نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۹۴-۸۵

مقاله پژوهشی

جداسازی و تعیین هویت مولکولی *مایکوباکتریوم ایویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* از نمونه شیر گاوداریهای استان تهران

طیبه حسن سلطان سولقانی[۱]، نادر مصوری*[۲]، راضیه نظری*[۳]، کیوان تدین[۴]، محمدرضا ذوالفقاری[۵]

۱- دانش آموخته دوره دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران

۲- دانشیار، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران.

۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران.

۴- دانشیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،

۵- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱

چکیده

با توجه به شیوع بالای بیماری یون در گله های گاو در سطح کشور و مخاطرات بهداشتی و آسیب های اقتصادی ناشی از شیوع این بیماری؛ به منظور بررسی فراوانی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* مطالعه ای در گاوداریهای فعال استان تهران انجام شد. ۸۰۰۰ نمونه سرمی گاو گاوداریهای اطراف تهران با استفاده از کیت الایزای موسسه رازی غربالگری شدند. نمونه های شیر از گاوهای رآکتور شناسایی شده، برای آزمایشهای PCR-*IS900* مستقیم از نمونه شیر و کشت نمونه‌های مذکور در محیط های کشت خاص MAP (هرولداگ مایکوباکتین دار و بدون مایکوباکتین) برای جستجوی *مایکوباکتریوم ایویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* جمع آوری شد. بر روی جدایه های حاصل از کشت، آزمایش های تاییدی PCR-16srRNA و PCR-IS1311 و PCR-IS900 انجام شد. در نتیجه آزمایش الایزا سرمی ۸۰۰۰ راس گاو، ۲۵دام (۰/۳ درصد) مثبت تشخیص داده شد. از ۲۵ نمونه شیر، ۸ مورد (۰/۱ درصد) درآزمایش مستقیم PCR-IS900 مثبت شدند؛ همچنین تنها نتیجه ۳ مورد (۰/۰۴ درصد) مورد در جداسازی *مایکوباکتریوم ایویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس* از طریق کشت و آزمایشات تاییدی PCR، مثبت شد. با توجه به اینکه در مرحله تحت بالینی بیماری، انتشار باکتری در شیر دام وجود ندارد و شناسایی باکتری از طریق کشت و PCR جواب منفی کاذب می دهد، لذا برای جلوگیری از ضررهای اقتصادی در این مرحله روش الایزا با توجه به حساسیت پایین و ویژگی بالا جهت غربالگری موارد عفونی برای جداسازی دام های آلوده از گله مناسب تر می باشد و از کشت به عنوان روش استاندارد و PCR روشی با حساسیت و ویژگی بالا برای شناسایی دقیق و تایید گاوهای دفع کننده *پاراتوبرکلوزیس* می توان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: جداسازی، گاوداریهای استان تهران، *مایکوباکتریوم ایویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس*، یون

*نویسنده مسئول: نادر مصوری

آدرس: آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

پست الکترونیک: n.mosavari@rvsri.ac.ir

*نویسنده مسئول: راضیه نظری

آدرس: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران.

پست الکترونیک: nazari1102002@yahoo.com

مقدمه

بیماری یون در سرتاسر جهان توسط باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در روده حیوانات حساس به این بیماری مانند گاو، بز و گوسفند ایجاد می شود. بررسی وجود بیماری یون در گله با استفاده از نمونه های سرم، شیر یا مدفوع امکان پذیر است(۸). این بیماری را برای اولین بار دامپزشکی به نام یون در سال ۱۸۹۴ شناسایی کرد. نقش بالقوه شیر در انتقال بیماری یون از گاوهای آلوده به گوساله ها به عنوان یکی از معضلات و عوامل مهم گسترش آلودگی در داخل گله می باشد (۶). برخی از مطالعات اعتقاد دارند، که باکتری *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در بیماری کرون در انسان نقش دارد با این حال، برخی دیگر ادعا می نمایند که ارتباط مشخصی بین این دو وجود ندارد و انتقال بین انسان و دام تا کنون تایید نشده است(۳و۵و۹).

