

## بررسی عیار سرمی آنتی‌بادی ضد مایکوباکتریوم اوویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس به روش الایزا در گاوهای شیری هلستاین

یاور حیدرزاده آسیابی<sup>۱</sup>، بهبود جعفری<sup>۲\*</sup>، علی حسن پور<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: dr.b.jafari@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۶/۱۱ پذیرش نهایی: ۹۷/۶/۲۸)

### چکیده

بیماری یون از جمله عفونت‌های مزمن باکتریایی در نشخوارکنندگان می‌باشد که با توجه به اسهال شدید و طولانی‌مدتی که ایجاد می‌کند، باعث تحلیل رفتن بدن دام می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی عیار سرمی آنتی‌بادی ضد مایکوباکتریوم اوویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (عامل بیماری یون) به روش الایزا و برآورد میزان آلودگی به عامل مذکور در گاوهای شیری مجتمع دامپروری کشت‌و صنعت مغان بود. در این مطالعه از تعداد ۷۳۸ رأس گاو شیری بالغ در مجتمع کشت‌و صنعت و دامپروری مغان که به‌طور تصادفی انتخاب شدند، خون‌گیری شده و نمونه‌های سرمی در آزمایشگاه به روش الایزا بررسی شدند. مطالعه حاضر نشان داد از تعداد ۷۳۸ رأس گاو مورد آزمایش، ۵۸ رأس دارای عیار سرمی علیه مایکوباکتریوم اوویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس با درصد S/P بیشتر از ۶۰ درصد بودند (میزان شیوع ۷/۸۶ درصد) که ۲۵ رأس مثبت (با درصد S/P بیشتر از ۷۰ درصد) و ۳۳ رأس مشکوک (با درصد S/P بیشتر از ۶۰ تا ۷۰ درصد) بودند. به دلیل این که چهره بیماری یون اغلب تحت بالینی بوده و دام در ظاهر سالم به نظر می‌رسد، به سبب دفع میکروب در مدفوع و ترشحات بدن خود بقیه گله را نیز آلوده می‌کند. بنابراین، انجام آزمون‌های غربالگری دوره‌ای در گله و همچنین تست دام‌های تازه وارد در کنار سایر اقدامات پیشگیرانه اکیداً توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: مایکوباکتریوم اوویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس، آنتی‌بادی، الایزا، گاوهای شیری.

## مقدمه

بیماری یون (Johnes disease) از جمله عفونت های مزمن باکتریایی در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی در سراسر جهان می‌باشد. عامل ایجادکننده این بیماری مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس می‌باشد که باعث بروز بیماری مزمن و غیرقابل درمان می‌گردد که از نشانه‌های اصلی آن اسهال شدید و طولانی‌مدت و لاغری شدید همراه با تورم عروق لنفاوی موضعی و لنفادنیت است. یون بیماری اختصاصی گاو بوده اما در گوسفند، بز و نشخوارکنندگان وحشی نیز دیده می‌شود. در سال ۱۸۹۵ یک محقق آلمانی به نام یون، از گاوهایی با علایم (اسهال، کم‌خونی پیش‌رونده، لاغری شدید و در نهایت مرگ) گونه‌ای از مایکوباکتریوم را جدا نمود. مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (عامل بیماری یون) یک باکتری اسیدفست می‌باشد که باسیلی شکل و فاقد دیواره سلولی است (Donaghy et al., 2003).

بیماری یون می‌تواند برای مدت‌های طولانی بدون علایم بالینی در گله حضور داشته باشد. معمولاً حیوانات مبتلا تب ندارند. تعدادی از حیوانات آلوده سوء تغذیه و ضعف نشان می‌دهند. علایم قابل توجه بیماری در خلال چند هفته پس از یک موقعیت استرس‌زا نظیر زایمان، دوره خشک‌سالی، درجه حرارت بالا یا استرس‌های محیطی، تغییرات تغذیه‌ای، عدم بالانس جیره، نقل و انتقال یا بیماری‌های هم‌زمان، رخ می‌دهد. این باکتری موجب افزایش ضخامت و ایجاد چین‌خوردگی در مخاط روده نشخوارکنندگان می‌گردد. تولید، در گله‌های درگیر به شدت افت می‌کند و این درحالی است که بیماری در حیوانات ۳ الی ۶ ساله

