مقایسه صحت، حساسیت و ویژگی روش گسترش مرطوب و PCR در تشخیص تریکومونیازیس در کبوتر ها

مومنی، ن.[۱*]، درخشان، ل.[۲]، کجباف، ف.[۳].

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۳ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۹

خلاصه

بیماری تریکومونیازیس یکی از بیماری های عفونی شایع، در پرندگان است که عامل ایجاد کننده آن تک یاخته تاژک‌دار *تریکوموناس گالینه* می باشد. علائم بیماری گوناگون است و شامل بی‌اشتهایی، اسهال، سختی بلع، پلاک‌های چرکی و بوی بد و ترش در داخل محوطه دهانی–حلقی می باشد. تشخیص مرسوم، براساس تهیه گسترش مرطوب و بررسی آن زیر میکروسکوپ می باشد. این مطالعه توصیفی–تحلیلی است. از آنجا که تاکنون مطالعه ای جهت مقایسه روش گسترش مرطوب و PCR در تشخیص تریکومونیازیس در شهر تهران انجام نشده بود، در این مطالعه بر آن شدیم تا با استفاده از روش مولکولی PCR و بر اساس تکثیر ژن ITS1/5.8S/ITS2 *تریکوموناس گالینه*، صحت، ویژگی و حساسیت آن را با روش گسترش مرطوب مقایسه کنیم. از ۶۰ کبوتر مراجعه کننده به درمانگاه های شهر تهران، از محوطه دهانی و چینه دان آن ها ۲ نمونه با استفاده از سواپ استریل گرفته شد. از یک نمونه به سرعت گسترش مرطوب تهیه شد و زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. نمونه دیگر نیز برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. با روش گسترش مرطوب ۴۰ درصد (۲۴ نمونه) و با روش PCR، ۸۵ درصد موارد (۵۱ نمونه) مثبت بودند. داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و با سطح اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی داری میان نتایج گسترش مرطوب و PCR در تشخیص تریکومونیازیس وجود دارد. بنابراین روش گسترش مرطوب در مقایسه با PCR، از "ویژگی" مناسبی در تشخیص تریکومونیازیس برخوردار است، در حالی که "حساسیت" و "صحت" پایینی در تشخیص تریکومونیازیس دارد.

واژه‌های کلیدی: حساسیت، ویژگی، گسترش مرطوب، PCR، تریکومونیازیس.

---

۱. دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.
۲. استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.
۳. استادیار، گروه دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.
*نویسنده مسئول: nimamomeni13761998@gmail.com