عدم وجود علائم بالینی در دام های مبتلا به یون از عواملی است که تشخیص این بیماری را دشوار می کند. دام های جوان به دلیل پیشرفت آهسته این بیماری، حداقل تا سن۱/۵ تا دو سالگی علائم بالینی را نشان نمی دهند. حیوانات آلوده می توانند سال ها با این بیماری بدون هیچ نشانه ظاهری و آشکاری زندگی کنند و در طی این مدت بیماری را بدون علائم بالینی و یا با اندک علایم بالینی از طریق شیر و مدفوع آلوده به سایر دام های گله های منتقل کنند. در فرم تحت بالینی باکتری از طریق مدفوع دام دفع می‌شود و از این طریق حیوانات جوان در بالاترین خطر ابتلا به عفونت هستند و اغلب ممکن است با این بیماری متولد شوند یا هنگام خوردن شیر از پستان آلوده به مدفوع دام به بیماری مبتلا گردند. در این مرحله می توان از طریق آزمایش الایزا و پادتن های قابل رد یابی، دام آلوده را تشخیص داد(۲و۱۷).

در مراحل پایانی بیماری، دام مبتلا دچار کاهش وزن، اسهال آبکی کف دار و پرتابی و نهایتا مرگ می شود. در مرحله بالینی گاهی قبل از بروز اسهال های شدید عامل بیماریزا از طریق شیر دفع می گردد. دفع باکتری از طریق اسهال نیز به صورت متناوب انجام می شود لذا در فرم بالینی همیشه نمی توان انتظار نتایج کشت و PCR مثبت داشت. با توجه به عدم امکان تشخیص به هنگام دام های آلوده (به علت فرم درون سلولی عامل بیماری یون) این بیماری بدون علایم خاص به سرعت در گله منتشر شده و در نتیجه با رسیدن دام های آلوده به فاز بالینی، گله متحمل خسارات بهداشتی و اقتصادی جبران ناپذیری می گردد لذا ضروری است روش های تشخیصی مناسبی بکار گرفته شود که بتواند بیماری را در مراحل اولیه تشخیص دهد و از گسترش بیش از پیش بیماری در گله و افزایش خسارات اقتصادی جلوگیری نماید(۱۷).

روشهای مرسوم برای شناسایی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* استفاده از نمونه های سرم، شیر یا مدفوع دام می باشد. آزمایش های سرمی مرسوم جهت تشخیص دام ها تست یونین، گاما اینترفرون و الایزا می باشد و به عنوان آزمایش های غربالگری استفاده می شود و نتایج مثبت حاصل را می توان با استفاده از آزمایش های رسمی مانند کشت و PCR تایید نمود(۱۲و۱۴).

در این تحقیق از روش الایزا غیرمستقیم نمونه های سرمی برای تشخیص و غربالگری بیماری *پاراتوبرکلوزیس* دام ها استفاده شد و از کشت نمونه های شیر مرتبط با همان دام هایی که تست الایزای آنها مثبت بود، در محیط های کشت هرولد اگ

(Herold's Egg yolk Medium) مایکوباکتین دار و بدون مایکوباکتین جهت جداسازی عامل و از تکنیک مولکولی *16srRNA*- PCR جهت تعیین هویت جنس *مایکوباکتریوم* و *IS1311*-PCR جهت شناسایی کمپلکس *مایکوباکتریوم ایویوم* و از *IS900*-PCR جهت تعیین هویت و تایید *مایکوباکتریوم ایویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* با توجه به ویژگی و سرعت بالا استفاده شد. این مطالعه با هدف جداسازی و تعیین هویت مولکولی *مایکوباکتریوم ایویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس* از نمونه شیر گاوداریهای استان تهران انجام گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری و آماده سازی نمونه های سرمی

۱۰سی سی خون از ورید دمی هر یک از ۸۰۰۰ راس گاو شیری اطراف استان تهران گرفته شد و به آزمایشگاه توبرکولین موسسه رازی انتقال یافت. لوله های حاوی خون با سرعت rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سرم حاصل در دمای ۲۰ -درجه سانتی گراد برای انجام آزمایش الایزا نگهداری گردید.

