Veterinary Clinical Pathology, Vol.15, No. 60, Winter 2022

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1944814.1335**

Comparison of molecular and serological isolation methods to identify pigeons suspected of having avian tuberculosis

lary Baghal, M.[1], Mayahi, M.[2*], Boroomand, Z.[2], Mosavary, N.[3]

1- Specialist in Poultry Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2- Professor, Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz; Ahvaz, Iran.
3- Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
[*]Corresponding author's email: mansoormayahi@scu.ac.ir
(Received: 2021/11/16 Accepted: 2020/3/13)

Abstract

Tuberculosis is one of the oldest infectious zoonotic diseases. The importance of avian tuberculosis and the growing risk of the disease in human societies have provided a double incentive for rapid diagnosis of the disease. *Mycobacterium avium* subsp. avium is the most important cause of disease in poultry. Sampling for the present research was done during 2018-2019. Based on clinical signs and poor physical condition, 101 pigeons suspected of having tuberculosis were selected from different herds. First, blood samples were taken from pigeons for serum preparation. Then pigeons were euthanized and necropsy was performed and tissue samples were taken for culture and molecular tests. The samples were cultured in three specific media: Lunstein-Johnson with glycerin, Lunstein-Johnson with pyruvate and Heroldegg. Molecular analysis of samples was conducted using 16S rRNA, IS1245, and IS901 primers. Serum samples were analyzed for antibodies against *Mycobacterium avium* using a specifically designed ELISA system. Based on culture and molecular identification, 39 isolates from *Mycobacterium avium* subsp. avium were isolated. Contamination of 13 pigeons with *Mycobacterium avium* subsp. avium was detected using the specifically designed ELISA system. According to the results, the sensitivity of the culture and PCR methods was higher than the specifically designed ELISA system. However, due to the significant relationship between these three methods, it seems that the ELISA system can be used to screen flocks in the early stages of the disease.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Isolation, Molecular identification, Mycobacterium, Pigeon, Serology.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1944814.1335

مقایسه روش‌های جداسازی، مولکولی و سرولوژی جهت شناسایی کبوتران مشکوک به بیماری سل پرندگان

مهسا لاری‌بقال[۱]، منصور میاحی[۲*]، زهرا برومند[۲]، نادر مصوری[۳]

۱- متخصص بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- آزمایشگاه مرجع، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mansoormayahi@scu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۲۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲)

چکیده

بیماری سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است. اهمیت بیماری سل پرندگان و خطر روزافزون گسترش این بیماری در جوامع انسانی انگیزه‌ای مضاعف جهت تشخیص سریع‌تر این بیماری فراهم نموده است. *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم مهم‌ترین عامل بیماری سل در پرندگان می‌باشد. نمونه‌برداری این تحقیق در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ انجام گرفت. بر اساس نشانه‌های بالینی ۱۰۱ کبوتر مشکوک به بیماری سل از گله‌های مختلف انتخاب شدند. ابتدا از کبوتران به منظور تهیه سرم، خون‌گیری انجام شد و پس از آسان‌کشی، با انجام کالبدگشایی، به منظور جداسازی عامل با روش کشت و انجام آزمایشات مولکولی نمونه‌های بافتی جمع‌آوری شد. کشت نمونه‌ها در سه محیط اختصاصی لونشتاین-جانسون گلیسیرین‌دار و لونشتاین-جانسون پیروات‌دار و هرولداگ انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای 16S rRNA، IS1245 و IS901 مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. با طراحی سیستم الایزا نمونه‌های سرم از نظر وجود آنتی‌بادی علیه *مایکوباکتریوم اویوم* بررسی شدند. با انجام کشت و انجام آزمایشات مولکولی ۳۹ جدایه از مایکوباکتریوم *اویوم* تحت‌گونه اویوم جدا شد و در آزمایش سیستم الایزای طراحی‌شده ۱۳ مورد آلودگی این کبوتران به *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم تشخیص داده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده حساسیت روش کشت و PCR نسبت به روش سیستم طراحی شده الایزا بالاتر بود اما با توجه به ارتباط معنی‌دار این سه روش با هم و نیز با توجه به ساده، سریع، ارزان و نسبتا غیر تهاجمی بودن روش الایزا به نظر می‌رسد می‌توان از سیستم الایزا جهت غربال‌گری گله‌ها در مراحل اولیه بیماری استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: تعیین هویت مولکولی، سرولوژی، جداسازی، کبوتر، مایکوباکتریوم.

مقدمه

بیماری سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است (Taroudizadeh and Imani Fouladi, 2012; Velayati, 1977). بر اساس تحقیقات به عمل آمده هر ساله حدود ۱۰/٤ میلیون نفر انسان به سل مبتلا می‌شوند و تقریباً یک سوم از جمعیت جهان حامل باسیل سل هستند و در معرض خطر ابتلا به بیماری فعال قرار دارند (Barberis *et al.*, 2017) و هر سال ۳ میلیون نفر بر اثر ابتلا به بیماری سل در جهان می‌میرند. اهمیت بیماری سل پرندگان و خطر روز افزون گسترش این بیماری در جوامع انسانی به علت مشترک بودن بیماری بین پرنده و انسان، انگیزه‌ای مضاعف جهت تشخیص سریع‌تر این بیماری فراهم نموده است (Mayahi *et al.*, 2013). سل پرندگان بیماری بسیار مهمی است که هم در پرندگان خانگی، آزادزی و شکاری (Tell *et al.*, 2001) و هم در پستانداران اهلی و وحشی دیده می‌شود (Pavlas *et al.*, 1992). سل پرندگان یک بیماری مزمن است که عموماً دستگاه گوارش پرنده را درگیر کرده و اغلب منجر به مرگ پرنده می‌شود (Movassaghi *et al.*, 2010). به علت اهمیت اقتصادی و خسارات ناشی از سل در پرندگان نگه‌داری شده در باغ‌وحش‌ها، خطر انقراض نسل برخی پرندگان نایاب، مشترک بودن بیماری و دشوار بودن کنترل آن، تشخیص بیماری اهمیت زیادی دارد (Fulton and Sanchez, 2020). این بیماری اغلب توسط *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *اویوم* و *مایکوباکتریوم جناونس* ایجاد می‌شود (Tell *et al.*, 2001). کشت، آزمایشات سرولوژیک (Fulton and Sanchez, 2020)، رنگ‌آمیزی اسیدفست و رادیوگرافی آزمایشاتی هستند که اغلب دامپزشکان جهت تشخیص بیماری انجام می‌دهند (Nouri *et al.*, 2012; Kriz *et al.*, 2010; Tell *et al.*, 2001). از آن جایی که نشانه‌های بالینی بروزیافته در این بیماری پاتوگونومیک نمی‌باشند و تفاوت گونه‌ای بسیاری در بروز نشانه‌ها وجود دارد (Tell *et al.*, 2001)، در پرندگانی که نشانه‌های بالینی این بیماری را نشان نمی‌دهند در صورت وجود باکتری‌های اسیدفست باید احتمال آلودگی به بیماری سل را داد. با این وجود برای اثبات بیماری کشت باکتری ضروری است (Pesek, 1998). با وجود اینکه کشت، قطعی‌ترین روش در تائید وجود عفونت با *مایکوباکتریوم*ها می‌باشد اما این روش دارای مشکلاتی از قبیل تهاجمی بودن، سخت رشد بودن ارگانیسم، طولانی بودن زمان تکثیر مایکوباکتریوم‌ها و نیاز به وجود شرایط مناسب از نظر دمایی، مواد مغذی و اکسیژن می‌باشد (Tell *et al.*, 2001). محیط‌های کشت هرولد حاوی زرده تخم‌مرغ، لونشتاین جانسون و میدل بروک جهت کشت *مایکوباکتریوم اویوم* استفاده می‌شوند (Friend *et al.*, 2001; Wobeser, 1997). لاپاراسکوپی نیز از جمله روش‌های تشخیص بیماری سل در پرندگان محسوب می‌شود که امکان بیوپسی از بافت و ضایعات را فراهم می‌کند اما این روش نیاز به تجهیزات پیچیده و گران دارد، مستلزم بیهوشی عمومی است و دارای خطرات ذاتی برای پرنده می‌باشد (Tell *et al.*, 2001). امروزه انجام آزمایشات مولکولی PCR بر پایه جستجوی ژن‌های IS6110، IS901 و IS1245 و نیز تکنیک‌هایی مانند هضم آنزیمی (RFLP) با استفاده از پروب‌های اختصاصی در تشخیص مایکوباکتریوم‌ها کارایی زیادی پیدا کرده‌اند. با استفاده از این روش‌ها به