مقدمه

بیماری تریکومونیازیس یکی از بیماری های عفونی شایع در پرندگان است که عامل ایجاد کننده آن تک یاخته تاژک دار تریکوموناس می باشد (Alhasnawi و همکاران، ۲۰۲۲). عامل ایجاد کننده تریکومونیازیس در کبوتر ها، گونه *تریکوموناس گالینه* می باشد. به این بیماری در کبوتران کانکر نیز گفته می شود (Doneley، ۲۰۱۶). کبوتر، پرندگان شکاری مثل عقاب و شاهین، فنچ، قناری، مرغ مینا، بادجگیر، عروس هلندی و دیگر طوطی سانان ممکن است به این انگل آلوده شوند؛ اما شیوع آن در کبوتر ها به دلیل نحوه انتقال این انگل، عوامل محیطی و ... بیش تر می باشد (Fadhil و همکاران، ۲۰۲۰؛ Alrefaei و همکاران، ۲۰۲۱؛ Albeshr و همکاران، ۲۰۲۰). علائم آلودگی به این انگل گوناگون است؛ در تاریخچه ممکن است وضعیت پرنده طبیعی گزارش شود یا به مواردی همچون بی حالی، عدم تمایل به پرواز کردن، کاهش اشتها و وزن، افزایش مصرف آب، کشیدن گردن به بالا، بالا آوردن غذا ، تکان دادن سر، سختی بلع ، ترشحات بینی و سختی تنفس و اسهال سبز رنگ اشاره شود (Fadhil و همکاران، ۲۰۲۰؛ El-Khatam و همکاران، ۲۰۱۶؛ Alejandro و همکاران، ۲۰۲۲). در معاینات بالینی ممکن است پرندگان بالغ هیچ علائمی نداشته باشند، اما معمولاً علائمی مانند بی حالی، کاهش توده بدنی، رشد ضعیف دیده می شود. همچنین پلاک های چرکی در داخل محوطه دهانی- حلقی نیز مشاهده می شوند (Graham، ۲۰۱۶). *تریکوموناس گالینه* فاقد میزبان واسط می باشد و این انگل از طریق آلوده شدن منبع آب و غذا مشترک، غذا دادن پرنده والد به جوجه های خود (جوجه های کبوتر از طریق شیره ی چینه دان کبوتر بالغ آلوده می شوند) و خورده شدن پرنده آلوده توسط پرندگان شکاری، منتقل می شود (Samour، ۲۰۱۶). پس از تاریخچه و علائم بالینی، رکن تشخیصی نهایی، آزمایشات میکروسکوپی است. بایستی با یک سواپ استریل از چینه دان پرنده یا پلاک های چرکی نمونه گرفته شود و پس از تهیه گسترش مرطوب از آن، زیر میکروسکوپ با لنز x۴۰ بررسی شود (Saikia و همکاران، ۲۰۲۲). در صورت وجود آلودگی، نمونه گیری صحیح و بررسی دقیق زیر میکروسکوپ بایستی این تک یاخته تاژک دار مشاهده شود. اما گاهی اوقات ممکن است نتیجه آزمایش گسترش مرطوب به دلیل خطا در یکی از مراحل ذکر شده، منفی کاذب شود. بنابراین روش های تشخیصی مولکولی، مانند PCR، FISH و اولیگونوکلئوتید پروبینگ، می توانند به تشخیص نهایی کمک کنند (سلطانی‌عینی و همکاران، ۲۰۱۶).

این مطالعه، توصیفی-تحلیلی است. از آنجا که تاکنون مطالعه ای جهت مقایسه روش گسترش مرطوب و PCR در تشخیص تریکومونیازیس در شهر تهران انجام نشده بود، در این پژوهش میزان صحت، حساسیت و ویژگی روش PCR با گسترش مرطوب در تشخیص *تریکوموناس گالینه* مقایسه شد.

مواد و روش

با استفاده از سواپ استریل، از چینه دان و محوطه دهانی ۶۰ کبوتر مراجعه کننده به درمانگاه های شهر تهران، نمونه گرفته شد. توزیع فراوانی کبوترهای مورد مطالعه برحسب سن و جنسیت در جدول ۱ آورده شده است.

از هر کبوتر حداقل ۲ نمونه گرفته شد؛ از یک نمونه به سرعت گسترش مرطوب تهیه شد و زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. سواپ حاوی نمونه دیگر، جهت آزمایش PCR درون میکروتیوب حاوی ۱/۵ سی سی بافر نگهدارنده PBS استریل قرار داده شد و تا قبل از استخراج و PCR در فریز و دمای منفی۲۰ درجه نگه داری شد.

همچنین از ۲۵ کبوتر ۳ نمونه گرفته شد و نمونه سوم برای ارزیابی توافق مشاهده گر با خودش (Intraobserver agreement) و ارزیابی دقت بین مشاهده گران (Interobserver agreement)، با رنگ گیمسا، رنگ آمیزی شد.

در آزمایش گسترش مرطوب، ترشحات اخذ شده از محوطه دهانی و چینه دان کبوتر، بر روی لام درون سرم فیزیولوژی حل شد و پس از قرار دادن لامل روی آن، زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی x۴۰ بررسی شد. در مواردی که تک یاخته *تریکوموناس گالینه* مشاهده گردید، نتیجه آزمایش مثبت در نظر گرفته شد.

