفوع رقیق شده با PBS را ۱ تا ۲ دقیقه ورتکس نموده و سپس با ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی را به یک میکروتیوب جدید انتقال داده و با ۱۳ تا ۱۴ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده سپس مایع رویی را دور ریخته، رسوب حاصل را در ۱۹۰ میکرولیتر بافر لیز GP مخلوط نموده، به آن ۱۰ میکرولیتر لیزوزیم اضافه کرده و پس از مخلوط کردن به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K به نمونه اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، در طی این مدت هر ۱۵ دقیقه نمونه به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد. ۱ میلی‌لیتر بافر لیز TNG به نمونه افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میکروتیوب حاوی نمونه را ۱ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ نموده و مایع روی رسوب در دو مرحله به شرح زیر از یک ستون فیلتر عبور داده شد: ابتدا ۶۵۰ میکرولیتر از محتوای میکروتیوب را به یک ستون فیلتر فعال شده انتقال داده و با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کرده بعد از تخلیه مایع عبور کرده از فیلتر سپس باقی نمونه را به ستون فیلتر منتقل و دوباره به مدت ۱ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه و سپس بلافاصله ۱ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و پس از تخلیه مایع عبور کرده از فیلتر ۲۵۰ میکرولیتر بافرwashing1 به ستون فیلتر اضافه نموده و پس از ۱ دقیقه نگهداری در دمای محیط به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانترفیوژ و تخلیه مایع داخل لوله جمع کننده ۲ بار شستشو با بافر washing انجام شد. در هر بار شستشو ۷۵۰ میکرولیتر بافر washing به ستون فیلتر اضافه شد و پس از ۱ دقیقه نگهداری در دمای محیط به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه بافر washing مرحله دوم، ستون فیلتر برای خشک شدن به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ستون فیلتر همراه با درپوش لوله جمع‌کننده در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر بافر Elution گرم (به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد) در آن ریخته و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. ستون فیلتر به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع خارج شده از آن به عنوان DNA تخلیص شده به یک میکروتیوب جدید انتقال داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مواد و برنامه انجام Nested-PCR: جهت انجام PCR از توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنی اختصاصی MAP یعنی *IS900* که در برخی مطالعات استفاده شده است، بهره‌گیری شد (۲۲). در تمام آزمایشات PCR از کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد. در هر واکنش، جهت کنترل منفی از آب مقطر و از DNA استخراج شده از MAP (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده شده و شرایط دمایی واکنش‌های PCR در جدول ۱ گزارش شده است.

PCR مرحله اول: برای انجام مرحله اول PCR از پرایمرهای-p90 5'-GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG 3 و p91 5'-GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC-3 استفاده شد. اجزای مورد استفاده در هر واکنش، در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون، دانمارک)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۳ میکرولیتر از هر یک از DNAهای استخراج شده و ۵ میکرولیتر آب مقطر بود. واکنشگرهای PCR روی یخ با هم مخلوط شد و بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) قرار داده شدند و برنامه حرارتی زیر استفاده گردید:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ چرخه)؛ ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه (۳۰ چرخه)؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (۱ چرخه).

جدول ۱. توالی آغازگرها و شرایط دمایی واکنش‌های PCR.

توالی هدف	نام آغازگر	توالی	شرایط دمایی واکنش	طول محصول (bp)
IS900	P90	5'-GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG-3	۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ چرخه)؛ ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه (۳۰ چرخه)؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (۱ چرخه).	۴۱۳
	P91	5'-GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC-3		
IS900 (nested)	AV1	5'-ATG TGG TTG CTG TGT TGG ATG G-3'		۲۹۸
	AV2	5'-CCG CCG CAA TCA ACT CCA G-3'		

جدول ۲. مقایسه نتایج آزمون‌های تشخیصی بیماری یون.

روش آزمایش		Nested-PCR مدفوع رکتوم		جمع کل
		موارد مثبت	موارد منفی	
الایزای سرم	موارد مثبت	۴۷	۱۲	۵۹
	موارد منفی	۱۵	۱۶	۳۱
جمع کل		۶۲	۲۸	۹۰

PCR مرحله دوم: برای انجام مرحله دوم PCR از پرایمرهای 5'-ATG TGG TTG CTG TGT TGG ATG G-3' AV1 و AV2 5'-CCG CCG CAA TCA ACT CCA G-3' استفاده شد. در این مرحله همه شرایط مانند مخلوط واکنشگرهای PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق مرحله اول بود با این تفاوت که DNA الگوی مورد استفاده شامل ۳ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول می‌باشد که به مخلوط واکنش اضافه می‌شود. در نهایت مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵درصد حاوی رنگ ایمن (سیناژن، ایران)، در کنار نردبان ژنی ۵۰bp (سیناژن، ایران) الکتروفورز شد. نمونه نتایج ژل الکتروفورز محصول Nested-PCR در تصویر ۱ نشان داده شده است.

