

جداسازی و شناسایی مایکوباکتریوم بویس از نمونه‌های کشتار گاهی گاوهای توپر کولین مثبت استان اصفهان با استفاده از کشت میکروبی و تعیین هویت بیوشیمیایی

• امیرحسین شاهمرادی (نویسنده مسئول)

بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، ایران

• کیوان تدین

بخش واکسنهای هوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

• رضا عارف پژوهی

بخش توپر کولین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

• وحید نعمان

بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، ایران

• کیومرث سلیمانی بابادی

بخش توپر کولین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۴

Email: a.hamidian@ut.ac.ir



چکیده

علیرغم اجرای طولانی برنامه مبارزه با سل گاوی در ایران، این بیماری همچنان به عنوان یک مشکل بزرگ باقی مانده است و سبب ایجاد ضررهای اقتصادی گسترده می‌شود. در این مطالعه جداسازی مایکوباکتریوم بویس، عامل ایجادکننده سل گاوی، از گاوهای رآکتور (توبر کولین مثبت) کشتار شده در استان اصفهان مورد بررسی قرار گرفته است. در فاصله زمانی ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۸ عقده‌های لنفاوی مزانتریک و مدیاستینال همراه با نمونه‌های پاتولوژیک (در صورت وجود) از ۱۴۳ گاو بر روی محیط کشت اختصاصی لونشتاین-جانسون گلیسیرین دار و لونشتاین-پیرووات دار کشت داده شد. تعداد ۲۸ جدایه دارای ویژگی‌های رشد مایکوباکتریوم‌ها نظیر بر خورداری از خاصیت اسید فست بودن در میکروسکوپی، توسط یک الگوریتم استاندارد بیوشیمیایی متشکل از آزمایش‌های رشد تریچه‌ی بر روی محیط کشت بیرووات دار، کاتالاز، تولید نیاسین، احیاء نیترات، رشد در محیط حاوی تیوفن کربوکسیلیک هیدرازید اسید (TCH) و تولید کورد فاکتور، مورد بررسی قرار گرفتند. در نتیجه تمام ۲۸ جدایه به عنوان مایکوباکتریوم بویس شناسایی شدند. این جدایه‌ها از ۸ واحد گاوداری در نواحی مختلف استان اصفهان جمع‌آوری شده بودند که از میان آنها ۱۵ جدایه مربوط به یک گله در بهارستان و دو گله دیگر هر یک با ۴ جدایه بودند. ۵ جدایه باقیمانده از ۵ گاوداری در مناطق دولت آباد، نجف آباد، تیران، گلشهر و قلعه شور اصفهان جداسازی شدند. جداسازی م. بویس به عنوان تنها پاتوژن مایکوباکتریایی عامل بیماری در گاوان رآکتور اصفهان نشانه تاییدکننده دیگری است دایر بر اینکه دیگر اعضاء کمپلکس م. توپر کولوزیس نقشی در اپیدمیولوژی سل گاوی در این استان ندارند، همچنان که این مشاهده در مورد دیگر استان‌های ایران نیز موضوعیت دارد. در سه مورد از ۸ گاوداری مورد بررسی در این بررسی ۴ جدایه م. بویس و یا بیش از آن از هر گله جمع‌آوری گردید که این امر نشانه وقوع همه‌گیری بیماری در این گله‌ها می‌باشد. پاسخ به این سؤال که آیا یک سویه واحد یا چندین سویه در بروز اپیدمی در این گله‌ها دخالت داشته اند نیازمند انجام بررسی‌های دقیق مولکولار اپیدمیولوژی خواهد بود.

کلمات کلیدی: تست توپر کولین؛ مایکوباکتریوم بویس؛ تست‌های بیوشیمیایی؛ اسید فست؛ رنگ آمیزی ذیل نلسون

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 75-80

Detection and recognition of *Micobacterium tuberculosis* in PPD positive cattle by microbacterial culture and biochemical tests in Esfahan province

By: Shahmoradi, A.H., (Corresponding Author) Veterinary Research Department, Isfahan Agriculture and Natural resources Research and Education Center, AREO, Isfahan, Iran. Tadayon, K., Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREO, Karaj, Iran. Arefpajohi, Reza., Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREO, Karaj, Iran. Noaman, V., Veterinary Research Department, Isfahan Agriculture and Natural resources Research and Education Center, AREO, Isfahan, Iran. Soleymani babadi, Kioomar., Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREO, Karaj, Iran.

