

## شناسایی اولین جدایه‌های باسیل پاراتوبر کلوزیس 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 واکنش‌های 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 این بررسی، بر روی نمونه‌های مدفوع دام‌های مشکوک به بیماری پاراتوبر کلوزیز و نیز تعدادی از دام‌های سالم منطقه سمیرم، براساس پروتکل‌های مورد تایید OIE، عملیات کشت میکروبی در محیط هرولدز آگ با مایکوباکتین و نیز محیط هرولدز آگ بدون مایکوباکتین انجام گردید سپس کشته‌ها در آنکوباتور قرار داده شد و بطور هفتگی کنترل و ثبت اطلاعات انجام گردید. از کلنی‌های رشد یافته، گسترش، رنگ آمیزی (ذیل-نلسون) و بررسی میکروسکوپی بعمل آمد، سپس از نمونه‌های مثبت میکروسکوپی، کشت مجدد ساب کالچر شد و در نهایت آزمون‌های مولکولار (PCR) بر روی نمونه‌های مثبت جهت تعیین شناسایی و هویت انجام شد. در طول انجام این بررسی تعداد ۶۸ نمونه از بز و گوسفند منطقه سمیرم اخذ شد که ۹۰٪ آنها دارای نشانی‌های بالینی مشکوک به بیماری یون بودند. در نهایت از ۱۱ نمونه باسیل اسید فست یون جدا شد که پس از کشت‌های 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 پاراتوبر کولوزیس می‌باشند که پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل و مشاهده باندهای به اندازه ۴۰۰ bp مورد تایید تشخیص نهائی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم پاراتوبر کلوزیس، بیماری پاراتوبر کلوزیس، بیماری یون، گوسفند و بز، پی سی آر

● 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 paratuberculosis* 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 & write results. The special mediums in this research include: Herrold's Egg Yolk with Mycobactin & Herrold's Egg Yolk without Mycobactin. Finally, in culture stage we 11 positive samples from 68 total. In molecular stage, by IS90 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

در سال ۱۸۹۵ یک محقق آلمانی بنام یون وهمکارانش، از گاوهای بیمار دارای علائم تب، اسهال، کم خونی پیشرونده، لاغری شدید و در نهایت مرگ، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس را جدا نمودند که بعداً 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 شناسایی 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 می‌باشد که عامل اصلی آن مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس است. مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس باسیلی است کند رشد، غیر متحرک، هوازی، گرم مثبت، اسید فست، مقاوم در برابر خشکی و اکثر دترجنتها، حساس به حرارت و ترکیبات فنله. اکثر سویه‌های 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 می‌شود، 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). محیط‌های کشت این باکتری بسیار اختصاصی می‌باشند که به دو گروه محیط‌های جامد و محیط‌های مایع تقسیم می‌شوند. از روشهای سرو لوژیکی مثل الیزا نیز میتوان در کنار کشت استفاده نمود. در سالهای اخیر تکنیکهای ملکولار (PCR) نیز جهت جداسازی و شناسایی کوتاه مدت مایکوباکتریومها استفاده می‌شود. دانشمندان در ژنوم مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس جزء ژنتیکی کشف نموده‌اند و آنرا IS۹۰۰ نام نهاده‌اند که اختصاص به همین باکتری دارد، بنابراین با تهیه پروب اختصاصی و با استفاده از PCR بر مبنای تکثیر قسمت اختصاصی ژنوم مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس یعنی ۵۹۰۰ میتوان سریع تر به وجود این باکتری پی برد (۱۰).

در ناحیه 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 احمد کوچ می‌نمایند. با توجه به وجود نشانی‌های بیماری یون در برخی از گله‌های این عشایر، به بررسی وجود باسیل مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (عامل بیماری یون) در بز و گوسفند این منطقه پرداختیم.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد مورد نیاز

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

و به روش (ذیل - نلسون) رنگ آمیزی و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت (۱۲).

