



راهنمای کشوری

تشخیص، بررسی و مدیریت عارضه سقط جنین نشخوارکنندگان



معاونت بهداشتی و پیشگیری

دفتر بهداشت و مدیریت بیماری های دامی

دانشکده دامپزشکی

دانشگاه تهران

زمستان 1391

بسم الله الرحمن الرحیم

راهنمای کشوری

تشخیص، بررسی و مدیریت عارضه سقط جنین نشخوارکنندگان

معاونت بهداشتی و پیشگیری

دفتر بهداشت و مدیریت بیماری های دامی

دانشکده دامپزشکی

دانشگاه تهران

زمستان 1391

پدید آورندگان

دکتر حسین اسماعیلی: استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

مونا حامدی: دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

دکتر سamed برومند فر: معاون دفتر بهداشت و مدیریت بیماری های دامی، سازمان دامپزشکی کشور

دکتر عبدالامیر رضایی: مدیر کل دفتر بهداشت و مدیریت بیماری های دامی، سازمان دامپزشکی کشور

زیر نظر

دکتر محسن مشکوه: معاون بهداشتی و پیشگیری سازمان دامپزشکی کشور

دفتر بهداشت و مدیریت بیماری های دامی، سازمان دامپزشکی کشور

زمستان 1391 هجری خورشیدی

پیشگفتار	۹
مقدمه	۱۰
تشخیص علت سقط جنین	۱۱
عملیات و تحقیقات در مواجهه با گسترده رخداد سقط جنین	۱۲
عوامل عفونی دخیل در سقط جنین گاو	۱۲
عوامل عفونی سقط جنین در بز	۱۴
سقط جنین در گوسفند	۱۵
اصول نمونه برداری و ارسال آنها به آزمایشگاه	۱۶
روش انتخاب و برداشت نمونه ها	۱۶
گسترش	۱۷
مغز و کشت از مایعات مغزی - نخاعی و سایر مایعات	۱۷
دستگاه ادراری	۱۹
دستگاه تنفس	۱۹
چشم	۱۹
پستان	۲۰
زخم	۲۰
روده ها	۲۰
کشت خون	۲۱
کشت مفصل	۲۱
جمع آوری و نگهداری نمونه ها	۲۲

۲۲	هیستوپاتولوژی.....
۲۳	باکتری شناسی.....
۲۵	ویروس شناسی.....
۲۶	سرم شناسی.....
۲۶	قارچ شناسی.....
۲۶	انگل شناسی.....
۲۸	سم شناسی.....
۲۹	پایدار کردن.....
۳۰	انواع پایدار کننده ها.....
۳۱	در مواقعی که نیاز به بررسی داریم، باید از چه تعداد از دام ها نمونه گیری کنیم؟.....
۳۳	چه کار کنیم زمانی که یک راس دام در یک تست مثبت است و در تست دیگر منفی؟.....
۳۴	رهیافت های تحقیق در موارد وقوع سقط جنین.....
۳۴	سقط های انفرادی (Sporadic abortions).....
۳۴	سقط های گسترده (Abortion outbreak).....
۳۶	جمع آوری نمونه های بالینی.....
۳۸	نمونه بافت جنین های سقط شده یا نوزادان تازه مرده.....
۳۸	مایعاتی که باید از جنین سقط شده اخذ شود.....
۴۰	روش جمع آوری، بسته بندی و ارسال نمونه.....
۴۵	وسایل لازم جهت جمع آوری نمونه ها.....
۴۶	جمع آوری، بسته بندی و انتقال نمونه های ویروسی به آزمایشگاه.....
۴۷	تشخیص غیر مستقیم.....

تفسیر نتایج و محدودیت ها	۴۸
تعیین سن جنین بر اساس اندازه سر تا دم (crown-rump length)	۵۱
روش صحیح دفن جنین های سقط شده	۵۴
نقش آموزش دامداران در کنترل بیماری	۵۶
علل باکتریایی سقط جنین	۶۰
بروسلوز	۶۰
بررسی های همه گیرشناسی در موارد همه گیری بروسلوز، یا در مواردی که مشکوک به بیماری هستیم	۷۶
موانع و مشکلات برنامه مبارزه با بروسلوز ایران	۱۰۱
کلامیدو فیلا آبورتوس	۱۰۳
سالمونلوز	۱۱۷
کمپیلوباکتریوز	۱۲۷
تب کیو	۱۳۹
لیستریوز	۱۵۰
لپتوسپیروز	۱۵۷
عفونت مایکوپلاسمایی و یوریا پلاسمایی	۱۷۳
مایکوپلاسمابوویس	۱۷۶
پلورپنومونی واگیر بزها	۱۷۸
آگلاکسی واگیردار گوسفند و بز	۱۸۰
باسیلوس لیچنی فورمیس	۱۹۰
علل ویروسی سقط جنین	۱۹۱
بیماری مرزی	۱۹۱

۲۰۴.....	اسهال ویروسی گاو (BVD).....
۲۲۰.....	بیماری ویروس آکابان.....
۲۲۴.....	بیماری زبان آبی.....
۲۳۳.....	رینوتراکئیت عفونی گاو (عفونت هرپس ویروسی 1 گاوی).....
۲۴۱.....	عفونت هرپس ویروس بزی 1.....
۲۴۴.....	تب دره ریفت.....
۲۴۹.....	عوامل انگلی سقط جنین.....
۲۴۹.....	توکسوپلاسموز.....
۲۶۴.....	نئوسپوروز.....
۲۶۸.....	تریکومونیاژیس.....
۲۷۴.....	سارکوسیتوزیس.....
۲۷۹.....	علل قارچی سقط جنین.....
۲۷۹.....	سقط جنین قارچی.....
۲۸۳.....	علل غیر عفونی سقط جنین.....
۲۹۹.....	اخذ تاریخچه.....
۳۰۸.....	پرسش های کلیدی.....
۳۱۴.....	راهنمای سریع سقط جنین گوسفندی.....
۳۱۶.....	منابع.....

پیشگفتار

سقط جنین دامهای مزرعه، همواره به عنوان یکی از معضلات صنعت دامپروری در ایران و سایر نقاط جهان مطرح می باشد که عوامل مسبب آن بسیار زیاد و متنوع اند. مجموعه ی حاضر با توجه به نیاز اجرایی ادارات کل و شبکه های دامپزشکی کشور به راهنمایی، جهت بررسی اولیه موارد سقط جنین، نحوه ی نمونه گیری، شرایط انتقال آنها و درمان و کنترل عوامل اصلی تهیه شده است که در نهایت به عوامل غیر عفونی نیز اشاراتی شده است.

در این کتاب سعی شده است تا از منابع معتبر و به روز دنیا استفاده شده و تا حد امکان، توصیه ها با شرایط ایران بومی سازی شود، لیکن بر این امر نیز واقفیم که دارای کاستی ها و کمبودهایی می باشد که امید است مقبول نظر و مورد استفاده دامداران و کارشناسان سطوح مختلف دامپزشکی قرار گیرد.

از آن جا که هیچ شخصی در هر مقامی بی نیاز از توصیه و نقد نمی باشد، جای بسی افتخار است اگر در ارتباط با هر کدام از بخش ها، نظری هست به اطلاع رسانده شود. خصوصا دریافت نظرات و توصیه هایی منطبق با شرایط کشور عزیزمان جهت اصلاح، و یا بهبود کیفیت مطالب از سوی همکاران محترم بالینی، آزمایشگاهی و علی الخصوص، تجربیات ارزنده ی تکنسین های محترم در اقصی نقاط کشور، برای نویسندگان بسیار ارزشمند خواهد بود. امید است کاستی های ویرایش اول با نظرات همکاران محترم مرتفع گردد.

نویسندگان از خوانندگان تقاضا دارند، دیدگاه های اصلاحی و انتقادات خود را از طریق رایانامه hesmaeli@ut.ac.ir برای نویسندگان ارسال نمایند.

پدیدآورندگان

دی ماه یکهزار و سیصد و نود و یک هجری خورشیدی

مقدمه

صنعت پرورش دام اهلی علاوه بر اهمیت اقتصادی، از نظر اجتماعی و سیاسی نیز قابل توجه است. حدود 70٪ از زمین های کشاورزی به پرورش دام های اهلی اختصاص داده می شود. و در این بین، پرورش نشخوارکنندگان از اهمیت ویژه ای برخوردار است. این اهمیت از لحاظ تولید شیر و گوشت و تا حدی نیز تولید پشم می باشد. خسارت هایی که از بین رفتن آبستنی در مراحل مختلف آن به دام های کشور وارد می سازد بسیار چشمگیر است، بنابراین سقط جنین می تواند باعث کاهش سود و ایجاد خسارات اقتصادی فراوان گردد.

ارزش اقتصادی دام بر پایه دو صنعت اقتصادی تولید و تولید مثل استوار است. بدیهی است تولید مثل مقدم بر تولید و بیش از آن مورد توجه می باشد زیرا تا مادامیکه تولید مثل نباشد، تولید هم میسر نخواهد بود، لذا مسائل تولید مثلی همیشه موضوع مهمی بوده و عناوین تحقیقاتی فراوانی را در دنیا به خود اختصاص داده است.

از مشکلات عمده ای که در ارتباط با دام های ایران وجود دارد مسئله سقط جنین و مرگ و میر نوزادان می باشد که باعث شده است تولیدات دامی بسیار کمتر از پتانسیل عظیم آن باشد، چرا که با توجه به جمعیت بالای آن، این توان وجود دارد که سهم بیشتری در تولیدات دامی داشته باشند.

علی رغم پیشرفتهای زیاد در امور مختلف دامپروری کشور، تغییر زیادی در بخش پرورش گوسفند و بز مشاهده نمی شود. وابستگی گوسفند به مرتع، کویری بودن بخش وسیعی از کشور، عدم آگاهی دامپروران با شیوه های نوین دامداری و از همه مهمتر، نگاه چوپانی به گوسفند و گوسفند داری، از عوامل مؤثر در این زمینه می باشد.

با وجود اینکه برابر آمار رسمی، کشور ایران از لحاظ جمعیت گوسفند، جزو 4 کشور اول دنیا قرار دارد تولیدات داخلی و در رأس آن تولید گوشت، کفاف نیازهای داخلی را نداده و سالیانه میلیونها دلار صرف واردات گوشت از سایر کشورها می شود. در این میان، روند رشد جمعیت گوسفند در دهه های اخیر سیر صعودی داشته ولی به علت عدم مدیریت صحیح، تناسب دام و مرتع بهم خورده و چرای بی رویه سبب تخریب هر چه بیشتر مراتع شده است.

در حال حاضر با وجود وضعیت نابه سامان فعلی، دیگر افزایش تولید از طریق رشد کمی جمعیت گوسفند امکان پذیر نیست و برابر اعلام رسمی منابع معتبر، در حال حاضر دام موجود در مراتع ایران 2/5 الی 3 برابر ظرفیت موجود

است؛ به عبارت دیگر برخلاف سایر بخشهای دامپروری مانند گاو‌داری، مرغداری، آبی‌پروری و حتی زنبورداری سیستم پرورش گوسفند در ایران یک سیستم کاملاً سنتی بوده که لازم است با وارد کردن مؤلفه‌هایی نظیر منابع مالی، تحقیق، آموزش و ترویج و بازاریابی، آن را به سیستم نیمه صنعتی تغییر داد و سبب افزایش تولید در بعد کیفی شد.

تشخیص علت سقط جنین

کلید تشخیص سقط، مشخص کردن علت آن و جلوگیری از سقط‌های بعدی است. با این وجود میزان موفقیت در تشخیص دقیق علت سقط گاو تنها 25 تا 35 درصد است.

چرا میزان موفقیت تشخیص سقط جنین کم است؟

- 1- حادثه، روزها، هفته‌ها یا حتی ماه‌ها قبل رخ داده و علت آن در زمان سقط، غیر قابل تشخیص است.
- 2- علائم بالینی کم بوده یا به هیچ وجه قبل از سقط در مادران وجود ندارد.
- 3- به طور معمول جراحات‌های ماکروسکوپیکی در فتوس وجود ندارد.
- 4- اتولیز، اغلب جراحات‌های فتوس را می‌پوشاند و نتایج آزمایش را مشکل می‌توان تفسیر کرد.
- 5- پرده‌های جفت اغلب در ابتدا درگیر شده و به طور معمول در دسترس نیستند.
- 6- روش‌های هیستولوژی، سرولوژی، پاتولوژی و سایر روش‌ها تنها کمک‌های حاشیه‌ای می‌کنند.
- 7- سیستم ایمنی فتوس ممکن است عکس‌العملی متفاوت از بالغ‌ها نشان دهد (نتایج کشت فتوس همیشه مشابه بالغ‌ها نیست).
- 8- نمونه‌های ارسالی ناصحیح هستند.

عملیات و تحقیقات در مواجهه با گسترده رخداد سقط جنین

در یک گله با شرایط خوب تا میزان 2٪ سقط جنین امری عادی و طبیعی است. کمتر از 5٪ سقط جنین در یک گله قابل قبول می باشد و معمولاً نیازی به انجام اقدامات خاصی وجود ندارد.

میزان سقط = تعداد دامهای سقط کرده / تعداد دامهای آبستن یا دامهایی که جفت گیری کرده اند

اگر میزان سقط از 5٪ گله تجاوز کرد یا اینکه در جمعیت خاصی از گله (بهاربند خاص یا یکی از گله های منطقه) وقوع یافت، لازم است تا اقدامات خاصی انجام شود. وجود سقط های مزمن در گله بین 5-2 درصد بیانگر آن است که یک مشکل مزمن در گله وجود دارد که نیازمند چاره جویی می باشد.

بررسی جفت و جنین سقط شده می تواند در تشخیص عامل ایجاد سقط به ما کمک کند. به عنوان مثال، باقی ماندن جنین برای مدتی در کانال زایمان باعث ایجاد درجاتی از تورم از جمله تورم در زبان و صورت، می گردد. جنین از نظر پاسخ عمومی به بیماری به ویژه در زمان زایمان، مشابه دامهای بالغ است. اما پاسخ اولیه جنین به بیماری در اغلب موارد بستگی به مرحله آبستنی دارد. به طور کلی هر باکتری که ایجاد سپتی سمی کند، می تواند باعث ایجاد جراحاتی در جفت گردد.

عوامل عفونی دخیل در سقط جنین گاو شامل موارد زیر می باشد:

- بروسلا آبورئوس: معمولاً در آبستنی با سن 9-6 ماهگی
- نئوسپورا کانینوم: در آبستنی با سن 8-3 ماهگی و به صورت میانگین 5/5 ماهگی
- لپتوسپیرا: معمولاً در آبستنی با سن 9-6 ماهگی
- باسیلوس لیچنی فورمیس: از حول و حوش 5 ماهگی به صورت سقط های انفرادی افزایش می یابد
- سالمونلا (خصوصاً سالمونلا دابلین): سقط های ناشی از آن معمولاً در حوالی ماه هفتم آبستنی می باشد هرچند می تواند در هر سنی از آبستنی موجب سقط جنین شود.
- لیستریا مونوسیتوزنز: اپیدمی های گاه و بیگاه در آبستنی با سن 9-6 ماهگی
- کمپیلوباکتر فتوس فتوس: در آبستنی با سن 7-5 ماهگی

- تریکوموناس فتوس: قبل از 5 ماهگی
- آرکانوباکتریوم پیورنز: به صورت تک گیر باعث سقط در هر سنی از آبستنی می شود ولی معمولاً بعد از آبستنی 6 ماهه اتفاق می افتد.
- مایکوباکتریوم توبرکلوزیس: در هر سنی از آبستنی می تواند موجب سقط جنین شود.
- عوامل قارچی نظیر آسپرژیلوس، آبسیدیا، گروه موکورال، مورتیلا: از آبستنی 4 ماهه تا انتهای آبستنی.
- اسهال ویروسی گاو (BVD): در هر سنی از آبستنی می تواند موجب سقط جنین شود.
- IBR, IPV, BHV-1: در آبستنی 4-9 ماهه باعث سقط می شوند.

انجام هرگونه عملیاتی برای یافتن عامل سقط، بستگی به تعداد موارد سقط جنین در هر گله دارد. اگر مورد انفرادی باشد معمولاً نیازی به انجام مداخلات آزمایشگاهی برای یافتن عامل وجود ندارد به خاطر آنکه بسیاری از سقط های انفرادی به دلیل عوامل عفونی نمی باشند. در مواردی که طبق برنامه کشوری، مراقبت فعال برای بروسلا آبورتوس وجود دارد می توان از این لحاظ این سقط ها را بررسی کرد.

اگر میزان سقط از 3-5 درصد گله (موارد مرده زایی و زایمان گوساله نارس - غیر از موارد دو قلو زایی - نیز باید محاسبه شود) تجاوز کرد و یا اینکه تعدادی سقط در زمان کوتاه و پشت سر هم اتفاق افتاد، لازم است تا تحقیق برای یافتن عامل سقط انجام گیرد.

وزن فتوس و جفت، اندازه فتوس (فاصله سر تا دم) و مرحله از آبستنی که سقط رخ داده است، از جمله مهم ترین مواردی است که در هنگام مواجهه با سقط جنین باید مورد توجه قرار گیرند.

عوامل عفونی سقط جنین در بز

ماده بز به صورت معمول حیوان بسیار باروری می باشد. با این حال بزها در مقایسه با دیگر حیوانات اهلی، میزان زیادی از سقط جنین را دارا می باشند. سقط های عفونی نقش مهمی در خسارت اقتصادی گله ها دارند. در یک اپیدمی یا رخداد گسترده سقط جنین در گله، بهترین روش آن است که این سقط ها را عفونی فرض کرده و اقدامات را بر اساس آن انجام داد. میکروبهای مختلفی در ایجاد سقط جنین در بز نقش دارند اما به صورت عمده، بیشترین سقط جنین های عفونی ناشی از بروسلا ملی تنسیس، کلامیدوفیلا آبورتوس، توکسوپلاسما، کمپیلوباکتر، مایکوپلاسما و کوکسیلا بورنتی می باشد.

جراحی عمده در سقط جنین های عفونی در تمام موارد، پلاستیت یا التهاب پرده های جفت می باشد که در نتیجه این ضایعه، جنین قادر به دریافت مواد غذایی و اکسیژن از مادر نبوده و عفونت را از این طریق کسب کرده که منجر به مرگ جنین و سقط آن می شود.

سقط جنین های در نیمه آبستنی و یا اواخر آبستنی موجب ضرر و زیان اقتصادی بسیاری می شوند چرا که جنین از دست رفته و دامهای سقط کرده می بایست تا فحلی و فصل زایمان بعدی جهت زایمان نگهداری شوند و یا به قیمت های ارزان تری فروخته شوند. متعاقب سقط جنین عفونی ممکن است که بیماری های رحمی طولانی وجود داشته باشد و دام قادر به باروری زود هنگام نباشد. مضافاً اینکه وجود دامی با سابقه سقط جنین عفونی در گله، خطری برای آلوده سازی دیگر دامهای گله نیز می باشد.

از آنجا که در سقط های عفونی دامهای جوان در شکم های اول و دوم سقط می کنند برخی دامداران بعد از فصل سقط، تمام دامهای سقط کرده خود را به میدان دام برده و به فروش می رساند و به خاطر فروش با قیمت بالاتر، در هنگام فروش، از سوابق سقط آنها اطلاعاتی به خریداران نمی دهد. از سوی دیگر دامدارانی که قصد تشکیل گله جدید و یا تهیه دامهای مولد جایگزین دارند، تمایل به خرید دامهای جوان برای گله خود دارند که در موارد بسیاری، این دامهای آلوده را خریداری کرده و موجب انتشار و جابه جایی آلودگی می شوند.

سقط جنین در گوسفند

از دست رفتن آبستنی (Pregnancy loss) در میش اگر قبل از روز 12 آبستنی در فصل تولید مثلی صورت گیرد، آن میش می تواند دومرتبه فحل شده و آبستن شود. در غیر این صورت، و اگر از دست رفتن آبستنی در روزهای بعد از آن وقوع یابد یک یا چند حالت زیر برای دام به وجود می آید:

- برگشت به فحلی
- عدم بره زایی و زایمان، در حالیکه هیچ گونه علائم بالینی دال بر سقط جنین وجود ندارد
- وجود ترشحات خونابه ای از واژن، در حالیکه هیچ جنین یا جفت دفع شده ای مشاهده نشده است
- وقوع سقط جنینی که جنین یا جفت دفع شده مشاهده و مشخص شده اند
- مرده زایی یا تولد نوزاد ضعیف بعد از 142 روزگی آبستنی

اصول نمونه برداری و ارسال آنها به آزمایشگاه

مهم ترین نکته در مراحل استفاده از آزمایشگاه تشخیصی، دقت در هنگام نمونه برداری و جمع آوری نمونه ها است. نمونه ها باید صحیح و با کیفیت مناسب به آزمایشگاه ارسال گردند. در برابر ارسال نمونه مناسب و صحیح از لاشه برای آزمایشگاه، همچنین جمع بندی و تفسیر نتایج بدست آمده از قبیل نتایج بالینی و آزمایشگاهی در جهت رسیدن به تشخیص نهایی بیماری، مسئولیت با دامپزشک است، چرا که در صورت ارسال و ارائه اطلاعات بی ارزش و نادرست، نتایج بی فایده بدست خواهد آمد. تشخیص های آزمایشگاهی در تعیین علت بروز بیماری های مختلف بسیار کمک کننده است، بنابراین علائم بالینی و تکنیک های آزمایشگاهی لازم و ملزوم یکدیگرند. گسترش خون و نمونه خون، سرم خون، همچنین چرک، خلط، ترشحات، اکسودا، ادرار، شیر و غیره زمانی جمع آوری می شوند که احتمال حضور عامل بیماری زا و یا بررسی آزمایشگاهی آنها در تشخیص بیماری مفید باشد. دامپزشکانی که در نقاط دوردست و یا در مناطقی که آزمایشگاه های پیشرفته ندارند، اشتغال دارند باید از روش های آزمایشگاهی ساده و معمولی که برای تشخیص بیماری ها به کار می رود، کاملاً آگاهی داشته باشند.

روش انتخاب و برداشت نمونه ها

در این مورد، دام زنده بیمار که اقدامات درمانی برای آن انجام نشده باشد و از طرفی علائم بالینی را نیز به خوبی نشان می دهد، به همراه لاشه تلف شده از همین دسته، بهترین نمونه ها برای ارسال است. البته بهتر است تعداد بیشتری از دام ها ارسال گردند. چرا که در این صورت، تشخیص دقیق تر و سریع تر بدست می آید. در این مورد دامپزشکان می توانند در تشویق دامدار برای چنین هدفی نقش موثری داشته باشند. اگر ارسال دام برای تشخیص امکان پذیر نیست، باید نمونه های بدست آمده در کالبد گشایی دام، بدقت و بطور صحیح جمع آوری و به آزمایشگاه فرستاده شود.

1- گسترش

در تهیه گسترش، نمونه هایی چون خون، اکسودا، سایر مایعات بدن، ترشحات ناشی از زخم، رحم و سایر قسمت ها مورد استفاده قرار میگیرد. نمونه های خونی از خون وریدی محیطی و در دمای بالا اخذ می گردد. (دمای پایین باعث انقباض عروق محیطی می شود) و پس از مرگ می توان از نقاط مختلف بدن و به منظور بررسی خون، گسترش خون تهیه کرد. اگر دام به تازگی تلف یا ذبح شده باشد، می توان پس از برداشتن دست ها، از ناحیه زیر بغل یا خون داخل قلب گسترش تهیه نمود.

گسترش خون ترجیحاً باید پیش از تجویز هرگونه داروهای ضد تک یاخته ای و ضد انگلی و یا داروهای ضد باکتریایی انجام شود، در غیر این صورت عامل اصلی مولد بیماری مشخص نمی شود. گسترش خون باید نازک و یکنواخت باشد و به لبه های لام نیز گسترش نیابد.

در صورتی که بررسی به منظور یافتن عواملی از قبیل تریپانوزم و فیلاریا صورت می گیرد، باید گسترش ضخیم تهیه شود. اگر نمونه خونی از پوست تهیه می شود، قبلاً باید مو یا پشم تراشیده و تمیز شده باشد و یا سطح پوست را با الکل خالص یا معمولی ضد عفونی و تا تبخیر الکل صبر کرد. در غیر این صورت نمونه خونی همولیز شده و آزمایش به طور دقیق انجام نخواهد شد. گسترش خون را باید در مجاورت هوا خشک و بعد به مدت 2 تا 3 دقیقه در متانول ثابت کرد. در مورد تهیه گسترش از مایعات بدن و یا اکسودا و ترشحات دیگر مانند مایعات اسهال، ابتدا باید توسط پیت پاستور یا سرنگ تمیز آن را جمع آوری، سپس 1 یا 2 قطره از مایعات جمع آوری شده را در مرکز لام قرار داد و با استفاده از پیت پاستور و یا سرسوزن تمیز آن را گسترش داد و در مجاورت هوا خشک کرد. لام هایی که روی آن ها گسترش تهیه شده باید توسط کاغذ و یا چوب کبریت از هم جدا نگه داشت، طوری که بین دو لام، دو عدد چوب کبریت در طرفین قرار داد و سپس با چسب نواری دور لام ها را چسباند.

2- مغز و کشت از مایعات مغزی - نخاعی و سایر مایعات

میزان مایعات مغزی نخاعی برای کشت میکروبی، معمولاً به 1 تا 2 میلی لیتر محدود است، اما از این مایعات، تعداد اندکی ارگانیزم می توان جدا کرد، ابتدا تمامی نمونه های برداشت شده باید قبل از کشت میکروبی، باروش رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گیرند. این روش قابل اعتماد و سریع بوده و براحتی قابل استفاده است.

البته بهتر است قبلاً به کمک سانتریفوژ تعداد اندک میکروارگانیسم موجود در مایعات مغزی نخاعی را در رسوب حاصل در لوله سانتریفوژ، متراکم و مجزا کرد، در این صورت، مایعات بالای رسوب را می توان برای آزمایش های شیمیایی و سرم شناسی به کار برد و از رسوب موجود برای تهیه گسترش و کشت استفاده کرد.

در مراحل ابتدایی مننژیت های باکتریایی و یا قارچی، با اینکه نتیجه کشت نمونه ها مثبت بوده، اما تعداد سلول های موجود در مایعات مغزی نخاعی در حد طبیعی است. واکنش لکوسیتهی این مایعات، در مننژیت حاد باکتریایی بیشتر از گلبول های سفید چند هسته ای تشکیل شده، در حالی که در عفونت های تک یاخته ای، لپتوسپیروز و بیماری های قارچی این واکنش چندان قابل توجه نبوده و بیشتر از لنفوسیت ها تشکیل می شود.

به منظور جمع آوری مایعات مغزی نخاعی باید از ناحیه عقب زاویه فک تحتانی برش عمیقی ایجاد کرد، طوری که به کندیل پس سری (occipital condyle) رسیده و مجرای مگنوم (magnum foramen) مشخص و ظاهر گردد. در این صورت می توان توسط سوزن و سرنگ استریل، از مایعات مغزی نخاعی، برای آزمایش های میکروب شناسی، کلینیکال پاتولوژی و غیره نمونه برداری کرد. همچنین برای بررسی وجود ضایعات آماسی و عفونی در اعصاب مرکزی می توان آزمایش پندی (pandy test) را انجام داد.

روش آزمایش طوری است که یک قطره از مایعات مغزی نخاعی را در لوله حاوی مایعات غلیظ فتل وارد می کنند و در صورت وجود مقادیر بالای پروتئین در مایعات مغزی نخاعی، شبیه حالتی که در آنسفالیت های عفونی ایجاد می گردد، رسوب کدری به وجود می آید. برای تهیه معرف پندی، در داخل بطری شیشه ای، بلورهای فتل را ریخته و روی آن آب جوش می ریزند و پس از گذشت چند ساعت که بلورهای داخل ظرف ته نشین گردید، از مایعات بالای ظرف که شفاف است، به عنوان معرف پندی استفاده می کنند.

در مورد آبه های مغزی نیز احتمال می رود که تغییرات سلولی و شیمیایی در مایعات مغزی نخاعی ایجاد گردد، اما به غیر از مواردی که آبه ها پاره شده اند، نتیجه گسترش و کشت منفی است. در مننژیت قارچی حاصل از کریپتوکوکوس، میتوان یک قطره از رسوب حاصل در لوله سانتریفوژ را روی لام قرار داد و بعد با یک قطره مرکب هندی یا مایع نیگروزین مخلوط کرد، سپس روی آن لامل قرار داد و با نور ضعیف میکروسکوپ، مطالعه نمود. مایع نیگروزین به علت وجود ناخالصی، نسبت به مرکب هندی بهترست. در این صورت می توان، سلول های دارای کپسول و جوانه قارچ را مشاهده کرد. نمونه برداری از سایر مایعات از قبیل مایعات حفره صدری، پریکارد و حفره بطنی و کپسول مفصلی باید به صورت استریل انجام گیرد. در این مورد برای برای جلوگیری از انعقاد نمونه ها، باید

مقدار کمی از هپارین استریل به آن ها اضافه کرد، زیرا احتمال می رود میکروارگانیزم ها در داخل لخته به دام افتند. البته باید از مایعات جمع آوری شده بر روی لام گسترش تهیه کرد و برای دیدن باکتری ها رنگ آمیزی انجام گیرد. از مایعات جمع آوری شده می توان برای دیدن مستقیم سلولها، شمارش سلولی، تهیه گسترش و کشت استفاده کرد. اگر میزان مایعات فوق بیش از حد عادی باشد می توان آن ها را سانتریفوژ کرد.

3- دستگاه ادراری

برای نمونه گیری از دستگاه ادراری، می توان سوزنی را به داخل مثانه یا لگنچه وارد کرد و محتویات آن را برداشت نمود. برای نگهداری آن از شیشه یا لوله استریل که دارای درب باشد استفاده می شود. ادرار محیط کشت خوبی برای میکروارگانیزم ها بوده و باید از رشد آن ها جلوگیری نمود. اگر نتوان تا یک ساعت پس از نمونه برداری ادرار را کشت داد می توان آن را تا 24 ساعت یا 10-5 روز در یخچال نگهداری کرد. رسوب حاصل از سانتریفوژ ادرار را می توان تحت مطالعه با میکروسکوپ قرار داد. پس از شکستن سنگ های ادراری از نقاط داخلی آن ها برای کشت استفاده می گردد.

4- دستگاه تنفس

با توجه به اینکه جدا کردن میکروارگانیزم ها به کمک کشت ترشحات دستگاه تنفس بیانگر نقش آن ها در ایجاد عفونت نمی باشد، بنابراین باید کشت میکروبی حاصل از آن با احتیاط مورد تفسیر قرار گیرد. زیرا طیف وسیعی از انواع میکروفلور در دستگاه تنفس وجود دارد. در این صورت می توان توسط سوآب از بینی و حلق گسترش تهیه کرد و رنگ آمیزی گرم انجام داد. در صورت غالب بودن نوع خاصی از میکروارگانیزم عفونت زه، می توان تا حدودی به عامل بیماری دست یافت و حال پس از کالبد گشایی از اگزودای داخل برونش ها یا قطعاتی از بافت ریه و از عقده های لنفاوی محل، برای کشت و بررسی عامل بیماری استفاده می شود.

5- چشم

در نمونه گیری از مخاطات چشم که مبتلا به کونژوکتیویت و کراتیت است می توان از سوآب استفاده کرد، اما به علت اینکه سوآب نمی تواند تعداد قابل ملاحظه ای از میکروارگانیزم ها را برداشت کند، بنابراین شاید بهتر باشد که از بافت قرنیه تراشیده و با روش گرم، گیمسا و در صورت لزوم با روش اسید فست رنگ آمیزی نمود. محیط

کشت آگار را می توان به دو قسمت تقسیم کرد، در یک قسمت با سوآب و در قسمت دیگر بافت تراشیده شده قرنيه را کشت داد.

6- پستان

دست ها را كاملاً شسته و سرپستانك ها را با الكل 70 درجه و يا مواد مناسب ديگر از قبيل پرمنگنات پتاسيم يك در هزار تميز نمود و به صورت استريل، 15 تا 20 ميلي ليتر نمونه شير تهيه و براي كشت از آن استفاده كرد. محيط كشت مناسب براي نمونه شير، مك كانكي و ژلوز خوندار است. بهتر است ابتدا چند بار سرپستانك را تخليه كرد، سپس از محتويات آن كشت داد. ضمناً نمونه شير را مي توان در ظرف درپوش دار و در يخدان حاوي يخ حمل نمود.

7- زخم

محتويات داخل زخم هايي كه هنوز سر باز نكرده اند، حاوي عامل بيماري زا مي باشند. زخم هاي باز، اولسرها و يا مجاري و سينوس هايي كه به بيرون سر باز مي كنند غالباً با ميكروارگانيسم هاي سطح پوست و مخاطات، همچنين ارگانيسم هاي موجود در هوا آلوده مي شوند. با سرنك و سوزن استريل مي توان از محتويات آبه هاي سر بسته نمونه برداري كرد. به علت حضور تعدادي از عوامل بي هوازي در بعضي از زخم ها بايد مواد جمع آوري شده را در شيشه ها و يا در ظروف درب دار و سر بسته به آزمايشگاه فرستاد. براي رنگ آميزي، گسترش و يا كشت ميكروبي، از زخم هاي باز موجود در پوست و مخاطات، تراشيده و نمونه سوآب تهيه مي كنند. بررسي هيستوپاتولوژي قطعات بيوپسي نيز مي تواند در تشخيص عفونت هاي حاصل از قارچ ها كمك كند. استفاده از رنگ آميزي گرم و بررسي هيستوپاتولوژي مي تواند در يافتن عامل بيماري و هويت آن كمك كند. در رنگ آميزي اختصاصي مقاطع آسيب شناسي قارچ ها مي توان از روش PAS، گروكات و يا GMS استفاده كرد.

8- روده ها

از روده ها با گره زدن دو سر قسمتي از آن و يا در صورت مابعد بودن محتويات آن، با سوزن و سرنك استريل از راه سروز وارد شده و نمونه برداري را انجام مي دهند. در صورت ديگر مي توان قسمتي از روده را برش داد و يك سوآب استريل را وارد كرد و چرخاند و به اين طريق نمونه برداري كرد و سوآب هاي تهيه شده را در داخل لوله

های درب دار و حاوی محیط غنی شده حمل نمود. باکتری های روده و مدفوع بیشتر از انواع بی هوازی و گرم منفی اند. به این منظور می توان از محیط های کشت غنی شده مانند آبگوشت تتراتیونات و یا سلنیت اف برای بررسی اسهال های کلی باسیلوزی یا سالمونلایی و غیره استفاده نمود. در حالی که اگر بیماری هایی نظیر آنتروتوکسمی و اسیدوز و غیره وجود داشته باشد، چون عامل آنها گرم مثبت است، می توان به روش گرم رنگ آمیزی کرد. روش دیگر آنکه می توان مقداری از مدفوع تازه را بر روی کاغذ صافی و یا کاغذ خشک کن پخش نمود و پس از خشک شدن، طوری کاغذ صافی را تا کرد که مدفوع درون آن قرار گیرد. حال باید نمونه فوق را در ظرف پلاستیکی بسته بندی و به آزمایشگاه فرستاد. اگر از محتویات روده برای آزمایش های سم شناسی ارسال می شود، بهتر است در حدود 5٪ کلروفرم به آن اضافه شود.

9- کشت خون

برای تهیه کشت خون، می توان سطحی از قلب (حدود 5 سانتی متر) را با وسیله ای شبیه به کاردک داغ نمود و با یک سوزن و سرنگ استریل مقداری از خون داخل آن را آسپیره کرد. خون بدست آمده را در بطری مخصوص کشت خون وارد کرده و یک قطره از آن را روی محیط ژلوز خوندار قرار داده و به وسیله ی لوپ استریل پخش کرد. رعایت اصول سترونی در هنگام خون گیری بخصوص در حالت سپتی سمی و یا بیماری های ویروسی اهمیت بیشتری دارد. نمونه ی خون بری آزمایش های مربوط را می توان در بطری درب دار که حاوی ماده ضد انعقاد است، جمع آوری و به فریزر منتقل نمود و میتوان برای حمل و نقل نمونه ی خون، از یخدان های حاوی یخ استفاده کرد و یا موقتاً در یخچال نگهداری کرد.

10- کشت مفصل

برای این هدف، می توان دو طرف استخوان های دراز را اره کرد و بدون آنکه کپسول مفصلی باز گردد در داخل ظرفی که در آن یخ قرار دارد، به آزمایشگاه فرستاد، اما برای نمونه گیری از داخل محتویات مفصل، می توان پوست سطح آن را برش داد و کنار زد، سپس توسط اسکالپل و یا وسیله ای مشابه، سطح بافت را سوراخ و یک سوآب استریل را وارد مفصل کرده و از مایعات مفصلی نمونه برداری انجام داد. حال می توان مایعات مفصلی را روی محیط کشت قرار داد و پخش نمود سپس برای تشخیص نهایی آن را به آزمایشگاه میکروب شناسی ارسال کرد.

جمع آوری و نگهداری نمونه ها

1- هیستوپاتولوژی

بافت های برداشته شده را باید در فرمالین 10٪ و بهتر آنکه در فرمالین بافر خنثی 10٪ قرار داد. فرمالین بهترین مایع ثابت کننده است و در مواقع معمولی و غیر اختصاصی می توان برای پایدار کردن بافت ها از آن استفاده کرد. همچنین ممکن است بافت را در محلول الکل 90 درجه قرار داد. لازم است پس از گذشت یک روز محلول را تعویض کرد. مقدار محلول های ثابت کننده و یا فیکساتیو باید حداقل 10 برابر حجم بافت باشد و بهتر است این مقدار تا 20 برابر افزایش یابد. چنانچه مجبور باشیم نمونه را توسط پست ارسال کنیم احتیاط کامل باید انجام شود و ظرف آن شکستنی نباشد، به همین دلیل بهتر است که از ظروف دهان گشاد با جنس پلاستیکی استفاده شود، همچنین حجم مایعات پایدار کننده به نصف تقلیل یابد.

دهانه ظرف اگر به اندازه کافی گشاد نباشد پس از آنکه بافت پایدار گردید، قوام آن سفت شده و انعطاف پذیر نخواهد بود و هنگام خارج کردن نمونه از ظرف، ایجاد مشکل خواهد کرد، در این صورت می باید ظرف شیشه ای را شکسته تا نمونه از آن خارج شود. بهتر است اول فرمالین را در ظرف ریخته، سپس نمونه را در آن انداخت تا به کف ظرف نچسبد، ضمناً لازم است مشخصات مربوط به بافت، نوع دام، تاریخ نمونه برداری، محل نمونه برداری، شماره ی نمونه، مشخصات صاحب دام و آدرس را به طور خلاصه، هم بر روی ظرف نمونه برداری و هم به صورت مکتوب و جداگانه به همراه نمونه ارسال نمود. اطلاعات را نباید فقط بر روی در ظرف ثبت کرد، چرا که ممکن است تحت شرایطی در های ظروف جا به جا شوند. پس از ثبوت بافت طی 24 تا 48 ساعت می توان آن ها را از داخل فرمالین بافر خنثی 10٪ خارج کرد و در ظروف مخصوص و کوچک برای آبگیری قرار داد. حال می توان آن ها را به آزمایشگاه ارسال کرد. این عمل خواص زیادی دارد منجمله آنکه از هزینه حمل و نقل و بسته بندی های غیر ضروری کاسته و از نشت مایع فیکساتیو جلوگیری می گردد.

در اینجا بسیار ضروری است بدانیم ضخامت بافت ها باید در حدود 0/5 تا 1 سانتی متر بوده و به همراه قسمتهایی از بافت های ضایعه دیده، قسمتی از بافت سالم اطراف نیز برداشت گردد. نمونه برداری باید هرچه زودتر و حتی الامکان بلافاصله بعد از مرگ صورت گیرد. به منظور فرستادن روده ها برای هیستوپاتولوژی قبل از خارج کردن

روده از محوطه بطنی، می توان توسط سرنگ و سرسوزن، مقداری فرمالین بافر خنثی 10٪ به مجرای روده تقسیم نمود، سپس دو طرف قطعات روده را گره زد و جدا نمود و آن را در ظرف حاوی بافر فرمالین خنثی 10٪ قرار داد. این اعمال موجب می شود تا از اتولیز سطح پرزهای روده جلوگیری شود. در غیر این صورت به علت بروز اتولیز، تفسیر ضایعات روده مشکل خواهد بود.

2- باکتری شناسی

شایان ذکر است که حتی الامکان قبل از استفاده از آنتی بیوتیک ها، نمونه گیری برای میکروب شناسی انجام شود و در عمل کالبد گشایی، نباید سطح بافت ها و اندام ها با محتویات دستگاه گوارش و یا چاقوی آلوده تماس حاصل نماید. همچنین قبل از تماس نمونه با سوآب یا تکه برداری بافتی برای میکروب شناسی، محتویات دستگاه گوارش بویژه محتویات روده ها نباید بافت ها و اندام های محوطه بطنی و قفسه سینه را آلوده کند. پس از مرگ به علت فشار حاصل از نفخ، باکتری ها از طریق سیستم گردش خون به قسمت های جلو و عقب لاشه جا به جا شده و وارد بافت و اندامها می شوند و یا ممکن است فلور میکروبی دستگاه گوارش وارد جریان خون باب شود و در کبد تزايد حاصل نماید. این امر باعث می شود چند ساعت پس از مرگ، ارزش باکتری شناسی به منظور تشخیص بیماری کاهش یابد. در این رابطه باسیل ها جایگاه خاصی دارند، بخصوص کلستریدیوم و گونه های مختلف آن ممکن است باعث آلوده شدن بافتها و اندامها شوند و عامل اصلی بیماری را ناپدید سازند، بهترین مواردی که می توانند برای بررسی باکتری شناسی مورد استفاده قرار گیرند عبارتند از:

1- نمونه برداری از حیوانی که در مرحله حاد بیماری بوده و یا دچار تب است.

2- حیوانی که مبتلا به مرگ ناگهانی شده.

3- جنین سقط شده.

4- حیوان مبتلا به اسهال.

5- ضایعات التهابی واکسوداتیو جلدی (درماتیت).

به منظور نمونه برداری برای باکتری شناسی و کشت می توان از ریه، کبد، طحال، کلیه، خون داخل حفره قلب، ترشحات اگسودا و بسته به مورد، از محتویات دستگاه گوارش، داخل صفاق و حفره ی صدری و مایعات پریکارد، بافت مغز و مایعات مغزی نخاعی، عقده های لمفاوی، ادرار و غیره استفاده کرد. همچنین با استفاده از سوآب می توان از داخل گوش، حلق، بینی، چشم، مهبل و پوست نمونه ی میکرب شناسی تهیه و برای تشخیص استفاده کرد. قابل ذکر است که در موارد سپتی سمی عوامل بیماری ها در بدن و با توجه به دور از دسترس بودن مغز استخوان از محتویات دستگاه گوارش، یکی از بهترین نقاط برای میکرب شناسی برداشت از مغز استخوان است که به این منظور استخوان ران، زند زبرین (Radius) و یا جناغ سینه می توانند مفید واقع شوند. مقطعی از استخوانهای فوق را می توان به آزمایشگاه فرستاد و یا اینکه پس از قطع عرضی از این استخوانها سطح مقطع آن را سوزانده و به کمک سوآب، نمونه برداری کرد و آن را به محیط کشت انتقال داد.

برای نمونه برداری بررسی میکرب شناسی، عضوی که دارای ضایعه بوده و هنوز به میکروب های دیگر آغشته نشده، مناسب است. به این منظور می توان به کمک کاردک یا وسیله ی مشابه دیگری که با حرارت داغ شده روی سطح عضو یا بافت قرار داد و پس از آن با کمک لوازمی مانند سوآب و غیره وارد عمق بافت شد و نمونه برداری را انجام داد. البته اگر بلافاصله بعد از گشودن لاشه امکان نمونه برداری وجود داشته باشد، دیگر نیازی به داغ نمودن بافت نیست و می توان بسرعت این عمل را انجام داد، چون بعضی از باکتری ها توسط مواد موجود در پنبه سوآپ از بین می روند، بهتر است قبل از خشک شدن پنبه، نمونه برداشت شده ارسال گردد تا در محیط کشت مناسب قرار گیرد.

بسته محتوی نمونه را باید با چسب محکم نمود و داخل پاکت قرار داد و در درجه حرارت معمولی به آزمایشگاه ارسال کرد. به این طریق دیگر نیازی به استفاده از ظروف دیگر و یا یخ نمی باشد. به منظور نمونه گیری میکربی از سرنگ به همراه سوزن های مناسب نیز استفاده می شود. با این وسیله می توان از اگسودای داخل مفاصل، آبسه ها، محتویات روده ها، مایعات مغزی نخاعی، محتویات مثانه، مایعات موجود در داخل صفاق، قفسه سینه، حفره پریکارد، خون موجود در داخل سیتم قلبی عروقی و غیره نمونه برداری کرد. این روش نمونه برداری بسیار مناسب است، زیرا محتویات داخل سرنگ در مقابل هوا قرار نگرفته و خشک نمی شود. این حالت باعث بقای بیشتر میکرب خواهد شد و به راحتی می توان سرنگ را با محتویات آن به آزمایشگاه ارسال کرد. می توان مقداری از

محتویات سرنگ و یا ترکیبات موجود در سر سوآب را به محیط کشت پلیت وارد کرد و با کمک لوپ که با حرارت شعله استریل شده است، آن را پخش نمود. همچنین باید از ترشحات آبسه، اکسودا، ادرار، مایعات مغزی نخاعی و مایعات آسپیره شده، گسترش تهیه و با ترکیباتی مانند رنگ گرم و گیمسا رنگ آمیزی کرد. لازم است لایه های نازکی روی لام قرار داد و یا بین دو لامل را فشار داد و آنها را از هم جدا نمود، حال می توان قسمت نازک را رنگ آمیزی کرد. پس از آنکه گسترش نازکی روی لام تهیه شد، باید سریعاً آن را در هوا خشک کرد و به آزمایشگاه فرستاد. در این نمونه خصوصیات ظاهری سلول ها تا چند روز حفظ خواهد شد، برای اطمینان بیشتر می توان گسترش های تهیه شده را در اتانول یا متانول 95٪ و یا مطلق، به مدت 3 دقیقه فیکسه کرد و پس از خشک کردن به منظور رنگ آمیزی، مطالعه و بررسی به آزمایشگاه ارسال نمود.

محیط های کشت نیز عبارتند از: آگار مغذی، آگار به عنوان منبع مغذی برای باکتری ها، آگار مغذی ژلاتین، ژلوز خوندار (Blood Agar) که ارگانسم های همولیتیک را مشخص می کند، سرم خون برای نشان دادن پروتئولیز و کروموزنر، محیط مک کانکی در تشخیص باکتری های انتروباکتریاسه، تیو گلیکولات برای کشت باکتری های هوازی اختیاری و بی هوازی، محیط روبرتسون برای ارگانسم های بی هوازی، محیط ساده و آگار برای رشد قارچ ها، آب پتونه برای تعیین حضور اندول و آمونیاک و آنزیم باکتری ها، نیترا برای ارزیابی احیای نیترا، لیتموس میلک محیط افتراقی برای تبخیر لاکتوز، انعقاد کازئین و احیای لیتموس، محیط قندی برای توانایی تخمیر قند و محیط اوره.

3- ویروس شناسی

نمونه هایی از نظر ویروس شناسی ارزش دارند که در مرحله ی حاد بیماری و قبل از تولید پادتن برداشت شده باشند و بدین منظور، عضوی از بدن که ضایعات بیشتری دارد مناسبتر است. نمونه های ارسالی برای ویروس شناسی بهتر است، در گلیسرین بافر و هانکس BSS، در کنار یخ و یا در درجه حرارت پائین به آزمایشگاه ارسال گردد. حتی الامکان نمونه نباید یخ زده باشد اما چنانچه طی 24 ساعت نمونه را ارسال کرد، ضروری است که آن را منجمد و به همراه یخ خشک به آزمایشگاه فرستاد. حرارت، نور، از بین رفتن آب نمونه، تغییر در میزان نمک نمونه و تغییر در pH، همگی میتوانند باعث تغییر ماهیت ویروس شوند.

4- سرم شناسی

به منظور اطمینان بیشتر لازم است نمونه های سرمی متعدد تهیه و از 4 تا 6 حیوان و یا 10٪ دامهای گله خونگیری کرد. در موارد معمولی مقدار 3 سانتی متر مکعب سرم کافی است، اما در مواردی مانند بیماری IBR و BVD-MD حداقل 6 سی سی از سرم برای ارسال به آزمایشگاه لازم است و به منظور پیشگیری از همولیز، نمونه های خون را سانتریفوژ کرده و فقط مایعات فوقانی به آزمایشگاه فرستاده میشود.

تست آگلوتیناسیون، ژل دیفیوزیون، حلقه رسوبی، آزمون تثبیت عامل کمپلمان، تست هماگلوتیناسیون، تست الایزا از انواع آزمایشاتی هستند که روی سرم انجام میگیرند.

5- قارچ شناسی

نمونه های بدست آمده از تراشیدن پوست را باید در ظروفی که خشک بوده و استریل اند، به آزمایشگاه ارسال نمود. برای بررسی قارچ ها و جرب ها از پیرامون ضایعات تازه تشکیل شده، تراشه های عمیق تهیه و نمونه برداری میکنند. در عفونت های قارچی پوست میتوان چند تار مو جدا کرده و در داخل پاکت و یا یک تکه کاغذ تمیز به آزمایشگاه ارسال نمود.

6- انگل شناسی

در بررسی انگل شناسی، مجاری هوایی، دستگاه تنفس، پوست، خون، ادرار و مدفوع مورد بررسی قرار میگیرد، اما مهمترین نمونه برای تشخیص انگل ها، مدفوع است. در داخل مدفوع تخم، لارو و تعداد زیادی از عوامل انگلی که از طریق دستگاه گوارش دفع می شوند وجود دارد. اگر مراحل مختلف سیر تکاملی در مدفوع مشاهده شود دلیل بر وجود آلودگی انگلی است، اما عدم وجود آنها دلیل بر عدم وجود آلودگی انگلی نمی شود و بررسی های سرولوژیک میتواند موثر واقع شود.

غالباً آزمایشهایی که به منظور بررسی وجود انگل صورت میگیرد، به کمک عمل شناور سازی یا تهیه ی گسترش بر روی لام انجام می شود، اما گاه نمیتوان به گرفتن یک نمونه اکتفا کرد. لازم است پس از گذشت 3 روز نمونه گیری تکرار شود. برای تشخیص انگل ها از مدفوع تازه دفع شده استفاده میگردد زیرا تخم بعضی از انگل ها به

سرعت باز شده و لارو از آن خارج شود و نیز ممکن است نتوان لارو ها را شناور ساخته یا معلق نمود و حتی الامکان باید نمونه مدفوع را خصوصاً در مورد نشخوار کنندگان از مقعد برداشت کرد.

بدین منظور به کمک فشار دادن 2 انگشت به کف رکتوم گاو حیوان را تحریک نمود و نمونه را برداشت نمود. در دامهای بزرگ با استفاده از دستکش و در دامهای کوچک با استفاده از وسایلی مثل قاشقک یا سوآب میتوان نمونه گرفت. تذکر این نکته لازم است که نباید از مدفوع دام مبتلا پس از مصرف مسهل، نمونه برداشت گردد، زیرا در این موارد تعداد تخم موجود در مدفوع به میزان چشم گیری کاهش میابد. بهتر آن است که نمونه مدفوع تا زمانی که به آزمایشگاه ارسال میگردد در محیطی سرد نگهداری شود و اگر این کار مقدور نباشد، میتوان آن را در فرمالین 10٪ پایدار نمود، طوری که به یک قسمت مدفوع 10 قسمت فرمالین اضافه کرد.

اگر نتوان آزمایش را بلافاصله انجام داد، لازم است نمونه ها را در یخچال نگهداری نمود. کرم های بالغ را می توان در محلول نمکی سرد به صورت مستقیم در آورد و بعد در محلول گلیسرول 10٪ و الکل 70٪ ثابت نمود. به انگل های خارجی روی لام می توان سود سوزآور 10-5 درصد و یا پتاس اضافه نمود و پس از شفاف شدن، آنها را بررسی کرد. به منظور نگهداری بندپایان (انگل های داخلی و خارجی) به صورت مرطوب می توان از اتانول 70 تا 80 درصد استفاده کرد درحالیکه الکل صنعتی و یا فرمالین برای این منظور مناسب نیستند.

محلول دیگر که برای پایدار نمودن بندپایان مناسب است، Duboscq Brazil بوده که حاوی 150 میلی لیترالکل 80٪ با یک گرم اسید پیکریک کریستال است که هنگام استفاده از این ترکیب به آن 60 میلی لیتر فرمالین و 15 میلی لیتر اسیداستیک اضافه می شود. الکل را باید هرچند وقت یکبار تعویض و یا به ظرف نگهداری آنها اضافه کرد. در تشخیص بعضی انگل ها از قبیل تک یاخته، کرم های پهن، کرم های نواری و کرم های گرد می توان از تهیه گسترش استفاده کرده، مقدار اندکی از مدفوع را در یک قطره آب یا محلول سرم نمکی فیزیولوژی روی یک لام قرارداده و آن را با لامل پوشانده و بررسی میکنند. با این روش می توان تک یاخته هایی مانند تریکوموناس، ژیا ردیا، آمیب و تروفوزوئیت را بررسی نمود.

در انگل شناسی برای بررسی تخم کرم های نواری و گرد و تعدادی از لاروها و اووسیت کوکسیدیا می توان از روش شناورسازی استفاده کرد که روشی است بسیار با ارزش ودقیق که البته برای تشخیص تخم کرم های

ترماتودها چندان با ارزش نمی باشد. برای این منظور می توان از محلول های شکر و نمک و نیترات سدیم و سولفات منیزیم، سولفات روی و غیره بهره برد. بررسی ادرار برای یافتن تخم انگل بیشتر به منظور مطالعه انگل های دستگاه ادراری کاربرد دارد که برای مثال می توان یافتن تخم انگل دیوکتوفیمارنال در سگ را نام برد. مطالعه خون بیشتر برای بررسی وجود میکروفیلر ها، لارو یا نوزاد گروه خاصی از کرم های گرد یا نماتود ها می باشند که این انگل ها را فیلر، یا فیلاریا و بیماری آن را Filariasis می نامند. میکروفیلر ها غالباً پس از گذشت ماه ها و حتی سال ها در خون ظاهر می شوند، زیرا مراحل بلوغ آنها به زمان زیادی برای تکامل و بلوغ جنسی نیاز دارد. میکروفیلر ها همچنین به صورت کرم های کوچک و ظریف با بدنی شفاف و حرکتی مارپیچی مشاهده می شوند.