Email: a.hamidian@ut.ac.ir

Received: April 2015 Accepted: August 2015

Despite the long-run anti bovine tuberculosis (BTb) scheme in Iran, BTb remains a major problem in the national cattle farming that causes substantial economical loss. In this search (2006-2009), isolation of *Mycobacterium bovis*, the causative agent of BTb, from tuberculin positive (reactor) cattle slaughtered in Isfahan has been addressed. Mesenteric and mediastinal lymph nodes along with pathological specimens (if present) from 143 cattle were cultured on Lowenstein-Jenson (LJ) slopes. The 28 isolates representing mycobacterial growth characteristics eg. Acid fastness in microscopy, were subjected to a standard biochemical algorithm comprising preferential growth on pyruvate LJ medium, catalase, niacin, nitrate reductase, tiophen carboxylic hydrazide acid (TCH) and production of cord factor tests. Consequently, all the 28 isolates were identified as *M. bovis*. These isolates originated from 8 farms in different regions of Isfahan province with 15 of them coming from a single herd in Baharestan followed by two more farms with 4 isolates from each. The remaining 5 single isolates were collected from 5 herds in Dolatabad, Najafabad, Tiran, Golshar and Ghaleh Shour regions. Isolation of *M. bovis* as the single mycobacterial causative pathogen in the reactor cattles of Isfahan is another confirmatory observation that no other member of *Mycobacterium tuberculosis* complex plays a role, if any, in epidemiology of BTb in Isfahan as is the case with rest of Iran. In three out of the 8 farms studied here, there were 4 or more *M. bovis* isolates collected from every herd an indication of BTb epidemics in these herds. Whether single strain or multiples strains of *M. bovis* have been involved in the disease outbreaks in these farms, further molecular epidemiology work is required.

Key words: Tuberculin positive ; Tuberculosis; *Mycobacterium bovis* ; Acid Fast ; Reactor

مقدمه

مایکوباکتریوم بوویس عامل اصلی سل در گاو بصورت طبیعی دارای بیشترین تنوع میزبانی در میان اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس می باشد. تخمین زده می شود که بیش از ۵۰ میلیون راس گاو در جهان آلوده به این باکتری می باشند (۱). پیشینه شناسایی ارتباط میان سل گاو و سل در انسان به اواخر قرن نوزدهم میلادی باز می گردد. به عنوان مثال می توان به مقاله Creighton که در ۱۸۸۰ میلادی با عنوان An Infective Form of Tuberculosis in Man identical with Bovine Tuberculosis در ژورنال فیزیولوژی و آناتومی منتشر شد اشاره نمود (۲). تا پیش از استفاده فراگیر از فرآیند پاستوریزاسیون، حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد موارد سل انسانی ناشی از م. بوویس گزارش شده بود. اگرچه در حال حاضر این رقم در مقیاس جهانی حدود ۱/۴٪ می باشد (۳) با این حال در

برخی از مناطق جهان و از جمله آفریقا و مکزیک این میزان بالاتر است. به عنوان مثال در ترکیه، همسایه غربی ایران، تا ۵/۳٪ موارد انسانی سل به این پاتوژن نسبت داده می شود (۳). سل گاو در بسیاری از مناطق جهان نظیر انگلستان، جمهوری ایرلند، چین و آمریکای لاتین علیرغم صرف هزینه های بسیار در جهت کنترل و ریشه کنی همچنان به عنوان یک مشکل بهداشتی و اقتصادی مهم در دامپروری محسوب می شود (۴). در ایران بر اساس شواهد موجود سل گاو از گذشته در میان گله های گاو وجود داشته است. در سال ۱۳۱۰ خورشیدی کارپانتیه دامپزشک فرانسوی، وجود سل را در میان لاشه گاوهای بومی که در کشتارگاه تهران ذبح می شدند را گزارش نمود. این مشاهدات توسط دامپزشکان ایرانی نیز در طول سال های ۱۳۲۵ و ۱۳۲۶ و پس از آن از دیگر شهرها و مناطق کشور گزارش شده است (۵). با وجود اجرای برنامه تست و کشتار تحت

سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه مایعات، از رسوب بدست آمده جهت تلقیح به یک لوله کشت لونشتاین- جانسون گلیسیرین دار و همچنین به یک لوله کشت لونشتاین- جانسون پیرووات دار استفاده شد. لوله‌های کشت تلقیح شده به مدت ۸ هفته متوالی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند.

آزمایش میکروسکوپی

در پایان دوره انکوباسیون از کلنی‌های تمام لوله‌های کشت گسترش میکروسکوپی تهیه و به روش اسید فست رنگ آمیزی و مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایشات بیوشیمیایی

این آزمایش‌ها شامل آزمون رشد ترجیبهی بر روی محیط کشت، تست نیاسین، آزمون کاتالاز، در دماهای ۲۲ °C و ۶۸ °C، آزمایش نیترات رداکتاز و کشت در محیط TCH (۹) و همچنین تست کورد فاکتور و بر اساس پروتکل‌های استاندارد می‌باشند (جدول شماره ۱) (۲۲).

آزمون رشد ترجیبهی بر روی محیط کشت

مایکوباکتریوم بوویس بصورت ذاتی در جداسازی اولیه گرایش بیشتری برای رشد بر روی محیط‌های کشت حاوی پیرووات از خود نشان می‌دهد درحالی‌که مایکوباکتریوم توبرکولوزیس رشد بهتری بر روی محیط‌های حاوی گلیسیرین از خود نشان می‌دهد.

تست نیاسین

یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل به محیط کشت اضافه و توسط نوک پپیت پاستور چند خراش بر روی سطح محیط ایجاد شد، سپس ۰/۶ میلی‌لیتر از مایع برداشت شده به یک لوله یونیورسال استریل انتقال یافت و یک نوار تست نیاسین داخل لوله قرار گرفت. پس از ۲۰ دقیقه مشاهده تغییر رنگ نوار و مایع برداشت شده به عنوان پاسخ مثبت (توانایی تولید نیاسین) و در صورت عدم تغییر رنگ نوار و مایع، به عنوان نتیجه منفی گزارش شد.

تست کاتالاز

مقدار ۶۱/۱ میلی‌لیتر از محلول A (g/L) ۹/۴ فسفات دی سدیک) و ۳۸/۹ میلی‌لیتر از محلول B (g/L) ۹/۰۷ فسفات منوپتاسیک) مخلوط نموده و pH محلول روی ۷ تنظیم شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول به دو لوله یونیورسال انتقال داده شد. یکی از دو لوله به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۸ °C و لوله دیگر به همین مدت در بن‌ماری ۲۲ °C نگهداری شد. به محتویات هر یک از دو لوله ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط مساوی توئین ۸۰ و آب اکسیژنه ۳۰ حجمی اضافه شد. مشاهده حباب به عنوان پاسخ مثبت و فقدان آن به عنوان پاسخ منفی تلقی شد.

آزمون نیترات رداکتاز

مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول نیترات ردوکتاز در یک لوله یونیورسال ریخته و به میزان یک لوپ از کشت باکتری به آن اضافه شد و به مدت ۲

