Archive of SID

شناسایی عفونت ناشی از *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در گاوداری‌های صنعتی شهرستان همدان

پژمان محمودی کوهی[1*]، علی صادقی نسب[2]، عبدالمجید محمدزاده[3]، آرام شریفی[4]، علی‌اصغر بهاری[2] و نادر مصوری[5]

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۶

چکیده

بیماری یون نوعی عفونت مزمن روده‌ای است که به وسیله‌ی *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* (Map) ایجاد شده و خسارات اقتصادی هنگفتی را به صنعت دامداری وارد می‌کند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، شناسایی عفونت ناشی از این باکتری در گاوداری‌های صنعتی شهرستان همدان بود. بدین منظور تعداد ۱۵۰ نمونه‌ی مدفوع از گاوهای به ظاهر سالم و مشکوک به بیماری، طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ جمع‌آوری و با استفاده از آزمون‌های میکروسکوپی مستقیم و Nested-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی نمونه‌ها به روش رنگ‌آمیزی زیل- نلسن نشان داد که تعداد ۸ رأس از دام‌ها (۵/۳۳ درصد)، به باکتری عامل بیماری، آلوده بودند و تمامی نمونه‌های مثبت، متعلق به گاوهای به ظاهر سالم بود. در حالی که با استفاده از آزمون Nested-PCR، به ترتیب تعداد ۳۹ (۳۰/۲۳ درصد) و ۹ (۴۲/۸۶ درصد) رأس از دام‌های به ظاهر سالم (مجموع ۱۲۹ رأس) و مشکوک به بیماری (مجموع ۲۱ رأس)، مثبت تشخیص داده شدند، هرچند اختلاف آماری معنی‌داری بین تعداد موارد مثبت در این دو گروه مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بنابراین، مجموعاً تعداد ۴۸ عدد (۳۲ درصد) از کل نمونه‌ها، به *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* آلوده بودند که میزان آلودگی نسبتاً زیادی را نشان می‌دهد. بدین ترتیب توصیه می‌شود به منظور کنترل آلودگی و جلوگیری از اشاعه‌ی آن به سایر دام‌ها و گله‌ها و جلوگیری از خسارات ناشی از بیماری، دام‌های آلوده حذف شوند و اقدامات مدیریتی و بهداشتی مناسبی اتخاذ گردد. بر اساس اطلاعات نویسندگان، مطالعه‌ی حاضر اولین گزارشی است که وجود پاراتوبرکلوز را در گاوداری‌های صنعتی شهرستان همدان تأیید می‌کند.

کلمات کلیدی: پاراتوبرکلوز، *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس*، Nested-PCR، گاو، همدان

مقدمه

بیماری یون (Johne's disease) یا پاراتوبرکلوز (Paratuberculosis) یکی از بیماری‌های مسری گاو، گوسفند، بز و سایر نشخوارکنندگان با انتشار جهانی است که از اهمیت اقتصادی خاصی برخوردار می‌باشد. این بیماری که به واسطه‌ی *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* ایجاد می‌شود، با آنتروکولیت گرانولوماتوز، تورم عروق لنفاوی موضعی و لنفادنیت همراه بوده و از طریق مدفوعی- دهانی انتقال می‌یابد. حیوانات با سن زیر ۱ ماه بیش‌ترین استعداد ابتلا را دارند، هرچند بسیاری از حیوانات قبل از شش ماهگی به باکتری آلوده می‌شوند (Hassani Tabatabaei and Firouzi 2005). از آنجا که این بیماری در نهایت به کاهش وزن و

[1*] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان E-mail: mahmoodi_pezhman@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[2] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[3] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[4] دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی باکتری‌شناسی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[5] دانشیار آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

