نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۱ تابستان ۱۳۹۵
DOI:10.22034/vj.2016.106063

جداسازی و شناسایی مایکوباکتریوم بویس از نمونه‌های کشتارگاهی گاوهای توبرکولین مثبت استان اصفهان با استفاده از کشت میکروبی و تعیین هویت بیوشیمیائی

•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 توبرکولین، 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 توبرکولین، 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 بوویس، عامل ایجادکننده سل گاوی، از گاوهای رآکتور(توبرکولین مثبت) کشتارشده در استان اصفهان مورد بررسی قرار گرفته است. در فاصله زمانی ۱۳۸۵تا ۱۳۸۸ عقده‌های لنفاوی مزانتریک و مدیاستینال همراه با نمونه‌های پاتولوژیک (در صورت وجود) از۱۴۳راس 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 برخورداری از خاصیت اسید فست بودن در میکروسکوپی، توسط یک الگوریتم استاندارد بیوشیمیایی متشکل از آزمایش‌های رشد ترجیهی 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 بوویس 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.بوویس به عنوان تنها پاتوژن مایکوباکتریایی عامل بیماری در گاوان رآکتور اصفهان نشانه تاییدکننده دیگری است دایر بر اینکه دیگر اعضاء کمپلکس م.توبرکولوزیس 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. بوویس 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 توبرکولین ; مایکوباکتریوم بویس; تست های 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 Lownstein-Jenson (LJ) slopes. The 28 isolates representing mycobacterial growth characteristics eg. Acid fastness in microscopy, were subjected to a standard biochemical algorythm 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 recator 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, furher molecular epidemiology work is required.

Key words: Tuberculin positive ; Tuberculusis; *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 می‌شود که بیش از ۵۰ میلیون راس گاو در جهان آلوده به این باکتری می‌باشند (۱). پیشینه شناسایی ارتباط میان سل گاوی و سل در انسان به اواخر قرن نوزدهم میلادی باز می‌گردد. به عنوان مثال می‌توان به مقاله Creighton که در ۱۸۸۰میلادی 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٪ می‌باشد (۳) با این‌حال 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 می‌شود (۳). سل گاوی در بسیاری از مناطق جهان نظیر انگلستان، جمهوری ایرلند، چین و آمریکای لاتین علیرغم صرف هزینه‌های بسیار در جهت کنترل و ریشه‌کنی همچنان به عنوان یک مشکل بهداشتی و اقتصادی مهم در دامپروری محسوب می‌شود (۴). در ایران بر اساس شواهد موجود سل گاوی از گذشته در میان گله‌های گاو وجود داشته است. در سال ۱۳۱۰ خورشیدی کارپانتیه دامپزشک فرانسوی، وجود سل را در میان لاشه گاوهای بومی که در کشتارگاه تهران ذبح می‌شدند را گزارش نمود. این مشاهدات توسط دامپزشکان ایرانی نیز در طول سال‌های 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

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 عقده های لنفاوی و ضایعات پاتولوژیک لاشه گاوهای توبرکولین مثبت ذبح شده در کشتارگاه اصفهان اجرا و جدایه‌های مایکوباکتریایی جمع‌آوری شده توسط آزمون های 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 لنفاوی (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 واکسن 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، سلایه و یکنواخت شد و سپس با استفاده از ۵ میلی لیتر مخلوط N-acetyl-L-cysteine (۰/۵ درصد)، هیدروکسید سدیم (۳/۵ مولار) و سیترات سدیم (۰/۰۵ مولار) به مدت ۱۵ دقیقه آلودگی‌زدایی شدند (۸). تقریبا ۵ میلی لیتر از قسمت شناور فوقانی برداشت و پس از خنثی‌سازی به کمک اسید کلریدریک در یک لوله یونیورسال در سرعت ۳۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ 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 پیرووات‌دار 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 ترجیهی بر روی محیط کشت، تست نیاسین، آزمون کاتالاز در دماهای ۲۲ °C و۶۸°C، آزمایش نیترات رداکتاز و کشت در محیط TCH(۹) و همچنین تست کورد فاکتور و بر اساس پروتکل‌های استاندارد می‌باشند(جدول شماره۱) (۲۲).