خونگیری باید در ساعت 4 عصر و ساعت 2 صبح فردای آن روز انجام شود. تزریق آدرنالین (اپی نفرین) به حیوانات باعث می شود که تعداد قابل توجهی از میکروفیلر ها در طی چند دقیقه به جریان خون محیطی وارد شوند. این روش مفیدترین و مطمئن ترین روش تشخیص میکروفیلر های دیروفیلاریا ای میتیس و نماتود های دیتالونما و ستاریا در خون محیطی است. تراشه پوست برای بررسی جرب ها، با لوله درب دار خشک و تمیز به آزمایشگاه فرستاده می شود.

7- سم شناسی

به منظور بررسی سم شناسی در جهت یافتن علت مرگ حیوان، باید تاریخچه ای دقیق به همراه علائم بالینی را ضمیمه گزارش کالبدگشایی کرد. پس از نتیجه گیری کلی، نوع سم و یا سموم مشکوک را به آزمایشگاه سم شناسی یا فرد سم شناس اطلاع می دهند. متأسفانه بسیاری از اوقات مشاهده می شود که برخی از افراد برای بررسی سموم، درخواست کلی می نمایند و این عمل مستلزم اتلاف وقت و هزینه فراوان خواهد بود. ضمناً باید مشخصات دام، مشخصات صاحب دام، تاریخ نمونه برداری، محل نمونه برداری و سن، جنس، زمان مرگ و داروهای تجویز شده، ضمیمه نمونه ارسالی شوند. در مورد تشخیص نوع سم، باید به تاریخچه بیماری، محیط اطراف حیوان، علائم بالینی و ضایعات پاتولوژیک توجه خاص داشت.

نمونه های سم شناسی را نباید با آب شست، چون ممکن است مقداری از سموم به این طریق از داخل بافت ها خارج شوند و یا تحت تأثیر مواد موجود در داخل آب قرار گیرند. بسته بندی نمونه ها باید در ظروف تمیز و غیر قابل

جذب و نشت شبیه به کیسه های نایلونی باشد. نمونه های بافتی باید منجمد شده و با همین وضعیت ارسال شوند. سرم و خون باید در یخچال نگهداری شود و از انجماد آنها نیز جلوگیری گردد. به نمونه های خون نیز به منظور پیشگیری از انعقاد، می توان ترکیبات سیترات و یا هپارین اضافه کرد.

نمونه های انتخابی برای آزمایش سم شناسی از حیوان زنده عبارتند از:

خون، ادرار، ترکیبات غذای استفراغ شده، مواد غذایی و مدفوع (که ارزش کمی دارد) و در صورت امکان، بیوپسی از کبد.

نمونه های انتخابی برای آزمایش سم شناسی از حیوان مرده یا تلف شده:

کبد، کلیه، معده و محتویات آن، ادرار، سرم، مغز

مقادیر تقریبی از نمونه هایی که باید ارسال شود عبارتند از:

سرم 5CC، خون کامل 10CC، ادرار 50CC، کبد 50-100 گرم، کلیه 50-100 گرم، مغز (نیمی فیکسه شده در فرمالین و نیمی منجمد شده) 50-100 گرم، طحال 50 گرم، محتویات معده یا شکمبه 150-500 گرم، غذا یا موادی که مشکوک اند 200-500 گرم، چربی بدن 50-100 گرم.

پایدار کردن

هدف کلی: هدف از پایدار کردن، حفظ ساختمان سلول ها و شبیه به حالتی است که در زمان حیات آن ها وجود دارد. به طوری که بتوان مقاطع نازکی از آن ها را تهیه و رنگ آمیزی کرد.

اهداف پایدار کردن عبارتند از:

1- جلوگیری و یا توقف در روند اتولیز و تغییراتی که در اثر باکتری ها ایجاد شده و گندیدگی حاصل می گردد.

2- منعقد نمودن بافت و جلوگیری از انتشار مواد و ترکیبات داخل سلول ها و بافت ها.

3- قوت و استحکام بخشیدن به بافت در مقابل آثار زیان آور مراحل مختلف آمادگی بافت ها، آبگیری و شفاف کردن و قالب گیری.

4- ایجاد شرایطی برای بافت ها به منظور امکانات بهتر برای رنگ آمیزی تفریقی با رنگ ها و معرف ها.

شایان ذکر است که وقتی موجود زنده دچار مرگ می گردد، تحت اثر یکسری از آنزیم های پروتئولیز کننده اجزای داخل سلول تجزیه می شود و این موضوع می تواند باعث تغییرات ساختمانی در سلول ها و بافت ها گردد و چون پایدار کننده ها، با این آنزیم ها ترکیب شده و مانع از عملکرد آنها می گردد و در نتیجه ساختار طبیعی سلول ها و بافت ها حفظ خواهد شد. بنابراین لازم است برای حفظ کردن بهتر آنها هر چه سریعتر نمونه برداری بافتی برای پایدار نمودن انجام پذیرد. روش دیگری که به کمک آن می توان مانع از عمل تجزیه و از بین رفتن اجزای داخل سلول ها شد، استفاده از هوای سرد است به همین علت گاهی لازم است موجود زنده را در یخچال یا فریزر نگهداری کرد تا در موقع مناسب نمونه برداری بافتی انجام گیرد.

ضمناً بعضی از مواد پایدار کننده کندتر و بعضی بسیار سریع تر نفوذ می کنند پس عمل پایدار کردن به مواردی از جمله بافت، ضخامت بافت و نوع ماده پایدار کننده بستگی دارد. پایدار کننده ها به دو گروه اصلی تقسیم می شوند، دسته ی اول آنهایی که پایدار کننده های میکروآناتومی اند و لایه هایی از بافت و سلول ها را پایدار می کنند که معمولاً در کارهای روزمره از این دسته استفاده می شود و دسته ی دوم، آنهایی که پایدار کننده های سیتولوژیک بوده و بیشتر اجزای تشکیل دهنده سلول ها و یا ارگانل ها را پایدار می کنند.

انواع پایدار کننده ها

1- فرمالین - فرمل - فرمالدئید (CHO.H-Formaldehyde)

فرمالدئید نوعی گاز است که در آب محلول بوده و حداکثر به میزان 30 تا 40 درصد در آب حل می گردد. این ماده اولین بار توسط بلوم (Blum) مورد استفاده قرار گرفت و یکی از پایدار کننده هاست که بیشترین مصرف را دارد. این ترکیب به صورت محلول در آب استفاده می شود که ممکن است به شکل غلیظ و قوی (به نسبت یک به چهار) و یا به شکل رقیق و ضعیف ده درصد (به نسبت یک به ده) به کار می رود. معایب فرمالین عبارتند از: الف) رنگدانه های فرمالین ایجاد کرده ب) اندکی چروکیدگی ایجاد نموده و ج) به کندی در بافت ها نفوذ می کند، طوری که برای پایدار کردن آنها حداقل دو روز تا چند روز زمان لازم است.

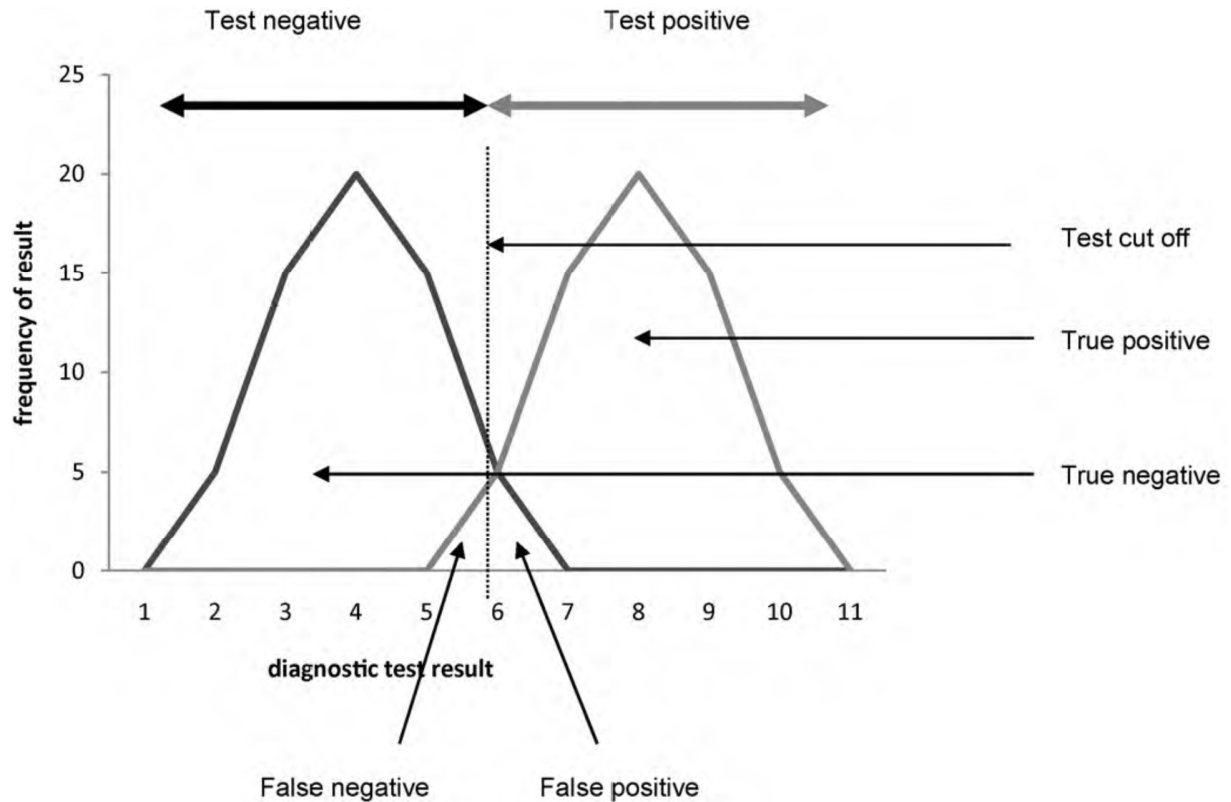
معمولاً فرمالین را به ترتیبی استفاده می کنند که 1 قسمت فرمالین و قسمت آب (ترجیحاً آب مقطر) مخلوط شده باشد. این ترکیب چهار درصد فرمالدئید دارد. محلول 10 درصد فرمالین نمکی عبارت است از 1 قسمت فرمالین و 9 قسمت سرم فیزیولوژی حاوی نمک به معنای 4 درصد فرمالین در محلول نمکی سرم فیزیولوژی.

گاز فرمالین محرک بوده و باعث تحریک چشم و بافت پوششی دستگاه تنفس می گردد. بنابر این لازم است آزمایشگاه مجهز به سیستم تهویه و هود باشند. همچنین دستکش های لاستیکی یا نوعی کرم محافظت کننده می تواند تأثیر مفیدی داشته باشد، زیرا ممکن است موجب درماتیت گردد.

در مواقعی که نیاز به بررسی داریم، باید از چه تعداد از دام ها نمونه گیری کنیم؟

ما نیاز داریم بدانیم که باید از کدام دام ها و به چه تعداد نمونه گیری کنیم. همچنین لازم است بدانیم که آیا تشخیص نهایی مان درست بوده است یا خیر؟ ما باید از حداقل 6 دام نمونه گیری کنیم. به این معنی که این 6 دام باید دارای یک مشکل باشند، مثلاً 6 دام یک گله که سقط کرده اند. اگر نمونه ها کمتر از این تعداد باشند، اطمینان ما از جوابها کمتر و در نتیجه تشخیص نهایی ما غیر قابل اعتمادتر خواهد بود. صحت کار را با نمونه گیری از دامهای سالم به عنوان شاهد، و تکرار نمونه گیری بعد از 2 هفته از همان دامها بالا می بریم. این کار، این امکان را به ما می دهد که افزایش عیار پادتن را در این دو هفته بسنجیم.

آزمون طلایی یعنی آزمونی که صراحتاً بتواند همه دامهای غیر آلوده را منفی گزارش کرده و تمام دامهای آلوده را مثبت گزارش کند. برای بسیاری از عفونتها چنین آزمونی در اختیار نیست، پس با علم به این موضوع و با توجه به حساسیت و ویژگی هر آزمون باید نتایج را تفسیر کرده و تصمیم گیری نمائیم. حساسیت آزمون یعنی درصدی از دامهای واقعاً آلوده که توسط آزمون، آلوده تشخیص داده شده اند و ویژگی آزمون نشان دهنده دامهای غیر آلوده ای است که توسط آزمون منفی تشخیص داده شده اند. در همه آزمایش های تشخیصی، میزان حساسیت و ویژگی آن مشخص شده است که می بایست در تفسیر نتایج به آن دقت شود.



به عنوان مثال اگر کیت الایزا تشخیص عفونت کلامیدوفیلا آبورتنوس برای گوسفندان خریداری کرده ایم که دارای حساسیت 85٪ و ویژگی 95٪ باشد و 100 گوسفند واقعاً آلوده در یک گله 1000 رأسی داریم. در این مثال ما می توانیم انتظار داشته باشیم این کیت بتواند 85 گوسفند از 100 گوسفند واقعاً آلوده و 855 راس از 900 راس واقعاً غیر آلوده را مشخص کند. در نتیجه 15 راس از گوسفندان آلوده شناسایی نشده و به عنوان دام غیر آلوده تلقی می شوند، در حقیقت این 15 دام آلوده، با میزان حساسیت 85 درصدی کیت، به عنوان دام غیر آلوده معرفی شده اند (منفی کاذب) و 45 دام واقعاً غیر آلوده با ویژگی 90 درصدی کیت به عنوان دام آلوده معرفی شده اند (مثبت کاذب) بنابراین این کیت می تواند به ما بگوید که 130 گوسفند آلودگی کلامیدیایی دارند و 870 راس پاک هستند.

اگر ما دقت کافی به حساسیت و ویژگی تست های مورد استفاده نداشته باشیم ممکن است تشخیص و تصمیم اشتباهی در رابطه با هر کدام از دامها و یا کل گله بگیریم. برای مثال اگر ما مشکوک به سقط های کلامیدیایی در گله ای هستیم و کیتی در اختیار داریم که 85٪ حساسیت و 95٪ ویژگی دارد، آنگاه فقط یک رأس میش که واقعاً به کلامیدیا آلوده بوده و سقط کرده است را تست کنیم، 15٪ احتمال دارد که نتیجه آزمایش منفی بوده و ما در تشخیص و درمان گله دچار اشتباه شویم (در زمان مراجعه تک کیس و یا ارسال تک نمونه به آزمایشگاه).

با نمونه گیری از 2 راس میش این خطا به کمتر از 3٪ رسیده و با نمونه گیری و آزمایش کردن 6 راس میش از گله مشکل دار، با این کیت، کمتر از 0/01 درصد احتمال خطا وجود دارد تا گله ای که دارای مشکل سقط های ناشی از کلامیدوفیلا آبورتوس است را منفی تلقی کرده یا عامل آن را تشخیص ندهیم. پس با نمونه گیری از حداقل 6 میش و مثبت شدن حداقل یک نمونه، می توانیم بگوئیم که در این گله آلودگی به کلامیدوفیلا آبورتوس وجود دارد.

در ارتباط با تست کردن یک راس دام نیز نکاتی وجود دارد که لازم است به آن ها توجه شود. در مثال قبل و با همان کیت اگر یک راس میش را دوبار با همان کیت تست کردیم (با فرض اینکه هیچ گونه تغییری در عیار پادتن های دام نداریم) ما دقت تشخیص خود را افزایش داده و خطا را به کمتر از 3٪ رسانده ایم. تصور کنید یک میش واقعاً پاک است، در تست دفعه اول 5٪ میش های پاک دارای نتیجه مثبت در تست هستند. احتمال اینکه گوسفندی دو بار نتیجه تست منفی داشته باشد در صورتیکه واقعاً آلوده است، فقط 0/052 است. پس ما 2/5 درصد خطا داریم که میشی که واقعاً آلوده است را منفی گزارش کنیم.

چه کار کنیم زمانی که یک راس دام در یک تست مثبت است و در تست دیگر منفی؟

می توانیم از تست های دیگر با حساسیت و ویژگی متفاوتی استفاده کنیم. برای مثال در ابتدا تستی انتخاب می کنیم که دارای حساسیت بالایی باشد تا مطمئن شویم که تمام دامهای آلوده را شناسایی کرده ایم و به این نکته دقت داریم که بواسطه بالا بودن حساسیت تست، تعدادی دام مثبت کاذب نیز شناسایی کرده ایم. سپس می توانیم تستی با ویژگی بالا انتخاب کرده و همه دام های مثبت در تست قبلی (تستی که حساسیت بالایی داشته) را با آن تست کرده و مثبت های واقعی را شناسایی کنیم.

رهیافت های تحقیق در موارد وقوع سقط جنین

سقط های انفرادی (Sporadic abortions)

- 1- بررسی جهت حضور بروسلا آبورتوس و انجام آزمایشات آن بر طبق پروتکل سازمان دامپزشکی کشور.
- 2- این نکته باید به درستی مشخص شود که تعداد سقط ها به درستی گزارش شده و این مورد واقعاً سقط انفرادی بوده است، بدین معنی که در گاوداری واقعاً سقط دیگری نبوده و موارد دیگری از سقط، به هیچ دلیلی پنهان نشده است. اگر در این مرحله از واقعیت سقط انفرادی مطمئن شدیم به مرحله 3 می رویم ولی اگر در این مورد مطمئن نشدیم و یا شک داشتیم باید مراحل تحقیق در سقط های اپیدمیک را دنبال کنیم.
- 3- اخذ جزئیات و تاریخچه کامل از گاو سقط کرده.
- 4- انجام معاینه کامل بالینی از گاو سقط کرده.
- 5- بررسی جفت به لحاظ وجود ضایعات قابل مشاهده.
- 6- ارسال سرم جهت ردیابی پادتن بر علیه لپتوسپیرا هارجو مگر آنکه گله بر علیه آن مایه کوبی شده باشد.
- 7- ارسال سرم جهت ردیابی پادتن بر علیه نئوسپورا کانینوم.
- 8- تهیه سوآب از ترشحات واژن و کشت در محیط های بیوشیمیایی جهت جستجوی سالمونلا دابلین.
- 9- اخذ تاریخچه از جزئیات گله در رابطه با هر گونه تغییر در سیستم پرورش، انتقال دام ها، خرید دام جدید، قرض گرفتن دام نر برای جفت گیری و سن گاوهای سقط کرده.

سقط های گسترده (Abortion outbreak)

1. قبل از هر چیز باید از وجود اپیدمی سقط ها مطمئن شویم. موارد مختلفی وجود داشته است که علی رغم گزارشات فراوان از وجود سقط های همه گیر، پس از بررسی مشخص شده است که هیچ گونه رخداد گسترده ای از سقط ها وجود ندارد. این حالت در نتیجه برخی اشتباهات در گزارش و یا فرصت طلبی ها به وجود می آید که یکی از بارزترین مثال ها در ایام نزدیک به وقایع مهم سیاسی کشور نظیر انتخابات های مختلف به وجود می آید. پس اولین قدم، اطمینان از صحت وقوع اپیدمی می باشد.
2. انجام مراحل (1)، (3)، (4) و (9)

3. بهتر آن است که چند جفت و جنین تازه یا چندین کوتیلودون تازه را به آزمایشگاه ارسال کنند. اگر این امر مقدور نبود به روش زیر نمونه ها به آزمایشگاه ارسال شود:
4. مقدار 2 سی سی از محتویات معدی (شیردان) جنین به روش استریل و با استفاده از سرنگ های استریل جمع آوری شود.
5. جمع آوری مقدار 2 سی سی مایعات قفسه سینه، دور قلب یا مایعات حفره بطنی به روش استریل و با استفاده از سرنگ های استریل.
6. ارسال 5 گرم از بافت تازه کبد، کلیه، قلب، ریه، تیموس و غدد بزاقی که بصورت استریل و جداگانه تهیه شده باشند. باید دقت داشت که این نمونه ها در یخچال نگهداری شده و در کنار یخ حمل شوند، همچنین نباید آنها را فریز کرد.
7. تهیه گسترش تماسی (impression smear) از بافتهای تازه کوتیلودون، ریه، کلیه و کبد که در هوای طبیعی خشک شوند و سپس با استفاده از استون فیکس یا ثابت شوند.
8. حدود 1 سانتی متر مکعب از کوتیلودون همراه با پرده های بین کوتیلودونی، کبد، قلب، کلیه و ریه جنین که در فرمال سالین فیکس شده اند به آزمایشگاه ارسال شود. مغز باید به صورت کامل از جمجمه جنین خارج و در این محلول تثبیت کننده ارسال شود.
9. خونگیری از گاوهای سقط کرده و ارسال سرم همراه با لخته
10. خونگیری از همان دامهای سقط کرده پس از 2-3 هفته جهت ارزیابی عیار افزایش یافته پادتن در سرم
11. در موارد مرده زایی که به کمبود ید مشکوک هستید می بایست غده تیروئید جدا شود و نیمی از آن به صورت تازه برای اندازه گیری ید و نیمی دیگر به صورت تثبیت شده در محلول فرمالین برای بررسی هیستوپاتولوژی ارسال شود.

در مواردی که علی رغم انجام آزمایشات معمول، هیچ گونه عامل عفونی مسبب سقط تشخیص داده نمی شود بر طبق اهمیت موضوع، می توان آزمایشات اختصاصی دیگری را انجام داده و دامنه آزمایشات و جستجوی اجرام غیر معمول را وسیع تر کرد. با این حال، سقط جنین می تواند در اثر بسیاری عوامل غیر عفونی به وجود آمده باشد که در ادامه به ذکر آنها خواهیم پرداخت. این نکته را باید به خاطر داشت که عوامل بسیاری از سقط ها علی رغم انجام

آزمایشات فراوان، ناشناخته باقی می ماند. در انگلستان تنها در 35 درصد مواردی که جفت و جنین به آزمایشگاه ارسال شده اند عامل مسبب سقط جنین مشخص شده است.

جمع آوری نمونه های بالینی

جهت دست یابی به تشخیص صحیح و دقیق، نمونه ها باید هم به صورت صحیح انتخاب شده و هم می بایست در زمان دقیقی این کار انجام شود و به صورت صحیح نیز حمل شود. چه بسا بافت های مناسب جمع آوری شده که در اثر عدم رعایت زمان نمونه گیری و طریقه حمل نمونه، ارزش تشخیصی خود را از دست بدهند.

نمونه ها باید به صورت صحیح، ثبت مشخصات شده و در درجه حرارت مناسب هر چه سریعتر به آزمایشگاه تشخیصی ارسال شوند. از آنجا که اکثریت عوامل سقط جنین دامها، میکروبهای بیماریزا برای انسان می باشند باید دقت کافی در بسته بندی نمونه ها صورت گیرد تا هیچ گونه نشت موادی از جعبه حمل نمونه صورت نگیرد، همچنین می بایست میزان کافی از کیسه های یخ جهت پائین نگه داشتن دمای محیط در کنار نمونه ها قرار گیرد.

کلمات " نمونه های ییولوژیک، شکستنی و حمل با احتیاط " می بایست بر روی جعبه ها به صورت بزرگ و قابل مشاهده نوشته شود.

جفت:

زمانی که جفت جنین های سقط شده در دسترس باشد و زیاد با خاک و بستر آلوده نشده باشد، بهترین نمونه برای تعیین یا جدا سازی بسیاری از عوامل سقط می باشد. علاوه بر امکان تهیه کشت میکروبی مناسب از جفت، می توان برای تهیه مقاطع پاتولوژی و همچنین تهیه گسترش و رنگ آمیزی از آن استفاده کرد. در زمانی که امکان انتقال جفت به هر دلیل به آزمایشگاه وجود ندارد لازم است تعدادی کوتیلودون جدا شده و ارسال گردد. جهت انجام این کار باید تعداد حداقل 6-7 کوتیلودون همراه با پرده های بین کوتیلودونی جدا شده و در ظرف استریل به آزمایشگاه ارسال شود. باید دقت داشت که کوتیلودون هایی که دارای جراحات قابل مشاهده هستند حتماً جدا و ارسال شوند.

اگر کوتیلودون ها با خاک آغشته شده اند می توان قبل از ارسال، آنها را با استفاده از مقداری سرم فیزیولوژی استریل شستشو داد. برای مقاصد مختلف لازم است تا کوتیلودون ها به روش های زیر ارسال شوند:

- جهت بررسی های ویروسی لازم است کوتیلودون ها در محیط انتقال ویروسی (Viral transport medium) حمل شوند.
- به منظور جدا سازی کمپیلوباکتر، کوتیلودون ها باید در محیط FPB/glycerol حمل شوند.
- برای بررسی لپتوسپیراها کوتیلودون ها باید در 100 سی سی محلول 1٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) منتقل شوند.
- جهت بررسی های هیستوپاتولوژی، تکه های نیم سانتی متری از کوتیلودون هایی که جراحات دارند جدا شوند و در محلول فرمالین 10٪ به آزمایشگاه ارسال شوند. باید دقت داشت که 1 قسمت نمونه به ازاء 10 قسمت محلول فرمالین وجود داشته باشد.
- برای تهیه گسترش های باکتریایی لازم است تا از کوتیلودون های با جراحات مشخص بر روی لام ها انتقال داده شود.

نمونه سوآب واژن:

ترشحات دستگاه تناسلی بلافاصله بعد از سقط که با استفاده از سوآب واژنی جمع می شود یکی از بهترین نمونه ها برای تعیین عامل سقط می باشد. این ترشحات به اندازه کوتیلودون ها از غلظت میکروارگانیزم مولد سقط برخوردار نیست اما به میزان قابل توجهی بیانگر آلودگی جفت می باشد. سوآب واژن از یک طرف نمونه بسیار خوبی جهت آزمایشات باکتری شناسی بوده و از طرف دیگر خطر کمتری برای نمونه گیر و انتقال دهنده دارد. لازم است که نمونه با فاصله کمی بعد از سقط جنین از دام گرفته شود. ترشحات دستگاه تناسلی معمولاً به مقدار بسیار زیادی در روزهای اولیه بعد از سقط وجود دارد که به سرعت از میزان آن کم شده یا دفع آن متناوب خواهد شد، در نتیجه اگر در روزهای اولیه بعد از سقط و یا به میزان کافی اخذ نشوند، می تواند آزمایشات ما را غیر قابل اعتماد کند. یکی از نکات مهمی که باید به آن توجه شود این است که از سوآب هایی استفاده شود که طول بلندی داشته باشند. این توصیه جهت جلوگیری از ایجاد آلودگی های ثانویه می باشد، چرا که اگر در این امر

دقت کافی صورت نگیرد و سوآب ها با احتیاط جمع آوری نشوند، ممکن است در اثر تماس سوآب با پوست حیوان یا محیط، باکتری هایی در کشت میکروبی جدا شوند که در تشخیص، گمراه کننده باشند.

نمونه بافت جنین های سقط شده یا نوزادان تازه مرده:

بافت ها اعم از کبد، کلیه، طحال، مغز و... می بایست به صورت سترون و حتی المقدور بلافاصله بعد از سقط یا مرگ از جنین اخذ شود. نمونه ها باید:

- در ظرف های استریل حمل و نگهداری شوند
- همانند آنچه در مورد جفت گفته شد، در محیط های انتقال اختصاصی بر حسب عامل مورد نظر حمل شوند
- در ظروف شیشه ای با حجم 10 برابر فرمالین 10٪ برای آزمایشات هیستوپاتولوژی حمل شوند
- زمانی که زیاد اتولیز نشده باشد باید مغز به صورت کامل از جنین جدا و ارسال شود

مایعاتی که باید از جنین سقط شده اخذ شود:

محتویات معده ها خصوصاً شیردان، خون قلب، مایعات حفره بطنی و قفسه سینه در صورتی که جنین اتولیز نشده باشد، می توانند به عنوان نمونه اخذ شوند. این مایعات می بایست بلافاصله و در کمترین زمان بعد از سقط به صورت استریل اخذ شوند.

شیر:

نمونه شیر یا آغوز باید از همه کارتیه ها در ظرف های استریل اخذ شود. لازم است قبل از نمونه گیری، کارتیه ها ضدعفونی شوند، چند دوشش اولیه دور ریخته شده و از دوشش های بعدی نمونه مورد نظر اخذ شود. این نمونه ها میتوانند جهت تشخیص پادتن یا پادگن مورد نظر مفید باشد. نمونه های شیر را نباید منجمد یا گرم کرد، همچنین این نمونه ها نباید در معرض تکان شدید قرار گیرند. در صورت ضرورت می توان جهت انجام آزمون های باکتری شناسی، شیر را منجمد نمود.

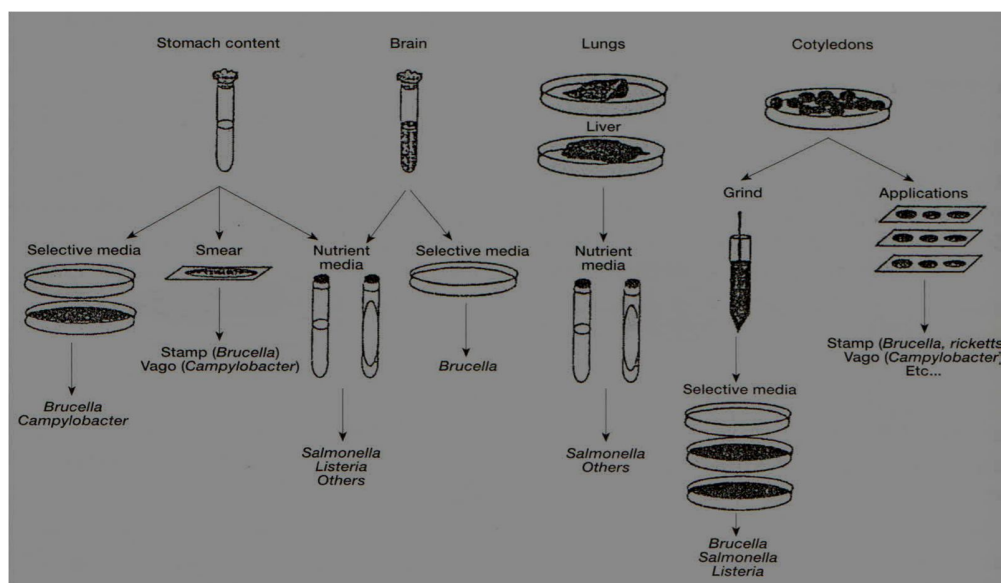
خون:

نمونه خون از دام های سقط کرده در زمان سقط، بهترین نمونه برای جدا سازی عامل بیماری می باشد. در بیشتر موارد اخذ نمونه خون در پستانداران از ورید اجوف و ورید دمی است، البته از ورید بازویی و پستانی نیز می توان استفاده کرد. برای برداشت نمونه خون، می توان از سرنگ و سوزن یا لوله خلأ و سوزن استفاده کرد. بهتر است پوست محلی که می خواهید نمونه خون را اخذ کنید را تراشیده و با الکل 70٪ ضد عفونی کنید و بگذارید خشک شود. همچنین ممکن است تهیه گسترش ضخیم یا نازک از خون ضرورت یابد.

دو نمونه باید از دام اخذ شود: 1- یک لوله بدون ضد لخته (لوله معمولی) برای جدا شدن سرم از خون و ردیابی پادتن در سرم 2- یک لوله آغشته به هپارین که مانع از لخته شدن خون شود، به منظور جدا سازی میکروارگانیزم عامل.

لازم است از تمام دامهای سقط کرده و حداقل 10٪ دامهای آبستن خونگیری به عمل آمده و پلاک گذاری شوند. دو تا سه هفته بعد باید مجدداً از دامهای قبلی نمونه سرم تهیه گردد تا هر گونه کاهش یا افزایش عیار پادتن در آن سنجیده شود. عیار افزایش یابنده یکی از بهترین شاهد ها برای تشخیص میکروارگانیزم مولد بیماری می باشد.

میزان عیار پادتن ممکن است بسته به میکروارگانیزم مولد بیماری و یا تکنیکی که جهت تشخیص به کار برده می شود، سریعاً کاهش یابد. بنابراین لازم است نمونه های سرم کمتر از گذشت 8 هفته از سقط یا زایمان از دام ها اخذ شود. اگر نمونه ها بعد از این زمان تهیه شود، در موارد بسیاری، قادر به تفریق پادتن های ناشی از یک عفونت مزمن یا مایه کوبی اخیر و یا عفونت اخیر با عامل مولد سقط، نمی باشیم.



تصویر شماره 1- تشخیص مستقیم سقط های عفونی. آنالیز نمونه ها

روش جمع آوری، بسته بندی و ارسال نمونه

جمع آوری نمونه ها:

- 1- خون کامل را در دو لوله فاقد ماده ضد انعقاد و حاوی EDTA جمع آوری کنید. (از سوزنی که به وسیله آن نمونه خون را جمع آوری کرده اید مجدداً استفاده نکنید و آن را دور بیندازید) برای انجام آزمون PCR بهتر است از EDTA استفاده شود.
- 2- جنین را به دقت معاینه کنید تا بتوانید موارد غیر طبیعی را در صورت وجود، مشاهده کنید (این ناهنجاری ها می تواند در اندام ها، سر و... وجود داشته باشد) و در صورت مشاهده موردی، آن را در برگه تاریخچه سقط گزارش کنید. به دقت پوست و بخصوص اطراف سر و پلک را معاینه کنید.
- 3- از یک چاقوی تمیز استفاده کنید. محوطه بطنی و قفسه سینه جنین را باز کنید، به زخمها (بخصوص در کبد و ریه) توجه کنید.
- 4- نمونه های تازه جنین را با روش های زیر جمع آوری کنید:

4-1) پوست: 1/4-1/2 پوست گوش. آن را در یک ویال پلاستیکی با درب غیر قابل نفوذ قرار دهید.

4-2) ریه: در صورت امکان، نمونه ای با ابعاد 2×3 تهیه کنید. آن را در کیسه های نفوذ ناپذیر قرار دهید.

4-3) غده فوق کلیه: غده فوق کلیه را بطور کامل ارسال کنید. آن را در کیسه های نفوذ ناپذیر قرار دهید.

4-4) کلیه: اگر کلیه خیلی بزرگ نیست، آن را بطور کامل ارسال کنید. اگر نه، یک قسمت بزرگ با ابعاد 1×2 کافی است. آن را در کیسه های نفوذ ناپذیر قرار دهید.

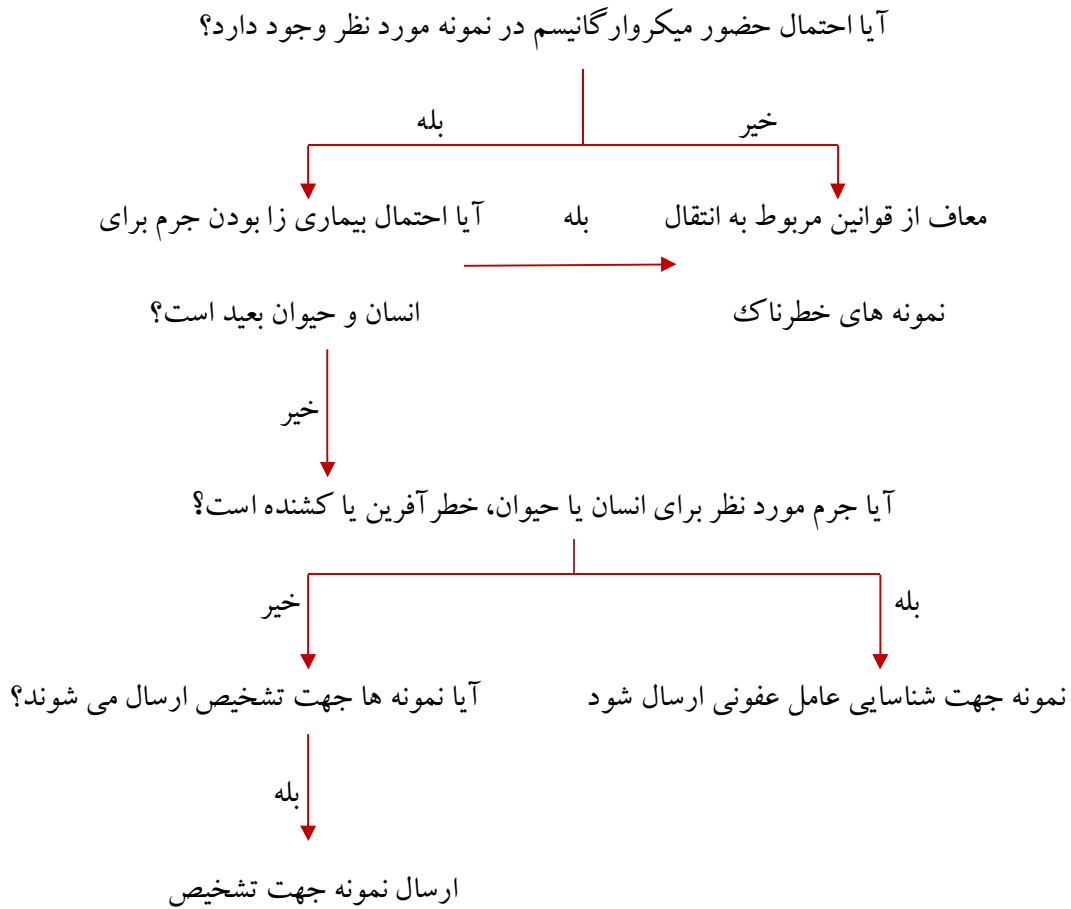
4-5) جفت: نمونه ای با ابعاد 2×3 سانتی متر برداشت کنید (در صورت امکان، برداشت نمونه از قسمتی باشد که در معرض محیط خارج قرار نگرفته باشد). آن را در کیسه های نفوذ ناپذیر قرار دهید.



تصویر شماره 2- ظروف نمونه گیری و بسته بندی آن ها

5- خون قلب را جمع آوری کنید، برای این کار از سرنگ 5 میلی لیتری و سوزن 1/2 in. G1 1/8 استفاده کنید. بهتر است 3-10 میلی لیتر از خون قلب جنین را جمع آوری کنید. گاهی لازم است که بطن چپ را برش دهید و خون را از سطح آن بیرون بکشید (اگر خون در دسترس نباشد می توانید از مایعات جنب و صفاق استفاده کنید). خونی را که جمع آوری کرده اید، در داخل لوله فاقد ضد انعقاد بریزید (سرنگ و سوزن استفاده شده را دور انداخته و آن را مجدداً وارد کیت نکنید).

6- محتویات محوطه بطنی را جمع آوری کنید. با استفاده از سوآب آغشته به الکل، سطح شکم را ضد عفونی کنید. با استفاده از سوزن و سرنگ 5 میلی لیتری، محتویات شیردان را جمع آوری کنید و آن را داخل لوله فاقد ماده ضد انعقاد بریزید (سرنگ و سوزن استفاده شده را دور انداخته و آن را مجدداً وارد کیت نکنید).



نحوه بسته بندی نمونه ها:

لوله های محتوی نمونه خون، محتویات معده و ویال نمونه های پوست را در جایگاه مخصوص خود در داخل کیسه جاذب قرار دهید. سپس آن را بسته بندی کنید و داخل کیسه های نفوذ ناپذیر قرار دهید. کیسه هایی که حاوی بافت های تازه هستند را در یک کیسه ی نفوذ ناپذیر بزرگتر قرار دهید و آن را داخل کیسه نمونه بگذارید. کیسه را طبق دستورالعمل گفته شده بسته بندی کنید. سپس آن را داخل کیسه عایق به همراه دو بسته یخ قرار داده و بسته ها را ارسال کنید.

نمونه های ثابت شده

7- جهت انجام آزمایش های هیستوپاتولوژی، برش هایی به ضخامت 1 cm از هر یک از بافت های زیر تهیه کنید و آنها را در ظرف کوچک محتوی فرمالین قرار دهید.

7-1 جفت (کوتیلودونها از سه ناحیه و هر قسمتی که غیر طبیعی باشد)

7-2 کبد

7-3 ریه

7-4 غده فوق کلیه

7-5 قلب

7-6 تیموس

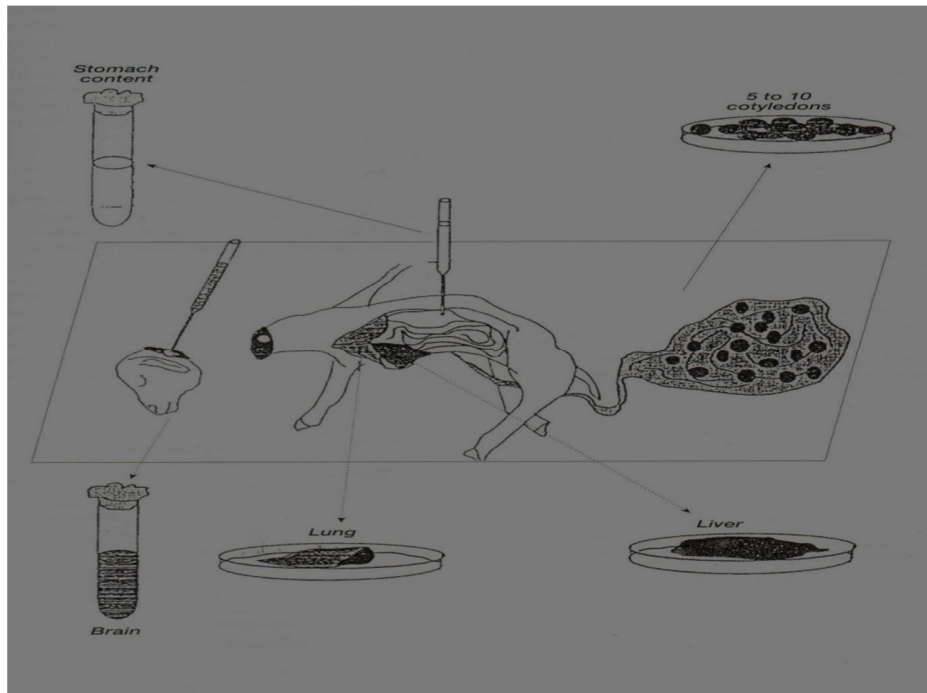
7-7 روده باریک

7-8 کلیه

7-9 پوست

7-10 هر بافت دیگری که احتمال می دهید برای نمونه گیری مناسب باشد

8- کل مغز را خارج کنید، حتی اگر دچار هضم خود به خودی (اتولیز) شده باشد و آن را در ظرف بزرگ فرمالین قرار دهید. بافت انتخابی جهت تشخیص سقط های ناشی از تکه یاخته ها (همچون نئوسپورا) مغز ثابت شده است.



تصویر شماره 3- تشخیص باکتری شناسی سقط عفونی. جمع آوری نمونه ها

بسته بندی و ارسال نمونه ها:

- 1- کیسه عایقی که نمونه ها را در داخل آن قرار داده اید و همینطور کیف حاوی ظروف فرمالین را داخل جعبه کیت قرار دهید.
- 2- برگه عمومی ارسال نمونه و برگه تاریخچه سقط را کامل کنید. سپس فرم ها را داخل کیسه نفوذ ناپذیر بازگردانده و آنها را در قسمت پشتی جعبه قرار دهید.
- 3- جعبه را ببندید و آن را بسته بندی کنید.
- 4- برچسب پستی را در قسمت خارجی جعبه قرار دهید.
- 5- نمونه ها را برای انجام آزمایش ارسال کنید.

فراهم نمودن نمونه های ثابت شده: هر دو شیشه فرمالین را همراه با کاغذ جاذب داخل کیسه نفوذ ناپذیر قرار دهید.

14 روز بعد، دومین نمونه سرم مادری را جمع آوری کنید (فقط از خون نمونه گیری کنید) و آن را بصورت جداگانه ارسال کنید. در برگه ارسال نمونه، باید تأکید شود که نمونه های ارسالی، دومین نمونه سرمی هستند. توجه داشته باشید که نمونه گیری های متوالی، هزینه های اضافی را نیز در بر دارد.

وسایل لازم جهت جمع آوری نمونه ها

1 کیسه عایق

2 بسته منجمد شده

1 کیسه نمونه

2 ظرف پلاستیکی فرمالین (یکی کوچک و یکی بزرگتر)

4 کیسه نفوذ ناپذیر با اندازه متوسط

مواد جاذب (6 کیسه نمک، ورق های کوچک و ورق های بزرگتر)

3 لوله فاقد ماده ضد انعقاد برای جمع آوری خون

1 لوله حاوی EDTA برای جمع آوری خون

1 سوزن برای جمع آوری خون (20 G 1 ½ in.)

1 ویال پلاستیکی با درب اسنپ محتوی بافر فسفات سالین

2 سرنگ 5 سی سی (بدون سوزن)

1 اسکالپل

2 سوآب الک

4 کیسه نفوذ ناپذیر کوچک برای قرار دادن نمونه های ریه، غده فوق کلیه، کلیه و جفت

1 کیسه نفوذ ناپذیر با ابعاد 10×12 (برای نوشتن توضیحات لازم در مورد نمونه ارسالی)



تصویر شماره 4- وسایل لازم جهت جمع آوری نمونه ها

برگه هایی که باید با نمونه ارسالی، جهت توضیحات لازم همراه باشد

برگه عمومی ارسال نمونه

برگه دستورالعمل

برگه اخذ سابقه سقط / مشکلات تولید مثلی

جمع آوری، بسته بندی و انتقال نمونه های ویروسی به آزمایشگاه

نمونه گیری بایستی از محل مناسب و در زمان مناسبی انجام شود. بهترین زمان نمونه گیری، تا حد ممکن بلافاصله پس از بروز علائم درمانگاهی بیماری است یعنی زمانی که بالاترین میزان جرم در بدن موجود است. گاهی چند روز پس از شروع علائم، این دوره به سرعت تمام می شود. در صورتیکه چند روز یا چند هفته پس از مصرف آنتی بیوتیک، درمان به شکست منتهی شده باشد نمونه گیری بی فایده خواهد بود.

محل نمونه گیری بستگی به علائم درمانگاهی و بیماری زایی جرم دارد. پس از جمع آوری، نمونه ها را برچسب زده و همراه با نوشتن تاریخچه ای از تشخیص اولیه، به آزمایشگاه ارسال می کنند. در مناطقی که هوا معتدل بوده و زمان ارسال نمونه ها به آزمایشگاه کمتر از یک روز طول می کشد، معمولاً از جعبه های چوب پنبه ای همراه با یخ (4 درجه سانتی گراد) استفاده می شود. اگر هوا گرم بوده و زمان رسیدن نمونه به آزمایشگاه بیش از یک روز طول

می کشد، می توان از یخ خشک (70- درجه سانتی گراد) استفاده کرد با این حال بهتر است در هنگام ارسال، جعبه حاوی نمونه را توسط یخ مرطوب دوباره پر کرد. در صورت مشکوک بودن به جرم های غیر بومی و یا جرم های عامل بیماری مشترک در نمونه های ارسالی، باید جعبه های چوب پنبه حاوی نمونه را در مخازن دو جداره محکم به همراه پوشال جاذب قرار داد.

تشخیص غیر مستقیم

تشخیص سرم شناسی، هم برای تأیید نتایج حاصل از تشخیص مستقیم و هم به عنوان یک روش مستقل جهت تشخیص علت سقط، مورد استفاده قرار می گیرد. روش های سرم شناسی، پادتن هایی را شناسایی می کنند که در پاسخ به عامل اصلی مسبب سقط، ترشح شده اند.

قاعده کلی آزمایش

تشخیص سرم شناسی سقط های عفونی، یک تشخیص مقایسه ای در سطح گله است. برای مثال در نواحی مدیترانه ای، آزمایش های همزمان برای تشخیص بروسلوز، سالمونلوز، کلامیدیوز و تب Q انجام می گیرد. سایر روش ها فقط در صورتی که آزمون های اولیه منفی شده باشند و یا برای تشخیص منبع عفونت انجام می شود.

روش انتخابی مورد استفاده بستگی به نوع عامل عفونی، امکان انجام آزمایش مورد نظر در آزمایشگاه و قوانین منطقه ای در مورد حمل ارگانیسم های واگیردار دارد. روش های قدیمی همچون آگلوتیناسیون سرم، ثبوت عامل مکمل یا ایمونوفلوئورسنت توسط OIE توصیه شده است که به طور معمول در تشخیص سرمی سقط ها، نتایج رضایت بخشی می دهند.

انتظاری که از یک آزمون می رود این است که نتایج را به صورت کمی در اختیار قرار دهد. در مناطقی که عفونت های متعدد رخ می دهد، تنها روش مؤثر جهت تشخیص تفریقی بین دام واکسینه، عفونت نهفته و عفونتی که باعث سقط شده است، روش سرم شناسی می باشد. وقوع متناوب سقط و کاهش تولید در دام آلوده، باعث افزایش کلی در میزان تولید پادتن های سرم می شود و به این وسیله باعث ایجاد پاسخ یادآور می گردد. باید با مقایسه نتایج آزمون هایی که با استفاده از آنتی ژن های مختلف به دست آمده است، تفسیر نهایی را انجام داد.

تفسیر نتایج و محدودیت ها

برای تفسیر نتایج سرم شناسی، جزئیات مربوط به آزمایش های انجام شده و نتایجی که به صورت عیار یا عوامل رقت سرم آزمایش شده بدست آمده است، باید در گزارش موجود باشد. (جدول 1) با توجه به ضوابط به تصویب رسیده، نتایج تحلیل ها می تواند در دو سطح تفسیر شوند:

1- برای تشخیص سرمی سقط عفونی، چنانچه نمونه ها کمتر از 8 هفته بعد از سقط تهیه شوند:

ارگانیسمی که حداکثر میزان ترشح آنتی بادی علیه آن، از حد آستانه در آزمایش بیشتر باشد، به احتمال زیاد عامل سقط در دامها است.

2- با تفسیر نتایج به دست آمده از بررسی های سرو اپیدمیولوژیک، می توان به حضور عفونت در گله پی برد:

زمانی که سطح پایدار آنتی بادی بیشتر از حد آستانه باشد، می توان گفت گله دارای عفونت نهفته بوده و یا اینکه اخیراً واکسینه شده است. هنگامی که نتیجه تمامی سرم های آزمایش شده زیر حد آستانه باشد، می توان گفت در این گله هیچ تماسی بین دام و عامل عفونی وجود نداشته است.

به عنوان مثال در جدول 1 ممکن است علت سقط ها در گله سالمونلا بوده و گله مبتلا به شکل پنهان عفونت با کلامیدیا و تب کیو باشد. همچنین می توان گفت که گله هیچ گونه آلودگی با بروسلا و توکسوپلازما نداشته است. (عدم وجود عفونت در گله را فقط در صورتی می توان تأیید کرد که هر دو آزمایش در تمامی دامها انجام گیرد)

جدول شماره 1- مثالی از گزارش تشخیص سرمی سقط های عفونی

سرم	بروسلوز (1)	کلامیدیوز (1)	تب کیو (1)	سالمونلوز (2)	توکسوپلاسموز (3)
1	0	1/10	0	1/160	0
2	0	1/20	0	1/1280	0
3	0	1/10	1/5	1/5120	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	1/10	1/10240	0
6	0	1/20	1/10	1/640	0
7	0	1/10	0	1/1280	0
8	0	0	0	1/2560	0
9	0	0	1/20	1/2560	0
10	0	1/40	0	1/640	0

3: الایزا

2: آزمایش سروآگلوتیناسیون

1: آزمایش ثبوت عامل مکمل

جدول شماره 2- خلاصه مقایسه ای روش های تشخیصی سقط های عفونی

سقط های عفونی	تشخیص مستقیم	
	آزمایش مستقیم	کشت
بروسلوز	+	+
سالمونلوز	-	+
لیستریوز	-	+
کمپیلوباکتریوز	+	+
کلامیدیوز	+	(+) ^c
تب کیو	+	(+) ^c
لپتوسپروز	+	
سایر عوامل باکتریایی	-	+
توکسوپلاسموز	(+) ^b	-
بیماری های ویروسی	-	(+) ^c

(a): آزمون تائیدی متعاقب تشخیص اولیه منبع عفونت

(b): روش های ایمونوآنزیماتیک یا ایمونوهیستولوژیک

(c): روش های حساسیت کشت سلولی یا ایمونوآنزیماتیک

(d): خنثی سازی سرم در کشت های سلولی حساس

اگر اندازه سر تا دم جنین 10 سانتی متر یا کمتر باشد بهتر است آن را به صورت دست نخورده، همراه با جفت ارسال کنید.

تعیین سن جنین بر اساس اندازه سر تا دم (crown-rump length)

سن جنین $y =$ اندازه سر تا دم جنین $X =$

سن جنین در گاو: $y = 2.5 (x + 21)$

سن جنین در گوسفند: $y = 2.1 (x + 17)$

اگر اندازه سر تا دم جنین بزرگتر از 10 سانتی متر بود، با توجه به توضیحات این نوشته عمل کنید.

برای نمونه برداری چاقوی تیز برای برش های اصلی و دو سوزن مورد نیاز است ($G1 \frac{1}{2} \text{ in.}$). باید تا جایی که می توانید نمونه های مناسب را جمع آوری کنید. نمونه سرم مادری (لوله لخته) و نمونه خون کامل (لوله حاوی EDTA) را باید از همه دامهای مبتلا و در صورت امکان از دامهای سالم نیز اخذ شود. توجه داشته باشید که نمونه های بافتی باید تازه باشند و نباید آن ها را در محیط کشت به آزمایشگاه ارسال کرد، با این کار می توانیم ارگانسیم های بیشتری را کشت دهیم. در این حالت، چون نمونه ها در محیط کشت انتقالی نیستند، باید آنها را به سرعت سرد کرد و در کوتاه ترین زمان ممکن همراه با بسته یخ به آزمایشگاه (مراکز تشخیصی بهداشت دام) ارسال نمود.