www.SID.ir

Archive of SID

لاغری منجر می‌شود، می‌تواند بازده‌ی گله‌های شیری و گوشتی را به شدت تحت تأثیر قرار دهد. به همین دلیل شناسایی بیماری در گله‌های پرورشی اهمیت بسیار زیادی دارد، به ویژه این که دفع جرم عامل بیماری قبل از بروز علائم بالینی بیماری آغاز می‌شود و ممکن است دام‌های دیگر را نیز مبتلا سازد (Hassani Tabatabaei and Firouzi 2005). تشخیص این بیماری به واسطه‌ی شناسایی موارد بالینی و تحت بالینی آن به وسیله‌ی روش‌های گوناگونی صورت می‌گیرد که هر یک دارای حساسیت و ویژگی متفاوتی هستند. در این خصوص، اگر چه روش کشت و جداسازی باکتری از نمونه‌ی مدفوع، یک روش حساس با ویژگی ۱۰۰ درصد است ولی دفع متناوب باکتری در مدفوع و زمان طولانی انکوباسیون جهت اعلام نتیجه‌ی کشت، کاربرد آن را محدود می‌کند (Merkel 1973, Collins et al. 1990, Whittington and Sergeant 2001). از طرف دیگر پاسخ‌های ایمنی اغلب در مراحل انتهایی بیماری شکل گرفته و این مسأله استفاده از آزمون‌های سرم‌شناسی را جهت تشخیص قطعی عفونت در کنار سایر روش‌ها امکان‌پذیر می‌سازد (Whittington 2009). از همین رو، به منظور تشخیص بیماری به صورت انفرادی در یک جمعیت دامی، معمولاً از سایر روش‌ها همچون آزمایش مستقیم میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی زیل- نلسن) و روش‌های تشخیصی مولکولی مانند PCR و Nested-PCR استفاده می‌شود که در آن‌ها اغلب به جستجوی عناصر ژنتیکی اختصاصی موجود در ژنوم باکتری همانند Map02، IS900 و IS901 پرداخته می‌شود (Millar et al. 1996, Slana et al. 2009, Douarre et al. 2010). زیرا که این آزمون‌های مولکولی از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار هستند و با استفاده از آن‌ها می‌توان با هزینه‌ی کم‌تر و در مدت زمان کوتاه‌تر اطلاعات لازم را به دست آورد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، شناسایی عفونت ناشی از *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در گاوداری‌های صنعتی شهرستان همدان بود.

مواد و روش کار

تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع از گاوهای به ظاهر سالم (۱۲۹ رأس) و مشکوک به بیماری یون (۲۱ رأس) با دامنه‌ی سنی از شکم یک تا شکم هشتم، طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از ۵ گاوداری‌های صنعتی شهرستان همدان که هر کدام حداقل دارای ۱۳۰ رأس گاو دوشا بودند، به روش توشه‌ی رکتال جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی منتقل گردید. ملاک مشکوک بودن بر اساس امتیازهای کم‌تر از ۲/۵ از وضعیت امتیاز بدنی ۱ تا ۵ و قوام مدفوع ۲ و کم‌تر از درجه‌بندی ۱ تا ۵، بوده است.

جهت آزمایش مستقیم میکروسکوپی، ابتدا از هر یک از نمونه‌های مدفوع یک گسترش تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی به روش زیل- نلسن با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌هایی که در گسترش آن‌ها باسیل‌های اسید فست نسبتاً کوتاه و با عرض کم به صورت مجتمع مشاهده شد، به عنوان نمونه‌های مثبت از نظر آزمایش مستقیم میکروسکوپی در نظر گرفته شدند.

استخراج DNAی باکتری‌ها از نمونه‌های مدفوع بر اساس روش ارائه شده توسط Stabel انجام شد (Stabel and Bannantine 2005). به طور خلاصه، نمونه‌ها با استفاده از بافر TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7.6) رقیق و پس از ۵ ثانیه ورتکس، به مدت ۲ دقیقه بدون حرکت قرار داده شدند. پس از ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ در ۲۰۰×g، مایع رویی هر نمونه به یک لوله جدید انتقال داده شد. سپس مایع رویی به نسبت ۱:۱۰۰ با بافر TE رقیق و ۱ میلی‌لیتر آن به یک میکروتیوب استریل منتقل گردید. پس از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰×g به مدت ۲ دقیقه، مایع رویی حذف و رسوب حاصل دوبار با ۱ میلی‌لیتر بافر TE شسته شد. در نهایت رسوب‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE حل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شدند. نمونه‌های DNA تا

