Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۹ زمستان ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.103030

شناسایی اولین جدایه‌های باسیل پاراتوبرکلوزیس در بز و گوسفند از ناحیه مرکزی ایران

• **امیر حسین شاهمرادی (نویسنده مسئول)**
عضو هیات علمی بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
• **کیوان تدین**
عضو هیات علمی بخش واکسنهای هوازی موسسه رازی کرج
• **وحید نعمان**
عضو هیات علمی بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
• **روح الله کشاورز**
عضو هیات علمی موسسه رازی کرج
تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۴
Email: amshahmoradi@gmail.com

چکیده

در ایـن بررسـی، بـر روی نمونـه های مدفوع دامهای مشـکوک به بیماری پاراتوبرکلوزیز و نیز تعدادی از دام های سـالم منطقه سـمیرم، براسـاس پروتکلهای مورد تایید OIE، عملیات کشـت میکروبی درمحیط هرولدز اگ با مایکوباکتین و نیز محیط هرولدز اگ بدون مایکوباکتین انجام گردید سـپس کشـتها درانکوباتور قرار داده شـد و بطور هفتگی کنترل وثبت اطلاعات انجام گردید.از کلنیهای رشـد یافته، گسترش، رنگ آمیزی(ذیل-نلسون)و بررسی میکروسکوپیک بعمل آمد،سپس از نمونه های مثبت میکروسکوپی، کشت مجددساب کالچر شد و در نهایت آزمونهای مولکولار(PCR) بر روی نمونه های مثبت جهت تعیین شناسایی وهویت انجام شد. در طول انجام این بررسی تعداد ۶۸ نمونه از بز و گوسفند منطقه سمیرم اخذ شد که۹۰٪ آنها دارای نشانی های بالینی مشکوک به بیماری یون بودند. در نهایت از ۱۱ نمونه باسیل اسید فست یون جدا شد که پس از کشت های مجدد و رسیدن به حجم مناسب باکتری، آزمون ملکولار زیر انجام گرفت. با استفاده از پرایمرهای IS۹۰۰، مشخص شد که تمامی باسیل‌های رشد کرده متعلق به جنس مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس می‌باشـندکه پس از الکتروفورز محصول PCR برروی ژل و مشاهده باندی به اندازه ۴۰۰ bp مورد تایید تشخیص نهائی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، بیماری پاراتوبرکلوزیس، بیماری یون،گوسفند وبز، پی سی آر

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 109 pp: 46-51

Identification of the first isolates of Paratuberculosis bacillus in goat and sheep of central region of Iran

By: Shahmoradi A.H., (Corresponding Author), Member of Scientific Board, Veterinary Research Dept., Isfahan Agriculture and Natural Resources Research Center. Tadayon, K., Department of Veterinary Aerobic Bacterial Research & Vaccine Production, Razi vaccine and serum research institute, Karaj, Iran. Noaman, V.; Member of Scientific Board, Veterinary Research Dept., Isfahan Agriculture and Natural Resources Research Center.; Keshavarz, R.; Member of Scientific Board, Razi vaccine and serum research institute, Karaj, Iran

Received: April 2015 Accepted: August 2015

Email: amshahmoradi@gmail.com

Mycobacterium paratuberclosis is one of the most important of *Micobacterium tuberculosis* complex family. This pathogen can infect all ruminant animals like cattle, sheep and goat. This research was done in central of Iran on goats & sheep those have signs of Johne's disease .The samples were put in safe packing and cold position beside ice. We worked on samples according to the (O.I.E) protocols: Decontamination, Culture in special mediums & Incubation in 37. C for about 20 weeks & wrirte results. The special mediums in this research include: Herrold's Eeg Yolk with Mycobactin & Herrold's Eeg Yolk without Mycobactin Finally,in culture stage we 11 positive samples from 68 total. In molecular stage, by IS9 0 and PCR technics,we found that all of these positive samples from Mycobacterium avium subsp Paratuberculosis. This research was done with cooperation of Razi Research Institute and Isfahan Veterinary Organisation

Key words: Johne's disease, *Mycobacterium avium* subsp., Paratuberculosis, Sheep and Goat, PCR

مقدمه

درسال ۱۸۹۵ یک محقق آلمانی بنام یون وهمکارانش، از گاوهای بیمارداری علائم تب، اسهال، کم خونی پیشرونده، لاغری شدید و درنهایت مرگ، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس را جدا نمودند که بعدا نام این بیماری Johne's Disease نهاده شد که به آن بیماری شبه سل نیز گفته می‌شود (۹).