اتفاق می‌افتد (Nebbia et al., 2006). گزارشاتی مبنی بر ارتباط این بیماری با بیماری کرون در انسان وجود دارد. بیماری کرون یک التهاب مزمن روده‌ها در انسان می‌باشد. البته، نتایج مطالعات متناقض بوده‌اند و خطر مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس جهت سلامت عمومی تأیید نگردیده است. با این وجود، تشویق واحدهای شیری و پرواری و دولت‌ها جهت توجه مستقیم به کنترل بیماری یون و ارزیابی سلامتی شیر و تولیدات گوشتی از این نظر می‌تواند در پیش‌گیری از بیماری کرون مورد توجه قرار گیرد. گسترش جهانی این باکتری ناشی از صادرات دام از کشورهای اروپایی به سایر نقاط جهان بوده است (Vannuffel et al., 1994). این بیماری به‌صورت پیش‌رونده‌ای نشخوارکنندگان را درگیر کرده و باعث زیان‌های تولیدی فراوانی می‌گردد. حیوانات مبتلا مقادیر بالایی از باکتری‌ها را از طریق مدفوع در آب و غذا پخش می‌کنند. عفونت معمولاً از همان بدو تولد از طریق جفت، شیر، آب یا ترشحات آلوده نوزاد را مبتلا می‌کند. حیوانات بالغ معمولاً مقاوم می‌شوند در حالی که آلوده‌اند و میکروب را پخش می‌کنند. راه انتقال باکتری از طریق شیر و مدفوع حیوان آلوده می‌باشد و بهترین راه مقابله با این بیماری حذف حیوان آلوده از گله است (Kalis et al., 1999). هدف از این مطالعه بررسی عیار سرمی آنتی‌بادی ضد بیماری یون به‌روش الایزا و برآورد درصد آلودگی به عامل مذکور در گاوهای شیری مجتمع دامپروری کشت‌و صنعت مغان بود.

## مواد و روش‌ها

اضافه گردید. دوره انکوبه ۳۰ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. در نهایت چاهک‌ها شستشو داده شد و محلول سوپسترا اضافه گردید. بعد از طی دوره انکوبه ۱۵ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، محلول متوقف‌کننده (Stop) اضافه گردید. در پایان میکروپلیت وارد دستگاه الیزا ریدر گردید و با طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بازخوانی قرار گرفت. داده‌های به‌دست‌آمده از نظر آماری مورد بررسی قرار گرفته و به صورت توصیفی بیان شدند.

## یافته‌ها

از تعداد ۷۳۸ رأس گاو مورد آزمایش، ۵۸ رأس دارای عیار سرمی علیه مایکوباکتریوم/ویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس با درصد S/P بیشتر از ۶۰ درصد بودند (میزان شیوع ۷/۸۶ درصد) که ۲۵ رأس مثبت (با درصد S/P بیشتر از ۷۰ درصد) و ۳۳ رأس مشکوک (با درصد S/P بیشتر از ۶۰ تا ۷۰ درصد) بودند. جزئیات مربوطه در جدول ۱ آورده شده است.

در این بررسی از مجموع ۷۳۸ رأس گاو شیری بالغ ایستگاه سوم مجتمع کشت‌و‌صنعت و دامپروری مغان (هم با علایم بیماری و هم به ظاهر سالم) که به‌طور تصادفی انتخاب گردیده بودند، خون‌گیری از طریق ورید دمی به‌عمل آمد. نمونه‌های خون در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال و در آزمایشگاه پس از تشکیل لخته، سرم نمونه‌ها جدا و توسط کیت مخصوص مایکوباکتریوم/ویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (ID.vet، محصول کشور فرانسه) به بررسی عیار آنتی‌بادی سرمی ضد این باکتری در نمونه‌ها به روش الیزا اقدام گردید. برای انجام آزمایش الیزا ابتدا تمامی نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۱۲ با بافر مخصوص رقیق‌سازی شدند. در ادامه، از هر نمونه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شد. در چهار چاهک ابتدایی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی اضافه گردید. بعد از طی دوره انکوبه ۴۵ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، توسط محلول شستشو چاهک‌ها شستشو داده شد و در ادامه به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه

