

مطالعه کارآیی روش تشخیصی آزمایش مستقیم میکروبی، PCR IS900 و کشت میکروبی در تشخیص باکتری مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در مدفوع گاوهای به ظاهر سالم

یونس انزابی^{۱*}، صمد فراشی بناب^۲، غلامعلی مقدم^۳

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی و ایمنونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: anzabi_y_576@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۲۹، پذیرش نهایی: ۸۸/۱/۳۱)

چکیده

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس نوعی آنتریت گرانولوماتوزی مزمن در نشخوارکنندگان با عامل مسبب مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (MAP) می‌باشد و خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت دامپروری به خصوص گاوداری شیری در سراسر دنیا وارد می‌کند. تشخیص MAP در نمونه‌های بالینی با روش کشت میکروبی به عنوان روش استاندارد طلایی به ۱۶-۶ هفته زمان نیاز دارد. از طرف دیگر شناسایی سریع و دقیق گاوهای دفع کننده میکروب فوق در مدفوع برای کنترل موفق بیماری در گله لازم است. در این تحقیق، بر روی مدفوع ۱۰۰ رأس گاو به ظاهر سالم از گاوداری‌های صنعتی تبریز با سابقه بیماری یون، آزمایش مستقیم میکروبی با رنگ آمیزی ذیل نلسن، کشت میکروبی در محیط زرده تخم مرغ هرولد و دو روش direct PCR بر پایه عنصر IS900 انجام شد. در آزمایش مستقیم میکروسکوپی ۷ نمونه (۷ درصد)، در کشت میکروبی ۱۴ نمونه (۱۴ درصد)، در PCR با جفت پرایمر ۱۵ F90/F91 نمونه (۱۵ درصد) و در PCR با جفت پرایمر ۲۵ FP20/FP26 نمونه (۲۵ درصد) مثبت ثبت شدند. این نتایج نشان داد روش PCR تعداد موارد مثبت بیشتری را شناسایی می‌کند، بنابراین می‌توان از آن برای شناسایی سریع و در عین حال دقیق تر گاوهای دفع کننده MAP در مدفوع استفاده کرد. هم چنین نوع پرایمر در حساسیت تست PCR نقش مهمی ایفا می‌کند.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۷، دوره ۲، شماره ۴، ۳۱۷-۳۰۹.

کلمات کلیدی: بیماری یون، آزمایش مستقیم میکروبی، کشت مدفوع، PCR، مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس

مقدمه

بیماری یون (Johne) یا پاراتوبرکلوزیس (Paratuberculosis) نوعی آنتریت گرانولوماتوزی مزمن می‌باشد که توسط باکتری مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium* subsp.)

بیماری یون (Johne) یا پاراتوبرکلوزیس (Paratuberculosis) ایجاد می‌شود (۲۱). MAP یک باکتری اسیدفست (acid fast)، وابسته به مایکوباکتین (mycobactin) و بسیار کند رشد بوده و تمایل به تشکیل توده دارد (۶ و ۱۶). بیماری در سراسر دنیا اتفاق می‌افتد و از

بیماری یون (Johne) یا پاراتوبرکلوزیس (Paratuberculosis) نوعی آنتریت گرانولوماتوزی مزمن می‌باشد که توسط باکتری مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium* subsp.)

عوامل مهم مرگ و میر در نشخوارکنندگان به خصوص گاو می باشد و خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت دامپروری وارد می کند. بیماری در گاو در کشورهای در حال توسعه اندمیک است (۳۷). در ایران در اکثر استان های کشور وجود بیماری به اثبات رسیده است (۱ و ۳۰).

فرم بالینی بیماری با اسهال پایدار، کاهش وزن، کاهش تولید شیر و در نهایت مرگ یا حذف زودرس دام از گله مشخص می شود (۳۷). در گاو با توجه به طولانی بودن دوره کمون بیماری معمولاً علائم درمانگاهی تا قبل از دو سالگی ظاهر نمی شود و بروز علائم در سنین ۶-۲ سالگی معمول است. دوره بیماری از هفته ها تا ماه ها متغیر است ولی همیشه منجر به دهیدراتاسیون، لاغری و ضعف می شود (۱). علاوه بر زیان های اقتصادی (در اثر کاهش وزن، کاهش تولید شیر، کاهش بازده تولید مثلی و افزایش مرگ و میر) (۲۱)، برخی از محققین معتقدند ارتباط احتمالی بین باکتری عامل بیماری یون و بیماری کرون (Crohn) انسان وجود دارد (۱۵، ۲۹ و ۳۲).