جدول شماره 3- نمونه های لازم جهت جمع آوری و آزمایش های مربوط به آن ها

نمونه ها	آزمایش های انجام شده
بافت های تازه	
جفت، ریه	کشت هوازی
محتویات شیردان	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی لپتوسپیرا
	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی کمپیلوباکتر جنین
ریه، کلیه، فوق کلیه و جفت	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی ترکیبی برای BVD
	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی ترکیبی برای IBR
	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی کلأمیدیا (شتر و نشخوارکننده کوچک)
	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی توکسوپلاسما (شتر و نشخوارکننده کوچک)
	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی EHV-1 (شتر)
	اگر در اخذ سابقه مشخص شد که در گله مشکلی وجود دارد، از آزمایش فلئورسنت آنتی بادی به جای جداسازی ویروس استفاده می شود.
	آزمایش آنزیم مبدل آنژیوتانسین برای شناسای BVD
پوست	
خون قلب	آزمون خنثی سازی سرم برای شناسایی BVD
	آزمایش فلئورسنت آنتی بادی غیر مستقیم Neospora
بافتهای ثابت شده	
جفت، کبد، ریه، مغز، فوق کلیه، قلب، تیموس، روده	هیستوپاتولوژی

	باریک، کلیه، و پوست جنین
ایمونوپراکسیداز برای نئوسپورا (اگر در آزمایش های هیستوپاتولوژی، نئوسپورا شناسایی شد)	مغز
لپتوسپیرا (5 سروتیپ)	سرم مادری
بروسلوز - تست سریع رزبنگال	
آزمون خنثی سازی سرم برای شناسایی BVD	
آزمایش الایزا برای شناسایی IBR	
آزمایش فلوئورسنت آنتی بادی غیر مستقیم برای شناسایی نئوسپورا	
آزمایش MAT برای توکسوپلازما گوندی	نمونه خون مادری حاوی EDTA
سلنیم	

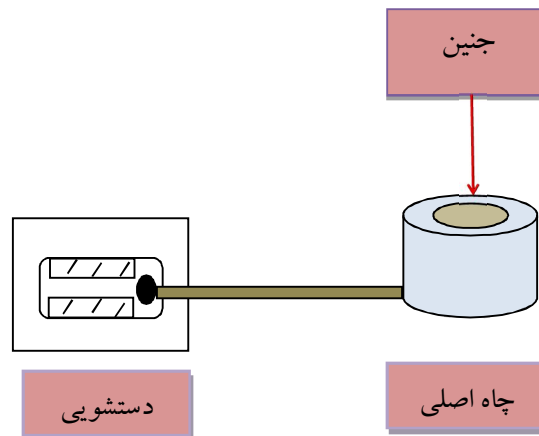
روش صحیح دفن جنین های سقط شده

دفن عمیق و صحیح جنین های سقط شده نکته مهمی است که لازم است به دامداران آموزش داده شود. عدم استفاده از جنین های سقط شده در تغذیه سگ های گله یکی از راه های جلوگیری از گسترش عفونت در منطقه می باشد. متأسفانه در شرایط گله های ایران، عمده جنین های سقط شده توسط دامدار برای تغذیه سگ های گله مورد استفاده قرار می گیرد که به لحاظ انتقال مکانیکی و بیولوژیک عوامل مختلف سقط، توسط سگ ها در روستا و مراتع اطراف حائز اهمیت می باشد. این نکته اهمیت دفن سریع و بهداشتی جفت و جنین های سقط شده را روشن می سازد. زمانی که این نکته به دامداران گوشزد می شود، اعلام می دارند در مواردی که اقدام به دفن جنین ها کرده اند، سگها آن را از زیر خاک بیرون آورده و می خورند.



تصویر شماره 5- موردی از تغذیه سگ های گله از جنین های سقط شده. استان سمنان، 1390

با توجه به اینکه سوزاندن یا دفن کردن جنین ها کار سختی برای دامدار می باشد، بهترین توصیه برای از بین بردن جنین های سقط شده در این شرایط، انداختن آنها در چاه های توالت روستا می باشد، چرا که سوراخی برای خروج گازهای مخزن فاضلاب توالت تعبیه شده است که می توان از این طریق، چاه ها را به مدفن خوبی برای اینگونه موارد تبدیل کرد. باید دقت داشت که جنین ها و مواد دفعی سقط ها را درون چاه فاضلاب بیرون از توالت انداختن نه درون سنگ توالت که باعث گرفتگی دستشویی ها گردد.



نقش آموزش دامداران در کنترل بیماری

احتیاج زیادی به افزایش کارآمدی برنامه های کنترل سقط جنین آنزوتوتیک میس ها وجود دارد که اینها شامل افزایش توان تشخیصی، پیشگیری و مدیریت بهداشتی گله ها می باشد. یکی از اصول اولیه در مدیریت بهداشتی گله ها، سطح سواد دامداران و همچنین آموزشهای مداومی است که به آنها در زمانهای مختلف، می بایست به صورت مستمر ارائه شود.

از مشکلات عمده در بین گوسفند داران، آگاهی پائین نسبت به امور مرتبط با بهداشت و تولید مثل دام ها می باشد. مطالعه چیدری و همکاران در سال 2001 در بین جمعیت عشایر استان چهارمحال و بختیاری حاوی نکات بسیار جالبی در ارتباط با شیوه آموزشهای ترویجی به عشایر و همچنین نیازهای اصلی آنها از زبان خودشان بود. طبق این مطالعه عمده نیازهای آموزشی عشایر به شرح زیر اعلام گردید:

- شیوه صحیح تغذیه و چرا در مرتع (مرتع داری و حفظ آن)
- مسائل و مشکلات تولید مثلی
- بیماریهای دامی
- واکسیناسیون، نحوه تزریقات و کاربرد و جایگاه مصرف داروهای مختلف
- در ارتباط با مسائل و مشکلات تولید مثلی گله های گوسفند و بز، مسائل زیر با اولویت بیشتری مطرح گردیده است:
- داروهای موثر برای ضد عفونی بند ناف نوزادان
- نحوه ضد عفونی کردن بند ناف
- مراقبت های دوران آبستنی، زایمان و پس از زایمان
- تغذیه زمان آبستنی و شیرواری

- کمک به سخت زایی ها

- نسبت مناسب قوچ به میش یا بز نر به ماده بز در گله

- سن و فصل مناسب تولید مثل

همچنین روش آموزش چهره به چهره و حضور مستمر به عنوان بهترین روش برای انتقال این مفاهیم عنوان شده است. نکته بسیار جالب در این مطالعه آن است که تمایل به یادگیری از طریق دامپزشکان بیشترین درصد را به خود اختصاص داده بود.

نتایج این مطالعه اهمیت فراوان آموزشهای ترویجی مناسب به دامداران را به اثبات می رساند چنانکه نگارنده خود شاهد است که بسیاری دامداران از اصول اولیه مبارزه با بیماریها و مراقبت های بهداشتی به اطلاع بوده و هنوز به شیوه ای کاملاً بدوی اقدام به دامداری می نمودند.

مسئله وجود دائمی قوچ و بز نر در گله، یکی از مسائل اساسی است که می بایست نسبت به آموزش آن به دامداران اقدام گردد. این امر باعث به وجود آمدن مشکلات زیادی در امر مدیریت بیماری های گله شده است چرا که با این ترتیب در دوره زمانی طولانی مدتی در سال، زایمان در گله وجود دارد و امکان اعمال مراقبت های بهداشتی و قرنطینه ای از بین می رود.

با توجه به گستردگی گله های گوسفند و بز در مراتع و دسترسی پائین آنها به خدمات دامپزشکی (غیر از توزیع سم و واکسیناسیون) لازم است موارد مورد نیاز آنها به صورت صحیح آموزش داده شود.

طبق نتایج آمارگیری از دامداری های کشور در سال 1387 شمسی، 46/5 درصد از بهره برداران دارای فعالیت دامداری، باسواد و 53/5 درصد آنان بی سواد بوده اند. این نکته اهمیت دو چندان برنامه های ترویجی را در ارتباط با دامداران به اثبات می رساند. دامداران با سواد نیازمند آموزشهای مختلف در رابطه با بهداشت و تغذیه گله می باشند و در این میان، توجه و آموزش دامداران بی سواد نکته ای است که می بایست به صورت خاص مورد توجه قرار گیرد. وجود خرافات و اعتقادات بی پایه بسیار در میان گوسفند داران بیشتر از دیگر دامداران می باشد.

نکته جالبی در ارتباط با آموزشهای ترویجی وجود دارد که بر طبق اعلام رسمی وزارت جهاد کشاورزی بیان می شود: در سال 1388 در مجموع به 13336 نفر از بهره برداران بخش کشاورزی و دامداری آموزش ترویجی ارائه شده است.

از 362 عنوان دوره آموزشی برگزار شده در کل کشور طی سال 1388 تنها 20 عنوان به مسائل مرتبط با دامپزشکی اختصاص یافته است که شامل موارد زیر می باشد:

فارماکولوژی دامپزشکی، ارتقاء سطح مهارت متصدیان مراکز جمع آوری شیر، بهداشت شیر و سلامتی، تولید مرغ بدون آنتی بیوتیک، بهبود کیفیت شیر، گوسفند داری در شرایط خشکسالی و مدیریت پیشگیری و مبارزه با بیماری های دامی.

حجم بالایی از مخاطبان معاونت ترویج وزارت جهاد کشاورزی، دامداران و افرادی هستند که به طرق مختلف با دام سرو کار دارند که اگر با احتساب تکرار برخی سرفصل های بالا در استانهای مختلف بخواهیم سهم آموزش های دامپزشکی به دامداران را محاسبه کنیم عدد 5/5٪ به دست می آید. این نکته بدان معنی است که تنها 5/5 درصد از امکانات ترویجی وزارت جهاد کشاورزی در سال 1388 صرف آموزشهای دامپزشکی گردیده است.

بیشترین سرفصل ترویجی که به دامپزشکی مربوط میشد دوره برگزار شده در استان مازندران با عنوان مدیریت پیشگیری و مبارزه با بیماری های دامی با جمعیت مخاطب 15 نفر بود.

از مجموع 13336 نفری که در این سال آموزش ترویجی دریافت کرده اند تنها 756 نفر (5/6٪) آموزشهای مرتبط با بهداشت دام را دریافت کرده که عمده آن مربوط به استان قزوین با 508 نفر مخاطب در کلاس بهداشت شیر بوده اند.

تعداد بهره برداری های دارای دام در آمارگیری سال 1387 وزارت جهاد کشاورزی نشان می دهد که تعداد 2211660 واحد در کشور وجود دارد که به کار دامداری مشغول می باشند.

به استناد نتایج آخرین سرشماری عشایری در سال 1387، ایلات و عشایر کوچنده نزدیک به 22/5 میلیون رأس و معادل 22/6 میلیون واحد دامی داشته اند. نزدیک به 98 درصد از سرمایه ی دامی عشایر را دامهای سبک تشکیل میدهند که شامل 60/3 درصد گوسفند و بره و 37/1 درصد بز و بزغاله میباشد.

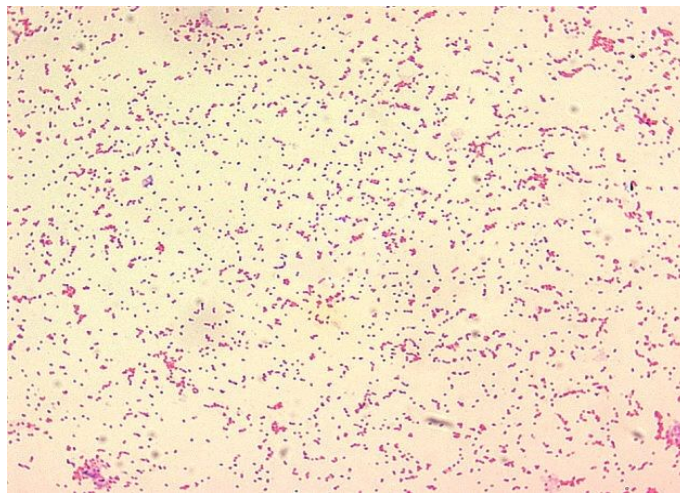
با توجه به این آمار، لازم است اهمیت ویژه ای به آموزشهای دامپزشکی در معاونت ترویج وزارت جهاد کشاورزی داده شود چرا که موارد مختلف و متعددی از نیازها در این بخش در بین دامداران وجود دارد که هیچ گاه به آنها پرداخته نشده است. عمده کار ترویجی ادارات کل دامپزشکی استانها مربوط به چاپ بروشورهای مختلف از بیماری ها می باشد که به دلیل آنکه دامپزشکان از اصول علم ترویج اطلاع چندانی ندارند، عمده این بروشورها به تعریف های کلاسیک بیماری خلاصه می شود و دامداران با سطوح مختلف سواد قادر به استفاده عملی از آنها نیستند.



علل باکتریایی سقط جنین

بروسلوز

بروسلاها اجرام میله ای کوتاه یا کوکوباسیلی هستند که قطر آنها 5/ تا 7/ میکرون و طول آن 1/5 - 6/ می باشد. طول باسیل ها به قدری کوتاه است که امکان دارد با کوکسی اشتباه شوند. این باکتری گرم منفی و غیر اسید فاست است و با رنگ آمیزی ذیل نیلسن اصلاح شده (MZN) به رنگ قرمز دیده می شود. آرایش آنها معمولاً به صورت تکی می باشد ولی زنجیرهای کوتاه نیز ممکن است تشکیل شود. علی رغم اینکه بروسلاها هاگ ندارند، ولی دوام آنها در خارج از بدن زیاد است.



تصویر شماره 6- نمای ریزیینی بروسلا

بیماری بروسلوز در دنیا از نظر ایجاد خسارات اقتصادی در دام و نیز به عنوان یک بیماری مشترک انسان و دام از نظر بهداشتی حائز اهمیت زیادی است. این بیماری در دامهای مختلف از جمله گاو، گاومیش، گوسفند، بز، اسب، شتر، پرندگان، جوندگان و گونه های دیگر اتفاق می افتد. بروسلا ممکن است از راه مخاط بینی، دهان یا حلق وارد بدن شود ولی مخاط تناسلی اهمیت بیشتری دارد. اغلب دامهای آلوده در دوره زندگی به صورت حامل می مانند و جرم را از طریق اکسودای رحمی و شیر، بعد از هر زایمان دفع می کنند. اولین سقط، اغلب در اولین آبستنی است و اگرچه جفت در هر آبستنی آلوده می شود ولی سقط معمولاً اتفاق نمی افتد.

بیماری در گوسفند و بز

بروسلوز گوسفندی با عامل بروسلا ملی تنسیس باعث سقط در دامهای آبستن می گردد. عامل این بیماری به سیستم رتیکولو آندوتلیال، رحم و غده پستانی تمایل دارد. مهم ترین علامت بالینی بروسلوز، سقط جنین در دامهای آبستن است و گاهی باعث تورم اپیدیدیم در قوچ ها می گردد. به دنبال آلودگی گله، امکان وقوع طوفان های سقط وجود دارد. مهم ترین راه انتقال بیماری از طریق گوارش است، اما ممکن است آلودگی از طریق خراش های پوستی و تنفس نیز منتقل شود. باکتری می تواند با ورود به شیر، امکان آلودگی انسان را فراهم کند.

یکی از راههای ساده و سریع در نزدیک شدن به تشخیص عامل سقط، تهیه گسترش مستقیم از محتویات شیردان جنین یا کوتیلودون ها می باشد. این گسترش ها می بایست با روش ذیل نیلسن اصلاح شده (MZN) رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ مشاهده شوند. مشکلی که ممکن است به وجود آید این است که اجرام بروسلا، کوکسیلا بورنتی و کلامیدوفیلا آبورتوس، می توانند با یکدیگر اشتباه گرفته شوند و یا اینکه به لحاظ وجود آلودگی همزمان در گله ها، بیش از یک عامل در مشکل دخالت داشته باشند.

بروسلوز گوسفند و بز در ایران

در سال 1329 وجود بیماری در گوسفندان اطراف اصفهان به اثبات رسید و متعاقب آن اقدامات دامپزشکی در جهت مبارزه با بیماری، منجر به تصویب آئین نامه ریشه کنی بروسلوز دامی توسط هیئت وزیران در سال 1346 گردید. با شناخته شدن بروسلوز دامی در کشور در دهه 20 شمسی و با اعمال روش های مختلف مبارزه با بیماری در پاره ای از مناطق کشور، روش ها و شیوه های متعددی برای کنترل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت تا اینکه برنامه مبارزه با بروسلوز دامی در قالب برنامه پنج ساله توسعه کشاورزی (1362-66) تحت عنوان پروژه ملی کنترل و ریشه کنی بروسلوز دامی در سال 1362 تدوین، تصویب و به اجرا گذاشته شد.

در کشور ما اولین بار بروسلا ملی تنسیس از کشت خون انسان در سال 1311 توسط دکتر کراندل (رئیس وقت انستیتو پاستور ایران) جدا گردید. برای نخستین بار در سال 1327، بروسلا ملی تنسیس از شیر بز توسط دکتر انتصار، در بخش بروسلوز موسسه واکسن و سرم سازی رازی جدا گردید و تولید واکسن REV1 با همکاری سازمان

بهداشت جهانی از سال 1341 در این موسسه آغاز شده و از سال 1342 تاکنون به صورت لیوفیلیزه عرضه می گردد. اولین مایه کوبی جمعیت گوسفند و بز مربوط به سال 1342 بوده است.

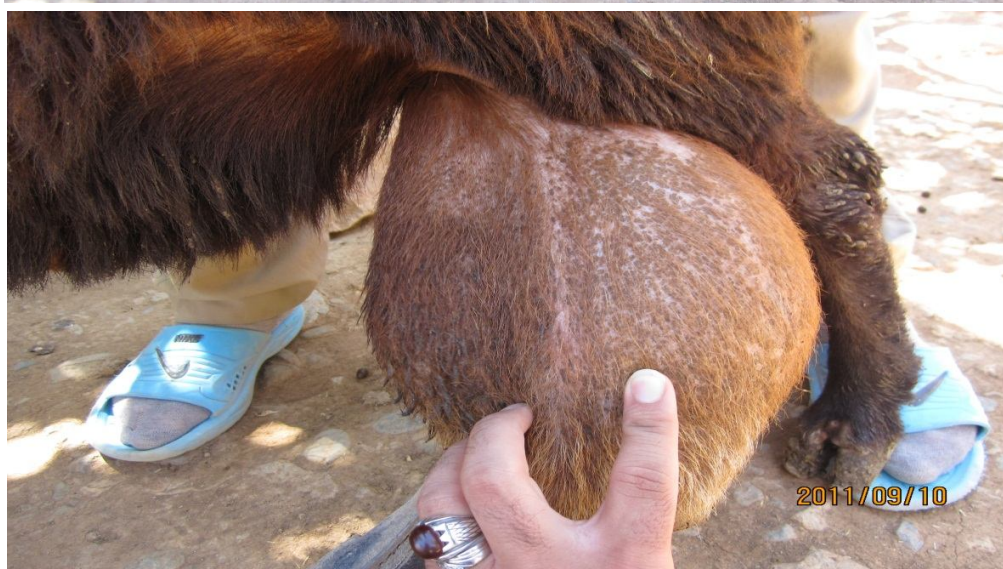
برنامه مبارزه شامل مایه کوبی دام های جوان در کنار آزمایش و کشتار دام های آلوده است. از سال 1342 لغایت 1352، بره و بزغاله های بالای سه ماه تا یک ماه قبل از اولین جفت گیری و همچنین گوسفندان بالغ غیر آبستن از اواخر دوره شیردهی تا یک ماه قبل از جفت گیری همراه با خالکوبی در گوش دام ها بوسیله واکسن دز کامل مایه کوبی می شدند. از سال 1352 مایه کوبی دامهای ماده بالغ به دلیل ایجاد عیار پادتن سرمی و اشکال در تشخیص قطع گردیده و تنها بره ها و بزغاله های ماده بالای 3 ماه تا یک ماه قبل از جفت گیری و همچنین نرهایی که به منظور جفت گیری نگهداری می شوند با واکسن دز کامل (FDRev1 $1-3 \times 10^9$ جرم زنده) به میزان یک میلی لیتر در زیر پوست ناحیه پشت کتف مایه کوبی و به منظور شناسائی، تکه برداری از گوش آنها انجام می شود.

در برنامه آزمایش و کشتار دام های آلوده، گوسفندان و بزهای بالغ، با استفاده از آزمون رزبنگال Rose Bengal Plate Test (RBPT) به لحاظ آلودگی با بروسلا غربالگری شده و دام های دارای واکنش آگلوتیناسیون مشخص، جهت آزمایشات تکمیلی بوسیله آزمایش های رایت Standard Tube Agglutination Test (STAT) و 2- مرکاپتواتانل (2Mercapto Ethanol (2ME) مورد بررسی قرار می گرفتند.

از ابتدای سال 1382 علاوه بر برنامه واکسیناسیون بره و بزغاله، مایه کوبی دام های بالغ با واکسن دز کاهیده Reduce Dose Rev1 ($0/5-2 \times 10^6$ جرم زنده) نیز جزو برنامه قرار گرفت و برنامه آزمایش و کشتار گوسفند و بز با توجه به اینکه کمتر از یک درصد دامهای واجد شرایط را تحت پوشش قرار میداد از برنامه حذف گردید. از آنجا که قدرت ایمنی زایی دز کاهیده Rev1 کوتاهتر بوده، گوسفندان و بزهای بالغ ماده با اولویت مایه کوبی دام های موجود در مناطق پر خطر، بصورت دو سالانه با واکسن دز کاهیده (RDRev1) مایه کوبی و جهت شناسائی بر روی گوش آن ها، پلاک پلاستیکی تکه ای شکل سبز رنگ (مخصوص طرح کنترل بروسلوز) نصب می شود.

علائم کالبد گشایی

در حالت التهاب مزمن جفت، علائمی چون ضخیم شدن و تورم و نکروز فیبرینی در غشای بین کوتیلودونی و فنجانی شدن کوتیلودون ها، مشاهده می گردد. علاوه براین نکروز کوتیلودون ها و التهاب چرکی نیز ممکن است رخ دهد، که این حالت به دنبال آلودگی جنین در اثر باکتری می یا خوردن مایع آمنیوتیک رخ می دهد.



تصاویر 7 - تصویر اورکیت یک طرفه بروسلائی در یک راس قوچ، کردستان 1390

جدول شماره 4 – نمونه های پیشنهادی برای انجام آزمون های باکتری شناسی در بروسلوز

شرایط نگهداری و حمل نمونه	زمان نمونه گیری	نمونه های پیشنهادی	
تمام نمونه ها می بایست در بسته بندی غیر قابل نشت و در دمای یخچال نگهداری شوند برای آزمایش تا 2 روز.	ترجیحاً در خلال 15 روز بعد از سقط یا زایمان	✓ سوآب واژن ✓ سرم ✓ شیر (حدود 20 سی سی از هر کارتیه)	دام زنده
	بسته به شرایط دمایی محیط، بین 1-2 روز	✓ گره لمفاوی (پشت حلقی، تحت فکی و عقب پستانی) ✓ رحم ✓ کبد ✓ بافت پستان	دام مرده
	هر چه سریعتر بعد از سقط (در شرایط مناسب دمایی تا 1 روز)	✓ مایعات شیردان و پیش معده ✓ کبد ✓ ریه	جنین سقط شده

کنترل و درمان

سیاست کنترل بروسلوز در مناطقی که شیوع آن کم است تست و کشتار می باشد اما در مناطقی که بیماری شیوع بالایی دارد، قبل از تست و کشتار لازم است دامها با واکسن زنده Rev.1 واکسینه شوند.

روش مایه کوبی دامهای جوان جایگزین با استفاده از دز کامل، بر این فرضیه استوار است که این واکسن منجر به ایجاد یک ایمنی مادام العمر در دام می شود و بعد از اجرای این پروتکل برای مدت 5-7 سال که برابر با عمر

اقتصادی گوسفند و بز است، همه جمعیت مایه کوبی شده و ایمنی کاملی در برابر بروسلوز در تمام جمعیت دامی کشور ایجاد گردیده است. این روش هر چند باعث به وجود آمدن ایمنی خوب و بادوام در دام ها میگردد اما وجود طولانی مدت آنتی بادی در آنها، موجب تداخل در برنامه مایه کوبی همراه با آزمایش و کشتار میگردد.

نکته مهمی که باید مد نظر قرار گیرد آن است که آزمون های سرم شناسی تشخیص بروسلا در حدود 2-3 هفته قبل و بعد از سقط و زایمان ممکن است نتایج منفی کاذب داشته باشند. این امر باید به دقت مورد توجه قرار گیرد چرا که معمولاً بعد از شکایت دامدار از وقوع سقط جنین به آن گله ها مراجعه شده و خونگیری به عمل می آید که با توجه به مورد فوق، لازم است تفسیر نتایج منفی آزمون رزبنگال در خلال 2-3 هفته قبل و بعد از سقط و زایمان با احتیاط صورت گیرد. لازم است دامهای مشخص شده برای کشتار به درستی شناسایی شوند و از ارسال دام ها به کشتارگاه مطمئن شویم زیرا در برخی موارد خروج این دامها از گله به صورت غیر مجاز انجام شده و به عنوان دام های سالم در مناطق دیگر به فروش می رسند.

یکی از چالش هایی که به صورت کلی در ارتباط با تشخیص گوسفند و بزهای آلوده وجود دارد این است که می بایست محدودیت اعتبار آزمایش های تشخیصی در شناسایی تمامی گوسفندان آلوده و یا نتایج منفی کاذب در اثر دوره کمون، نهفتگی و ضوابط تفسیر نتایج آزمایشگاهی مورد توجه قرار گیرد. آزمایش های سرم شناسی رایج مثل رزبنگال و تثبیت عامل مکمل در گوسفند و بز که با بروسلا ملی تنسیس آلوده شده اند دارای حساسیت کمتری نسبت به گاوهای آلوده به بروسلا آبورتوس هستند، از این رو تعداد گوسفندان آلوده به ملی تنسیس که در این آزمایش ها مشخص نمی شوند بیشتر است.

رزبنگال اصلاح شده: استفاده 3 برابر سرم نسبت به آنتی ژن که با این روش شاهد افزایش معنا دار حساسیت آزمون، بدون کاهش ویژگی آن می شویم و بر طبق توصیه سازمان جهانی بهداشت دام، این روش در گوسفند و بز مطمئن تر می باشد.

درمانی در ارتباط با بروسلوز در دام ها صورت نمی گیرد. در مواردی که لازم است می بایست از دام ها خونگیری به عمل آید و بر طبق پروتکل اجرایی، موارد آلوده شناسایی و کشتار شوند.

بروسلا آبورتوس

وضعیت بروسلوز گاوی در ایران

برای اولین بار در ایران بروسلا آبورتوس توسط دکتر دلپی و دکتر کاوه در سال 1323 از جنین سقط شده گاو، به دنبال مطالعه ای بر روی گاوهای شیری استان تهران در بخش بروسلوز موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی جدا گردید و از سال 1328 اولین مایه کوبی علیه این بیماری در تعدادی از گاوداری های ایران آغاز گردید. اولین آئین نامه ریشه کنی بروسلوز دامی توسط هیئت وزیران مربوط به سال 1346 بوده است.

طبق اعلام سازمان دامپزشکی کشور میزان شیوع بروسلوز در جمعیت گاوهای روستایی کشور در سال 73 و 82 به ترتیب 1/16 و 1/3 درصد بوده است. همچنین میزان شیوع بروسلوز در جمعیت گاو داری های صنعتی و نیمه صنعتی در سال 73 و 82 به ترتیب 0/59 و 0/3 درصد تعیین گردیده است.

شناسایی جرم: بررسی ویژگی های ظاهری جرم می تواند شواهدی را مبنی بر وجود بروسلا در اختیار ما قرار دهد. برای این منظور از رنگ آمیزی اسیدفاست اصلاح شده و بررسی ساختار بروسلا در نمونه های تهیه شده از جنین سقط شده یا ترشحات واژن (بخصوص زمانی که همراه با آزمایش های سرم شناسی باشد) استفاده می شود. PCR نیز روشی دیگر برای تشخیص باکتری است. لازم است گونه های بروسلا را جداسازی کنیم. برای این کار، از نمونه های تهیه شده شامل ترشحات رحمی، جنین های سقط شده، ترشحات پستان و همینطور بافت هایی چون گره های لمفاوی و اندام های تناسلی جنس نر و ماده، در محیط های ساده یا انتخابی کشت می دهیم. گونه ها و بیووار های بروسلا توسط روش های لیز فاز، کشت، سرم شناسی و بیوشیمیایی شناسایی می شوند. PCR در عین اینکه یک روش مکمل است، می تواند بیوتیپ باکتری را بر اساس توالی های ژنومی اختصاصی شناسایی کند.

الف) روش های رنگ آمیزی: بروسلا ها اجرام کوکوباسیل یا میله ای کوتاه هستند و اندازه آن ها $1/5\mu m$ - $0/6\mu m$ طول و $0/7\mu m$ - $0/5\mu m$ عرض می باشد. این باکتری ها معمولاً به صورت منفرد مشاهده می شوند اما گاهی نیز به صورت دوتایی یا در گروه های کوچک قرار می گیرند. ساختار بروسلا ها معمولاً ثابت است، به جز در کشت های قدیمی که به صورت اجرام چند شکلی مشاهده می گردند. بروسلا غیر متحرک و فاقد هاگ می باشد. همچنین این

باکتری فاقد تاژک، مژه یا کپسول حقیقی است. بروسلا گرم منفی بوده و با رنگ آمیزی دو قطبی رنگ نمی شود. این اجرام به طور حقیقی اسید فاست نمی باشند، اما نسبت به رنگ زدایی توسط اسید های ضعیف مقاوم هستند. بنابراین با روش اصلاح شده استامپ زیل نیلسون، به رنگ قرمز مشاهده می شوند. این یک روش معمول برای بررسی گسترش های تهیه شده از اندام ها یا مایعات بیولوژیک است که قبلاً با استفاده از حرارت یا اتانول ثابت شده اند. در این روش بروسلا ها به صورت اجرام قرمز در زمینه ای آبی مشاهده می شوند. می توان از روش فلوکروم یا پراکسیداز نشاندار که بر اساس آنتی بادی متصل شده (کونژوگه) می باشد نیز، استفاده نمود.

حضور ارگانسیم های داخل سلولی و اسید فاست ضعیف، با ویژگی های ساختاری بروسلا یا ارگانسیم هایی که با روش اختصاصی ایمنی رنگ آمیزی شده اند، احتمالاً نشاندهنده بروسلوز است. با این وجود، این روش در مورد نمونه های شیر و محصولات لبنی که حاوی تعداد کم تری بروسلا است، حساسیت پایینی دارد. همچنین تفسیر نتایج به دلیل حضور گلبول های چربی دشوار می باشد. در تفسیر نتایج مثبت، باید دقت لازم را به عمل آورد، زیرا سایر ارگانسیم هایی که باعث سقط می شوند مانند کلامیدوفیلا آبورتوس یا کوکسیلا بورنتی، مشابه بروسلا بوده و تفریق آن ها مشکل می باشد. نتایج حاصل چه مثبت باشند و چه منفی باید با کشت تأیید گردند. روش پروب های DNA یا PCR برای تشخیص جرم در نمونه های بیولوژیک مختلف نیز، قابل استفاده می باشد.

ب) کشت

1) محیط کشت پایه: جدا سازی مستقیم و کشت بروسلا که به طور معمول در محیط جامد صورت می گیرد، بهترین روش مورد استفاده است، چراکه کولونی ها را قادر به جدا سازی می کند و در نتیجه اجرام به خوبی قابل شناسایی می شوند. این محیط تشکیل موتانت های غیر صاف را محدود کرده و از آلودگی بیش از اندازه جلوگیری می کند. به هر حال گاهی ممکن است به منظور غنی سازی و یا برای نمونه های حجمی، استفاده از محیط کشت مایع توصیه گردد. طیف وسیعی از محیط های پایه دهیدراته به صورت تجاری در دسترس می باشد، مانند محیط پایه بروسلا، آگار تریپتوز (یا تریپتیکاز) - سویا (TSA). برای رشد سویه هایی چون بروسلا آبورتوس بیووار 2، افزودن 2-5٪ سرم گاو یا اسب ضروری است، به طوری که بسیاری از آزمایشگاه ها سرم را به محیط کشت پایه اضافه می کنند. از جمله اضافه کردن به محیط پایه بلاد آگار (اکسئید) یا آگار کلومبیا (Biomérieux) که نتایج بسیار خوبی را در اختیار قرار میدهند.

می توان از سایر محیط های مناسب مانند آگار سرم دکستروز (SDA) یا آگار دکستروز گلیسرول نیز استفاده نمود. SDA محیط مناسب تری جهت بررسی ساختار کلونی ها می باشد. استفاده از محیط دو فازی غیر انتخابی به نام محیط Castañeda's برای جدا سازی بروسلا از خون و سایر مایعات بدن مانند شیر توصیه می شود. علت استفاده از محیط Castañeda's این است که بروسلا تمایل دارد که در محیط براث جدا شود و این امر با تعیین بیوتیپ ها با روش های معمول باکتری شناسی تداخل می نماید.

2) محیط انتخابی: تمام محیط های پایه ای که در مطالب فوق به آن ها اشاره شد، می توانند برای تهیه محیط انتخابی مورد استفاده قرار گیرند. لازم است آنتی بیوتیک های مناسب جهت جلوگیری از رشد سایر ارگانسیم ها اضافه شوند. بیشترین محیط انتخابی مورد استفاده، محیط Farrell's می باشد که با اضافه کردن 6 آنتی بیوتیک به محیط کشت پایه به دست می آید. مقادیر زیر به یک لیتر آب اضافه می شوند:

پلی میکسین B سولفات (5000 واحد = 5 میلی گرم)، باسیتراسین (25,000 واحد = 25 میلی گرم)، ناتامایسین (50 میلی گرم)، نالیدیکسیک اسید (5 میلی گرم)، نیتاتین (100,000 واحد)، ونکومایسین (20 میلی گرم)

مکمل آنتی بیوتیک با یخ خشک به صورت تجاری موجود می باشد (اکسوئید). به هر حال نالیدیکسیک اسید و باسیتراسین در غلظت هایی که در محیط Farrell's استفاده می شوند اثرات مهاری بر روی برخی از سویه های بروسلا آبورئوس و بروسلا ملی تنسیس دارند. بنابراین، حساسیت کشت را با استفاده همزمان از Farrell's و محیط Thayer-Martin اصلاح شده، به میزان قابل توجهی افزایش می دهند.

به طور خلاصه، محیط Thayer-Martin اصلاح شده توسط محیط پایه GC تهیه شده (38 gr/lit در آزمایشگاه Biolife، میلان، ایتالیا) و با هموگلوبین (10 gr/lit، Difco)، کولیستین متان سولفونات (mg/lit 7/5)، ونکومایسین (3 mg/lit)، نیتروفورانتیون (10 mg/lit)، نیتاتین (100,000 واحد بین المللی در لیتر = mg 17/5) و آمفوتریسین B (2/5 mg/lit) غنی می شود. **بر خلاف بیووار های متعدد بروسلا آبورئوس، برای رشد بروسلا ملی تنسیس احتیاجی به اتمسفر کربن دی اکسید 5-10٪ نمی باشد.**

از آنجا که امکان دارد تعداد بروسلا ها در نمونه های شیر، آغوز و برخی نمونه های بافتی کم تر از نمونه های تهیه شده از مواد سقطی باشد، توصیه می شود که محیط های کشت غنی شوند. در مورد نمونه های شیر، استفاده از

سانتریفوژ و کشت از خامه و پلت نتایج بهتری را در اختیار ما قرار می دهد، اما در این موارد برای جلوگیری از آلودگی آئروسول ها رعایت اصول ایمنی ضروری می باشد. غنی کردن می تواند در محیط مایعی صورت گیرد که حاوی براث سرم دکستروز، براث تریپتوز (یا تریپتیکاز) - سویا (TSA) یا براث بروسلا (که با مخلوط آنتی بیوتیکی شامل حداقل آمفوتریسین B $1 \mu\text{g/ml}$ و ونکومايسين $20 \mu\text{g/ml}$ غنی شده است) باشد. انکوباسیون (گرم خانه گذاری) محیط غنی شده باید به همراه کشت ثانویه ضعیف در محیط انتخابی جامد، در دمای 37°C درجه سانتی گراد و هوای غنی شده با کربن دی اکسید 5-10% به مدت 6 هفته صورت گیرد. ترجیحاً روش دو فاز از استفاده از محیط انتخابی جامد و مایع در بطری های مشابه (روش Castañeda's)، برای به حداقل رساندن کشت ثانویه می تواند مفید باشد. گاهی اوقات برای جدا سازی بروسلا از شیر، استفاده از یک محیط انتخابی دو فاز، با ترکیب محیط Castañeda's پایه به همراه افزودن آنتی بیوتیک های زیر به فاز مایع توصیه می شود. (مقادیر زیر در یک لیتر محیط می باشند):

پلی میکسین B (سولفات) (6000 واحد = 6 میلی گرم)، باستراسین (25000 واحد = 25 میلی گرم)، ناتامایسین (50 میلی گرم)، نالیدیکسیک اسید (5 میلی گرم)، آمفوتریسین B (1 میلی گرم)، ونکومايسين (20 میلی گرم)، D سیکلوسرین (100 میلی گرم).

تمام محیط های کشت باید از لحاظ کیفیت کنترل شوند و باید رشد سویه های بروسلا را از یک تلقیح کوچک تا سویه های سخت رشد مانند بیووار 2 بروسلا آبورتوس را تضمین کنند. در محیط کشت جامد مناسب، کلونی های بروسلا بعد از 2-3 روز گرم خانه گذاری قابل مشاهده هستند. بعد از 4 روز گرم خانه گذاری، کلونی های بروسلا به صورت گرد و با قطر 1-2 میلی متر با حاشیه صاف مشاهده می شوند. این کلونی ها شفاف هستند و هنگامی که آن ها را در مقابل نور قرار می دهیم به رنگ عسلی روشن مشاهده می گردند. همچنین وقتی کلونی ها را از بالا نگاه می کنیم، آن ها را به صورت محدب و به رنگ سفید مرواریدی می بینیم. به مرور زمان کلونی ها بزرگ تر شده و به تدریج تیره تر می گردند.

کشت های صاف بروسلا تمایل دارند که در طی رشد خود، به ویژه در کشت های ثانویه دستخوش تغییر شوند، همچنین تمایل دارند به شکل خشن تبدیل شوند. بنابراین، شفافیت کلونی ها کمتر می شود، کلونی ها به شکل گرانولر هستند، کلونی ها مات بوده و به رنگ سفید مات تا قهوه ای در نور منعکس شده یا نور عبوری، مشاهده می

شوند. آزمون بررسی جداسازی باکتری، با استفاده از رنگ آمیزی کریستال ویوله به راحتی قابل انجام است. کلونی های خشن به رنگ قرمز و کلونی های صاف یا رنگ را جذب نمی کنند و یا اینکه به رنگ زرد روشن مشاهده می شوند. اگر کلونی ها صاف هستند، باید آن ها را در مجاورت آنتی سرم بروسلا آبورتوس با پرگنه های صاف و یا ترجیحاً در مجاورت سرم های تک اختصاصی آنتی A و M قرار داد. در مواردی که کلونی ها صاف نیستند، برای بررسی باکتری های جدا شده باید آنتی سرم را در مجاورت آنتی ژن خشن بروسلا قرار داد. معمولاً تغییرات ساختاری کلونی همراه است با تغییر در حدت، ویژگی های سرم شناسی و یا حساسیت فاژ. ساختار شاخص (تیپیک) کلونی و نتیجه آگلوتیناسیون مثبت با آنتی سرم بروسلا، احتمالاً نشانه دهنده جداسازی بروسلا است.

3) جمع آوری و کشت نمونه ها: برای اینکه بتوان ابتدا به بروسلوز را در دامها به وسیله کشت تشخیص داد، انتخاب نمونه ها معمولاً بستگی به نشانی های بالینی در دام مورد نظر دارد. با ارزش ترین نمونه هایی که می توان جمع آوری کرد شامل جنین های سقط شده (محتویات شیردان، طحال و ریه)، پرده های جنینی، ترشحات واژن (که به وسیله سوآب جمع آوری می شود)، شیر، منی و مایعات آرتریت یا هیگروما می باشد. برای انتخاب نمونه های بافتی از لاشه دام، نمونه های ترجیحی از بافت های مربوط به سیستم رتیکولواندوتلیال (مانند طحال و گره های لمفاوی سر، پستان و دستگاه تناسلی) می باشد. همچنین در اواخر آبستنی یا در اوایل پس از زایش، نمونه های بافتی ترجیحاً شامل رحم و پستان می باشند. به طور معمول رشد کلونی ها 3-4 روز بعد از کشت صورت می گیرد، اما تا وقتی که 8-10 روز از زمان کشت دادن نگذشته باشد نباید نتیجه را منفی اعلام کرد.

نمونه های بافتی: جابه جایی نمونه ها باید به طور سترون و با استفاده از ابزار سترون صورت گیرد. باید برای تهیه نمونه های بافتی مواد اضافی را از آن ها حذف کرد (مانند چربی). بافت ها را باید به قسمت های کوچک برش داد. سپس باید قبل از اینکه در محیط جامد تلقیح شوند، با استفاده از stomacher یا دستگاه جداکننده بافت (tissue grinder)، نمونه ها را در بافر سالین فسفات سترون خیسانند.

ترشحات واژن: یک منبع عالی برای جداسازی بروسلا، سوآب واژن است که بعد از سقط یا بعد از زایمان تهیه می شود، که نسبت به جمع آوری نمونه های سقطی خطر کم تری برای افراد ایجاد می کند. سوآب آغشته به ترشحات واژن روی محیط جامد تلقیح می شود.

شیر: نمونه شیر باید به صورت بهداشتی تهیه شود و قبل از جمع آوری، لازم است پستان ها شسته و خشک شوند و سر پستانک ها ضد عفونی شوند. نمونه ها باید از همه کارتی ها اخذ شوند و از هر سر پستانک 10-20 میلی لیتر شیر جمع آوری گردد. اولین دوشش شیر را باید دور ریخت، سپس نمونه تهیه شده مستقیماً داخل مخازن سترون ریخته می شود. باید مراقب بود که نمونه شیر با دست شیردوش تماس مستقیم پیدا نکند. شرایط ساتریفوژ کردن شیر باید طوری باشد که از آلوده شدن آئروسول ها و در نتیجه آلودگی افراد در معرض جلوگیری شود. خامه و رسوب چه به صورت جداگانه و چه به صورت مخلوط، بر روی محیط انتخابی جامد قرار داده می شود. در نمونه های تانک شیر، تعداد بروسلا کم است و امکان دارد جداسازی آن موفقیت آمیز نباشد.

محصولات لبنی: محصولات لبنی نیز باید در محیط کشتی که در بالا توضیح داده شد، کشت داده شوند. این محصولات حاوی تعداد کمی جرم هستند بنابراین توصیه می شود محیط کشت آن ها غنی شود. قبل از کشت، نمونه ها باید به دقت همگن شوند. پس از اینکه نمونه ها در دستگاه جداکننده بافت (tissue grinder) قرار داده شد، خیس شده و در stomacher یا مخلوط کن برقی پودر می گردد و حجم مناسبی از PBS سترون به آن افزوده می شود. کشت باید از لایه های سطحی و قسمت های مرکزی محصولات لبنی صورت گیرد. به همان نسبت که بروسلا ها به سرعت رشد می کنند، به سرعت نیز از بین می روند. توزیع بروسلا ها بسته به شرایط و روش فیزیکی شیمیایی که محصول لبنی تولید می شود، متفاوت است.

تمام نمونه ها را باید بلافاصله پس از جمع آوری سرد شوند و به نزدیک ترین آزمایشگاه منتقل شوند. در آزمایشگاه اگر نمی خواهیم نمونه های بافتی و شیر را بلافاصله کشت دهیم باید آن ها را منجمد کنیم. بهتر است از به کار بردن حیوانات آزمایشگاهی مگر در موارد ضروری اجتناب کرد اما گاهی تنها وسیله برای تشخیص بروسلا این حیوانات هستند، به خصوص وقتی که میزان بروسلا در نمونه موجود کم باشد. تلقیح به خوکچه هندی از طریق زیر جلدی یا خراش جلد است و یا به صورت داخل رگی یا داخل صفاقی به موش تلقیح شود. در این روش باید اصول ایمنی به خوبی رعایت شود. طحال موش 7 روز پس از تلقیح کشت داده می شود. در مورد خوکچه هندی ابتدا نمونه سرمی در هفته های 3 و 6 پس از تلقیح مورد آزمایش قرار می گیرد و بعد از طحال حیوان کشت تهیه می شود.

آزمایش شیر

یک روش مؤثر در غربالگری گله های شیری، آزمون تانک شیر است. گاو هایی که در اواخر آبستنی قرار دارند و خشک شده اند، در آزمون تانک شیر شرکت داده نمی شوند. در مورد این حیوانات در صورت آلودگی، با انجام آزمایش های سرم شناسی، احتمال مثبت شدن نتیجه بسیار بیشتر است. بلافاصله پس از زایش، لازم است که تانک شیر مجدداً مورد آزمایش قرار گیرد. این روش ارزان است و امکان تکرار آن نسبت به انجام آزمون بر روی نمونه خون بیشتر است. هنگامی که نتیجه آزمایش مثبت شد، تمامی گاو هایی که در مورد آن ها آزمون شیر صورت می گیرد، باید آزمون خون نیز در مورد آن ها صورت گیرد. آزمون الایزای غیر مستقیم شیر دارای حساسیت و ویژگی بالایی است و به خصوص برای گله های بزرگ کاربرد دارد. در مواقعی که امکان استفاده از الایزا نیست، آزمایش حلقه شیر، یک روش مناسب می باشد.

آزمایش حلقه شیر

برای غربالگری دام های شیروار گله می توان از آزمایش حلقه شیر (MRT) استفاده نمود. در گله های بزرگ (با بیش از 100 رأس گاو شیری)، حساسیت این آزمون قابل اطمینان نیست. گاهی از MRT برای جبران رقیق سازی نمونه های تانک شیر در گله های بزرگ استفاده می شود. نمونه ها براساس فرمول زیر تهیه می شوند:

اندازه گله	میزان مورد نیاز از تانک شیر
>150 رأس دام	1ml
150-450	2ml
451-700	3ml

در گاو هایی که 4 ماه قبل از آزمایش واکسینه شده اند و همینطور در نمونه هایی که حاوی شیر های غیر طبیعی (مانند آغوز) هستند یا در موارد ورم پستان، نتایج مثبت کاذب به وجود می آید. بنابراین توصیه می شود که از این آزمون در مورد گله های کوچک استفاده نشود، چراکه باعث خسارات زیادی در گله می شود.

روش آزمایش

این آزمایش بر روی نمونه های تانک شیر صورت می گیرد. در صورت لزوم باید نمونه ها را با استفاده از نگه دارنده (1/0٪ فرمالین یا 0/02٪ برونوپول) به مدت 2-3 روز در دمای 4 درجه سانتی گراد عمل آوری نمود.

1) نمونه های شیر و آنتی ژن ها را به اتاقی با دمای 20 ± 3 درجه سانتی گراد منتقل کنید. آنتی ژن ها را باید فقط در روز آزمایش از یخچال بیرون آورید.

2) ظرف حاوی آنتی ژن را به خوبی تکان دهید.

3) برای انجام آزمایش، 50-30 میکرولیتر از آنتی ژن را به 1-2 میلی لیتر شیر کامل اضافه کنید (حجم نمونه شیر تهیه شده از تانک شیر در مورد گله های بزرگ تر باید بیشتر باشد).

4) ارتفاع شیر در لوله، حداقل باید 25 میلی متر باشد. باید از حرارت دادن، منجمد کردن، تکان دادن و نگه داری نمونه های شیر به مدت بیش از 72 ساعت خودداری نمود.

5) به طور معمول باید مخلوط نمونه های شیر و آنتی ژن، در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 1 ساعت به همراه محلول های کار مثبت و منفی، گرمخانه گذاری شوند. با این وجود، گرمخانه گذاری به مدت یک شبانه روز در دمای 4 درجه سانتی گراد، حساسیت آزمایش را افزایش و قرائت نتایج را آسان تر می سازد.

6) تشکیل یک حلقه به رنگ آبی تیره در بالای ستون سفید رنگ شیر، نشان دهنده واکنش مثبت قوی است. وجود هر لایه آبی رنگ بر روی سطح شیر را باید مورد توجه قرار داد چراکه ممکن است نشان دهنده مثبت بودن نتیجه باشد (به خصوص در گله های بزرگ).

7) اگر رنگ شیر از کرم تجاوز کند، نشان دهنده منفی بودن آزمایش است.

8) زمانی که MRT برای گله های بزرگ صورت می گیرد 2 یا 3 میلی لیتر شیر مورد استفاده قرار می گیرد.

تشخیص باکتری

قاعده کلی آزمایش

در این روش با رنگ آمیزی اختصاصی، حضور باکتری در گسترش یا مقاطع بافتی بررسی می شود. روش رنگ آمیزی استامپ، شیوه ای قدیمی در تشخیص بروسلا می باشد.

مواد و معرف ها

- ظرف رنگ آمیزی
- میکروسکوپ نوری
- رنگ زیل فوشین (محللول ذخیره: 1 گرم از فوشین پایه را در داخل 10 میلی لیتر الکل خالص حل کنید، سپس 90 میلی لیتر فنول 5٪ به آن اضافه کنید)
- استیک اسید 0/5%
- متیلن بلو 1%

روش کار

- 1- یک گسترش یا قسمتی از نمونه را برداشت و آن را با شعله ثابت کنید.
- 2- با زیل فوشین (که به نسبت 1 به 10 رقیق شده است) به مدت 10 دقیقه رنگ آمیزی کنید.
- 3- سپس آن را به خوبی با آب بشوید.
- 4- با استفاده از استیک اسید 0/5٪ به مدت 30 ثانیه رنگ بری کنید.
- 5- سپس آن را به خوبی با آب بشوید.
- 6- دومین رنگ آمیزی را با استفاده از متیلن بلو 1٪ به مدت 20 ثانیه انجام دهید.
- 7- آن را با آب به خوبی بشوید.

قرائت و تفسیر نتایج

بروسلا ها به صورت اجسام قرمز در زمینه ای آبی به صورت منفرد یا چندتایی (زنجیری) و معمولاً داخل سلولی مشاهده می شوند. نتایج مثبت لزوماً نشان دهنده آلودگی نیست. گاهی به دلیل فقدان ارگانسیم یا بیش از حد بودن آن در نمونه، نتایج به دست آمده همراه با خطا است. بنابراین نتیجه این آزمایش چه مثبت باشد و چه منفی باید با کشت دادن تأیید شود.

بررسی های همه گیرشناسی در موارد همه گیری بروسلوز، یا در مواردی که مشکوک به بیماری

هستیم

بررسی های همه گیر شناسی، با ارائه راهکارهای کنترلی و با در نظر گرفتن وضعیت بهداشتی منطقه، یک ابزار ضروری در کنترل بروسلوز می باشد و قادر است: 1- در تأیید یا عدم تأیید موارد مشکوک تصمیم گیری کند 2- منشأ عفونت را مشخص کند 3- سایر گله هایی که از لحاظ همه گیرشناسی با عامل عفونت در ارتباط هستند را شناسایی نماید 4- وضعیت انتشار بیماری و جنبه های مربوط به پرورش دام را ارزیابی کند تا به این وسیله در مورد سیاست های کنترل بیماری (کشتار دام های حامل و کاهش جمعیت گله) تصمیم گیری نماید. در یک منطقه، بررسی اطلاعات جمع آوری شده در گروهی از دامپروری ها، می تواند به شناسایی الگوی بیماری، مانیتور کردن و تنظیم راهکار ها کمک کند.

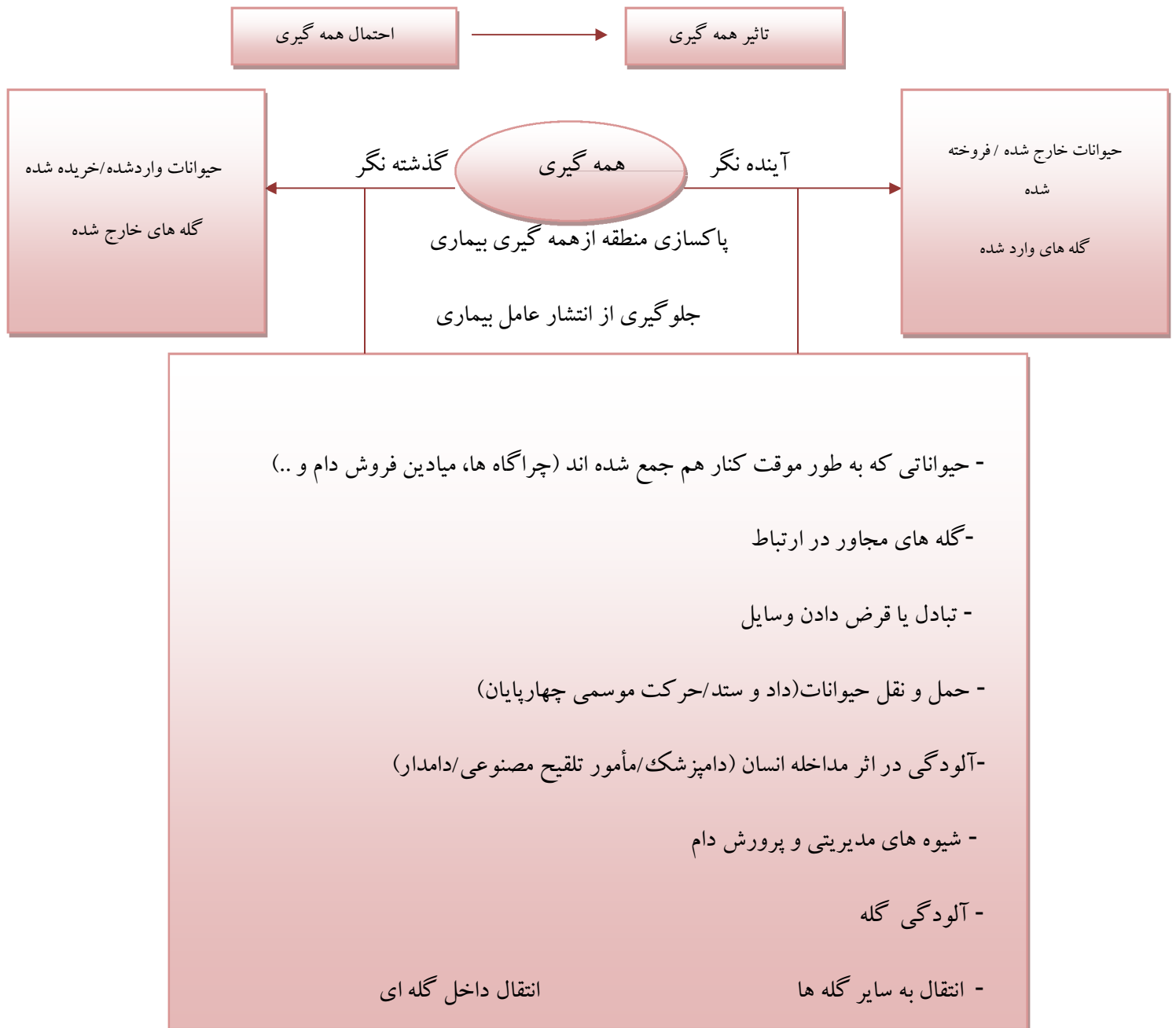
در مواقع همه گیری بیماری، انتخاب شیوه ریشه کنی بستگی به شرایط حقیقی حاکم بر منطقه ای دارد که همه گیری در آن رخ داده است. ارزیابی درست از این مساله، به کیفیت و جامعیت بررسی های ما بستگی دارد، بنابراین لازم است که تمام اطلاعات ضروری به دقت جمع آوری شود تا در عمل، انتخاب خوبی صورت گیرد. بعلاوه افزایش آگاهی کشاورزان و دامپزشکان در برنامه ریزی ها (به علت اهمیت مشارکت این افراد)، بررسی های همه گیرشناسی را به یک ابزار مهم تبدیل می کند. نظارت مستقیم بر شیوه های مدیریتی دامداری و سایر عوامل که می توانند به گسترش بروسلوز کمک کنند در مطالعات بهداشتی اهمیت دارد.

کاربرد همه گیر شناسی

علل وقوع بیماری چیست؟

اهداف اصلی تحقیقات همه گیرشناسی به شرح زیر است:

- مشخص کردن منشأ همه گیری بروسلوز
- شناسایی عوامل مستعد کننده برای انتقال داخل گله ای / سیر تکاملی شیوع بیماری / راه های احتمالی فرار ارگانیزم و خطرات آن برای سلامتی انسان
- شناسایی گله هایی که از لحاظ همه گیرشناسی، با منشأ اولیه همه گیری بیماری ارتباط داشته اند.