جدول ۱- وضعیت آنتی‌بادی سرمی ضد مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در گاوان تحت مطالعه

وضعیت آنتی‌بادی سرمی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
مثبت	۲۵	۳,۳۹
مشکوک	۳۳	۴,۴۷
منفی	۶۸۰	۹۲,۱۴

## بحث و نتیجه‌گیری

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس یک بیماری عفونی غیرقابل درمان در نشخوارکنندگان سراسر جهان است. از خصوصیات این بیماری آنتروکولیت مزمن

گرانولوماتوز، کشنده و پیش‌رونده همراه با تورم عروق لنفاوی موضعی و لنفادنیت است که توسط مایکوباکتریوم/ویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium* subspecies )

۲۰۰-۲۵۰ میلیون دلار (۳۵۱ دلار به‌ازای هر گاو در سال) تخمین زده می‌شود (Sohal et al., 2007; Clark et al., 2008). اگرچه میزان خسارات اقتصادی بیماری یون در ایران به‌درستی مشخص نیست، ولی بر اساس پژوهش انجام‌شده در استان فارس مشخص شد که در گاو‌داری‌های مثبت از نظر بیماری یون نسبت به موارد منفی، تولید شیر در یک دوره تولیدی، ۳۳۵ کیلوگرم کاهش و فاصله بین دو گوساله‌زایی، به میزان ۳۰ روز افزایش پیدا می‌کند (Ansari-Lari et al., 2009).

از سوی دیگر اعتقاد بر این است که *M. avium* تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس در بروز بیماری کرون در انسان نقش دارد (Chiodini et al., 1986). علی‌رغم اینکه در ایران سالیان متمادی از حضور بیماری یون می‌گذرد، اما مطالعات محدودی روی این بیماری صورت گرفته است (Seyyedini et al., 2010). این مطالعات تنها در چند منطقه از کشور صورت گرفته است و در انجام آنها از تست‌های تشخیصی گوناگون استفاده شده است. از سوی دیگر به علت دوره نهفتگی طولانی‌مدت بیماری و در نتیجه افزایش تعداد دام دفع‌کننده جرم، راه‌های انتقال مختلف، هزینه‌های بالای تست‌های تشخیصی و حذف دام‌های ناقل، اجرای برنامه‌های کنترل بیماری را مشکل ساخته و تفسیر نتایج آزمایشگاهی، چالش‌برانگیز می‌باشد (Sockett, 2000; Sohal et al., 2007).

نتایج این پژوهش نشان داد که ۳/۳۹ درصد گاوهای مورد آزمایش از لحاظ آنتی‌بادی ضد مایکوباکتریوم اویوم مثبت بودند که کمتر از گزارش اخیر وضعیت بیماری یون در ایران بود. در دو مطالعه اخیر که در استان‌های تهران و البرز روی سرم گاو به روش الیزا

(paratuberculosis) یا MAP ایجاد می‌شود (O'shea, 2011; Larsen et al., 2012). پاراتوبرکلوزیس در لیست بیماری‌های The World Organization for Animal Health (OIE) در گروه B قرار گرفته و محدودیت‌های تجاری ایجاد می‌کند (Piras et al., 2015).

متداول‌ترین راه ابتلا به بیماری یون، آلودگی مدفوعی-دهانی گوساله‌ها با عامل بیماری می‌باشد، هر چند انتقال داخل رحمی نیز گزارش شده است (Collins et al., 2006). شکل بالینی بیماری به دلیل طولانی بودن دوره کمون، معمولاً در سنین بالای دو سال اتفاق می‌افتد (Constable et al., 2017). در این بیماری سوء جذب مواد مغذی، منجر به تعادل منفی انرژی شده و انتروپاتی با از دست دادن پروتئین، سبب اسهال متناوب یا مداوم می‌گردد که به آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد انگلی پاسخ نداده و منجر به کاهش وزن پیش‌رونده، ضعف و در نهایت مرگ می‌شود (Tiwari et al., 2006; Pinedo et al., 2008; Imirzalioglu et al., 2011). خسارات ناشی از بیماری به علت کشتار قبل از موعد، کاهش ارزش لاشه، کاهش وزن‌گیری، کاهش کیفیت و کمیت شیر، کاهش باروری (به علت کاهش شکل‌گیری جسم زرد و پروژسترون سرم)، افزایش حساسیت در برابر بیماری‌ها و عفونت‌های دیگر و افزایش هزینه‌های درمانی متوجه دامداران و صنعت دامپروری می‌باشد (Sockett, 2000; Sadati et al., 2012).