www.SID.ir

Archive of SID

انجام آزمون‌های PCR در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تمامی نمونه‌های DNAی استخراج شده، با استفاده از روش PCR آشیانه‌ای و بر اساس پرایمرهای معرفی شده توسط Stabel و همکاران در سال ۲۰۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفتند. این پرایمرها به منظور شناسایی اختصاصی عنصر ژنتیکی ISMap*02* در ژنوم عامل بیماری یون طراحی شده‌اند و توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است. واکنش‌های PCR اول و دوم در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شدند و اجزای آن‌ها شامل ۱۰ میکرولیتر از یک مخلوط تجاری (Bioscience، آلمان)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای مستقیم P1 و معکوس P2 با غلظت۵۰ پیکومول (BioNEER، کره جنوبی)، ۱ میکرولیتر از نمونه DNAی الگو و مابقی آب مقطر استریل بودند. در هر مرحله بررسی نمونه‌ها، از کنترل مثبت (حاوی DNAی *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* سویه 316F) و کنترل منفی (فاقد DNA) استفاده شد. به علاوه، جهت کاهش احتمال آلودگی متقاطع بین نمونه‌ها از دست‌کش‌های یک‌بار مصرف استفاده گردید. آزمون PCR اول شامل ۲۰ چرخه‌ی حرارتی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود. به علاوه، یک مرحله‌ی حرارتی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، قبل و بعد از چرخه‌های تکراری فوق انجام شد. سپس، ۱ میکرولیتر از محصول این PCR به عنوان DNAی الگو در PCR دوم مورد استفاده قرار گرفت. اجزای واکنش PCR دوم به استثنای پرایمرها (P3 و P4) مشابه PCR اول بود و برنامه‌ی حرارتی آن شامل یک مرحله در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه‌ی تکراری ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۲ دقیقه و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. سرانجام، محصولات واکنش‌های PCR روی ژل آگاروز حاوی رنگ اتیدیوم بروماید، الکتروفورز و تحت تابش اشعه‌ی ماوراء بنفش با استفاده از دستگاه UV Transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جهت آنالیز آماری اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون مربع کای بررسی و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در آزمون‌های PCR

نام پرایمر	توالی	اندازه محصول (جفت باز)
P1	5’ GCACGGTTTTTCGGATAACGAG 3’	۲۷۸
P2	5’ TCAACTGCGTCACGGTGTCCTG 3’	
P3	5’ GGATAACGAGACCGTGGATGC 3’	۱۱۷
P4	5’ AACCGACGCCGCCAATACG 3’	

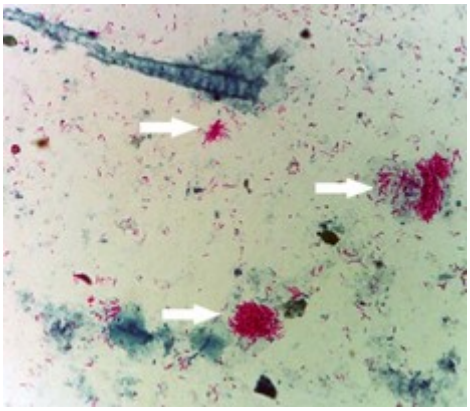
نتایج

آزمایش مستقیم میکروسکوپی

با استفاده از رنگ‌آمیزی نمونه‌های مدفوع به روش زیل- نلسن، تنها تعداد ۸ (۵/۳۳ درصد) نمونه، مثبت تشخیص داده شد و تمامی این نمونه‌ها متعلق به گاوهای به ظاهر سالم بودند. در شکل ۱، نمونه‌ای مثبت در رنگ-آمیزی زیل- نلسن نشان داده شده است.

www.SID.ir

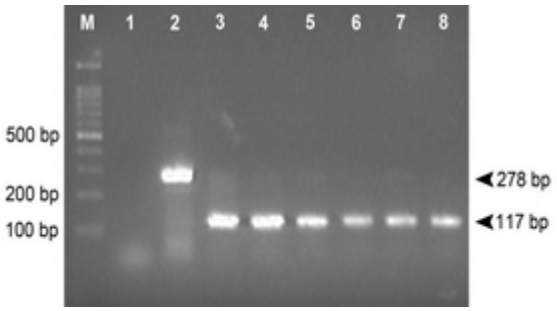
Archive of SID



شکل ۱: نمونه‌ی مدفوع رنگ‌آمیزی شده به روش زیل-نلسن که نشان دهنده‌ی آلودگی شدید با باکتری عامل یون است. باکتری‌ها با پیکان نشان داده شده‌اند (×۱۰۰۰).