در سال ۱۹۳۲ کرون و همکارانش در انسان بیماری مزمنی را که سبب بروز تب، اسهال، کم خونی پیشرونده و لاغری مفرط میشود شناسائی کردند و یکی از عوامل ایجاد بیماری را مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس عنوان نمودند این بیماری نیز Crohn's Disease نام نهاده شد (۹).

بیماری یون(Johne's Disease) از بیماریهای مزمن گرانولوماتوزی روده باریک میباشدکه عامل اصلی آن مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس است. مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس باسیلی است کند رشد، غیر متحرک، هوازی، گرم مثبت، اسید فست، مقاوم در برابرخشکی و اکثر درترجنتها، حساس به حرارت و ترکیبات فنله. اکثر سویه های این باکتری جهت رشد در محیط کشت به فاکتور آهن یا مایکوباکتین نیازمند هستند. دیواره سلولی این باکتری Spheroplast بوده و یکی از دلایل دیر رشد بودن آن به نظر میرسد. این باکتری در موکوس دیواره روده نفوذ کرده و بوسیله ماکروفاژها بلعیده می شود، داخل فاگوسیتها تزاید نموده و سبب تورم سلولهای ناحیه و در نهایت متورم شدن عضو میگردد (۱۰).

هنوز هم پس از سالها، از کشت میکروبی بعنوان (gold test) یاد میشود ولی باید توجه داشت که روش کشت میکروبی نیاز به زمان دارد (حداقل ۲ ماه). محیط های کشت این باکتری بسیار اختصاصی میباشند که به دو گروه محیط های جامد و محیط های مایع تقسیم می شوند. از روشهای سرو لوژیکی مثل الایزا نیز میتوان در کنار کشت استفاده نمود . در سالهای اخیر تکنیکهای ملکولار (PCR) نیز جهت جداسازی و شناسایی کوتاه مدت مایکوباکتریومها استفاده می شود. دانشمندان در ژنوم مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس جزء ژنتیکی کشف نموده اند و آنرا IS۹۰۰ نام نهاده اند که اختصاص به همین باکتری دارد، بنابراین با تهیه پروب اختصاصی و با استفاده از PCR برمبنای تکثیر قسمت اختصاصی ژنوم مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس یعنی ۵۹۰۰ میتوان سریع تر به وجود این باکتری پی برد (۱۰).

در ناحیه مرکزی مرکزی ایران عشایر منطقه سمیرم زندگی میکنند که در اوایل فصل بهار و در طول تابستان در این ناحیه ساکن هستند و در فصول سرد به مناطقی از استانهای گرم مثل فارس، خوزستان و بوشهر و کهگیلویه و بویر احمرکوچ می‌نمایند. با توجه به وجود نشانی های بیماری یون در برخی از گله های این عشایر، به بررسی وجود باسیل مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (عامل بیماری یون) در بز و گوسفند این منطقه پرداختیم.

مواد و روش ها

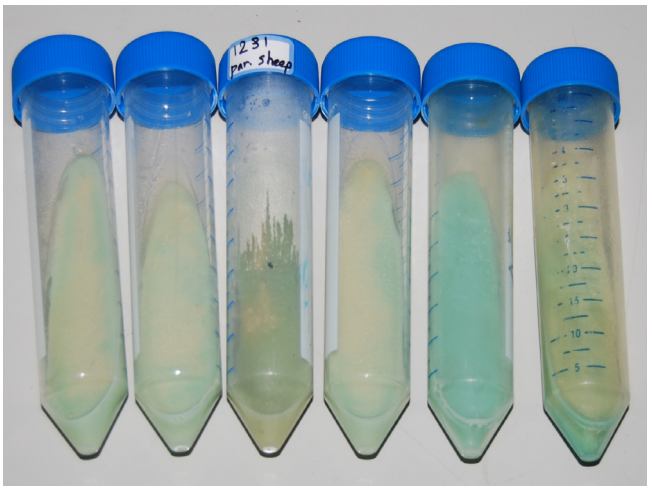
مواد مورد نیاز

نمونه مدفوع دامهای مشکوک و برخی دامهای سالم، ظرف نمونه‌گیری، ارلن مایر، مگنت، پیپت، لام میکروسکوپی، آنس، سانتریفوژ، انکوباتور

www.SID.ir

Archive of SID

اتوکلاو، میکروسکوپ و میکسر، محلول میکروب زدای H.P.C = Hexad -cyl Pridinium Chloride ، محیط‌های اختصاصی کشت میکروبی هرولدز اگ با و بدون مایکوباکتین، مایکوباکتین (Mycobactin)، محلول رنگ آمیزی (ذیل– نلسون)، وسایل و مواد مورد نیاز PCR