به دلیل این که چهره بیماری یون غالباً تحت بالینی است، دامداران معمولاً این بیماری را نادیده گرفته و متوجه خسارات اقتصادی آن نمی‌شوند. ضررهای اقتصادی این بیماری در ایالات متحده آمریکا سالانه

کشورهای جهان، آمار و ارقام متفاوتی از میزان آلودگی سرمی دام‌ها به یون را نشان می‌دهد. مطالعات اپیدمیولوژیک، شیوع سرمی بیماری یون در بلژیک را ۶/۶ درصد و در هلند ۲/۷ تا ۶/۹ درصد نشان می‌دهند (Boelaert *et al.*, 2000). در یک بررسی روی گاوان جنوب غربی انگلستان شیوع بیماری تحت‌بالینی با استفاده از روش PCR و کشت میکروبی به ترتیب ۳/۵ و ۲/۶ درصد گزارش شده است (Cetinkaya *et al.*, 1996). در مطالعه‌ای دیگر، ۲۹۸۹ گاو با آزمایش کشت مدفوع بررسی گردیدند و ۵ درصد کشت‌ها مثبت بود (Kalis *et al.*, 1999). شیوع گله‌ای در اروپا در محدوده‌ای بین ۲ درصد در اتریش، تا ۵۵ درصد در دانمارک گزارش شده است (Gaemmagami *et al.*, 2012).

اخیراً در ایرلند میزان آلودگی با استفاده از تست الایزای غیرمستقیم ۷/۴ درصد برآورد گردیده است (Kennedy *et al.*, 2016). در تحقیقی در آمریکا چنین گزارش شد که ۴۰-۲۰ درصد گله‌های شیری دارای مراحل مختلف بیماری یون هستند (Stabel, 2001). در کل، شیوع انفرادی بیماری در آمریکا بین ۱/۸ تا ۱۸ درصد تخمین زده می‌شود (Lilenbaum *et al.*, 2007). در یک بررسی دیگر روی گاومیش کوهان‌دار آمریکایی، کشت مدفوع از ۱۴ رأس گاومیش به عمل آمد که در ۳/۷ درصد آنها کشت مثبت بود (Huntley *et al.*, 2005). شیوع بیماری در کشور استرالیا در سطح انفرادی گاو شیری، ۱/۹ درصد است (Carter, 2012). در انتاریو ۲/۶ درصد (Hendrick *et al.*, 2005)، در کالیفرنیا ۴/۶ درصد (Adaska and Anderson, 2003)، در گالیسیای اسپانیا ۳/۰۲ درصد (Diéguez *et al.*,

اجرا شده، میزان آلودگی به ترتیب ۱۵ درصد (Hatamifar *et al.*, 2017) و ۳/۱۹ درصد (Teymouri *et al.*, 2016) گزارش شد. روش‌های متعدد دیگری نیز برای ارزیابی وضعیت شیوع بیماری یون در مناطق مختلف ایران مورد استفاده قرار گرفته است. به عنوان مثال، شیوع گله‌ای بیماری یون در استان فارس با PCR-Nested در نمونه تانک شیر بررسی و از میان ۱۱۰ نمونه تانک شیر ۱۲ نمونه مثبت بوده و شیوع گله‌ای به ترتیب در شیراز ۸/۶ درصد، مرودشت ۸/۵ درصد و سپیدان ۲۳/۵ درصد گزارش شد (Haghkhah *et al.*, 2008).