راحتی می‌توان نمونه‌های مشکوک به سل انسانی و یا حیوانی را در عرض یک روز از نظر وجود مایکوباکتریوم و همچنین تعیین گونه آن دقیقا مورد بررسی و تایید قرار داد (Jabbarzadeh and Seifi, 2010). به عبارت دیگر روش‌های مولکولار در تشخیص آنتی‌ژن‌ها یا ژن‌های خاص و تعیین هویت مایکوباکتریوم‌های پاتوژن انقلابی بزرگ ایجاد نموده‌اند. مزایای این روش‌ها شامل بدست آوردن نتایج سریع، توانایی تشخیص میزان اندک آلودگی در نمونه‌ها و تعیین هویت دقیق گونه‌های مایکوباکتریوم بوده است (Tell *et al*., 2001). علی‌رغم سرعت بالای تشخیص در این روش، دفع متناوب ارگانیسم و دشواری در یافتن بافت هدف از جمله مشکلات پیش‌رو می‌باشد. آزمایش‌های سرولوژیک کاربردی در تشخیص سل پرندگان شامل هماگلوتیناسیون (HA)، ثبوت کمپلمان (CF) و الایزا می‌باشد (Thoen *et al*., 1979; Jorgensen, 1978). این آزمایش‌ها، خاص گونه‌ای هستند و تنها برای تعداد محدودی از گونه‌ها در دسترس می‌باشند (Christal, 2013). آزمایش HA با استفاده از خون یا سرم قابل انجام است. نخستین‌بار موس و همکاران در سال ۱۹۴۳ از آزمایش آگلوتیناسیون با استفاده از نمونه سرم خون به منظور تشخیص بیماری سل در طیور استفاده کردند (Pavlas *et al*., 1992). آگلوتیناسیون خون کامل یک روش تشخیصی سریع برای پرنده‌های آلوده در گله می‌باشد. گرچه موارد مثبت کاذب در آن نقطه ضعف به حساب می‌آید (Fulton and Sanchez, 2020). استفاده از خون کامل تازه، حساس‌تر از خون کامل شامل EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) یا سرم است و نتایج مثبت واقعی را نشان می‌دهد. برای دسترسی به نتایج قابل اعتماد، آنتی‌ژن‌های خاص گونه‌ای مورد نیاز است و می‌توان از آن به عنوان یک آزمایش برای غربال‌گری و ارزیابی گله‌ها استفاده نمود (Fulton and Sanchez, 2020; Christal, 2013; Tell *et al*., 2001; Cromie *et al*., 1993; Hawkey *et al*., 1990). این تست در پرندگان آبزی، مرغان خانگی، پرندگان شکاری و درنا قابل انجام است (Christal, 2013; Cromie *et al*., 1993; Hawkey *et al*., 1990). حساسیت آزمایش الایزا بالا است، با این وجود این آزمایش مشکل بوده و به آنتی‌ژن‌های خاص گونه‌ای نیاز دارد و نتایج مثبت کاذب در این آزمایش می‌تواند بالا باشد. از این روش نیز می‌توان جهت غربال‌گری گله استفاده نمود (Fulton and Sanchez, 2020; Tell *et al*., 2001). آزمایش تثبیت کمپلمان (CF) نیز جهت مشخص نمودن وجود عفونت یا در معرض قرار گرفتن با *مایکوباکتریوم اویوم* کاربرد دارد (Christal, 2013; Phalen *et al*., 1995). شناسایی منابع عفونت، مسیرهای انتقال و پیدا کردن مخازن بیماری یکی از چالش‌های اصلی در برنامه ریشه‌کنی بیماری می‌باشد از این رو تمایز سویه‌های مختلف *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *اویوم* الزامی به‌نظر می‌رسد. اطلاعات موجود عمدتاً به تشخیص سل پرندگان به روش کشت از ضایعات کالبدگشایی پس از مرگ محدود است. بررسی منابع نشان می‌دهد در خصوص تشخیص سرولوژیک سل کبوتران مطالعه چاپ شده‌ای در دسترس نمی‌باشد، بنابراین تحقیق حاضر با هدف مقایسه تشخیص بیماری سل پرندگان به ۳ روش کشت، تعیین هویت مولکولی و سیستم الایزای طراحی شده در آزمایشگاه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

- **نمونه‌برداری**: نمونه‌برداری در مدت یک سال از مهر ۱۳۹۶ تا مهر ۱۳۹۷ از ۱۰ گله کبوتر مشکوک به بیماری سل به عمل آمد. از بین ۷۰۰ کبوتر مورد بررسی، ۱۰۱ کبوتر بر اساس نشانه‌های بالینی انتخاب شدند. بدین منظور در هر نوبت، کبوتران با نشانه‌های بالینی مانند ضعف، لاغری بیش از حد، ژولیدگی پر، عدم تمایل به پرواز، اسهال، وجود گرانولوم در ناحیه ملتحمه چشم، تورم مفاصل خرگوشی، لنگش، زخم‌های آتش‌فشانی در ناحیه پا، وجود ندول یا ضایعات گرانولوماتوز در بال یا مفاصل پا انتخاب شدند و در ادامه کبوتران مشکوک به بخش کالبدگشایی بخش بیماری‌های طیور بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل می‌شدند. ابتدا از کبوتران به منظور تهیه سرم، خون‌گیری شده و پس از آسان‌کشی، با انجام کالبدگشایی، جراحات کالبدگشایی مشاهده شده ثبت و نمونه‌های بافتی تهیه می‌گردید. در صورت وجود جراحات از کبد، طحال، قلب، روده، دستگاه عضلانی اسکلتی و همچنین غدد جنسی نمونه‌برداری و در صورت عدم وجود ضایعات، نمونه بافتی از کبد و طحال تهیه می‌شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در ظروف مخصوص نمونه‌برداری قرار گرفته و تا زمان انجام آزمایش‌های تشخیصی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری می‌شدند.