برای استخراج DNA نمونه‌های نگهداری شده در PBS استریل، از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون استفاده شد. پس از استخراج DNA، مسترمیکس و پرایمر افزوده شد. برای انجام PCR از یک جفت پرایمر به نام های

1.58sF و 1.58sR که از ژن ITS1/5.8S/ITS2 مشتق شده بودند، استفاده شد. توالی مورد نظر از سایت NCBI(National center for biotechnology information)، گرفته شد. توالی نوکلئوتیدی این پرایمرها به شرح زیر است (جدول ۲):

توالی بالا(Forward):

5´-TGCTTCAGCTCAGCGGGTCTTCC-3´

توالی پایین(Reverse):

5´-CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3´

با استفاده از سمپلر، ابتدا ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر، سپس ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (مجموعاً ۳ میکرولیتر)، پس از آن، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس آماده شده و در نهایت ۵ میکرولیتر از DNA نمونه به درون میکروتیوب افزوده شد. حجم نهایی محلول ما ۲۵ میکرولیتر می باشد.

به طور معمول، واکنش PCR شامل مجموعه ای از ۲۰-۴۰ چرخه حرارتی یا سیکل و هر چرخه شامل ۳ مرحله با درجه حرارت مشخص است، که مرحله دناتوراسیون (Denaturation) با دمای ۹۵°، اتصال یا آنلینگ (Annealing) با دمای ۴۹° و مرحله گسترش یا اکستنشن (Extension) با دمای ۷۲° انجام شد. همچنین قبل از شروع این چرخه حرارتی، یک مرحله تحت عنوان مرحله آغاز (Initialization step) با دمای ۹۵° به مدت ۲ دقیقه و پس از پایان چرخه، یک مرحله تحت عنوان مرحله طویل شدن نهایی (Final elongation) با دمای ۷۲° و به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

پس از پایان واکنش PCR، ژل آگارز ۱/۵درصد در سینی ژل درست شد و درون تانک الکتروفورز قرار گرفت. سپس از هر نمونه ۷ میکرولیتر در چاهک های ایجاد شده بارگذاری شد.

سپس جریان برق، با ولتاژ ۸۰ ولت، به دستگاه الکتروفورز وصل شد و پس از برقراری میدان الکتریکی، با ایجاد اختلاف پتانسیل بین دو سوی این شبکه، مولکول های موجود در این نمونه ها با سرعت های متفاوتی درون شبکه متخلخل و لابه لای حفرات این شبکه به صورت موازی در مسیر مستقیم حرکت کردند.

سپس ژل درون رنگ اتیدیوم بروماید قرار گرفت و پس از ۲۰ دقیقه درون دستگاه ثبت تصویر ژل (Gel doc) و زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفته شد (تصویر ۱).

نتایج

از ۶۰ کبوتری که بر روی آن ها آزمایش انجام شد، با روش گسترش مرطوب، ۴۰ درصد نمونه ها (۲۴ عدد) مثبت تشخیص داده شدند. با روش PCR نیز ۸۵ درصد نمونه ها (۵۱ عدد) مثبت بودند. همچنین باند های تشکیل شده حاصل از PCR در تمام نمونه های مثبت، با وزن ۳۷۰bp ثبت شد (تصویر ۱).

همچنین میزان توافق مشاهده‌گر با خودش معادل ۱۰۰ درصد و میزان توافق بین مشاهده‌گران معادل ۸۸ درصد می‌باشد که نشان دهنده توافق بسیار خوب مشاهده‌گر با خودش و هم‌چنین بین مشاهده‌گران می‌باشد.

از کل کبوتران مبتلا به تریکومونیازیس (بر طبق روش PCR)، در ۴۷/۱ درصدشان، روش گسترش مرطوب نیز مثبت شده است (حساسیت).

از کل کبوتران سالم (بر طبق روش PCR)، در ۱۰۰ درصدشان، روش گسترش مرطوب نیز منفی شده است (ویژگی).

در ۵۵ درصد موارد، تشخیص هر دو روش (PCR و گسترش مرطوب) مشابه بوده است (صحت).

داده های جمع آوری شده توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور ارزیابی دقت روش گسترش مرطوب در مقایسه با PCR در تشخیص تریکومونیازیس از پارامترهای حساسیت، ویژگی و صحت (دقت) استفاده شد.

در جدول ۳، دقت روش گسترش مرطوب در مقایسه با PCR، در تشخیص تریکومونیازیس در کبوترهای مورد مطالعه، آورده شده است.