ادامه بررسی

هدف از دنبال کردن این بررسی ها، شناسایی گله ها یا جایگاه دامهایی است که در همه گیری اولیه بیماری آلوده شده اند. با این کار فرصت شناسایی جمعیت هایی که امکان دارد در معرض بیماری قرار گیرند، فراهم می شود و به ما کمک می کند تا برای جلوگیری از آلودگی های ثانویه یا ثالثیه از مقیاس های مناسب استفاده کنیم.

بررسی موارد زیر ضروری است:

- دامهای فروخته شده/ دامهایی که از زمان شروع آلودگی از گله خارج شده اند
- گله های اطراف که ممکن است با گله آلوده در تماس باشند (از طریق چراگاه ها و.....)
- گله هایی که به طور موقت با گله آلوده کنار هم جمع شده اند (چراگاه های عمومی/ کوچ دامها، میادین فروش دام و.....)
- حمل و نقل دامها (خرید و فروش/ کوچ دامها)
- تبادل/ قرض دادن لوازم یا وسایل
- آلودگی در اثر مداخله انسان (دامپزشک/ مأمور تلقیح مصنوعی/ دامدار)
- با توجه به طول دوره کمون بروسلوز، تاریخ زایمان ها/ سقط جنین و سیکل های تولید مثل (طول دوره جفتگیری/ هم زمانی فحلی ها/ مدت زمان کوچ و...)، وقتی یک همه گیری ایجاد می شود باید به تاریخچه گله از دو سال قبل از وقوع همه گیری یا حتی بیشتر (در مواردی که سابقه ای که دامدار از گله به ما می دهد قابل اطمینان نیست) توجه کنیم.

مطالعات گذشته نگر

مطالعات گذشته نگر به منظور شناسایی منشاء و منبع همه گیری ها طراحی می شوند. لازم است که از آلودگی مجدد گله ای که از عفونت پاک شده است جلوگیری به عمل آید.

مطالعات و بررسی های ما باید با توجه به تاریخچه گله (حداقل از دو سال قبل از شیوع بیماری) باشد. تمام دامهایی که در این مدت وارد گله شده اند باید در مطالعه ای که انجام می دهیم مورد توجه قرار گیرند. علاوه بر این وجود مراتع مشترک برای گله های مختلف، امکان انتقال آلودگی از طریق وسایلی که بین گله ها مبادله می شوند و مداخله انسان در انتقال آلودگی نیز باید لحاظ گردند. در شرایطی که جابه جایی بدون مجوز دامها وجود دارد و یا اینکه ورود دامها غیر قانونی است، باید وضعیت بهداشتی دامها را در گله های اولیه به خوبی کنترل و بررسی کرد. در مواقعی اطلاعات ما از وضعیت مبدأ اولیه ای که دامها را از آن خریداری کرده ایم کافی نیست، در این موارد باید وضعیت بهداشتی تمام دامهایی که در طی دو سال گذشته وارد گله شده اند را از زمان ورود آن ها به گله بررسی کنیم.

زمانی که دامهایی را برای فروش یا زایمان از گله خارج می کنید و یا اینکه دامهایی را به تازگی خریداری و وارد گله می کنید، باید آن ها را در جایی جدا از سایر دامها نگه داری نمایید.

روند شیوع بیماری و بررسی انتقال داخل گله ای آن

داده هایی که نشاندهنده مثبت بودن سرمی دامها است و همچنین عواملی که به پایداری بروسلوز در گله کمک می کند، باید مورد بررسی قرار گیرد، تا به این وسیله احتمال انتشار آلودگی توسط دامهای حامل ارزیابی گردد و اقدامات لازم مانند stamping out، تغییر در شیوه مدیریت، نظافت و ضد عفونی و غیره انجام پذیرد.

برخی از عواملی که به پایداری عفونت کمک می کنند عبارتند از:

- اندازه گله (عاملی است که به مدیریت گله بستگی دارد)
- در نظر گرفتن امکانات (محوطه و حصار) و امکان ضد عفونی کردن

- زایمان های فصلی : طولانی بودن فصل بره زایی باعث می شود که دامهای ماده در شرایط متفاوتی به سر ببرند، به این صورت که برخی زایمان کرده اند در حالی که برخی دیگر هنوز آبستن هستند. برای مثال دامهای جوان چند ماه بعد از دامهای بالغ جفت گیری می کنند و زمانی که دامهای بالغ زایمان کرده اند، دامهای جوان ماه های آخر آبستنی را می گذرانند، به همین علت نسبت به آلودگی و عفونی شدن حساسیت بیشتری دارند.

- مکان زایمان دامها و میزان آلودگی و امکان ضد عفونی کردن آن

- قرار گیری در معرض مواد و وسایل آلوده (بعد از زایمان - سقط و...)

- مدیریت بره های تازه متولد شده، دامهای ماده جایگزین و قرار گرفتن در معرض عفونت

- تاریخ زایمان، سقط و تلقیح مصنوعی

روش ها

در مناطقی که میزان شیوع بیماری بالا است:

در مناطق با شیوع بالای بیماری، ممکن است اجرای برنامه های همه گیرشناسی عملاً امکان پذیر نباشد، چراکه این کار احتیاج به زمان و سرمایه گذاری زیاد از نظر منابع انسانی دارد. علاوه براین در این موارد، تعیین منشأ بیماری نیز کار دشواری است. بررسی گله های آلوده نباید به یک نمونه گیری ساده از خون، تست و کشتار محدود شود، بلکه باید عواملی که به بقای بروسلوز در گله کمک می کنند در بررسی های ما لحاظ گردند. بنابراین لازم است که شناخت کافی از مشکلات در سطح دامداری را به دست آوریم.

در مناطقی که شیوع بیماری پایین است:

در مناطق با شیوع پایین بیماری و قبل از اینکه بیماری ریشه کن شود، مطالعات همه گیرشناسی جهت شناسایی منابع احتمالی عفونت و راه های انتشار آن اهمیت ویژه ای دارد. اگر بررسی های انجام گرفته دقیق باشد می توان به خوبی موارد مثبت واقعی و همینطور موارد مثبت کاذب را در گله شناسایی کرد.

مناطقى که از بروسلوز پاک هستند:

انجام بررسی ها در مناطقی که از بروسلوز پاک هستند در مواردی ضرورت می یابد که بخواهیم بدانیم آیا نتایج مثبت، ناشی از آلودگی به بروسلا است یا در اثر آلودگی به باکتری های دیگر ایجاد شده است.

در مناطقی که از عفونت پاک هستند و فاصله بین اقدامات کنترلی طولانی می شود، در صورت وقوع همه گیری تشخیص آن با تأخیر صورت می گیرد. بنابراین لازم است گله هایی که احتمال آلودگی در آن ها وجود دارد به سرعت شناسایی شوند.

پرسشنامه بر اساس داده های همه گیرشناسی

پرسشنامه حاضر برای بررسی های دقیق قابل استفاده است (مناطقى که شیوع بیماری در آنها پایین است) و از دو بخش تشکیل می شود:

- بخش اول شامل بررسی همه گیر شناسی و بدست آوردن اطلاعات از پرونده گله ها (که توسط سرویس های دامپزشکی ثبت شده است) می باشد. سایر اطلاعات را می توان از مراکز خدمات دامپروری، سازمان ها، انجمن های دامداران و غیره جمع آوری نمود.

- بخش دوم شامل اطلاعات به دست آمده از معاینه ی دام توسط سرویس های اجرایی دامپزشکی می باشد.

در جدول 5، فهرستی از جنبه های مهم همه گیر شناسی بروسلوز آورده شده است. این موارد به 7 بخش تقسیم شده است و بر اساس میزان جزئیات مورد نیاز، در مناطق با شیوع بالا (جزئیات کمتر) و مناطق با شیوع پایین (جزئیات بیشتر) با 3-1 ستاره مشخص شده است.

ممکن است در یک گله گونه های مختلفی از نشخوارکنندگان وجود داشته باشد. برای مثال نشخوارکنندگان کوچک، گاو و گاو میش که باید در شرایط متفاوت نگهداری شوند، در یک گله در کنار هم نگهداری می شوند. این در حالی است که راهکار های کنترل و روش های تشخیص بیماری ها در این گونه ها با یکدیگر متفاوت است. بنابراین، پرسشنامه همه گیر شناسی باید شرایط را توضیح دهد تا بتوان مطمئن شد که آزمایش های سرم شناسی و محدودیت ها در مورد تمامی دامهای حساس گله انجام شده است.

جدول شماره 5- جنبه های مهم همه گیر شناسی بروسلوز

عنوان	بخش ها	درجه اهمیت
دامپروری	تعیین هویت (شماره، نام صاحب دام)، موقعیت جغرافیایی	***
	خدمات دامپزشکی (سازمان تولید کنندگان، نام دامپزشک)	***
	وضعیت بهداشت	***
	(تاریخ آخرین وضعیت، سابقه سرم شناسی، محدودیت ها، واکسیناسیون)	***
	موارد انسانی	**
	محصولاتی که از دامداری خارج شده اند	***
گله	ساختار گله (تعداد دامها)	***
	تغییر اندازه گله (تاریخ، دلایل)	**
	وضعیت بهداشتی دامها (واکسینه بودن یا واکسینه نبودن دامها)	**
	علائم بالینی (سقط، مرده زایی، عدم باروری و غیره)	**
	گونه های دیگری که در تماس با گله هستند و وضعیت بهداشتی آنها	**
اخذ سابقه	خرید دام (تعداد، تاریخ، هدف از خرید، محل خرید)	***
	ورود دام به گله (قرض گرفتن و ...)	**
	مراعات موسمی و مراعات مشترک / مناطقی که مخصوص تأمین آب گله است	***
	وضعیت دامداری های مجاور و میزان تماس با آنها	**
	سایر راه های تماس و ارتباط دام ها با یکدیگر (میادین دام، شیردوشی مشترک)	**
	تماس با سایر گونه های دامی	*
	مداخله انسان (دامپزشک، مأمور تلقیح، بازدید کنندگان از دامداری) و	*

	تجهیزات دامداری مورد استفاده به صورت مشترک	
بررسی های آینده نگر	دام های فروخته شده (تعداد، تاریخ، مقصد دام فروخته شده)	***
	راه های تماس دامها با یکدیگر (مراتع موسمی، مراتع مشترک، شیردوشی، میادین خرید دام، تماس با دامهای گله های مجاور و غیره)	***
	فروش شیر، پنیر تازه، پنیر رسیده، و سایر محصولات دامی	**
	آلودگی با مدفوع و احتمال آلودگی های دیگر محصولات دامی	**
	مداخله انسان و تجهیزات دامداری مورد استفاده به صورت مشترک	*
	فصل زایش (مدت زمان، فصول مختلف برای بالغین و میش های جوان)	***
انتقال داخل گله ای	زایمان (مکان زایش و وضعیت بهداشتی آن)	**
	مدیریت بره ها و میش های جوان جایگزین	**
	روش شیردوشی	**
	فضولات و مواد زائد	*
	نظافت و ضدعفونی کردن	**
	حضور حیوانات وحشی	*
نتایج	بازگشت گله به شرایط طبیعی	***
	مجاورت با سایر گله ها	***
	ورود دام جدید به گله	***
	مراتع مشترک یا مناطقی که مخصوص تأمین آب گله است	***
	مراتع موسمی و گله های ترکیبی	***
	سایر منابع عفونت	***
اندازه	مطالعات گذشته نگر	**
گیری ها	مطالعات آینده نگر	**
	روند پاکسازی همه گیری	**

پیامدها:

- در موارد مشکوک باید اقدامات بهداشتی صورت گیرد و تغییراتی که از لحاظ همه گیر شناسی با شیوع بیماری در گله مرتبط است، باید متوقف شود.
- کنترل سرمی در این گله ها باید در مورد همه دام های بالغ انجام گیرد.
- مسئولین بهداشتی باید توجه داشته باشند، در صورتی که دامهایی از گله های عفونی وارد می شوند به سرعت گزارش گردند.
- پس از شناسایی شیوه های مناسب مدیریتی، اقدامات لازم جهت اصلاح نواقص باید صورت گیرد.
- تحلیل اطلاعات جمع آوری شده باعث می شود ارزیابی درستی از شرایط همه گیر شناسی مناطق آلوده به بروسلوز انجام گیرد.
- اصلاح برنامه ها با استفاده از اطلاعات خوب و با کیفیت، دستیابی به نتایج مطلوب را بهبود می بخشد.

پرسشنامه جهت تشخیص همه گیری در گله های گاو/گوسفند و بز که مشکوک به آلودگی بوده و یا مبتلا به بروسلوز هستند.

فصل اول - مطالعه تاریخچه گله

تاریخ:

نام محقق:

قبل از معاینه گله گوسفند و بز/ گاو اطلاعات لازم را می توان از سرویس های دامپزشکی و سایر سرویس های دامپروری، سازمان ها، انجمن های دامپروران و غیره جمع آوری نمود. نمونه ای که بیان می شود، بیشتر مورد توجه دامدارانی است که گوسفند و بز را باهم نگهداری می کنند.

• اطلاعات اجرایی در مورد دامداری / محل نگهداری دامها

تذکره! محل نگهداری دام = یک واحد همه گیر شناسی = تمامی واحد های تولید گاو، گوسفند و بز و سایر گونه های حساس به بروسلوز، که معمولاً شامل طویله، آغل و یا مراتع مشترکی است که در آن، دامها کنار یکدیگر قرار می گیرند.

☐ گله گوسفند و بز / گاو: گوسفند ☐ بز ☐ گاو ☐ گوسفند و بز در یک مکان ☐
☐ گوسفند و بز و گاو در یک مکان ☐ سایر گونه های دامی ☐

شماره شناسایی گله گوسفند و بز / گاو -----

نام -----

نام صاحب دام -----

نشانی -----

شماره تماس ----- فکس -----

نام دامپزشک ----- نشانی -----

شماره تماس ----- فکس -----

عضویت در انجمن دامداران ☐ بلی ☐ خیر ☐

عضویت در سایر سازمان ها ☐ بلی ☐ خیر ☐

توضیحات -----

تلقیح مصنوعی ☐ بلی ☐ خیر ☐

----- فعالیتهای خاص دامداران -----

فهرست محصولات دامی

تولیدات گله گوسفند و بز / گاو: ☐ شیر ☐ گوشت ☐ شیر و گوشت ☐
شیر خام جهت فروش ☐ تلیسه جهت فروش ☐ کود ☐

تعداد مشخص دام ها	گوسفند و بز:	گاو:	
-------------------	--------------	------	--

تعداد دام ها:

- میش < 18 ماه: ----- نمونه خون کدام میش ها برای اولین مرتبه اخذ شده است -----
- قوچ ----- (شامل گوسفندان نر با سن بیش از 6 ماه)
- میش های نابالغ (6-18 ماه) -----
- بره > 6 ماه -----
- بز < 1 سال -----
- بز های نابالغ -----
- بز های نر -----
- تعداد دام های واکسینه شده: گوسفند ----- بز -----

سایر گونه ها

گاو

- وضعیت بروسلوز: -----

- گاو ماده -----

- تلیسه ها < 1 سال -----

- گاو های نر -----

- گوساله ها > 1 سال -----

طیور: ----- - روش نگهداری: -----

سگ ها:

نگهداری سگ به صورت آزاد ☐ نگهداری سگ به صورت بسته ☐

سگ های ولگرد (نام صاحب قبلی سگ): -----

- آیا اخیراً کنترل سرمی صورت گرفته است؟ خیر ☐ بلی ☐ (تاریخ، نتایج، درمان ها و)

مکان زایش در محلی غیر از دامداری: خیر ☐ بلی ☐

مکان: -----

وضعیت بهداشتی گله

ظاهرأ پاک ☐ پاک ☐ مشکوک به وجود آلودگی ☐ آلوده ☐ سایر موارد: -----

تاریخ شروع اقدامات بهداشتی: ----- /----- /-----

آیا اطلاعات جمع آوری شده حاکی از وقوع بروسلوز در گله است؟

منشأ عفونت -----
خیر ☐ بلی ☐ تاریخ ----- /----- /-----

تعداد گوسفندان/ بزهای آزمایش شده: -----

تعداد دام هایی که نتیجه آزمون سرمی آن ها مثبت بوده است: -----

آیا سقط ها ناشی از آلودگی به بروسلا بوده است؟
☐ خیر ☐ بلی

کشتار: ☐ تمامی دامهای گله

☐ بخشی از دامهای گله

آیا نظافت و ضدعفونی جایگاه نگهداری دامها صورت گرفته است؟
☐ بلی ☐ خیر

با چه ماده ای؟ -----

تاریخ بازگشت گله به شرایط قبلی: ----- /----- /-----

مشاهدات: -----

نتایج آخرین کنترل سالیانه

تاریخ	تعداد دامهای آزمایش شده/تعداد کل	نتایج سرم شناسی	تفاسیر

وارد کردن دام جدید به گله (خرید/ وارد کردن دام)

بطور منظم	بطور نامنظم	توضیح در صورت نامنظم بودن
		خرید/ ورود دام جدید در سال
		خرید/ ورود دام جدید در یک سال
		خرید/ ورود دام جدید در دو سال
		خرید/ ورود دام جدید در سه سال

مقایسه فهرست تغییرات گله در دو سال گذشته با فهرست کنترل خرید و شناسایی منشأ گله.

آیا گله در طی سه سال گذشته کوچ داشته است؟

☐ بلی ☐ خیر

تاریخ (از --- تا ---)	منطقه	نام دامداران دیگر گله ها (گوسفند و بز/ گاو)	وضعیت بهداشتی سایر گله ها (گوسفند و بز/ گاو)

آیا دامها در زمان کوچ از مراتع مجاور استفاده کرده اند؟

☐ خیر ☐ بلی ☐ (گوسفند/ بز ☐ ، گاو ☐) (نقشه مسیر کوچ)

وضعیت فعلی کوچ دامها

الف) کوچ پیاده دامها

تاریخ	فهرست مواقع مسیر	گله هایی که در مسیر کوچ خود، با سایر گله ها مخلوط شده اند *	گله هایی که از مسیری کوچ می کنند که قبل از آن ها، گله ای دیگر از آن مسیر عبور کرده است **

* نام دامدارانی که گله های آن ها در مسیر کوچ خود، با سایر گله ها مخلوط شده اند.

** نام دامدارانی که گله آن ها در مسیری کوچ کرده است که قبلاً سایر گله ها از آن مسیر عبور کرده اند.

ب) کامیون حمل دامها

نام و آدرس راننده کامیون:-----

آیا کامیون حمل دام قبل از اینکه دامها را حمل کند، ضد عفونی شده است؟ بلی ☐ خیر ☐

مکان و تاریخ تخلیه دامها:-----

ج) حوادثی که طی انتقال دامها رخ می دهد

سقط ☐ زایمان پیش از موقع ☐ حضور سگ ولگرد ☐ حضور حیوانات وحشی ☐

آیا کنترل سرمی سگ های گله صورت می گیرد؟ بلی ☐ خیر ☐

نظرات:-----

قرض دادن، اجاره کردن

تاریخ (از --- تا ---)	شناسایی حرکت دامها	نام گله خریداری شده	وضعیت گله خریداری شده	برنامه کنترلی بعد از بازگشت دامها

آیا نامناسب بودن وضعیت گله به دلیل مشکلات مدیریتی بوده است؟

☐ بلی ☐ خیر

- آیا نتایج آزمون های سرمی انجام شده جهت کنترل دامهای خریداری شده یا فروخته شده مثبت بوده است؟

☐ خیر ☐ بلی تاریخ: -----/-----/-----

جزئیات: -----

مشاهدات: -----

- موارد مشکوک بر اساس توضیحات زیر می باشد:

- آیا آزمون های سرمی به صورت سالیانه انجام می گیرد؟

☐ خیر ☐ بلی - نتایج: -----

- آیا رابطه ای بین اطلاعات همه گیر شناسی با شیوع بیماری وجود داشته است؟

☐ خیر ☐ بلی

تاریخ اخذ اطلاعات: -----/-----/----- شماره شناسایی گله آلوده: -----

مکان وقوع همه گیری:

تاریخ وقوع همه گیری: -----/-----/-----

نوع ارتباط از لحاظ همه گیر شناسی:

نظرات: -----

نتایج آزمون های سرم شناسی گله ای که از لحاظ همه گیر شناسی با گله های آلوده دیگر در ارتباط است:

تاریخ	نوع آزمایش انجام شده	تعداد دامهایی که مورد آزمایش قرار گرفته اند	تعداد موارد مثبت	نظرات

• اطلاعات تکمیلی

- نقشه ای که موقعیت مراتع را مشخص می کند
- نقشه ای که موقعیت آغل یا طویله را مشخص می کند
- نقشه ای که موقعیت تمامی مراتع را مشخص می کند. (بخصوص مراتع موسمی)

پرسشنامه جهت تشخیص همه گیر شناسی در گله های گاو یا گوسفند و بز که مشکوک به عفونت بوده یا به بروسلوز مبتلا هستند

فصل 2- بررسی نحوه نگهداری دام

تاریخ: نام محقق:

تمامی اطلاعات جمع آوری شده باید با همکاری صاحب دام مورد بررسی قرار گیرد.

• موقعیت جایگاه نگهداری دام

روش های نگهداری دام

- ☐ آغل دائمی
- ☐ استفاده از مراتع مشترک
- ☐ آغل زمستانه
- ☐ مراتع تابستانه
- ☐ آغل تابستانه
- ☐ مراتع زمستانه
- ☐ نگهداری در مرتع

شیوه مصرف آب دامها

- ☐ حمل آب به دامداری
- ☐ استفاده از آب دریاچه
- ☐ استفاده از آب چاه (چشمه)
- ☐ استفاده از آب رودخانه

آیا امکان تماس دامها با سایر گله ها وجود دارد؟ ☐ بلی ☐ خیر

کود

- ☐ به صورت ذخیره: در محوطه دامداری
- ☐ جمع آوری کود در زمین های تحت کشت
- ☐ به صورت پخش: در مراتع
- ☐ آمیزه ای از روش های ذکر شده
- ☐ سایر موارد
- هرچند وقت یکبار جایگاه تمیز می شود؟ -----
- هرچند وقت یکبار جایگاه ضد عفونی می شود؟ -----
- مواد شیمیایی مورد استفاده جهت ضد عفونی: -----
- مسئول ارائه خدمات (ارائه شواهد مستند): -----
- اندازه جایگاه برای هریک از گونه های دامی: -----
- گوسفند: ----- بز: ----- گاو: ----- سایر گونه ها: -----
- نقشه ای که موقعیت جایگاه را نشان می دهد (1/100000)

- تعداد مراتع: -----

- نقشه مراتع

- آیا دامهایی جهت پرواربندی در گله نگهداری می شود؟ ☐ بلی ☐ خیر

مشاهدات: -----

● فهرست دامها

- سرشماری جمعیت دامی (شمارش تعداد دامها در هرگونه به صورت جداگانه یا شمارش کلی دامها در تمام گونه ها):

- تعداد دامهای مولد ثبت شده (فهرست دامها): -----

- مشاهدات و وقایع غیر معمول:

- سایر موارد:

• جا به جایی دامها

- ورود دام جدید به گله در مدت دو سال (خرید، قرض گرفتن و ...)

- اطلاعات کامل جمع آوری شده: -----

تعداد دامهای فروخته شده در مدت 3 سال

شماره شناسایی	جنس	تاریخ فروش	شماره شناسایی گله خریداری شده یا شماره فروشنده

جمع شدن گله ها در کنار یکدیگر (در مراتع موسمی، قرض گرفتن و غیره)

آیا گله ها حداقل به طور فصلی در کنار یکدیگر جمع می شوند؟

☐ خیر ☐ بلی

با مجوز رسمی؟ ☐ خیر ☐ بلی

در صورت لزوم اطلاعات را به طور دقیق و کامل بنویسید:

• تماس با گله های مجاور

فهرستی از نزدیک ترین گله های مجاور (جایگاه و مراتع این گله ها)

شماره شناسایی گله	مکان نگهداری دام	وضعیت بروسلوز	وقایع پاتولوژیک احتمالی

نقشه ای که موقعیت گله های مجاور را مشخص می کند:

- جایگاه نگهداری - مرتع

(جاده ها، مسیر عبور گله، مسیر عبور آب، محل هایی که در آن آب مورد استفاده دامها قرار دارد و غیره را در نقشه علامت گذاری کنید)

عوامل خطری که از طریق علوفه و یا شیوه نگهداری دام، احتمال آلودگی را افزایش می دهند را فهرست کنید:

- تلقیح مصنوعی خیر ☐ بلی ☐ مشاهدات: -----
- جفت گیری خیر ☐ بلی ☐ مشاهدات: -----
- استفاده از وسایل و تجهیزات مشترک (کامیون حمل دام، وسایل مقید کردن دام، تراکتور، ماشین پخش کود و غیره): -----
- آلودگی در اثر مداخله انسان (دامپزشک، تکنسین، مسئول تلقیح مصنوعی، دامدار و غیره): -----

- جمع شدن گله ها در کنار یکدیگر: -----

- مراتع موسمی: -----

اگر لازم است بر روی نقشه مشخص کنید:

- مسیر عبور آب
- مراتع نگهداری دام (که شامل مراتعی است که از محل اصلی نگهداری دام دور است)
- موقعیت محل نگهداری گله های مجاور (از شماره های مشابه جدول قبلی استفاده کنید)

● تشخیص بروسلوز در افرادی که به طریقی با دام سروکار داشته اند

• مشاهدات دامپزشک

• مشاهدات دامپرووران (مشاهدات دامپرووران به همراه مشاهدات دامپزشک می تواند مفید واقع شود)

نتیجه گیری

• نتایج بررسی ها

مشخص شدن عوامل خطر با بررسی شیوه های پرورش دام:

- ☐ وقوع قبلی همه گیری بروسلوز
- ☐ خرید دام از گله آلوده
- ☐ فقدان کنترل سرمی دامهای خریداری شده
- ☐ قرار گرفتن گله در کنار دامهای گله های آلوده یا فاقد شرایط مناسب
- ☐ قرار گرفتن گله در مجاورت گله های آلوده
- ☐ سایر موارد:

موانع و مشکلات برنامه مبارزه با بروسلوز ایران

از عمده ترین مشکلاتی که در ایران، پیش روی برنامه مبارزه با بروسلوز وجود دارد موارد زیر می باشد:

- شرایط بدوی نگهداری گوسفند و بز در کلیه نقاط کشور از جمله وجود عشایر و دامداران کوچ رو.
- عدم وجود سیستم شناسائی دامهای روستائی و عشایری که باعث بی اطلاعی از سوابق ایمنی گله ها می شود.
- ضعف یا عدم وجود سیستم قرنطینه و کنترل تردد و حمل و نقل دام در مناطق مرزی و سراسر کشور و مشکلات موجود در کنترل حمل و نقل فرآورده های دامی در کشور.
- وجود مرزهای طولانی و خاکی فاقد کنترل با کشور های دارای شرایط بهداشتی و دامپزشکی ضعیف و آلودگی آنها به بروسلوز.
- تردد و قاچاق دام از کشورهای همجوار به دلیل اختلاف بالای قیمت گوشت.
- پایین بودن اطلاعات و سطح آگاهی های عمومی و بهداشتی دامداران.
- مدت زمان طولانی نگهداری گوسفند و بزهای مولد بطوریکه این دامها تا زمانی که قادر به زایمان بوده و دارای دندان باشند در گله ها نگهداری می شوند که این عمر، بالاتر از دوره ایمنی واکسیناسیون می باشد و باعث حساس شدن دوباره دام ها در برابر عفونت می گردد.
- خلا قانون مناسب جهت برخورد سیستم قضایی با متخلفین در زمینه بهداشت دام که این امر منجر به عدم توان بازدارندگی در زمینه قاچاق دام از کشورهای همسایه و جابه جایی وسیع دام در کشور گردیده و باعث انتقال و چرخش آلودگی بین نقاط مختلف داخل و خارج کشور گردیده است.
- عدم وجود آمار صحیح از جمعیت و پراکندگی دام کشور.

- کمبود اعتبارات و امکانات متناسب با برنامه ها و حجم عملیات مورد نیاز و عدم وجود سهمی از بودجه نظام سلامت کشور.

- کوتاه بودن تاریخ مصرف واکسن Rev1 بطوریکه تنها برای مدت 4 ماه قابل مصرف بوده و این زمان کوتاه، مشکلات فراوانی برای تهیه و پخش واکسن در کشور را به وجود آورده است.

- ضعف نسبی سیستم زنجیره سرد در مرحله حمل تا زمان مصرف واکسن.

کنترل و پیشگیری از بروسلوز پیچیده تر از مایه کوبی در کنار آزمایش و کشتار دام های آلوده می باشد. یک برنامه کنترل و ریشه کنی بیماری با حمایت مناسب منابع مالی در کنار همکاری دامداران و متولیان دولتی برنامه نیاز است تا از گسترش بیماری جلوگیری شود. بدون این مسائل، هر گونه استراتژی هر چند خوب نیز محکوم به شکست است.

کلامیدوفیلا آبورتوس

کلامیدوفیلا آبورتوس باکتری گرم منفی داخل سلولی اجباری است که عامل عفونی سقط آنزوتوتیک می باشد و به عنوان یکی از عوامل اصلی کاهش تولید در گوسفند و بز در دنیا شناخته شده است. در بسیاری از کشورها این میکروارگانیسم یکی از مهمترین عوامل سقط جنین در میش ها بوده و در بزها نیز بیماری مشابه می باشد. همچنین گاو، خوک و اسب نیز به آن آلوده می شوند. سقط جنین های ناشی از این جرم یک عامل عمده زیان اقتصادی و مساله جدی در کشورهایی است که در آنها پرورش گوسفند اهمیت دارد.

کلامیدیوز از متداولترین عوامل سقط جنین در گوسفند و بزهای بسیاری از مناطق دنیا از جمله آمریکا و انگلستان می باشد و در انگلستان، 45٪ از عوامل سقط را به این میکروب نسبت داده اند. علی رغم وجود واکسن های تجاری در دسترس، سقط جنین های ناشی از این میکروارگانیسم هنوز هم به عنوان یکی از معضلات اصلی کشورهای دارای صنعت گوسفند داری مطرح بوده و یکی از معمول ترین عوامل سقط جنین در این کشورها می باشد.

از آنجا که گوسفندان آلوده، سالم به نظر رسیده و تنها در حول و حوش زایمان و یا سقط جنین دارای ترشحات دستگاه تناسلی می باشند، توجه دامدارها را به خود جلب نکرده و به همین دلیل حساسیت دامدارها در جهت به کار بردن اعمال پیشگیرانه را بر نمی انگیزد. کلامیدوفیلا آبورتوس در گوسفندان در بدو ورود به لوزه ها رفته و در آنجا جایگزین می شوند که پس از آن توسط جریان خون یا لمف به دیگر بافت های بدن می رود. کلامیدوفیلا آبورتوس تمایل بسیاری به ایجاد آلودگی مستمر بدون نشانی در بسیاری از گونه های حیوانی دارد. میش های آلوده تا حول و حوش سقط هیچ گونه علائمی نشان نداده و کاملاً سالم به نظر می رسند و تنها در حوالی سقط (2-3 هفته آخر آبستنی) مقداری ترشحات واژنی دارند، به همین خاطر عفونت ناشی از کلامیدوفیلا آبورتوس اغلب توجهی را جلب نکرده و تشخیص داده نمی شوند تا زمانی که دیگر برای هر گونه عمل پیشگیرانه ای در فصل بره زایی دیر شده است.

در سقط های ناشی از کلامیدوفیلا آبورتوس ضخیم شدن جفت، نکروز شدن پرده های جنینی و ترشحات اکسودایی در جفت وجود دارد و جنین های سقط شده معمولاً به صورت کامل رشد کرده و غیر طبیعی بودن

آناتومیکی خاصی نیز در جنین وجود ندارد. این عوامل باعث شده تا التهاب جفت را یکی از کلیدهای اصلی در پاتوژنز جرم عنوان نمایند.

اعتقاد بر این است که آلودگی اولیه با کلامیدوفیلا آبورتوس از طریق مسیر دهانی و یا مخاط بینی باشد. منبع اولیه آلودگی گوسفندان پاک از طریق ترشحات زایمانی و یا ترشحات واژنی دام های مبتلا خصوصا در فصل بره زایی می باشد. معمولا این گوسفندان که به تازگی آلوده شده اند در فصل بعدی زایمان (شکم زایمان بعدی) سقط می کنند.

بیشترین الگویی که از سقط های ناشی از کلامیدوفیلا آبورتوس گزارش شده بدین شکل است که در سال اول میزان کمی سقط در گله وقوع می یابد اما در سال دوم سقط های طوفانی در حدود 20-30 درصد میش ها اتفاق می افتد. پس از آن در سال بعد، سقط ها در حدود 5-10 درصد در گله به وقوع می پیوندد به علاوه آنکه میش های جدید جایگزین نیز سقط می کنند.

بعد از آلودگی دام سالم بوسیله کلامیدوفیلا آبورتوس دو مسیر کلی برای ایجاد بیماری وجود دارد:

1- اگر دام ها هنگام آلودگی غیر آبستن بوده و یا در سن آبستنی بعد از 110 روز قرار داشته باشند در این دام ها عفونت به حالت پنهان درآمده و در آبستنی بعدی به حالت آشکار بروز می کند. ایمنی محافظت کننده بعد از بروز بیماری بالینی به وجود می آید و این گوسفندان دیگر بیماری را به شکل بالینی نشان نخواهند داد

2- اگر میش ها در قبل از روز 110 آبستنی آلوده شوند علائم بالینی بیماری را در همان آبستنی نشان می دهند. در گله هایی که جفت گیری در بیش از یک چرخه فعلی گسترده است، میش ها در یک دوره زمانی، در سنین مختلف آبستنی قرار دارند. از آنجا که سقط بیشتر در 2-3 هفته آخر آبستنی اتفاق می افتد، گوسفندان سالمی که دیرتر جفت گیری کرده و آبستن شده اند در معرض خطر کسب عفونت و آلودگی بوسیله گوسفندان آلوده ای که زودتر آبستن شده اند قرار دارند.

در شرایط گله های ایران که زایمان ها با فواصل زیاد انجام میشود و فصل زایمان طولانی می شود، دامهای پاک می توانند از طریق دامهای آلوده عفونت را کسب کرده و در همان آبستنی، سقط کنند. گوسفندانی که در سال اول

عفونت، سقط کرده و یا بره های ضعیف به دنیا آورده اند در آبستنی بعدی هیچ گونه علائم بالینی نشان نداده و نوزادان سالم به دنیا می آورند که این در اثر شکل گیری ایمنی محافظت کننده در دام های سقط کرده می باشد.

نکته مهم در نتیجه گیری از این یافته ها، اهمیت فوق العاده جداسازی میش و بزهای سقط کرده از سایر گله، تا حداقل 3 هفته پس از سقط را نشان می دهد. متأسفانه آگاهی بسیار کم دامداران در ارتباط با کنترل سقط یکی از معضلات اساسی می باشد، بطوریکه تقریباً در تمام مواردی که مشاهده شد، دامدار اقدام خاصی را بعد از شروع سقط در گله انجام نمی داد. دلایل مختلفی برای عدم انجام اقدامات توسط دامداران اعلام می شد که عدم وجود علوفه برای تغذیه میش های سقط کرده از آن جمله است بدین ترتیب، در صورتی که بخواهند آنها را به مدت چند روز از سایر دام ها جدا کنند، هیچ گونه توان تغذیه دستی برای آنها وجود ندارد، ضمن آنکه قادر نیستند چوپان جداگانه ای برای این دام ها بگیرند تا در این مدت اوج ترشحات پس از سقط، آنها را از گله جدا نگه دارند و جداگانه به چرا ببرند.

حضور دام های تازه سقط کرده در بین گله و بیرون رفتن با گله باعث می شود تا ترشح جرم در محیط نیز صورت گیرد و از آنجا که فرم EB کلامیدیا قادر است برای ماه ها در محیط خارج زنده بماند، آلودگی به سادگی در گله و محیط منتشر می شود.

در شرایط کشور ما در بسیاری مواقع در فصل زایمان، دامداران اقدام به خرید بره و بزغاله های مادر مرده از سایر گله ها می نمایند. این به دلیل آن است که در فصل زایمان بسیار اتفاق می افتد که گوسفندان بره های خود را از دست می دهند و یا برعکس، بره ها و بزغاله ها مادران را از دست می دهند. از طرفی از آنجا که در سیستم پرورش سنتی، مادران به نوزادان بسیار وابسته می شوند در صورتی که بره تلف شود بعد از چند روز، شیر مادر به کلی قطع می شود و دامداران به دلیل اینکه از این قطع شیر و در نتیجه ضرر اقتصادی جلوگیری کنند اقدام به خرید بره و بزغاله های شیر خوار از گله های دیگر مناطق می نمایند و با مالیدن آب نمک به این نوزادان جدید، آنها را به مادران بره مرده تحویل می دهند تا از شیر آنها تغذیه کرده و مانع قطع شیر گوسفند خود می شوند. از آنجا که این بره ها از گله های مختلف با شرایط متفاوت بهداشتی به گله ها وارد می شوند می توانند منبع بالقوه آلودگی برای گله جدید باشند.

خطر بیماری مشترک

کلامیدوفیلا آبورتوس از پاتوژنهای زئونوتیک بالقوه برای انسان محسوب می‌شوند در اغلب موارد سقط های انسانی ناشی از کلامیدوفیلا آبورتوس، سابقه تماس نزدیک با گوسفند یا بز آلوده بوده است. نتیجه آلودگی خانم های باردار در سه ماهه اول بارداری، سقط حتمی است در حالیکه آلودگی بعد از این زمان منجر به مرده زایی و یا زایمان پیش از موعد می باشد. بنابراین خانم های باردار می بایست از گوسفندان و بزها در فصل زایمان و نوزادان آنها اجتناب کنند و همچنین از تماس با لباسهای افرادی که با این دام ها سروکار دارند نیز جهت جلوگیری از آلوده شدن باید دوری نمایند. افرادی که به هر دلیل دارای سیستم ایمنی مناسب نیستند باید از هرگونه تماس با منابع این آلودگی دوری نمایند.

تشخیص

تشخیص بر پایه تاریخچه، علائم بالینی و نشان دادن جرم در ترشحات سقط و جنین سقط شده می باشد. بهترین نمونه برای مقاصد باکتری شناسی، تهیه یک گسترش کوتیلودون های جفت که دارای جراثیم و التهاب می باشند است. هر چند تهیه گسترش از جفت ها ارجحیت دارد لیکن می توان از محتویات شیردان جنین سقط شده یا ترشحات واژن گوسفند تا 24 ساعت و بز تا 3 روز بعد از سقط گسترش مستقیم تهیه کرد. سوآب باید به صورت کامل به دیواره ها و کف واژن کشیده شود.

جدول شماره 6- نمونه های مناسب جهت تشخیص کلامیدوفیلا آبورتوس با روشهای مختلف

خون	مایعات جنین سقط شده			سوآب واژن	جفت	
	حفره بطنی	قفسه سینه	شیردان			
-	±	±	±	±	+++	باکتری شناسی
تعیین پادگن						
-	+	+	+	+	+++	ایمنوفلورسنس
-	+	+	+	+++	±	الایزا
-	±	±	±	+++	±	PCR
جدا سازی عامل						
-	+	+	+	+++	+	تخم مرغ جنین دار
-	-	-	-	+++	+	کشت سلول
سرم شناسی						
+++	-	-	-	-	-	CFT
+++	-	-	-	-	-	الایزا
+++	-	-	-	-	-	ایمنوفلورسنس

+++ : نمونه بسیار مناسب؛ + : نمونه ای که می توان از آن استفاده کرد اما ممکن است نتیجه خوبی ندهد؛

± : نمونه ای که استفاده از آن مشکل است؛ - : نمونه غیر مناسب

تشخیص مستقیم

تشخیص با استفاده از روش های باکتری شناسی

برخی از روش های رنگ آمیزی، جهت تشخیص کلامیدیا به کارگرفته می شوند. این روش ها سریع بوده و قابل اجرا در بیشتر آزمایشگاه ها می باشند، با این وجود اغلب اوقات تفسیر نتایج حاصل از آنها دشوار است. مهم ترین مشکل این روش ها، پایین بودن میزان حساسیت و ویژگی آنها است، البته مزیتی که می توان به آن اشاره کرد این است که ماندگاری رنگ بر روی لام ها خوب است، بنابراین می توان آن ها را جهت تأیید تشخیص به آزمایشگاه های مخصوص ارسال کرد.

قاعده کلی آزمایش

در گسترش تماسی تهیه شده از نمونه هایی که با روش های stamp، Gimenez، Machiavello یا گیمسا رنگ آمیزی شده و توسط میکروسکوپ با درشت نمایی بالا بررسی شده اند، کلامیدیا به صورت ساختار های کوکسی شکل روشن (منفرد یا گروهی) مشاهده می شود. (روشی که در این بخش بیان می شود شکل تغییر یافته روشی است که در فصل بروسلوز توضیح داده شد)

روش رنگ آمیزی استامپ

مواد و معرف ها

- 1- میکروسکوپ، عدسی چشمی 10X، عدسی روغنی
- 2- محلول فوشین پایه
- 3- استیک اسید 0/3%
- 4- مالاشیت گرین 1% در آب غیر یونیزه

روش کار (تصویر 8)

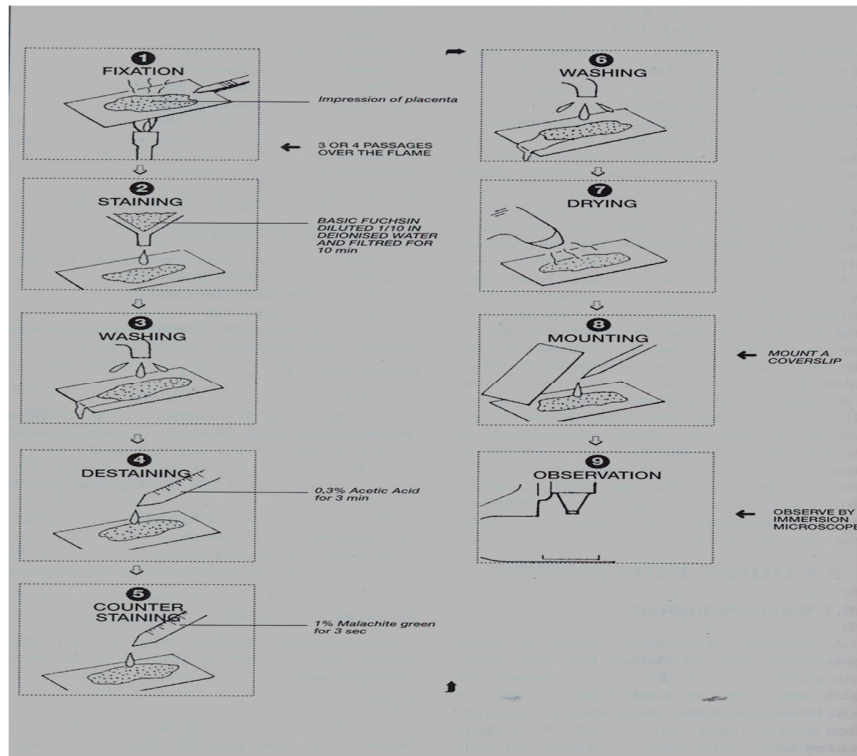
- محلول فوشین پایه
- 1- لام را به وسیله شعله ثابت کنید.
- 2- سپس آن را به مدت 10 دقیقه در محلول فوشین پایه که با نسبت 1/10 در آب غیر یونیزه، رقیق و فیلتر شده است، قرار دهید.
- 3- آن را با آب به خوبی بشوید.
- 4- سپس با استفاده از استیک اسید 0/3٪ به مدت 30 ثانیه رنگ بری را انجام دهید.
- 5- با محلول مالاشیت گرین برای مدت 30 ثانیه رنگ آمیزی کنید.
- 6- آن را با آب به خوبی بشوید.
- 7- لام را خشک کنید و آن را در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کنید.

خواندن نتایج

باکتری ها به شکل اجسام قرمز روشن در زمینه ای سبز آبی مشاهده می شوند.

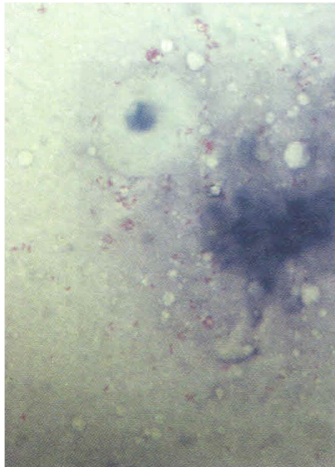
توجه!

محلول رقیق شده ای که از فوشین پایه تهیه شده است نباید بیشتر از یک هفته نگهداری شود. بنابراین آن را بلافاصله بعد از تهیه روی لام صاف کنید، چرا که حضور رگه ها یا کریستال های کوچک رنگ، می تواند باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب شوند.

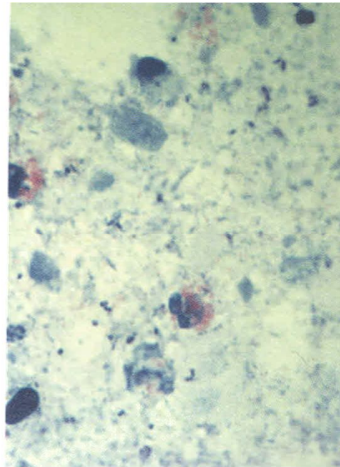


تصویر شماره 8- تشخیص بر اساس روش های باکتری شناسی. رنگ آمیزی با روش استامپ جهت تشخیص کلامیدیا.

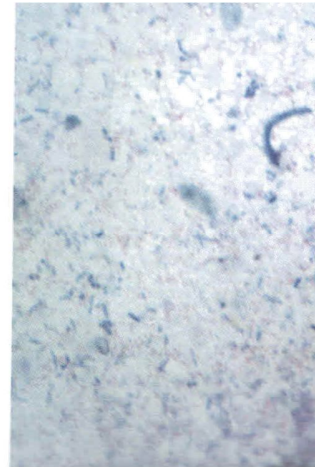
- بسته به ضخامت نمونه، مدت زمان رنگ بری با استفاده از استیک اسید و رنگ آمیزی با استفاده از مالاشیت گرین می تواند متفاوت باشد.
- مشاهده نتایج با استفاده از میکروسکوپ خسته کننده، سخت و نیازمند تجربه فردی می باشد بطوریکه باید بتوان کلامیدیا را از کوکسیلا و بروسلا تفریق کرد.
- باید در کنار آزمایش های باکتری شناسی، سایر آزمایش های سرم شناسی نیز انجام شود تا از تفسیر اشتباه نتایج پیشگیری شود.



1



2



3

تصویر شماره 9- بررسی باکتری شناسی با کمک رنگ آمیزی استامپ برای نمونه های:

(1) نمونه محتویات شیردان دام مبتلا به بروسلوز

(2) نمونه کوتیلودون آلوده به کلامیدوفیلا آبورتوس

(3) نمونه کوتیلودون آلوده به کوکسیلا بورنتی

آماده سازی محلول ها

- محلول a: 1/5 گرم از فوشین پایه را در 15 میلی لیتر اتانول 95٪ حل کنید. سپس آن را صاف و 12-24 ساعت صبر کنید.
- محلول b: آبی که دوبار تقطیر شده را بجوشانید، سپس 2 گرم فنول را در 50 میلی لیتر از این آب حل کنید و محلول حاصل را در محیط مرطوب سرد کنید.
- 10 میلی لیتر از محلول a را با محلول b مخلوط کنید.
- سپس محلول فوق را در داخل بالن حجمی، با استفاده از آبی که دوبار تقطیر شده به حجم 100 میلی لیتر برسانید.
- محلول حاصل را در یک ظرف دهان گشاد ذخیره کنید.

شناسایی جرم: اساساً تشخیص موارد مثبت آلودگی با کلامیدوفیلا آبورتوس، بستگی دارد به سابقه سقط در گوسفند یا بز (اغلب در اواخر آبستنی)، التهاب نکروتیک جفت و وجود تعداد بالای ارگانسم در گسترش های رنگ آمیزی شده از نمونه جفت آلوده. برای نمونه برداری می توان از پشم جنین هایی که رطوبت خود را هنوز از دست نداده اند یا سوآب واژن دام های ماده ای که به تازگی سقط کرده اند، استفاده نمود. باید دقت نمود تا کوتیلودون هایی که در اثر آلودگی به کلامیدوفیلا آبورتوس آسیب دیده اند را با جراحات ناشی از توکسوپلازما گوندی اشتباه نگیریم. همچنین در بررسی های خود باید مراقب شباهت های ساختاری بین کلامیدوفیلا آبورتوس و کوکسیلا بورنتی (عامل تب کیو) باشیم. آنتی ژن کلامیدیا را می توان با روش هایی چون الایزا، ایمونوهیستوشیمی یا آزمون فلئورسنت آنتی بادی شناسایی کرد، درحالی که DNA این باکتری با روش هایی چون PCR یا میکرواری (ریز ارایه) قابل شناسایی می باشد. کیت های تجاری برخی از این روش ها موجود است. کلامیدوفیلا آبورتوس را تنها می توان از سلول های زنده جداسازی نمود، بنابراین باید امکان رشد این باکتری در جنین جوجه یا کشت سلولی (با رعایت اصول ایمنی مربوط به نمونه های خطرناک) را فراهم آورد.

1) تهیه گسترش

در مواردی که بر اساس سابقه گله و شکل جراحات جفت، مشکوک به سقط آنزئوتیک می شویم، می توانیم با بررسی میکروسکوپی، از گسترشی که رنگ آمیزی کرده ایم، جهت تشخیص استفاده نماییم. برای تهیه گسترش باید از بخش های آلوده پرز های پرده های جنینی یا قسمت های مجاور آن استفاده نمود. روش های مختلف رنگ آمیزی وجود دارد، برای مثال می توان به ماکیاولو اصلاح شده، *brucella differential*، یا زیل نیلسن بهبود یافته اشاره کرد. هنگامی که با روش اخیر رنگ آمیزی کرده و سپس با استفاده از یک میکروسکوپ قوی، گسترش تهیه شده را مورد بررسی قرار می دهیم، در صورت مثبت بودن نتیجه، تعداد زیادی اجسام اولیه، کوچک (300 nm) و کوکسی شکل را به صورت انفرادی یا گروهی و به رنگ قرمز در زمینه آبی مشاهده خواهیم کرد. در یک زمینه تیره روشن، اجسام اولیه به رنگ سبز روشن مشاهده می شوند. اگر جفت آلوده جهت تهیه گسترش در دسترس نباشد می توان گسترش را از سوآب واژن دام های ماده ای که طی 24 ساعت گذشته سقط کرده اند، پشم مرطوب جنین سقط شده یا نوزاد مرده به دنیا آمده (که توسط مادرش تمیز نشده باشد)، محتویات شیردان جنین سقط شده یا نوزاد مرده به دنیا آمده تهیه نمود.

اما به طور کلی در این نمونه ها تعداد کم تری ارگانیزم نسبت به جفت وجود دارد. از لحاظ ریخت شناسی ممکن است تفریق کلامیدوفیلا آبورتوس به دلیل شباهت با کوکسیلا بورنتی (عامل تب کیو در انسان) و ریکتزیا مشکل باشد چراکه این باکتری ها نیز گاهی باعث سقط می شوند. بنابراین در مواقعی که سابقه مناسبی از گله در اختیار ما قرار ندارد یا زمانی که جراحات پاتولوژیک بر روی جفت مشاهده نمی شود، در تفریق موارد فوق باید دقت بیشتری به کار ببریم. تفاوت های آنتی ژنیکی بین کلامیدوفیلا آبورتوس و کوکسیلا بورنتی را می توان با استفاده از روش های سرم شناسی تشخیص داد. برای تشخیص کلامیدوفیلا آبورتوس در گسترش هایی که تهیه کرده ایم می توان از آزمون فلئورسنت آنتی بادی (که در آن آنتی سرم اختصاصی یا آنتی بادی مونوکلونال به کار برده می شود) استفاده نمود.

2) شناسایی آنتی ژن

آزمون های مختلفی که بر اساس شناسایی آنتی ژن طراحی شده اند، برای تشخیص جنس های مختلف کلامیدیا به صورت تجاری وجود دارند. در یک ارزیابی مقایسه ای که بر روی نمونه های غیر گوسفندی انجام شد، مشخص گردید که روش الایزا حساسیت بیشتری نسبت به آزمایش فلئورسنت آنتی بادی دارد. همچنین کیتی که لیپوپلی ساکارید (LPS) کلامیدیا را شناسایی می کند نسبت به روش های مبتنی بر الایزا بیشترین حساسیت را دارا می باشد، بنابراین گاهی باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب (مخصوصاً در نمونه مدفوع پرندگان) می گردد. این کیت در نمونه های جفت گوسفند نتایج رضایت بخشی را در اختیار ما قرار می دهد. البته باید توجه نمود که با این روش نمی توان کلامیدوفیلا آبورتوس را از سایر گونه های کلامیدیا که ممکن است نمونه را آلوده کرده باشند تفریق کرد. در مقاطع هیستوپاتولوژی جهت شناسایی آنتی ژن می توان از آنتی بادی های ضد کلامیدیا که بر ضد LPS یا MOMP (پروتئین بزرگ غشاء خارجی) بوده و به صورت تجاری موجود هستند استفاده نمود.

3) DNA

تکثیر DNA کلامیدیا با روش های PCR و real-time PCR امکان پذیر بوده و با استفاده از این روش ها می توان حضور کلامیدیا را در نمونه های بیولوژیک بدون نیاز به کشت دادن تأیید نمود. PCR حساسیت بالایی دارد اما خطر آلودگی های متقاطع بین نمونه ها یا آلودگی های محیطی در دامداری وجود دارد. یک مشکل بالقوه دیگر

ایجاد نتایج منفی کاذب ناشی از مواد مهار کننده در PCR می باشد. روش هایی برای تفريق بين توالی های DNA ناشی از کلامیدوفیلا آبورتوس و *C. pecorum* وجود دارد. در سال های اخیر استفاده از روش real-time PCR به دلیل سرعت بیشتر، توان بالا و سهولت ترجیح داده میشود. اخیراً، روش DNA microarray hybridization که در آن از تیوب های اری با کف ضخیم (پلت فرم) استفاده می شود، می تواند در تشخیص مستقیم و شناسایی ارگانیزم در نمونه های بالینی به کار گرفته شود. آزمون PCR با قطعات محدود چند شکلی موجود است که با این روش می توان دام های آلوده را با دام های واکنش تفکیک کرد.