اکثر حیوانات در اوایل زندگی آلوده می شوند و راه انتقال عفونت عمدتاً راه مدفوعی-دهانی (faecal-oral) است (۲۳). باکتری در مدفوع و شیر گاوهای آلوده دفع می شود. حتی گاوهای آلوده ممکن است از ۱۸ ماه قبل از بروز علائم بالینی باکتری را دفع کنند و گاوهای مبتلا به فرم بالینی می توانند تا ۱۰^{۱۲} سلول MAP را در مدفوع دفع کنند (۳، ۵ و ۷). بنابراین شناسایی گاوهای دفع کننده عامل یون در مدفوع برای جلوگیری از گسترش عفونت در گله لازم و ضروری می باشد. در گذشته کشت مدفوع را حساس ترین، اختصاصی ترین و معمول ترین روش برای تشخیص فرم بالینی و تحت بالینی بیماری گاو در نظر می گرفتند. اگرچه هنوز هم این روش ابزار قدرتمندی برای کنترل بیماری در این حیوان محسوب می شود، استفاده گسترده از آن به دلیل پرهزینه و وقت گیر بودن محدود شده است (۱۱ و ۲۷). تشخیص سریع MAP با روش آزمایش مستقیم میکروسکوپی (Direct microscopic test) قابل

انجام است (۱۳، ۲۱ و ۳۸). در سال های اخیر PCR هم برای تشخیص باکتری مذکور توسعه یافته است (۳۳ و ۳۶). در این مطالعه کارایی سه روش کشت میکروبی، آزمایش مستقیم میکروسکوپی و PCR در تشخیص MAP در مدفوع گاو بررسی شده است. برای انجام PCR از دو روش direct PCR (PCR مستقیم) بر پایه عنصر IS۹۰۰ استفاده شد. IS۹۰۰ قطعه نوکلئوتیدی به طول ۱۴۵۱ جفت باز است که تصور می شود برای MAP اختصاصی باشد (۱۰).

مواد و روش کار

نمونه مدفوع ۱۰۰ رأس گاو به ظاهر سالم از تعدادی گاوداری صنعتی تبریز که سابقه بیماری یون در پرونده بهداشتی آن گاوداری ها در ۳-۲ سال گذشته ثبت شده بود، جمع آوری و به آزمایشگاه ارسال شد. جمع آوری نمونه ها از رکتوم انجام می شد.

رنگ آمیزی ذیل نلسن: گسترش های میکروبی تهیه شده از مدفوع با تکنیک ذیل نلسن رنگ آمیزی شدند و از نظر وجود باکتری های اسیدفست با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی شدند. وجود باسیل های اسیدفست که به تعداد زیاد و به صورت کلامپ (مجتمع) مشاهده می شدند نشانه مثبت بودن آزمایش بود (۳۸).

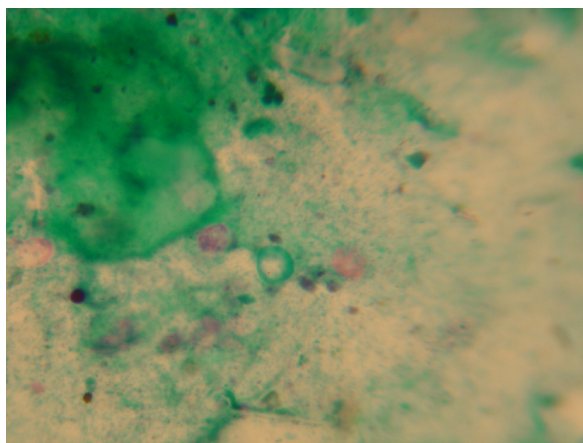
کشت میکروبی: ۱ گرم مدفوع با ۲۰ میلی لیتر هگزادسیل پریدنیوم کلراید (Hexadecyl Pridinium Chloride) ۰/۷۵ درصد آلوده زدایی می شد (در دمای آزمایشگاه و به مدت ۱۸ ساعت). محلول آلوده زدایی شده را به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتریفوژ کرده و ۰/۱ میلی لیتر رسوب حاصله جهت کشت در محیط زرده تخم مرغ هرولد (Herrolds' egg yolk media) به کار می رفت. از هر نمونه مدفوع در چهار محیط کشت مذکور کشت داده شد که سه تا از محیط های کشت واجد مایکوباکتین J (۲mg/۱۰۰۰ ml) یا چند برابر عصاره کشت خالص مایکوباکتریوم فلئی (M. phlei) و لوله چهارم فاقد آن بود. لوله ها به مدت ۱۶ هفته در ۳۷ °C انکوبه