جدول ۱: توزیع فراوانی کبوترهای مورد بررسی برحسب سن و جنسیت (n=۶۰)

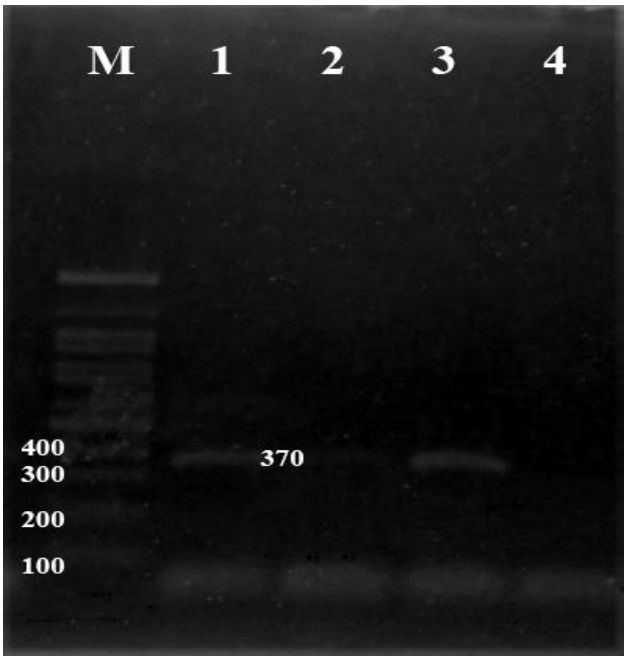
متغییر	فراوانی	درصد
سن		
کبوتر بالغ	۵۲	۸۶/۷
جوجه کبوتر	۸	۱۳/۳
جنسیت		
نر	۳۸	۶۳/۳
ماده	۲۲	۳۶/۷

جدول۲: پرایمر های مورد استفاده در این پژوهش

نام پرایمر	Seq(5´-3´)
1.58Sf	TGCTTCAGCTCAGCGGGTCTTCC
1.58Sr	CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG

جدول ۳: دقت روش گسترش مرطوب در مقایسه با PCR در تشخیص تریکومونیازیس در کبوترهای مورد مطالعه (n=۶۰)

روش	حساسیت	ویژگی	صحت
گسترش مرطوب	۴۷/۱	۱۰۰	۵۵



تصویر ۱: باند های ایجاد شده در ژل؛ نمونه های مثبت باندی به اندازه ۳۷۰bp ایجاد کرده اند.
M: مارکر (لدر) ، نمونه های ۲،۱ و ۳ مثبت و نمونه ۴ کنترل منفی

بحث

مطالعه حاضر بر روی ۶۰ کبوتر در ۳ مرکز درمانی شهر تهران صورت گرفت، کبوترهای مورد مطالعه از نظر سنی، ۵۲ عدد (۸۶/۷ درصد) بالغ و ۸ عدد (۱۳/۳درصد) جوجه کبوتر بودند. همچنین ۳۸ کبوتر (۶۳/۳ درصد) نر و ۲۲ کبوتر (۳۶/۷ درصد) ماده بودند.

شیوع *تریکوموناس گالینه* در نمونه های مورد مطالعه با روش گسترش مرطوب ۲۴ عدد (۴۰ درصد) و با روش PCR، ۵۱ عدد (۸۵ درصد) بود.

از کل کبوتران مبتلا به تریکومونیازیس (بر طبق روش PCR)، در ۴۷/۱ درصدشان، روش گسترش مرطوب نیز مثبت شده است (حساسیت).

از کل کبوتران سالم (بر طبق روش PCR)، در ۱۰۰ درصدشان، روش گسترش مرطوب نیز منفی شده است (ویژگی).

در ۵۵ درصد موارد، تشخیص هر دو روش (PCR و گسترش مرطوب) مشابه بوده است (صحت).

سلطانی عینی و همکاران(۱۳۹۵) مطالعه ای جهت مقایسه روش گسترش مرطوب و PCR در تشخیص *تریکوموناس گالینه* در کبوتر ها انجام دادند، که پس از نمونه گیری از ۷۲ کبوتر، ۱۸ نمونه با روش گسترش مرطوب مثبت اعلام شد اما با روش PCR، تعداد نمونه های مثبت ۲۴ عدد بود و اعلام کردند که تست PCR نسبت به گسترش مرطوب در تشخیص *تریکوموناس گالینه*، دارای ویژگی و حساسیت بالاتری می باشد که نتیجه مطالعه همسو با این مطالعه می باشد.