حمایت قانون از سال ۱۳۴۶ خورشیدی، در حال حاضر کمتر از ۸٪ کل گله گاو کشور که حدود ۸/۵ میلیون راس تخمین زده می‌شوند تحت پوشش این برنامه قرار دارند ضمن آنکه این برنامه بیشتر روی کنترل بیماری در گاوان اصیل و دورگ متمرکز شده است (۶). بدین ترتیب وجود لاشه‌های گاو دارای سل منتشر و همچنین موضعی در میان گاوان بومی و اصیل بصورت پیوسته در گزارشات سالیانه بسیاری از کشتارگاه‌های ایران مشاهده می‌شود. اگرچه اجرای برنامه تست و کشتار گاوهای راکتور سلی در انگلستان و ایرلند نیز همانند ایران تاکنون منجر به ریشه‌کنی بیماری در هیچ یک از این کشورها نشده است اما از دیدگاه اپیدمیولوژی و فرآیند اجرای برنامه، بدلیل وجود اشکالات لجستیکی اساسی مقایسه این کشورها با ایران غیرمنطقی است. بنظر نمی‌رسد ریشه‌کنی بیماری در ایران دستکم در کوتاه مدت در دسترس قرار داشته باشد (۵).

در استان اصفهان با مساحت تقریبی ۱۰۵۲۶۳ کیلومتر مربع برنامه کنترل بیماری سل با انجام تست توبرکولین از چند دهه گذشته در حال اجرا بوده است. در این استان حدود ۴۰۲۰۰ راس گاو اصیل در گاوداری‌های صنعتی و ۱۴۵۰۰ راس در گاوداری‌های نیمه صنعتی پرورش می‌یابند ضمن آنکه حدود ۳۹۰۰۰۰ راس گاو دورگ و بومی نیز در دامداری‌های سنتی و روستایی سطح استان نگهداری می‌شوند. استان اصفهان از کانون‌های مهم در اپیدمیولوژی سل گاوی می‌باشد (۷).

مطالعه حاضر به منظور آگاهی از فراوانی آلودگی به مایکوباکتریوم بوویس در میان گاوان توبرکولینه استان اصفهان با انجام کشت میکروبی بر روی عقده‌های متفاوتی و ضایعات پاتولوژیک لاشه گاوهای توبرکولین مثبت ذبح شده در کشتارگاه اصفهان اجرا و جدایه‌های مایکوباکتریایی جمع‌آوری شده توسط آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شدند. یافته‌های تحقیق در سایه اطلاعات موجود در سایر استان‌های کشور مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های کشتارگاهی

عقده‌های لنفوای (مدیاستینال، مزانتریک و پشت حلقی) همراه با بخش‌هایی از ریه، طحال و کبد (در صورت وجود ضایعات پاتولوژیک قابل مشاهده) متعلق به لاشه گاوهای توبرکولین مثبت در فاصله زمانی ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۸ از کشتارگاه جمع‌آوری و پس از بسته‌بندی در ظرف نمونه‌برداری مناسب و ثبت مشخصات با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی کرج انتقال داده شد.

کشت میکروبی بر روی محیط اختصاصی

در آزمایشگاه با استفاده از مواد و وسایل استریل ابتدا همه نمونه‌های مربوط به هر دام بصورت مجتمع توسط هاون آزمایشگاهی و ماسه بادی، سلايه و یکنواخت شد و سپس با استفاده از ۵ میلی‌لیتر مخلوط N-acetyl-L-cysteine (۰/۵ درصد)، هیدروکسید سدیم (۳/۵ مولار) و سیترات سدیم (۰/۵ مولار) به مدت ۱۵ دقیقه آلودگی زدایی شدند (۸). تقریباً ۵ میلی‌لیتر از قسمت شناور فوقانی برداشت و پس از خنثی‌سازی به کمک اسید کلریدریک در یک لوله یونیورسال در سرعت ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه

مایکولات می‌باشد که فقط توسط سویه‌های بیماری‌زای مایکوباکتریوم توپرکلوزیس تولید و باعث جلوگیری از مهاجرت گلبول‌های سفید و در نتیجه ایجاد گرانولوم‌های مزمن می‌شود. باسیل‌های حاوی این ویژگی در زیر میکروسکوپ به شکل زنجیره‌های موازی دیده می‌شوند.