پس از اتمام PCR، محصولات PCR در ژل ۱ درصد آگار الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) (۵/۰ μg/ml) ژل زیر اشعه UV بررسی می‌شد. اندازه محصول PCR با جفت پرایمر F۹۰/F۹۱ ۴۰۰ جفت‌باز (bp) و اندازه محصول PCR با جفت پرایمر FP۲۵/FP۲۶ ۲۲۸ جفت‌باز می‌باشد. به عنوان کنترل منفی از آب مقطر استریل و به عنوان کنترل مثبت از MAP تأیید شده استفاده شد.

آنالیز آماری: جهت مشخص کردن میزان توافق (agreement) تست‌های مورد استفاده در این تحقیق از تست Kappa استفاده شد.

نتایج

در آزمایش مستقیم میکروسکوپی ۷ نمونه، در کشت میکروبی ۱۴ نمونه، در PCR با جفت پرایمر F۹۰/F۹۱ ۱۵ نمونه و در PCR با جفت پرایمر FP۲۵/FP۲۶ ۲۵ نمونه مثبت ثبت شدند (نمودار ۱). تصاویری از آزمایش مستقیم میکروسکوپی مثبت و کشت میکروبی مثبت (نگاره‌های ۱-الف و ۱-ب) و الکتروفورز مربوط به هر دو جفت پرایمر (نگاره ۲) نشان داده شده است.



نگاره ۱-الف: آزمایش مستقیم میکروسکوپی مثبت مدفوع با رنگ‌آمیزی ذیل‌نلسن

شدند. پس از اتمام دوره رشد و تشکیل پرگنه‌های باکتری‌ها، پرگنه‌های MAP با بررسی مشخصات پرگنه‌ها، رشد باکتری فقط در محیط‌های واجد مایکوباکتین و تهیه گسترش میکروبی و رنگ‌آمیزی ذیل‌نلسن تأیید می‌شدند (۱۴).

استخراج DNA: با استفاده از لیزوزیم، SDS، پروتئیناز K و CTAB (N-cetyl-N, N, N-trimethyl ammonium bromide) مطابق پروتکل اقدام به استخراج DNA از رسوب شد (۳۴).

PCR دو روش direct PCR با دو جفت پرایمر F۹۰/F۹۱ و FP۲۵/FP۲۶ (ساخت شرکت طوبی‌نگین-تهران) بر روی هر نمونه انجام شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها به شرح زیر می‌باشد (۲۴):

P۹۰: 5'-GTTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3'/

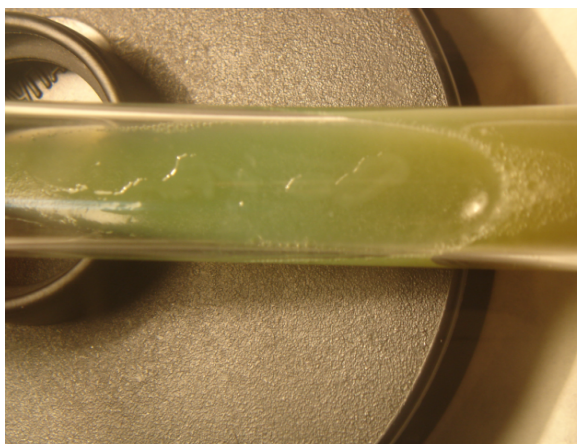
P۹۱: 5'-GAGGTTCGATCGCCCACGTGA-3'

FP۲۵: 5'-CCAGGGACGTCGGGTATGGC-3'/

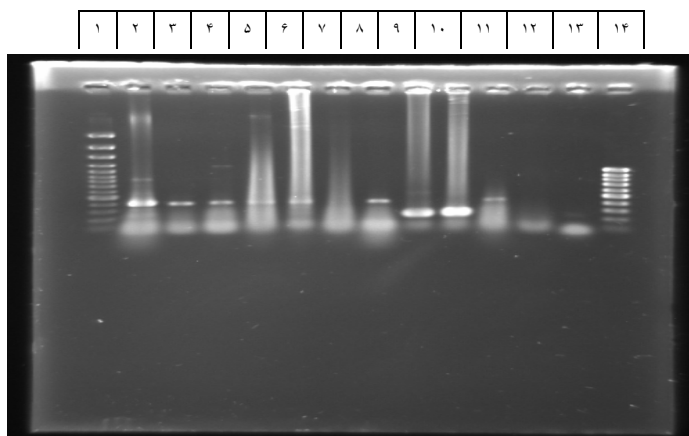
FP۲۶: 5'-GGTCGGCCTTACCGGCGTCC-3'