انجام تست الایزای نمونه های سرمی

نمونه های سرمی با استفاده از دستورالعمل کیت تشخیص آنتی بادی ضد *پاراتوبرکلوزیس* موسسه رازی که بر اساس اصول الایزای غیر مستقیم طراحی شده است، آزمایش و بررسی شد. سرم‌ها با آنتی‌ژن *مایکوباکتریوم فلئی* مخلوط و رقیق سازی گردید و سایر مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت و نتایج بوسیله‌ی دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد و سپس طبق جدول مندرج در کیت موارد مثبت، مشکوک و منفی مشخص گردید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه های شیر

پس از غربالگری اولیه سرم ۸۰۰۰ دام با آزمایشات الایزا، نمونه شیر از ۲۵ دام الایزا مثبت جهت بررسی میکروبی و مولکولی دریافت و به سردخانه بخش توبرکولین موسسه رازی انتقال یافت. ۵۰ میلی لیتر نمونه شیر در لوله فالکون با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار با دور rpm ۳۶۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و بعد از جداسازی خامه رویی، مایع رویی دور ریخته شد. خامه رویی و رسوب زیرین، هر کدام به منزله نمونه مجزا مراحل آلودگی زدایی را طی نمودند. آلودگی زدایی با سود نرمال و خنثی سازی با اسید کلریدریک انجام و سپس مجدداً سانتریفوژ نمونه ها انجام شد.

کشت نمونه های شیر

۰/۱ میلی لیتر از رسوب هر نمونه در محیط کشت هرولداگ مایکوباکتین دار و فاقد مایکوباکتین تلقیح و محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد.

استخراج DNA از نمونه های شیر

از نمونه‌های شیر به صورت مستقیم استخراج DNA و *IS900*-PCR با استفاده از پرایمرهای جدول شماره -۱ انجام پذیرفت . به منظور غیرفعال شدن باکتری، رسوب نمونه‌های شیر در دمای ۸۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام و اندازه گیری کیفی DNA با ژل آگارز ۱٪ و الکتروفورز و اندازه گیری کمی DNA با دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد.

بررسی هویت مولکولی جدایه ها

پس از استخراج DNA، جهت تعیین هویت مولکولی جدایه‌های حاصل از کشت نمونه‌های شیر، به ترتیب از چندین واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

مربوط به لوکوس‌های *16srRNA Long*-*IS900,IS1311*, که در جدول شماره-۱ آمده است استفاده گردید.

جدول شماره ۱-تعیین هویت مولکولی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس*

جایگاه ژنی	پرایمر	توالی پرایمر	سایز(جفت بازی)	دمای اتصال	مرجع
16srRNA	*16srRNA* Long F *16srRNA* Long R	5'- TAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGG - 3' 5'-ACTTCG TCCCAATCGCCG ATCCCACC - 3'	1436	60°c/1min	(Huard,2003)
IS1311	*IS1311* F *IS1311* R	5'-GCGTGAGGCTCTGTGGTGAA -3' 5'- ATGACGACCGCTTGGGAGAC -3'	608	60°c/40s	(Shin, 2010)
IS900	*IS900* F *IS900* R	5'-TTCTTGAAGGGTGTTCGGGGCC-3' 5'-GCGATGATCGCAGCGTCTTTGG-3'	560	64°c /45s	(Slana,2009)

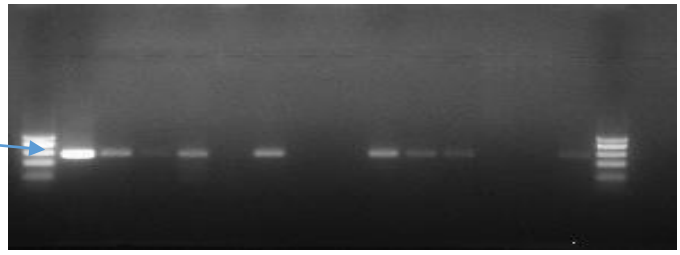
بهینه سازی دمای اتصال واکنش‌ها با استفاده از PCR گرادیانت صورت گرفت. در تمامی واکنشهای PCR، از مخلوط PCR شرکت ویراژن استفاده شد، سپس به آن ۱میکرولیتر از هر پرایمر (به غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر) و۲میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده (۲۰-۱۵ نانوگرم در میکرولیتر) و نهایتاً ۴ میکرولیتر آب مقطر اضافه و واکنش PCR با برنامه حرارتی واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای۹۵ درجه، واسرشت به مدت ۱ دقیقه در دمای۹۵ درجه و اتصال با توجه به دماهای اختصاصی هر پرایمر (مطابق جدول شماره ۱)، با مدت زمان مشخص انجام شد. طویل شدن در دمای ۷۲ درجه برای ژن *16srRNA* Long به مدت۹۰ ثانیه و برای سایر ژنها ۶۰ ثانیه در ۳۵ سیکل و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. در این تحقیق از سویه III&V (*مایکوباکتریوم ایویوم* تحت گونه *پارا توبرکلوزیس*) موسسه رازی به عنوان کنترل مثبت و محصول PCR ژنهای مختلف جدایه ها بر روی ژل آگارز۱ درصد حاوی Safe stain الکتروفورز انجام و نتایج بررسی گردید.