نتایج

در مجموع نمونه‌های کشتارگاهی ۱۴۳ راس گاو در دوره انجام تحقیق از شهرستان‌های اصفهان، نجف‌آباد، خمینی شهر، مبارکه، زرین شهر و شهرضا و مناطق دولت‌آباد، بهارستان، تیران و کرون، جاده نایین و خوراسگان جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه بر کشت روی محیط اختصاصی میکروبی انجام شد. پس از بررسی دقیق میکروسکوپی، در ۲۸ مورد رشد مایکوباکتریایی تشخیص داده شد. این نمونه‌ها از گاوهای ماده متعلق به ۸ واحد گاوداری مستقر در مناطق بهارستان، نجف‌آباد، قلعه شور، دولت‌آباد، تیران و کرون، گلشهر و جاده نایین جمع‌آوری شده بودند.

ساعت در انکوباتور 37°C قرار داده شد. در صورت تولید نیترا، این ماده توسط نیترات ردوکتاز به نیتريت تبدیل می‌شود و وجود آن به روش زیر شناسایی شد:

الف) بعد از گذشت ۲ ساعت یک قطره اسیدکلریدریک 0.5 نرمال به محتویات لوله اضافه شد.

ب) دو قطره از محلول سولفانیلامید 0.2% افزوده شد.

ج) دو قطره از محلول ان نفتیل دی آمین دی کلریدرات 0.1% اضافه شد.

تست توانایی رشد در محیط TCH

پرگنه‌های باکتری در محیط تیوفن ۲-کربوکسیلیک هیدرازین اسید (TCH) کشت و ۸ هفته در دمای 37°C نگهداری شد. فقط مایکوباکتریوم بویس قادر به رشد در این محیط می‌باشد. آزمایش کورد فاکتور: این خصوصیت مربوط به تولید ترهالوز دی

جدول ۱- جدول کلیدی تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها بوسیله تست‌های بیوشیمیایی (۲۲)

گونه	تست نیاسین	تست کاتالاز 23°C	تست کاتالاز 68°C	تست نیترات ردوکتاز	کشت در TCH	رشد در [I] پیرووات دار	رشد در [I] گلیسرین دار	سرعت رشد	تولید رنگدانه	کورد فاکتور
مایکوباکتریوم توپرکلوزیس	+	+	-	+	+	ضعیف	خوب	کند	-	+
مایکوباکتریوم بویس	-	-	-	-	-	خوب	ضعیف	کند	-	-
دیگرمایکوباکتریوم‌ها	-	+/-	+/-	+/-	+	متغیر	متغیر	متغیر	+/-	+/-

جدول ۲- مشخصات نمونه‌های مثبت در کشت میکروبی

کد واحد گاوداری	منطقه جغرافیایی	تعداد جدایه مایکوباکتریوم بویس
A	بهارستان	۱۵
B	دولت‌آباد	۱
C	نجف‌آباد	۴
D	قلعه شور	۴
E	تیران	۱
F	گلشهر	۱
G	قلعه شور	۱
H	نجف‌آباد	۱

۵ - دخالت مایکوباکتریوم‌های غیربیماری‌زا یا محیطی پیش از این مشاهداتی دایر بر امکان آلوده بودن همزمان گله‌های گاو با چند گونه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس (۱۹، ۲۰) و همچنین چند سویه م. بویس (۲۱) گزارش شده است. امکان وجود چندین سویه م. بوویس در یک دامداری در ایران نیز مورد تایید قرار گرفته است (۷). نظر به اینکه در مطالعه حاضر موضوع وجود و شناسایی سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم بویس مورد بررسی قرار نگرفته است بنابراین اگرچه احتمال فعالیت سویه‌های متعدد در واحدهای گاوداری تحت بررسی این تحقیق در اصفهان وجود دارد اما در حال حاضر نمی‌توان در این مورد اظهار نظر قطعی نمود.

تشکر و قدردانی

لازم است از :

همکاران بخش توبرکولین موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، همکاران بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، اداره کل دامپزشکی استان اصفهان، همکاری صمیمانه آقایان رضا عارف پژوهی، مرتضی رحمانی، سهیلا مرادی بیدهندی، محمد محمد طاهری و احمد شعبانی تشکر و قدردانی شود.