PCR mix (حجم ۵۰ μl) برای جفت پرایمر F۹۰/F۹۱ عبارت بود از: ۲۰۰ μM dNTP mix، ۲/۵ mM MgCl₂، ۵۰ mM KCl، ۲۰ mM Tris-Cl (PH=۸/۴)، ۱ μl از هر پرایمر، ۲ واحد DNA پلیمرز Taq (شرکت طوبی‌نگین، تهران) و ۱۰۰ ng DNA الگو و برنامه PCR عبارت بود از: ۹۴°C/۵' (مرحله واسرشتگی اولیه)، ۳۵ چرخه: ۹۴°C/۴۰' و ۶۵°C/۱' و ۷۲°C/۱' (مرحله گسترش نهایی).

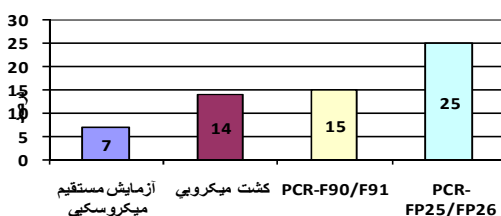
PCR mix (حجم ۵۰ μl) برای جفت پرایمر FP۲۵/FP۲۶ شامل ۲۰۰ μM dNTP mix، ۲ mM MgCl₂، ۵۰ mM KCl، ۲۰ mM Tris-Cl (PH=۸/۴)، ۱ μl از هر پرایمر، ۲ واحد DNA پلیمرز Taq (شرکت طوبی‌نگین، تهران) و ۱۰۰ ng DNA الگو بود. برنامه PCR به قرار زیر بود: ۹۴°C/۴۰' (مرحله واسرشتگی اولیه)، ۳۵ چرخه: ۹۴°C/۳۰' و ۷۰°C/۳۰' و ۷۲°C/۴۰' (مرحله گسترش نهایی).



نگاره ۱-ب: کشت مثبت در محیط زرده تخم مرغ هرولد حاوی میکوباکتین



نگاره ۲- عکسی از ژل الکتروفورز مربوط به PCR با جفت پرایمرهای F۹۰/F۹۱ و FP۲۵/FP۲۶ در این شکل ردیف ۱ (از چپ به راست) سایز مارکر ۱۰۰bp شرکت Plus Fermentas (به ترتیب از بالا به پایین شامل باندهای با اندازه ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۳۱، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ جفت باز)، ردیف ۱۴ سایز مارکر ۱۰۰bp شرکت Fermentas (به ترتیب از بالا به پایین شامل باندهای با اندازه ۱۰۳۱، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۸۰ جفت باز) و در ردیف‌های ۶-۲، ۸ و ۱۱ محصول ۴۰۰bp مربوط به جفت پرایمر F۹۰/F۹۱ و در ردیف‌های ۹ و ۱۰ محصول ۲۲۸ bp مربوط به جفت پرایمر FP۲۵/FP۲۶ و در ردیف‌های ۷، ۱۲ و ۱۳ جواب منفی مشاهده می‌شود.



نمودار ۱- نتایج به دست آمده از آزمایش مستقیم میکروسکوپی، کشت میکروبی و PCR در تشخیص MAP در مدفوع گاوهای به ظاهر سالم (n=۱۰۰)

با جفت پرایمر F90/F91 کامل و با PCR با جفت پرایمر FP25/FP26 متوسط بود. توافق دو روش PCR هم متوسط بود (جدول ۱).