شکل ۱- باسیل های رشد کرده در چند نمونه مثبت

روش‌ها

–نمونه برداری و ارسال به آزمایشگاه : در ظروف مناسب از دامهای دارای نشانی های بالینی و نیز از دامهای سالم(نمونه شاهد) نمونه مدفوع روده ای گرفته و به آزمایشگاه منتقل شد.عملیات کشت میکروبی براساس پروتکل (O.I.E) انجام گرفت (۱۱).

– آماده سازی نمونه های مدفوع : یک گرم از مدفوع را دریک لوله آزمایش با حجم ۵۰ ml ریخته و روی آن ۲۰ml آب مقطر استریل اضافه نمودیم. پس از تکان دادن و مخلوط کردن، بمدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه به حال خود قرار داده شد. سپس ۵ml از مایع روئی لوله را بوسیله پیپت کشیده و به لوله آزمایشی که محتوی ۲۰ میلی لیتر محلول هگزا دسیل پیریدینیوم کلراید H.P.C = Hexadecyl Pridinium Chloride با رقت ۰/۷۵درصد بود منتقل کردیم. لوله آزمایش مذکور را خوب مخلوط نمودیم تا یکنواخت گردد، سپس لوله به حالت ایستاده و بدون حرکت ۲۴ – ۱۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد.پس از آن مایع روئی را خالی نموده و از رسوب حاصل جهت کشت میکروبی استفاده نمودیم. (نمونه شماره ۱) (۷).

– کشت میکروبی و انکوباسیون: تعداد ۳ لوله محتوی محیط جامد (Herrold's egg yolk with Mycobactin) و یک لوله (Mycobactin He- rold's egg Yolk without) آماده نموده و از رسوب نمونه شماره یک به میزان ml ۰/۱ به هر یک از چهار لوله تلقیح نمودیم (۷). لوله های کشت شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بطور هفتگی تغییرات یادداشت گردید (۷).

– بررسی میکروسکوپیک :از رسوب نمونه شماره ۱ و همچنین از کلنی‌های ظاهر شده در لوله های محیط کشت، گسترش (اسمیر) تهیه و به روش (ذیل– نلسون) رنگ آمیزی و مورد مطالعه میکروسکوپیک قرار گرفت (۱۲).

نتایج

در طول انجام این بررسی تعداد ۶۸ نمونه از گوسفند و بز که ۹۰%

شکل ۲ – باسیل های رشد یافته در یک نمونه

آنها دارای نشانی های بالینی مشکوک به بیماری یون بودند اخذ شدکه در نهایت از ۱۱ نمونه باسیل اسید فست یون جدا شد که پس از کشت های مجدد و رسیدن به حجم مناسب باکتری، مراحل ملکولار انجام گرفت.

- استخراج DNA (۱۴): پس از ساب کالچر نمونه های مثبت، در حدود شش تا هشت هفته پس از انکوباسیون کلنی‌ها به اندازه کافی رشد کرده بودند. سپس با استفاده از یک آنس پلاستیکی استریل تحت شرایط ایمن در زیر هود از سطح محیط کشت محیط هرالدزاگ حداقل به میزان دو لوپ کامل از کلنی‌های باکتری برداشته و به آرامی در درون یک میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE انتقال داده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه جهت غیر فعال شدن باکتری در دمای ۸۵ °C قرار داده شد.

- مراحل استخراج DNA: ماده ژنتیکی باکتری بر اساس روش پیشنهادی Soolingen Van که به روش CTAB شناخته می شود استخراج گردید و این روش مشتمل برمراحل زیر بود.