فدهیل و همکاران(۲۰۱۹) نیز مقایسه ای میان روش گسترش مرطوب و PCR در تشخیص *تریکوموناس گالینه* در کبوتر های در بغداد، عراق انجام دادند که پس از نمونه گیری از ۱۸۰ کبوتر، ۱۰۶ نمونه (۵۸ درصد) با روش گسترش مرطوب مثبت بودند اما با روش PCR، ۱۵۳ نمونه (۸۵ درصد) مثبت یافت شد و اعلام کردند که روش PCR نسبت به گسترش مرطوب حساسیت بالاتری دارد و نتیجه مطالعه با این مطالعه همسو می باشد.

کیو و همکاران(۲۰۱۷)(Qiu و همکاران، ۲۰۱۷) نیز برای شناسایی و تعیین توالی *تریکوموناس گالینه* از روش PCR استفاده کردند و مقایسه ای میان روش گسترش مرطوب و PCR انجام دادند. از ۳۵ نمونه اخذ شده، ۱۵ نمونه با روش گسترش مرطوب مثبت گزارش شد و تمامی آن ها با روش PCR نیز مثبت شدند. اما از ۲۳ نمونه ای که با روش گسترش مرطوب منفی گزارش شده بودند، ۱۹ نمونه توسط PCR مثبت اعلام شد و اعلام کردند که تست PCR نسبت به گسترش مرطوب در تشخیص *تریکوموناس گالینه*، حساسیت بالاتری دارد، که نتیجه مطالعه آن ها نیز با این مطالعه همسو می باشد.

البشیر و همکاران(۲۰۲۰) در مطالعه ای تحت عنوان جداسازی و تعیین ویژگی های مولکولی *تریکوموناس گالینه* در ریاض عربستان انجام دادند. در این مطالعه از ۲۷۳ پرنده، نمونه از چینه دان تهیه شد و با روش گسترش مرطوب مورد ارزیابی قرار گرفت. از این تعداد، ۷۲ نمونه (۲۶/۴ درصد) مثبت بودند. همچنین از روش PCR هم برای تعیین ژنوتیپ های *تریکوموناس گالینه* استفاده شد. در این مطالعه نیز مقایسه ای میان دو روش گسترش مرطوب و PCR انجام نشد.

در مطالعات ذکر شده تنها مقایسه ای میان نتایج آزمایش گسترش مرطوب و PCR صورت گرفته است، اما در این مطالعه علاوه بر آن، حساسیت، ویژگی و صحت هم مورد بررسی قرار گرفته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش گسترش مرطوب در مقایسه با PCR، از "ویژگی" مناسبی در تشخیص تریکومونیازیس برخوردار است، در حالی که "حساسیت" و "صحت" پایینی در تشخیص تریکومونیازیس دارد و با سطح اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی داری میان نتایج گسترش مرطوب و PCR وجود دارد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 14(2022-23) 163-169

Comparison of the accuracy, sensitivity and characteristic of the wet mount and PCR method in the diagnosis of trichomoniasis in pigeons

Momeni, M.*[1], derakhshan, L.[2], kajbaf, F.[3].

Received: 23.04.2022 Accepted: 29.01.2023

Abstract

Trichomoniasis is one of the common infectious diseases in birds, which is caused by the flagellated protozoan *Trichomonas gallinae*. The symptoms of the disease are various and include anorexia, diarrhea, swallowing, purulent plaques and bad and sour smell inside of the oropharyngeal cavity. Conventional diagnosis is based on the preparation of a wet mount and its examination under a microscope. This is a descriptive-analytical study. Since no study has been conducted to compare the wet mount method and PCR in the diagnosis of trichomoniasis in Tehran, In this study, we decided to use the molecular PCR method and based on the amplification of the ITS1/5.8S/ITS2 gene of *Trichomonas gallinae* to compare its accuracy, specificity and sensitivity with the wet mount method. From 60 pigeons referred to the clinics in Tehran, 2 samples were taken from their oral cavity and crop using sterile swab. A wet mount was quickly prepared from a sample and examined under a microscope. Another sample was also used for PCR testing. 40% (24 samples) with the wet mount method and 85% (51 samples) were positive with the PCR method. The data was analyzed with SPSS software version 24 and with a confidence level of 95% there is a significant difference between the results of wet mount and PCR in the diagnosis of trichomoniasis. Therefore, compared to PCR, the wet mount method has good "specificity" in the diagnosis of trichomoniasis, while it has low "sensitivity" and "accuracy" in the diagnosis of trichomoniasis.