توافق آزمایش مستقیم میکروسکوپی با کشت میکروبی متوسط، با PCR با جفت پرایمر F90/F91 متوسط و با PCR با جفت پرایمر FP25/FP26 نسبی بود. توافق کشت میکروبی با PCR

جدول ۱- توافق آزمایش مستقیم میکروسکوپی، کشت میکروبی و PCR در تشخیص MAP در مدفوع گاوهای به ظاهر سالم

| دو روش | کشت میکروبی با PCR با جفت- پرایمر FP25/FP26 | کشت میکروبی با PCR با جفت- پرایمر F90/F91 | آزمایش مستقیم میکروسکوپی با PCR با جفت- پرایمر FP25/FP26 | آزمایش مستقیم میکروسکوپی با PCR با جفت- پرایمر F90/F91 | آزمایش مستقیم میکروسکوپی با کشت میکروبی | آزمایش‌ها |
|--------|---|---|--|--|---|-----------|
| PCR | ۰/۶۹ | ۰/۶۵ | ۰/۳۶ | ۰/۵۹ | ۰/۶۳ | توافق (K) |

بر روی محیط کشت زرده تخم مرغ هرولد است ولی به علت کند رشد بودن MAP کشت مدفوع فرآیندی وقت گیر است به طوری که جداسازی این باکتری از مدفوع با روش‌های متداول کشت ۱۶-۶ هفته طول می‌کشد (۲۷). هم‌چنین علی‌رغم اعمال روش‌های آلوده‌زدایی، اغلب کشت‌ها به دلیل آلودگی از دست می‌روند (۱۹ و ۳۶) و حتی به کار بردن روش‌های آلوده‌زدایی قبل از کشت به خاطر تأثیر روی سلول‌های MAP می‌تواند به کسب نتایج منفی کاذب منجر شود (۲۸). در تعدادی از

بحث و نتیجه‌گیری

کنترل بیماری یون به علت فقدان یک روش تشخیصی مناسب که قادر به شناسایی هم حیوانات مبتلا به فرم بالینی و هم حیوانات مبتلا به فرم تحت بالینی بیماری باشد دشوار است (۳۵) و حساسیت پایین تست‌های تشخیصی از مهم‌ترین موانع در کنترل بیماری یون محسوب می‌شود (۲۰). تست استاندارد طلایی (Golden standard) برای بیماری یون کشت مدفوع

مطالعات حساسیت پایین کشت مدفوع مشخص شده و این روش قادر به شناسایی همه حیوانات مبتلا به فرم تحت‌بالینی بیماری که از منابع مهم عفونت گله و آلودگی محیط هستند نبوده است (۲۲، ۲۵ و ۲۷). در این مطالعه هم حساسیت کشت مدفوع پایین بود (در مقایسه با PCR) و در ضمن به علت طولانی شدن انکوباسیون محیط‌های کشت گاهی آلودگی ثانویه و حتی خشک شدن و ناکارآمد شدن محیط کشت رخ می‌داد که احتمالاً در ثبت نتایج واقعی تأثیر گذاشته است.

تشخیص MAP به روش آزمایش مستقیم میکروسکوپی هم انجام می‌شود ولی در مورد حساسیت و ویژگی روش مستقیم تردید وجود دارد و تفریق عامل بیماری یون از سایر اجرام اسیدفسست موجود در مدفوع مشکل می‌باشد (۲۱ و ۳۸). تعدادی از گزارشات نشان داده‌اند آزمایش مستقیم گسترش‌های مدفوعی پس از رنگ‌آمیزی ذیل‌نلسون ابزار تشخیصی قابل اطمینانی نیست (۱۸). در مطالعه انجام شده توسط Glanemann (۲۰۰۳) حساسیت و ویژگی روش آزمایش مستقیم میکروسکوپی در مدفوع در مقایسه با کشت به ترتیب ۵۴/۴ و ۷۳ درصد بود (۱۳). در این مطالعه هم که کمترین تعداد موارد مثبت در آزمایش مستقیم میکروسکوپی به دست آمد حساسیت پایین این روش تأیید شد. به این دلایل این روش اگرچه ارزان است ولی به تنهایی برای تشخیص دقیق توصیه نمی‌شود.

برای تشخیص MAP تست‌های سرولوژیکی مختلفی از قبیل ایمونودیفوزیون در ژل آگار (AGID)، تثبیت کمپلمان (CFT)، تست جلدی با یونین، اندازه‌گیری اینترفرون گاما و الیزا (ELISA) ابداع شده‌اند ولی حساسیت و ویژگی این تست‌ها متفاوت گزارش شده و حساسیت یا ویژگی پایینی داشته‌اند و حتی در مواردی گزارش شده از کشت مدفوع حساسیت کمتری داشتند (۲۵، ۲۷، ۳۱ و ۳۶).