روش آنالیز آماری: با استفاده از روش‌های آماری محاسباتی و نرم افزار اکسل آنالیز آماری داده‌ها مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت تعیین حساسیت و ویژگی از فرمول‌های زیر استفاده شد:

(تعداد موارد مثبت حقیقی + تعداد موارد منفی کاذب/ تعداد موارد مثبت حقیقی) = حساسیت

(تعداد موارد منفی حقیقی + تعداد موارد مثبت کاذب/ تعداد موارد منفی حقیقی) = ویژگی

همچنین ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی و صحت تست به روش‌های زیر محاسبه شد.

(مثبت حقیقی + مثبت کاذب)/ مثبت حقیقی = ارزش اخباری مثبت

(منفی حقیقی + منفی کاذب)/ منفی حقیقی= ارزش اخباری منفی

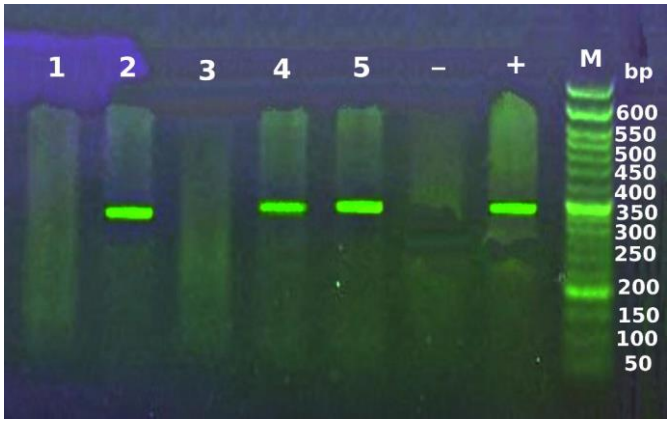
کل نمونه/ (منفی حقیقی + مثبت حقیقی) = صحت تست

نتایج

نتایج آزمون الایزا: از مجموع ۲۲۰۳ نمونه سرمی آزمایش شده با الایزا، ۱۱۲ مورد مثبت (۵/۰۸ درصد) و ۲۰۹۱ مورد منفی (۹۴/۹۲ درصد) بود.

نتایج آزمون Nested-PCR: همچنین نتایج آزمون Nested-PCR مدفوع رکتوم نشان داد از ۵۹ رأس گاو با نتیجه مثبت در آزمون الایزا، در ۴۷ رأس (۷۹/۶۶ درصد) مثبت و ۱۲رأس (۲۰/۳۴ درصد) نتایج PCR منفی بودند. همچنین از ۳۱ رأس گاو الایزا منفی در ۱۵رأس (۴۸/۳۸ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها مثبت و در ۱۶رأس (۵۱/۶۲ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها منفی بود.

حساسیت و ویژگی Nested-PCR: بر اساس نتایج حاصل حساسیت و ویژگی Nested-PCR به ترتیب ۷۵/۸ درصد و ۵۱/۶ درصد بود.



تصویر ۱. نتایج ژل الکتروفورز محصول Nested-PCR انجام شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *IS900* ستونM: نردبان ژنی ۱۰۰bp، ستون+: کنترل مثبت، ستون-: کنترل منفی، ستون ۵ و ۴ و ۲: نمونه‌های آلوده و مثبت، ستون ۳ و ۱: نمونه‌های منفی.

حساسیت و ویژگی الایزا: بر اساس نتایج حاصل حساسیت و ویژگی الایزا به ترتیب ۷۹/۶ درصد و ۵۷/۱۴ درصد بود.

ارزش اخباری مثبت و منفی: با در نظر گرفتن Nested-PCR به عنوان تست استاندارد و ارزش اخباری مثبت و منفی الایزا به ترتیب ۷۹/۶۶ و ۵۱/۶۱ درصد محاسبه گردید.

صحت تست: با توجه به تعداد موارد مثبت و منفی حقیقی صحت تست برابر با ۷۰ درصد محاسبه شد.