نتایج

۲۵ نمونه (۰/۳ درصد) از ۸۰۰۰ نمونه سرمی جمع آوری شده از گاوداریهای استان تهران، با استفاده از کیت الایزای موسسه رازی مثبت تشخیص داده شد.

طبق راهنمای بررسی نتایج کیت الایزای موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، OD بیش از ۰/۷ مثبت و OD کمتر از ۰/۲۵ منفی گزارش می شود.

۸ نمونه(۰/۱ درصد) از ۲۵ نمونه شیر دام های غربال شده با روش الایزا، با آزمایش مستقیم IS900–PCR شیر (با مشاهده قطعه ۵۶۰ جفت بازی) مثبت تشخیص داده شد(شکل شماره ۱).



شکل شماره۱-PCR*IS900* نمونه های شیر-ستون ۱و ۱۶.سایز مارکر ۲۰۰ جفت بازی (ساخت موسسه رازی)-ستون۲.کنترل مثبت- ستون -۱۷ .کنترل منفی -ستون ۳ تا ستون۱۵.نمونه های شیر

در نتیجه کشت ۲۵ نمونه شیر مذکور بر روی محیط کشت هرولداگ مایکوباکتین دار و بدون مایکوباکتین تعداد ۳جدایه (۰/۰۴درصد) بدست آمد که توسط رنگ آمیزی زیل نلسون باسیل اسید فست مورد تایید قرار گرفت. با استفاده از PCR-*16srRNA* long Huard و مشاهده قطعه ۱۴۳۶ جفت بازی جنس *مایکوباکتریوم* تایید شد و با استفاده از PCR -*IS1311* و مشاهده قطعه ۶۰۸ جفت بازی تعلق ۳ جدایه مذکور به *کمپلکس ایویوم* تایید شد. مشاهده قطعه ۵۶۰ جفت بازی در PCR *IS900* نشان دهنده وجود *مایکوباکتریوم ایویوم تحت گونه پارا توبرکلوزیس* بود. این ۳ جدایه که در نتیجه کشت مثبت گزارش شد در PCR *IS900* مستقیم از شیر نیز مثبت بودند.

بحث

با توجه به ضرر اقتصادی که بیماری یون در گله های گاو و گوسفند و بز ایجاد می کند و با توجه به ساختار باکتری عامل یون که درون سلولی می باشد ضروری است از روشهای سریع شناسایی مانند الایزا جهت غربالگری دام های آلوده گله، برای جلوگیری از گسترش بیماری و ضرر اقتصادی ناشی از آن بهره جست و از روشهای استاندارد طلایی مانند کشت و تعیین هویت مولکولی با استفاده از PCR برای تایید عامل بیماری استفاده کرد(۱۲). کشت روشی استاندارد و طلایی برای تشخیص باکتری می باشد و همچنین به دلیل تعداد زیاد کپی های *IS900* و اختصاصی بودن پرایمرهای مربوطه در تشخیص بیماری یون می توان از مارکر مذکور جهت شناسایی و تعیین هویت *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* بهره برد که یک نشانگر ژنتیکی قابل اعتماد است(۲۰). لیکن با توجه به اینکه کشت و PCR در مراحل کمون بیماری و تحت بالینی منفی میگردند لذا الزامی است تا غربالگری با تست های مناسبتری مانند گاما اینترفرون یا الایزا انجام پذیرد.

همچنین با توجه به ارتباط احتمالی باکتری عامل بیماری یون در دام و بیماری کرون در انسان، لزوم توجه بیشتر در این مورد احساس می شود. همچنین مقاومت نسبتاً بالای این باکتری به تیمارهای حرارتی و ویژگی درون سلولی بودن آن منجر به بقای بیشتر این باکتری در جریان پاستوریزه کردن شیر می گردد و در صورت مصرف شیر فله، پیامدهای جبران ناپذیری را به همراه خواهد داشت که بایستی مورد توجه محققین به خصوص در زمینه بهداشت عمومی قرار گیرد(۱۷).