در پژوهش دیگری که در منطقه تبریز توسط انزابی و همکاران صورت گرفته است، با انجام آزمایش PCR روی شیر ۸۰ رأس گاو مشکوک به ابتلا به بیماری یون، تعداد ۲۵ نمونه (۳۲ درصد) مثبت گزارش شده است. همچنین موارد متعدد مثبت در بین گاوهای به ظاهر سالم و شیر پاستوریزه نیز گزارش شده است که نشان‌دهنده آلودگی نسبتاً بالای منطقه می‌باشد (Anzabi *et al.*, 2006). فتحی و همکاران در سال ۲۰۱۱ طی یک بررسی در آذربایجان غربی روی صد نمونه شیر مربوط به گاوهای سالم، حضور مولکولی عامل بیماری یون را ۱۲ درصد اعلام نمودند و همچنین میزان حضور مولکولی عامل یون در گاوهای آلوده را (با روش PCR روی نمونه‌های شیر) ۴۴ درصد بیان داشتند (Fathi *et al.*, 2011).

در یک تحقیق روی گله‌های با سیستم کنترلی ضعیف از نظر بیماری یون، چنین نشان داده شد که ۷/۸ تا ۸۰ درصد گاوان، با روش کشت و PCR مثبت می‌باشند (Pavlas, 2005). تحقیقات انجام شده در سایر

مدفوع بوده و منجر به نتایج منفی کاذب بسیاری می‌گردد (Collins *et al.*, 1991; Dargatz *et al.*, 2001; Hardin and Thorne, 1996; Sockett, 2000).

در واقع بسیاری از مطالعات، حساسیت آزمایش الایزای سرم خون را بر اساس نسبت توزیع ارگانیزم در مدفوع که مثبت شده، در محدوده ۱۵ تا ۷۵ درصد تخمین می‌زنند (Sweeney *et al.*, 1994; Whitlock *et al.*, 2000; Dargatz *et al.*, 2001). حساسیت الایزای جذبی در بررسی‌های مختلف، متفاوت و از ۱۵ تا ۸۸ درصد ذکر شده است (Pinedo *et al.*, 2008). به‌رحال، بر اساس گزارشات موجود، آزمون الایزا در جهت شناسایی دام‌های با عفونت پاراتوبرکلوزیس و کنترل بیماری مفید است و دام‌های با آزمون الایزای مثبت قطعاً آلوده می‌باشند و این تست می‌تواند به همراه علائم بالینی بیماری و یا سایر آزمون‌ها به عنوان تائید تشخیص نهایی مورد استفاده قرار گیرد. در دام‌های الایزا منفی انجام سایر آزمون‌ها جهت اعلام نمودن عاری بودن دام از عفونت ضروری می‌باشد. با توجه به اینکه این بررسی در فاز تحت‌بالینی بیماری انجام شده است و احتمالاً تعدادی از حیوانات عفونی را به دلیل عدم تکوین پاسخ ایمنی هومورال و تولید آنتی‌بادی قابل جستجو در بر نمی‌گیرد، لذا میزان واقعی بیماری بیش از این تخمین زده می‌شود. با در نظر گرفتن این حقیقت که پاسخ ایمنی به عفونت MAP به‌وسیله ایمنی با واسطه سلولی آغاز شده و متعاقباً با ایمنی هومورال ادامه پیدا می‌کند، عدم تشخیص مراحل اولیه بیماری توسط آزمایشات سرمی قابل توجیه است.

پس از شروع عفونت با MAP برخی حیوانات پاسخ تیپ Th1 را نشان می‌دهند که به وسیله آزادسازی

در مکلنبرگ آلمان ۱۲/۲ درصد (Hacker *et al.*, 2007)، از دام‌ها از نظر سرمی آلوده به بیماری تشخیص داده شده‌اند.

در سال ۱۹۵۹ یک مطالعه در خصوص یون گاوی در بریتانیا نشان داد که شیوع بیماری بالینی ۰/۶ درصد می‌باشد (Withers, 1959). مطالعات دیگر در انگلستان در دهه نود میزان آلودگی شیرهای پاستوریزه که توسط آزمایش PCR مثبت شده‌اند را ۳۰ درصد گزارش نموده‌اند (Millar *et al.*, 1996). پژوهش دیگری که در آن از تکنیک‌های PCR و کشت برای آزمایش نمونه‌های کشتارگاهی استفاده شده بود، نشان داد که شیوع عفونت تحت‌بالینی در گاو بالغ ۳/۵ درصد و در گاو جوان ۲ درصد می‌باشد (Cetinkaya *et al.*, 1996). در پژوهشی که در اسلوانی با روش الایزا انجام گرفت، ۳/۴ درصد گاو و ۳/۵ درصد نشخوارکنندگان کوچک مثبت بودند (Ocepek *et al.*, 2002). در مطالعه‌ای دیگر با روش الایزا در کشور کره ۳/۳ درصد گاو از نظر سرمی مثبت تشخیص داده شدند (Park *et al.*, 2006).