در سال‌های اخیر روش‌های مختلف PCR بر پایه IS900 برای تشخیص MAP در نمونه‌های بالینی (مدفوع، نمونه‌های

بافتی، بافی‌کت و شیر) استفاده شده است (۲، ۷، ۱۲، ۲۴ و ۳۶). Huntley و همکاران (۲۰۰۵) از کشت مدفوع، کشت بافت‌ها (مقاطع ایلئوم و ژورنوم، عقده‌های لنفوی ایلئوسکال و مزانتریک)، PCR بافت‌ها بر پایه عنصر IS900، رنگ‌آمیزی ذیل‌نلسن، رنگ‌آمیزی فلورسنت اورامین O/آکریدین ارنژ و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بافت‌ها برای تشخیص MAP در ۱۴ گاو میش آمریکایی (American bison) مشکوک به بیماری یون استفاده کردند که داده‌ها نشان داد تشخیص MAP بر پایه DNA (PCR) حساس‌تر از کشت مدفوع، کشت بافت و رنگ‌آمیزی بافت در تشخیص عفونت در گاو میش آمریکایی بود (۱۶).

Dieguez و همکاران (۲۰۰۷) از کشت مدفوع، چهار نوع کیت الیزای سرم در دسترس (تجاری) و PCR بر پایه IS900 برای تشخیص عفونت MAP در ۳۹۶ گاو از چهار گله گاو شیری با سابقه بیماری بالینی یون استفاده نمودند. نتایج نشان داد هیچ‌یک از روش‌های الیزای سرم، کشت مدفوع و PCR توانایی تشخیص زودهنگام MAP در گاوهای شیری را ندارند (۷). Singha و همکاران (۲۰۰۷) از کشت مدفوع، الیزای شیر، کشت شیر و PCR مدفوع برای تشخیص بیماری یون در ۲۶ گاو شیری استفاده نمودند. حساس‌ترین روش به ترتیب کشت شیر (۹۶/۱۵٪)، کشت مدفوع (۸۶/۶٪)، الیزای شیر (۷۶/۹٪) و PCR IS900 (۲۳٪) بود. در بین چهار روش، PCR کم حساس‌ترین ولی ۱۰۰٪ اختصاصی بود. علت پایین بودن حساسیت PCR در این مطالعه می‌تواند به علت عدم تهیه DNA الگوی مناسب باشد (۳۳). Clark و همکاران (۲۰۰۸) از کشت مدفوع، الیزای سرم و PCR مدفوع برای تشخیص MAP در ۲۵۰ گاو که وضعیت آن‌ها از نظر بیماری یون نامشخص بود استفاده کردند. با کشت مدفوع ۲۶/۸٪، با الیزای سرم ۱۰٪ و با PCR مدفوع ۲۹/۶٪ مثبت تشخیص داده شد (۴). Irengue و همکاران (۲۰۰۸) از آزمایش مستقیم میکروسکوپی، کشت میکروبی و real time PCR برای

شد. PCR (مخصوصاً با جفت پرایمر FP۲۵/FP۲۶) نسبت به آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت میکروبی موارد مثبت بیشتری را نشان داد. با توجه به این نتایج و توافق بین تست‌ها؛ PCR می‌تواند به عنوان یک روش سریع و دقیق‌تر، جایگزینی برای روش‌های متداول تشخیص MAP در مدفوع گاوها باشد. اگرچه توافق بین هر دو روش PCR مناسب بود ($K=0/69$) ولی PCR با جفت پرایمر F۹۰/F۹۱ نتیجه‌ای شبیه به کشت و کمی بهتر از آزمایش مستقیم میکروسکوپی نشان داد، بنابراین PCR با این جفت پرایمر جایگزین مناسبی برای روش‌های متداول تشخیص MAP در مدفوع گاوها نیست و انتخاب نوع پرایمر در افزایش حساسیت تست PCR اهمیت زیادی دارد.