- **کشت نمونه‌ها**: با استفاده از پنس و اسکالپل استریل از اندام‌های مختلف و در صورت وجود جراحات، از آنها قطعات کوچکی جدا و به داخل هاون‌های استریل (شیمی‌بان-ایران) منتقل شد. مقداری شن استریل روی نمونه‌ها ریخته شد. پس از صلایه کردن نمونه‌ها، به منظور آلودگی‌زدایی، به میزان هم حجم نمونه اولیه محلول حاوی سیترات سدیم (صنایع شیمیایی آروین-ایران)، سدیم هیدروکسید (مرک-آلمان) و N استیل N سیستئین (مرک-آلمان) به هر ظرف اضافه شد و یک مخلوط هموژن و یکنواخت حاصل گردید. پس از گذشت ۲۰ دقیقه از آلودگی‌زدایی نمونه‌ها، به علت خاصیت هیدروفوبی ناشی از لیپید فراوان در دیواره مایکوباکتریوم‌ها به وسیله پوآر استریل (D & N-آلمان) از قسمت بالای محلول داخل هاون حدود ۱۵ تا ۲۰ میلی‌لیتر محلول برداشته و داخل لوله فالکون حاوی ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک (شیمی دارویی نوترن-ایران) و یک قطره معرف متیلن بلو (بایوکم-فرانسه) ریخته شد. افزودن محلول رویی صلایه به لوله فالکون حاوی اسید و معرف تا آنجا ادامه داده شد تا رنگ محلول داخل لوله به رنگ سبز پسته‌ای تبدیل گردید. پس از آن لوله فالکون‌ها با دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه مایع رویی دور ریخته شد و به رسوبات ته لوله‌ها ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته بدون فنل (Bio-Idea-ایران) با pH=۶/۸ افزوده شد. پس از هم زدن رسوبات، با پوآر استریل از محلول‌ها برداشته و حدود ۱ میلی‌لیتر در داخل محیط کشت لونشتاین-جانسون گلیسیرین‌دار (مرک-آلمان) و لونشتاین-جانسون پیروات‌دار (مرک-آلمان) و هرولد حاوی تخم‌مرغ (مرک-آلمان) تلقیح شد. محیط‌های کشت تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و رشد باکتری‌ها به مدت ۳ ماه مورد بررسی قرار گرفت.

- **تعیین هویت مولکولی**: جهت انجام آزمایشات مولکولی ۳۰۰ میکرولیتر از صلایه تهیه شده از نمونه‌ها

برای کشت، در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و با استفاده از بن‌ماری (ممرت-آمریکا) در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه غیر فعال گردید. استخراج DNA بر اساس روش Van Soolingen و همکاران انجام شد (Van Soolingen *et al*., 2002). بدین منظور استخراج DNA به روش دستی با استفاده از لیزوزیم (مرک-آلمان)، پروتئیناز K (سیگما-آلمان)، SDA (مرک-آلمان)، نمک ۵ مولار (مرک-آلمان)، cTAB (سیگما-آلمان)، ایزوآمیل الکل کلروفرم (مرک-آلمان)، ایزوپروپانول (مرک-آلمان) و الکل (الکل خرمشهر-ایران) انجام شد.

در این تحقیق برای تعیین هویت مایکوباکتریوم‌های جدا شده از کبوتر ابتدا با استفاده از پرایمرهای 16S rRNA متعلق بودن ایزوله‌ها به جنس مایکوباکتریوم مورد بررسی قرار گرفت. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل و مشاهده باندی به اندازه bp ۵۴۳ و تائید این امر، جهت شناسایی دقیق‌تر جنس و گونه مایکوباکتریوم‌ها از پرایمرهای IS901 و IS1245 استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل و حضور باند bp ۱۰۸٤ در مورد سکانس IS901 دلیل بر وجود *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم و مشاهده باندی به اندازه bp ٤۲۷ برای سکانس IS1245 این امر را تائید می‌کرد (Huard *et al*., 2003, Guerrero *et al*., 1995, Kunze *et al*., 1991) (جداول ۱، ۲، ۳ و ٤).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین هویت مایکوباکتریوم‌های جدا شده از کبوترهای آلوده

نوع پرایمر و جایگاه هدف	توالی نوکلئوتیدی
16S rRNA	F 5 ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C 3 R 5 TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A 3
IS901	F:5 GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA 3 R:5 TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT 3
IS1245	F:5 AGG TGG CGT CGA GGA AGA 3 R: 5′ GCC GCC GAA ACG ATC TAC 3

جدول ۲- برنامه دما، زمان و چرخه ترموسایکلر با استفاده از پرایمر 16S rRNA (Huard *et al*., 2003).

مراحل PCR	دما	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹٤ درجه سلسیوس	۵ دقیقه	۱ سیکل
دناتوراسیون	۹٤ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	
آنیلینگ	٦۰ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	۲۵ سیکل
بسط نهائی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه	۱ سیکل

جدول ۳- برنامه دما، زمان و چرخه ترموسایکلر با استفاده از پرایمر IS901 (Kunze *et al*., 1991)

مراحل PCR	دما	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹٤ درجه سلسیوس	۵ دقیقه	۱ سیکل
دناتوراسیون	۹٤ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	
آنیلینگ	٦۰ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	۲۵ سیکل
بسط زنجیره	۷۲ درجه سلسیوس	۱۵۰ ثانیه	
آنیلینگ	٦۵ درجه سلسیوس	۱۲۰ ثانیه	۱ سیکل
بسط نهائی	۷۲ درجه سلسیوس	۱۰ دقیقه	۱ سیکل

جدول ٤- برنامه دما، زمان و چرخه ترموسایکلر با استفاده از پرایمر IS1245 (Guerrero *et al*., 1995)