۱- به هر یک از مایکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون غلیظ و کشته شده مایکوباکتریوم ۵۰ مایکرولیتر لیزوزیم ۱۰ mg/ml اضافه شد و پس از ورتکس شدن، یک شب در ۳۷ C° قرار داده شد.

۲- مقدار ۱۱۰ میکرولیتر مخلوط پروتئیناز K و SDS ۱۰% به هر مایکروتیوب اضافه و خیلی کوتاه ورتکس شد و یک شب در ۵۰ C° انکوبه گردید. طی این دو مرحله پیکره باکتری‌ها توسط آنزیمهای لیزوزیم، پروتئیناز K و SDS از بین رفته و DNA باکتری آزاد گردید.

۳- به مایکروتیوب‌ها ۱۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار اضافه شد.

۴- به هر مایکروتیوب ۱۰۰ مایکرولیتر محلول CTAB/NaCl که قبلا به مدت ۱۰ دقیقه در فور ۶۵ C° قرار داده شده بود (تا سیال گردد)، اضافه

www.SID.ir

Archive of SID

گردید و تا ظهور محلول سفید شیری رنگ ورتکس شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ Co قرار گرفت.

۵- یک حجم (در حدود ۷۵۰ مایکرولیتر) ایزوآمیل الکل – کلروفرم(نسبت ۱ به ۲۴) به هر مایکروتیوب اضافه وحداقل به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و در دمای اتاق به مدت ۸ دقیقه در g ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

۶- با دقت و با کمک سمپلر ۱۰۰ به تدریج و به آهستگی فاز آبی را که حاوی DNA بود و در قسمت فوقانی دو فاز دیگر قرار داشت برداشته و به یک مایکروتیوب دیگر منتقل ¬گردید. تقریبا ۸۰٪ از مایع روئی برداشت شود. در حین انتقال ممکن بود مقداری پروتئین به همراه محلول حاوی DNA وارد مایکروتیوب شود که برای تخلیص بیشتر DNA مراحل ۵ و ۶ مجدداً تکرار شد.

۷- به میزان ۰/۶ حجم (۴۵۰ مایکرولیتر) ایزوپروپانول سرد به فاز آبی حاوی اسید نوکلئیک اضافه و به مدت ۳۶۰-۳۰ دقیقه در ۲۰- Co نگهداری گردید.

۸- میکروتیوبهای حاوی DNA به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در g ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی تا حد امکان دور ریخته شد .

۹- مقدار یک میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه و مایکروتیوب‌ها چند بار سروته گردیدند.

۱۰- محلول بالا ۵ دقیقه در دمای اتاق در g۱۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع روئی اتانول تا حد امکان دورریخته شد.

۱۱- برای اطمینان از خارج شده تمام اتانول مایکروتیوب حاوی رسوب DNA در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود و اتانول تبخیر گردد.

۱۲- روی رسوب DNA، ۲۰ مایکرولیتر بافرTE ریخته شد تا DNA به خوبی در TE حل گردد. میزان وکیفیت DNA با انجام الکترفورز در ژل اگارز و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید بررسی شد در مرحله بعد به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ میزان و خلوص DNA به طور دقیق مشخص گردید (۱۱).

تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم‌ها با استفاده از تکنیک PCR

در این تحقیق جهت تعیین هویت مولکولی دقیق، از دو پرایمر IS۹۰۰P۹۰ و IS۹۰۰P۹۱ برای انجام واکنش PCR استفاده شد و اجزا آزمون های PCR مورد استفاده در این تحقیق طبق جدول آماده گردید.

مراحل آماده سازی میکرو تیوپ‌ها جهت انجام واکنش PCR

برای جلوگیری از اتلاف زمان بر حسب تعداد نمونه مورد آزمایش، یک مخلوط اصلی که شامل بافر ۱۰x PCR، محلول MgCl2، مخلوط dNTP، پرایمرجلو برنده، پرایمر پس ران، Taq DNAپلیمراز و آب مقطر استریل است تهیه شد ودر میکروتیوپ ها تقسیم شد. برای انجام هر واکنش PCR مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت.

۱- مخلوط اصلی PCR به میکروتیوب های PCR انتقال داده شد.

۲- حدود ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم از هر نمونه DNA استخراج شده به مخلوط PCR اضافه گردید.

۳- مخلوط حاصل به کمک یک مایکروسانتریفوژ در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ ثانیه سانتریفوژ و سپس مایکروتیوب‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند.