تشخیص MAP در نمونه‌های مدفوعی گوساله‌های آلوده شده به صورت تجربی با MAP استفاده کردند و *real time* PCR حساسیت بالاتری از آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت میکروبی نشان داد (۱۸). Pinedo و همکاران (۲۰۰۸) ارتباط بین نتایج به دست آمده از کشت مدفوع، الایزای سرم و PCR آشیانه‌ای را در تشخیص MAP در شیر، خون و مدفوع گاوهای شیری ($n=328$) بررسی نمودند. بیشترین توافق برای کشت مدفوع و PCR مدفوع و کمترین توافق برای PCR خون و الایزا به دست آمد (۲۶). در تحقیق حاضر هم که از روش کشت میکروبی، آزمایش مستقیم میکروسکوپی و دو روش PCR بر پایه IS۹۰۰ برای تشخیص MAP در مدفوع گاوهای به ظاهر سالم استفاده

فهرست منابع

۱. طباطبائی، ع.ح. و فیروزی، ر. (۱۳۸۰): بیماری‌های باکتریائی دام. انتشارات دانشگاه تهران- صفحات: ۴۲۳-۴۱۴.
2. Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbudde, S., Novak, M., and Mikula, I. (2006). IS900 PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from buffy coat of cattle and sheep. *Veterinary Microbiology*. 112: 33-41.
3. Clarke, C.J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol*. 116: 217-261.
4. Clark, D.L.Jr., Koziczkowski, J.J., Radcliff, R.P., Carlson, R.A., and Ellingson, J.L.E. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis: Comparing Fecal Culture Versus Serum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Direct Fecal Polymerase Chain Reaction. *J. Dairy Sci*. 91: 2620-2627.
5. Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., and Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev*. 7: 328-345.
6. Corti, S., and Stephan, R. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol*. 2: 15.
7. Crossley, B.M., Zagmutt-Vergara, F.J., Fyock, T.L., Whitlock, R.H., and Gardner, I.A. (2005): Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 107: 257-263.
8. Dieguez, F.G., Gonzalez, A.M., Menendez, S., Vilar, M.J., Sanjuan, M.L., Yus, E., and Arnaiz, I. (2007). Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in dairy cows. *The Veterinary Journal*. 56: 243-252.
9. Englund, S., Bolske, G., Ballagi-Pordany, A., and Johansson, K.E. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Veterinary Microbiology*. 81: 257-271.
10. Englund, S., Bolske, G., and Johansson, K.E. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *FEMS Microbiology Letters*. 209: 267-271.
11. Garrido, J.M., Cortabarria, N., Oguiza, J.A., Aduriz, G., and Juste, R.A. (2000). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 77: 379-386.
12. Giese, S.B., and Ahrens, P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Veterinary Microbiology*. 77: 291-297.

13. Glanemann, B. (2003). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss Dairy Cattle by Culture and Serology. *internet*, xxxxx, 1-20.
14. Greenstein, R.J. (2003). Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *THE LANCET Infectious Diseases*. 3: 507-514.
15. Greenstein, R.J.; Collins, M.T. (2004). Emerging pathogens: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zoonotic? *Lancet*. 31 (364): 396-397.
16. Harris, N.B. and Barletta, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 489-512.
17. Huntley, J.F.J., Whitlock, R.H., Bannantine, J.P., and Stabel, J.R. (2005): Comparison of Diagnostic Detection Methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in North American Bison. *Vet Pathol*. 42: 42-51.
18. Ireng, L.M., Walravens, K., Govaerts, M., Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K., and Gala, J. (2008): Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* sub sp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Veterinary Microbiology*. xxx: xxx-xxx.
19. Klausen, J., Huda, A., Ekeroth, L., and Ahrens, P. (2003). Evaluation of serum and milk ELISAs for *paratuberculosis* in Danish dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. 58: 171-178.
20. Kudahl, A.B., Sorensen, J.T., Nielsen, S.S., and Ostergaard, O. (2007). Simulated economic effects of improving the sensitivity of a diagnostic test in *paratuberculosis* control. *Preventive Veterinary Medicine*. 78: 118-129.
21. Lilenbaum, W., Marassi, C.D., and Oelemann, W.M.R. (2007). *Paratuberculosis*: an update. *Braz. J. Microbiol.* 38: 580-590.
22. Nielsen, S.S., and Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of *paratuberculosis*: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*. 129: 217-235.
23. Manning, E.J.B., and Collins, M.T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20: 133-150.
24. Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., and Hermon-Taylor, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3446-3452.
25. Pillai, S.R., and Jayarao, B.M. (2002). Application of IS900 PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Directly from Raw Milk. *J. Dairy Sci.* 85: 1052-1057.
26. Pinedo, P.J., Rae, D.O., Williams, J.E., Donovan, G.A., Melendez, P. and Buergelt, C.D. (2008). Association among Results of Serum ELISA, Faecal Culture and Nested PCR on Milk, Blood and Faeces for the Detection of *Paratuberculosis* in Dairy Cows. *Transboundary and Emerging Diseases*. 55 (2): 125-133.
27. Rajeev, S., Zhang, Y., Sreevatsan, S., Motiwala, A.S., and Byrum, B. (2005). Evaluation of multiple genomic targets for identification and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates using real-time PCR. *Veterinary Microbiology*. 105: 215-221.
28. Reddacliff, L.A., Vadali, A., and Whittington, R.J. (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95: 271-282.
29. Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J.F. and Naser, S.A. (2005). Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11: 116-125.
30. Shamoradi, A.H., Arefpajohi, R., Tadayon, K., and Mosavari, N. (2008). *Paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle farms in Central Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* 40: 169-17.
31. Sharma, G., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.G., Juste, R.A., et al. (2008). Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johne's disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. *Research in Veterinary Science*. 84: 30-37.
32. Singh, A.V., Singh, S.V., Makharia, G.K., Singh, P.K., and Sohal, J.S. (2007). Presence and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical and suspected cases of Crohn's disease and in the healthy human population in India. *Int. J. Infect. Dis.* 18: 254-258.
33. Singha, S.V., Singha, A.V., Singhb, R., Sandhub, K.S., Singha, P.K., Sohal, J.S., et al. (2007). Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal-PCR for the diagnosis of bovine Johne's disease (BJD) in India. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 30: 175-186.
34. Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Loch, C., Supply, P., Rastogi, N. (2003). Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, genetics and evolution*. 3: 125-133.