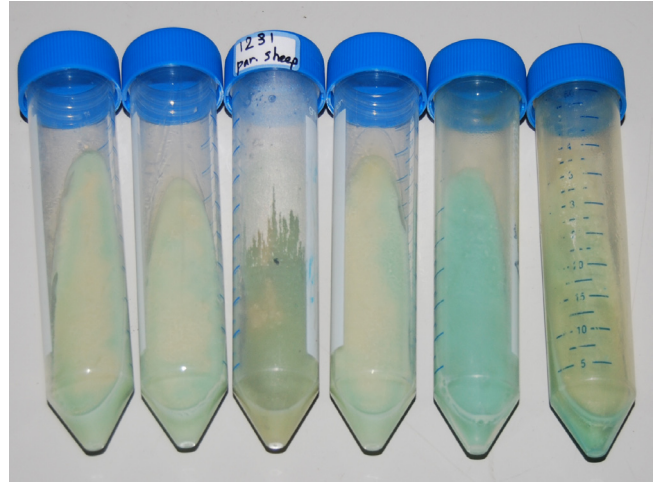
### نتایج

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

اتوکلاو، میکروسکوپ و میکسر، محلول میکروب زدای H.P.C = Hexadecyl 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 ۲ - باسیل های رشد یافته در یک نمونه



شکل ۱- باسیل های رشد کرده در چند نمونه مثبت

آنها دارای نشانی های بالینی مشکوک به بیماری یون بودند اخذ شد که 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 کلنی ها 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 هرالداژگ حداقل به میزان دو لوپ کامل از کلنی های 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 بر مراحل زیر بود.

۱- به هر یک از مایکروتیوب های حاوی سوسپانسیون غلیظ و کشته شده مایکوباکتریوم ۵۰ میکرولیتر 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 باکتری ها توسط آنزیم های لیزوزیم، پروتئیناز K و SDS از بین رفته و DNA باکتری آزاد گردید.

۳- به مایکروتیوب ها ۱۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار اضافه شد.

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

### روش ها

- 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 بر اساس پروتکل (O.I.E) انجام گرفت (۱۱).

- آماده سازی نمونه های مدفوع : یک گرم از مدفوع را در یک لوله آزمایش با حجم ۵۰ ml ریخته و روی آن ۲۰ ml 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 ۱۵ ml 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 ۰/۷۵ درصد 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 ۰/۱ ml 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 میکروسکوپی: از رسوب نمونه شماره ۱ و همچنین از کلنی های ظاهر شده در لوله های محیط کشت، گسترش (اسمیر) تهیه

مدت ۵ ثانیه سانتریفیوژ و سپس مایکروتیوب‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند.

۴- برنامه دما و زمان انجام PCR، شامل جدا شدن دو رشته DNA (دنا توره شدن)، چسبیدن پرایمرها به هر زنجیره (آنیلینگ) و سنتز زنجیره مورد نظر برای سکانس‌های IS۹۰۰ مطابق جدول‌ها اجرا گردید.

#### الکتروفورز محصول PCR

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

۱- آگارز ۱٪ در بافر 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.

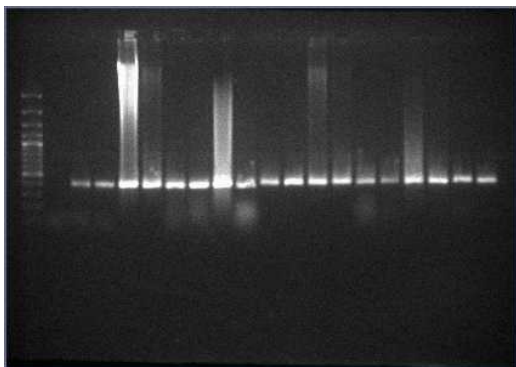
۲- از هر نمونه محصول PCR همراه با بافر نمونه به میزان ۶ میکرولیتر، در چاهک موجود در ژل ریخته شد (به نسبت ۱ به ۵).

۳- در چاهک ابتدایی یا انتهایی سایز مارکر ریخته 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 (Naser, 2004) IS900 P90 #26) و نتایج آن: با استفاده از پرایمرهای IS۹۰۰، مشخص شد که تمامی باسیل‌های رشد کرده متعلق به جنس مایکوباکتریوم اوپوم تحت گونه پاراتوبریکولوزیس می‌باشند. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل و مشاهده باندهی به اندازه ۴۰۰ bp مورد تایید قرار گرفت.