۴- برنامه دما و زمان انجام PCR، شامل جدا شدن دو رشته DNA (دناتوره شدن)، چسبیدن پرایمرها به هر زنجیره (آنیلینگ) و سنتز زنجیره مورد نظر برای سکانس های IS۹۰۰ مطابق جدول ها اجرا گردید.

الکتروفورز محصول PCR

جهت بررسی محصول به دست آمده از واکنش PCR، الکتروفورز به صورت زیر انجام گرفت.

۱- آگارز ۱٪ دربافر TBE همراه با اتیدیوم بروماید تهیه و در سینی ژل ریخته شد. ژل بعد از شکل گرفتن در تانک الکتروفورز محتوی بافر TBE قرار گرفت.

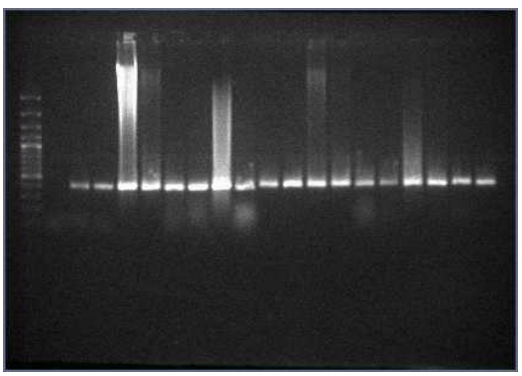
۲- از هر نمونه محصول PCR همراه با بافر نمونه به میزان ۶ میکرولیتر، در چاهک موجود در ژل ریخته شد (به نسبت ۱ به ۵).

۳- در چاهک ابتدایی یا انتهایی سایز مارکرریخته شد.(از سایز مارکر،جهت تعیین اندازه قطعه محصول PCR استفاده می‌گردد).

۴- درب تانک الکتروفورز گذاشته و ژل در میدان الکتریکی با قدرت ۸ v/cm به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد.

۵- ژل فوق توسط دستگاه ژل داک مشاهده و عکس آن در کامپیوتر ذخیره گردید.

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای IS900 (Naser, 2004 P90 #26) و نتایج آن : با استفاده از پرایمرهای IS۹۰۰، مشخص شد که تمامی باسیل های رشد کرده متعلق به جنس مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس می باشند. پس از الکتروفورز محصول PCR برروی ژل و مشاهده باندی به اندازه ۴۰۰ bp مورد تایید قرار گرفت.



از سمت چپ به ترتیب پس از Ladder
Negative-۱۲۲۸-۱۲۲۸-۱۲۳۱-۱۲۳۱-۱۲۳۲-۱۲۳۲-۱۲۳۵-۱۲۳۵-۱۲۳۶-
۱۲۳۶-۱۲۳۹-۱۲۳۹-۱۲۴۰-۱۲۴۰-۱۲۴۸-۱۲۴۸-۱۲۵۱-۱۲۵۱

بحث

عشایر منطقه سمیرم اوایل بهار به این مکان می آیند و اواخر شهریور یا اوایل پائیز به مناطقی از استان های فارس، خوزستان ، بوشهر و کهگیلویه و بویراحمرکوچ می کنند، بنابراین زمان نمونه برداری منحصر به ۴ تا ۵ ماه سال بود. از۵ منطقه عشایرنشین سمیرم نمونه برداری انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه

Primer	Sequence (۵'-۳')	Reference
IS۹۰۰P۹۰	GTT CGG GGC CGT CGC TTA GG	Huard, ۲۰۰۳
IS۹۰۰P۹۱	GAG GTC GAT CGC CCA CGT GA	Huard, ۲۰۰۳

جدول اجزاء مورد نیاز در PCR

PCR reaction	PCR buffer[۱] (µl)	dNTPs[۲] (µl)	$MgCl_2$[۳] (µl)	Primer forward[۴] (µl)	Primer reverse[۴] (µl)	Taq polymerase[۵] (µl)	DNA template (µl)	PCR water (µl)	Final volume
IS۹۰۰P	۱,۲۵	۰,۲۵	۱,۲	۱	۱	۰,۳	۳	٤,۵	۱۲,۵