بحث

یون یک بیماری واگیردار بوده که گاو و دیگر نشخوارکنندگان را در بسیاری از مناطق دنیا مبتلا می‌کند. این بیماری دارای اثرات اقتصادی بر تولیدات گاوهای شیری است و امروزه، بیماری یون به صورت یکی از پرضررترین بیماری‌ها در گاوهای شیری در آمده است. کنترل مؤثر پاراتوبرکلوزیس به دلیل عدم وجود آزمایش‌های تشخیصی سریع و صحیح، دوره کمون طولانی، حضور موارد تحت‌بالینی تشخیص داده نشده و عدم وجود دانش کافی در مورد تنوع سویه‌ای MAP مشکل بوده و تفسیر نتایج آزمایشگاهی، چالش برانگیز می‌باشد (۲۳).

مسئله اصلی که استفاده از روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR را محدود کرده و حساسیت آن‌ها را کاهش می‌دهد کیفیت نامناسب DNA استخراج شده در اثر مقاومت دیواره سلولی مایکوباکتریایی و نیز حضور ممانعت کننده‌های متعدد PCR می‌باشد (۲۴) بنابراین بهینه کردن فرآیندهای استخراج DNA در این مسیر اهمیت فراوانی می‌یابد. به این منظور، آماده سازی اولیه نمونه برای به‌دست آوردن DNA با کیفیت ضروری است (۲۵). برخی از مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر نشان داده که روش PCR ساده و یک مرحله‌ای در برخی موارد قادر به تشخیص دقیق عامل عفونی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* به ویژه در شرایط مقدار کم DNA الگو نیست. به همین دلیل برای تشخیص این عامل عفونی در مطالعه حاضر از روش مطمئن‌تر و حساس‌تر Nested-PCR به دلیل توانایی جستجو و تکثیر مقادیر بسیار اندک DNA، استفاده شد. از طرفی تشخیص *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در مدفوع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا مهم‌ترین راه انتشار این باکتری، پخش مدفوع حیوانات آلوده در محیط می‌باشد. یکی از مزایای روش به‌کار رفته در مطالعه حاضر این است که، به صورت مستقیم و بدون نیاز به کشت و یا اطلاع از وضعیت بالینی و کلینیکی دام می‌توان به بررسی نمونه‌های مدفوعی گرفته شده از دام پرداخت و با اطمینان زیادی سلامت و یا آلودگی دام مربوطه را نسبت به *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* گزارش نمود. با توجه به این‌که حیوان آلوده علائم بالینی خاصی از خود بروز نمی‌دهد، لذا تشخیص سریع و دقیق این باکتری با استفاده از روش Nested-PCR اهمیت زیادی برخوردار است.

همان گونه که در بخش نتایج نشان داده شد، برآورد میزان فراوانی موارد عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در دو روش تشخیصی سریع استفاده شده در مطالعه حاضر منتهی به ارائه دو میزان فراوانی متفاوت برای این بیماری گردید. از ۵۹ رأس گاوی که نتایج الایزای سرم آن‌ها مثبت بود، ۴۷ مورد نتیجه مثبت در آزمون Nested-PCR مدفوع رکتوم را نشان دادند. بر اساس نتایج مطالعات

مختلف آزمون‌های سرولوژی تنها قادر به تشخیص موارد پیشرفته بیماری هستند، زیرا پاسخ ایمنی هومورال آهسته توسعه یافته و به شدت وابسته به تعداد کل مایکوباکتریوم می‌باشد (۲۶، ۲۷). همچنین الایزا درتشخیص بیماری در دام‌های جوان و تازه آلوده شده، حساسیت کمی دارد زیرا در این دام‌ها به علت عدم تولید آنتی بادی، الایزا قادر به تشخیص عفونت از سرم خون آن‌ها نیست؛ با پیشرفت بیماری و افزایش تولید آنتی بادی، قدرت تشخیصی الایزا نیز افزایش می‌یابد (۲۸).

بر اساس نظر برخی محققین، جهت تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* به وسیله آزمون‌های سرولوژیکی نظیر الایزا، احتمال بروز واکنش متقاطع با باکتری‌های مشابه و حصول نتیجه مثبت کاذب وجود دارد (۲۶). استفاده از الایزای جذبی در مطالعه کنونی سبب بهبود نسبی نتایج آزمون الایزا در مقایسه با PCR شده است. یک فرضیه دیگر این است که سیر بیماریزایی *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *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 (۲۹). به نظر می‌رسد که آزمون‌های تشخیصی سریع، هر کدام شکل یا مرحله متفاوتی از عفونت با *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (باکتری و آنتی بادی) را تشخیص می‌دهند. حساسیت پایین و ویژگی بالای روش الایزا جهت تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در مطالعات بسیاری گزارش شده است، در این مطالعات میزان ویژگی آزمون الایزا در محدوده ۹۷ تا ۹۹ درصد و میزان حساسیت آن در گله‌های با کشت مدفوع مثبت، کمتر از ۵۰ درصد (۳۰، ۳۱) و در گله‌های با شیوع کم در حدود ۲۰ درصد (۲۷) گزارش شده است.