آزمون Nested-PCR (PCR آشیانه‌ای)

این آزمون PCR، شامل دو مرحله‌ی PCR متوالی بود. واکنش PCR اول با جفت پرایمرهای P1 و P2 صورت گرفت و سبب تکثیر یک قطعه DNA به طول ۲۷۸ جفت باز شد و در ادامه استفاده از محصول این PCR در واکنش PCR دوم با جفت پرایمرهای P3 و P4، با تولید قطعه‌ای DNA با اندازه‌ی ۱۱۷ جفت باز همراه بود. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، پس از انجام آزمون PCR آشیانه‌ای مشخص شد که در مجموع ۴۸ عدد (۳۲ درصد) از نمونه‌های مدفوع، شامل ۳۹ نمونه متعلق به گاوهای به ظاهر سالم و ۹ نمونه متعلق به گاوهای مشکوک به بیماری، به DNAی *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* آلوده بودند. نمونه‌هایی مثبت در نظر گرفته شدند که باند ۱۱۷ جفت بازی در الکتروفورز محصولات PCR دوم آن‌ها، مشاهده شد. هر چند از تعداد ۴۸ نمونه مثبت، ۲۷ نمونه فاقد قطعه‌ی تکثیر یافته ۲۷۸ جفت بازی در PCR اول بودند. در تمامی مراحل آزمون‌های PCR، باندهای DNA مورد نظر در مورد کنترل مثبت (حاوی DNA *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس*) مشاهده شد، در حالی که هیچ باندی در مورد کنترل منفی وجود نداشت.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR آشیانه‌ای جهت تشخیص DNAی باکتری عامل یون.

M: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون ۱: نمونه کنترل منفی (فاقد DNA الگو)؛ ستون ۲: محصول PCR مرحله اول حاصل از نمونه کنترل مثبت (حاوی DNA *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* سویه 316F)؛ ستون‌های ۳ تا ۸: محصولات PCR مرحله دوم متعلق به تعدادی از نمونه‌های مدفوعی مثبت.

بحث

امروزه برنامه‌های کنترلی در مورد بسیاری از بیماری-های عفونی دام صورت می‌پذیرند. گام اول چنین برنامه-هایی، اغلب تشخیص عفونت در جمعیت دامی یک منطقه است که با استفاده از روش‌ها و آزمون‌های مختلفی انجام می‌شود. در این میان، بیماری یون یکی از بیماری‌های عفونی مهم نشخوارکنندگان به ویژه گاو است که به واسطه‌ی عوارضی همچون دهیدراتاسیون، کاهش تولید شیر، لاغری مفرط و ضعف، خسارات اقتصادی چشمگیری را بر گاوداری‌های صنعتی وارد می‌کند (Hassani Tabatabaei and Firouzi 2005). به همین جهت مطالعات بسیاری با هدف شناسایی این عفونت در جمعیت‌های دامی نواحی مختلف کشور صورت گرفته است.

Seyyedin و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطالعه‌ای را جهت شناسایی اشکال تحت بالینی بیماری یون با دو روش کشت باکتری و Nested-PCR روی نمونه‌های مدفوع گاوهای هلشتاین در استان خراسان رضوی انجام دادند. در این پژوهش، تعداد ۱۶ و ۱۰۳ نمونه مدفوع از

www.SID.ir

Archive of SID

دام‌های با و بدون علامت بالینی یون جمع‌آوری شد. در میان نمونه‌های مدفوع دام‌های دارای علائم بالینی ۱۳ (۸۱/۳ درصد) و ۱۴ (۸۷/۵ درصد) نمونه به ترتیب با روش‌های کشت و مولکولی مثبت تشخیص داده شدند. در حالی که بررسی نمونه‌های مدفوع دام‌های فاقد علائم بالینی نشان داد که ۱۲ (۱۱/۷ درصد) و ۱۰ (۹/۷ درصد) نمونه به ترتیب با روش‌های کشت و مولکولی مثبت بودند. Nassiri و همکاران در سال ۲۰۱۲، تعداد ۲۴۳ نمونه مدفوع و ۵۶ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از دام-های مشکوک در گاوداری‌های اطراف مشهد را جهت شناسایی نمونه‌های آلوده به *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* با استفاده از روش PCR بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد ۱۰۷ نمونه از ۲۴۳ نمونه مدفوع (۴۴ درصد) و ۱۰ نمونه از ۵۶ نمونه شیر خام (۱۸ درصد) به این باکتری آلوده بودند. Haji Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۰۶، شیوع عفونت *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* را با استفاده از روش رنگ‌آمیزی زیل- نلسن در گاوهای کشتار شده در اهواز بررسی کردند و دریافتند که تنها ۲ درصد از نمونه‌های دریچه‌ی ایلئوسکال به عفونت باکتریایی مذکور آلوده بودند. در مطالعه‌ای که توسط Tohidi Moghadam و همکاران در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت، تعداد ۱۵۰ نمونه شیر و مدفوع گاوهای شیری مشکوک به بیماری یون در استان تهران جمع‌آوری و از نظر آلودگی به باکتری عامل آن مورد آزمایش قرار گرفتند. با استفاده از تکنیک Nested-PCR مشخص شد که به ترتیب تعداد ۶۸ (۴۵/۳ درصد) و ۷۴ (۴۹/۳ درصد) عدد از نمونه‌ها مثبت بودند. هر چند بررسی نمونه‌ها به روش PCR معمولی، میزان آلودگی نمونه‌ها را به ترتیب ۴۱ (۲۷/۳ درصد) و ۴۸ (۳۲ درصد) نشان داد. در مطالعه‌ای که Sadati و همکاران در سال ۲۰۱۲ در شمال ایران (تنکابن) انجام دادند، عفونت ناشی از باکتری عامل بیماری یون با استفاده از تکنیک PCR در ۹۰ رأس گاو بررسی شد و مشخص گردید که میزان عفونت بسته به مناطق نمونه‌گیری بین ۴/۲ تا ۷/۷ درصد متغیر بود. همچنین در گزارشی که اخیراً توسط Mohammadian و Abasnia در سال ۲۰۱۵ ارائه شده است، ۶/۳ درصد از ۱۱۱ نمونه اخذ شده از گوسفندان مشکوک به بیماری یون در کشتارگاه اهواز، با استفاده از رنگ‌آمیزی نمونه‌های مدفوع به روش زیل- نلسن، مثبت تشخیص داده شدند.