[۱]: Without $MgCl_2$.
[۲]: From ۱۰ mM solution.
[۳]: From ۲۵ mM solution.
[٤]: From ۵ pmol/ µl solution.
[۵] From ۵ U/ µl stock

جدول برنامه PCR در دستگاه ترموسایکلر

PCR reaction	Initial heating	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	№ of complete cycles
MAP۱	٦۰۰sec, ۹۵ °C	٦۰sec, ۹۵ °C	۹۰ sec, ۵۸ °C	۹۰ sec, ۷۲ °C	٦۰۰sec, ۷۲ °C	۳۵

نمونه‌هائی که کشت میکروبی مثبت، از گله های مناطق مختلفی بودند و این بدان معنی است که بیماری یون در اکثرگله های عشایر وجود دارد.

موضوعی که باید یادآورشد اینکه گله های گوسفند و بز عشایر چون راه درازی را می پیمایند تا به این منطقه برسند عوامل مختلفی مثل استرس حمل و نقل، تغییر آب و هوا و نیز تغییر نوع علوفه مرتعی می تواند سبب بروز اسهال شود. چون در این پژوهش دام های دارای نشانی های مشکوک به بیماری یون مورد نظر بود از دامهائی که نشانی های غیر یونی داشتند مثل اسهال سفید نمونه برداری بعمل نیامد.

مطلب مهم دیگر اینکه قبلا در برخی از این گله ها تعدادی گاو نیز وجود داشتندکه بنابرگفته صاحبان آنها برخی از این گاوها مدتی طولانی مبتلا به اسهال بودند و از گله خارج شده بودند.

متاسفانه دسترسی به واکسن و دارو درکل منطقه عشایرنشین سمیرم بسیار نامناسب بود که می تواند سبب انتقال عوامل بیماریزا از استانی به استان دیگر شود. در مورد بیماری یون نیز برنامه مدونی جهت مبارزه با این بیماری در دست اجرا نمی باشد که با توجه به مزمن بودن آن، در آینده این بیماری می تواند یکی از مشکلات اصلی در مناطق ییلاقی و قشلاقی باشد.

در تحقیق حاضر از تعداد ۶۸ نمونه اخذ شده، تعداد ۱۱ مورد مثبت بدست آمد که ۷ نمونه مربوط به گوسفند ماده (میش۲ تا ۳ ساله) و ۴ مورد مربوط به بز (۳ راس ماده + یک راس نر) ۲ تا ۳/۵ ساله بود. این نمونه ها شامل مناطق مختلف عشایرنشین منطقه سمیرم (منطقه وردشت روستای فتح آباد - روستای حنا و روستای چشمه خونی - پادنای اولیا مناطق بیده و قره چمن - پادنای سفلا منطقه کومه) می شدند. این تعداد نمایانگر حضور بالای جرم در منطقه می باشد و بدلیل اینکه هدف از این تحقیق جمع آوری عامل بیماری برای تحقیقات بعدی بوده لذا محاسبات آماری را در این تحقیق نمی توان به راحتی انجام داد، معذالک حدود یک ششم مثبت نمونه ها حاکی از وجود بیماری و آلودگی بالای منطقه می باشد که آمادگی و برنامه ریزی مناسب را برای مقابله با آن طلب می‌نماید.

نکته جالب در کشت نمونه ها این بود که سرعت رشد در نمونه های مربوط به بزها بیشتر از گوسفندان بود و نیز پرکنه های رشد کرده بدون پیگمان بودند

با استفاده از پرایمرهای IS۹۰۰، مشخص شد که تمامی باسیل های رشد کرده متعلق به جنس مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس می باشند.

با توجه به اینکه در این طرح برای اولین بار در ایران ، باسیل مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس از گوسفند و بز جدا شده است، پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی برای مقایسه این باسیل ها با نمونه‌های استاندارد انجام گیرد و نیز مقایسه ای بین باسیل گوسفندی و بزی جدا شده در این طرح با مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس که در طرح جداسازی و شناسائی باسیل یون در دامداریهای صنعتی و نیمه صنعتی اصفهان یافت شده است صورت پذیرد.

با توجه به جداسازی و شناسائی عامل بیماری یون در گله‌های گوسفند عشایر منطقه سمیرم و کوچ این گله ها به استانهای فارس، بوشهر، خوزستان و کهگیلویه و بویر احمر بهتر است جهت جلوگیری از پراکنده شده باسیل یون و اشاعه بیماری یون، مبارزه با این بیماری در برنامه

www.SID.ir

Archive of SID

سازمان دامپزشکی قرار گیرد.