گزارشات فوق و نتایج به‌دست آمده از این مطالعه حاکی از گسترش آلودگی در نقاط مختلف دنیا و ایران می‌باشد. آزمایشات مبتنی بر الایزا به دلیل آسان بودن جمع‌آوری نمونه (خون یا شیر)، نتایج سریع تست و هزینه‌ای نسبتاً کم، بسیار مطلوب می‌باشند. با این حال، به چند دلیل نتایج حاصل از الایزا نیاز به تفسیر دقیق و محتاطانه دارد. با توجه به تأخیر زمانی بین عفونت و ارائه باکتری به سیستم ایمنی برای ایجاد واکنش ایمنی، حساسیت الایزای سرم برای تشخیص گاوهای با عفونت تحت‌بالینی خیلی پایین‌تر از حساسیت کشت

سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مثل گاما اینترفرون به عنوان فاکتوری کلیدی در کنترل عفونت مایکوباکتریایی نشان داده می‌شود. متعاقباً بسته به شرایط، سیستم به سمت پاسخ تیپ Th2 تغییر کرده و آنتی‌بادی IgG غیرمحافظتی از سلول‌های B آزاد می‌گردد. در نتیجه مراحل انتهایی بیماری پاراتوبرکلوزیس در گاو با فعالیت غالب Th2 و سطح آنتی‌بادی بالا، تعداد زیاد باسیل و کاهش پاسخ سلولی به آنتی‌ژن‌های اختصاصی و در نتیجه افزایش استعداد ابتلا به سایر بیماری‌ها همراه است. بر طبق این دینامیک ایمنی‌شناختی، حساسیت آزمون‌هایی که آنتی‌بادی‌های اختصاصی MAP را در مراحل اولیه و تحت‌بالینی بیماری جستجو می‌کنند، پایین است (Heidarnejhad et al., 2017).

در کل محدودیت و مشکل اصلی برای ارزیابی آزمون‌های تشخیصی یون، فقدان یک استاندارد طلایی بی‌نقص است که مبین وضعیت واقعی و مرحله صحیح عفونت در حیوانات مورد مطالعه باشد (Whitlock et al., 2017).

به دلیل این که چهره بیماری یون غالباً تحت بالینی است و دام به‌ظاهر سالم به‌نظر می‌رسد، به سبب دفع میکروب در مدفوع و ترشحات بدن خود، بقیه گله را نیز آلوده می‌کند. بنابراین، انجام آزمون‌های غربالگری دوره‌ای در گله و همچنین تست دام‌های تازه وارد در کنار سایر اقدامات پیشگیرانه اکیداً توصیه می‌شود.

### سپاسگزاری

از کلیه افراد، سازمان‌ها و ارگان‌هایی که در انجام این کار پژوهشی همکاری داشته‌اند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

### منابع

- Adaska, J.M. and Anderson, R.J. (2003). Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 60(3): 255-261.
- Ansari-Lari, M., Haghkhah, M., Bahramy, A. and Baheran, A.M.N. (2009). Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Fars province (Southern Iran) dairy herds. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4): 553-557.
- Anzabi, Y., Tabatabayi, A. and Asgharzade, M. (2006). A survey of the infection status of *Mycobacterium avium* paratuberculosis in dairy cattle using PCR and culture of Tabriz region. *Iranian Journal of Veterinary Science*, 2: 297-310. [In Persian]
- Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J., Berkvens, D. and Godfried, J. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary Microbiology*, 77(3): 269-281.
- Carter, M.A. (2012). Prevalence and prevention of paratuberculosis in North America. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 60: S9-18.