منابع مورد استفاده

1. Tuggle, C.K. and W.R. Waters, Tuberculosis-resistant transgenic cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015. 112(13): p. 3854-5.
2. Creighton, C., An Infective Form of Tuberculosis in man identical with bovine tuberculosis. *J Anat Physiol*; 1880. 15(Pt 1): p. i1-59.
3. Muller, B., et al., Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*; 2013. 19(6): p. 899-908.
4. Waters, W.R., et al., Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine*, 2012. 30(16): p. 2611-22.
5. Tadayon, K., et al., An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in Iran, a historically zebu-dominant farming country. *Iran J Microbiol*. 2013. 5(1): p. 1-13.
6. Tadayon, K., et al., A review of the contemporary knowledge of bovine tuberculosis and government policy in Iran. *Vet Microbiol*. 2011. 151(1-2): p. 192-9.
7. Tadayon, K., et al., *Mycobacterium bovis* infection in Holstein Friesian cattle, Iran. *Emerg Infect Dis*, 2008. 14(12): p. 1919-21.
8. Goyal, M., et al., Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *J Infect*, 1999. 38(3): p. 171-5.
9. Herrera-Leon, L., et al., (Differentiation of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular techniques). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009. 27(9): p. 496-502.
10. Khaleghian, P., et al., Genetic Diversity of Iranian *Mycobacterium bovis* Subtypes. *JVM*, 2013. 9(2): p. 81-90.

بر طبق جدول شماره ۲، بیشترین تعداد جدایه به میزان ۱۵ مورد مربوط به یک دامداری در منطقه بهارستان بود همچنین ۴ جدایه از یک دامداری در شهرستان نجف آباد، ۴ جدایه از یک واحد گاوداری در منطقه قلعه شور و نیز از ۵ واحد گاوداری دیگر از هر کدام یک جدایه از نمونه‌های کشتارگاهی جداسازی شد.

پس از اجرای آزمایشات بیوشیمیایی نشان داده شده که تمام ۲۸ جدایه دارای رشد مشهودی بر روی محیط لونشتاین- جانسون پیرووات‌دار بودند ضمن آنکه در همه تست‌های نیاسین، کاتالاز 22°C ، کاتالاز 68°C ، نیترات رداکتاز و همچنین رشد در محیط کشت TCH و نیز تولید کورد فاکتور پاسخ منفی بدست آمد. نتیجه جمع‌بندی این آزمون‌ها منجر به تایید مایکوباکتریوم بوویس بودن تمام این ۲۸ جدایه شد.

بحث

در سال ۱۳۲۴ برای نخستین بار در ایران فتح‌اله انتصار موفق به جداسازی م. بوویس از یک راس گاو در روستای اسماعیل آباد کرج و نشان دادن بیماری‌زایی آن در حیوانات آزمایشگاهی شد (۵). در حال حاضر جداسازی این پاتوژن از گاوان مسلول در اکثر استان‌های ایران بصورت پیوسته گزارش می‌شود (۷). جدا شدن م. بوویس از گاوان توبرکولین مثبت در مطالعه حاضر با مشاهدات پیشین در ایران در سازگار می‌باشد (۱۰). در شرایطی که جدا شدن اعضای دیگر کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و از جمله مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مایکوباکتریوم آفریکانوم و همچنین مایکوباکتریوم آریکس از گله‌های گاو و گاومیش در کشورهای آفریقایی نظیر غنا (۱۱)، آفریقای جنوبی (۱۲) و کشورهای آسیایی نظیر بنگلادش (۱۳)، هند (۱۴) و پاکستان (۱۵) و اروپایی نظیر آلمان (۱۶) و نروژ (۱۷) پیش از این گزارش شده است اما تاکنون جداسازی دیگر اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس از گاوها در ایران گزارش نشده است.