بر اساس مطالعات Mihajlovic و همکاران در سال۲۰۱۱، روش PCR در تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* دارای ویژگی بالایی است و میزان حساسیت آن با پیشرفت بیماری افزایش می‌یابد (۲۷). Clark و همکاران در سال ۲۰۰۸، جهت تشخیص بیماری یون در گاو 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 (۳۲). این محققین در مجموع آزمون PCR مدفوع را در مقایسه با الایزای سرم، روش مناسب‌تری در تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* معرفی نمودند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری نهایی: در مطالعه حاضر از Nested PCR جهت ارزیابی نتایج حاصل از آزمون الایزای جذبی استفاده شد. گرچه روش کشت یک روش استاندارد برای تعیین آلودگی به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* می‌باشد ولی به‌دلیل زمان‌بر بودن و عدم تفاوت معنی‌دار بین کشت و PCR در مطالعات صورت گرفته، استفاده از PCR به عنوان یک روش جایگزین کشت برای بررسی شیوع آلودگی تشخیص بیماری یون توصیه شده است (۳۲). با توجه به دفع متناوب باکتری *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در مدفوع دام‌های آلوده، به‌نظر می‌رسد که PCR دارای نتایج منفی کاذب بالا باشد زیرا امکان ردیابی باکتری در هر مرحله از نمونه‌برداری مدفوع به‌دلیل عدم دفع مستمر حتی در دام‌های آلوده وجود ندارد. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد حساسیت PCR (۷۵/۸ درصد) در مقایسه با ELISA (۷۹/۶۶ درصد) کمتر بوده است. از طرف دیگر علاوه بر ارزش اخباری مثبت و منفی بالا (به ترتیب ۷۹/۶۶ و ۵۱/۶۱ درصد) و صحت آزمون (۷۰ درصد) ELISA و همچنین هزینه‌بر و زمان‌بر بودن و نیاز به امکانات آزمایشگاهی بیشتر و پیچیده‌تر PCR نسبت به ELISA، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که آزمون ELISA نسبت به PCR جهت بررسی‌های غربال‌گری و مطالعات اپیدمیولوژیکی مناسب‌تر بوده و پیشنهاد می‌گردد از این روش برای مشخص نمودن دام‌های آلوده به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در گاوداری‌های صنعتی استفاده گردد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که از این مطالعه در قالب تسهیلات پژوهشی حمایت نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Nielsen SS, Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. Vet Microbiol. 2008;129(3-4):217-35. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.12.011 PMID: 18255239

2. Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH, Hunter PR. Detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. Inflamm Bowel Dis. 2008;14(3):401-10. doi: 10.1002/ibd.20276 PMID: 17886288

3. Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. Vet Microbiol. 2001;79(4):311-22. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00364-3 PMID: 11267791

4. Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Bartos M, Weston RT, et al. Potential risk of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. Med Vet Entomol. 2005;19(4):360-6. doi: 10.1111/j.1365-2915.2005.00585.x PMID: 16336300

5. Douarre PE, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony JM. Isolation and detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. Gut Pathog. 2010;2(1):11. doi: 10.1186/1757-4749-2-11 PMID: 20875096

6. Wells SJ, Collins MT, Faaberg KS, Wees C, Tavornpanich S, Petrini KR, et al. Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy cattle. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(10):1125-30. doi: 10.1128/CVI.00236-06 PMID: 16928884

7. Sharma G, Jeevanandam P. Synthesis of self-assembled prismatic iron oxide nanoparticles by a novel thermal decomposition route. RSC Adv. 2013;3(1):189-200. doi: 10.1039/C2RA22004K

8. Smith RL, Grohn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, et al. A longitudinal study on the impact of *Johne's disease* status on milk production in individual cows. J Dairy Sci. 2009;92(6):2653-61. doi: 10.3168/jds.2008-1832 PMID: 19447998

9. Collins MT. Diagnosis of *paratuberculosis*. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011;27(3):581-91. doi: 10.1016/j.cvfa.2011.07.013 PMID: 22023836

10. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):489-512. doi: 10.1128/CMR.14.3.489-512.2001 PMID: 11432810

11. Klanicova B, Slana I, Roubal P, Pavlik I, Kralik P. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. Int J Food Microbiol. 2012;157(2):150-5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.021 PMID: 22591549

12. Puerto-Parada M, Arango-Sabogal JC, Pare J, Dore E, Cote G, Wellemans V, et al. Risk factors associated with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* herd status in Quebec dairy herds. Prev Vet Med. 2018;152:74-80. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.02.010 PMID: 29559108

13. Vilar AL, Santos CS, Pimenta CL, Freitas TD, Brasil AW, Clementino IJ, et al. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. Prev Vet Med. 2015;121(1-2):49-55. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.06.003 PMID: 26092721

14. Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik I. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. Int J Food Microbiol. 2008;128(2):250-7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.013 PMID: 18824269

15. Kupper J, Brandt H, Donat K, Erhardt G. Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* status of German Holstein cows tested by fecal culture. J Dairy Sci. 2012;95(5):2734-9. doi: 10.3168/jds.2011-4994 PMID: 22541503

16. Anna Rita A, Victor NN, Silvia P, Luciana P, Anastasia D, Vincenzo C. Ovine paratuberculosis: a seroprevalence study in dairy flocks reared in the marche region, Italy. Vet Med Int. 2011;2011:782875. doi: 10.4061/2011/782875 PMID: 21876850

17. Pruvot M, Forde TL, Steele J, Kutz SJ, De Buck J, van der Meer F, Orsel K. The modification and evaluation of an ELISA test for the surveillance of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in wild ruminants. BMC Vet Res. 2013;9:5. doi: 10.1186/1746-6148-9-5 PMID: 23302439

18. Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I. Detection methods for *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in milk and milk products: a review. Vet Med-Czech. 2008;53(6):283-306. doi: 10.17221/1859-VETMED

19. Chui LW, King R, Sim J. Development of an immunocapture-polymerase chain reaction assay using IgY to detect *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Can J Vet Res. 2010;74(2):102-7. PMID: 20592839

20. Munster P, Volkel I, Wemheuer W, Petschenka J, Wemheuer W, Steinbrunn C, et al. Detection of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in ileocaecal lymph nodes collected from elderly slaughter cows using a semi-nested IS900 polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 2011;154(1-2):197-201. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.033 PMID: 21775077

21. Leite TS, Mather JA. A new approach to octopuses' body pattern analysis: a framework for taxonomy and behavioral studies. Am Malacol Bull. 2008;24(1):31-41. doi: 10.4003/0740-2783-24.1.31

22. Pillai SR, Jayarao BM. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* directly from raw milk. J Dairy Sci. 2002;85(5):1052-7. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74165-9 PMID: 12086038

23. Sohal JS, Singh SV, Subhodh S, Singh AV, Singh PK, Sheoran N, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* diagnosis and strain typing--present status and future developments. Indian J Exp Biol. 2007;45(10):843-52. PMID: 17948732

24. Rapp D. DNA extraction from bovine faeces: current status and future trends. J Appl Microbiol. 2010;108(5):1485-93. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04606.x PMID: 19912432

25. Sting R, Hrubenja M, Mandl J, Seemann G, Salditt A, Waibel S. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time PCR in comparison to culture. Vet J. 2014;199(1):138-42. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.08.033 PMID: 24280588

26. Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev. 1994;7(3):328-45. doi: 10.1128/CMR.7.3.328 PMID: 7923053

27. Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe GP. Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. J Dairy Sci. 2014;97(1):299-309. doi: 10.3168/jds.2013-7101 PMID: 24239088

28. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, Spencer PA. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J Vet Diagn Invest. 1995;7(4):488-93. doi: 10.1177/104063879500700411 PMID: 8580170

29. Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezabal N, Aduriz G, Atxaerandio R, Sevilla I. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. J Vet Diagn Invest. 2005;17(4):354-9. doi: 10.1177/104063870501700409 PMID: 16130994

30. Collins MT. Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(6):1367-71. doi: 10.1128/cdli.9.6.1367-1371.2002 PMID: 12414776

31. McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW, Sockett DC. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. Vet Microbiol. 2005;110(1-2):105-11. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.07.010 PMID: 16125880

32. Clark DL Jr, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Carlson RA, Ellingson JL. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. J Dairy Sci. 2008;91(7):2620-7. doi: 10.3168/jds.2007-0902 PMID: 18565921