از سمت چپ به ترتیب پس از Ladder

Negative-۱۲۲۸-۱۲۲۸-۱۲۲۱-۱۲۲۱-۱۲۲۲-۱۲۲۲-۱۲۳۵-۱۲۳۵-۱۲۳۶-۱۲۳۶-۱۲۳۹-۱۲۳۹-۱۲۴۰-۱۲۴۰-۱۲۴۸-۱۲۴۸-۱۲۵۱-۱۲۵۱

#### بحث

عشایر منطقه سمیرم اوایل بهار به این مکان می‌آیند و اواخر شهریور یا اوایل پائیز به مناطقی از استان‌های فارس، خوزستان، بوشهر و کهگیلویه و بویراحمر کوچ می‌کنند، بنابراین زمان نمونه برداری منحصر به ۴ تا ۵ ماه سال بود. از ۵ منطقه عشایرنشین سمیرم نمونه برداری انجام شد.

گردید و تا ظهور محلول سفید شیری رنگ ورتکس شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت.

۵- یک حجم (در حدود ۷۵۰ میکرولیتر) ایزوآمیل‌الکل - کلروفرم (نسبت ۱ به ۲۴) به هر مایکروتیوب اضافه و حداقل به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و در دمای اتاق به مدت ۸ دقیقه در  $11000\text{g}$  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. تقریباً 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 میکرولیتر) ایزوپروپانول سرد به فاز آبی حاوی اسید نوکلئیک اضافه و به مدت ۳۰-۳۶۰ دقیقه در  $20^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید.

۸- میکروتیوب‌های حاوی DNA به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در  $11000$  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  $1000\text{g}$  سانتریفیوژ و مایع روئی اتانول تا حد امکان دور ریخته 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 میکرولیتر بافر TE ریخته شد تا DNA به خوبی در TE حل گردد. میزان و کیفیت DNA با انجام الکتروفورز در ژل آگارز 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 IS۹۰۰P۹۱ و IS۹۰۰P۹۰ برای انجام واکنش PCR استفاده شد و اجزا آزمون‌های PCR مورد استفاده در این تحقیق طبق جدول آماده گردید.

#### مراحل آماده سازی میکرو تیوب‌ها جهت انجام واکنش PCR

برای جلوگیری از اتلاف زمان بر حسب تعداد نمونه مورد آزمایش، یک مخلوط اصلی که شامل بافر  $10\times$  PCR، محلول  $\text{MgCl}_2$ ، مخلوط dNTP، پرایمر جلو برنده، پرایمر پس ران، Taq DNA پلیمرز و آب مقطر استریل است تهیه شد و در میکروتیوب‌ها تقسیم شد. برای انجام هر واکنش PCR مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت.

- ۱- مخلوط اصلی PCR به میکروتیوب‌های 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 مایکروسانتریفیوژ در  $12000\text{g}$  به

جدول پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
IS ۹۰۰P۹۰	GTT CGG GGC CGT CGC TTA GG	Huard, ۲۰۰۳
IS ۹۰۰P۹۱	GAG GTC GAT CGC CCA CGT GA	Huard, ۲۰۰۳

جدول اجزاء مورد نیاز در PCR

PCR reaction	PCR buffer <sup>۱</sup> (μl)	dNTPs <sup>۲</sup> (μl)	MgCl <sub>۲</sub> <sup>۳</sup> (μl)	Primer forward <sup>۴</sup> (μl)	Primer reverse <sup>۴</sup> (μl)	Taq polymerase <sup>۵</sup> (μl)	DNA template (μl)	PCR water (μl)	Final volume
IS ۹۰۰P	۱,۲۵	۰,۲۵	۱,۲	۱	۱	۰,۳	۳	۴,۵	۱۲,۵

<sup>۱</sup>: Without MgCl<sub>۲</sub>.

<sup>۲</sup>: From ۱۰ mM solution.

<sup>۳</sup>: From ۲۵ mM solution.

<sup>۴</sup>: From ۵ pmol/μl solution.

<sup>۵</sup>: From ۵ U/μl stock

جدول برنامه PCR در دستگاه ترموسایکلر

PCR reaction	Initial heating	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	No of complete cycles
MAP۱	۶۰۰sec, ۹۵ °C	۶۰sec, ۹۵ °C	۹۰ sec, ۵۸ °C	۹۰ sec, ۷۲ °C	۶۰۰sec, ۷۲ °C	۳۵

نمونه‌هایی که کشت میکروبی مثبت، از گله‌های مناطق مختلفی بودند و این بدان معنی است که بیماری یون در اکثر گله‌های عشایر وجود دارد. موضوعی که باید یادآور شد اینکه گله‌های گوسفند و بز عشایر چون راه درازی را می‌پیمایند تا به این منطقه برسند عوامل مختلفی مثل استرس حمل و نقل، تغییر آب و هوا و نیز تغییر نوع علوفه مرتعی می‌تواند سبب بروز اسهال شود. چون در این پژوهش دام‌های دارای نشانی‌های مشکوک به بیماری یون مورد نظر بود از دامهایی که نشانی‌های غیر یونی داشتند مثل اسهال سفید نمونه برداری بعمل نیامد.