مراحل PCR	دما	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹٤ درجه سلسیوس	۵ دقیقه	۱ سیکل
دناتوراسیون	۹٤ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	
آنیلینگ	٦۵ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	۳۰ سیکل
بسط زنجیره	۷۲ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	
بسط نهائی	۷۲ درجه سلسیوس	۱ دقیقه	۱ سیکل

- **طراحی سیستم الایزا:** جهت انجام آزمایشات سرولوژی از آنتی‌ژن‌های *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم (بانک میکروبی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی-ایران) استفاده شده و از غلظت‌های ٤۰ ماکروگرم تا غلظت‌های کمتر جهت تعیین بهترین غلظت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی استفاده شد. جهت تهیه کنترل مثبت، سه کبوتر بعد از خون‌گیری از آنها (به عنوان کنترل منفی، بعد از مشخص شدن عدم وجود آنتی‌بادی ضد *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم) مورد تزریق سوسپانسیون سویه استاندارد D4 (بانک میکروبی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی-ایران) قرار گرفتند. بعد از یک ماه مجددا از آنها خون‌گیری شد و از سرم آنها به عنوان کنترل مثبت در فرآیند تعیین بهترین غلظت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی ستفاده شد.

- **فرآیند تعیین بهترین غلظت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی:** برای این منظور فرآیند رقیق‌سازی آنتی‌ژن از غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در چاهک بدون آنتی‌ژن انجام گرفت. بافر پوشاننده (coating buffer) مورد استفاده، بافر کربنات بی‌کربنات ۰/۱ مولار (مرک-آلمان) بود و رقیق‌سازی آنتی‌ژن با این بافر انجام شد و داخل هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت با فویل پوشانده شد و به مدت ١٦ تا ١٨ ساعت در دمای یخچال نگه‌داری شد و پس از این فرآیند، سه بار شستشو با بافر PBS ۰/۰۱ مولار (DNAbiotech-ایران) انجام گرفت.

- **مرحله مهاری (Blocking):** مقدار ۱۵۰ میکرولیتر محلول مهارکننده BSA ۲ **درصد** (DNAbiotech-ایران) در چاهک‌ها ریخته شد و سپس پلیت با فویل پوشانده و ۱ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق گذاشته شد. بعد از گذشت ۱ ساعت محلول **مهارکننده** خالی و ۳۰ دقیقه زمان گرفته شد تا چاهک‌ها کاملا خشک شدند و پلیت آماده استفاده بود.

- **اضافه کردن آنتی‌بادی (نمونه سرم):** سرم شارژ شده گاو (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی-ایران)، با استفاده از آنتی‌ژن‌های *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم (سویه استاندارد D4) به عنوان کنترل مثبت و سرم گاو شارژ نشده (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی-ایران)به عنوان کنترل منفی قلمداد گردید و از رقت ۱/۱۰۰ آنها برای فرآیند تعیین بهترین غلظت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی استفاده شد. سرم‌ها با بافر رقیق کننده (PBST ۱ درصد همراه با BSA ۲ درصد) (DNAbiotech-ایران) تهیه و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری صورت گرفت. پلیت ۵ بار

شستشو داده شد و از رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی‌آنتی‌بادی کونژوگه با پراکسیداز (HRP Conjegate abcam/uk Goat anti bovine) استفاده و پس از گرمخانه‌گذاری ۳۰ دقیقه‌ای در دمای اتاق مجدداً پلیت شستشو داده شد.

- **افزودن سوبسترا:** در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای TMB (- 5,5' , 3,3' tetramethylbenzidine) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی گرمخانه‌گذاری شد.

- **محلول متوقف‌کننده:** مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده (stop solution) در چاهک‌ها ریخته شد.

- **قرائت جذب نوری:** پلیت در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده شد.

- **انجام آزمایش الایزا:** جهت انجام آزمایش الایزا ابتدا آنتی‌ژن استاندارد سویه D4 در ته گودی‌های پلیت الایزا پوشش داده شد. بافر کربنات بی‌کربنات ۰/۱ مولار تهیه و ۱۱ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن استاندارد سویه D4 مخلوط و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل در هر گودی از پلیت الایزا پوشش داده شد. پس از آن پلیت الایزا به مدت ٢٤ ساعت در سردخانه ۸-۲ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از گذشت ٢٤ ساعت پلیت الایزا از سردخانه خارج و محلول داخل گودی‌ها تخلیه شد. در ادامه پلیت الایزا ۳ بار با محلول شستشو PBS بدون توئین (DNAbiotech-ایران) و هر بار به میزان ۳۰۰ میکرولیتر در هر گودی شسته شد. پس از آن ۱۵۰ میکرولیتر محلول مهار کننده درون گودی‌ها ریخته و ۱ ساعت زمان داده شد. بعد از گذشت ۱ ساعت محلول مهارکننده تخلیه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر سرم با رقت ۱ به ۱۵۰ به گودی‌ها اضافه شد. ۳۰ دقیقه زمان داده شد. پس از آن گودی‌های پلیت ۵ بار و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو شسته شد. برای استفاده از Gout Anti chicken (بیوکمپ-ایران) نیاز به Anti chicken 1x بود، بنابراین ۱۱۰ میکرولیتر از Gout Anti chicken 100x با ۱۱ میلی‌لیتر محلول کونژوگه مخلوط و از محلول حاصل ۱۰۰ میکرولیتر به تمام گودی‌های پلیت الایزا اضافه و ۳۰ دقیقه زمان داده شود. پس از آن گودی‌های پلیت ۵ بار و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو شسته شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر TMB به تمام حفرات افزوده و پلیت الایزا به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر **محلول متوقف کننده** به تمام حفرات اضافه شد. در انتها پلیت الایزا به وسیله دستگاه الایزا Reader (Hiperion-آلمان) در طول موج ٤٥٠ نانومتر قرائت گردید.

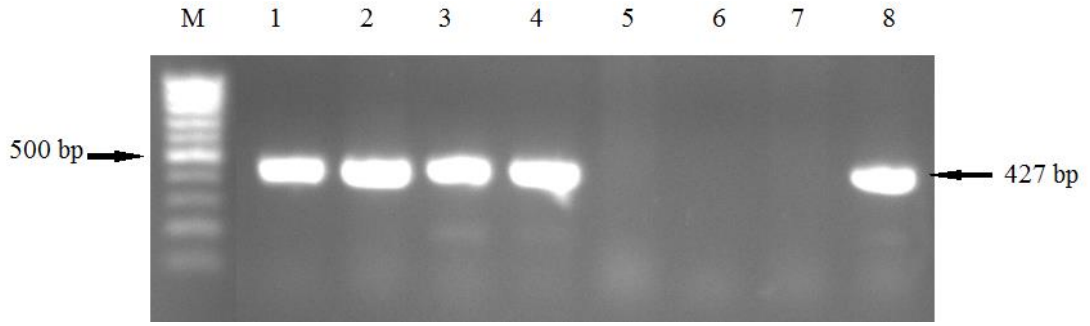
- **تحلیل آماری داده‌ها:** آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS با استفاده از آزمون مربع کای با سطح معنی‌دار ۵ درصد و آزمون همبستگی پیرسون انجام گرفت.