در این مطالعه نیز از نمونه سرمی ۸۰۰۰ رأس گاو مورد مطالعه، توسط آزمایش الایزا ۲۵ مورد مثبت مشاهده شد که نشان دهنده وجود عفونت سرمی در مرحله تحت بالینی می باشد. به دلیل حساسیت پایین (حدود ۵۰درصد)(کیت یون موسسه رازی) آزمون الایزا در مورد تشخیص *مایکوباکتریوم* ها و باکتری های درون سلولی که از دسترس سیستم ایمنی فرار می کنند، احتمالاً تعداد واقعی دامهای مبتلا بیشتر از این تعداد

می باشد، ولی تعدادی از دام های آلوده در این مرحله، به دلیل عدم تکامل پاسخ ایمنی هومورال تولید آنتی بادی با قابلیت تشخیص توسط الایزا را ندارند. عدم تشخیص توسط آزمایشات سرمی به این دلیل است که پاسخ ایمنی به *MAP* با واسطه سلولی آغاز می شود و با ایمنی هومورال ادامه می یابد. بنابراین در مراحل اولیه عفونت هنوز آنتی بادی کافی برای ایجاد موارد مثبت الایزا وجود ندارد با این وجود الایزا با حساسیت پایین و ویژگی بالا، سرعت و قیمت مناسب و سهولت نمونه گیری، آزمون غربالگری مطلوبی برای تشخیص *پاراتوبرکلوزیس* در مقایسه با تستهای پرهزینه ای نظیر گاما اینترفرون می باشد.

هر چند که بررسی شیوع واقعی بیماری به دلیل اینکه روشهای تشخیص بیماری از حساسیت بالایی برخوردار نبوده و روشهای نمونه گیری و آزمایش در کشورهای مختلف متفاوت است، بسیار مشکل میباشد. با این وجود طبق گزارش های مرکز سلامت حیوانات مینه سوتا امریکا تشخیص یون با استفاده از نمونه های سرم، شیر یا مدفوع امکان پذیر است. برای تعیین وجود این بیماری در گله می توان از آزمایش های غربالگری استفاده کرد. آزمایش الایزا روی شیر یا سرم می تواند به عنوان آزمایش غربالگری استفاده شود. نتایج مثبت آزمایش را می توان با استفاده از آزمایش های رسمی مانند کشت مدفوع یا PCR تأیید کرد. نتایج منفی مدفوع همیشه قابل اعتماد نیست، زیرا برخی از حیوانات آلوده به طور نامنظم بیماری را دفع می کنند یا اصلاً این بیماری را دفع نمی کنند. کالبدگشایی یک حیوان مرده می تواند *پاراتوبرکلوریس* را در روده شناسایی کند و آن را از طریق هیستوپاتولوژی یا بررسی میکروسکوپی بافت تأیید کند(Minne sota Board of Animal Helth).

در مطالعه بدیعی که بر روی شیر بالک تانک گله انجام پذیرفته بود و چهار روش PCR و کشت و الایزا و مشاهده مستقیم از لام را با یکدیگر مقایسه نمود نشان داد درصد موارد مثبت شناسایی شده با روش الایزا از کشت بیشتر بوده و با وجود اینکه کشت روش استاندارد طلایی می باشد ولی درصد موارد مثبت کمتر می باشد(۴).

همچنین در مطالعه شیوع سرمی فرم تحت بالینی بیماری یون توسط حیدرنژاد و همکاران از میان ۳۳۸ نمونه سرمی و مدفوع، میزان شیوع بیماری برحسب الایزا ۹/۵درصد و بر اساس کشت ۳/۶ درصد و همچنین میزان شیوع گله ای بیماری و بر اساس الایزا ۱۴/۵۷ درصد و بر اساس کشت ۲۸/۶ درصد محاسبه شد (۱۳).

مطالعه حاتمی فر و مصوری برای طراحی سیستم الیزای غیرمستقیم با استفاده از پادگنهای ترشحی *مایکوباکتریوم آویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* به این نتیجه رسید برای تشخیص پاراتوبرکلوزیس پادگنهای ترشحی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* حساسیت لازم را جهت تشخیص بیماری ایجاد میکنند، اما تشخیص باکتری از مدفوع در مراحل اولیه بیماری، مشکل است. بنابراین با استفاده از الایزای غیرمستقیم طراحی شده می توان پادتن را در مراحل اولیه بیماری ردیابی کرد(۱۲).