(4) مقاطع بافتی

می توان در یک مقطع نازک بافتی (کم تر 4 میکرومتر) که با مایعاتی چون بون (bouin) یا carnoy به خوبی ثابت شده است گنجیدگی های داخل سلولی کلامیدیا را با رنگ آمیزی گیمسا مشاهده نمود. همچنین با استفاده از رنگ آمیزی های ایمنی شناسی، نتایج خوبی را می توان بدست آورد. آزمون ایمونوپراکسیداز مستقیم، روش سریع و آسانی است، در حالی که آزمون استرپتاویدین - بیوتین یک روش پیچیده است. استفاده از میکروسکوپ الکترونی با ایجاد کانتر است منفی، می تواند کلامیدوفیلا آبورتوس و کوکسیلا بورتی را از یکدیگر تفریق کند.

(5) جدا سازی جرم

کلامیدوفیلا آبورتوس را می توان از تخم مرغ های جنین دار یا در کشت سلولی جدا سازی نمود، روش اخیر، روش انتخابی برای جداسازی سویه های جدید محسوب می شود. از آنجا که عامل کلامیدوز باعث ایجاد بیماری مشترک با انسان می شود، در جداسازی و به کار گیری روش های تشخیصی لازم است اصول ایمنی در سطح 2 به کار گرفته شود.

می توان از نمونه های بافتی چون کوتیلودون ها، غشا های جفت، ریه یا کبد جنین یا سوآب واژن استفاده نمود. چنانچه پس از نمونه گیری جداسازی جرم با تأخیر صورت گیرد، برای نگه داری موقت نمونه ها باید از محیط های انتقالی مناسب استفاده نمود. برای اینکه بتوان نمونه ها را برای مدت طولانی نگه داری کنید باید آن ها را در دمای 80- یا 20- منجمد نمایید. بهترین محیط ها، ساکارز/فسفات/گلو تامات یا محیط SPG (ساکارز: 74 g/litre ، 0/512 g/litre : KH_2PO_4 ، 1/237 g/litre : K_2HPO_4) و ال-گلو تامیک اسد (0/721 g/litre) می باشد که

می توان از مکمل هایی چون سرم جنین گاوی 10٪، آنتی بیوتیک (استرپتومایسین و جنتامایسین مناسب هستند در حالی که پنی سیلین مناسب نیست) و ممانعت کننده های رشد قارچ نیز استفاده نمود (آمفوتریسین B). نسبت بافت به محیط 1/10 می باشد و متناوباً 1 گرم بافت در زمینه sand سترون و در 8 میلی لیتر محیط انتقالی به کار برده می شود.

جنین جوجه: نمونه های مورد آزمایش با استفاده از سوسپانسیون 10٪ در آبگوشت مغذی حاوی استرپتومایسین (نباید از پنی سیلین استفاده کرد) (200 μ g/ml) آماده می شوند؛ 0/2 ml سوسپانسیون در کیسه زرده جنین های 6-8 روزه تلقیح می شود و سپس در دمای 37 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری می شوند. جنین های آلوده 4 تا 13 روز بعد از تلقیح تلف می شوند. سپس با تهیه گسترش از غشاء عروقی کیسه زرده می توان تعداد اجسام اولیه را مشخص نمود.

کشت سلول ها: کلامیدوفیلا آبورئوس را می توان در انواع مختلفی از سلول ها جداسازی نمود. اما از سلول های McCoy، Buffalo Green Monkey (BGM) یا سلول کلیه نوزاد همستر (BHK) بیشتر استفاده می شود. برای تأیید تشخیص از تعلیق کشت سلول تک لایه ای در محیط رشد با غلظت 2×10^5 سلول در هر میلی لیتر استفاده می شود. قسمتی از 2 میلی لیتر سوسپانسیون در بطری های شیشه ای با کف صاف که هریک دارای یک پوشش منفرد 16 میلی متری می باشند، توزیع می شود. هم ریز شدن پوشش های تک لایه بعد از گرم خانه گذاری به مدت 24 ساعت و در دمای 37 درجه سانتی گراد، ایجاد می شود. محیط رشد با 2 میلی لیتر آزمون تلقیح جابه جا و جایگزین می شود، سپس برای تشخیص آلودگی با دور 25000 g به مدت 30 دقیقه در پوشش تک لایه سانتریفوژ می شود. تک لایه های پوشش دار بعد از اینکه به مدت 2 تا 3 روز گرم خانه گذاری شدند، در متانول ثابت شده و با گیمسا یا Gimenez رنگ آمیزی می شوند. در این هنگام کشت های آلوده حاوی اجسام بازوفیلیک (در رنگ آمیزی گیمسا) یا ائوزینوفیلیک (در رنگ آمیزی Gimenez) می باشند. روش های مشابه دیگری نیز جهت تشخیص آنتی ژن کلامیدوفیلا آبورئوس وجود دارد، برای مثال آزمون فلئورسنت آنتی بادی می تواند مورد استفاده قرار گیرد که به اندازه روش های قبلی با ارزش می باشد.

می توان با انجام درمان های شیمیایی سلول های کشت داده شده، فعالیت کلامیدیا ها را افزایش داد. برای رشد اختصاصی کلامیدیاها، مواد مختلفی که برای اتصال به تلقیح توضیح داده شده است، قبل یا در طی آلودگی استفاده می شود. تک لایه های پوشش داری که در معرض قرار می گیرند شامل سیکلو هگزیمید (0/5 μ g/ml) در محیط

نگه دارنده، امتین ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) 5 دقیقه قبل از عفونت، 5 یدو2 داکسی یوریدین ($8 \mu\text{g} / \text{ml}$) سه روز قبل از عفونت می باشند. در مواردی که سلول های پیش شرط در دسترس هستند، روش جداسازی اخیر نیاز به زمان دارد تا اجرام بیشتری به طور موفقیت آمیز جداسازی شوند.

کنترل و درمان

واکسن های مختلفی جهت پیشگیری از این بیماری در دنیا وجود دارد که در حال حاضر در ایران در دسترس نمی باشد. پروتکل های درمانی مختلف بر اساس شرایط و وضعیت گله پیشنهاد می شود که شامل موارد زیر می باشد:

1- برای تزریق به هر کدام از دامها می توان از اکسی تتراسیکلین طولانی اثر با میزان 20 میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل عضلانی و هر 14-10 روز تا پایان آبستنی استفاده کرد.

2- در گله های بزرگ که تزریق مشکل است می توان از تتراسیکلین خوراکی با میزان 400-500 میلی گرم به ازاء هر راس در هر روز برای مدت 2 هفته استفاده کرد.

3- در شرایطی که توان انجام پروتکل های درمانی فوق وجود ندارد و یا به هر دلیل نمیتوان تزریق های متوالی انجام داد، روش دیگری توصیه شده که بدین صورت می باشد: یک بار تزریق اکسی تتراسیکلین طولانی اثر در 6-8 هفته قبل از زایمان و یک تزریق 3 هفته بعد از زایمان.

4- در گله هایی که به صورت مزمن آلوده به کلامیدیا می باشند می توان از تجویز خوراکی تتراسیکلین با میزان 250-500 میلی گرم به ازاء هر راس در هر روز در زمان 60 روز قبل از شروع زایمان ها استفاده کرد. این پروتکل تا حد زیادی به کاهش سقط ها در گله کمک می کند.

5- جداسازی دام های سقط کرده از سایر جمعیت گله.

سالمونلوز

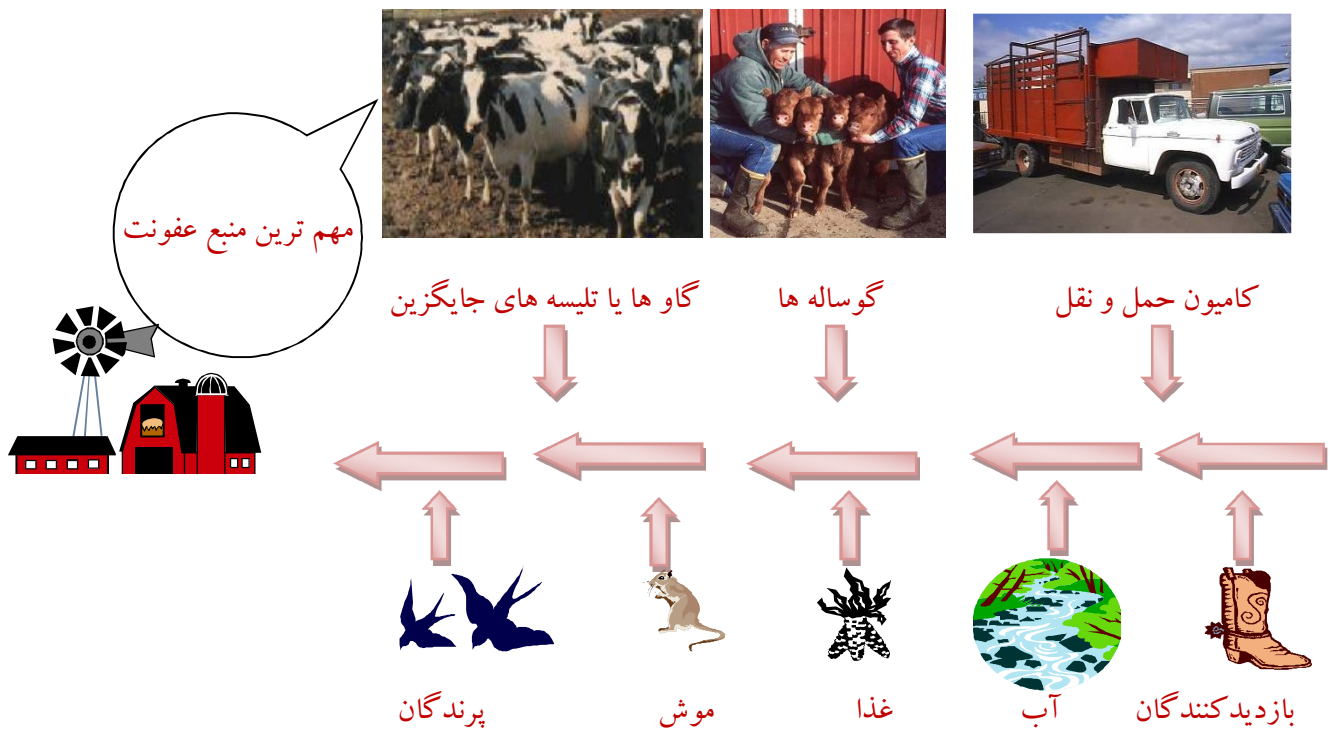
سالمونلا ها باکتری های میله ای شکل گرم منفی هستند. سالمونلوز اغلب در حیوانات به دنبال استرس های حمل و نقل، گرسنگی، تراکم و آبستنی بروز می کند. گوسفند میزبان اختصاصی سالمونلا آبورتوس اوویس و گاو سالمونلا دابلین میباشند که عفونت معمولاً توسط دام آلوده به گله وارد می شود. باکتری به مقدار زیادی در جفت، ترشحات واژنی و جنین سقط شده وجود دارد و دام های مبتلا تا مدتی بعد از سقط، عامل بیماری را از راه واژن دفع می کنند.

بیماری زایی

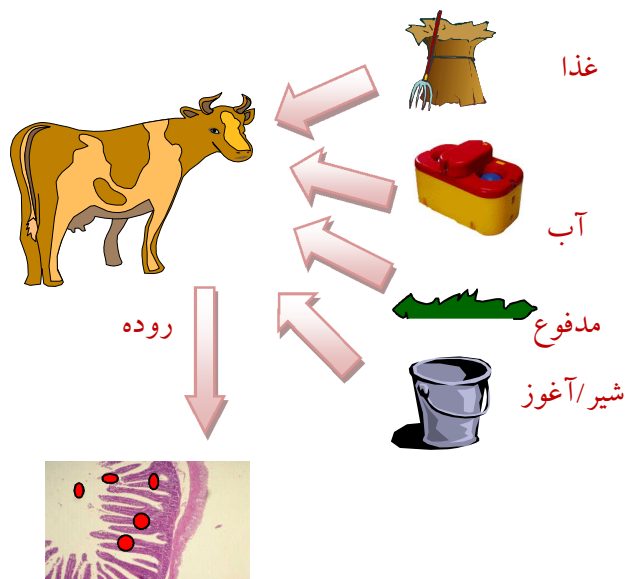
سقط به طور معمول با دو روش رخ می دهد: یکی اینکه باکتری سبب ضایعات در اپیتلیوم دستگاه گوارش می شود که آزاد شدن پروستاگلاندین ها را به همراه دارد و به دنبال آن جسم زرد از بین رفته و سقط، دو الی سه روز بعد ایجاد می شود. طریق دیگر به این شکل است که سپتی سمی مادری سبب موضعی شدن ارگانیسم در بافت های مختلف از جمله رحم آبستن می شود. باکتری در بافت کوتیلودون ها تکثیر کرده و سبب نکروز آن و در نتیجه سقط می شود.

همه گیر شناسی

تصویر شماره 10- راه های ورود سالمونلا به دامداری



تصویر شماره 11- راه های آلودگی دام:



علائم بالینی

علائم بستگی زیادی به سروتپ سالمونلا دارد. در موارد سالمونلا آبورتوس اویس و و سالمونلا مونته ویدیو بارزترین علامت، سقط در شش هفته آخر آبستنی است. بروز سقط به دنبال تب خفیف و بی اشتها می گذرا خواهد بود. برخی میش ها بعد از سقط به مننژیت مبتلا شده و می میرند. مرگ و میر بره ها نیز یکی از علائم شیوع بیماری محسوب می شود. میزان سقط جنین در میش ها حدود 15-25 درصد است و میش هایی که سقط می کنند نسبت به بیماری مصونیت پیدا می کنند. گوسفندهای آبستنی که در 4 ماهگی یا بعد از آن آلوده می شوند به طور معمول جنین های سالم به دنیا می آورند.

در مناطقی که عفونت آندمیک است، سقط به میش های جوان و شکم اول محدود می شود. سقط ناشی از سالمونلا مونته ویدیو، با بیماری مختصری به صورت بی حالی و افسردگی در میش ها همراه بوده و ترشحات واژنی متعفن و گود افتادن گودال تهی گاه می توانند از اولین نشانه های سقط باشند. آلودگی به سالمونلا تیفی موریوم با نشانه های آنتریت حاد و بیماری سیستمیک مشخص میگردد. در میش های آبستن عفونت منجر به بی اشتها، اسهال خونی، افسردگی شدید، دندان قروچه و مرگ ناگهانی به علت سپتی سمی می شود. سقط ناشی از این سالمونلا، به فراوانی با بیماری صاحب دام یا کارگران دامپروری، سگ های گله و سایر دامها مانند گاو، توأم می گردد. عفونت با سالمونلا دابلین مشابه سالمونلا تیفی موریوم است. مرگ در بره ها تا سن 7 روزگی به صورت یک چهره بیماری خود نمایی می کند.

علائم کالبدگشایی

جفت و جنین معمولاً تازه بوده و ضایعه ای در آن ها دیده نمی شود. در اغلب بره هایی که مرده به دنیا می آیند یا یک هفته بعد از تولد تلف می شوند، آنتریت حاد و تورم حاد شیردان در کالبدگشایی آن ها دیده می شود.

کنترل و پیشگیری

در حال حاضر واکسن تجاری در دسترس در ایران وجود ندارد.

یک واکسن کشته سالمونلا دابلین و سالمونلا تیفی موریوم در گاو ها مورد استفاده و تأیید قرار گرفته است. این واکسن در گوسفند ها نیز در هنگام مواجهه با سالمونلوز می تواند مورد استفاده قرار گیرد. در این موارد 2 یا 3 تزریق از دز 2 میلی لیتری واکسن به فاصله 10 روز در میش هایی که هنوز نرزییده اند، حفاظت ایجاد می کند. در زمان رخداد سقط، جداسازی دامهای مبتلا برای محدود کردن آلودگی محیط و کاهش احتمال انتقال به سایر دامها گله با ارزش خواهد بود. در مواجهه با سقط ناشی از سالمونلا مونته ویدیو، درمان همه میش های گله با دو بار تزریق اکسی تتراسیکلین طولانی اثر به فاصله 7 روز، میزان بروز بیماری را کاهش می دهد. همچنین به علت احتمال حضور سالمونلا ها در مدفوع گاو ها و طیور، مناطقی که در آن ها از مدفوع این دامها برای حاصلخیز کردن خاک استفاده شده است، نباید برای چرای میش های آبستن مورد استفاده قرار گیرد.

تشخیص

تشخیص بر اساس کشت محتویات معده جنین، جفت و یا ترشحات واژن انجام خواهد شد. جنین سقط شده، اگر جفت و ترشحات واژنی نیز همراه با آن اخذ شود بهترین نمونه برای تشخیص می باشد.

جمع آوری نمونه

جنین سقط شده

هر بافتی از جنین سقط شده جهت جداسازی سالمونلا مناسب می باشد. مغز و محتویات معده جنین بهترین نمونه برای تشخیص سالمونلا می باشند چرا که علاوه بر آنکه به میزان زیادی آلودگی در خود دارند به جهت موقعیت آناتومیکی خود نیز از آلودگی های ثانویه که ممکن است جنین با آنها آلوده شود برای مدت زیادی در امان می باشند. این نمونه ها همراه با دیگر بافتهای جنین مثل کبد، طحال، ریه و کلیه باید به صورت استریل جمع آوری و در ظرفهای استریل به آزمایشگاه حمل شوند.

جفت

از آنجا که همه کوتیلودون ها به یک میزان آلودگی ندارند بهتر است بین 10-5 کوتیلودون از هر جفت جمع آوری شود. اگر جفت به شدت با خاک و بستر آلوده شده است می توان با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل آن را

شستشو داد و با استفاده از کاغذهای استریل رطوبت گیر آن را خشک کرد. کوتیلودون های اخذ شده از جفت باید در حجم مساوی با محلول سرم فیزیولوژی استریل آسیاب شده و برای کشت میکروبی مورد استفاده قرار گیرد.

نمونه های واژنی

سواب های واژنی نیاز به آماده سازی خاصی ندارند با این حال اگر سواب ها خشک شده اند یا تعداد آنها زیاد نیست می بایست با استفاده از 1 سی سی محلول سرم فیزیولوژی استریل، از سواب های آغشته به ترشحات دستگاه تناسلی دام سقط کرده، سوسپانسیون تهیه کرد و در محیط کشت از آن استفاده کرد.

سواب ها می توانند برای چند روز در دمای یخچال (4 درجه سانتی گراد) و برای چند هفته در دمای فریزر (20- درجه سانتی گراد) نگهداری شوند، بدون آنکه تاثیر چندانی بر روی جدا سازی سالمونلا ها داشته باشد.

نمونه خون

نمونه های خون باید به صورت استریل و با استفاده از لوله های استریل در خلال 8 هفته بعد از سقط یا تولد نوزادان ضعیف جمع آوری شوند. بهترین زمان برای انجام آزمون های سرم شناسی، 4 هفته بعد از سقط جنین می باشد. نمونه ها باید از تعداد حداقل 10 دام سقط کرده در گله جمع آوری شوند. اگر این تعداد دام در زمان نمونه گیری وجود نداشت لازم است از تعدادی دام آبستن سنگین گله نیز نمونه گیری شود. اگر دام های سقط کرده در گله مشخص نیستند و نمونه گیری، بعد از گذشت چند روز از وقوع سقط گله می گذرد و دام های سقط کرده در دسترس نمی باشند لازم است از تعداد حداقل 20 دام بالغ ماده گله، نمونه گیری به عمل آید.

شناسایی جرم: تشخیص جرم بر پایه جداسازی ارگانسیم از بافت (حتی بافت هایی که به صورت غیر سترون در زمان کالبدگشایی تهیه شده اند) یا از مدفوع و سواب مقعدی می باشد. همچنین می توان از نمونه های محیطی، غذا و علوفه نیز باکتری را جداسازی نمود. با استفاده از آزمایش های سرم شناسی می توان آلودگی های قبلی یا آلودگی فعلی دام ها به سرووار های سالمونلا را تشخیص داد. زمانی که اندام های تولید مثلی آلوده می شوند و همچنین زمانی که سقط یا آلودگی جنین اتفاق می افتد، کشت از محتویات معده جنین، جفت و سواب واژن الزامی است. سالمونلا ها با استفاده از روش های متنوعی جداسازی می شوند. این روش ها شامل پیش غنی سازی

محیط جهت احیا کردن سالمونلا های آسیب دیده، غنی سازی محیط با مواد ممانعت کننده که باعث سرکوب کردن رشد سایر ارگانسیم ها می گردد و استفاده از آگار پلیت انتخابی برای تفریق سالمونلا از سایر انتروباکتر ها می باشد.

آزمایش های بیوشیمیایی، سرم شناسی و مولکولی متنوعی برای تهیه کشت خالص وجود دارد، که به منظور تأیید قطعی سویه سالمونلای جدا شده مورد استفاده قرار می گیرند. سالمونلا ها دارای آنتی ژن های پیکری (O)، تاژکی (H) و حدت (V) هستند. این آنتی ژن ها با استفاده از سرم تایپینگ اختصاصی شناسایی می شوند. با رجوع به فرمول آنتی ژنیک در جدول کافمن - وایت، می توان سرووار ها را شناسایی نمود. بسیاری از آزمایشگاه ها نمونه های جداسازی شده را به آزمایشگاه های مرجع ارسال می کنند، تا بدین وسیله هویت کامل سرمی تأیید و تیپ فاژ و ژنوتیپ سویه مشخص شود.

نمونه گیری های متناوب و همینطور نوع نمونه هایی که جمع آوری می شوند تا حد زیادی بستگی دارند به:

- اهداف برنامه آزمایش (از جمله هر گونه الزامات قانونی)
- نشانی های بالینی
- سطح تشخیص یا دقتی که در تخمین میزان شیوع به کار رفته است
- هزینه ها
- در دسترس بودن منابع نمونه گیری و امکانات آزمایشگاهی
- جهت راهنمایی روش های نمونه گیری برای تولید اولیه و همینطور آماده سازی نمونه ها در آزمایشگاه، استاندارد ISO جدید تهیه شده است.

تهیه نمونه های انفرادی برای آزمایش های باکتری شناسی در مواردی که در دام نشانه های بالینی مشاهده می شود و یا جهت مونیتورینگ دام ها، باید تا آنجایی که ممکن است به صورت سترون انجام پذیرد. همچنین لازم است که

نمونه ها را قبل از هرگونه اقدام درمانی با آنتی بیوتیک جمع آوری نمود. بهتر است که نمونه های بالینی در مرحله حاد بیماری یا بلافاصله پس از مرگ دام تهیه شوند.

مراقبت های لازم جهت جلوگیری از آلوده شدن نمونه ها در زمان نمونه گیری، حمل و نقل و همینطور در آزمایشگاه باید به خوبی اعمال شود. نمونه های بسته بندی شده باید سرد نگه داری شوند و اطلاعات لازم همراه آن ها موجود باشد. در مورد دام های کوچک تر، در صورت امکان بهتر است تعدادی از دام های بیمار یا دام هایی که به تازگی تلف شده اند را به آزمایشگاه ارسال نمود. جداسازی سرووار های عادت یافته به میزبان از مدفوع معمولاً کار دشواری است، در این موارد از بافت های آلوده کشت تهیه می شود.

باید به دام هایی که مبتلا به شکل تحت حاد سالمونلوز شده اند توجه ویژه ای شود، چراکه این دام ها باعث دفع سالمونلا به طور متناوب و با تعداد کم می شوند. از جمله مواردی که می تواند حساسیت تشخیص را افزایش دهد شامل افزایش اندازه و تعداد نمونه ها که باعث تشخیص اختصاصی تری می گردد، ترکیب کردن نمونه های مربوط به چند دام و تکرار نمونه گیری ها می باشد. در این شرایط روش های باکتری شناسی و سرم شناسی بیشتر از اینکه موارد انفرادی آلودگی را تشخیص دهد، جهت تشخیص گله های آلوده به کار گرفته می شود.

● کشت

روش های متنوعی جهت جداسازی سالمونلا وجود دارد. روش کشت در محیط که بهترین روش در شرایط تشخیصی خاص است، به عوامل متعددی بستگی دارد که از جمله این عوامل می توان به سرووار سالمونلا، نوع و منشأ نمونه ها، گونه حیوان، تجربه فرد آزمایشگر و در دسترس بودن محیط غنی شده انتخابی و محیط پلیت انتخابی اشاره کرد.

تمامی محیط های کشت باید از لحاظ کیفیت کنترل شده و با یک تلقیح کوچک در حضور ماتریکس نمونه های مربوط، باعث رشد ارگانیزم شود. اگر به جای نمونه های رایج از سویه های مرجع معمول استفاده گردد و روش های غیر دقیق مورد استفاده قرار گیرد، ممکن است باعث آلودگی متقاطع نمونه ها شود. بنابراین باید از سرووار کمیاب با رشد واضح که بیشترین شباهت را به سویه های هدف دارد استفاده شود. همچنین ممکن است از سویه هایی با مقاومت ضد میکروبی یا نشانگر های پروتئینی فلئورسنت سبز استفاده شود. افزایش کیفیت برنامه های

کاربردی باعث استفاده بیشتر از روش های استاندارد بین المللی مانند ISO 6579:2002 می شود. حتی اگر برای نمونه های مدفوع و نمونه های محیطی معتبر نباشد، اما برای مواد غذایی کاربرد دارد. در سال های اخیر، یک روش استاندارد برای تشخیص سالمونلا در تولیدات اولیه دام، توسعه یافته و مورد ارزیابی قرار گرفته شده است و یک روش ISO (ISO 6579:2002 Annex D) امروزه مورد استفاده قرار می گیرد. روش استاندارد براساس پیش غنی سازی در بافر آب پپتونه، غنی سازی در محیط نیمه جامد اصلاح شده راپاپورت - (MSRV) vassiliadis، جداسازی در گزیلوز- لیزین- داکسی کولات و استفاده از یک پلیت محیط انتخابی می باشد. مشخص شده است که این روش اثر زیادی بر تولیدات غذایی و گوشتی دام ها دارد. همچنین این روش آسان تر و ارزان تر از روش کامل ISO است.

الف) محیط پیش غنی شده

تعداد سالمونلا ها در دام های بدون علامت بالینی، نمونه های محیطی، خوراک دام (animal food and feed) معمولاً کم است، بنابراین لازم است که از محیط پیش غنی سازی مانند بافر آب پپتونه یا براث پیش غنی سازی شده عمومی، جهت کمک به جداسازی جرم استفاده شود. به این وسیله تعداد کم سالمونلا ها تکثیر می یابند. همچنین سالمونلا هایی که در اثر انجماد، حرارت، خشک شدن، زیست کش ها، اسید های ارگانیک، باکتریوسین ها و فاز ها به صورت sub lethally آسیب دیده اند، احیا می شوند. پیش غنی سازی بهترین روش برای جداسازی سویه های حاد سالمونلا (مانند سویه های عادت یافته به میزبان) از مدفوع نیست، چراکه سایر ارگانیسم ها به صورت رقابتی در طی پیش غنی سازی غیر انتخابی، دارای رشد بیش از اندازه هستند.

ب) محیط غنی شده

محیط غنی شده، مایع یا آگار نیمه جامد است و شامل افزودنی هایی می باشد که به طور انتخابی اجازه رشد سالمونلا را می دهد در حالی که از رشد سایر ارگانیسم ها جلوگیری می کند. با این وجود برخی از این محیط های غنی شده برای برخی از سرووار های سالمونلا نسبتاً سمی هستند. از جمله اینکه سلنیت از رشد S.Choleraesuis ممانعت می کند و بریلینت گرین نیز برای بسیاری از سویه های S.Dublin سمی می باشد. از افزایش درجه حرارت نیز برای بالا بردن انتخابی بودن محیط غنی شده استفاده می شود. برای مثال تتراتیونات و راپاپورت -

vassiliadis در دمای 43 درجه سانتی گراد از رشد سویه های حساس به حرارت به خصوص S.Dublin ممانعت می کند. امروز برای گرم خانه گذاری محیط راپاپورت-vassiliadis با پایه براث، دمای 41/5 درجه سانتی گراد توصیه می شود. محیط حرکت غنی شده انتخابی برای افزایش حساسیت جداسازی سالمونلا استفاده می شود. همچنین محیط نیمه جامد غنی شده مانند MSR/V یا محیط تشخیصی نیمه جامد سالمونلا (DIASALM) دارای حساسیت بیشتری می باشند. فرمولاسیون محیط ها ممکن است گاهی بین تأمین کنندگان یا حتی دسته های مختلف متفاوت باشد. همچنین دما، مدت گرم خانه گذاری و حجم نمونه ای که برای تلقیح به محیط، مورد استفاده قرار می گیرد، همگی بر میزان جداسازی جرم مؤثر می باشند. بنابراین چنین متغیرهایی همیشه باید مد نظر قرار بگیرند. از جمله محیط های انتخابی غنی شده می توان سدیم تتراتیونات به عنوان براث مولر-کافمن، سلنیت F، سلنیت سیستین، براث بریلینت گرین، براث راپاپورت-vassiliadis یا محیط نیمه جامد راپاپورت-vassiliadis را نام برد.

گاهی بهتر است بیش از یک براث انتخابی به کار برده شود، یا اینکه با پیش غنی سازی و غنی سازی انتخابی مستقیم (یا پلیت مستقیم) کشت تهیه کرد، که البته در اکثر موارد این اقدامات از نظر هزینه های اضافی به صرفه نمی باشد. می توان از افزودنی هایی مانند فریوکسالین E به محیط انتخابی استفاده نمود. این افزودنی باعث افزایش جداسازی سالمونلا از آهن یا نمونه های محدود شده مواد غذایی مانند تخم مرغ، آب یا خاک می گردد. همچنین افزودن آنتی بیوتیک هایی مانند نوویوسین می تواند باعث سرکوب شدن رشد اکثر ارگانیزم های گرم مثبت یا سایر باکتری های گرم منفی مانند پروتئوس شود. افزودن آنتی بیوتیک های اختصاصی می تواند باعث افزایش جداسازی سویه هایی از سالمونلا ها که مقاوم به ضد میکروب ها هستند، شود.

ج) محیط پلیت انتخابی

این محیط ها جامد و آگار انتخابی هستند و باعث رشد باکتری ها با درجات مختلف می گردد. این محیط ها از رشد سایر باکتری ها به غیر از سالمونلا ها جلوگیری می کنند و اطلاعاتی نیز در مورد اختلافات بیوشیمیایی مهم در اختیار قرار می دهند. معمولاً لاکتوز را تخمیر نکرده و هیدروژن سولفید تولید نمی کند. نتایج 24-48 ساعت پس از کشت دادن در دمای 37 درجه سانتی گراد قرائت می شود. در چنین محیطی کلونی های سالمونلا از کلونی های

متعلق به سایر باکتری ها قابل تفریق است، البته گاهی موارد استثنا نیز در مورد باکتری های پروتئوس، پزودوموناس، سیتروباکتر و هافنیا وجود دارد که در این صورت تفریق کلونی سالمونلا از این باکتری ها امکان پذیر نیست.

گاهی ممکن است سالمونلا هایی که لاکتوز را تخمیر کرده و تولید H_2S می کنند نیز جداسازی شوند. هنگامی که از محیط نیمه جامد انتخابی استفاده می شود، شناسایی چنین سویه های غیر معمولی به خوبی صورت می گیرد. در این موارد می توان از محیط DIASALM استفاده نمود که جهت تأیید تشخیص، آزمون آگلوتیناسیون اسلاید به کار گرفته می شود. در این آزمون از آنتی ژن های چند ظرفیتی O و H یا آنتی سرم های اختصاصی که کلونی از ناحیه رشد در پلیت به محیط مایع منتقل می شود. برای این منظور از پلیت هایی مانند آگار دس اکسیلات سترات (DCA) یا آگار بیسموت سولفیت (BS) استفاده می شود. اگرچه در این محیط ها موارد مثبت کاذب افزایش می یابند. سالمونلا آبورتوس اویس یک سرووار کند رشد است و برای جداسازی این سرووار، معمولاً پلیت ها را تا 72 ساعت گرم خانه گذاری کرده و از محیط بلاد آگار غیر انتخابی استفاده می شود. از جمله محیط های انتخابی شامل آگار بریلینت گرین، آگار گزیلوز- لیزین- دس اکسیلات، آگار داکسی کولات/ سترات و آگار بیسموت سولفیت می باشد، اگرچه بسیاری از آن ها ممکن است در literature و محیط کاتالوگ یافت شوند.

امروزه طیف وسیعی از محیط های آگار کروموزنیک مانند آگار Rambach، SMID و ASAP موجود می باشد. بسیاری از این محیط ها می توانند کلونی های مشکوک را از یکدیگر تفریق کنند اما باید ماتریکس های نمونه، سیستم های کشت و طیف سرووار های مورد استفاده معتبر باشد چراکه حساسیت پائینی دارد.

کمپیلوباکتریوز

کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه ونرالیس که باکتری گرم منفی است که عامل سقط جنین در گاو، گوسفند و بز می باشد. کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه فتوس در گوسفند و بز سبب سقط جنین واگیردار یا انفرادی می شود در حالیکه کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه ونرالیس در گاو موجب ناباروری خواهد شد. اهمیت این گونه در سالهای اخیر به علت استفاده از تلقیح مصنوعی در گاو شیری کاهش یافته که علت آن به کارگیری آنتی بیوتیک در صنعت مذکور می باشد.

گاو نر می تواند برای تمام عمر ناقل بیماری باشد بدون آنکه تداخلی با تولید مثل و کفایت منی داشته باشد. درصد آبستنی در گله کم می شود، مرگ جنین ممکن است قبل از شناخت مادری از آبستنی (MRP) ایجاد شود، که در نتیجه ماده گاو مبتلا به طور مرتب به سیکل برمی گردد (سه هفته بعد از جفت گیری). در صورتی که مرگ جنین بعد از شناخت مادری آبستنی ایجاد شود سیکل های 25 تا 35 روز زیاد دیده می شود. بنابراین مهم ترین چهره بیماری که توسط دامدار توضیح داده می شود، برگشت منظم و غیر منظم به فحلی است. تعداد کمی از ماده گاوهای حساس و تلیسه که با گاو نر آلوده جفت گیری کرده اند، نوزاد سالم به دنیا می آورند. ایمنی به تدریج ایجاد می شود و ماده گاوها آبستن باقی می مانند و در نهایت بعد از متوسط 5 بار جفت گیری، گاوها آبستن می شوند و زایمان می کنند.

به طور کلی می توان گفت کمپیلوباکتریوز در گاو با نشانه های ناباروری، کاهش آبستنی و سقط جنین همراه است. در ماده گاو عفونت ابتدا حاد است و به تدریج مزمن می شود. ناباروری با مرحله حاد همراه است و سقط جنین در مرحله مزمن اتفاق می افتد. سقط جنین ممکن است در دوره عفونت حاد نیز ایجاد شود. کمپیلوباکتریوز تناسلی گاو از نظر بالینی با ناباروری و سقط جنین انفرادی در ماه های آخر آبستنی تظاهر می کند که اغلب منجر به عفونت مزمن گردن رحم و مهبل می شود.

سقط جنین های انفرادی در ماه 4 تا 8 آبستنی، همراه با ترشحات فرج، ادم خفیف فرج و برخی اوقات بزرگ شدن پستان مشاهده می شود. به طور کلی سقط جنین در گله های آلوده، پائین و حدود 5-10 درصد است.

خطر بیماری مشترک

اغلب عفونت های انسانی از طریق مصرف آب آلوده، شیر غیر پاستوریزه و سایر محصولات لبنی غیر پاستوریزه از جمله پنیر، مصرف گوشت مرغ و گوشت قرمز که به خوبی پخته نشده باشند، تماس مستقیم با حیوانات خانگی مانند سگ و گربه و پرندگان، تماس های شغلی با گاو و گوسفند و کار در آزمایشگاه رخ می دهد. عفونت با کمپیلوباکتر فتوس در انسان بسیار نادر است و بیشتر در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند بروز می کند. عفونت با این باکتری در زمان بارداری می تواند به جنین منتقل شود و باعث مرده زایی گردد. (مننژیت در بزرگسالان) کمپیلوباکتر ژوژنی یکی از عوامل مهم گاستروانتریت و اسهال می باشد. در کشور ما شیوع این باکتری به عنوان عامل ایجاد کننده اسهال، 10-2 درصد گزارش شده است.

کنترل

جداسازی گله آلوده و غیر آلوده، تلقیح مصنوعی و واکسیناسیون راه های کنترل بیماری است. در گله های شیری بهترین راه کنترل، استفاده وسیع از تلقیح مصنوعی است. آنتی بیوتیک های مختلفی برای کنترل کمپیلوباکتر فتوس در منی مایع و منجمد توصیه شده است. نگهداری منی در 35 درجه سانتی گراد به مدت 40 دقیقه با پنی سیلین استرپتومایسین، لینکومایسین و اسپکتینومایسین سبب کاهش کمپیلوباکتر فتوس در منی آلوده می شود. گاوهای نر مراکز تلقیح باید هر 6 ماه یک بار آزمایش شوند.

درمان

استفاده از آنتی بیوتیک برای درمان گاوهای نر و ماده و منی کاربرد دارد. استرپتومایسین به طور وسیعی برای کنترل کمپیلوباکتر فتوس استفاده می شود. تجویز محلول آبی دی هیدرو استرپتومایسین داخل غلاف آلت تناسلی همزمان با تزریق زیر جلدی آن برای گاو نر به کار می رود. با این وجود سویه های مقاوم به استرپتومایسین نیز وجود دارند. شست و شوی آلت تناسلی و غلاف آن با 8 لیتر آب حاوی 2 درصد آب اکسیژنه و سپس استفاده از پماد حاوی 10 گرم نئومایسین، 4 گرم اریترومایسین و 200 گرم کربوواکس توصیه شده است. تزریق آنتی بیوتیک به تنهایی ارزش محدودی دارد، چون ایمنی طی چند هفته پس از شروع عفونت ایجاد می شود. گزارش شده که درمان و

واکسیناسیون هم زمان و تزریق استرپتومایسین، گاوهای نر مراکز تلقیح مصنوعی را پاک می کند. آنتی بیوتیک چه موضعی و چه عمومی اثرات سودمندی در گاو ماده ندارد.

جمع آوری نمونه

دام نر: در گاو نر ترشحات غلاف قضیب با روشهای مختلفی به دست می آید. اسکراپ، آسپیره کردن و شستشو دادن. ترشحات غلاف قضیب معمولاً با اسکراپینگ به دست می آید و می تواند جهت جدا سازی باکتری استفاده شده و یا آن را در لوله محتوی 5 سی سی محلول PBS در فرمالین 1٪ برای آزمون ایمونوفلئورسنس جمع آوری کرد. مایع منی می تواند از طریق واژن مصنوعی جمع آوری شود که پس از آن، محتویات واژن مصنوعی را می توان با 20-30 سی سی محلول PBS شستشو داده و در ظرف استریل جمع آوری کرد.

برای جمع آوری نمونه از غلاف قضیب می بایست 20-30 سی سی محلول PBS را در آن وارد کرده و پس از گذشت 20-15 ثانیه، محلول را آسپیره کرده و در ظرف استریل جمع آوری می نمائیم.

نمونه منی جمع آوری شده که در PBS غوطه ور است باید مستقیماً روی محیط کشت معمولی یا محیط کشت غنی شده قرار داده شود.

دام ماده: جهت نمونه برداری در دام ماده از ترشحات گردن رحم و واژن استفاده کنید. نمونه ها را با روش آسپیره کردن یا شست و شوی واژن جمع آوری کنید. جهت آسپیره کردن، ناحیه فرج را با دستمال تمیز کنید. سپس یک پیت مخصوص تلقیح مصنوعی یا پیت تلقیح مصنوعی را وارد واژن کنید تا بخش ابتدایی آن به گردن رحم برسد. در هنگام بیرون کشیدن ترشحات، پیت را به آهستگی جلو و عقب ببرید سپس پیت را خارج کنید و ترشحات جمع آوری شده را مستقیماً به محیط کشت یا محیط کشت انتقالی و غنی شده وارد نمایید.

همچنین می توانید نمونه ها را با شست و شوی واژن، جمع آوری کنید: با استفاده از سرنگی که به پیت مخصوص تلقیح مصنوعی متصل است 20-30 میلی لیتر PBS را به آهستگی به داخل واژن تزریق کنید. مایعات را بیرون بکشید و مجدداً 4-5 مرتبه دیگر مایعات را به آهستگی تزریق کنید سپس به طور مستقیم آن را در محیط کشت پخش کرده یا آن را به محیط کشت انتقالی و غنی شده اضافه کنید. می توانید بعد از تزریق PBS با استفاده از یک

تامپون یا گاز استریل که به مدت 5-10 دقیقه در داخل واژن نگهداری شده است مایع شست و شو را از محوطه واژن جمع آوری کنید. نمونه ای که از گردن رحم و واژن اخذ کرده اید را باید با PBS رقیق کنید و سپس آن را به طور مستقیم در محیط کشت یا محیط کشت انتقالی و غنی شده وارد کنید. نمونه ای را که به این شیوه جمع آوری کرده اید در ظرفی که حاوی حدود 5 میلی لیتر PBS و فرمالین 1٪ است، ارسال کنید. نمونه ها باید تازه باشند و در محیط کشت انتقالی مناسب مانند FBS/glycerol ارسال گردند و تا رسیدن به آزمایشگاه در شرایط سرد و مرطوب نگهداری شوند.

نمونه ها

تنها در صورتی می توان گفت که عامل سقط در دامها کمپیلوباکتر است که جرم را جداسازی کنیم و بررسی کنیم که آیا خصوصیات این جرم با کمپیلوباکتر مطابقت دارد یا خیر. نمونه های انتخابی شامل جفت دام سقط شده، کبد، ریه و معده جنین و ترشحات واژن می باشد. محتویات معده جنین سقط شده که می توان از آن به صورت سترون توسط سرنگ نمونه گیری کرد، نمونه مناسبی جهت جداسازی کمپیلوباکتر می باشد. جهت اخذ نمونه از پرده های جفت لازم است بعد از شست و شوی آن با PBS جهت رفع آلودگی های سطحی، پرز های کوریونیک را به روش اسکرابینگ جدا و به محیط کشت معمولی انتقال داد. نمونه هایی را که می خواهیم به آزمایشگاه ارسال کنیم، باید تازه باشند، توسط محیط انتقالی مناسب مثل FBP/glycerol منتقل شده و سرد و مرطوب نگهداری شوند. نمونه ها باید در دمای 4-10 درجه سانتی گراد و به دور از نور به آزمایشگاه ارسال شود. چنانچه امکان ارسال نمونه ها در همان روز جمع آوری به آزمایشگاه نباشد، باید حتماً آن ها را در محیط انتقالی نگه داری نمود. محیط های انتقالی متنوعی جهت ارسال نمونه ها وجود دارد که از جمله آن ها می توان اشاره کرد به: Lander's-clark's, SBL, Weybridge's, Clark's and Foley's, Blair's, Cary حاوی cycloheximide هستند که دارای خاصیت بالقوه سمی است به همین دلیل می توان از amphotericin B به عنوان جایگزین استفاده کرد.

برای تشخیص موارد مثبت، آزمایش های هیستوپاتولوژیک بر روی نمونه های بافتی دام سقط شده مناسب می باشند. نمونه هایی که ضخامت آنها کمتر از 0/5 سانتی متر است، باید بلافاصله بعد از سقط یا مرگ، تهیه شده و

توسط ثابت کننده مناسب ثابت شوند. بهتر است بافت های ثابت شده برای حداقل دو روز قبل از هر کاری بر روی آن ها در محیط آزمایشگاه باقی بمانند.

آماده سازی محلول ها

- 1- محیط کشت FBP/glycerol، محیط آبگوشت مغذی شماره 2
- 2- آگار 0/12 w/v %
- 3- گلیسرول 15 %
- 4- عصاره مخمر 0/1 w/v %
- 5- FBP با غلظت دوبرابر و مکمل غنی شده
- 6- آبگوشت مغذی، آگار و گریسرول را با استفاده از حرارت ملایم ذوب کنید. سپس آنها را به مدت 15 دقیقه در حرارت 121 درجه سانتی گراد اتوکلاو کنید، سپس دمای آن ها را در حمام آب به 50-55 درجه سانتی گراد برسانید. FBP غنی شده با مکمل را به صورت سترون اضافه و به آرامی مخلوط کنید. 4 میلی لیتر از محلول حاصل را در ظروف مخصوص توزیع کنید.

تشخیص

در موارد برگشت منظم و غیر منظم به فحلی در گاو ها و تلیسه ها به ویژه پس از ورود یک گاو نر به گله، پس از ارزیابی اسپرم گاو نر باید به کمپیلوباکتریوز مشکوک شد.

جداسازی میکروب از مایعات پس از شست و شوی غلاف آلت تناسلی

تهیه گسترش، کشت و آزمون آنتی بادی فلئورسنت

آزمون سرم شناسی

واژینال موکوس آگلوتیناسیون تست

در گاو نر شست و شوی غلاف و اسکراب آن توصیه شده است با استفاده از بافر نرمال سالین می توان نمونه را در همان روز زنگه داشت در غیر این صورت، محیط کشت قابل حمل و نقل استفاده می شود.

شناسایی جرم: برای بررسی حضور جرم می توان از نمونه های اخذ شده از گاو نر، ماده یا جنین های سقط شده استفاده نمود. این باکتری یک ارگانیزم گرم منفی و به شکل میله ای خمیده است که می تواند به صورت S شکل، فنی شکل یا شیه مرغ دریایی مشاهده شود. این باکتری را می توان در دمای 37 درجه سانتی گراد و برای حداقل سه روز در اتمسفر میکروآنروبیک (کم هوازی) کشت داد. همچنین می توان با استفاده از روش های بیوشیمیایی یا مولکولی کمپیلوباکتر فتوس را جداسازی کرده و تحت گونه های مختلف آن را از یکدیگر تفريق نمود. می توان از آزمون ایمونوفلئورسنس برای تشخیص این باکتری استفاده کرد، اما نمی توان تحت گونه های مختلف آن را با این روش تفريق نمود.

جمع آوری نمونه از جنین سقط شده و جفت: جفت نیز مانند نمونه های کبد، ریه و محتویات معده جنین از بهترین نمونه ها جهت جداسازی باکتری مسبب بیماری محسوب می شود. نمونه ها به طور مستقیم به محیط انتقالی و غنی شده، یا به PBS همراه فرمالین 1٪ (جهت آزمون فلئورسنس آنتی بادی غیر مستقیم) تلقیح می شوند.

انتقال نمونه ها:

وقتی نمونه ها به آزمایشگاه می رسند، باید آن ها را به طور مستقیم داخل محیط کشت تلقیح و در صورت لزوم آن ها را بیشتر آماده سازی نمود.

1) نمونه های دستگاه تناسلی: نمونه های حاصل از شست و شوی غلاف قضیب جهت غلیظ شدن ممکن است نیاز به سانتریفوژ کردن (3500 g) داشته باشند. نمونه نهایی (که به 250 میکرولیتر کاهش یافته است) به محیط کشت (به طور مستقیم و/یا با فیلتر کردن) تلقیح می شود. اگر CVM خیلی چسبناک است، باید آن را با اضافه کردن یک حجم مساوی از محلول سیستئین ذوب کرد (محلول آبی سیستئین هیدروکلراید در 7/2 g/100ml، pH:0/25، که با فیلتراسیون غشایی سترون شده است). بعد از 15-20 دقیقه می توان موکوس رقیق شده و ذوب شده را به محیط کشت تلقیح نمود.

2) جنین سقط شده و جفت: محتویات معده جنین به طور مستقیم به محیط کشت تلقیح می شود. جهت ضد عفونی کردن اندام های داخلی یا قسمت هایی از این اندام ها، آن ها را با شعله حرارت می دهیم. سپس آن ها را همگن سازی کرده و بعد به محیط کشت تلقیح می کنیم.

پرده های جفت را ابتدا با PBS شست و شو می دهیم تا آلودگی های شدید موجود در سطح آن ها کاهش یابد. سپس پرز های کوریونیک را خراش می دهیم و این مواد تخریشی را به محیط کشت منتقل می کنیم.

جداسازی کمپیلوباکتر فتوس:

1) محیط کشت جهت جداسازی: در حال حاضر محیط های زیادی جهت تشخیص باکتری شناسی BGC استفاده می شود. باید توجه نمود که بسیاری از محیط های مورد استفاده برای جداسازی گونه های کمپیلوباکتر به دلیل ضد میکروب هایی مانند سفالوسپورین ها، جهت جداسازی کمپیلوباکتر فتوس مناسب نیستند چراکه این ترکیبات از رشد این گونه باکتری ممانعت می کنند. اکثر محیط های کشت حاوی سیکلوهرگزامید هستند، که به دلیل قدرت سمیت آن، این ماده ضد قارچ می تواند با آمفوتریسین B جایگزین شود. محیط انتخابی جهت جداسازی کمپیلوباکتر فتوس Skirrow's. Skirrow's بر پایه محیط بلاد با 5-7٪ خون دفیبرینه بوده و حاوی مواد انتخابی پلی میکسین B سولفات (2/5 IU/ml)، تری متوپریم (5 µg/ml)، ونکومايسين (10 µg/ml) و سیکلوهرگزامید (50 µg/ml) می باشد.

می توان از یک محیط غیر انتخابی با پایه خون (5-7٪ خون) با فیلتراسیون استفاده نمود. اما به هر حال حساسیت این محیط نسبت به محیط انتخابی کم تر است. کنترل کیفیت هر محیط باید با استفاده از سویه های کنترل انجام پذیرد.

2) شرایط گرم خانه گذاری: پلیت ها در دمای 37 درجه سانتی گراد و در اتمسفر میکروآئروبیک (10-5٪ اکسیژن، 10-5٪ کربن دی اکسید و ترجیحاً 5-9٪ هیدروژن برای رشد مطلوب) گرم خانه گذاری می شوند. شرایط میکروآئروبیک با روش های مختلفی ایجاد می شود. در برخی از آزمایشگاه ها، اتمسفر مناسب با استفاده از گاز جایگزین در جار تولید می شود. همچنین کیت های تولید کننده گاز به صورت تجاری موجود می باشند. علاوه براین می توان از گرم خانه های اتمسفر متنوعی استفاده نمود. شرایط کشت و گرم خانه گذاری به طور مرتب به

وسیله سویه های کنترل کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه فتوس و کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه ونرالیس، تأیید می شود. این کنترل ها برای جداسازی لازم الاجرا می باشد.

شناسایی گونه های کمپیلوباکتر:

(1) **ساختار کلونی:** کلونی های کمپیلوباکتر فتوس معمولاً بعد از 2-5 روز در محیط کشت ظاهر می شوند. برای جلوگیری از رشد کلونی های اختصاصی توسط آلاینده ها، توصیه می شود که محیط را هر روز ارزیابی و کلونی های مشکوک را ساب کالچر کنید. بعد از 3-5 روز گرم خانه گذاری، اندازه کلونی ها به 1-3 میلی متر می رسد. این کلونی ها به رنگ خاکستری و صورتی کم رنگ، گرد، محدب، صاف و درخشان با حاشیه منظم مشاهده می شوند.

(2) **ساختار ماکروسکوپی:** کمپیلوباکتر ها محرک هستند و در طی ساب کالچر ممکن است ناپدید شوند. این باکتری اغلب به صورت اجرام باریک، باسیل خمیده و با عرض 0/3-0/4 میکرومتر و طول 0/5-8 میکرومتر مشاهده می شود. ممکن است به طور هم زمان در حالت زنده، کمپیلوباکتر به سه اندازه کوتاه (شبه ویرگول)، متوسط (شبه S) و طویل (به شکل مارپیچی) وجود داشته باشد.

(3) آزمون های بیوشیمیایی (جدول 7)

(4) **اتمسفِر:** کمپیلوباکتر در شرایط هوازی رشد نمی کند.

تشخیص بیوشیمیایی تحت گونه های کمپیلوباکتر فتوس:

آزمون هایی که در جدول 7 توضیح داده شده است باید بر روی کشت خالص انجام پذیرد.

جدول شماره 7: ویژگی های متفاوت گونه های کمپیلوباکتر که از دستگاه تناسلی گاو و جنین سقط شده جدا شده است.

نالیدیکیسک اسید	H ₂ S ^(b)	گلایسین % 1	NaCl 3.5%	کاتالاز	اکسیداز	42°C	15°C	
V	-	-	-	V	+	-	V	<i>c.fetus</i> <i>subsp.venerealis</i>
R	-	+	-	+	+	V ^(a)	+	<i>c.fetus</i> <i>subsp.fetus</i>
S^(e)	-	V	-	V ^(d)	+	V ^(c)	-	<i>c.jejuni</i>
R	V	V	-	+	+	+	-	<i>c.hyointestinalis</i>
V	+	+	+	V	+	+	-	<i>c.sputorum</i>

(a): اگرچه کمپیلوباکتر فتوس متعلق به کمپیلوباکتر های ترموفیلیک نیست، اما تعداد قابل توجهی از سویه های این گونه در دمای 42 درجه سانتی گراد رشد می کنند. (b): در محیط triple sugar iron agar، (c): *c.jejuni* *subsp.jejuni* مثبت و *c.jejuni subsp.doylei* منفی، (d): *c.jejuni subsp.jejuni* مثبت و *c.jejuni subsp.doylei* گاهی مثبت و گاهی منفی. (e): طبق سویه های Bergey's Manual حساس هستند، با این حال سویه های مقاوم به طور متناوب گزارش شده اند. (+): واکنش مثبت یا رشد. (-): واکنش منفی یا عدم رشد سویه ها در محیط مناسب و تحت شرایط خاص. (V): نتایج متفاوت. (S): حساسیت. (R): مقاومت.

1) رشد در دمای 25 و 42 درجه سانتی گراد: یک سلول مشکوک به دو محیط پلیت با پایه خون تلقیح می شود. هر پلیت در اتمسفر خاص و در دمای 25 و 42 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری می شود. سویه های کنترل هم زمان مورد آزمایش قرار می گیرند.

2) اکسیداز و کاتالاز: آزمون ها بر طبق پروتکل باکتری شناسی استاندارد انجام می شوند. سویه های کنترل هم زمان مورد آزمایش قرار می گیرند.

(3) **رشد در حضور سدیم کلرید:** یک سلول مشکوک به محیط بلاد حاوی 3/5% NaCl (15 میلی لیتر محیط بلاد+2/04 میلی لیتر محلول سدیم کلرید 5 مولار) و محیط plain blood تلقیح می شود. گرم خانه گذاری تحت اتمسفر خاص صورت می گیرد. سویه های کنترل هم زمان مورد آزمایش قرار می گیرند.

(4) **رشد در حضور گلايسين 1%:** یک سلول مشکوک به محیط گلايسين (15 میلی لیتر محیط با پایه خون+1,65 میلی لیتر محلول آبی 10% از گلايسين سترون فیلتر شده) و روی همان محیط بدون گلايسين تلقیح می شود. گرم خانه گذاری تحت اتمسفر خاص صورت می گیرد. سویه های کنترل (از تحت گونه های ونرالیس و فتوس) هم زمان مورد آزمایش قرار می گیرند. از آنجایی که تمام سویه ها سخت رشد هستند، تغییرات اندک در محیط می تواند مهم باشد. در صورت عدم رشد در حضور گلايسين، باید به آزمون احتمالی برای کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه ونرالیس توجه نمود.