یافته‌ها

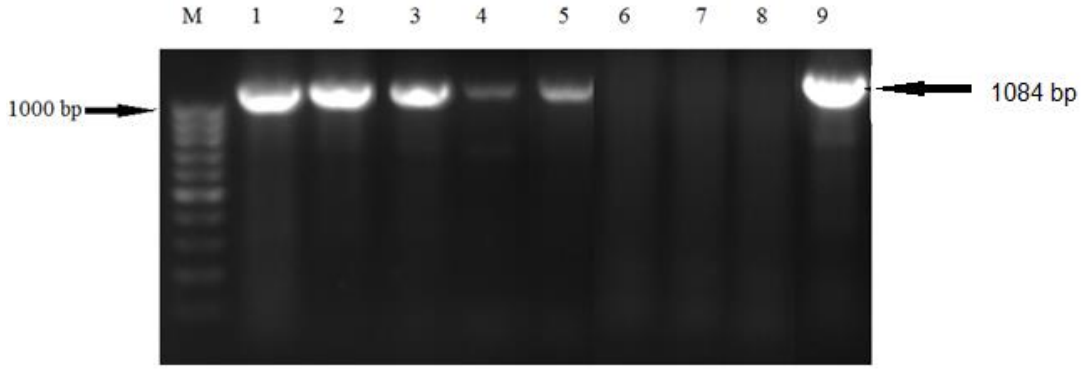
بدون در نظر گرفتن جنس کبوتران، ۳۹ کبوتر (۳۸/٦ درصد) مبتلا به سل بودند. از بین ۷۵ کبوتر نر، ۲۷ کبوتر (۳٦ درصد) و از بین ٢٦ کبوتر ماده ۱۲ کبوتر (٤٦/۲ درصد) نتایج مثبت را نشان دادند.

بر اساس محاسبات صورت‌گرفته Cut off تیترهای به‌دست آمده از آزمون الایزای طراحی‌شده ۰/۲ تعیین گردید. بنابراین در آزمایش الایزا، بدون در نظر گرفتن

جنس کبوتران، ۱۳ مورد (۱۲/۹ درصد) ابتلا به سل را نشان دادند. با در نظر گرفتن جنس، در آزمایش الایزای انجام شده از بین ۷۵ کبوتر نر این تحقیق، ۸ مورد (۱۰/۷ درصد) و از بین ۲٦ کبوتر ماده این تحقیق ۵ مورد (۱۹/۲ درصد) ابتلا به بیماری سل را نشان دادند. آزمایش تعیین هویت مولکولی در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول تعیین هویت مولکولی بر روی صلایه‌های بافتی تهیه شده صورت گرفت و در مرحله دوم تمام جدایه‌های رشد یافته در محیط کشت، توسط PCR جهت تعیین هویت مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایش PCR اولیه بدون در نظر گرفتن جنس کبوتران، ۳۸/٦ درصد از آنها و در آزمایش PCR جدایه‌های اسیدفست به‌دست آمده از رشد در محیط کشت، تمام جدایه‌ها از نظر وجود سکانس پرایمرهای 16S rRNA، IS1245 و IS901 مثبت شدند (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱- واکنش PCR با استفاده از پرایمر IS1245، اندازه اختصاصی آن ٤۲۷ bp. چاهک M سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، چاهک شماره ۱ تا ٦ نمونه‌های آزمایش شده جهت *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم. چاهک شماره ۷ کنترل گونه منفی (*مایکوباکتریوم بویس*، سویه ATCC number AN5 35726). چاهک شماره ۸ کنترل مثبت (*مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم، سویه ATCC number 35713 D4).



شکل ۲- واکنش PCR با استفاده از پرایمر IS901، اندازه اختصاصی آن ۱۰۸٤. چاهک M سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، چاهک شماره ۱ تا ۷ نمونه‌های آزمایش شده جهت *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم. چاهک شماره ۸ کنترل گونه منفی (*مایکوباکتریوم بویس*، سویه ATCC number 35726 AN5). چاهک شماره ۹ کنترل مثبت (*مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه اویوم، سویه ATCC number 35713 D4).

آنالیز آماری نتایج بر اساس متغیر سن نشان داد که در کشت نمونه‌ها ۳۵ مورد (٤٤/٩ درصد) از بالغ‌ها و ٤ مورد (١٧/٤ درصد) از نابالغ‌ها؛ در آزمایش الایزای طراحی‌شده، ۱۱ مورد (١٤/١ درصد) از بالغ‌ها و ۲ مورد (٨/٧ درصد) از نابالغ‌ها و در آزمایش تعیین هویت مولکولی۳۵ مورد (٤٤/٩ درصد) از بالغ‌ها و ٤ مورد (١٧/٤ درصد) از نابالغ‌ها نتایج مثبت را نشان دادند.

- مقایسه نتایج حاصل از کشت و سیستم الایزای طراحی‌شده: بر اساس مقایسه نتایج حاصل از کشت و الایزا، از ۳۹ موردی که نتایج کشت آنها مثبت شد، تنها ۱۳ مورد (۳۳/۳ درصد) در آزمایش الایزای طراحی شده نتایج مثبت داشتند. همچنین بر اساس آنالیز آماری انجام شده ارتباط بین کشت و الایزا معنادار می‌باشد (p<۰/۰۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده حساسیت و ویژگی روش کشت ۱۰۰ درصد و حساسیت و ویژگی سیستم الایزای طراحی‌شده به ترتیب ۳۳/۳۳ درصد و ۱۰۰ درصد بود.

- مقایسه نتایج حاصل از کشت و PCR: بر اساس مقایسه نتایج حاصل از کشت و PCR، تمام ۳۹ موردی که نتایج کشت آنها مثبت شد در PCR نیز نتایج مثبت داشتند. ارتباط بین کشت و PCR معنادار گزارش شد (p<۰/۰۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده حساسیت و ویژگی روش کشت و PCR، ۱۰۰ درصد بود.

- مقایسه نتایج حاصل از سیستم الایزای طراحی شده و PCR: بر اساس نتایج به‌دست آمده از الایزای طراحی‌شده و PCR، از ۳۹ موردی که نتایج PCR آنها مثبت شد، ۱۳ مورد (۳۳/۳ درصد) در آزمایش الایزا نتایج مثبت داشتند و بر اساس آنالیز آماری انجام شده ارتباط بین الایزا و PCR معنادار بوده است (p<۰/۰۵).