در عربستان ۶۸۷ نمونه سرم و مدفوع از گاوهای شیری یک، دو، چهار و شش ساله سه گاوداری که از نظر جغرافیایی متفاوت بودند جمع آوری شد. از آزمون PCRفقط برای آزمایش ۶۲ نمونه ELISA منفی استفاده شد. این مطالعه به طور قطعی وجود این بیماری را در گله های لبنی عربستان سعودی نشان داده و اثربخشی تست های ELISA و PCR را در آشکارسازی عفونت MAP در مرحله تحت بالینی تایید کرده است(۱).

مطاللعه ای در دانمارک بروی شیر مخزن ۹۰۰ گله از ۶ ناحیه کشور دانمارک به وسیله تست الایزا نشان داد ۷۰ درصد این گله ها آلوده بودند(۱۵).

در بررسی شیر مخزن گله ها در کشور امریکا نتایج حاصل از الایزا و کشت مدفوع گاوها را با نتایج حاصل از PCR و کشت شیر مخزن گله ها مورد مقایسه قرار دادند، نتایج بررسی ها نشان دادگله های الایزا مثبتی که کشت مدفوع گاوها درآنها منفی می باشد امکان آلودگی شیر آنها به باکتری *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* وجود دارد(۱۸).

در پژوهش حاضر میزان شناسایی موارد مثبت با آزمون الایزا بیشتر از موارد مثبت کشت شیر و PCR مشاهده شد، تعداد موارد مثبت PCR-*IS900* مستقیم از شیر ۸ مورد و تعداد موارد مثبت از کشت نمونه های شیر ۳ مورد بود که با آزمایشهای PCR-*16srRNA* جنس *مایکوباکتریوم* و با PCR-*IS1311* کمپلکس *ایویوم* و با PCR-*IS900* وجود *مایکوباکتریوم ایویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* تایید شد. علت احتمالی پایین بودن نتایج مثبت در کشت شیر، می تواند بدلیل دفع متناوب باکتری در شیر و یا تعداد پایین باکتری دفع شده باشد. یکی از محدودیت های اصلی کشت شیر که در مطالعات متعددی به آن اشاره شده است، حساسیت پایین در فرم بالینی بیماری میباشد که محدوده متفاوتی را در این مطالعات در بر می گیرد. در مرحله تحت بالینی و دوره کمون بیماری یون معمولاً کشت و PCR مثبت نمی شود(۱۶). در مطالعاتی متعدد گزارش‌های متفاوتی از تعداد باکتری مورد نیاز جهت مثبت شدن PCR و کشت ذکر شده است. طبق مطالعات گیس و همکاران در سال ۲۰۰۰ کشت میکروبی توانایی تشخیص باکتری در حدو 1000 CFU/ml را دارد، بنابراین اگر تعداد پارتیکل باکتری در نمونه ای کافی نباشد نتیجه کشت میکروبی مثبت بدست نمی آید. در نتیجه حساسیت کشت نسبت به PCR پایین تر قرار می گیرد زیرا با مقادیر کم DNA استخراج شده نیز PCR مثبت گزارش شده است، لیکن در آزمون PCR نیز می بایستی مقدار DNA هدف در حدی باشد که در محدوده مناسب جهت آزمون PCR قرار بگیرد که معمولا در حدود ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر می باشد (۱۰).

بر اساس نتایج مطالعات تیلور و همکاران چنانچه تعداد پارتیکل باکتری 200-300 CFU/ml در شیر پاستوریزه باشد نتایج کشت و PCR مثبت بدست می‌آید(۱۱و۱۹) طبق مطالعه پیلای و همکاران از دانشگاه پنسیلوانیای آمریکا نشان داده شد که اگر آلودگی به باکتری در نمونه در حدودد 100CFU/ml باشد، حساسیت PCR- *IS900* کامل و ۱۰۰٪ است. در صورتی که اگر آلودگی به باکتری در نمونه ها درحدود 10CFU/ml باشد، حساسیت پایین تر و در حدود ۵۰٪ است (۱۶).