(5) **تولید هیدروژن سولفید در محیط TSI:** این آزمون بر روی محیط TSI تحت شرایط ویژه ای انجام می شود. محیط حاوی پپتون (20 g/litre)، عصاره گوشت (2/5g/litre)، عصاره مخمر (3 g/litre)، سدیم کلرید (5 g/litre)، فریک سترات (0/5 g/litre)، سدیم تیوسولفات (Na₂S₂O₃) (0/5 g/litre) و آب مقطر (تا 1 لیتر) می باشد. سپس این محیط داخل لوله ها توزیع می شود و در اتوکلاو با دمای 115 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه قرار داده می شود. سپس به حالت مورب گذاشته شده تا به حالت جامد تبدیل شود.

(6) **تولید هیدروژن سولفید در محیط سیستین:** آزمون H₂S در محیط براث بروسلا که حاوی 0/02% سیستین است صورت می گیرد. تولید H₂S با نوار سرب استات که به قسمت داخلی بالای لوله متصل شده است، شناسایی می شود. یک سلول مشکوک به داخل محیط تلقیح می شود. لکه های سیاه نوار استات سرب به عنوان واکنش مثبت قلمداد می شود. سویه های کنترل هم زمان مورد آزمایش قرار می گیرند.

(7) **حساسیت به سفالوتین و نالیدیکسیک اسید:** حساسیت به سفالوتین (CN) و نالیدیکسیک اسید (NA) با استفاده از صفحاتی که حاوی CN (30 میکرو گرم) یا NA (30 میکرو گرم) هستند، مورد آزمایش قرار می گیرند. برای آزمایش، کشت های 72 ساعته داخل PBS با غلظت 10⁹ باکتری در هر میلی لیتر، تعلیق می شود. با استفاده از سوسپانسیون 100 میکرولیتر در محیط پایه خون گسترده می شود. صفحات حساس در قسمت بالا قرار داده می

شوند. این پلیت ها در دمای 37 درجه سانتی گراد و در اتمسفر خاص گرم خانه گذاری می شوند سپس بعد از 48 و 72 ساعت بررسی می شوند. یک ناحیه ممانعتی به اندازه حداقل 3 میلی متر در اطراف یک صفحه نشاندنده سویه حساس به آنتی بیوتیک مورد نظر است. همه سویه های کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه فتوس و بیشتر سویه های کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه ونرالیس به NA مقاوم و همه کمپیلوباکتر فتوس ها به CN حساس هستند.

علائم بالینی

کمپیلوباکتریوز در گوسفند و بز بیماری بومی و واگیر داری است که در فواصل نامنظم و با چرخه همه گیری 4-5 سال، به صورت همه گیر بروز می کند. نشانه های بالینی مشخص شامل سقط جنین در 6 تا 8 هفته آخر آبستنی، تولد بره های ضعیف و نارس، مرده زایی و مرگ و میر در بین بره های تازه متولد شده است (10 تا 20 درصد). میزان سقط جنین در گله های حساس به بیش از 70 درصد می رسد اما به طور معمول، متوسط نرخ سقط جنین 25 درصد است. در گله آلوده، دامها بدون توجه به اینکه سقط کرده یا نکرده باشند و یا حتی آلوده نشده باشند، ایمنی بادوامی به دست می آورند. این ایمنی اکتسابی برای حدود سه سال و در مواردی تا پایان عمر دوام دارد. کمپیلوباکتریوز در گوسفند غیر آبستن بدون علائم بالینی است.

بیماری در گوسفند

کمپیلوباکتریوز در مناطقی که پرورش گوسفند به شکل متراکم و در محیطی غیر بهداشتی صورت میگیرد شیوع دارد. اگر چه سقط جنین های حاصل از کمپیلوباکتر در گوسفند و بز انفرادی است اما سقط های طوفانی در حدود 70 درصد نیز در گله ها گزارش شده است.

بیماری زایی در گوسفند و بز: کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه فتوس، کمپیلوباکتر ژورنی و کمپیلوباکتر کلی در گوسفند و بز، موجب همه گیری های سقط جنین در 6 تا 8 هفته آخر آبستنی می شوند.

علائم کالبد گشایی

علائم کالبد گشایی در جنین نسبت به مرحله آبستنی و زمان مرگ جنین متفاوت است. جنین های سقط شده اغلب متورم بوده و مایع سروزی خونی حاوی رگه های خونی و فیبرین در حفره های بدن دیده می شود. آماس زیر

جلدی با خونریزی های نقطه ای بر روی سطح غشاهای سروزی همراه است که ناشی از تغییرات اتولیز در جنین می باشد. التهاب جفت در اثر ادم غشاء بین کوتیلودونی ایجاد می شود. کوتیلودون ها شکننده و زرد رنگ هستند که این نشانی در التهاب جفت ناشی از عوامل دیگر نیز مشاهده می شود.

بر روی سطح کبد جنین، اغلب ضایعات نکروتیک کانونی رنگ پریده و فرورفته به اندازه 1-2 و گاهی 4 سانتی متر دیده می شود. این ضایعات بر روی بیش از 40 درصد کبد جنین های سقط شده دیده می شود. برخی اوقات این ضایعات با تورم و خون ریزی کبد همراه است. گاهی تورم نکروتیک صفاق، پلورزی، برونکوپنومونی خفیف و پریکاردیت خفیف مشاهده می شود. در برخی از میش های سقط کرده تورم خفیف فرج همراه با ترشحات قرمز مایل به قهوه ای یا موکوسی - چرکی برای چند روز تا یک هفته دیده می شود.

کنترل و پیشگیری

در مناطقی که احتمال انتشار و انتقال افقی عفونت زیاد است، دو تزریق داخل عضلانی پی در پی 30 هزار واحد بین المللی پنی سیلین و 3. گرم دی هیدرو استرپتومایسین برای هر کیلو گرم وزن بدن در میش های آبستن توصیه شده است.

درمان

سویه های جدا شده از گاو و گوسفند و پرندگان نسبت به پنی سیلین و تتراسیکلین حساسند اما نسبت به پلی میکسین B و باسیتراسین به طور کامل مقاومند. در گوسفند، تجویز آنتی بیوتیک های خوراکی موثر نیستند، مگر اینکه مقدم بر آلودگی باشند. با تجویز پنی سیلین به میش های آبستن گله نیز می توان از بروز سقط جلوگیری کرد.

در مواجهه با یک اپیدمی سقط جنین ناشی از کمپیلوباکتر تمام دامهای آبستن باید درمان آنتی بیوتیکی شوند. استفاده از اکسی تتراسیکلین طولانی اثر با میزان 20 میلی گرم به ازاء هر کیلو گرم وزن بدن می تواند مفید باشد. برای گله های بزرگ که امکان تزریق هر راس وجود ندارد استفاده از تتراسیکلین با میزان 250 تا 300 میلی گرم به ازاء هر راس در هر روز تا زمان اتمام زایمان ها توصیه می شود. تزریق روزانه 400 هزار واحد بین المللی پنی سیلین و 25. گرم دی هیدرواسترپتومایسین به میزان 6 تا 10 سی سی برای هر میش نیز توصیه شده است.

تب کیو

تب کیو یک بیماری تب زا است که عامل آن کوکسیلا بورنتی می باشد. این جرم طیف وسیعی از میزبانهای حساس اعم از حیوانات اهلی و وحشی و حتی گونه های غیر پستانداری و ماهیان، کنه ها، پرندگان و خزندگان را آلوده می کند. میزبانهای اصلی این جرم انسان، گاو و نشخوارکنندگان کوچک می باشد و سایر دامها می توانند به عنوان مخزن باشند. این جرم در کنه ها دوام دارد و در شیر، ترشحات رحمی هنگام زایش در نشخوارکنندگان و گرد و خاک یافت می شود. انسانها می توانند از طریق ترشح جرم در ادرار، مدفوع، ترشحات سقط و یا زایمانهای طبیعی آلوده شوند اما مهم ترین راه انتقال در انسان، استنشاق ریز قطره ها در کشتارگاه ها یا زایمان های طبیعی دام ها می باشد چرا که دام ها می توانند در هر شکم زایمان طبیعی و سالم نیز، این جرم را به میزان زیاد در محیط پخش کنند.

در نشخوارکنندگان سقط جنین، ناباروری و تولد نوزادان ضعیف در اثر ابتلا به این عفونت ایجاد می شود. گوسفند و بز حساسیت بیشتری در مقایسه با گاو، در سقط جنین ناشی از آلودگی به این جرم از خود نشان می دهند. لازم به ذکر است که در شرایط بالینی، سقط جنین در بز در مقایسه با گوسفند بیشتر معمول بوده و بزها میزان زیادتری از جرم را در زمان زایمان و سقط ترشح می کنند. در هر دو گونه بز و گوسفند، عفونت های بدون نشانه بالینی بسیار شایع تر از سقط جنین های کلینیکی می باشد. بعد از اولین آلودگی، ایمنی در بدن دام به وجود می آید که در سالهای بعد سقط در دام ایجاد نمی شود اما با این حال، ماده بزها در سالهای بعدی نیز مشکلات تولید مثلی را نشان می دهند.

تشخیص

نمونه های مناسب جهت مقاصد باکتری شناسی و یا جداسازی جرم در جنین تخم مرغ موارد زیر می باشد:

- جفت و کوتیلودون
- ترشحات دستگاه تناسلی و سوآب واژن
- محتویات شیردان جنین سقط شده

نمونه های واژنی که در خلال 2 روز بعد از سقط از دام اخذ میشود نشان دهنده اجرام موجود در جفت میباشد. در صورتیکه جفت موجود باشد و به آن دسترسی داشته باشیم، بهترین نمونه میباشد اما در زمانی که این امر میسر نمی باشد می توان از نمونه های سوآب واژن استفاده کرد. نمونه های ترشحات واژن و محتویات شیردان جنین سقط شده دارای میزان کمی از کوکسیلا بورنتی می باشند و نمونه های مناسبی جهت مشاهده این جرم نمی باشند. محتویات شیردان جنین سقط شده معمولاً دارای جمعیت متناسب و یکنواختی از اجرام ریکتزایی نبوده و این مایعات برای مقاصد جداسازی در حیوانات آزمایشگاهی یا جنین تخم مرغ مناسب می باشند اما غالباً برای کشت سلول سمی می باشند. دیگر اندامهای جنین سقط شده مانند کبد، کلیه، طحال و ریه به میزان زیادی جرم را دارا بوده و می توانند به عنوان منبعی برای جداسازی جرم مورد استفاده قرار گیرند.

تهیه گسترش و رنگ آمیزی، روش سریع و ساده ای جهت تشخیص اولیه بیماری می باشد. تشخیص سریع این امکان را می دهد که اقدامات بهداشتی و درمانی را سریعتر بر حسب عامل بیماری انجام دهیم. برای این کار مطابق روش زیر عمل می کنیم:

کوکسیلا جرم گرم منفی می باشد که به رنگ های بازی حساسیت دارد. بهترین روش برای رنگ آمیزی آن زیل نیلسن اصلاح شده (MZN) می باشد.

مواد مورد نیاز: میکروسکوپ نوری، رنگ فوشین بازی، اسید استیک و متیل بلو

بهرتر است از جفت و کوتیلودون های مختلف برای این منظور استفاده شود زیرا همه کوتیلودون ها به یک اندازه درگیر نبوده و لازم است از 5-6 کوتیلودونی که بیشترین جراحت را نشان می دهند برای این منظور استفاده شود.

- کوتیلودون های مورد نظر را بر روی لام تمیز فشار داده تا کاملاً با آن تماس یابد.
- لام ها را در هوای محیط قرار داده تا خشک شوند.
- فوشین بازی (با نسبت 1 به 5 در آب مقطر) بر روی لام ریخته و 10 دقیقه صبر می کنیم.
- با استفاده از آب مقطر لام را شستشو می دهیم.
- رنگ زدایی لام با استفاده از استیک اسید (با نسبت 1 به 30 در آب مقطر) برای مدت 15-40 ثانیه.
- متیل بلو 1٪ در آب مقطر را برای مدت 15 ثانیه بر روی لام ریخته

- شستشو با آب مقطر
- خشک شدن لام در هوای محیط
- مشاهده در زیر میکروسکوپ با عدسی 100 روغنی
- مشاهده اجسام ریکتزایی (کوکوباسیل یا میله ای کوتاه) قرمز رنگ در زمینه آبی: به صورت داخل سلولی و یا پخش شده در زمینه گسترش مشاهده می شوند.

ملاحظات:

- ✓ تمام محلول ها باید قبل از استفاده رقیق شوند و به رقت های مورد نظر تبدیل شوند.
- ✓ زمان رنگ بری در استیک اسید بستگی به ضخامت گسترش دارد. اگر ضخامت گسترش زیاد باشد باید تا چند ثانیه به زمان مورد اشاره افزوده شود. اگر زمان دقیق را نمی توانید حدس بزنید لازم است در زمانها و ضخامت های مختلف امتحان کنید.
- ✓ رنگ آمیزی مشابه برای بروسلا و کلامیدیا نیز استفاده می شود که ممکن است باعث اشتباه در تفریق این اجرام با یکدیگر شود. کاربر مجرب لازم است تا تفریق ظاهری این اجرام را انجام دهد با این حال پلی مورفیسم بودن کوکسیلا بورنتی عامل کمک کننده مهمی در تفریق کوکسیلا با آن دو جرم می باشد.
- ✓ در تمامی موارد لازم است آزمون های سرم شناسی در کنار مشاهده مستقیم انجام شود تا از اشتباهات در تشخیص جلوگیری شود.
- ✓ وجود اجرام ریکتزایی دلیل بر عفونت می باشد اما در مناطق آندمیک می بایست از میزان زیادی از دام ها این جرم جدا شده و نشان داده شود تا بتواند دلیلی بر این باشد که عامل اصلی سقط جنین، کوکسیلا بورنتی است.
- ✓ استفاده از ترشحات واژن دارای محدودیت هایی است از جمله: مشکل بودن تهیه گسترشی با ضخامت مناسب و زمان جمع آوری نمونه زیرا ترشح جرم در ترشحات واژنی همیشگی نیست.
- برای جدا سازی جرم در محیط کشت سلول، سوآب واژنی یا نمونه ترشحات زایمانی به جهت دارا بودن مقادیر زیاد کوکسیلا بورنتی، بهترین نمونه می باشند. معمول ترین راه استفاده از گسترش های تهیه شده از جفت و یا ترشحات واژنی می باشد که با روش های Stamp, Gimenez or Machiavello methods رنگ آمیزی شده اند.

شناسایی جرم: در مواقعی که سقط های پشت سرهم و یا مرده زایی در گله مشاهده می شود، جهت تشخیص آزمایشگاهی می توان از نمونه هایی چون جفت، ترشحات واژن و بافت های جنین های سقط شده (کبد، ریه یا محتویات معده) استفاده کرد. همچنین برای بررسی دفع باکتری می توان نمونه ها را از واژن، شیر، آغوز و مدفوع دام تهیه نمود.

کوکسیلا بورنتی که یک باکتری درون سلولی اجباری است را می توان با تلقیح گونه های این باکتری به کشت های سلول معمولی، کیسه زرده جنین جوجه یا حیوانات آزمایشگاهی جداسازی نمود. در مواردی که نیاز به جداسازی باکتری از بافت ها، مدفوع، شیر یا نمونه های محیطی که با میکروارگانیسم های مختلف آلوده شده اند داریم، استفاده از حیوانات آزمایشگاهی می تواند مفید واقع شود.

می توان باکتری را در بافت های رنگ آمیزی شده یا گسترش تهیه شده از موکوس واژن و با استفاده از میکروسکوپ روغنی با عدسی چشمی مشاهده نمود. از آنجایی که این باکتری مقاوم به اسید است، می توان از روش های مختلف رنگ آمیزی از جمله استامپ، زیل نیلسن بهبود یافته، Gimenez و کوستر اصلاح شده استفاده نمود. البته به دلیل پایین بودن ویژگی این روش ها، نمی توان نتایج مثبت را به طور قطعی تأیید کرد.

تا امروز ثابت شده است که شناسایی جرم با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، آمیخته گری درجا و PCR دارای ویژگی و حساسیت بیشتری نسبت به روش های رنگ آمیزی قدیمی دارند. هیچ آنتی بادی اختصاصی برای روش ایمونوهیستوشیمی به صورت تجاری در دسترس نمی باشد. در حالی که کیت PCR برای نشخوارکنندگان موجود بوده و می توان به راحتی در آزمایشگاه های مناسب و مجهز از آن استفاده نمود. همچنین PCR یک روش مفید و مطمئن برای غربالگری تعداد زیاد و انواع مختلف نمونه ها بوده و در حال حاضر یک ابزار انتخابی برای تشخیص بیماری تب کیو محسوب می شود.

اخیراً دو روش PCR-based typing توضیح داده شده است:

MLVA (multi-locus variable number of tandem repeats analysis) و MST (multispacer sequence typing) که بدون نیاز به جداسازی کوکسیلا بورنتی اجازه به تایپینگ گونه های جرم می دهد.

بر اساس نوع نمونه و هدف تشخیصی می توان کوکسیلا بورنتی را با روش های مختلفی شناسایی نمود. استفاده از real-time PCR جهت تشخیص و تعیین تعداد DNA کوکسیلا بورنتی، به طور چشمگیری کاربرد دارد. در مواردی که سقط های پشت سر هم و مرده زایی در گله ای مشاهده می کنیم باید نمونه ها را از جنین های سقط شده، جفت و ترشحات واژن بلافاصله پس از سقط یا زایمان جمع آوری نمود.

همیشه در بررسی ها باید بتوان عامل اصلی سقط جنین در گله را مشخص کرد. تشخیص زود هنگام طوفان سقط ناشی از تب کیو در یک گله به ما کمک می کند تا بتوانیم با راه های آلودگی از طریق دامداری یا محیطی مقابله کنیم. زمانی می گوئیم مورد مثبت در گله وجود دارد که علائم بالینی (سقط و یا مرده زایی) در آن گله مشاهده و حضور جرم تأیید شود. در صورت امکان، برای کاهش نتایج منفی کاذب در روش PCR، لازم است نمونه سوآب واژن در روز زایمان (یا کم تر از 8 روز بعد از زایمان) جمع آوری شود. در مواقعی که در تفسیر نتایج با مشکل مواجه می شویم، به کارگیری روش های سرم شناسی در گله می تواند مفید واقع شود. برای تشخیص دفع باکتری می توان از نمونه تانک شیر، نمونه های انفرادی شیر یا آغوز، نمونه های واژن و مدفوع استفاده کرد. اما به هر حال شناسایی دفع کنندگان باکتری کار دشواری است، چراکه هنوز روش های انتشار جرم به خوبی شناسایی نشده اند. آزمایش بر روی نمونه های تانک شیر یا مخلوط نمونه های انفرادی (مانند سوآب واژن و یا نمونه های شیر)، برای تشخیص انتشار داخل گله ای جرم باید صورت گیرد.

الف) جداسازی جرم: برای تشخیص آزمایشگاهی اختصاصی جرم، ممکن است مجبور به جداسازی باکتری شویم. در مواردی که بررسی های میکروسکوپی تعداد زیادی کوکسیلا بورنتی را همراه با میزان کمی آلودگی با سایر باکتری ها نشان می دهند، جداسازی مستقیم با تلقیح به تخم مرغ جنین دار یا کشت سلولی امکان پذیر است. به عنوان مثال، قسمتی از جفت را در بافر فسفات سالین (PBS) که حاوی آنتی بیوتیک (استرپتومایسین: $\mu\text{g/ml}$ 100-200 و پنی سیلین یا جنتامایسین $\mu\text{g/ml}$ 50-100) است، همگن سازی می کنیم. پس از اینکه با سرعت پایین سانتریفوژ کردیم، مایع رویی رقیق را به تخم مرغ های جنین دار 6-7 روزه از طریق کیسه زرده تلقیح می کنیم. بهتر است تخم مرغ های مربوط به مرغ های SPF را برای این کار استفاده کنیم. جنین هایی که طی 5 روز اول پس از تلقیح تلف می گردند دور انداخته می شوند. 10-15 روز پس از تلقیح کیسه های زرده برداشت می شوند سپس گسترش های رنگ آمیزی شده از دیواره کیسه زرده جهت اطمینان از عدم آلودگی با سایر باکتری ها و شناسایی

حضور کوکسیلا بورنتی بررسی می شوند. همچنین می توان برای تشخیص این جرم از PCR نیز استفاده نمود. برای جداسازی جرم از یک کشت خالص، ممکن است پاساژهای بعدی نیز ضرورت یابد.

برای کشت ویروس، ظرف پوسته کشت سلول یک میکروکالچر سلولی به صورت تجاری موجود است و برای جداسازی باکتری های داخل سلولی مانند کوکسیلا بورنتی مورد استفاده قرار می گیرد. سوسپانسیون نمونه ها به فیروبلست های ریه جنین انسان (HEL) که در یک پوشش با ابعاد 1 سانتی متر مربع و داخل یک ویال پوشش دار رشد می کنند، تلقیح می شوند. سانتریفوژ کردن به مدت یک ساعت و با دور 700 g باعث افزایش اتصال و نفوذ پذیری باکتری به سلول ها می شود. برای نمونه مشابه از سه ویال پوشش دار استفاده می شود. در روز 3، 10، 21، اثرات سیتوپاتیک کوکسیلا بورنتی (که به صورت واکوئل هایی مشخص می شود) با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی می شود. بعد از گذشت 10 روز، می توان کوکسیلا بورنتی های رشد کرده در سلول ها را به طور مستقیم با استفاده از آزمون ایمونوفلئورسنس بر روی پوشش داخلی در ویال پوشش دار شناسایی نمود.

در این آزمون از آنتی بادی های پلی کلونال ضد کوکسیلا بورنتی و آنتی بادی های ثانویه مناسب که متصل به ایزوتیوسیانات فلئورسین هستند، استفاده می شود. باقی سلول های ویال پوسته برداشته شده و به فلاسک کشت 25 cm^2 منتقل می شود. با یک کشت معمولی که هفته ای یک بار تعویض می شود، گرم خانه گذاری به مدت 3 ماه انجام می پذیرد. بررسی بروز عفونت در سلول هایی که با Gimenez رنگ آمیزی می شوند و کشت روی آن ها سانتریفوژ شده و به وسیله PCR مورد ارزیابی قرار می گیرند، می تواند صورت گیرد. هنگامی که اثرات سیتوپاتیک مشاهده شده و یا نتایج حاصل از رنگ آمیزی Gimenez یا PCR مثبت شود، یک پاساژ در فلاسک کشت 75 cm^2 انجام می گیرد. سپس جهت جداسازی کوکسیلا بورنتی، کشت رویی به لایه های یک پارچه سلول های ورو یا فیروبلست های L929 موش در فلاسک کشت 150 cm^2 تلقیح می شود. اگرچه این روش کاربرد انسانی دارد اما در مورد حیوانات نیز قابل استفاده می باشد.

در مواردی که نمونه های ما شامل جفت، ترشحات واژن، مدفوع یا شیر هستند که معمولاً به میزان زیادی با سایر عوامل آلودگی پیدا می کنند، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی به عنوان یک سیستم پالایشی ضرورت می یابد. برای نگه داری جوندگانی که به طور تجربی آلوده می شوند، محدودیت زیستی در سطح 3 باید اعمال شود. موش و خوکچه هندی مناسب ترین حیوانات برای این کار هستند. یک دز 0/5 میلی لیتری به صورت داخل صفاقی به هر

حیوان تلقیح می شود و در این هنگام باید وضعیت دمای بدن و سطح آنتی بادی ها مورد بررسی قرار گیرد. انجام این روش باید با آزمایش های سرم شناسی (که از همان نمونه هایی که برای تلقیح به حیوانات مذکور استفاده شد باید استفاده گردد) همراه باشد. نمونه های سرمی، 10 روز پس از تلقیح به موش و خوکچه هندی جمع آوری می شوند. اگر حیوان تب کند، می میرد و طحال آن جهت جداسازی جرم استفاده می شود، به این صورت که به تخم مرغ جنین دار یا کشت سلول تلقیح می شود. بررسی میکروسکوپی کک کوکسیلا بورنتی را میتوان با ایمپرژن و رنگ آمیزی طحال انجام داد. سپس می توان با انجام PCR بر روی نمونه طحال، DNA این باکتری را شناسایی کرد. در مورد موش می توان طحال را 9 روز پس از تلقیح جمع آوری نمود.

ب) رنگ آمیزی: در مواردی که مشکوک به سقط عفونی هستیم، می توان گسترشی از کوتیلودون های جفت بر روی لام های میکروسکوپی تهیه نمود. همچنین برای این کار می توان از نمونه هایی چون ریه، کبد، محتویات شیردان جنین سقط شده یا ترشحات واژن استفاده نمود. نمونه های فوق را می توان با روش های مختلفی مانند استامپ، Gimenez، ماکیاولو، گیمسا و کوستر اصلاح شده رنگ آمیزی نمود، که سه روش اول نتایج بهتری را در اختیار قرار می دهند. روش های مذکور شباهت زیادی با روش زیل نیلسن بهبود یافته داشته و برای رنگ آمیزی باکتری، دارای فوشین پایه می باشند.

برای مثال رنگ آمیزی استامپ روشی است که در آن از 0/4٪ محلول فوشین پایه استفاده می شود که به وسیله 0/5٪ محلول اسید استیک به سرعت رنگ بری شده و سپس مجدداً با متیلن بلو 1٪ یا محلول مالاشیت گرین رنگ آمیزی می شود. گسترش تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ روغنی با عدسی چشمی (500 × یا بیشتر) مورد بررسی قرار می گیرد. در آزمایشگاه های دامپزشکی روش استامپ ترجیح داده می شود، در حالی که در آزمایشگاه های تحقیقاتی بیشتر روش Gimenez جهت بررسی سلول های کشت آلوده، مورد استفاده قرار می گیرد. از آنجایی که یک محلول اسیدی جهت تفریق استفاده نمی شود، روش Gimenez سریع ترین روش است. در رنگ آمیزی، کوکسیلا بورنتی به تعداد زیاد، باریک، به رنگ صورتی و کوکوباسیل در زمینه آبی یا سبز مشاهده می شود. ممکن است به علت اندازه کوچک کوکسیلا بورنتی، گاهی شناسایی آن ها دشوار باشد که به دلیل وجود تعداد بالای این اجرام حالت مذکور جبران می شود. گنجیدگی های این باکتری در سلول های میزبان، معمولاً به شکل توده های قرمز در زمینه آبی یا سبز مشاهده می شود.

باید توجه شود که ممکن است در تفسیر نتایج بررسی های میکروسکوپی، کوکسیلا بورنتی با کلامیدوفیلا آبورتوس و گونه های بروسلا اشتباه شود، اما کلامیدوفیلا آبورتوس حاشیه های مشخص تر دارد، گرد و کوچک بوده و شیه گلبول ها است. گونه های بروسلا نیز بزرگ ترند ($0/6-1/5\mu\text{m}$ طول و $0/5-0/7\mu\text{m}$ عرض)، واضح تر مشاهده می شوند و به میزان بیشتری رنگ می گیرند. **برای مقایسه بین این سه باکتری، لازم است لام های کنترل مثبت برای کوکسیلا بورنتی، کلامیدوفیلا آبورتوس و بروسلا تهیه شود.** در روش های معمولی، بررسی های میکروسکوپی همراه با نتایج مثبت سرم شناسی کفایت می کند. اگر استفاده از رنگ آمیزی های بیولوژیک نتیجه بخش نیست، باید از روش های دیگر به عنوان آزمایش های تأییدی استفاده نمود.

ج) روش های تشخیصی اختصاصی: شناسایی کوکسیلا بورنتی را می توان با کمک روش های ایمنی شناسی اختصاصی (capture ELISA، ایمونوهیستوشیمی)، آمیخته گری in-situ یا تکثیر DNA انجام داد. روش ایمونوهیستوشیمی می تواند با استفاده از بافت های آغشته به پارافین یا بر روی گسترش هایی که با استون ثابت شده اند، صورت پذیرد. این روش یک ایمونوفلئورسنس غیر مستقیم یا آزمون ایمونوپراکسیداز است که در آن از آنتی بادی های اختصاصی پلی کلونال کوکسیلا بورنتی که در حیوانات آزمایشگاهی (خرگوش یا خوکچه هندی) تولید می شود، استفاده می گردد. جهت قابل مشاهده شدن باکتری، از یک antispecies (خرگوش یا خوکچه هندی) که به آنتی IgG (که با ATTC یا پراکسیداز نشان دار شده است) متصل شده است، استفاده می شود. باید لام های کنترل مثبت آنتی ژن کوکسیلا بورنتی جهت مقایسه موجود باشد. هیچ آنتی بادی اختصاصی برای روش ایمونوشیمی به صورت تجاری موجود نمی باشد.

برای بافت هایی که آغشته به پارافین هستند (بخصوص نمونه های جفت)، از روش آمیخته گری in-situ فلئورسنس با استفاده از پروب های الیگنوکلئوتید اختصاصی که با هدف 16 s rRNA استفاده می شود.

روش PCR جهت شناسایی DNA کوکسیلا بورنتی در کشت های سلولی و نمونه های بیولوژیک، به طور موفقیت آمیزی استفاده می شود. PCR برای شناسایی گله های پاک یا گله هایی که در آن ها سقط رخ داده است طراحی شده است. در مورد نمونه های شیر، آغوز و مدفوع که تعداد کوکسیلا بورنتی در آن ها نسبت به مواد سقطی کم تر است، می توان از روش PCR که برای نمونه های متنوعی طراحی شده است، استفاده نمود. جهت حفظ ایمنی برای کارکنان آزمایشگاه، قبل از انجام PCR لازم است نمونه های بیولوژیک را غیر فعال سازیم، می

توان این کار را با قرار دادن نمونه ها در دمای 90 درجه سانتی گراد به مدت 30-60 دقیقه (بسته به نوع نمونه، اندازه یا وزن آن) انجام داد. این روش در آزمایشگاه های مجهز با استفاده از پرایمر هایی که برای اهداف متنوعی مشتق شده اند مانند توالی های الحاقی با چند کپی IS1111 (افزایش تعداد M80806) استفاده می شود.

همه گیر شناسی

سقط در گله های آلوده تا حدود 93 درصد نیز می رسد اما اغلب حدود 5-50 درصد است. پس از سقط یا زایمان طبیعی حیوانات مبتلا و تماس آن ها با مرتع، انتقال از راه گوارش به بقیه گله صورت می گیرد. ارگانیزم در غلظت بالا در جفت و مایعات جنین و در نتیجه، ترشحات واژنی وجود دارد و همچنین از راه ادرار و مدفوع تا 11 الی 18 روز پس از زایش دفع می شود. در بز تا 2 هفته پس از زایش از راه ترشحات واژنی و تا 52 روز از راه شیر و مدفوع دفع می شود. در گاو نیز حداکثر دفع در زمان زایمان رخ می دهد و تا دو هفته نیز وجود دارد، ولی از راه شیر تا چند ماه یا حتی 2 سال بعد دفع شده و تانک شیر نیز آلودگی را نشان می دهد.

علائم بالینی

علائم بالینی زیاد نیستند اما سقط و مرده زایی در انتهای آبستنی رخ داده و آسیب های شدید جفت و نکرور کوتیلودون ها و قطور شدن بین کوتیلودون ها وجود دارد. تعدادی از بزها بدون علائم ظاهری سقط می کنند درحالی که سایر بزها ممکن است بی اشتهایی و بی حالی را 1-2 روز قبل از سقط از خود نشان دهند.

بیماری در گوسفند:

در گوسفند ها عفونت هنگام بره زایی از سقط جنین متداول تر است. میزان سقط در یک گله ممکن است بین 5 تا 35% باشد. جنین ها در اواخر آبستنی سقط می شوند و یا به صورت مرده زایی و تولد بره های ضعیف بروز می کند اما در هر صورت التهاب چرکی جفت از نشانه های معمول آن می باشد.

علائم کالبد گشایی

بر روی کوتیلودون ها قسمت هایی به رنگ خاکستری بوده و نکروز، التهاب و اکسودا بر روی آن مشاهده می شود. غشاء بین کوتیلودونی ضخیم، چرمی و زرد رنگ شده و سطح آن توسط اکسودا پوشیده می شود.

کنترل و پیشگیری

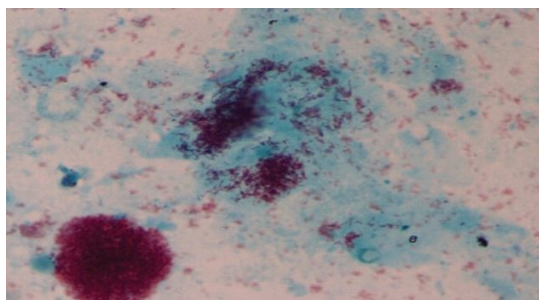
واکسن تجاری در دسترس در ایران وجود ندارد. مانند سایر بیماری های مشترک، کنترل بیماری در جمعیت دامی می تواند به کاهش انتقال عفونت به انسان ها منجر شود. استراتژی های کنترل کنه و اقدامات بهداشتی محیطی میتواند به کاهش آلودگی محیطی کمک کند. مایعات آلوده رحمی، جنین های سقط شده و بسترهای آلوده شده با ترشحات زایمانی می بایست سوزانده شوند زیرا کوکسیلا بورنتی به بیشتر ضد عفونی کننده ها و شرایط محیطی مقاوم است. از آنجا که دامهای به ظاهر سالم و دامهایی که زایمانهای سالم و طبیعی داشته اند نیز در صورت آلوده بودن می توانند میزان زیادی جرم در زایمان ترشح و در محیط پخش کنند، لازم است حتماً آموزش های لازم به دامداران در خصوص از بین بردن صحیح و بهداشتی بستر ها و ترشحات زایمانی داده شود.

کودهای دامداری باید قبل از جابه جایی و استفاده در امورات کشاورزی، بوسیله آهک یا کلسیم سیانید 0/4 درصد عمل آوری شوند. لازم است این کار در روزهایی انجام شود که وزش باد وجود نداشته باشد تا باعث انتقال اجرام نشوند.

درمان

در تجربه ای که در یک همه گیری سقط جنین در بزها به دست آمد، استفاده از کلرتراسیکلین خوراکی به میزان 200 میلی گرم به ازاء هر راس در هر روز برای مدت 19 روز باعث توقف سقط جنین ها شد. در مواجهه با کانون های سقط جنین ناشی از این بیماری، تزریق 20 میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن اکسی تتراسیکلین 20٪ دیر جذب، سه روز یک بار به مدت 14-10 روز نیز موثر می باشد هر چند این رژیم درمانی نمی تواند باعث پاکي گله شود و مواردی از دامهای حامل باقی می ماند.

گربه، گاو، گوسفند و بز و جوندگان محیط می توانند به عنوان مخازن نگهدارنده در محیط باشند و موجب شیوع عفونت دوباره در همان محل گردند. کوکسیلا بورنتی قادر است برای سالها حتی در محیط خشک نیز زنده بماند و موجب بروز عفونت دوباره در دامها و انسانها گردد.



تصویر شماره 12- کوکسیلا بورنتی

لیستریوز

لیستریا مونوسیژنوز باکتری گرم مثبت، غیر اسید فاست و میله ای کوتاه به صورت مستقیم و یا کمی خمیده می باشد. این باکتری در طبیعت بر روی علوفه و گیاهان، خاک، شیر و مدفوع فراوان است. محیط اطراف از راه شیر و مدفوع آلوده می شود همچنین در مخاط برخی دامها به صورت همزیست وجود دارد. نسبت بالایی از گوسفند و بزهای سالم، حاملین خفته این جرم هستند و باکتری را در مدفوع و شیر تحت شرایط استرس دفع می کنند. باکتری به وفور از سیلو، بخصوص سیلوی نامرغوب و با pH بالا (5-9) جدا می گردد.

علائم بالینی

اغلب سقط های لیستریایی در ثلث سوم آبستنی اتفاق می افتد اگر چه ممکن است خیلی زودتر و در سن 4 ماهگی نیز رخ دهد. سقط های لیستریایی با بسیاری از سقط های باکتریایی دیگر متفاوت است زیرا گاو قبل از سقط تا بعد از آن، علائم بالینی دارد که شامل از دست رفتن وزن بدن، تب، تابلوی خونی التهابی، جفت ماندگی و آندومتريت است.

جنین های مبتلا اغلب چند روز قبل از دفع در رحم می مانند و به طور کامل اتولیز می شوند. سقط به علت التهاب حاد جفت و در نتیجه سپتی سمی جنین رخ می دهد. اگر چه اغلب مشاهده اتولیز مشکل است اما جراحات های جفت ممکن است شامل کانون های زرد نقطه ای که راس ویلی های کوتیلودون را می پوشاند با پلاستیت کانونی یا منتشر بین کوتیلودون ها باشد. جنین به طور معمول اتولیز شده و ممکن است کانون های کوچک نکروز در سطح کبد یا طحال دیده شود. این کانون ها ممکن است با جراحات های نکروتیک سقط های ناشی از IBR اشتباه شوند.

تشخیص

تشخیص بر اساس جدا سازی باکتری از بافت های جنین یا جفت است. بر خلاف آنسفالیت لیستریایی که کشت باکتری از مغز ممکن است مشکل باشد، لیستریا به آسانی از بافت های جنین و جفت جدا می شود. مرگ جنین به علت سپتی سمی بوده، بنابراین باکتری به تعداد بالا در بافت ها و مایعات آن، جفت و ترشحات رحمی وجود دارد.

رنگ آمیزی گرم از ترشحات جنین سقط شده و یا گسترش های تماسی تهیه شده از بافت های جنین و جفت، نشان دهنده تعداد زیادی کوکوباسیل گرم مثبت پلی مورف خواهد بود.

شناسایی جرم: طیف وسیعی از روش های سریع وجود دارد که جهت تشخیص لیستریا مونوسیتوزنز در نمونه های غذایی و نمونه های مربوط به دام های آلوده، مورد استفاده قرار میگیرد. استاندارد طلایی روش های معمول با سایر روش ها مقایسه می شود و حساسیت این روش ها معمولاً خیلی بالا است. در این روش ها، عوامل انتخابی که در روش های غنی سازی استفاده می شود کاربرد دارد تا میزان آلودگی به سایر میکروارگانیسم کاهش یافته و تکثیر لیستریا مونوسیتوزنز افزایش یابد. روش های تعیین تحت تیپ های مختلف سویه های لیستریا مونوسیتوزنز وجود دارد از جمله تعیین سروتیپ ها، تعیین فاز، الکتروفورز آنزیم مولتی لوکوس، الگوهای هضم آنزیمی مقاوم به اسید نوکلئیک (الکتروفورز معمولی و با زمینه ژل ضربان دار)، تعیین توالی نوکلئیک اسید و تقویت تصادفی DNA چند شکلی.

روش های معمول باکتری شناسی به دلایل مختلفی از جمله اینکه نتایج استفاده از آن ها در کشت خالص ارگانیسم برای اهداف خاص مفید می باشد، اهمیت دارند. معمولاً این روش ها حساسیت بالایی داشته و نیازی به تجهیزات پیچیده و گران قیمت ندارد. از جمله معایب این روش ها این است که پروتکل آن ها برای کامل شدن احتیاج به زمان طولانی دارد. در این روش ها دستکاری های زیادی صورت می گیرد، احتیاج زیاد به مواد شیمیایی مختلف، معرف ها و محیط ها دارد و همچنین احتمال آلودگی با سایر میکروارگانیسم ها وجود دارد که رشد بیش از اندازه آن ها باعث پوشیده شدن حضور میکروارگانیسم اصلی شده، امکان مشاهده واریانت های غیر تیپیک ارگانیسم اصلی را فراهم می کند و رشد این باکتری ها در پلیت های انتخابی و پلیت آگار تفریق کننده، مشکلاتی را در شناسایی ارگانیسم اصلی ایجاد می کند.

برای جداسازی و تشخیص لیستریا مونوسیتوزنز از غذا، نمونه های محیطی و نمونه های دامی، لازم است از مواد انتخابی و روش های غنی سازی استفاده شود، که استفاده از آن ها باعث می شود میزان آلودگی با سایر ارگانیسم ها در یک سطح معقولی باقی بماند، در حالی که میزان تکثیر لیستریا مونوسیتوزنز به حدی می رسد که برای تشخیص کفایت می کند. غنی سازی سرد لیستریا مونوسیتوزنز از روزهای ابتدایی باکتری شناسی بالینی لیستریا به طور منظم استفاده می شود به این منظور که ارگانیسم را قادر سازد تا در دمای یخچال تکثیر یابد، این در حالی است که سایر

ارگانيسم ها در اين شرايط تکثير پيدا نمي کنند. به هر حال اين روش احتياج به گرم خانه گذاري طولاني (اغلب چند ماه) دارد و اين امر استفاده از آن را در تحقيقات فعلي، در همه گيري ها با منشأ تغذيه اي و موارد انفرادي و همينطور در اجراي بررسي هاي برنامه هاي کنترل نقاط بحراني، غير ممکن مي سازد. ترکيبات انتخابي باعث رشد لیستريا مونوسیتوزن می شوند و با گنجاندن آن ها در گرم خانه با دمای طبیعی و در محیط کشت، مدت زمان مورد نیاز برای رشد انتخابی ارگانيسم، کوتاه مي شود. از جمله اين ترکيبات انتخابي مي توان به سيکلوهگزاميد، کوليستين، سفوتتان، فسفو مایسین، ليتيوم کلرايد، نالیدیکسیک اسید، آکریفلاوین، فنیل اتانول، سفتازیدیم، پلی میکسین B و موکسالاکتان اشاره نمود.

از جمله روش های باکتری شناسی برای تشخیص لیستریوز کشت مستقیم از نمونه ها بر بلاد آگار یا سایر محیط های غنی شده و استفاده همزمان از روش غنی سازی سرد همراه با ساب کالچر ضعیف به مدت دوازده هفته، می باشد. می توان آنتی ژن لیستريا مونوسیتوزن را با کمک روش های ایمونوشیمی بر روی بافت های ثابت شده با فرمالین، تشخیص داد. مشخص شده است این روش در تشخیص شکل التهاب مغزی لیستریوز نشخوارکنندگان، حساسیت بالاتری نسبت به پلیت مستقیم و کشت باکتریایی غنی شده سرد دارد. به کارگیری روش های دیگر غنی سازی و عوامل انتخابی جهت جداسازی لیستريا مونوسیتوزن از غذا و نمونه های محیطی و انجام بررسی های باکتری شناسی اهمیت دارد.

هیچ روش منفردی برای تشخیص لیستريا مونوسیتوزن از همه انواع خوراک ها به اندازه کافی از نظر حساسیت معتبر نیست. علاوه براین، سلول های لیستريا مونوسیتوزن در غذا های فرآوری شده در اثر انجماد، حرارت، اسیدی شدن و سایر عوامل فیزیکی یا شیمیایی، به صورت تحت کشنده آسیب می بینند، چنین باکتری هایی قبل از اینکه بتوان آن ها را در کشت شناسایی کرد، نیاز به شرایط کشت ویژه برای ترمیم آسیب ها دارند.

الف) روش های جداسازی

روش های معمول جداسازی لیستريا مونوسیتوزن از بافت های دام ها شامل کشت مستقیم نمونه ها در بلاد آگار گوسفند یا سایر محیط های کشت غنی شده و استفاده هم زمان از روش غنی سازی سرد همراه با ساب کالچر ضعیف به مدت 12 هفته می باشد. زمانی که تعداد زیادی ارگانيسم در یک ناحیه طبیعی سترون وجود دارد،

جداسازی ارگانسیم به وسیله کشت مستقیم تقریباً کار آسانی است، مانند زمانی که سپتی سمی در دام ایجاد شده است. اما زمانی که تعداد ارگانسیم کم است (مانند شکل التهاب مغز بیماری یا زمانی که نمونه ها به شدت آلوده شده اند) جداسازی جرم دشوار است.

در دام های مبتلا به لیستریوز نمونه ها باید بر اساس یافته های بالینی انتخاب شوند. نمونه ها از جراحات کبدی، کلیه ها و یا طحال تهیه می شوند و در مواردی که دام سپتی سمی دارد می توان از مایع نخاعی، پل مغزی و مدولا در شکل التهاب مغزی لیستریوز، جفت (کوتیلودون)، محتویات شیردان جنین و یا ترشحات رحمی در دام های سقط کرده استفاده نمود. برای جابه جایی، ذخیره سازی و حمل و نقل نمونه ها باید آن ها را در دمای 4 درجه سانتی گراد سرد نمود. نمونه های سرد تا زمانی که می خواهیم آن ها را بررسی و آزمایش کنیم سرد باقی بمانند.

در زیر پروتکلی جهت جداسازی لیستریا مونوسیتوزنز از نمونه های بدست آمده از کالبدگشایی دام ها توضیح داده شده است:

• روش جداسازی از نمونه های کالبدگشایی دام ها

(1) 10-25 گرم یا میلی لیتر از نمونه (بسته به میزان نمونه موجود) را داخل 225 میلی لیتر براث غنی شده لیستریا تلقیح کنید. میزان تلقیح نمونه هایی که از دام های مبتلا به لیستریوز جمع آوری کرده اید، کم تر از نمونه های غذایی است (25 گرم یا میلی لیتر). در مورد نمونه های آلوده، تا آنجایی که می شود باید میزان زیادی تلقیح نمود (10-25 گرم یا میلی لیتر). (محیط پایه براث غنی شده لیستریا: براث اکسوئید تریپتون سویا: 30 گرم، عصاره مخمر دیفکو: 6 گرم، آب: 1 لیتر، مواد انتخابی: اکریفلاوین: 2/3 میلی گرم، نالیدیکسیک اسید: 9/2 میلی گرم، سیکلوهگزامید: 11/5 میلی گرم، مواد انتخابی به 225 میلی لیتر براث پایه اضافه می شود).

(2) براث را در دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت گرم خانه گذاری کنید.

(3) 0/1 میلی لیتر کشت براث غنی شده را بر روی پلت آگار آکسفورد گسترش دهید.

(4) پلیت را در دمای 37 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری کنید. رشد باکتری را بعد از 24 و 48 ساعت بررسی کنید. 5 کلونی را آزمایش کنید (اگر تعداد کلونی ها کم بود همگی آن ها را آزمایش نمایید) و ظاهر تیپیک لیستریا مونوسیتوژنز را بررسی کنید: شکل سلول، واکنش گرم، فعالیت همولیتیک در بلاد آگار (خون فیبرینه شده اسب)، تحرک در دمای 20 درجه سانتی گراد، تخمیر گلوکز (+)، رامنوز (+)، زایلوز (-)، هیدرولیز اسکولین و تولید کاتالاز.

محیط کشتی که آماده کرده اید باید از لحاظ کیفیت کنترل شود و این محیط کشت باید موجبات رشد ارگانسیم های مشکوک از تلقیح کم نمونه را فراهم سازد. سویه مرجع را باید به صورت موازی از نمونه های مشکوک کشت داد تا از اینکه آزمایش به درستی کار می کند مطمئن شد.

نمونه های خوراک که جهت بررسی تهیه می شوند باید نماینده کل خوراک (شامل سطح خارجی و داخلی آن) باشند. روش های کشت معمول شامل یک روش غنی سازی بر پایه استفاده از محیط کشت مایع محتوی مواد انتخابی است. ماهیت محیط و مواد انتخابی در روش های مختلف متفاوت است. نمونه ها به مدت 24-72 ساعت و در دمای 37 درجه سانتی گراد غنی سازی می شوند. بعد از غنی سازی انتخابی، کشت ها داخل پلیت و بر روی پلیت آگار انتخابی/تفریقی برای جداسازی کلونی های احتمالی لیستریا مونوسیتوژنز قرار داده می شوند. تقریباً در همه روش ها از آگار آکسفورد یا آکسفورد اصلاح شده استفاده می شود. آگار آکسفورد حاوی لیتیم کلراید، سیکلو هگزامید، کولستین، اکریفلاوین، سفوتتان و فسفومايسين به عنوان مواد انتخابی هستند. کلونی های لیستریا کوچک و سیاه هستند و دور آن ها هاله سیاه قرار دارد.

(ب) روش های تشخیصی معمول

تشخیص کلونی های تیپیک گونه های لیستریا در پلیت انتخاب/تفریقی که در بالا توضیح داده شد، با استفاده از آزمون های battery صورت می گیرد. این آزمون ها شامل واکنش رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، حرکت (به صورت مرطوب که زیر میکروسکوپ فاز کانتراست مشاهده می شوند و همچنین با استفاده از تلقیح در محیط تست حرکت)، همولیز و مصرف کربوهیدرات می باشند. آزمون Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) ابزاری بسیار کارآمد جهت کمک به تشخیص گونه های لیستریا است. این روش راحت بوده و قرائت

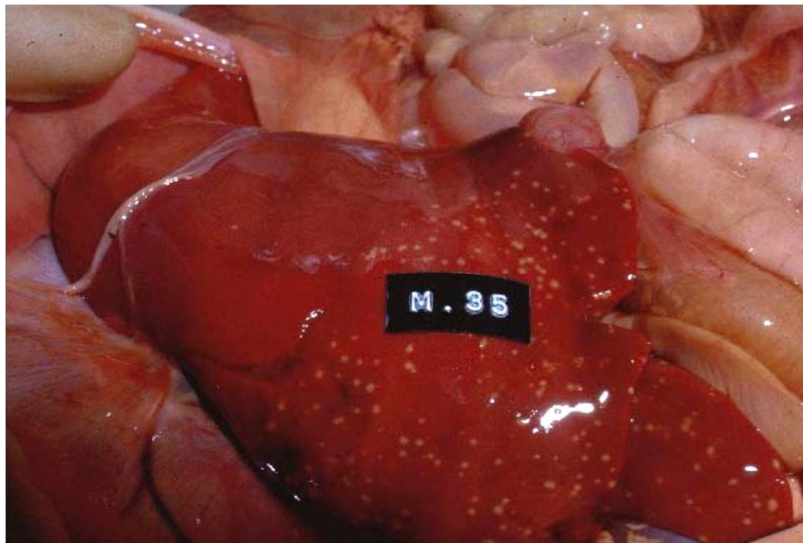
نتایج آن آسان می باشد. این آزمون شامل یک لایه از همولیز بتای استافیلوکوکوس ارتوس (ATCC سویه 49444 یا 25923، NCTC سویه 7428 یا 1803) و رودوکوکوس اکوئی (ATCC سویه 6939 و NCTC سویه 1621) می باشد که در لایه های مستقیم انفرادی به صورت موازی یا روی بلاد آگار گوسفند یا پلِت آگار دو لایه همراه با یک لایه خیلی نازک از بلاد آگار، پوشانده شده است. بعد از گرم خانه گذاری به مدت 24-48 ساعت و در دمای 35-37 درجه سانتی گراد (در صورت استفاده از پوشش نازک بلاد آگار 12-18 ساعت)، یک واکنش مثبت شامل یک ناحیه تقویت شده با همولیز بتا، در نقطه مشترک تست/کنترل و سویه مرجع لیستریا مونوسیتوژنز مشاهده می شود. لیستریا مونوسیتوژنز با لایه استافیلوکوکوس ارتوس مثبت و با رودوکوکوس اکوئی منفی می شود.

کنترل و درمان

ارتباط بین لیستریا مونوسیتوژنز و تغذیه سیلو به درستی مشخص شده است بنابراین باید روی دقت در سیلو کردن و حذف غذاهای فاسد شده برای دام های آبستن تاکید گردد. اگر مواد آلوده توسط دام آبستن خورده شوند، تجویز دوزهای درمانی آنتی بیوتیک مثل اکسی تتراسیکلین به آب یا غذا لازم است. همچنین می توان از پنی سیلین در درمان دام ها استفاده کرد.

علائم کالبد گشایی

تورم و ادم پرده منتر به همراه پرخونی آن در میش و بره های سقط شده از جمله جراحات هایی است که می توان آن را مخصوص لیستریوز دانست. وجود کانون های زرد یا سفید رنگ با اندازه های 1 میلی متر در اغلب اندام ها به ویژه در کبد، نکروزه شدن ویلی های جفت و پوشیده شدن کوریون از اکسودای قرمز و قهوه ای رنگ از دیگر علائم است.



تصویر شماره 13- سقط جنین ناشی از لیستریوز - زخم های دانه ارزنی کبد



تصویر شماره 14- سقط جنین ناشی از لیستریوز - کوریو آلانتوئیس ضخیم؛ چرمی و خاکستری

لپتوسپیروز

عامل بیماری لپتوسپیروز از جنس لپتوسپیرا و یک اسپروکت هوازی کوچک است. برای رشد این اجرام وجود شرایطی چون آبهای سطحی، خاک قلیایی و درجه حرارت 15-20 درجه سانتی گراد لازم است. لپتوسپیروز یکی از بزرگترین دلایل زیان های اقتصادی در دامداری ها است. سقط جنین (تا 30٪)، مرده زایی، کاهش تولید شیر و مرگ و میر دامهای نوزاد از جمله زیان های اقتصادی این بیماری است. بیش از 200 سرووار مختلف از این باکتری در تمام دنیا مشخص شده است. توزیع این سرووار ها از یک کشور به کشور دیگر و یا حتی بین نواحی مختلف در یک کشور متفاوت است.

معمول ترین عامل بیماری در تمام دامها، وارسته سرمی پومونا است. بیماری لپتوسپیروز باعث بروز سپتی سمی، نفريت بيناييني، کم خونی و سقط جنین در اغلب گونه های دامی و نیز ورم پستان در گاو می شود. هر سرووار تمایل به عادت کردن در میزبان خاصی (میزبان نگهدارنده) دارد، هرچند که می تواند در سایر دامها نیز ایجاد بیماری کند. تشخیص عفونت در میزبان نگهدارنده اغلب مشکل است، زیرا پاسخ آنتی بادی به نسبت پایین است و ارگانيسم نیز در بافت ها حضور اندکی دارد. انتقال پاتوژن در بین میزبان های نگهدارنده اغلب در تماس مستقیم با ادرار آلوده، مایعات جفت یا شیر است. انتقال بیماری ممکن است به صورت عمودی و انتقال مقاربتی نیز رخ دهد. انتقال عفونت در میزبان های اتفاقی به صورت غیر مستقیم مانند تماس با آب یا محیط های آلوده شده با ادرار میزبان های نگهدارنده، به وجود می آید.

بیماری زایی

عفونت دامهای حساس از راه غشا های مخاطی چشم، بینی، واژن و پوست های نرم یا بدون مو، رخ می دهد. باکتری می (حضور باکتری در خون) بعد از دوره کمون 4 تا 10 روزه ایجاد می شود و در مدت چند روز تعداد زیادی جرم در طحال، کبد، کلیه و دستگاه تناسلی گاو نر و ماده یافت می شود، و به سلول های کبدی و عروق خونی آسیب وارد می آید. چند روز بعد از وقوع لپتوسپیرومی، تولید پادتن شروع می گردد و به سرعت پاکسازی خون و بافت از جرم شروع می شود. در صورتی که پاسخ پادتنی کافی نباشد، تهاجم و آسیب بافتی شدید اتفاق می افتد. وقتی تهاجم بافتی صورت گرفت، علی رغم حضور پادتن های جریانی، عفونت بقا می یابد.