از مجموع ۸ واحد دامپروری مورد مطالعه در این تحقیق، در سه واحد جداسازی بیش از یک جدایه م. بوویس دیده شد. بطوریکه در دو واحد هر کدام ۴ جدایه و در یک واحد ۱۵ جدایه باکتری جدا شد. در شرایطی که با اعمال برنامه تست و کشتار به تدریج از تعداد دام‌های توبرکولین مثبت در گاوداری‌ها کاسته می‌شود با اینحال یکی از نشانه‌های احتمالی اجرای غیرموفق برنامه، مشاهده افزایش موارد توبرکولین مثبت در گله و یا شناسایی دام‌های راکتور پس از پاک شدن گله بدنبال نوبترهای متوالی تست توبرکولین می‌باشد. بنظر می‌رسد وقفه میان اجرای نوبت‌های متوالی تست توبرکولین در گله‌های فوق می‌تواند توجیه نماید که سویه یا سویه‌های عامل وقوع بیماری فرصت کافی برای آلوده نمودن دام‌های متعدد در گله را بدست آورده اند. به دلیل وجود مثبت‌های کاذب، در این تحقیق از ۱۴۳ نمونه کشتارگاهی توبرکولین مثبت، فقط از ۲۸ جدایه مایکوباکتریوم بوویس جدا شد. در موارد مثبت کاذب (False Positive)، با اینکه تست توبرکولین مثبت می‌شود ولی باسیل سل جدا نخواهد شد. مثبت‌های کاذب تست توبرکولین در موارد زیر اتفاق می‌افتد (۴):

- ۱ - آلودگی به سل انسانی
- ۲ - آلودگی به سل مرغی
- ۳ - آلودگی به بیماری یون
- ۴ - موارد واکسیناسیون یون

11. Asante-Poku, A., et al., Prevalence of bovine tuberculosis in a dairy cattle farm and a research farm in Ghana. *Onderstepoort J Vet Res.* 2014. 81(2): p. E1-6.
12. Gey van Pittius, N.C., et al., Infection of African buffalo (*Syn-
cerus caffer*) by *Oryx bacillus*, a rare member of the antelope clade
of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Wildl Dis.* 2012.
48(4): p. 849-57.
13. Rahim, Z., et al., Characterization of *Mycobacterium africanum*
subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoli-
gotyping. *Southeast Asian J Trop Med Public Health,* 2007. 38(4):
p. 706-13.
14. Mittal, M., et al., Evidence of presence of *Mycobacterium*
tuberculosis in bovine tissue samples by multiplex PCR: possible
relevance to reverse zoonosis. *Transbound Emerg Dis.* 2014. 61(2):
p. 97-104.
15. Akhtar, F., et al., The use of PCR technique in the identifica-
tion of *Mycobacterium* species responsible for bovine tuberculosis
in cattle and buffaloes in Pakistan. *Trop Anim Health Prod.* 2015.
47(6): p. 1169-75.
16. Erler, W., et al., (The epizootiology of tuberculosis of cattle in
the Federal Republic of Germany). *Berl Munch Tierarztl Wochen-
schr,* 2003. 116(7-8): p. 288-92.
17. Alfredsen, S. and F. Saxegaard, An outbreak of tuberculosis in
pigs and cattle caused by *Mycobacterium africanum*. *Vet Rec.*1992.
131(3): p. 51-3.
18. Monaghan, M.L., et al., The tuberculin test. *Vet Microbiol.*
1994. 40(1-2): p. 111-24.
19. Ameni, G., et al., *Mycobacterium tuberculosis* infection in graz-
ing cattle in central Ethiopia. *Vet J.* 2011. 188(3): p. 359-61.
20. Jenkins, A.O., et al., Molecular epidemiology of human and
animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Vet Micro-
biol.* 2011. 151(1-2): p. 139-47.
21. Figueiredo, E.E., et al., Multiple strains of *Mycobacterium*
bovis revealed by molecular typing in a herd of cattle. *Vet J.* 2012.
193(1): p. 296-8.
22. Collins & Ltne , *Microbiological methods*, 7th edition (1997)
2 – Laboratory methods in medical Mycobateriology Center for
Disease Control (CDC) USA.