- Cetinkaya, B., Egan, K., Harbour, D. and Morgan, K. (1996). An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in South West England. *Epidemiology and Infection*, 116(3): 373-379.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R. and Coutu, J.A. (1986). Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(3): 357-363.
- Clark, D., Koziczkowski, J., Radcliff, R., Carlson, R. and Ellingson, J. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: Comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 91(7): 2620-2627.
- Collins, M., Sockett, D., Ridge, S. and Cox, J. (1991). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2): 272-276.
- Collins, M.T., Gardner, I.A., Garry, F.B., Roussel, A.J. and Wells, S.J. (2006). Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(12): 1912-1919.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. and Grünberg, W. (2017). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 11th ed., Saunders, Elsevier, pp: 350-401.
- Dargatz, D.A., Byrum, B.A., Barber, L.K., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Shulaw, W.P., *et al.* (2001). Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(7): 1163-1166.
- Diéguez, F.J., Arnaiz, I., Sanjuán, M.L., Vilar, M.J., López, M. and Yus, E. (2007). Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in cattle in Galicia (Northwest Spain). *Preventive Veterinary Medicine*, 82(3): 321-326.
- Donaghy, J., Totton, N. and Rowe, M. (2003). Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4): 285-291.
- Fathi, R., Sarkarati, F., Eslami, M., Rezavand, B. and Nourizadeh, A. (2011). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cow milk using culture and PCR methods. *Archives of Razi Institute*, 66(2): 95-100.
- Gaemmagami, S., Khosravi, M., Ahmadi, M., Deniko, A., Hagdin, M.M. and Koochakzadeh, A. (2012). Prevalence of Johne's disease in Tehran and evaluation absorbed ELISA test as a diagnostic method. *Iran Veterinary Journal*, 8(3): 54-59. [In Persian]
- Hacker, U., Hüttner, K. and Konow, M. (2004). Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommern, Germany. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 117(3-4): 140-144.
- Haghkhah, M., Ansari-Lari, M., Novin-Baheran, A.M. and Bahramy, A. (2008). Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by bulk-tank milk PCR in Fars province (Southern Iran) dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 86(1): 8-13.
- Hardin, L. and Thorne, J. (1996). Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209(1): 120-122.
- Hatamifar, M., Mosavari, N. and 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*, 11(2): 26-33.
- Heidarnejhad, O., Safi, S., Mosavari, N. and Keshavarz, R. (2017). Sero-prevalence of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy farms of Tehran-Iran using absorbed elisa assay. *Journal of Comparative Pathology*, 14(3): 2239-2246. [In Persian]



- Hendrick, S., Duffield, T., Leslie, K., Lissemore, K., Archambault, M. and Kelton, D. (2005). The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, 46(12): 1126.
- Huntley, J., Whitlock, R., Bannantine, J. and Stabel, J. (2005). Comparison of diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in North American Bison. *Veterinary Pathology*, 42(1): 42-51.
- Imirzalioglu, C., Dahmen, H., Hain, T., Billion, A., Kuenne, C., Chakraborty, T., *et al.* (2011). Highly specific and quick detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in feces and gut tissue of cattle and humans by multiple real-time pcr assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5): 1843-1852.
- Kalis, C., Hesselink, J., Russchen, E., Barkema, H., Collins, M. and Visser, I. (1999). Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from bovine fecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(4): 345-351.
- Kennedy, A., Byrne, N., Garcia, A., O'mahony, J. and Sayers, R. (2016). Analysis of Johne's disease ELISA status and associated performance parameters in Irish dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 12(1): 43.
- Larsen, J., Webb Ware, J. and Kluver, P. (2012). Epidemiology of bovine Johne's disease (BJD) in beef cattle herds in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 90(1-2): 6-13.
- Lilenbaum, W., Marassi, C. and Oelemann, W. (2007). Paratuberculosis: An update. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4): 580-590.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., *et al.* (1996). Is900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3446-3452.
- Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S. and De Meneghi, D. (2006). Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Research*, 66(1): 116-120.
- O'shea, B.J. (2011). The Johne paradigm: From detection to management to treatment. *Department of Environmental Health and Safety the Virulence*, 2(4): 264-266.
- Ocepek, M., Krt, B., Pate, M. and Pogačnik, M. (2002). Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slovenian Veterinary Research*, 39: 179-185.
- Park, K.T., Ahn, J., Davis, W.C., Koo, H.C., Kwon, N.H., Jung, W.K., *et al.* (2006). Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 7(4): 349-354.
- Pavlas, M. (2005). New findings of pathogenesis, diagnostics and control of paratuberculosis in cattle. *Acta Veterinaria Brno*, 74(1): 73-79.
- Pinedo, P.J., Williams, J.E., Monif, G.R., Rae, D.O. and Buergelt, C.D. (2008). *Mycobacterium paratuberculosis* shedding into milk: Association of ELISA seroreactivity with DNA detection in milk. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 6(2): 137-144.
- Piras, C., Soggiu, A., Bonizzi, L., Greco, V., Ricchi, M., Arrigoni, N., *et al.* (2015). Identification of immunoreactive proteins of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Proteomics*, 15(4): 813-823.
- Sadati, R., Jafarpour, M., Mirinargesi, M., Nazemi, A. and Barghi, A. (2012). Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in dairy cattle bred in Northern Iran by Nested-PCR. *Global Veterinaria*, 8(3): 259-263.
- Seyyedini, M., Zahraei, T. and Najafi, M.F. (2010). Comparison of isolation frequency of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from different types of samples. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(3): 143-149.
- Sockett, D.C. (2000). Johne's disease diagnosis and control. *Advances in Dairy Technology*, 12: 73.