در نقاطی از بدن مثل توبول های کلیه، چشم و رحم که فعالیت پادتنی در آنها حداقل است، جرم مستقر شده و بقا می یابد. لپتوسپیروها پس از تکثیر، از ادرار و ترشحات رحمی دفع می شوند. موضعی شدن و حضور ارگانیزم در رحم ممکن است سبب عفونت جنین و در نتیجه سقط، مرده زایی یا تولد نوزادان ضعیف شود. آزاد شدن لمفوکین ها همچون TNF- α در اثر اندوتوکسین باکتری یکی از ساز و کار های مهم در حداث بیماری است. آزاد شدن TNF- α باعث آسیب به سلول های اندوتلیال و در نتیجه خونریزی در لپتوسپیروز حاد می شود. آسیب به عروق کلیه منجر به هموگلوبینوری می شود.

علائم بالینی

بیشتر عفونت های لپتوسپیروزی در گاو های غیر آبستن، تحت بالینی است و تعداد زیادی از دام ها بدون بروز نشانه های واضح بیماری، عامل بیماری را از طریق ادرار دفع می کنند. عفونت جنین سبب سقط، مرده زایی و زایش نوزادان ضعیف خواد شد. سقط بعد از 1 تا 6 هفته پس از عفونت حاد پومونا و 4 تا 12 هفته پس از عفونت حاصل از هارجو رخ می دهد و سقط جنین های پومونا اغلب در ثلث آخر آبستنی رخ می دهد. بعد از همه گیری ناشی از سرووار پومونا، بروز سقط در بعضی گله ها می تواند بسیار بالا (تا 50 درصد) باشد. هارجو ممکن است سبب ناباروری یا سقط از چهار ماهگی تا پایان آبستنی شود. میزان سقط در هارجو بین 10 الی 30 درصد است و در صورتی که جنین در سه ماهه سوم آبستنی عفونی شود، جنین می تواند پادتن های اختصاصی تولید کند و بر عفونت غلبه یابد.

بیماری در گاو

تب شدید (40-41 درجه سانتی گراد) خمودگی، کم خونی، هموگلوبینوری، زردی و رنگ پریدگی مخاطات از نشانه های شکل حاد این بیماری است. گوساله های تا 1 سال نسبت به شکل حاد بیماری حساس ترند. در گاو های بالغ علاوه بر نشانه های مذکور، معمولاً سقط جنین، مرگ نوزادان و تغییراتی در پستان و شیر وجود دارد. ترشح شیر تقریباً قطع می شود و ترشحاتی به رنگ قرمز محتوی لخته خون از پستان خارج می گردد و پستان قوام سخت و سفت ندارد. معمولاً سقط در نیمه دوم آبستنی اتفاق می افتد که ممکن است به علت تهاجم جرم به جفت باشد. در عین

حال سقط جنین ممکن است در هر مرحله ای از آبستنی از ماه چهارم به بعد اتفاق بیفتد. در گاو نر تورم بیضه، کاهش تعداد اسپرم و گاهی جراحات پوستی در ناحیه اسکروتوم نیز مشاهده شده است. علائم شکل تحت حاد بیماری مشابه شکل حاد است ولی شدت آن کم تر است. سقط جنین در شکل تحت حاد 3 تا 4 هفته بعد از بروز نشانی ها روی می دهد. کاهش مقدار شیر و پیدایش خون و تغییر رنگ آن در چهار کارتیه پستان از خصوصیات دیگر این شکل از بیماری است. در شکل مزمن بیماری سقط جنین در ثلث آخر آبستنی رخ می دهد و تلفات این شکل از بیماری در گاو بالا و دوره نقاهت طولانی است.

بیماری در گوسفند

گوسفند و بز در بین حیوانات اهلی کمتر به لپتوسپیروز حساس اند. لپتوسپیروز علت معمول سقط گوسفند نیست، ولی زمانی که در گاوداری ها یا حیوانات وحشی منطقه لپتوسپیروز وجود دارد، باید به آن توجه کرد چراکه در بیشتر موارد، آلودگی گوسفند ها در اثر تماس مستقیم یا غیر مستقیم با سایر حیوانات از جمله گاو ها ایجاد می شود. شکل حاد بیماری در گوسفند توسط لپتوسپیرا پومونا و شکل تحت حاد توسط لپتوسپیرا هارجو ایجاد می شود. در شکل حاد، تب، تنفس سریع، بی حالی، هموگلوبینوری، زردی، سقط جنین و تلفات در بره ها مشاهده می شود. در شکل تحت حاد، سقط جنین در اواخر آبستنی، قطع شیر، لاغری و زردی مخاطات دیده می شود. گاهی بیماری به صورت فوق حاد بروز می کند و دامهای مبتلا در مدت 24 ساعت و گاهی زود تر با علائم تب، بی حالی و گاهی زردی تلف می شوند. میش های آبستن نیز ممکن است جنین خود را سقط کنند. بره ها به ویژه بره های لاغر در برابر بیماری بسیار حساس هستند و معمولاً در اثر ابتلا به بیماری در مدت کم تر از 12 ساعت تلف می شوند. موضعی شدن در بافت عصبی و در نتیجه بروز آنسفالیت در گوسفند و بز رایج است. علاوه بر علائم مذکور، گاهی گوسفند های مبتلا دارای تنگی نفس و صدای خس خس بینی بوده و سرشان را پایین نگه می دارند.

بیماری در بز

چندین سروتیپ از لپتوسپیرا اینتروگان نشان داده شده که عامل سقط در بزها می باشند، اما شیوع آنها مشخص نیست. لپتوسپیرا ایکتره‌هموراژیه، لپتوسپیرا گریپوتایفوزا و لپتوسپیرا پومونا از عوامل اصلی سقط در بز هستند. در ظاهر بزها بیشتر از گوسفند ها به لپتوسپیروز حساس هستند. بزها به عنوان منبع اولیه لپتوسپیروز عمل نمی کنند و احتمالاً آلوده شدن بزها به علت تماس با ادرار آلوده سایر گونه ها ایجاد می شود. علائم بالینی در بز شامل بی اشتها، تب، رنگ پریدگی، هموگلوبینوری، آنمی، علائم عصبی و سقط است که سقط در ثلث سوم آبستنی رخ می دهد.

علائم کالبدگشایی

ضایعات کلیه یکی از مهم ترین نشانه های بیماری است، چراکه لپتوسپیروز باعث نفريت بینابینی در کلیه می شود و ممکن است کلیه ها متورم و زرد متمایل به سبز باشد. در مراحل پیشرفته بیماری آثار التهاب به صورت مناطق کوچک سفید رنگ و برجسته ای در بافت کلیه ها جلب توجه می کند. در موارد مزمن بیماری کانون های کوچک به رنگ سفید یا خاکستری با هاله ای از پرخونی در اطراف در حاشیه کلیه مشاهده می گردد. خونریزی در بافت های زیر مخاطی و زیر سروزها قابل مشاهده است. در گاو ممکن است مخاط شیردان دچار زخم و خونریزی شود. در مواردی که هموگلوبینوری شدید است خیز و آمفیزم ریوی امکان دارد مشاهده گردد همچنین ممکن است در محوطه صدري و صفاقي مایعات زرد و خونابه دیده شود. بزرگ شدن طحال یکی از علائم معمول در کالبدگشایی دامهای مبتلا است و کبد ممکن است بزرگ، زرد و سفت باشد. گاهی ظاهر جنین ها زرد است. جفت معمولاً متورم است. آسیب های وارد به جنین اندک است و غالباً توسط اتولیز پوشیده می شود. گاهی ممکن است جنین دچار آسیت یا پريتونیت فیبرینی باشد.

همه گیر شناسی

بر اساس تقسیم بندی سازمان دامپزشکی کشور، ایران از لحاظ وقوع لپتوسپیروز به سه منطقه پر خطر، کم خطر و ظاهراً بی خطر تقسیم می شود. نواحی ظاهراً بدون خطر شامل مناطقی است که رخداد بیماری در آنها به صورت بالینی و به شکل یرقان بسیار نادر است. در مناطق کم خطر گزارش وقوع بیماری به صورت رخداد های بالینی انفرادی و به شکل یرقان، بدون گزارش سقط و عوارض پستانی و تلفات می باشد. در مناطق پر خطر (کرمانشاه، بوشهر و اردبیل) واگیری نسبتاً شدید بیماری به صورت بالینی همراه با یرقان، سقط و تلفات (10-5٪) مشاهده می شود. رایج ترین راه انتقال این بیماری آب است و موارد جدید ابتلا، اغلب در فصول بارندگی رخ می دهد. بنابراین می توان گفت لپتوسپیروز یک بیماری فصلی است بطوریکه شیوع آن در مناطق معتدل در فصل تابستان و پاییز به اوج می رسد و در مناطق گرم، در فصول بارانی بیشترین رخداد بیماری وجود دارد. در شرایط ایران نیز، لپتوسپیروز بیشتر در مناطقی که بارندگی فراوان و آب و هوای مرطوب و معتدل دارند، نظیر استان های شمالی کشورمان دیده می شود. علاوه بر این واگیری بیشتر در فصل زمستان و در جاهایی که گاو ها در یک محوطه محصور و متراکم هستند نیز دیده می شود.

مهمترین منبع عفونت دام آلوده است که آب و مواد غذایی را از طریق ادرار، شیر، جنین سقط شده و ترشحات رحمی آلوده می سازد. ادرار نمودن گاو های آلوده در زمین های سخت که موجب پخش قطرات ادرار تا فاصله زیادی می شود، (با توجه به اینکه ورود ارگانیسم بیشتر از طریق خراش های پوستی و مخاطی به بدن صورت می گیرد) می تواند گاو های مجاور را از راه مخاطات بینی، چشم و یا مهبل آلوده سازد.

جاری شدن سیلاب پس از بارندگی مانع جذب ادرار حیوانات آلوده به خاک و یا تبخیر آن می شود و لپتوسپیرا ها به راحتی در سطح آب روان شده و در لجن ها بر جای می مانند. علاوه بر این، آب های سطحی باعث می شود که لپتوسپیرا در سطح آب و سطح باتلاق ها قرار گیرد که این مسئله احتمالاً ابتلای حیوانات، بویژه جوندگان را افزایش می دهد. تمام دامهایی که از بیماری بهبود یافته اند، ممکن است به طور متناوب جرم را از طریق ادرار دفع کند، به طوری که در گاو دفع جرم از طریق ادرار ممکن است تا 36 روز ادامه داشته باشد. علاوه بر این ادرار خونی که در این بیماری در سگ مشاهده می شود، می تواند راهی در جهت پخش عفونت باشد.

گاو های مبتلا به گنده خواری (پیکا) از طریق نوشیدن ادرار آلوده، می توانند به بیماری مبتلا شوند. انتقال بیماری از طریق جفت (انتقال عمودی) غیر معمول است و آلودگی نوزادان از طریق رحم رخ می دهد. باکتری می تواند در جنین سقط شده و نوزاد تلف شده نیز وجود داشته باشد. نوزادی که از عفونت با لپتوسپیرا زنده می ماند، می تواند آلودگی را تا یک هفته بعد از تولد منتقل کند. از راه های دیگر انتقال آلودگی وجود مراتع مشترک است. خرید یا قرض گرفتن گاو های نر آلوده و دسترسی دام ها به رودخانه ها، جویبار ها، آب های جاری یا آب فاضلاب می تواند باعث آلودگی دامهای سالم شود.

خطر بیماری مشترک

بیماری لپتوسپیروز در انسان عمدتاً یک بیماری شغلی است. آلودگی در انسان در اثر تماس مستقیم با ادرار، شیر و بافت های دام مبتلا و یا به وسیله آب ها یا زمین های آلوده صورت می گیرد. علاوه بر این باکتری می تواند از طریق پوست سالمی که برای مدت طولانی در آب قرار گرفته است، به بدن نفوذ کند. این باکتری می تواند به مقدار زیادی در شیر حضور داشته باشد اما در اثر پاستوریزاسیون از بین می رود. گوسفندان عامل خطر بیماری مشترک برای کارکنان کشتارگاه، دامداران و پشم چینان محسوب می شوند که علاوه بر این خطر بیماری برای شالیکاران، شیردوشان، دامپزشک ها و دامداران نیز وجود دارد. نشانی های بیماری در انسان شامل تب، سردرد، ورم ملتحمه چشم، درد عضلانی، تورم حلق و بثورات جلدی می باشد. باید در زمان جابه جایی لاشه دام تلف شده و در زمان نمونه گیری به خطر مشترک بودن بیماری توجه کرد.

رعایت نکات بهداشتی در دامداری ها، آموزش افراد و استفاده از لباس های مخصوص می تواند از آلوده شدن افراد مرتبط پیشگیری کند. جایگاه شیردوشی و محوطه دامداری باید شسته شود تا کف این قسمت ها از ادرار آلوده پاک شود. لازم است کارکنان کشتارگاه برای دست زدن به لاشه و کلیه دامها از دستکش لاستیکی استفاده کنند. استفاده از لباس ضد آب، ضد عفونی کردن وسایل و تجهیزات در تماس با دام آلوده، سوزاندن یا استریلیزه کردن تمام وسایل آلوده در دامداری ها از نکات دیگری است که باید جهت پیشگیری از آلودگی رعایت کرد.

کنترل و پیشگیری

اولین گام در کنترل بیماری شناسایی منبع عفونت و جلوگیری از انتقال عفونت می باشد. منابع عفونت شامل دامهای با علائم بالینی، جنین های سقط شده، جفت، دامهای حامل، حیوانات وحشی، سگ و گربه، و منابع محیطی مثل آب آلوده می باشد. در مراکز نگهداری گاو های نر جهت تلقیح مصنوعی باید سرم این گاو ها از جهت سرووار های هارجو، گریپوتیفوزا، کانیکولا، پومونا، سرجو و ایکترههمورازیه در رقت 1/100 در آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی منفی باشند. استفاده از واکسن هایی که حاوی سرووار های همان منطقه جغرافیایی باشد برای کنترل بیماری صورت می گیرد.

واکسن بر علیه لپتوسپیروز از نوع کشته است. وقتی بیماری در گله ای ایجاد می شود و سرعت انتشار بالایی دارد باید دامهای آلوده تحت درمان قرار گیرند، دامهای سالم واکسینه شوند و گله به جایگاه پاکیزه منتقل شود. وقتی در گله ای بیماری تشخیص داده می شود، باید با واکسینه کردن، از سقط در دامهای دیگر پیشگیری کرد. همچنین باید در مناطق با بارانهای شدید موسمی و همینطور نواحی سیل خیز، دامهای علفخوار متکی به مرتع در فصل خاص علیه لپتوسپیروز با واکسن با کیفیت واکسینه گردند ضمن اینکه به تامین علوفه در حداقل نیاز نیز اقدام شود. در صورت امکان می توان تمام دامهای گله را واکسینه و گاو های آبستن را با تک دوز دی هیدرواسترپتومایسین درمان کرد. علاوه بر این توصیه می شود دامداران جهت واکسیناسیون سگهایی که در دامپروری نگه داری می شوند نیز اقدام کنند. که این کار باید قبل از ورود سگ به گله صورت گیرد و بعد از آن نیز ادامه پیدا کند. در این صورت سلامتی دام ها و نیز افرادی که در تماس مستقیم با این دام ها هستند تضمین شده و در نتیجه راندمان تولید و دامپروری بالا می رود. اولین واکسیناسیون باید پس از 6 ماهگی صورت گیرد. دامها ابتدا باید دوبار واکسینه شوند و سپس واکسیناسیون به صورت سالانه تکرار شود. در گله های مبتلا، شاید دوبار واکسیناسیون در سال نیاز باشد، زیرا ایمنی به طور معمول کوتاه و با تیترا پایین است. واکسیناسیون در گوساله های زیر 3 ماه مؤثر واقع نخواهد شد. البته واکسیناسیون گاو های آبستن در اواخر آبستنی گوساله ها را ایمن می کند.

برای ایجاد ایمنی در گوسفند می توان هر 6 تا 12 ماه با سویه اختصاصی مبادرت به واکسیناسیون کرد. دامهایی که جهت جایگزینی از گله هایی که سابقه آلودگی در آنها بوده است، باید با دوز کاهیده واکسن کشته لپتوسپیروز

واکسینه گردند. واکسیناسیون گاو های نر، تلیسه های جایگزین و دامهای ماده 2-3 ساله چند هفته قبل از جفت گیری در مناطق بومی در پیشگیری از بیماری مؤثر واقع می شود. علاوه براین، تجویز آنتی بیوتیک های مؤثر جهت حذف حاملین مفید می باشد. تزریق یک تک دز پنی سیلین و استرپتومایسین به کلیه دامهای با سن بیش از 4 ماه می تواند در کنترل بیماری مؤثر واقع شود. در برنامه ریشه کنی بیماری، باید دامهای حامل شناسایی و از گله خارج شوند. گاو های ماده ای که سقط می کنند یا نوزاد مرده یا ضعیف به دنیا می آورند باید حذف شوند و دامها را باید از گله های پاک خریداری کرد. در مناطق آلوده هرگاه بخواهند دامی را خریداری نمایند و به گله وارد سازند باید مدتی آن را در قرنطینه نگه دارند و پس از اینکه دوبار به فاصله دو هفته آزمایش سرمی و یا کشت ادرار آنها منفی شد آن را به گله وارد نمایند. دامهای نر آلوده نباید در جفت گیری های طبیعی یا برای تلقیح مصنوعی مورد استفاده قرار گیرند، البته با استفاده از ضد میکروب ها می توان مطمئن بود که جرم از طریق منی منتقل نمی شود. واکسیناسیون باید تا 5 سال ادامه پیدا کند. (با این کار دیگر در گله، دامهایی که برای مدت طولانی جرم را از خود دفع می کنند وجود نخواهند داشت). برای جفت گیری تلیسه ها، از گاو های نری که تا کنون جفت گیری نکرده اند استفاده شود. گاو های جوان تا سن 38-39 ماهگی از سایر گاو ها جدا نگهداری شوند. این کار میزان تماس بین تلیسه ها و سایر گاو ها را کاهش می دهد.

آزمایش های لازم در مورد گاو هایی که وارد گله می شوند باید دو هفته قبل از ورود آنها صورت گیرد. دیوار کشی اطراف منابع آبی، چراگاه و دامداری و همینطور مصون نگه داشتن این منابع از دسترس حیوانات وحشی، زهکشی مناطق گل آلود و مرطوب چراگاه ها و گندزدایی مناطق عفونی شده و مشکوک به عفونت از جمله کار های مفید برای پیشگیری از بیماری است. همچنین مبارزه با موش ها و دیگر جوندگان باید در دستور کار پیشگیری از لپتوسپیروز قرار گیرد. زهکشی کف جایگاه نگه داری دام، باید به گونه ای باشد که از تجمع مایعات و فضولات دامی در کف جایگاه جلوگیری کند و فضولات دامها باید به مکانی دور از محل نگهداری آنها منتقل شود. علاوه بر این، تمیز و خشک نگه داشتن بستر دامها و همچنین ضد عفونی کردن جایگاه، می تواند جرم را از بین برده و مانع از انتقال عفونت به دامهای سالم شود. بنابراین شست و شو و ضد عفونی محل نگهداری دام با استفاده از ضد عفونی کننده ها مانند ضد عفونی کننده های یده ضرورت دارد.

استفاده ترتیبی از شعله، ضد عفونی کننده و آهک پاشی سطح دامداری می تواند مفید واقع شود. علاوه براین، کنترل تردد افراد و کنترل ورود و خروج وسایل نقلیه، ماشین آلات و لوازم ضروری است. طبق سیاست سازمان دامپزشکی کشور در طی سالهای 1384 تا پایان سال 1388 جهت مبارزه با بیماری در کشور در مناطق پر خطر، ابتدا درمان دامها با استفاده از دارو و تزریق واکسن و سپس استمرار واکسیناسیون هر شش ماه یکبار به مدت 5 سال صورت گرفت. در مناطق کم خطر و بی خطر نیز مراقبت بر پایه آزمایشات سرم شناسی صورت گرفت و در صورت بروز خطر برخورد دارویی انجام می شد.

انجام پروتکل فوق در این مدت سبب قطع وقوع بیماری در گله های تحت پوشش در مناطق پر خطر (شامل سه استان کرمانشاه، اردبیل و بوشهر) شد و در حالی که حجم واکسیناسیون کاهش یافت، تعداد کانونهای وقوع بیماری نیز کاهش پیدا کرد بطوریکه در سال 1389 تنها 12 کانون وقوع بیماری در ایران گزارش شده است درحالیکه در سال 1382 در مجموع 218 کانون وقوع بیماری در ایران گزارش شده است.

درمان

هدف اصلی درمان در تمام عفونت های لیتوسپیاری کنترل عفونت قبل از آسیب کبد و کلیه ها است. برای این منظور بلافاصله پس از مشاهده علائم بیماری در گله، استرپتومایسین و تتراسیکلین توصیه می گردد. البته در صورتی که سپتی سمی اتفاق بیفتد، درمان مؤثر نخواهد بود. میزان تجویز استرپتومایسین 10-12/5 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن زنده دام، تتراسیکلین 10-15 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و پنی سیلین پروکائین 25000 واحد به ازای هر کیلو گرم وزن دام توصیه شده است.

هدف دیگر از درمان بیماری کنترل لیتوسپیوری در دامهای حامل است. برای محدود کردن دفع جرم از طریق ادرار در گاوها می توان از یک دوز منفرد از دی هیدرواسترپتومایسین (25 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) استفاده کرد. در موارد همه گیری استفاده از دی هیدرواسترپتومایسین (25 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به همراه واکسیناسیون از ابتلای دامهای سالم و سقط در دامهای آبستن پیشگیری میکند. برای جبران کم خونی، انتقال خون به میزان 5-10 لیتر خون به ازای 450 کیلوگرم وزن بدن در گاو توصیه می شود. علاوه براین، آنتی بیوتیک های مختلفی مثل استرپتومایسین، تتراسیکلین، اریترومایسین، تیامولین و تایلوزین بر علیه لیتوسپیرا مؤثر

هستند. اگرچه مؤثرترین آنتی بیوتیک، استرپتومایسین است. به هر حال آنتی بیوتیک ها ممکن است باعث کاهش دفع میکروب شوند، اما موجب حذف عفونت نمی شوند. برای درمان در گوسفند استفاده از استرپتومایسین با دوز 11 میلی گرم بر کیلوگرم دو بار در روز به مدت سه روز به شکل داخل عضلانی، می تواند مفید باشد. گزارش شده که تزریق دی هیدرواسترپتومایسین به مقدار 25 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن سبب توقف سقط می شود. در موارد همه گیری می توان از دی هیدرو استرپتومایسین جهت درمان میش های آبستن استفاده کرد.

جمع آوری نمونه

نمونه ها جهت آزمایش های باکتری شناسی: کلیه، کبد و جفت به صورت منجمد (برای انجام آزمایش های فلئورسنت آنتی بادی، PCR، کشت)

نمونه های بافت شناسی (نمونه ها باید در فرمالین ثابت شوند): کلیه، کبد، مغز، قلب، ریه، جفت (جهت بررسی با میکروسکوپ نوری و آزمون هماگلوتیناسیون غیر مستقیم)

نمونه ها جهت آزمایش های سرم شناسی: قلب (سرم خون قلب یا مایعات پریکارد جنین) جهت آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی

نمونه های جمع آوری شده از جنین سقط شده: کلیه، کبد، ریه و ...، مایعات جنینی شامل: زلالیه، مایعات صدری، مایعات صفاقی، مایعات پریکارد و جفت

5-10 گرم از هریک از بافت ها و یا تعداد 5-6 کوتیلودون باید به صورت سترون جمع آوری شوند. سپس نمونه ها باید در ظروف حاوی 100 میلی لیتر سرم آلبومین گاوی 1٪ رقیق شده (1 گرم BSA در 100 میلی لیتر بافر فسفات { KH_2PO_4 487 mg/l + Na_2HPO_4 664 mg/l } که شامل 200 $\mu\text{g/ml}$ -5 فلوروئوراسیل است) به صورت سترون قرار داده شوند.

نمونه های خون را باید تا آنجایی که می توان از تعداد زیادی از میش ها اخذ کرد (حداقل 10 میش) و باید تا آنجا که می توان نمونه ها بلافاصله بعد از سقط جمع آوری شوند. نمونه های خون را می توان از جنین سقط شده نیز برداشت کرد. نمونه های خون باید در لوله های شیشه ای سترون که فاقد ماده ضد انعقاد است جمع آوری گردند.

تمامی نمونه ها باید در دمای 4 درجه سانتی گراد و در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال شوند.

روش کشت: هر جزء سویه که در آخرین واکسن وجود دارد، باید به صورت جداگانه در محیط مایع (ترجیحاً فاقد پروتئین یا با پروتئین کم) رشد داده شوند. حجم هر کشت master seed با رشد در یکسری ساب کالچر با دمای 29 ± 1 درجه سانتی گراد و به مدت 2-10 روز تا یک حجم کافی باید تقویت شود. کشت ها را باید تا آنجا که لازم است تکان داد و هوادهی کرد.

هر ساب کالچر از کشت master seed باید از جهت خلوص و رشد مناسب بررسی شود. برای بررسی خلوص، می توان به اندازه یک لوپ از کشت به پلیت بلاد آگار یا براث تیوگلیکولات تلقیح کرد و به مدت 2-5 روز در دمای 35-37 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری نمود. سپس یک گسترش از رسوب کشت با روش گرم رنگ آمیزی می شود. به وسیله میکروسکوپ زمینه تاریک می توان وضعیت رشد را بررسی نمود. تولید کشت seed باید با آنتی سرم خرگوش مشابه خودش، برای اطمینان از خلوص و هم سانی آزمایش شود که برای این منظور می توان از MAb استفاده نمود.

آزمون های سرم شناسی: آزمون های سرم شناسی بیشترین استفاده را در تشخیص لپتوسپیروز دارند و آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT)، آزمایش سرم شناسی استاندارد می باشد. آنتی ژن های انتخاب شده برای MAT باید شامل سویه هایی باشد که نماینده گروه سرمی موجود در ناحیه خاص است، بعلاوه آنتی ژن هایی که به وسیله گونه های میزبان نگه داری می شوند. MAT هم برای آزمایش بر روی دام ها به صورت انفرادی استفاده می شود و هم برای آزمایش گله. MAT برای آزمایش انفرادی دام ها جهت تشخیص عفونت بسیار مفید است: با این روش عیار آنتی بادی نمونه های سرم دام هایی که به شکل حاد بیماری مبتلا هستند و همچنین نمونه های سرم دام هایی که در دوره نقاهت بیماری به سرمی برند، چهار برابر افزایش می یابد. برای دست یابی به اطلاعات مفید از یک گله، باید حداقل 10 دام یا 10٪ گله، مورد آزمایش قرار بگیرند. همچنین باید سابقه واکسیناسیون دام ها بررسی و ثبت شود.

در آزمایش انفرادی دام ها، تشخیص شکل مزمن عفونت و در گله شکل بومی آلودگی به کمک MAT دارای یکسری محدودیت هایی می باشد. دام های آلوده ممکن است سقط کنند و یا جرم را از طریق کلیه و دستگاه تناسلی خود دفع کنند. در این دام ها عیار MAT کم تر از حداقل عیار قابل قبول (1/100) می باشد (رقت نهایی).

جهت تشخیص آنتی بادی های ضد لپتوسپیروز روش الایزا می تواند مفید باشد. آزمایش های زیادی برای تشخیص آلودگی های اخیر و غربالگری دام هایی که به طور تجربی در مطالعات استفاده می شوند، توسعه یافته است و به طور اولیه مورد استفاده قرار می گیرد. دام هایی که علیه سروواری واکسینه شده اند، گاهی در آزمون الایزا مثبت می شوند و تفسیر نتایج را پیچیده می کند.

الف) آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی:

رایج ترین آزمون سرم شناسی مورد استفاده، MAT می باشد که در آن از آنتی ژن های زنده استفاده می گردد. این روش در مقابل سایر آزمون های سرم شناسی، یک آزمایش مرجع است که از آن برای آزمون های واردات و صادرات استفاده می شود. برای ایجاد حساسیت مناسب، باید از آنتی ژن هایی استفاده کرد که نماینده تمامی گروه های سرمی شناخته شده در منطقه بوده و ترجیحاً سویه ها نماینده همه گروه های سرمی باشند. معمولاً شناسایی یک گروه سرمی با استفاده از واکنش های متناوب در غربالگری سرم شناسی صورت می گیرد، اما برای شناسایی قطعی از جداسازی یک سرووار از دامی که دارای علائم بالینی است استفاده می گردد. می توان با جداسازی ناحیه ای به جای سویه های مرجع، حساسیت آزمون را افزایش داد. اما سویه های مرجع به تفسیر نتایج در بین آزمایشگاه ها کمک می کنند.

ویژگی MAT خوب است. آنتی بادی های علیه سایر باکتری ها معمولاً با آنتی بادی های علیه لپتوسپیرا واکنش متقاطع ندارند، با این حال، به طور مشخصی واکنش متقاطع سرم شناسی بین سرووار ها و گروه های سرمی لپتوسپیرا وجود دارد و دامی که با یک سرووار آلوده شده است، دارای آنتی بادی هایی است که با آنتی بادی های علیه سایر سرووار ها در آزمون MAT واکنش متقاطع ایجاد می کند (معمولاً در سطح پایین). بنابراین، در عفونت های انفرادی یا در همه گیری ها نمی توان از آزمون های سرم شناسی جهت تشخیص قطعی استفاده کرد و در این موارد باید از روش های جداسازی جرم استفاده نمود. به هر حال، در مناطقی که سرووار های لپتوسپیرا به خوبی تشخیص

داده شده است، می توان از روش های جداسازی و آزمایش های سرم شناسی دام های آلوده استفاده نمود، اما نه برای تشخیص قطعی سرووار عفونی. علاوه براین، دام هایی که در برابر لپتوسپیروز واکسینه شده اند، ممکن است دارای آنتی بادی علیه سرووار موجود در واکسن مورد استفاده باشند. بنابراین، توجه به سابقه واکسیناسیون دام های مورد آزمایش اهمیت زیادی دارد.

سویه های انتخاب شده باید در محیط کشت مایع لپتوسپیرا (مانند Tween 80 BSA, EMJH یا سایر محیط های انتخابی) و در دمای 29 ± 1 درجه سانتی گراد رشد کند. همچنین کشت باید حداقل 4 روزه باشد اما بیشتر از 8 روز نباشد. از کشت های زنده با تراکم تقریباً 2×10^8 لپتوسپیرا به ازای هر میلی لیتر به عنوان آنتی ژن استفاده می شود. می توان با شمارش مستقیم سلول ها با استفاده از محفظه شمارش باکتری و میکروسکوپ زمینه تاریک، تراکم کشت را مشخص نمود. شمارش سلول ها را می توان به طور متناوب با استفاده از اندازه گیری پراکنش در اسپکتروفتومتر با فیلتر 400 نانومتر یا با نفلومتری تخمین زد. اگر از روش های غیر مستقیم استفاده شود، لازم است شمارش مستقیم سلول باکتریایی اصلاح شود و ممکن است یک آزمون غربالگری با سرمی به رقت $1/50$ (یا یک رقت آغازین متفاوت براساس هدف آزمایش) صورت پذیرد. هم حجم سرم رقیق شده، آنتی ژن به هر چاهک اضافه می شود، که رقت سرم نهایی در آزمون غربالگری $1/100$ می شود. پلیت های میکروتیتراسیون در دمای 29 ± 1 درجه سانتی گراد و به مدت 2-4 ساعت گرم خانه گذاری می شوند. پلیت ها با میکروسکوپ زمینه تاریک بررسی می شوند.

نقطه پایانی، رقتی از سرم است که 50٪ آگلوتیناسیون را نشان دهد، 50٪ سلول های آزاد با کشت کنترل با رقت $1/2$ در بافر فسفات سالین مقایسه می شود. نتیجه آزمون به عنوان رقت نهایی سرم (مثلاً $1/100$ یا $1/400$) یا متقابلاً به صورت عیاری که رقت نهایی سرم است (مثلاً 100 یا 400)، گزارش می شود. بسیاری از آزمایشگاه ها یک آزمون غربالگری را در یک رقت نهایی سرم انجام می دهند که از $1/100$ شروع می شود تا بالاتر.

در MAT، شناسایی آنتی ژن ها اهمیت زیادی دارد. ارزیابی آنتی ژن ها با استفاده از سرم فوق ایمن خرگوش، MAbs، یا روش های مولکولی با چند مرتبه پاساژ صورت می گیرد، که بهتر است این کار در هر بار آزمایش انجام گیرد، اما حداقل دو بار در سال باید صورت پذیرد. سرم فوق ایمن خرگوش را می توان از یک آزمایشگاه مرجع تهیه نمود و یا از پروتکل هایی مانند کمیته فرعی طبقه بندی لپتوسپیرا تهیه نمود. به طور خلاصه می توان از

خرگوش های سالم با وزن 3-4 کیلوگرم که فاقد آنتی آنتی بادی های قابل شناسایی لپتوسپیرا هستند، استفاده کرد. از ورید حاشیه ای (مارژینال) گوش هر خرگوش خون گیری می شود و از یک کشت زنده با رشد خوب یا کشت کلون شده ای که به آن فرمالین افزوده شده است، استفاده می شود که دارای تراکم تقریباً 2×10^8 لپتوسپیرا در هر میلی لیتر می باشد. کشت در محیط Tween 80 BSA یا یک محیط مناسب دیگر باید رشد نماید. 5 تزریق 1ml، 2ml، 4ml و 6ml با فواصل 7 روز انجام می گیرد. یک هفته بعد از تزریق، عیار آنتی بادی های مشابه با استفاده از MAT مشخص می شود. اگر عیار $1/12,800 \leq$ بود، 7 روز بعد خرگوش را بیهوش کرده و با سوراخ کردن قلب از خون گیری می کنیم (یا 14 روز بعد از آخرین تزریق). اگر عیار $1/12,800 >$ باشد، می توان یک تزریق شش میلی لتری دیگر از کشت انجام داد. 7 روز پس از این تزریق مجدداً عیار مشابه مشخص می شود. مگر اینکه عیار $1/12,800 \leq$ باشد که در این صورت روش مذکور باید دوباره با یک خرگوش دیگر انجام پذیرد. برای آماده سازی هر آنتی سرم از دو خرگوش استفاده می شود. اگر عیار ها در هر دو خرگوش مناسب بود، سرم ها با هم مخلوط می شوند. بهتر است که آنتی سرم ها را با حجم 2 میلی لیتر برای حفظ قدرتشان به صورت خشک منجمد نموده و در دمای 5-2 درجه سانتی گراد ذخیره کنیم. متناوباً می توان سرم ها را در حجم 2 میلی لیتر و در دمای 15 تا 20 درجه سانتی گراد ذخیره نمود. سایر روش های ایمن سازی که براساس استفاده از آنتی سرم های تأیید شده هستند نیز مورد توجه قرار می گیرند.

خلوص آنتی ژن های مورد استفاده در MAT باید با کشت منظم بر روی بلاد آگار و براث تیوگلیکولات، مورد ارزیابی قرار گیرد. کشت های ذخیره آنتی ژن ها در دمای 70- تا 80- درجه سانتی گراد در ازت مایع ذخیره می شوند. در ازت مایع ممکن است میزان لپتوسپیرا های زنده بعد از لیوفیلیزه کردن کاهش پیدا کند. پاساژ مجدد آنتی ژن ها در محیط مایع باعث از دست رفتن قدرت آنتی ژن ها می گردد، که در این موارد باید یک کشت مایع جدید از کشت استاک تهیه شود.

MAT در آزمایش انفرادی دام ها، روش بسیار مفیدی می باشد. در نمونه های سرم دام های که دچار عفونت حاد بوده یا نمونه سرم دام هایی که در دوره نقاهت بیماری هستند، افزایش 4 برابری در عیار آنتی بادی قابل شناسایی است. علاوه براین، احتمالاً تشخیص لپتوسپیروز براساس عیار های خیلی بالا در دامهایی است که دارای چهره بالینی ثابتی هستند. این آزمایش در تشخیص عفونت های مزمن، سقط جنین و همینطور حاملینی که جرم را از طریق کلیه

یا دستگاه تناسلی دفع می کنند، دارای محدودیت می باشد. این مسئله به خصوص در عفونت های عادت یافته به میزبان صدق می کند. مانند سرووار هارجو در گاو: زمانی که عیار $1/100$ یا بیشتر به عنوان نتیجه معنی دار مطرح می شود، حساسیت آزمون فقط 41٪ است و حتی زمانی که حداقل عیار معنی دار به $1/10$ کاهش می یابد، حساسیت آزمایش تنها 67٪ می باشد. می توان آنتی بادی های خون جنین را نیز شناسایی نمود، اما معمولاً عیار ها پایین است (مثلاً $1/10$) و در بیشتر آزمایشگاه ها نیاز به اصلاح آزمون دارد.

از آنجا که لپتوسپیروز گله را درگیر می کند، MAT بیشتر به عنوان آزمونی در سطح گله مطرح می باشد. Cole و همکاران پیشنهاد دادند که برای اخذ اطلاعات مفید، نمونه ها از حداقل 10 دام یا 10٪ گله (هر کدام که بیشتر بودند) تهیه شوند. در مطالعه ای که عفونت هارجو را در گاو بررسی می کرد، Hathaway و همکاران متوجه شدند که معمولاً نمونه گیری از 10 گاو حضور یا عدم حضور عفونت را در گله مشخص می کند. افزایش اندازه نمونه ها به بهبود اطلاعات همه گیر شناسی، تشخیص بیماری بالینی و سلامت عمومی کمک می کند.

در تشخیص سرم شناسی لپتوسپیروز باید به نوع سرووار و شرایط بالینی کاملاً توجه شود. در موارد سقط جنین ناشی از سرووار پومونا در گاو، معمولاً در زمان سقط عیار بالایی وجود دارد، چرا که علامت بالینی (سقط جنین) بلافاصله پس از عفونت ایجاد شده است. سقط جنین ناشی از سرووار هارجو در گاو، یک رویداد مزمن است که در این موارد پاسخ سرم شناسی در زمان سقط متنوع است، به طوریکه برخی از دام ها از نظر سرمی منفی هستند، درحالی که سایرین عیار بالایی را نشان می دهند. ممکن است در اثر عفونت در مرحله حاد ناشی از سرووار هارجو، تولید شیر گاو کاهش یابد، که این علامت بالینی با عیار های بالا همراه می باشد. در تفسیر نتایج MAT، باید سابقه واکسیناسیون مورد توجه قرار گیرد. واکسیناسیون وسیع باعث افزایش تعداد دام هایی می شود که از نظر سرمی مثبت هستند. در این صورت دام هایی که به صورت مزمن به خصوص با سرووار هارجو آلوده هستند تشخیص داده نمی شوند.

(ب) الایزا: روش الایزا جهت شناسایی آنتی بادی های ضد لپتوسپیروز توسعه یافته است. الایزا از آنتی ژن ها، پروتوکل های سنجش و پلت فرم های سنجش استفاده می کند و شامل آزمون پلیت و آزمون نوار ادراری می باشد. امروزه آنتی ژن های سطحی لپتوسپیروز شناسایی شده اند. الایزا دارای حساسیت بالایی است، اما به اندازه MAT ویژگی برای سرووار ها را ندارد. در الایزا IgM در عرض یک هفته پس از آلودگی (قبل از آگلوتیناسیون

آنتی بادی ها) قابل شناسایی است. IgG 2 هفته پس از آلودگی در سگ ها قابل شناسایی است و این آنتی بادی برای مدت طولانی باقی می ماند. بنابراین سگ های مبتلا به شکل حاد لپتوسپیروز دارای عیار بالای IgM و عیار پایین IgG هستند. سگ های واکسینه و سگ هایی که قبلاً به لپتوسپیروز آلوده بوده اند دارای عیار بالای IgG و عیار پایین IgM هستند.

آزمون های مشابه دیگری نیز وجود دارد که برای تشخیص آنتی بادی های ضد لپتوسپیرا در گاو و گوسفند مورد استفاده قرار می گیرند. بزرگ ترین تفاوت نقش الایزا در دام های اهلی استفاده از IgM برای تشخیص آلودگی های جدید و برای غربالگری گله در منطقه ای که واکسیناسیون علیه لپتوسپیروز صورت نگرفته است، می باشد. می توان از یک الایزای total-Ig برای شناسایی دام های حساس در کار های تجربی استفاده کرد. همچنین می توان از الایزا جهت شناسایی آنتی بادی های ضد سرووار هارجو در شیر گاو به صورت انفرادی یا در تانک شیر، استفاده نمود. این آزمایش ها به تشخیص گله های آلوده به سرووار هارجو کمک می کنند. اما ممکن است گله هایی که علیه سرووار هارجو واکسینه شده اند در آزمون الایزا مثبت شوند، در نتیجه ارزش الایزا در مناطقی که واکسیناسیون به طور معمول رواج دارد، کاهش می یابد. امروزه آزمون های الایزایی طراحی شده است که اساس آن ها شناسایی آنتی بادی علیه پروتئین ها یا لیپوپروتئین های سطحی لپتوسپیرا می باشد، اما این روش ها هنوز به طور گسترده در اختیار ما قرار ندارند.

عفونت مایکوپلاسمایی و یوریا پلاسمایی

گونه های مایکوپلازما و یوریا پلازما دای ورزوم هر دو متعلق به خانواده مایکوپلازما تاسه بوده و ارگانیزم های چند شکلی بدون دیواره سلولی و کوچک (قطر 0/3-0/8 میکرون) هستند. جنس یوریاپلازما را به تازگی مایکوپلازما های A می نامند. مایکوپلازما ها به حرارت حساس و در برابر سرما مقاوم می باشند. این ارگانیزم ها در مقابل ضد عفونی کننده ها مثل فنل 1٪، فرمالین 0/5٪ و کلرید جیوه 0/01٪ در مدت چند دقیقه از بین می روند. مایکوپلازما ها می توانند برای چند هفته در خاک و بستر دامها باقی بمانند. عفونت های مایکوپلاسمایی حدت زیادی ندارند اما باعث ایجاد بیماری مزمن در دامها می شوند. این ارگانیزم ها به آسانی از راه جفت گیری طبیعی و تلقیح مصنوعی آلوده منتقل می شوند. حالت های دیگر انتقال شامل تماس مستقیم جنین در حین عبور از کانال زایش و آلودگی محیطی به علت ادرار دامهای آلوده است.

یوریاپلازما دای ورزوم می تواند باعث التهاب فرج، ناباروری و سقط در دام ماده شود. عفونت با این ارگانیزم نرخ آبستنی را به حدود 20٪ می رساند. سقط یوریاپلاسمایی تا 10٪ نیز گزارش شده است. مشکلات تولید مثلی ناشی از یوریاپلازما می تواند به مدت 6 ماه در گله ادامه یابد. همراه عفونت های مایکوپلاسمایی و یوریا پلاسمایی به طور معمول التهاب لوله رحمی (سالمپنیت) مشاهده شده است و دام به دلیل ایجاد التهاب لوله رحمی، التهاب گردن رحم و التهاب اندومتر متعاقب جفت گیری طبیعی یا تلقیح مصنوعی، دچار مشکلات ناباروری می شود. مایکوپلازما بووی جنیتالیوم در موارد التهاب گرانولر فرج، التهاب اندومتر، ناباروری در گاو ماده و همچنین التهاب وزیکول سمینال در گاو نر جدا شده است. عفونت های دستگاه تناسلی نر با مایکوپلازما بوویس، کمتر از مایکوپلازما بووی جنیتالیوم متداول است. اگرچه مایکوپلازما بوویس از نظر انتقال مقاربتی ممکن است خطرات بیشتری داشته باشد. التهاب سمینال وزیکول، التهاب اپیدیدیم و تورم بیضه به علت عفونت مایکوپلاسمایی در گاو نر گزارش شده است. عفونت های مایکوپلاسمایی میزان واگیری بسیار بالا دارند اما میزان تلفات ناشی از آن ها پایین است. عفونت مایکوپلاسمایی در سقط های انفرادی نیز مشاهده می شود. از آنجا که این ارگانیزم ها به طور طبیعی در دستگاه تناسلی گاو های نر و ماده حضور دارند و با وجود اینکه دام بیمار نیست از آنها جدا می شوند، تشخیص آنها مشکل می باشد.

بیماری زایی

مایکوپلاسما ها تمایل به غشا های مخاطی دارند و می توانند به صورت اجرام هم سفره (کمنسال) یا بیماری زا در این قسمت ها حضور داشته باشند. این ارگانیزم ها اتصالات محکم با سلول های اپیتلیال برقرار کرده و سپس موضعی شده و ایجاد عفونت می کنند.

از نظر بیماری زایی بیماری های ناشی از مایکوپلاسما در سه گروه مجزا قرار می گیرند:

- 1- بیماری هایی که بروز سپتی سمی مهمترین مشخصه آنهاست.
- 2- بیماری هایی که در آنها معمولاً مرحله گسترش مایکوپلاسما از طریق خون ناشناخته است و به دنبال آن موضعی شدن و بروز آماس در حفرات سروزی و یا مفاصل اتفاق می افتد.
- 3- بیماری های موضعی دستگاه تنفسی، دستگاه تناسلی، غده پستان یا ملتحمه چشم. در این بیماری ها گسترش جرم از طریق جریان خون بارز نمی باشد ولی گاهی ممکن است اتفاق بیفتد. این بیماری ها امکان دارد در نتیجه تکثیر موضعی غیر قابل کنترل مایکوپلاسما ها و سپس گسترش آنها از طریق سطوح مخاطی به محل های حساس تر اندامها یا دستگاه های مختلف، بروز نماید.

علائم بالینی

در گاو علائم بالینی به دنبال یوریاپلاسما شامل التهاب گرانولر فرج، ناباروری و سقط است. همچنین عفونت رحمی با یوریاپلاسما سبب زایش گوساله های ضعیف می شود. عفونت مایکوپلاسمایی دستگاه تناسلی ممکن است سبب التهاب گرانولر فرج، ناباروری و سقط جنین شود. به دنبال عفونت قسمت فوقانی دستگاه تولید مثل، ناباروری ایجاد می شود.

مایکوپلاسما آگالاکتیه وارسته بویس در گاو، گوسفند و بز می تواند باعث التهاب فرج و واژن (ولوواژینیت) شود. انتقال این عفونت از منی دام آلوده به دام ماده می تواند باعث التهاب اندومتر و التهاب لوله رحمی و در نتیجه منجر به ناباروری و مشکلات تولید مثلی شود. همچنین بیماری ناشی از این عفونت می تواند منجر به سقط های انفرادی شود.

بیماری در گاو

گونه های مایکوپلاسما در گاو باعث عوارضی می شوند که زیان های اقتصادی فراوانی را به دنبال دارد. از جمله این عوارض شامل ورم پستان، پلی آرتريت و سقط می باشد. بیماری می تواند از طریق غده پستان وارد شیر شده و گوساله ها با مصرف شیر، آلوده شوند. سقط معمولاً به دنبال سپتی سمی عفونت ناشی از مایکوپلاسما ها رخ می دهد.

مایکوپلازما بوویس

مایکوپلازما بوویس باعث عوارضی چون پنومونی، تورم مفاصل و ورم پستان در گاو می شود که این عوارض با التهاب قرنیه و ملتحمه چشم، التهاب گوش، التهاب منتر (منژیت) و سقط همراه است. 11 گونه مایکوپلازما قادر به ایجاد ورم پستان در گاو هستند اما بیشتر همه گیری های ورم پستان ناشی از گونه مایکوپلازما بوویس می باشند. میزان واگیری بیماری می تواند تا 25٪ باشد. تماس مستقیم بین دام آلوده و دام حساس اولین راه انتقال مایکوپلازما بوویس می باشد. گاو ها می توانند از طریق ترشحات بینی، عفونت را به مدت چندین ماه تا چندین سال از خود دفع کنند. گوساله هایی که از شیر دامهای مبتلا استفاده کرده اند، ممکن است به پنومونی و التهاب گوش میانی مبتلا شوند. البته پاستوریزه کردن این شیر ها باعث از بین رفتن مایکوپلازما بوویس می شود. علاوه براین، از طریق دستگاه شیردوشی یا دست شیردوش نیز آلودگی می تواند به گاو های دیگر منتقل شود. مایکوپلازما بوویس هم می تواند باعث فعال شدن سیستم ایمنی بدن شود و هم می تواند آن را سرکوب کند. به محض آلودگی با این ارگانیزم، ماکروفاژ های آلوئولی فعال شده و باعث تولید دو جزء مهم در پاسخ ایمنی یعنی TNF- α و نیتریک اکساید می شوند. به این ترتیب سیستم ایمنی فعال شده و به عفونت پاسخ می دهد. علاوه براین، ارگانیزم می تواند با ممانعت از دگرانوله شدن نوتروفیل ها، فعالیت های اکسیداتیو و تکثیر لنفوسیت ها، باعث سرکوب ایمنی شود.

مایکوپلازما بوویس از طریق ایجاد مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) باعث از بین رفتن لنفوسیت ها می شود. بیماری ناشی از مایکوپلازما بوویس بیشتر در گوساله های پروراری ایجاد می شود. معمولاً این دامها سابقه ابتلا به بیماری های تنفسی داشته اند که استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان آن ها مؤثر واقع نبوده است. صدای کراکل و ویز در معاینه ریه این دامها وجود دارد. در برخی قسمت های ریه صدای بم شنیده می شود که نشان دهنده انسداد برونشیول ها در اثر ترشحات است. افسردگی، بی اشتها، سرفه، تب و از دست دادن وزن بدن از علائم شایع در این بیماری می باشد. گوساله های مبتلا معمولاً دچار لنگش می شوند. سختی در راه رفتن و تورم مفاصل مربوط به اندام های حرکتی بزرگ مشاهده می شود. گوساله ها تمایل به راه رفتن ندارند و برای مدت طولانی زمین گیر می شوند. در این حالت وزن گوساله ها رو به کاهش می گذارد و دچار زخم بستر می شوند. دامهایی که در آن ها بیماری خفیف است ممکن است بعد از گذشت 10-14 روز خود به خود بهبود یابند. اما در دامهایی که به شکل

شدید بیماری مبتلا هستند، امکان دارد بیماری پیشرفت کند که در این موارد باید دام مبتلا حذف شود. پنومونی، پلی آرتریت یا هردوی این علائم، ممکن است دامها را در هر سنی درگیر کند.

مایکوپلازما بوویس می تواند باعث التهاب گوش میانی یا گوش خارجی گردد، که در این صورت در گوساله ها علائمی چون افسردگی، سرفه، ریزش ترشحات از بینی و بی اشتها می مشاهده می شود. ممکن است سر به یک سمت خم شود و لب، پلک و گوش همان سمت نیز فلج شود. همچنین از دست دادن متناوب تعادل در سمت مبتلا در هنگام راه رفتن دام مشاهده می شود. سختی در عمل بلع، برگرداندن غیر ارادی شیر و سختی در مکیدن شیر از شیشه، در گوساله های مبتلا مشاهده می شود. در التهاب گوش میانی ممکن است ترشحات دیده نشود، علاوه بر این برگشتگی سر به عقب (اپیستوتنوس) و حرکات غیر ارادی چشم (نیستاگموس) در این عارضه رایج است. در نهایت پس از چند روز عدم تعادل، زمین گیری و مرگ رخ می دهد. در کالبدگشایی دامهای مبتلا التهاب کیسه مفصلی را به طور مشخص مشاهده می کنیم. کیسه مفصلی متورم بوده و مایع مفصلی حاوی چرک و فیبرین است.

یک دوز واحد از واکسن مایکوپلازما بوویس که با ساپونین، غیر فعال شده است، دامها را ایمن کرده و باعث کاهش دفع ویروس در دامهای مبتلا می گردد. مایه کوبی با مایکوپلازما بوویس منجر به سقط در گاو های آبستن می شود.

نمونه های مورد نیاز جهت تشخیص مایکوپلازما بوویس:

نمونه های بافت شناسی: ریه و غشاء مفصلی (جهت بررسی با میکروسکوپ نوری و ایمونوهیستوشیمی)

نمونه ها جهت تشخیص مایکوپلازما: ریه و سوآب از حفره مفصلی (برای کشت)

جهت درمان عفونت ناشی از مایکوپلازما بوویس می توان از طیف وسیعی از ضد میکروب ها از جمله تایلوزین، اکسی تتراسیکلین، لینکومایسین و آلدومایسین استفاده کرد. در گوساله هایی که مبتلا به بیماری تنفسی ناشی از مایکوپلازما بوویس به همراه گونه های پاستورلا هستند، استفاده از والنمولین (valnemulin) در شیر گوساله ها به مدت 4 روز، باعث افزایش وزن آن ها شده و احتمال عفونت با مایکوپلازما را در این گوساله ها کاهش می دهد.

بیماری در بز

گونه های مایکوپلازما پاتوژن های مهمی در بز هستند و بیشتر عفونت های مایکوپلازمایی باعث پنومونی بینایی به همراه عطسه می شود که منجر به کاهش رشد و در نتیجه لاغری دام مبتلا، بزرگ شدن بدون درد و مزمن مفاصل و ورم پستان می گردد. در برخی از موارد، چنانچه پنومونی پیشرفت کند می تواند باعث نارسایی احتقانی قلب شود. مایکوپلازما ها در بز باعث ورم پستان، تورم مفاصل (آرتریت)، التهاب قرنیه و ملتحمه چشم، گاهی التهاب فرج و واژن (لولواژینایتیس) و سقط می شوند. در یک همه گیری، سقط جنین علامت بالینی اصلی در دامها محسوب نمی شود. سقط در ثلث آخر آبستنی رخ می دهد. ارگاناسم ممکن است در شیر، کبد، طحال، کلیه، مایعات آمنیوتیک و جفت بز ماده ای که سقط کرده است حضور داشته باشد. علاوه بر این ارگاناسم ممکن است در کوتیلودون ها، کبد و کلیه جنین نیز یافت شود. در آمریکا دامهای مبتلا کشتار می شوند اما در سایر کشور ها به دلایل اقتصادی از تتراسیکلین یا تایلوزین جهت درمان دامهای مبتلا استفاده می شود.

پلوروپنومونی واگیر بز ها

مایکوپلازما کاپری کولوم تحت گونه کاپری پنومونیه عامل پلوروپنومونی واگیر بز ها، بیماری خاص بز ها است که شدیداً واگیردار و کشنده است. گوسفندان ظاهراً نسبت به عفونت طبیعی با این جرم مقاوم هستند. بیماری به آسانی از طریق استنشاق انتقال می یابد. جرم عامل بیماری به مدت طولانی در خارج از بدن دام زنده نمی ماند و ورود بیماری در گله به وسیله دامهای حامل یا آلوده صورت می پذیرد. عفونت زایی این بیماری بالا و میزان ابتلا 100٪ است. بیماری حاد و شدید بوده و میزان تلفات ناشی از آن 60-100 درصد می باشد.