با توجه به نتایج به‌دست آمده حساسیت و ویژگی روش PCR، ۱۰۰ درصد و حساسیت و ویژگی سیستم الایزای طراحی شده به ترتیب ۳۳/۳۳ درصد و ۱۰۰ درصد بود.

بحث و نتیجه‌گیری

علی‌رغم این‌که سالیان زیادی از وجود بیماری سل پرندگان در ایران می‌گذرد، اما مطالعات اندکی در این رابطه وجود دارد (Asadollahi *et al*., 2015; Boulfion, 2009). در این تحقیق، شیوع بیماری در کبوتران جوان کمتر از کبوتران مسن بود. علت این امر را می‌توان به بالاتر بودن مواجه با عامل بیماری در کبوتران مسن، طولانی بودن دوره کمون بیماری و عدم تکوین پاسخ ایمنی هومورال و تولید آنتی‌بادی قابل ردیابی نسبت داد (Asadollahi *et al*., 2015; Gonzalez *et al*., 2002). با وجود آنکه تمام جدایه‌ها در محیط‌های مایکوباکتین‌دار و پیروات‌دار رشد کرده بودند، اما تعداد کلونی‌های به‌دست آمده در محیط‌های مایکوباکتین‌دار بیشتر و بزرگ‌تر بود که این نتیجه بیانگر موثر بودن مایکوباکتین در رشد باکتری است. تعداد بیشتر کلونی‌های رشد یافته در محیط‌های مایکوباکتین‌دار و بزرگ‌تر بودن اندازه کلونی‌ها با نتایج سایر مطالعات مطابقت داشت (Fulton and Sanchez, 2020; Asadollahi *et al*., 2015; Dhama *et al*., 2011).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه کشت و سیستم الایزای طراحی‌شده، از ۳۹ موردی که نتایج کشت آنها مثبت شد، تنها ۱۳ مورد در آزمایش الایزای طراحی‌شده نتایج مثبت داشتند. این بدان معناست که حساسیت کشت در تشخیص موارد بیماری بالاتر از آزمایش الایزای طراحی‌شده است. از آنجایی که عامل بیماری

باکتری درون سلولی است و زمان ورود آن به خون به مرحله بیماری (ابتدای بیماری) ارتباط دارد و نیز با توجه به این‌که عامل این بیماری بیشتر ایمنی سلولی را تحریک می‌کند تا ایمنی هومورال را (تولید پادتن‌های غیر حفاظتی) (Cromie *et al*., 2000; Van Der Heyden, 1997) و همچنین با توجه به متفاوت بودن مرحله بیماری در کبوتران مختلف، می‌توان کمتر بودن حساسیت آزمایش الایزای طراحی‌شده نسبت به کشت را توجیه نمود (Fulton and Thoen, 2003; Tell *et al*., 2001). اگرچه حساسیت آزمون الایزای طراحی‌شده در تحقیق حاضر کمتر از حساسیت این آزمون در مطالعات محققان دیگر بود (Cromie *et al*., 2000) اما با توجه به همبستگی معنی‌دار بین نتایج حاصل از کشت و الایزای طراحی‌شده، همچنین به دلیل سهولت نمونه‌گیری، سرعت و قیمت مناسب با استفاده از آزمون الایزای طراحی‌شده می‌توان پادتن علیه بیماری سل را در مراحل اولیه بیماری ردیابی کرد و از این تست در ابتدای بیماری جهت غربال‌گری گله‌ها استفاده نمود. شیتای و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ انجام آزمایشات سرولوژیکی (rapid agglutination RAT test;) را روش مطمئنی برای تشخیص پرندگان آلوده ندانستند و به این نکته اشاره نمودند که RAT تنها به تشخیص بیماری در پرندگان به شدت آلوده حساس است (Shitaye *et al*., 2008b).

همچنین کرومی و همکاران در سال ۱۹۹۳ با مقایسه نتایج حاصل از نکروپسی با نتایج حاصل از آزمون الایزا و آگلوتیناسیون خون کامل و سرم در ۱۷۸ غاز وحشی گزارش نمودند که حساسیت آزمون الایزا به گونه‌ای است که قادر به تشخیص بیماری حتی در مراحل اولیه است، ولی آزمون آگلوتیناسیون خون کامل و سرم با وجود سرعت و سهولت انجام کار، دارای نتایج مثبت و منفی کاذب است. با این وجود می‌توان از آزمون الایزا و آگلوتیناسیون برای غربال‌گری پرندگان موجود در این گله‌ها استفاده نمود (Cromie *et al*., 1993). استفاده از روش‌های سرولوژی در تشخیص بیماری سل در سایر دام‌ها نیز همواره مورد توجه محققین بوده است. سینگلا و همکاران در سال ۲۰۱۹ با مقایسه سه روش تشخیصی تست پوستی، سنجش میزان اینترفرون گاما و آزمون الایزا در ۱۲۸ گاو شیری از ۲۵ گله آلوده به بیماری سل به این نتیجه رسیدند که می‌توان از سنجش میزان اینترفرون گاما و آزمون الایزا به عنوان تست تکمیلی تشخیصی برای بیماری استفاده نمود (Singhla *et al*., 2019). همچنین برین و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی سرولوژی سرم و شیر ۵۰۰ راس بز بالغ که علیه *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیز واکسینه شدند گزارش کردند که افزایش آنتی‌بادی IgG در سرم و شیر ۱۰۰ درصد حیواناتی که تست پوستی آنها مثبت بود و ۷۷/۸ درصد در سرم و ۹۵/٤ درصد در شیر حیواناتی که تست پوستی آنها منفی بود مشاهده شد. بر اساس گزارش این محققین بررسی سرولوژیکی سرم و شیر بزها می‌تواند در تشخیص و مدیریت بیماری سل در این دام مفید باشد (O'Brien *et al*., 2017). وود و همکاران در سال ۱۹۹۲ با انجام مطالعات جهت تشخیص سل گاوی به روش الایزا گزارش کردند حساسیت این تست در تشخیص بیماری ۱۸/۱ درصد و ویژگی آن ۹٦/٤ درصد می‌باشد (Wood *et al*., 1992). در طب انسانی نیز استفاده از روش‌های سرولوژی جهت تشخیص بیماری

سل کاربرد دارد. قدیری و همکاران در سال ۱۳۸۵ با بررسی نمونه سرمی ۱۷٦ بیمار مبتلا به سل (۱۲٤ بیمار مبتلا به سل ریوی و ۵۲ بیمار مبتلا به سل خارج ریوی) با استفاده از روش الایزا گزارش کرد که روش سرولوژیکی الایزا می‌تواند در تشخیص بیماری سل کمک کننده باشد. هر چند حساسیت این روش بالا نیست (Ghadiri *et al*., 2006). ایزدی و همکاران در سال ۱۳۹۵ با بررسی نمونه سرم ۵۵ بیمار مبتلا به بیماری سل و ۲۸ نمونه سالم، با روش الایزای غیرمستقیم به این نتیجه دست یافتند که میزان آنتی‌بادی در افراد بیمار علیه عامل بیماری به طرز معناداری بالاتر از افراد سالم بود. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که استفاده از روش الایزا برای تعیین تیتر آنتی‌بادی می‌تواند به عنوان روش تشخیصی دقیق و سریع جایگزین آزمون‌های قدیمی باشد (Izadi *et al*., 2015).