35. Stabel, J.R., Bosworth, T.L., Kirkbride, T.A., Forde, R.L., and Whitlock, R.H. (2004). A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 16: 22–30.
36. Taddei, S., Robbi, C., Cesena, C., Rossi, I., Schiano, E., Arrigoni, N., Vicenzoni, G. and Cavarani, S. (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction–based diagnostic tests with a conventional culture method. *J Vet Diagn Invest.* 16: 503–508.
37. Wells, S.J., Collins, M.T., Faaberg, K.S., Wees, K., Tavorpanich, S., Petrini, K.R., Collins, J.E., Cernicchiaro, N., and Whitlock, R.H. (2006). Evaluation of a Rapid Fecal PCR Test for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Dairy Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology.* 13 (10): 1125–1130.
38. Zimmer, K., Drager, K., Klawonn, W., and Hess, R. (1996). Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl–Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. [B].* 46 (2): 137–140.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 2,4:309-317, 2009

Efficiency of direct microbial diagnosis, IS900 PCR and microbial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in the feces of apparently healthy cattle

Anzabi, Y.^{1*}, Farashi Bonab, S.², Moggaddam, Gh.A.³

1-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

2-Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author's email: anzabi_y_576@yahoo.com

(Received: 18 JAN 2009, Accepted: 20 APR 2009)

Abstract

Johne's disease or paratuberculosis is a chronic granulomatous enteritis in ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). The disease is responsible for significant economic losses in dairy industry worldwide. Microbial culture as a golden standard test for detection of MAP in faecal specimens requires 6-16 weeks to complete, whereas accurate and rapid identification of cattle shedding MAP in their feces is essential for successful control of the disease in herds. In the present study, direct microbial diagnosis by Ziehl-Neelsen acid-fast staining, microbial culture on Herrolds' egg yolk media and two IS900 direct PCR assays were carried out on 100 fecal specimens of apparently healthy cattle collected from dairy herds of Tabriz with a history of Johne's disease. The number of positive specimens identified by the direct microbial diagnosis, microbial culture and PCR with F90/F91 and FP25/FP26 primers were 7 (7%), 14 (14%), 15(15%) and 25(25%) respectively. These results indicated that PCR detected more positive cases therefore it can be employed for rapid and accurate diagnosis of cattle shedding MAP in their feces and the type of primer used has a significant role in the sensitivity of this test. Direct microbial diagnosis by Ziehl-Neelsen acid-fast staining identified 7 (7%) specimens, two IS900 direct PCR assays identified 15 (15%) and 25 (25%) specimens, respectively, and microbial culture identified 7 (7%) specimens as positive. Collectively, these data indicate that PCR detection of MAP was more sensitive than direct microbial diagnosis by Ziehl-Neelsen acid-fast staining or faecal culture, especially if appropriate primers were used.

Keywords: Johne's disease, faecal culture, direct microbial diagnosis, PCR, *Mycobacterium avium* subsp, paratuberculosis