در بین سالهای ۷۸ – ۱۳۷۵ دکتر شاهرخی در استان مرکزی از تعداد ۱۰۲ نمونه مدفوع مشکوک به یون کشت داده شده، ۱۶ مورد مثبت جداسازی نمود (۶۸/۱۵٪). وی در کنار کشت میکروبی، تستهای الایزای جذبی و الایزای گاماانترفرون را نیز بکار برد که میزان شیوع در الایزای جذبی (۷۵/۶۸) و در الایزای گاما انترفرون را (۷۵/۴۳) بدست آورد که داده های این تحقیق نیز بسیار نزدیک به تحقیق حاضر می باشد (۴).

شکیبامهر(بذرپور) در بین سالهای ۷۹ – ۱۳۷۸ با استفاده از الایزا و همچنین تهیه گسترش مستقیم، به بررسی بیماری یون در شهرستان ساوجبلاغ پرداخت که پس از بررسی ۲۷۶ نمونه مدفوع و خون، میزان شیوع بیماری را در روش الایزا (۹۱/۲۳) و در بررسی مستقیم گسترشهای میکروسکوپی(۲/۲) تعیین نمود. با ذکر این مطلب که در این تحقیق کشت صورت نپذیرفته و در صورت انجام کشت احتمالا موارد جدایه نزدیک به داده های تحقیق حاضر می بود (۳).

شاهمرادی و همکاران، در طی سالهای ۸۲ تا ۸۴ در راستای یک پروژه تحقیقاتی به بررسی وجود بیماری یون در گاوداریهای صنعتی و نیمه صنعتی اصفهان پرداختند که از مجموع ۲۲۷ نمونه دارای نشانی بالینی اخذ شده از این گاوداریها، تعداد ۳۲ نمونه اسید فست مثبت بودند. با توجه به اینکه حساسیت لام مستقیم در حدود ۶۰% می باشد لذا تخمین موارد مثبت نزدیک به تحقیق فعلی می باشد (۱).

منابع مورد استفاده

۱- شاهمرادی، امیرحسین - مصوری، نادر - تدین،کیوان و همکاران (۸۴-۱۳۸۲) - جداسازی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در گاوداریهای صنعتی و نیمه صنعتی اصفهان - طرح تحقیقاتی

۲- تدین، کیوان – شاهمرادی ، امیرحسین – مصوری ، نادر (۱۳۸۲) کتاب باکتری شناسی سل و اصول طراحی و مقرارت کار در آزمایشگاه سل – چاپ سازمان نظام دامپزشکی کشور

۳- شکیبامهر (بذرپور)، علی و همکاران (۸۰ – ۱۳۷۹)- بررسی سرواپیدمیولوژی بیماری یون با استفاده از روش الایزا در شهرستان ساوجبلاغ – پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

۴ –شاهرخی و همکاران– (۷۸ – ۱۳۷۵) بررسی بیماری یون در استان مرکزی- طرح تحقیقاتی

۵ - گزارش سالیانه ۸۰ بخش تحقیق و تولید توبرکولین موسسه رازی.

۶ - انصاری لاری، حق خواه، بهرامی، نوین باهران (۱۳۸۵). بررسی ریسک فاکتورهای مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در گاوداریهای شیری استان فارس

7- Gwozdz JM. Comparative evaluation of two decontamination methods for the isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from faecal slurry and sewage Vet Microbiol. 2006 Jul 20;115(4):358-63. Epub 2006 Apr 3

8– Veterinary Practice PP: 74 – 84 (1977)

9– Office International Des Epizooties Manual of standards for Diagnosis Tests and Vaccine. (2004)

10– 11th International Colloquium on Paratuberculosis

11- STABEL J.R. (1997). An improved method for the cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine. fecal samples and comparison to three other methods. J. Vet. Diagn. Invest., 9, 357–380.

12- Debroy B, Tripathi BN, Sonawane GG, Bind RB (2012) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) in alcohol-fixed tissues of sheep by ISMav2 gene PCR and its comparison with histopathology, bacterial culture and IS900 PCR. Small Ruminant Research 105, 2012, 329-334

www.SID.ir