به نظر می رسد علت کم شدن موارد مثبت PCR نسبت به الایزا بدلیل عدم دفع باکتری در مراحل اولیه بیماری در دوره کمون و فرم تحت بالینی بیماری و متناوب دفع شدن عامل در فرم های کلینیکی بوده و همین طور تعداد کمتر موارد مثبت کشت نسبت به PCR بدلیل حضور تعداد کم باکتری زنده در نمونه های شیر مورد استفاده می‌باشد زیرا آزمون PCR چه در فرم زنده و یا مرده باکتری نتیجه مثبت داده ولی کشت تنها در تعداد بیش از10-100 CFU/ml و مشروط به زنده مانی باکتری جواب مثبت می دهد.

در نهایت با توجه به وجود آلودگی تحت بالینی در گاوداریها و دوره کمون طولانی، این بیماری اغلب تا سال ها پس از عفونت اولیه در گله قابل تشخیص نیست که به آن اثر "نوک کوه یخ" گفته می شود و هر دام

آلوده می تواند تعداد زیادی دام دیگر را آلوده نماید و گوساله ها بیشترین ابتلا را از طریق آلوده شدن به MAP دارند، زیرا گاوها غالباً تا پنج سالگی علایم بالینی بیماری را نشان نمی‌دهند، بنابراین هر چه سریعتر بایستی دام های آلوده شناسایی و جداسازی شوند(۷). در نتیجه ضروری است به کمک آزمایش الایزای غیر مستقیم ؛که روشی مناسب با حساسیت پایین و ویژگی بالا برای غربالگری است؛ هر چه سریعتر در مرحله تحت بالینی به شناسایی و غربالگری دام های آلوده در گله اقدام نمود و ضرر اقتصادی به گله را مهار نمود.

در دام هایی که تست الایزا آنها مثبت شده است ولی دو تست دیگر منفی شده با توجه به اینکه ویژگی الایزا بالا است نشان دهنده این است که دام عفونی بوده ولی هنوز باکتری را دفع نمی‌کند تا بتوان توسط PCR و کشت آنرا شناسایی نمود. لذا این دام‌ها معمولامشخص گردیده و تا زمانی که دفع باکتری را ننمایند و در تست های PCR و کشت مثبت نگردند می توان از آنها در گله استفاده نمود ولی به محض دفع باکتری می بایستی از گله اخراج گردند در ضمن برای تحت کنترل بودن تمام گله بویژه حیوانات آلوده الزامی است تا هر شش ماه یکبار تست الایزا اننجام پذیرد و معمولا وقتی نتیجه تست الایزا از $^{+}$۳ به بالا می شود (OD>2) در آن زمان دفع باکتری بیشتر شده که ممکن است در PCR و کشت بتوان آنرا شناسایی کرد.

تشکر و قدردانی

در پایان از همکاری موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج بخصوص بخش توبرکولین و بخش واکسن های هوازی صمیمانه تقدیر و تشکر می‌گردد

منابع

WWW.bah.state.mn.us(Minne sota Board of Animal Helth)

1. Al Hajri, S. M., & Alluwaimi, A. M. (2007). The efficiency of ELISA and PCR in detecting subclinical *paratuberculosis* in the Saudi dairy herds. Pakistan *Journal of Biological Sciences*: PJBS, **10:** 1906-1909.
2. Ansari-Lari M, Haghkhah M, Bahramy A, Novin Baheran AM. (2009). Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. T*ropical animal health and production* Apr;**41:**553-7.
3. Anzabi Y, Tabatabayi AH, Asgharzadeh M.(2005). A survey on the infection status of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in dairy cattle using PCR of Tabriz. *Journal of Iran veterinary science*;**4:**125-31.
4. Badiei A, Mousakhani F, Barin A, Hamidi A, Zafari M. (2012). Comarison of direct microscopic examination, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), culture and Nested-PCR for diagnosis of herds bulk tank milk infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal* Feb **20:**1369-78.
5. Barratt, A.S., Arnoult, M.H., Ahmadi, B.V., Rich, K.M., Gunn, G.J. and Stott, A.W., (2018). A framework for estimating society's economic welfare following the introduction of an animal disease: the case of Johne's disease. *PLoS One*, ***13*:** p.e0198436.
6. Barrington GM, Gay JM, Eriks IS, Davis WC, Evermann JF, Emerson C, O'Rourke JL, Hamilton MJ, Bradway DS.(2003). Temporal patterns of diagnostic results in serial samples from cattle with advanced *paratuberculosis* infections. *Journal of*