در مطالعه‌ی حاضر نیز تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع گاوهای شیری از گاوداری‌های صنعتی شهرستان همدان جمع‌آوری و با استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی نمونه‌های مدفوع به روش رنگ‌آمیزی زیل- نلسن نشان داد که تنها تعداد ۸ عدد (۵/۳۳ درصد) از نمونه‌ها، به باکتری عامل بیماری آلوده بودند، با این حال، هیچ یک از این نمونه‌ها متعلق به گاوهای مشکوک به بیماری نبودند. در حالی که به ترتیب تعداد ۳۹ (۳۰/۲۳ درصد) و ۹ عدد (۴۲/۸۶ درصد) از دام‌های به ظاهر سالم و مشکوک به بیماری با استفاده از آزمون Nested-PCR مثبت تشخیص داده شدند. البته آزمون مربع کای نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری بین تعداد موارد مثبت در این دو گروه وجود ندارد (P>۰/۰۵) که این امر می‌تواند بیان‌گر عدم کفایت علائم درمانگاهی بیماری یون جهت شناسایی موارد دچار عفونت باشد و به همین دلیل پیشنهاد می‌شود که جهت غربالگری دام‌های مشکوک، حتماً از روش‌های آزمایشگاهی استفاده شود. از طرف دیگر، تمامی نمونه-هایی که از نظر رنگ‌آمیزی زیل- نلسن مثبت بودند، در آزمون PCR نیز مثبت تشخیص داده شدند که این مسأله حساسیت بالاتر آزمون PCR را تأیید می‌کند. بدین ترتیب با استفاده از روش مولکولی مشخص شد که مجموعاً تعداد ۴۸ نمونه (۳۲ درصد) از ۱۵۰ نمونه مدفوع، به *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* آلوده بودند که میزان آلودگی نسبتاً زیادی را نشان می‌دهد. بر اساس اطلاعات موجود، به نظر می-رسد که تحقیق حاضر اولین مطالعه‌ی علمی در زمینه‌ی بررسی عفونت ناشی از *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

پاراتوبرکلوزیس در استان همدان باشد که نتایج آن حضور این باکتری در گاوداری‌های صنعتی شهرستان همدان را تأیید می‌کند.

انجام مطالعات مشابه و جمع‌آوری اطلاعات جامع‌تر در رابطه با شناسایی این عفونت در گاوها و سایر نشخوارکنندگان و حذف دام‌های حامل و آلوده می‌تواند در کنار مدیریت صحیح به کنترل بیماری، کاهش خسارت‌های ناشی از آن و جلوگیری از اشاعه‌ی بیماری به سایر دام‌ها و گله‌ها کمک بسزایی نماید و بدین ترتیب می‌توان اقدامات کنترلی و پیش‌گیرانه مؤثرتری را اتخاذ کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا همدان جهت تأمین هزینه‌های اجرای این تحقیق از محل طرح شماره‌ی ۱۴۰۳-۳۲ تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Collins, M.T.; Kenefick, K.B.; Sockett, D.C.; Lambrecht, R.S.; McDonald, J. and Jorgensen J.B. (1990). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. Journal of Clinical Microbiology, 28: 2514-2519.