مطلب مهم دیگر اینکه قبلا در برخی از این گله‌ها تعدادی گاو نیز وجود داشتند که بنا بر گفته صاحبان آنها برخی از این گاوها مدتی طولانی مبتلا به اسهال بودند و از گله خارج شده بودند.

متأسفانه دسترسی به واکسن و دارو در کل منطقه عشایرنشین سمیرم بسیار نامناسب بود که می‌تواند 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 نمی‌باشد که با توجه به مزمن بودن آن، در آینده این بیماری می‌تواند یکی از مشکلات اصلی در مناطق بیلاقی 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 (میش ۲ تا ۳ ساله) و ۴ مورد مربوط به بز (۳ راس ماده + یک راس نر) ۲ تا ۳/۵ ساله بود. این نمونه‌ها شامل مناطق مختلف عشایرنشین منطقه سمیرم (منطقه وردشت روستای فتح آباد - روستای حنا و روستای چشمه خونی - پادانای اولیا مناطق بیده و قره چمن - پادانای سفلا منطقه کومه) می‌شدند. این تعداد نمایانگر

در تحقیق حاضر از تعداد ۶۸ نمونه اخذ شده، تعداد ۱۱ مورد مثبت بدست آمد که ۷ نمونه مربوط به گوسفند ماده (میش ۲ تا ۳ ساله) و ۴ مورد مربوط به بز (۳ راس ماده + یک راس نر) ۲ تا ۳/۵ ساله بود. این نمونه‌ها شامل مناطق مختلف عشایرنشین منطقه سمیرم (منطقه وردشت روستای فتح آباد - روستای حنا و روستای چشمه خونی - پادانای اولیا مناطق بیده و قره چمن - پادانای سفلا منطقه کومه) می‌شدند. این تعداد نمایانگر

نمونه‌هایی که کشت میکروبی مثبت، از گله‌های مناطق مختلفی بودند و این بدان معنی است که بیماری یون در اکثر گله‌های عشایر وجود دارد. موضوعی که باید یادآور شد اینکه گله‌های گوسفند و بز عشایر چون راه درازی را می‌پیمایند تا به این منطقه برسند عوامل مختلفی مثل استرس حمل و نقل، تغییر آب و هوا و نیز تغییر نوع علوفه مرتعی می‌تواند سبب بروز اسهال شود. چون در این پژوهش دام‌های دارای نشانی‌های مشکوک به بیماری یون مورد نظر بود از دامهایی که نشانی‌های غیر یونی داشتند مثل اسهال سفید نمونه برداری بعمل نیامد.

مطلب مهم دیگر اینکه قبلا در برخی از این گله‌ها تعدادی گاو نیز وجود داشتند که بنا بر گفته صاحبان آنها برخی از این گاوها مدتی طولانی مبتلا به اسهال بودند و از گله خارج شده بودند.

متأسفانه دسترسی به واکسن و دارو در کل منطقه عشایرنشین سمیرم بسیار نامناسب بود که می‌تواند 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 نمی‌باشد که با توجه به مزمن بودن آن، در آینده این بیماری می‌تواند یکی از مشکلات اصلی در مناطق بیلاقی 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 (میش ۲ تا ۳ ساله) و ۴ مورد مربوط به بز (۳ راس ماده + یک راس نر) ۲ تا ۳/۵ ساله بود. این نمونه‌ها شامل مناطق مختلف عشایرنشین منطقه سمیرم (منطقه وردشت روستای فتح آباد - روستای حنا و روستای چشمه خونی - پادانای اولیا مناطق بیده و قره چمن - پادانای سفلا منطقه کومه) می‌شدند. این تعداد نمایانگر



کتاب باکتری شناسی سل و اصول طراحی و مقرارت کار در آزمایشگاه سل - چاپ سازمان نظام دامپزشکی کشور

۳- شکیبامهر (بذریور)، 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

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 (بذریور) 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 احتمالاً 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)