امروزه کشت و تعیین هویت مولکولی به عنوان قطعی‌ترین روش‌های تشخیص سل در پرندگان مطرح هستند (Shitaye *et al*., 2008a). در این تحقیق تمام ۳۹ نمونه مثبت در کشت، از نظر وجود سکانس ژنومی IS901 و IS1245 مثبت بودند که نشان می‌دهد این جدایه‌ها به سروتیپ‌های ۱، ۲ و ۳ *مایکوباکتریوم اویوم* تعلق دارند و به عنوان سوش‌های حاد *مایکوباکتریوم اویوم* به شمار می‌آیند. نتیجه این تحقیق با نتایج سایر محققین که موفق به جداسازی سوش‌های حاد *مایکوباکتریوم اویوم* از پرندگان شدند، مطابقت دارد (Asadollahi *et al*., 2015; Dvorska *et al*., 2003; Tell *et al*., 2001).

کاوسکا و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی ۹۸ نمونه بافتی از یک گله مشکوک به بیماری سل پرندگان شامل ۹ مرغ و یک خروس با سابقه کاهش وزن، ۱۲ مورد مثبت با روش کشت و ۱٦ نمونه مثبت با روش PCR گزارش کردند. در گزارش این محققین روش PCR یک روش جایگزین سریعتر و قابل اعتماد در مقایسه با روش کشت معمولی بود (Kaevska *et al*., 2010).

عبدالستار و همکاران در سال ۲۰۲۱ با مقایسه روش تشخیص بیماری سل پرندگان با دو روش کشت و PCR بر روی ۳۰۰ نمونه مدفوع از ۱۰۰ جوجه روستایی، ۱۰۰ مرغ تخم‌گذار و ۱۰۰ پرنده نگه‌داری شده در قفس گزارش کردند اگرچه PCR روشی سریع، قابل اعتماد و مقرون به صرفه برای تشخیص *مایکوباکتریوم اویوم* در مرحله تحت بالینی است با این وجود کشت مدفوع پرندگان همچنان باید به عنوان یک آزمایش مرجع برای تشخیص سل پرندگان استفاده شود (Sattar *et al*., 2021).

همچنین قلوبی و همکاران در سال ۲۰۱٤ با مقایسه تشخیص ۳۰ نمونه انسانی مشکوک به بیماری سل به روش کشت و PCR اعلام کردند با وجود آنکه روش کشت، تست طلایی در تشخیص بیماری است اما روش PCR یک ابزار ارزشمند، مقرون به صرفه و جایگزین برای تشخیص سریع سل فعال در نمونه‌های بالینی مختلف است (Gholoobi *et al*., 2014).

این بررسی نشان داد حساسیت روش کشت و PCR نسبت به روش سیستم طراحی شده الایزا بالاتر بود اما با توجه به ارتباط معنی‌دار این سه روش با هم و نیز با توجه به ساده، سریع، ارزان و نسبتاً غیرتهاجمی بودن

روش الایزا به نظر می‌رسد می‌توان از سیستم الایزا جهت غربال‌گری گله‌ها در مراحل اولیه بیماری استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب پژوهانه (SCU.VC98.145) در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از دکتر عبدالرحمن راسخ استاد آمار دانشگاه شهید چمران اهواز بابت تجزیه تحلیل آماری قدردانی می نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Asadollahi, K., Mosavari, N. and Mayahi, M. (2015). Genotyping of Mycobacterium avium subsp. avium isolates from naturally infected lofts of domestic pigeons in Ahvaz by IS901 RFLP. Iranian Journal of Microbiology, 7(5): 260-264.
- Barberis, I., Bragazzi, N.L., Galluzzo, L. and Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus, Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 58(1): E9-E12.
- Boulfion, M. (2009). Molecular Identification of Mycobacteria Isolated from Pigeons Submitted to Razi Institute. Postgraduate Thesis from Azad University Research Science Branch, Tehran, No. 5469. [In Persian]
- Christal, G.P. (2013). Implications of Mycobacterium in Clinical Disorders. Chapter 28, pp: 681- 689.
- Cromie, R.L., Ash, N.J., Brown, M.J. and Stanford, J.L. (2000). Avian immune Responses to Mycobacterium avium: the wildfowl example. Developmental & Comparative Immunology, 24(2-3): 169-185.
- Cromie, R.L., Brown, M.J., Forbes, N.A., Morgan, J. and Stanford, J.L. (1993). A comparison and evaluation of techniques for diagnosis of avian tuberculosis in wildfowl. Avian Pathology, 22(3): 617- 630.
- Dhama, K., Mahendran, M., Tiwari, R., Dayal Singh, S., Kumar, D., Sing, S., *et al*. (2011). Tuberculosis in birds: Insight into the Mycobacterium avium infections. Veterinary Medicine International, 712369: 1-14.
- Dvorska, L., Bull, T.J., Bartos, M., Matlova, L., Svastova, P., Weston, RT., *et al*. (2003). A standardized restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing Mycobacterium avium isolates links IS901 with virulence for birds. Journal of Microbiological Methods, 55(1): 11-27.
- Friend, M., Robert, G., McLean, F. and Deín, FJ. (2001). Disease emergence in birds: challenges for the twenty-first century. The Auk, 118(2): 290-303.
- Fulton, RM. and Sanchez, S. (2020). Tuberculosis. In: Other Bacterial Diseases, Tuberculosis. In David E.S. editor. Disease of Poultry. 14th ed., Blackwel Publishing, pp: 1033-1043.
- Fulton, R.M. and Thoen, C.O. (2003). Tuberculosis, In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, F.M., Mc Dougald, L.R. and Swayne, D.E. editors. Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp: 836-844.