the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine serum. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* May 1;**121:**203-10.
15. Nielsen, S.S., Thamsborg, S.M., Houe, H. and Bitsch, V. (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of *paratuberculosis* in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 44: 1-7
16. Pillai SR, Jayarao BM. (2002). Application of *IS900* PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *Journal of Dairy Science* May 1;**85:**1052-7.
17. Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, Sanderson JD, Sechi LA, Dettori G, Zanetti S, Hermon-Taylor J. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *Journal of clinical microbiology* Dec;**45:**3883-90.
18. Stabel, J.R., Wells, S.J. and Wagner, B.A. (2002). Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne’s disease in US dairy herds. *American Dairy Science Association*. **85:** 525-531
19. Taylor TK, Wilks CR, McQueen DS. (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Veterinary Record*;**109:**532-3.
20. Vans nick E, De Rijk P, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L, Portaels F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *Para tuberculosis*. *Veterinary microbiology* Jun 3; **100:**197-204.

veterinary diagnostic investigation Mar;**15:**195-200.
7. Begg, D.J., O’Brien, R., Mackintosh, C.G. and Griffin, J.F.T., (2005). Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infection and immunity*, ***73*:** 5603-5611.
8. Collins MT, Spahr U, Murphy PM. Ecological characteristics of M. (2001). *paratuberculosis. Bulletin-International Dairy Federation* **362:**32-40.
9. Garcia, A.B. and Shalloo, L.(2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of dairy science*, ***98*:** 5019-5039.
10. Giese SB, Ahrens P. Detection of Mycobacterium avium subsp. (2000). *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Veterinary microbiology* Dec **20:**77:291-7.
11. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT.(2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental microbiology* May;**68:**2428-35.
12. Hatamifar M, Mosavari N, Kazemi J. (2017). Designing of Indirect ELISA system using secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for Diagnosis of *paratuberculosis. Iranian Journal of Medical Microbiology* Jun 10;**11:**26-33.
13. Heidarnejhad O, Safi S, Mosavari N, Keshavarz R. (2017). Sero-prevalence of subclinical *paratuberculosis* (Johne's disease) in dairy farms of Tehran-Iran using absorbed ELISA assay. *Journal of Comparative Pathobiology* Sep 23;**14:**2239-46.
14. Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, Martin G. (2008). Evaluation of five ELISA test kits for

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2, Autumn & Winter 2021

Isolation and molecular identification *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*, from milk samples of Tehran province's dairy Farms

Tayebeh Hassansoltan Solaghani[1], Nader Mosavari[*2], R. Nazari[*3], Keyvan Tadayon[4], Mohammad Reza Zolfaghari[5]

1. PhD Student .Department of Microbiology, College of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran,

2. Associate Professor. Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran,

3. Associate Professor. Department of Microbiology, College of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

4. Associate Professor. Department of Occupational Health and Safety Engineering, Non-communicable Diseases, Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran, mmb093@gmail.com

5. Associate Professor. Department of Microbiology, College of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Received: 9 May 2022 Accepted: 23 August2022

Abstract

A study was performed in the Persian capital province of Tehran to assess frequency of Para tuberculosis in its operating cattle farms. As many as 8,000 cows were screened by a home-made ELISA system. Milk specimens were collected from detected reactor to perform confirmatory PCR-16srRNA, PCR-IS900 and PCR IS1311 experiments plus bacterial culture on specific media in search for Mycobacterium avium subsp Para tuberculosis (MAP). While among the 25 ELISA positive(0.3%) animals eight cases produced positive results in PCRs(0.1%) only three appeared positive in MAP isolation(0.04%). In deduction, we assume when it comes to selection of control measures against Ptb, in an environment with presumably high prevalence of Ptb like Tehran, ELISA is a much more sensible detection system compared to the zero false-positive method of bacterial culture.

Keywords: Isolation, Farms in Tehran Province, Mycobacterium avium subsp, Para tuberculosis, Johne's disease

**Corresponding author: Nader Mosavari*

Address: Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

E. mail: n.mosavari@rvsri.ac.ir

**Corresponding author: R. Nazari*

Address: Department of Microbiology, College of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

E. mail: nazari1102002@yahoo.com