Douarre, P.E.; Cashman, W.; Buckley, J.; Coffey, A. and O'Mahony, J.M. (2010). Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. Gut Pathogens, 2:11.

Haji Hajikolaei, M.; Ghorbanpoor, M. and Solaymani, M. (2006). The prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ileocecal valve of cattle slaughtered in Ahvaz abattoir, southern Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 7(2): 77-80.

Hassani Tabatabaei, A.M. and Firouzi R. (2005). Animal diseases due to bacteria, 2nd edition, number 2492, University of Tehran Press, Pp: 414-422.

Merkal, R.S. (1973). Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. Journal of the American Veterinary Medical Association, 163: 1100-1102.

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 cows' milk in England and Wales. Applied and Environmental Microbiology, 62(9): 3446-3452.

Mohammadian, B. and Abasnia, M. (2015). A study on the prevalence of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in three breeds of sheep at Ahvaz abattoir. Iranian Veterinary Journal, 11: 103-109.

Nassiri, M.R.; Jahandar, M.H.; Soltani M.; Mahdavi, M. and Doosti, M. (2012). Identification and strain determination of *M. paratuberculosis* (MAP) by PCR and REA methods based on IS900 and IS1311 insertion segments. Journal of Agricultural Biotechnology, 4: 83-96.

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.

Seyyedin, M.; Tadjbakhsh, H. and Zahraei Salehi, T. (2010). Identification of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in fecal samples of Holstein-Friesian cattle using molecular and cultivation methods. Journal of Veterinary Research, 65: 135-140.

Slana, I.; Bartos, M.; Roubal, P.; Babak, V. and Pavlik, I. (2009). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. a. avium* detected by culture, I*S*900 and IS901 highly sensitive PCR in bulk tank milk from dairy herds in the Czech Republic between 2002 and 2004. Czech Journal of Food Science, 5: 372-378.

Stabel, J.R. and Bannantine, J.P. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap*02*, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. Journal of Clinical Microbiology, 43: 4744-4750.

www.SID.ir

Archive of SID

Tohidi Moghadam, M.; Sarv, S.; Moosakhani, F. and Badiie, A. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and fecal samples in dairy cattle by PCR and Nested-PCR. Journal of Animal and Veterinary Advances. 9(24): 3055-3061.

Whittington, R.J. (2009). Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. Journal of Clinical Microbiology, 47: 614-622.

Whittington, R.J. and Sergeant, E.S.G. (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in animal populations. Australian Veterinary Journal, 79: 267-278.

www.SID.ir

Archive of SID

Identification of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in industrial dairy farms of Hamedan

Mahmoodi Koohi, P.[1]; Sadeghi-nasab, A.[2]; Mohammadzadeh, A.M.[1]; Sharifi, A.[3]; Bahari, A.A.[2] and Mosavari, N.[4]

Received: 11.11.2016 Accepted: 16.05.2017

Abstract

John's disease is a chronic intestinal infection which is caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) and imposes huge economic losses to farms. The aim of the present study was to detect infection by this bacterium in industrial farms of Hamedan. During the years 2015-2016, 150 fecal samples from apparently healthy and suspected cattle were collected and examined using direct microscopic and Nested-PCR assays. The results obtained from examination of fecal samples with Ziehl-Neelsen (ZN) staining showed that 8 samples (5.33%) were infected with the causative agent of the disease. While, using Nested-PCR assay, 39 (30.23%) and 9 (42.86%) samples were found to be positive in apparently healthy (n=129) and suspected cattle (n=21), respectively. However, no significant difference was statistically observed between the numbers of positive cases in these two groups (P>0.05). Thus, 48 (32%) out of 150 fecal samples were totally infected with *M. avium* subsp. *paratuberculosis* which relatively shows a high infection rate. Therefore, it is suggested to eliminate infected animals and take proper management and hygiene measures in order to control the infection and prevent its prevalence to other animals and herds. To our knowledge, the present study is the first report which confirms paratuberculosis in industrial farms of Hamedan.

Key words: Paratuberculosis, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, Nested-PCR, Cattle, Hamedan

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3- PhD Graduated of Bacteriology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
4- Associate Professor, Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
Corresponding Author: Mahmoodi Koohi, P., E-mail: mahmoodi_pezhman@yahoo.com

www.SID.ir