- Ghadiri, K., Izadi, B., Afsharian, M., Rezaei, M. and Namdari, S. (2006). Evaluation of diagnostic value of serological tests (IgA, IgG, IgM) in the diagnosis of tuberculosis in Kermanshah in 2003-2005. Journal of Infectious and Tropical Diseases affiliated to the Association of Infectious and Tropical Diseases Specialists, 35(11): 55-58. [In Persian]
- Gholoobi , A., Masoudi-Kazemabad, A., Meshkat , M. and Meshkat, Z. (2014). Comparison of Culture and PCR Methods for Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in Different Clinical Specimens. Jundishapur Journal of Microbiology, 7(2): e8939.
- Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer T. and Telenti, A. (1995). A novel insertion element from Mycobacterium avium, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. Journal of Clinical Microbiology, 33(2): 303-304.
- Hawkey, C., Kock, RA., Henderson, GM. and Cindery, RN. (1990). Hematological changes in domestic fowl (Gallus gallus) and cranes (Gruiformes) with Mycobacterium avium infection. Avian Pathology, 19: 223-234.
- Huard, R.C., Lazzarini, L.C., Butler, W.R. and Van soolingen, D. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions. Journal of Clinical Microbiology, 41(4): 1637-1650.
- Izadi, H., Sohrabi, N., Tebyanian, M., Musouri, N. and Mahdavi, M. (2015). Evaluation of serum levels of specific antibodies against recombinant ESAT-6 antigen in patients with tuberculosis compared with healthy individuals. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 4(6): 474-480. [In Persian]
- Jabbarzadeh, I. and Seifi, M. (2010). Rapid identification of different species of Mycobacterium in tuberculosis. Journal of Veterinary Clinical Research. 1(2): 5-13. [In Persian]
- Jorgensen, J.P. (1978). Serological investigation of strains of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare isolated from animal and non-animal sources. Nordisk Veterinary Medicine, 30(4-5): 150-162.
- Kaevska, M., Slana, I., Kralik, P. and Pavlik, I. (2010). Examination of Mycobacterium avium subsp. avium distribution in naturally infected hens by culture and triplex quantitative real time PCR. Veterinarni Medicina, 55(7): 325-330.
- Kriz, P., Slana, I., Mrlik, V., Moravkova, M., Kralova, A., Krizova, K., *et al*. (2010). Mycobacterium avium subsp. avium in domestic pigeons (Columba livia f. domestica) diagnosed by direct conventional multiplex PCR: a case report. Veterinarni Medicina, 55(2): 87-90.
- Kunze, Z.M., Wall, S., Appelberg, R., Silva, M.T., Portales, F. and Mcfadden, J.J. (1991). IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in Mycobacterium avium. Molecular Microbiology, 5(9): 226-227.
- Mayahi, M., Mosavari, N., Esmaeilzadeh, S. and Asadollahi, P.K. (2013). Comparison of four different culture media for growth of Mycobacterium avium subsp. avium isolated from naturally infected lofts of domestic pigeons. Iranian Journal of Microbiology, 5(4): 379-382.
- Movassaghi, A.R., Haghshenas, K.H. and Farzin, H.R. (2010). Granulomatous dermatitis caused by Mycobacterium Spp. in pigeons (first report). 4th Iranian Congress of Clinical Microbiology, pp: 9-11.
- Nouri, M., Azarabad, H. and Moeini Jazani, M. (2012). Cutaneous tuberculosis, coccidiosis, cestode infection, and trichoepithelioma in a columba pigeon (Columba livia). Second National Congress of Veterinary Laboratory Sciences. pp: 251. [In Persian]
- O'Brien, A., Clare W., Clarke, J.B., Hayton, A., Watt, N.J. and Harkiss, G.D. (2017). Serological Analysis of Tuberculosis in Goats by Use of the Enferplex Caprine TB Multiplex Test. Clinical and Vaccine Immunology, 24(2): e00516-518.
- Pavlas, M., Michalska, A. and Hunady, M. (1992). Diagnosis of avian tuberculosis-mycobacteriosis by rapid agglutination. Acta Veterinaria Brno, 62(1): 63-69.
- Pesek, L. (1998). Zoonotic Diseases (Birds -Humans): Avian Tuberculosis, Bird to Human Transmission. Pet Bird Magazine.

- Phalen, D.N., Grimes J.E. and Phalen, S.W. (1995). Serologic diagnosis of mycobacterial infections in birds (a preliminary report). Proceeding of the Association of Avian Veterinarians, 40: 67-73.
- Sattar, A., Zakaria, Z., Abu, J., Saleha A, A. and Gabriel, RP. (2021). Isolation of Mycobacterium avium and other nontuberculous mycobacteria in chickens and captive birds in peninsular Malaysia. BMC Veterinary Research, 17(13): 1-13.
- Shitaye, J.E., Matlova, L., Horvathova, A., Moravkova, M., Dvorska-Bartosova, L., Trcka, I., *et al*. (2008a). Diagnostic testing of different stages of avian tuberculosis in naturally infected hens (Gallus domesticus) by the tuberculin skin and rapid agglutination tests, faecal and egg examinations. Veterinarni Medicina, 53(2): 101-110.
- Shitaye, J.E., Matlova, L., Horvathova, A., Morvathova, M., Dvorska-Bartosova, L., Treml, F., *et al*. (2008b). Mycobacterium avium subsp. avium distribution studied in a naturally infected hen flock and in the environment by culture, serotyping and IS901 RFLP methods. Veterinary Microbiology, 127(1-2): 155-164.
- Singhla, T., Boonyayatra, S., Chulakasian, S., Lukkana, M., Alvarez, J., Sreevatsan S., *et al*. (2019). Determination of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis screening tests in dairy herds in Thailand using a Bayesian approach. BMC Veterinary Research, 15(149): 1-7.
- Taroudizadeh, Y. and Imani Fouladi, A.A. (2012). Investigation of underlying and environmental factors causing tuberculosis. Scientific Journal of the Medical System Organization of the Islamic Republic of Iran. 30(4): 335-340. [In Persian]
- Tell, L.A., Woods, L. and Cromie, R.L. (2001). Mycobacteriosis in birds. "Avian tuberculosis in birds". Review Science and Technology office Internationale des Epizooties, 20(1): 180-203.
- Thoen, C.O., Armbrust, A.L. and Hopkins, M.P. (1979): Enzyme- linked immunosorbent assay for detecting antibodies in swine infected with Mycobacterium avium. American Journal of Veterinary Research, 40(8): 1096-1099.
- Van der Heyden, N. (1997). Mycobacterial infections: new strategies in the treatment of avian mycobacteriosis. Seminars in Avian Exotic Pet Medicine, 6(1): 25-33.
- Van Soolingen, D., de Haas, P.E.W. and Kremer, K. (2002). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Typing of Mycobacteria. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, 54: 165-203.
- Velayati, A.A. (1977). Tuberculosis Disease. Vol. 1, 1st ed., University Publication Center: 1-908. [In Persian]
- Wobeser, G.A. (1997). Tuberculosis. Diseases of Wild Waterfowl. 2nd ed., New York, N.Y. Plenum Press, pp: 71-75.
- Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifis, T., McCormick, B.S., *et al*. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Veterinary Microbiology, 31(1): 71-79.