Keywords: Sensitivity, specificity, wet mount, PCR, trichomoniasis.

1. Graduated with a doctorate in veterinary medicine,Islamic Azad University, Shushtar, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shooshtar, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shooshtar, Iran.
*Corresponding author: nimamomeni13761998@gmail.com

منابع

سلطانی‌عینی،م.؛ توسلی،م.؛قریشی،ع. ۱۳۹۵. تشخیص مولکولی تریکوموناس گالینه با استفاده از تکثیر ژن 5.8S rRNA به روش PCR در کبوتران خانواده کلمبیده (Columbidae). **۱۰(۲)**،۸۲-۷۷.

Albeshr, Mohammed F, and Abdulwahed F Alrefaei. 2020. 'Isolation and characterization of novel Trichomonas gallinae ribotypes infecting Domestic and Wild birds in Riyadh, Saudi Arabia', *Avian diseases*, **64**: 130-34.

Alejandro Mateo, Sandra, Iris Azami-Conesa, Bárbara Martín-Maldonado, Natalia Pastor-Tiburón, Raquel Martín-Hernández, Fernando González-González, and María Teresa Gómez-Muñoz. 2022. 'Adaptation of the classical end-point ITS-PCR for the diagnosis of avian trichomonosis to a real-time PCR reveals Bonelli's eagle as a new host for Trichomonas gypaetinii', *Parasitology Research*, **121**: 3663-70.

Alhasnawi, Naji. 2022. 'A comparative study of parasitic infections in domestic and wild pigeons in Iraq', *Archives of Razi Institute*, **77**: 709.

Alrefaei, Abdulwahed Fahad, Mohammed Fahad Albeshr, Sultan Nafea Alharbi, Abdulmajeed Fahad Alrefaei, Mikhlid Hammad Almutairi, Bader Obaid Almutairi, Johanna L Nader, and Salim Manoharadas. 2021. 'Molecular characterization of the Fe-hydrogenase gene marker in Trichomonas gallinae isolated from birds in Riyadh, Saudi Arabia', *Parasitology international*, **81**: 102263.

Doneley, B. 2016. *Avian medicine and surgery in practice companion and aviary birds*, Second ed. CRC Press, New York. 230-231.

El-Khatam, Ahmed O, Mahmoud R AbouLaila, Mahmoud Ibrahim, and Mostafa M AbdEl-Gaber. 2016. 'Trichomonas gallinae: Prevalence and molecular characterization from pigeons in Minoufiya governorate, Egypt', *Experimental parasitology*, **170**: 161-67.

Fadhil, Layla T, Azhar A Faraj, and Amer M AL-Amery. 2020. 'Trichomonas gallinae identification and histopathological study in pigeon (Columba livia domestica) in Baghdad city, Iraq', *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, **44**: 57-63.

Graham, J. 2016. *Blackwell's five-minute veterinary consult-Avian*, first ed. Wiley Blackwell, Hoboken. 287-288

Samour, J. 2016. *Avian medicine*, first ed. ELSEVIER, St. Louis. 27-29

Saikia, Munmi, Kanta Bhattacharjee, Prabhat Chandra Sarmah, and Dilip Kumar Deka. 2022. 'Comparative Evaluation of Direct Smear and Culture Methods for Detection of Trichomonas gallinae Infection in Pigeon and Chicken of Assam', *International Journal of Current Science Research and Review*, **5**: 4331-35.

Qiu, Shen-Ben, Meng-Na Lv, Xi He, Ya-Biao Weng, Shang-Shu Zou, Xin-Qiu Wang, and Rui-Qing Lin. 2017. 'PCR identification and phylogenetic analysis of Trichomonas gallinae from domestic pigeons in Guangzhou, China', *The Korean journal of parasitology*, **55**: 333.