- Sohal, J., Singh, S., Subhodh, S., Singh, A., Singh, P., Sheoran, N., *et al.* (2007). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis diagnosis and strain typing-present status and future developments. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(10): 843-52.
- Stabel, J. (2001). On-farm batch pasteurization destroys mycobacterium paratuberculosis in waste milk. *Journal of Dairy Science*, 84(2): 524-527.
- Sweeney, R., Whitlock, R., Buckley, C., Spencer, P., Rosenberger, A. and Hutchinson, L. (1994). Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Mycobacterium paratuberculosis in milk. *American Journal of Veterinary Research*, 55(7): 905-909.
- Teymouri, H., Mosavari, N. and Taghi, H.P. (2016). Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle by using indirect absorbed ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) system and culture in Alborz province, Iran. *International Journal of Mycobacteriology*, 5: S220-S221.
- Tiwari, A., Vanleeuwen, J.A., Mckenna, S.L., Keefe, G.P. and Barkema, H.W. (2006). Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(9): 874.
- Vannuffel, P., Dieterich, C., Naerhuyzen, B., Gilot, P., Coene, M., Fiasse, R., *et al.* (1994). Occurrence, in Crohn's disease, of antibodies directed against a species-specific recombinant polypeptide of Mycobacterium paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(2): 241-243.
- Whitlock, R., Wells, S., Sweeney, R.W. and Van Tiem, J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77(3): 387-398.
- Withers, F.W. (1959). Incidence of the disease. *Veterinary Record*, 71: 1150-1153.

## **Investigating serumic levels of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis using the ELISA method in Holstein dairy cattle**

**Heydarzadeh Asiabi, Y.<sup>1</sup>, Jafari, B.<sup>2\*</sup>, Hassanpour, A.<sup>3</sup>**

1- MSc. Student of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author's email: dr.b.jafari@gmail.com

(Received: 2017/9/2 Accepted: 2018/9/19)

### **Abstract**

Paratuberculosis (Johne's disease) is a chronic bacterial infection of ruminants causing body wasting due to severe and protracted diarrhea. The aim of the present study was to investigate the rate of infection to Johne's disease in cattle of Moghan agro-business and animal husbandry complex by detecting antibody titers against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) using the absorptive ELISA method. For this purpose, blood samples were collected from 738 randomly selected milking cattle of Moghan agro-business and animal husbandry complex and their sera were assessed by ELISA method. The results indicated that 58 cattle had antibody titers against MAP with S/P percentage over 60% (infection rate of 7.86%) of which 25 cattle were positive (with S/P percentage over 70%) and 33 were suspicious (with S/P percentage between 60-70%). Because Johne's disease is manifested as a subclinical disease and infected cattle seem to be apparently healthy, bacteria are shed through faeces and body secretions causing infection of the rest of the herd. Thus performing periodic herd screening tests and testing recently introduced animals alongside other preventive measures is strictly advised.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, Antibody, ELISA, Dairy cattle.