آزمون رشد ترجیهی بر روی محیط کشت

مایکوباکتریوم بوویس بصورت ذاتی در جداسازی اولیه گرایش بیشتری برای رشد بر روی محیط های کشت حاوی پیرووات از خود نشان می‌دهد درحالی که 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 پیپت 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 بن ماری با دمای ۲۲ °C نگهداری شد. به محتویات هر یک از دو لوله ۰/۵ میلی لیتر 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 میلی لیتر 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

ســـاعت در انکوباتور°C ۳۷ قرار داده شد. در صورت تولید نیترات، این ماده توســـط نیترات ردوکتاز به نیتریت تبدیل می‌شود و وجود آن به روش زیر شناسایی شد:

الف) بعد از گذشـــت ۲ ساعت یک قطره اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال به محتویات لوله اضافه شد.

ب) دو قطره از محلول سولفانیلامید ۰/۲٪ افزوده شد.

ج) دو قطـــره از محلـــول ان نفتیل دی آمیـــن دی کلرهیدرات ۰/۱٪ اضافه شد.

تست توانایی رشد در محیط TCH

پرگنه‌های باکتری در محیط تیوفن ۲-کربوکســـیلیک هیدرازین اسید (TCH) کشت و ۸ هفته در دمای°C ۳۷ نگهداری شد. فقط مایکوباکتریوم بوویس قادر به رشد در این محیط می‌باشد.

آزمایـــش کورد فاکتـــور: این خصوصیت مربوط بـــه تولید ترهالوز دی مایکولات می‌باشـــد که فقط توسط ســـویه‌های بیماری‌زای مایکوباکتریوم توبرکلوزیـــس تولید و باعث جلوگیری از مهاجرت گلبول‌های ســـفید و در نتیجه ایجاد گرانولوم‌های مزمن می‌شـــود. 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 شهرســـتان‌های اصفهان، نجف آباد، خمینی شـــهر، مبارکه، زرین شـــهر و شـــهرضا و مناطق دولت آباد، بهارســـتان، تیران و کـــرون، جاده نایین و خوراســـگان جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه بر کشت روی محیط اختصاصی میکروبی انجام شـــد. پس از بررسی دقیق میکروسکوپی، در ۲۸ مورد رشـــد مایکوباکتریایی تشخیص داده شد. این نمونه‌ها از گاوهای ماده متعلق به ۸ واحد گاوداری مســـتقر در مناطق بهارســـتان، نجف آباد، قلعه شور، دولت آباد، تیران و کرون، گلشهر و جاده نایین جمع‌آوری شده بودند.

جدول۱- جدول کلیدی تعیین هویت مایکوباکتریوم ها بوسیله تست های بیوشیمیایی (۲۲)

گونه	تست نیاسین	تست کاتالاز ۲۲°C	تست کاتالاز ۶۸°C	تست نیترات ردکتاز	کشت در TCH	رشد در LJ پیروات دار	رشد در LJ گلیسرین دار	سرعت رشد	تولید رنگدانه	کورد فاکتور
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	+	+	–	+	+	ضعیف	خوب	کند	–	+
مایکوباکتریوم بویس	–	–	–	–	–	خوب	ضعیف	کند	–	–
دیگرمایکوباکتریوم‌ها	–	+/–	+/–	–/+	+	متغیر	متغیر	متغیر	–/+	–/+

جدول ۲- مشخصات نمونه های مثبت در کشت میکروبی

کد واحد گاوداری	منطقه جغرافیایی	تعداد جدایه مایکوباکتریوم بوویس
A	بهارستان	۱۵
B	دولت آباد	۱
C	نجف آباد	۴
D	قلعه شور	۴
E	تیران	۱
F	گلشهر	۱
G	قلعه شور	۱
H	نجف آباد	۱

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 هرکدام 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 پیروات‌دار بودند ضمن آنکه در همه تست‌های نیاسین، کاتالاز ۲۲ °C، کاتالاز ۶۸°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 فتح‌الله 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 جداشدن 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 هرکدام 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 رآکتور 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

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 نمی توان 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. Khaleqhian, P., et al., Genetic Diversity of Iranian *Mycobacterium bovis* Subtypes. *JVM*, 2013. 9(2): p. 81-90.

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 (*Syncerus 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 spoligotyping. *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 identification 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 Wochenschr,* 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 grazing 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 Microbiol*. 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.