علائم بیماری شامل سرفه، تنگی نفس، تب ($40/5-41/5$ دجه سانتی گراد) و سقط در بز های آبستن می باشد. در مراحل پایانی بیماری، تنفس دهانی، بیرون افتادن زبان و ترشح کف آلود بزاق مشهود است و دام به مدت دو روز یا بیشتر تلف می شود. در شرایط بد آب و هوایی بیماری به شکل سپتی سمی بروز می کند و علائم بالینی و علائم کالبدگشایی مشاهده نمی شود یا بسیار کم است. در کالبد گشایی بز های تلف شده، کبدی شدن ریه و وجود مقدار زیادی ترشحات سרוزی و فیبرینی در پرده جنب مشاهده می گردد. ضایعات ممکن است محدود به یک ریه باشد. در کشور هایی که بیماری بومی نیست باید بز بیمار و بز هایی که در مجاورت آن به سر می برند، معدوم شوند تا

منع انتشار عفونت از بین برود. اما در کشورهایی مثل ایران که بیماری بومی است، بعد از جدا کردن دام بیمار، منطقه را باید ضد عفونی نمود و بزهای سالم را واکسینه کرد. واکسن های حاوی سویه F38 در ماده کمکی فروند غیر کامل و واکسن کشته ساپونین دار از همین سویه در پیشگیری از بیماری مؤثر هستند ولی واکسن نوع اول در دامهایی که از گوشت آنها استفاده می شود مناسب نمی باشد. واکسیناسیون هر شش ماه یک بار بایستی تکرار گردد. مشخص شده است که در صورتی که یک یادآور یک ماه بعد از تزریق اولیه واکسن غیر فعال تهیه شده از سویه F38 مصرف شود، محافظت بیشتری ایجاد می کند.

نمونه های لازم جهت تشخیص بیماری:

می توان نمونه ها را از جراحات ریه، مایعات جنب و گره های لمفاوی مدیاستینال تهیه نمود. چنانچه امکان ارسال سریع نمونه ها به آزمایشگاه نیست می توان کل ریه را در دمای 20- درجه سانتی گراد برای ماه ها نگه داری کرد. باید تا جایی که ممکن است نمونه ها در شرایط سرد ارسال شوند. چراکه با افزایش دما مایکوپلازما های زنده در نمونه ها کاهش می یابند. می توان ریه را به صورت منجمد ارسال نمود.

مایکوپلازما مایکوئیدس واریته مایکوئیدس

این ارگانیزم در بزها باعث پريتونیت فیرینی، پنومونی، تورم مفاصل، ورم پستان و سقط می شود. علائم کالبدگشایی آن شامل منژیت، پر خونی ریه، وجود آگزودای فیبرینی چرکی در ریه ها و پرده جنب و ادم در دیواره بین لبولی می باشد. نمونه های سرم شناسی جهت آزمون تثبیت عامل مکمل و آگلوتیناسیون لاتکس از دامهای بیمار باید جمع آوری شود. به دلیل شکننده بودن باکتری عامل این بیماری، در مسافت های طولانی، نمونه های باکتری شناسی را باید همراه یخ خشک ارسال نمود.

آگالاکسی واگیردار گوسفند و بز

آگالاکسی یک بیماری واگیردار در گوسفند و بز است که ضایعات آن در پستان، چشم و مفاصل دام مبتلا ظاهر می شود. اگرچه اکثر دانشمندان حساسیت بز را بیشتر از گوسفند می دانند، اما در ایران میش ها بیشتر از بزها به بیماری مبتلا می شوند. بر طبق آمار رسمی سازمان دامپزشکی کشور بیماری آگالاکسی در تمامی مناطق دام خیز کشور وجود داشته و گوسفند و بز را مبتلا می کند. عامل این بیماری بیشتر مایکوپلازما آگالاکتیه مد نظر می باشد. عوامل دیگر مانند مایکوپلازما مایکوئیدس، مایکوپلازما آرژینینی، مایکوپلازما مایکوئیدس واریته مایکوئیدس و مایکوپلازما پوتری فیسنس نیز به عنوان عوامل بیماری شناخته شده اند. میزان تلفات این بیماری 10-30 درصد است اما تعداد زیادی از دامها به علت اینکه غده پستان در آنها آسیب دیده و برای همیشه غیر قابل استفاده می گردد، از گله حذف می شوند.

بیماری در هر سنی بروز می کند، جنس هم در ابتلا به بیماری دخالت ندارد و ضایعات ممکن است در دامهای نر نیز ایجاد شود. آگالاکسی بیشتر به طور مستقیم از دامی به دام دیگر انتقال می یابد، ولی گاهی به طور غیر مستقیم از طریق شیردوشی و دست شیردوش نیز ممکن است انتقال یابد. عامل بیماری از طریق ترشحات بدن به خصوص شیر، ترشحات چشم و مفاصل دفع می شود. علاوه براین، باکتری از طریق دستگاه گوارش یا نوک پستان نیز می تواند وارد بدن می شود. به دلیل اینکه دفع جرم از شیر از یک تا هشت سال بعد از بهبود ممکن است ادامه یابد، بنابراین

بیماری نه تنها توسط دام بیمار، بلکه توسط دام بهبود یافته نیز امکان دارد منتقل شود. همچنین انتقال بیماری از طریق آئروسول، وسایل و تجهیزات آلوده نیز صورت می گیرد. شیر دام مبتلا می تواند بستر، غذا و تجهیزات شیردوشی را آلوده کند و به این طریق بیماری را به دامهای سالم منتقل کند.

همچنین ارگاناسم می تواند در مجرای گوش گوسفند و بز وجود داشته باشد و باعث انتقال بیماری از طریق کنه های گوش گردد. بره ها و بزغاله ها از طریق مکیدن شیر مادر های آلوده می توانند به بیماری مبتلا شوند. در مناطقی که بیماری بومی است وجود مراتع مشترک بیماری را از طریق تماس مستقیم و یا آلوده کردن مرتع، به گله های سالم منتقل می کند. پس از ورود جرم به بدن، باکتری وارد گردش خون می شود و ایجاد سپتی سمی می کند. 2-3 روز بعد، جرم عامل بیماری از جریان خون خارج و در اندام های مختلف از جمله پستان، چشم و مفاصل موضعی می شود و باعث بروز علائم بیماری می گردد. دوره کمون بیماری طولانی و حدود 11-13 روز است. بره ها و بزغاله ها در اثر آلودگی دچار سپتی سمی شده و می میرند. اولین علامت بیماری تب شدید است که چندان دوام ندارد. بعلاوه بی اشتها و بی قراری نیز مشهود می باشد. ترشح شیر ابتدا کاهش می یابد و ترشحات چرکی از پستان خارج می شود. هر دو غده پستان متورم، گرم و شکننده هستند. علاوه براین، شیر زرد، گرانوله و حاوی لخته است. دامهای شیروار و آبستن حساسیت بیشتری به بیماری دارند. اگر دامهای آبستن آلوده شوند امکان سقط وجود دارد و در اکثر موارد دامهای آبستن تلف می شوند. اوج علائم بالینی در گوسفند و بز مبتلا بعد از زایمان مشاهده می شود. در برخی همه گیری های این بیماری، التهاب فرج و واژن و التهاب رحم وجود دارد. نهایتاً به علت فیبروز غده پستان، شیر به طور کامل قطع می گردد. 2-14 روز بعد از قطع شیر، ضایعات چشم و مفاصل ظاهر می شود. تورم چشم با ریزش ترشحات مخاطی و ترس از نور همراه است. ورم ملتحمه که رفته رفته به سمت التهاب قرنیه پیشرفت می کند به همراه عروق دار شدن قرنیه ممکن است مشاهده گردد. درگیری مفاصل منجر به ایجاد اشکال در حرکت دام و لنگش می شود. مفاصل کارپ و تارس درگیر، در ملامسه گرم بوده و مایع مفصلی در آن ها قابل لمس است. گاهی تورم مفاصل شدید و دردناک، و زمانی خفیف و غیر آشکار می باشد.



تصویر شماره 15- درگیری مفاصل در بیماری آگالاکسی



تصویر شماره 16- درگیری چشم در بیماری آگالاکسی

دوره بیماری ممکن است از یک تا چند ماه به طول انجامد. در مواردی که دام از بیماری بهبود می یابد، برای همیشه ایمن خواهد شد. در شکل حاد بیماری علاوه بر تب و قطع ناگهانی و کامل شیر، ورم پستان یک طرفی یا دو طرفی، بزرگ شدن گره های لمفاوی پستان و آبسه های متعدد نیز در غده پستان مشاهده می گردد. در کالبد گشایی این دامها ورم پستان *durative*، لمفادنوپاتی، تورم مفاصل و مشکلات چشمی مشاهده می شود. در ایران برنامه منظم واکسیناسیون، درمان دامهای آلوده و رعایت بهداشت جهت کنترل بیماری توصیه می شود. واکسیناسیون دامها با واکسن کشته همراه با ماده کمکی ساپونین در صورتی که به موقع استفاده شود مؤثر خواهد بود. در دامهای ماده واکسیناسیون قبل از جفت گیری صورت می گیرد. به دلیل استعداد دامهای جوان در ابتلا به بیماری، واکسیناسیون در سنین پایین توصیه می گردد. البته تجویز واکسن نباید در سنین کمتر از ده هفته انجام شود. بهترین زمان تجویز واکسن در سن 3 ماهگی توصیه شده است. این واکسن را معمولاً 2 بار به فاصله 2 هفته از راه زیر جلدی تزریق می کنند و مقدار تزریق هر بار به میزان یک میلی لیتر می باشد. مدت زمان ایمنی 6 ماه است و در سال 2 بار بایستی انجام شود. این واکسن برای میش ها 2 ماه قبل از زایش توصیه شده است. علاوه بر برنامه واکسیناسیون برای جلوگیری از ورود بیماری در یک گله باید از ورود دامهای بیمار و یا مشکوک جلوگیری نمود و دامهای تازه خریداری شده را به دقت مورد معاینه قرار داد. جداسازی دامهای بیمار، حذف آنها از گله و ضد عفونی کردن جایگاه دام در هنگام شیوع بیماری کمک مؤثری در محدود ساختن بیماری خواهد نمود. درمان دامهای بیمار با تایلوزین یا اریترومايسين در صورتی که به موقع انجام شود تا 80 درصد موارد مؤثر خواهد بود. میزان تزریق تایلوزین 5-10 میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه تا 3 روز است. اکسی تتراسیکلین شدت بیماری را کاهش می دهد، ولی باعث کاهش میزان دفع جرم از شیر نمی شود.

نمونه های لازم جهت تشخیص بیماری آگالاکی:

نمونه هایی که می توان جمع آوری کرد شامل سوآب بینی و نمونه شیر از دامهای مبتلا به ورم پستان و یا دامهای به ظاهر سالم (در مواردی که میزان تلفات و واگیری در بره ها بالا است)، نمونه مایع مفصلی در دامهای مبتلا به التهاب مفاصل (آرتریت)، سوآب ملتحمه چشم در دامهایی که چشمشان درگیر شده است و نمونه خون برای تشخیص آنتی بادی در دامهای سالم و آلوده می باشد. در دامهای تلف شده نمونه ها شامل پستان به همراه گره های لمفاوی این ناحیه، مایع مفصلی، بافت ریه (در حد فاصل بین ناحیه آلوده و سالم) و مایعات جنب و پریکارد. نمونه ها باید در

شرایط مرطوب و سرد به آزمایشگاه ارسال گردد. هر چهار عامل مایکوپلاسما، تقریباً به آسانی از اندام های داخلی، مفاصل و شیردان جدا می شوند و در اکثر محیط های کشت مایکوپلاسما، کولونی هایی با اندازه های متوسط تا بزرگ، طی 3-4 روز تشکیل می شود.

نمونه های باکتری شناسی: شیر، سوآب چشم، مایعات مفصلی (کشت هوازی و PCR)

نمونه های سرم شناسی (آزمون تثبیت عامل مکمل و الایزا)

طبق دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور در سال 1391، نمونه های مرضی باید بصورت سترون از دامهای بیمار جمع آوری شوند و به محیط ترانسپورت شامل: محیط Heart infusion broth + 20٪ سرم + 10٪ عصاره مخمر + 200 IU/ml آپی سیلین + گلوکز 0/1 ٪ + فنل رد 0/2 ٪ منتقل و بلافاصله در شرایط زنجیره سرد جهت جداسازی سویه و شناسایی به آزمایشگاه ارسال شود.

علائم کالبدگشایی

قرمز شدن کانونی یا منتشر پرده های جنینی به ویژه در پرده کوریوآلانتوئیک و همچنین ضخیم شدن و زرد رنگ شدن آن ممکن است مشاهده گردد. آسیب های وارده مزمن بوده و باعث عوارضی چون فیروز، ادم و التهاب آمنیون می شود. علاوه براین التهاب و نکروز کانونی در کوتیلودون ها و فضای بین کوتیلودونی نیز در پرده کوریوآلانتوئیس مشاهده می شود. التهاب آمنیون بدون مشاهده التهاب جفت، علامت شاخص سقط های یوریاپلاسمایی می باشد.

همه گیر شناسی

دامهای ناقل سالم مهمترین نقش را در ایجاد اپیدمی در این بیماری دارند. مشخص شده است که گاو، شتر و نشخوارکنندگان کوچک وحشی، مخازن عفونت مایکوپلاسمائی هستند. تلقیح مصنوعی می تواند در ایجاد ناباروری یوریاپلاسمایی نقش داشته باشد، چراکه در حین تلقیح، یوریاپلاسمای می تواند به داخل رحم منتقل شود.

خطر بیماری مشترک

این بیماری برای انسان خطری ایجاد نمی کند.

کنترل و پیشگیری

حتی الامکان باید حذف دام های مبتلا یا ناقل بیماری از گله های آلوده صورت گیرد. بر اساس دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور در سال 1391، واکسیناسیون دو ماه قبل از زایش به منظور ایجاد ایمنی در بره های کمتر از 3 ماه بایستی انجام گیرد. دوبار مایه کوبی در سال و انجام « مایه کوبی راپل » 15 روز بعد، امری ضروری است. واکسیناسیون تلیسه ها با واکسن کشته یوریاپلازما دای ورزوم باعث پاسخ ایمنی به این عفونت می گردد، اما از ابتلا به بیماری جلوگیری نمی کند و منجر به پاک شدن دام از عفونت نمی شود. همراه داشتن داروهای ضد حساسیت (آنتی هیستامین و آدرنالین) به منظور برخورد با شوک های آنافیلاکتیک احتمالی در هنگام مایه کوبی توصیه می گردد. استفاده از غلاف سوند تلقیح (غلاف دوبل یا پوشش های پلاستیکی) در پیشگیری از عفونت رحمی با ارزش است. رعایت موازین بهداشتی و اقدامات قرنطینه ای جهت کنترل دام های بیمار یا مشکوک به بیماری ضروری است.

درمان

مایکوپلازما ها فاقد دیواره سلولی هستند، بنابراین نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم می باشند. اما به بسیاری از آنتی بیوتیک های دیگر حساس اند. این اجرام بیشترین حساسیت را نسبت به ماکرولید ها (اریترومایسین، اسپیرامایسین و تیلوزین)، تتراسیکلین ها، کوئینولین ها و کلرامفنیکل دارند با این وجود نتایج درمان در این بیماری چندان رضایت بخش نیست. به ترتیب مایکوپلازما ها و یوریاپلازما ها بیشترین حساسیت را به تیامولین، تیلوزین دارند، اما نسبت به اکسی تتراسیکلین حساسیت کمتری دارند. ترکیبی از لینکومایسین - اسپکتینومایسین - تیلوزین، بیشترین اثر را در درمان عفونت های ناشی از گونه های یوریاپلازما دارد. تجویز داخل رحمی یک گرم تتراسیکلین یک روز پس از تلقیح مصنوعی برای بهبود باروری در گله هایی که مشکلات تولید مثلی آنها به علت یوریاپلازما

تأیید شده، مفید است. گزارش شده تایلوزین (10 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) برای 5 روز درمان مؤثر برای التهاب فرج و التهاب غلاف قضیب ایجاد شده، به علت یوریاپلاسما است. آنتی بیوتیک های فلوروکینولون مثل انروفلوکساسین برای مشکلات تولید مثلی ایجاد شده به علت مایکوپلاسما مفید است. همچنین تایلوزین و تتراسیکلین اثر خوبی بر علیه گونه های مایکوپلاسما دارند.

جمع آوری نمونه

برای جداسازی ارگانسیم های مایکوپلاسما یا یوریاپلاسما، سوآب های داکرون یا پلی استر برای جمع آوری نمونه از فرج و واژن نیاز است. سوآب باید بلافاصله در محیط انتقال بدون چارکول غوطه ور شده و منجمد شود. نمونه ها باید تا زمان ورود به آزمایشگاه منجمد باشند. نمونه های ارجح برای جداسازی یوریاپلاسما دای ورزوم یا گونه مایکوپلاسما شامل ریه، کارنکول، محتویات معده و مایعات آمنیوتیک است. این نمونه ها باید بلافاصله سرد شده و در همان روز به آزمایشگاه منتقل شود یا منجمد شده و به شکل منجمد انتقال داده شوند.

محیط مایکوپلاسما: روش مرسوم می که برای جداسازی مایکوپلاسما استفاده می شود، قابل تعمیم برای هر چهار مایکوپلاسما می باشد. مایکوپلاسما ها، قادر به رشد در بسیاری از محیط ها می باشند. رشد پیش رونده مایکوپلاسما آگالاکتیه در محیطی که حاوی اسید های ارگانیک، مانند پیرووات و ایزوپروپانول است، مشاهده شده است. فرمولاسیون محیط PRM، به شرح زیر می باشد:

100 ml/litre سرم خونی غیر فعال، 20 g/litre پپتون مخصوص، 5 g/litre عصاره مخمر، 5 g/litre گلیسرول، 5 g/litre سدیم کلرید، 9 g/litre HEPES، 100 ml/litre عصاره مخمر تازه، 5 g/litre سدیم پیرووات، 12/5 ml فنول رد 2٪ و آمپی سیلین (200000 IU/ml)، را حرارت دهید. با استفاده از آب مقطر، حجم آن را به 1 لیتر رسانده و با فیلتر کردن آن را سترون کنید. pH محیط براث را بر روی 7/6 تنظیم کنید. محیط نیمه جامد را با افزودن 10 گرم (Bury UK) labM agar No.1، یا آگاری که همین کیفیت را داشته باشد، آماده کنید و آن را در یک پتری دیش سترون بریزید.

تایلوزین استات (250 mg/litre) که دارای اثرات سمی بوده و از رشد برخی از مایکوپلازما ها جلوگیری می کند، از رشد عامل آگالاکسی واگیر، ممانعت نمی کند و در محیط انتقالی می تواند یک ترکیب ضروری برای کاهش آلودگی باکتریایی نمونه های بالینی، محسوب شود. اما زمانی که مایکوپلازما ها در شرایط invitro رشد می کنند، نباید از آن استفاده شود. می توان به جای تالیوم استات، از کولیستین سولفات (37/5 mg/litre)، استفاده نمود.

روش انجام آزمایش:

(i) رقت های 10 برابر (10^1 - 10^6)، از نمونه های مایع (شیر، مایع مفصلی، سوآب ملتحمه و گوش) یا بافت های همگن شده در محیط براث مناسب، تهیه کنید.

(ii) چند قطره از هر نمونه را در محیط آگار پخش نمایید. سپس 10٪ از تلقیح را به محیط براث، اضافه کنید.

(iii) سوآب ها را به طور مستقیم به محیط آگار منتقل کنید.

(iv) براث های تلقیح شده و محیط آگار را در دمای 37 درجه سانتی گراد، با اتمسفر مرطوب و 5٪ کربن دی اکسید، گرم خانه گذاری کنید (در حین کار، حرکت دادن ظروف باید آرام باشد).

(v) براث ها را هر روز از لحاظ نشانی های رشد، بررسی نمایید (که به صورت یک منظره ابر مانند یا شیری رنگ مشخص می شود).

(vi) اگر پس از گذشت 7 روز، هیچ نشانی از رشد مایکوپلازما ها مشاهده نشود، لازم است ساب کالچر 10٪ از تلقیح براث در براث جدید تهیه گردد و حدود 50 میکرولیتر از آن در محیط آگار، پخش شود.

(vii) مرحله (v) را مجدداً تکرار کنید. اگر پس از گذشت 21 روز از گرم خانه گذاری، هیچ مایکوپلازمایی رشد نکرد، می توان نتیجه را منفی در نظر گرفت.

(viii) اگر آلودگی باکتریایی ایجاد شد (که به شکل کدورت زیاد مشاهده می شود)، بایستی 1 میلی لیتر از براث آلوده را از فیلتر 0/45 میکرونی عبور و به محیط براث جدید منتقل نمود.

معمولاً نمونه های بالینی، به بیش از یک گونه مایکوپلازما آلوده هستند. بنابراین، در اغلب موارد خالص سازی کلون ها قبل از آزمایش های بیوشیمیایی و سرم شناسی (مخصوصاً در مورد آزمون های ممانعت از رشد GIT و ممانعت از فیلم FIT)، امری ضروری می باشد. در هر صورت کلون کردن، روش زمان بری است و به حداقل دو هفته زمان احتیاج دارد. آزمون های ایمونوفلئورسانس، immune binding نقطه ای و جدیداً آزمون های PCR، نیازی به کلون کردن ندارند، چراکه این روش ها قادر به تشخیص مایکوپلازما های پاتوژن در کشت های مخلوط هستند، ضمن اینکه زمان کمی صرف انجام آن ها می شود.

آزمایش های بیوشیمیایی: اولین آزمایشی که باید بر روی کلون جدا شده صورت پذیرد، آزمون حساسیت به دیجیتونین می باشد. این روش مایکوپلازما ها را از آکولپلازما ها (acholeplasma)، جدا می نماید. آکولپلازما ها، آلوده کننده های همه جایی هستند که باعث رشد بیش از اندازه مایکوپلازما ها می گردند. روش هایی چون رشد در محیط مایع حاوی گلوکز (1٪)، آرژنین (0/2٪) و فنول فتالین دی فسفات (0/01٪)، روش رشد بر روی محیط نیمه جامد حاوی سرم اسب یا زرده تخم مرغ برای شناسایی فیلم یا لکه ها (spots) و همینطور رشد بر روی آگار کازئین یا آگار سرم منعقد شده برای آزمون های پروتئولیز، تقریباً مناسب ترین آزمون هایی هستند که می توان برای تفریق مایکوپلازما ها استفاده نمود. با این وجود، هریک از مایکوپلازما ها دارای ویژگی های بیوشیمیایی متنوعی هستند، بنابراین آزمون های بیوشیمیایی ارزش تشخیصی ندارند. مهم ترین ویژگی بیوشیمیایی که M.putrefacient را از سایر مایکوپلازما ها تفریق می کند، بوی تعفن است که در کشت براث تولید می شود. سایر ویژگی ها که می تواند در شناسایی مایکوپلازما ها مفید باشد، شامل: تولید فیلم و لکه (spots) در سطح براث و محیط نیمه جامد که توسط مایکوپلازما آگالاکتیه و در موارد اندکی M.putrefacient، تولید می شود و فعالیت پروتئولیتیک Mcc و MmmLC در سرم منعقد شده و کازئین می باشد.

همچنین یک آزمون بیوشیمیایی سریع و بسیار مناسب که استراز C8 را فعال می کند، وجود دارد. یک ساعت پس از افزودن سوبسترای کروموژنیک SLPA اکتانوات، کلونی های قرمز رنگ مایکوپلازما، بر روی محیط آگار، ظاهر می شوند (یک استر سنتتیک جدید، ساخته شده از یک اسید چرب C8 و یک کروموزوم فنولیک). این فعالیت به صورت مشترک با مایکوپلازما بوویس صورت می گیرد البته این گونه مایکوپلازما به ندرت در نشخوارکنندگان کوچک یافت می شود. جداسازی مایکوپلازما آگالاکتیه، احتیاج به کلون کردن ندارد، چراکه

این باکتری، به راحتی در کشت های مخلوط قابل شناسایی است. در صورت لزوم، می توان از روش های PCR جهت تفريق *M.bovis* و *M.agalactiae*، استفاده نمود.

باسیلوس لیچنی فورمیس (*Bacillus licheniformis*)

اگر چه این باکتری یک میکروب همه جایی است اما مهمترین منبع آن سیلوها، آب، مواد غذایی و بسترهایی است که بوسیله ذرات سیلوها آلوده شده اند. مسیر آلودگی بوسیله این میکروب به صورت کامل شناخته نشده است اما احتمالاً از طریق ورود به جریان خون متعاقب آلوده کردن دستگاه گوارش می باشد.

موارد سقط انفرادی در سه ماهه سوم آبستنی اتفاق می افتد همچنین گزارش هایی از وقوع اپیدمی های کوچک در دو سال پیاپی وجود دارد. در برخی موارد گوساله ها زنده متولد می شوند اما جراحی های قابل مشاهده ای روی جفت وجود دارد. تشخیص آن بر پایه کشت از ترشحات واژن (سوآب واژن)، محتویات شیردان جنین و جفت می باشد. تنها راه کنترل آن، ممانعت از مصرف غذای آلوده (سیلو یا یونجه و علوفه) می باشد.

در ایران، موردی از جداسازی این باکتری در ترشحات شیردان جنین سقط کرده یک راس بز، در استان بوشهر وجود داشته است.

علل ویروسی سقط جنین

بیماری مرزی

ویروس بیماری مرزی در جنس پستی ویروس و در خانواده فلاوی ویریده قرار دارد. این ویروس به عامل اسهال ویروسی گاو (BVD) شباهت زیادی داشته و برخی از موارد همه گیری بیماری مرزی همراه با حضور بیماری اسهال ویروسی گاو در گله ها مشاهده شده است. در کشور ما نیز شیوع بیماری مرزی در نقاط مختلف منعکس کننده حضور آلودگی با BVD می باشد. بیماری مرزی بیشتر در گوسفند و به میزان کمتری در بزها رخ داده و به طور نادر گاو ها را درگیر می کند. در مطالعه ای که در سال 1390 در استان فارس صورت گرفت، 20٪ گوسفندان و 14٪ بزها از نظر سرمی مثبت بودند. همچنین در مطالعه دیگری که در سال 1387 در گوسفندان اطراف تبریز صورت گرفت، مشخص شد که 75/6 درصد گوسفندان مبتلا بودند. تحقیقات نشان داده است که در اطراف قم 19/1 درصد سقط ها، ناشی از بیماری مرزی است که نشان دهنده حضور ویروس در منطقه است.

بیماری در گوسفند

بیماری مرزی مادرزادی است و بره ها را درگیر می کند. بیماری در میش مشکلی ایجاد نمی کند اما ویروس به جفت حمله می کند و منجر به عوارضی چون سقط، مرده زایی، نازایی و به دنیا آمدن بره های ضعیف و کوچک می گردد. در این بیماری پشم برخی از بره ها به طور غیر طبیعی مانند مو می شود و لرزش آشکار عضلات نیز ممکن است در بره های مبتلا مشاهده شود. این بیماری در بسیاری از کشور های مهم از لحاظ پرورش گوسفند وجود دارد. ویروس میش را آلوده کرده و سبب ویرمی (حضور ویروس در خون) هفت روزه می گردد. در زمانی که میش ویرمیک است ویروس از ادرار، مدفوع و بزاق دفع می شود. بره های ویرمیک اگر به سن تولید مثل برسند نوزادان PI (مقاوم به عفونت) به دنیا می آورند. این بره ها بدون نشان دادن علائم بالینی ویروس را برای مدت طولانی از ترشحات خود (بزاق، ادرار، مدفوع و غیره) دفع می کنند. عفونت های دائم (PI)، در بره هایی که قبل از توسعه سیستم ایمنی آلوده شده ولی زنده مانده اند، به وقوع می پیوندد که این حالت بیشتر بین روز های 21 و 72 آبستنی رخ می دهد، اما بعد از آن ایجاد نمی شود. اغلب این بره ها در زمان تولد علائم اختلال عصبی را به شکل

لرزش خفیف تا انقباض های شدید تمام عضلات مخطط (که به شکل انقباض سر و تمام بدن است) نشان می دهند. بره های PI اگر تا 6 ماه زنده بمانند، خود به خود بهبود می یابند.

بیماری در بز

مرگ جنین مهمترین نتیجه این بیماری در بز است. در بزها سیستم ایمنی بعد از 80-100 روزگی تکامل پیدا می کند. بنابراین بزغاله های PI بعد از 60 روز از آبستنی ممکن است به وجود آیند (با علائم لرزش و گاهی بدون علائم بالینی)، البته چنین حالتی در بزغاله ها کمتر از بره ها مشاهده می شود. آلودگی بزها به بیماری مرزی اغلب در اثر نزدیک بون به گاو های مبتلا به BVD مشاهده شده است. علائم بالینی در بز مشابه گوسفند است.

بیماری زایی

نکروز در اتصال ویلی های تروفوبلاست در کارنکول مادری ایجاد می شود. این نکروز سبب جدا شدن جفت از رحم شده و در نتیجه در تغذیه جنین و تبادل خونی، اختلال ایجاد می شود. بره های PI متولد شده برای تمامی عمر آلوده اند و ویروس در تمام بافت های بدن این دامها وجود دارد. اغلب گوسفندان PI نمی توانند آنتی بادی اختصاصی بر علیه BDV تولید کنند، اما گاهی اوقات به شکل متناوب سرم آن ها مثبت می شود. در این دامها پاسخ آنتی بادی بر علیه سایر پاتوژن ها و آنتی ژن ها طبیعی است. با وجود این، پاسخ ایمنی سلولی مختل شده، زیرا جمعیت سلول های T تغییر یافته و عملکرد لنفوسیت ها کاهش یافته است. بنابراین این بره ها اغلب به بیماری های معمول حساس ترند و قبل از رسیدن به سن بلوغ می میرند.

علائم بالینی

وجود تعداد زیادی میش نازا در فصل تولید مثل در گله و غیر آبستن بودن تعداد زیادی از آنها، سقط، زایش بره های دارای علائم و بدون علائم بالینی، شامل بره های ضعیف یا بره های PI در گله از علائم این بیماری می باشد. مرگ جنین زمانی رخ می دهد که عفونت با سویه های حاد قبل از تکامل ایمنی جنین به وجود آمده باشد، که بیشتر در 45 تا 75 روزگی است. اغلب جنین هایی که قبل از 60-85 روز آبستنی آلوده می شوند، به علت آسیب وارده

مرده، سقط، له شده یا مومیایی می شوند. مادرانی که بعد از 85 روزگی آلوده شوند، ممکن است سقط کنند یا بره ضعیف به دنیا آورند.

21-72 روزگی از آبستنی در گوسفند و حدود 60 روزگی در بز ← نوزاد PI در صورت زنده ماندن

45-72 روزگی از آبستنی ← له شدگی، کاهش اندازه سر تا دم و محور طولی جمجمه

45-75 روزگی از آبستنی ← مرگ جنین به علت عدم تکامل سیستم ایمنی

قبل از 60-85 روزگی از آبستنی ← سقط و مرده زایی

بعد از 85 روزگی از آبستنی ← سقط یا به دنیا آمدن بره های ضعیف

بعد از 90 روزگی از آبستنی ← دفع جنین مومی یا آنازارک

کاهش رشد بعد از تولد، تغییر شکل پشم و نواقص عصبی از علائم عمده بیماری است. اگر جنین زنده بماند ممکن است آسیب های مختلفی در آن دیده شود. فولیکول های مو متأثر شده و به جای پشم، مو شکل می گیرد که دارای رنگ قهوه ای و سیاه شدید به ویژه در ناحیه شانه، گردن و سر است که این حالت در گوسفند های PI مشاهده می شود البته برخی از دامهای PI هیچگونه نشانی عصبی و غیر طبیعی شدن پشم را نشان نمی دهند. پشم حیوان وقتی که خشک است مویی شکل و خشن می شود به خصوص در ناحیه پس گردن، پشت، تهی گاه و کپل.

این عارضه بیشتر در نژاد هایی دیده می شود که پشم ظریف دارند و در نژاد هایی که پشم ضخیم و بلند دارند مشاهده نمی شود. گوسفندانی که پشم ضخیمی دارند بعد از مدتی پشم آنها شروع به ریزش می کند، این اتفاق معمولاً در سه هفته اول زندگی رخ می دهد. بره ها، کوچک و دارای صورتی کوتاه بوده و استخوانهای طویل دارند. بره های مبتلا وزن پایینی دارند و دچار ضعف سیستم ایمنی هستند. نواقص استخوانی از جمله آرتروگريپوزيس (سفتی مفاصل و ضعف عضلات) و لوردوزيس (بیچیدگی مهره های پشت) نیز، گزارش شده است و قسمت جلویی سر حالتی گنبدی شکل پیدا می کند. در گوسفندان بالغ و جوان بیماری به صورت تحت بالینی است.

درجات خفیف تا شدید لرزش بدن ممکن است در بره های مبتلا مشاهده شود و لرزش عضلات در ناحیه لگن و بخش های بالایی اندام های خلفی یا لرزش در تمام بدن و تکان خوردن سر و گردن ایجاد می شود. در موارد خفیف تر فقط لرزش گوش ها و دم مشاهده می شود. لرزش در هنگامی که بره حرکت می کند ایجاد می شود و وقتی استراحت می کند مشاهده نمی شود. شدت لرزش وقتی که دام بالغ می شود کاهش یافته و ممکن است رفع شود مگر اینکه حیوان دچار استرس شود. در برخی همه گیری ها لرزش عضلات و مویی شدن پشم در بره ها مشاهده نمی شود که این حالت تشخیص بیماری مرزی را از سایر علل سقط مشکل می سازد. به طور کلی علائم عصبی در بره هایی که زنده می مانند، کاهش می یابند و به تدریج در سن 3-6 ماهگی بر طرف می گردند اما چنین دامهایی قبل یا در زمان بره زایی می میرند.

در موارد شدید بره ها قادر به بلند شدن نیستند و اگر هم بلند شوند در هنگام راه رفتن تعادل ندارند، این حالت به خصوص در اندام های حرکتی خلفی مشاهده می شود اما فلجی در دام رخ نمی دهد. چرخیدن به دور خود، فشار دادن سر به موانع، نیستاگموس (لرزش چشم) و عدم هماهنگی در رشد در بره هایی که دچار هیدروآنسفالیت و دیسپلازی مخچه هستند دیده می شود، چنین بره هایی وزن کمی دارند اما پشم آنها طبیعی است. بره ها چون ضعیف هستند نمی توانند خوب شیر میش ها را بمکند بنابراین دچار نفخ مداوم می شوند و شیر در پستان میش باقی می ماند. مرگ در هر سنی ممکن است رخ دهد. بلوغ در دامهای مبتلا به تأخیر می افتد و در دام های نر بیضه ها کوچک شده، قوام نرم و سستی پیدا می کنند و به طور طبیعی رشد نمی کنند. قوچ های PI ضعیف بوده، منی آنها شدیداً آلوده است و میزان باروری کمی دارند.

نشانه های کالبد گشایی:

یافته های کالبد گشایی شامل قطور شدن ماکروسکوپیک ایلوم، سکوم و کلون است. کوتیلودون ها نسبت به سن جنین کوچک بوده و نکروز کانونی در اندازه های یک تا سه میلی متری را نشان می دهند. مومیایی شدن جنین، پر مو شدن و کوچک بودن جنین نسبت به سن آبستنی مشاهده می شود. کاهش در اندازه سر تا دم جنین و کاهش محور طولی مجموعه که باعث ظاهر له شده بره می شود، در اوایل آبستنی (45-72 روزگی) مشاهده می گردد.

امکان ایجاد پلی آرتريت ندولار در بره های جوان وجود دارد. کوچک بودن اندازه مغز و نخاع از موارد دیگر در کالبدگشایی دامهای مبتلا است.

همه گیر شناسی

انتشار بیماری در شرایط طبیعی هم به صورت عمودی (از مادر به جنین) و هم به طور افقی (از میشی به میش دیگر) صورت می گیرد. مهم ترین منبع آلودگی در گله، خرید بره میش های PI است این بره ها که در ظاهر سالم هستند به مدت طولانی ویروس را از خود دفع می کنند. بره میش های PI که به تازگی وارد گله می شوند ممکن است تا بزرگسالی زنده بمانند و با اینکه قدرت باروری آنها کم است، می توانند بره های مقاوم به دنیا بیاورند که خود منبع آلودگی هستند. برخی از بره های نر، ویروس را از راه منی دفع می کنند که این دامها قدرت باروری کمی دارند. در صورتی که میش های آبستن حساس با گله های آلوده برخورد کنند و یا میش های آلوده با میش هایی که در مقابل بیماری ایمنی ندارند، در نزدیکی هم قرار گیرند، تلفات شدیدی بروز می کند.

در گله هایی که فصل تولید مثل طولانی دارند، ممکن است علائم بالینی در میش هایی که دیرتر آبستن شده اند مشاهده شود. در تابستان که ارتباط و تماس نزدیک بین دام ها کمتر است، سرعت انتشار بیماری پایین است. شیوع این بیماری با افزایش تراکم دامها در گله ارتباط مستقیم دارد. در گله هایی که گاوها و گوسفند ها در زمستان نزدیک هم نگهداری می شوند، گاو های (PI) مقاوم به BVD منبع مهمی جهت وقوع همه گیری بیماری مرزی هستند. این بیماری هم به صورت همه گیری و هم انفرادی رخ می دهد. همه گیری بیماری مرزی در گله هایی رخ می دهد که میش ها با سنین مختلف در اوایل آبستنی به سر می برند. در مواردی که بیماری در گله به صورت انفرادی به وقوع می پیوندد، باید تمامی بره ها و گوسفندانی که مشکوک به آلودگی هستند قبل از شروع فصل جفت گیری به کشتارگاه فرستاده شوند.

خطر بیماری مشترک

این بیماری برای انسان خطری ایجاد نمی کند.

کنترل و پیشگیری:

قاعده کلی در کنترل بیماری این است که از آلودگی میش ها در اوایل آبستنی جلوگیری کنیم. گوسفند های PI که آبستن نمی شوند باید شناسایی و به کشتارگاه فرستاده شوند، این کار باید قبل از جفت گیری صورت گیرد. بعد از شیوع بیماری و سقط، تمام بره هایی که دارای نقایص مادرزادی هستند و همینطور بره های ضعیف را باید به کشتارگاه فرستاد. از آنجا که علائمی چون لرزش و غیر طبیعی شدن پشم پس از 1-2 ماه از تولد برطرف می شود این علائم باید سریع تشخیص داده شوند. بهتر است هیچ دامی به گله وارد نشود، به عبارت دیگر بهترین راه کنترل، محدود کردن گله است، ولی اگر هم خریدی صورت گرفت قبل از ورود به گله به طور حتم باید آزمایش های لازم انجام شود. بره های جایگزین بالای دو ماه باید آزمایش های الایزا یا سایر آزمایش های جداسازی ویروس را پشت سر بگذارند و در صورت منفی بودن، اجازه ورود به گله را دارند. عفونت دائمی با انجام تست های سرمی غربالگری در بره میش هایی که در سن 6 ماهگی (پس از کاهش ایمنی مادری) برای جایگزینی استفاده می شوند می توانند شناسایی شوند بنابراین قبل از خرید میش و قوچ جایگزین باید آنها را غربالگری یا قرنطینه کرد و گوسفند هایی که به تازگی وارد گله شده اند تا زایش بره هایشان از سایر گوسفند های گله جدا نگهداری شوند. گاو ها و گوسفندان نیز باید از یکدیگر جدا نگهداری شوند و غذا خوری و آبخوری مشترک نداشته باشند. به خصوص اینکه گاو ها نباید در نزدیکی گوسفند های آبستن باشند و نباید دارای مرتع مشترک با آنها باشند. گله های گاو باید بر علیه BVD واکسینه شوند.

واکسن کشته ای جهت این بیماری تهیه شده که بهتر است قبل از جفت گیری به میش ها تزریق شود تا از انتقال بیماری از طریق جفت جلوگیری شود. گزارش ها نشان می دهند که ایمنی متقاطع بین ویروس بیماری مرزی و ویروس اسهال ویروسی گاو ها خیلی کم است. بنابراین واکسیناسیون گوسفندان با واکسن کشته یا زنده اصلاح شده BVD فایده ای ندارد.

درمان

در مورد این بیماری درمان اختصاصی وجود ندارد و با انجام مراقبت، بسیاری از بره ها زنده می مانند اما رشد بره ها ضعیف است و به طور معمول بزرگ کردن این بره ها ارزش اقتصادی ندارد.

جمع آوری نمونه

نمونه های بافت شناسی: پوست ثابت شده در فرمالین، نخاع، 1/2 مغز، پوست، تیروئید، قسمت انتهایی ایلوم، کولون، سکوم، تیموس، طحال، کبد، قلب، کلیه (جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری و آزمایش ایمونوهیستوشیمی)

نمونه های سرمی: سرم خون قلب / مایعات قفسه سینه (جهت آزمون خنثی سازی ویروس)

نمونه های ویروس شناسی: جفت/کارانکول، تیموس، گره های لمفاوی، طحال، تیروئید، مغز، ایلوم و منی (ISO، آزمون فلئورسنت آنتی بادی، الایزا، PCR)

نمونه ها جهت جداسازی ویروس:

جفت و بافت های جنین

تعداد 5 یا 6 کوتیلودون جفت همراه با غشای بین کوتیلودون ها، بافت های جنین سقط شده و بره ای که تازه تلف شده باشد. این نمونه ها باید به صورت سترون (آسپتیک) و در ظروف سترون مخصوص (استریل) حاوی محیط کشت انتقالی ویروس جمع آوری شوند.

جدول شماره 8- نمونه هایی که جهت تشخیص بیماری مرزی باید جمع آوری شوند

نمونه گیری از:		روش های تشخیص	علائم بالینی
دام تلف شده	دام زنده		
تیروئید، کلیه، طحال، مغز، جفت در محیط کشت انتقالی (VTM)	نمونه خون هیپارینه دام بالغ	جداسازی ویروس	سقط
تیروئید، کلیه، طحال، مغز، جفت	نمونه خون هیپارینه دام بالغ	تشخیص آنتی ژن	
مغز و نخاع در ثابت کننده	—	بافت شناسی	
مایعات جنینی	نمونه خون دام بالغ	سرم شناسی	
تیروئید، کلیه، طحال، مغز، روده، گره های لمفاوی در محیط کشت انتقالی (VTM)	نمونه خون هیپارینه از بره و دام بالغ	جداسازی ویروس	بره با علائم بیماری، ضعف، با رشد کم یا دچار اسهال
تیروئید، کلیه، طحال، مغز، روده، گره های لمفاوی	نمونه خون از بره و دام بالغ	تشخیص آنتی ژن	
مغز و نخاع در ثابت کننده	--	بافت شناسی	
	نمونه خون از بره و دام بالغ	سرم شناسی	

نمونه های خون:

نمونه های خون جهت جداسازی ویروس یا تشخیص وجود آنتی ژن یا آنتی بادی استفاده می شود. بهتر است نمونه گیری از خون از میش های سقط کرده در زمان سقط جمع آوری شود. نمونه ی خون از بره هایی که دارای علائم بیماری، ضعف، رشد کم هستند، باید قبل از مصرف آغوز جمع آوری شوند. از هر دام دو نمونه خون باید تهیه شود. یکی از نمونه ها در لوله شیشه ای سترون که فاقد عوامل ضد انعقاد است جهت شناسایی آنتی بادی، نمونه دیگر در لوله شیشه ای سترون حاوی هپارین جهت جداسازی ویروس و شناسایی آنتی ژن جمع آوری می شود.

شناسایی آنتی ژن در نمونه های جفت و نمونه های بافتی از جنین سقط شده یا بره ای که با دارای علائم بیماری بوده و به تازگی تلف شده است انجام می گیرد. نمونه ها باید به صورت سترون (آسپتیک) جمع آوری شوند و در ظروف سترون قرار گیرند.

نمونه های بافت:

نمونه های مغز و نخاع باید در ظروف شیشه ای حاوی ثابت کننده مناسب مانند فرمول سالین کلسیم (که با حل کردن 0/85 گرم سدیم کلرید و 1 گرم کلسیم کلرید در مخلوطی از 10 میلی لیتر فرمالدهید 40٪ و 90 میلی لیتر آب، به دست می آید) قرار گیرند و حداقل نسبت ثابت کننده به بافت 10 به 1 باشد. نمونه های بافت باید حداقل به مدت 4 هفته در ثابت کننده باقی بمانند.

نمونه هایی که جهت تشخیص آنتی بادی جمع آوری می شوند:

- نمونه خون
- مایعات جنینی: محتویات شیردان، خون قلب، مایعات جنب و صفاق را می توان از جنین سقط شده ای که خیلی دچار هضم خود به خودی (اتولیز) نشده است برداشت کرد. این مایعات باید در اولین فرصت ممکن به صورت سترون جمع آوری شوند. از سرنگ سترون برای این کار استفاده کنید و نمونه ها را در ظروف سترون و مناسب جمع آوری نمایید.

آماده سازی نمونه ها

محیط کشت انتقالی

محلول نمکی متعادل را hanks کنید

سرم آلبومین گاوی 1%

300IU/ml پنی سیلین G

300 µg/ml استرپتومایسین سولفات

150 IU/ml پلی میکسین B سولفات

آمونیم کلرید tris

آمونیم کلرید 8/3 گرم

Tris 20/6 گرم

آب مقطر 1/9 لیتر

آمونیم کلرید را در 1 لیتر آب حل کنید (0/16 مولار). tris را در 900 میلی لیتر آب حل کنید (0/17 مولار) و pH را با استفاده از 1 مول اسید هیدروکلریک به 7/65 برسانید.

محلول کار: 90 میلی لیتر از آمونیوم کلرید 0/16 مولار را با 10 میلی لیتر از محلول tris 0/17 مولار ترکیب و به خوبی مخلوط کنید و pH را با استفاده از هیدروکلریک اسید 1 مولار به 7/2 برسانید.

جداسازی ویروس:

آزمایشگاه هایی که ویروس را جداسازی می کنند، باید ضمانت نامه ای داشته باشند مبنی بر اینکه سلول ها و سرم جنین گاو (FBS) فاقد آلودگی با پستی ویروس بوده و هیچ فعالیت ضد پستی ویروس ندارند.

می توان سلول را از تعدادی از سلول های کشت اولیه یا ثانویه گوسفند (مانند کلیه، بیضه ها و ریه)، جداسازی نمود. رده سلول گوسفندی برای رشد BDV کم یاب است. رده سلولی نیمه مداوم از عضله جنین بره (FLM)، جنین کامل یا شبکه کروئید گوسفند نیز قابل استفاده است اما رده های مختلف تفاوت قابل توجهی در آلودگی به ویروس دارند. استفاده از سلول های گوسفندی برای جداسازی و رشد ویروس BD و BVD نوع 1 و 2 موفقیت آمیز می باشد. در مناطقی که گوسفند از طریق گاو به BVD آلوده می شود، از سیستم جداسازی استفاده می شود که هم برای سلول های گاوی و هم برای سلول های گوسفندی مناسب باشد. کشت سلول های مختلف گاوی می تواند مورد استفاده قرار بگیرد، از جمله این سلول ها شامل سلول های بیضه، نای جنین یا توربینات های جنینی (شاخک های بینی جنین) یا یک رده ادامه دار حساس سلول کلیه می باشند. به هر حال، سلول های گاوی برای جداسازی اولیه و رشد تعدادی از سلول های BD حساس نمی باشند. بنابراین اتکا به سلول های گاوی به تنهایی توصیه نمی شود.

می توان نمونه سرم را از دام زنده تهیه نمود و آن را جهت حضور ویروس عفونی مورد آزمایش قرار داد. اما شستن مکرر لکوسیت ها (حداقل سه مرتبه) در محیط کشت و کشت هم زمان آن ها به مدت 5-7 روز با سلول های حساس، حساس ترین روش برای تأیید عفونت پستی ویروسی است. بافت های تهیه شده از دام های تلف شده، در محیط انتقالی ویروس [10% (W/V)] جمع آوری می شوند. در آزمایشگاه، بافت ها سانتریفوژ شده، مایع رویی از فیلتر های 0/45 میکرون عبور داده می شوند و مابقی آن حذف می گردد. طحال، تیروئید، تیموس، کلیه، مغز، گره های لمفاوی و جراحات روده، بهترین اندام ها برای جداسازی ویروس هستند.

می توان از منی جهت بررسی BDV استفاده نمود، اما منی بسیار سیتوتوکسیک است و باید رقیق شود (معمولاً 1/10 در محیط کشت). خطر منی آلوده از قوچ های PI، باعث شده است که خون نمونه بهتری برای شناسایی این

دام ها محسوب شود. روش های متنوعی جهت جداسازی ویروس وجود دارد که همگی آن ها باید حساسیت بالایی داشته باشند. در زیر یک روش حساس برای جداسازی ویروس توضیح داده شده است:

کشت ها با subconfluent یا تک لایه های confluent جدید سلول های حساس گوسفندی حداقل دو مرتبه با محلول نمکی متعادل هنکس شسته می شوند. این کار برای حذف محیط رشد قبل از تلقیح با تقریباً 0/2 میلی لیتر از نمونه، که باعث جذب سطحی به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد می گردد، انجام می شود.

(i) کشت ها با حداقل 2 میلی لیتر محیط شسته و دور ریخته می شود، سپس یک حجم مناسب از محیط کشت نگه دارنده به آن اضافه می شود.

(ii) کشت ها برای 5-7 روز در دمای 37 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری می شوند، سپس با استفاده از میکروسکوپ به صورت روزانه بررسی شده و اثرات سیتوپاتیک در آن ها گزارش می شود.

(iii) کشت ها در دمای 70- درجه سانتی گراد منجمد شده و سپس ذوب شده و بر روی کشت های تازه پاساژ داده می شوند.

(iv) 3-4 روز بعد، سلول هایی که در فلاسک شیشه ای رشد می کنند، در استون سرد برای 15 دقیقه ثابت می شوند، اما سلول هایی که در فلاسک پلاستیکی رشد می کنند، به روشی که در آزمون خنثی سازی سرم استفاده می شود، ثابت می شوند. سلول های ثابت شده، با استفاده از روش مستقیم یا غیر مستقیم ایمونوفلئورسنس رنگ آمیزی می شوند. کنترل های مورد نیاز شامل سلول های منفی و سلول هایی که باعث رشد استاندارد سویه های سیتوپاتیک و غیر سیتوپاتیک BDV می شوند، می باشد. سلول ها با میکروسکوپ UV برای فلئورسنس سیتوپلاسمیک منتشر که پستی ویروس را مشخص می کند، بررسی می شوند.

(v) سلول ها زیر میکروسکوپ UV جهت آزمون فلئورسنس سیتوپلاسمیک منتشر (که پستی ویروس را تشخیص می دهد)، بررسی می شوند.

همچنین می توان از رنگ آمیزی ایمونوپراکسیداز روی cover-slip ها و لام های chamber (همانند پلیت های میکروتیتر) استفاده کنید. می توان برای کشت هایی که منجمد و سپس ذوب می شوند، از آزمون های الایزایی که آنتی ژن را شناسایی می کنند استفاده نمود، در این روش ها از آنتی بادی های مونوکلونال علیه اپیتوپ های روی پروتئین NS 2-3 غیر ساختمانی محفوظ، استفاده می شود. رنگ آمیزی پستی ویروس های غیر سیتوپاتیک معمولاً ویروس را در پایان اولین پاساژ شناسایی می کند، اما برای شناسایی ویروس های کند رشد در سلول های ضعیف، باید دو مرتبه پاساژ داد.

آزمون های سرم شناسی:

آنتی بادی های ضد BDV معمولاً با استفاده از آزمون خنثی سازی ویروس یا الایزا از سرم گوسفند شناسایی می شوند. می توان از آزمون آگار ژل ایمونودیفیوژن که از حساسیت پایین تری برخوردار است نیز استفاده نمود. در تمامی آزمون ها باید از سرم های مرجع کنترل مثبت و منفی استفاده نمود، که در یک آزمون معتبر باید نتایج را در محدوده ای که از پیش تعیین شده است در اختیار ما قرار دهد. سرم های انفرادی برای تشخیص شیوع BDV در یک گله، یک منطقه یا یک کشور مورد استفاده قرار می گیرند. به هر حال، برای تشخیص عفونت حاد، بهترین نمونه ها، سرم هایی که در مرحله حاد بیماری هستند و دام هایی که در مرحله نقاهت به سر می برند می باشند. نمونه های سرمی که چند مرتبه از دام گرفته می شود، باید در کنار هم و در یک پلیت مورد آزمایش قرار گیرند.

کشت:

برای نشخوارکنندگان، کشت های سلولی مختلفی وجود دارد. به دست آوردن نتیجه مطلوب از آن ها بستگی به نوع سلول و روش جداسازی دارد. یک واکسن تجاری BDV که حاوی دو سویه ویروس است، در رده های سلولی گوسفندی آماده شده است. سلول ها باید با توجه به سیستم seed-lot از بذر سلول master (MCS) که عاری از آلودگی با میکروارگانیزم ها است، تولید شوند. واکسن فقط باید در سلول هایی که کم تر از 20 مرتبه پاساژ داده شده اند از MCS تولید شود. سلول های کنترل باید در همه پاساژ ها از لحاظ آلودگی به پستی ویروس، بررسی شوند.

اسهال ویروسی گاو (BVD)

ویروس BVD در جنس پستی ویروس و خانواده فلاوی ویریده قرار دارد. این ویروس به عنوان یکی از مهم ترین عوامل بیماری دستگاه گوارش شناخته شده است و میزبان های این ویروس، نشخوار کنندگان اهلی و وحشی هستند. این بیماری در بیشتر کشور هایی که دارای گاوداری هستند وجود دارد و در برخی از کشور ها مهمترین بیماری در گاو ها محسوب می شود. در کشور ما نیز این بیماری شایع می باشد، به طوریکه در مطالعه ای که در سال 1357 صورت گرفت، آلودگی گاو های شیری ایران به این بیماری 62٪ بود. در گزارشی از گاوداری های شهریار در سال 1381، میزان شیوع BVD، 56/77٪ بود. همچنین در مطالعه دیگری که در سال 1389 در طی یک سال در گاوداری های اطراف تهران صورت گرفت، مشخص شد که از 251 نمونه جنین سقط شده، 63 نمونه (25/2٪) BVD مثبت بوده اند. در گزارش دیگری در سال 1390 از گاوداری های صنعتی مشهد، 74/17٪ گاو های شیری که سقط کرده بودند، آلودگی به این بیماری را نشان دادند.

زمانی که گاو های آبستن حساس، به این ویروس آلوده می شوند، عفونت از راه جفت به جنین انتقال می یابد. عفونت انتقال یافته از راه جفت ممکن است سبب مرگ، سقط جنین و ایجاد نقص در اندام های جنین شود یا اینکه سیستم ایمنی جنین، ویروس را تحمل کند که به تحمل ایمنی یا پذیرش ایمنی معروف است و باعث ایجاد دام های دارای عفونت دائم (PI) در گله می شود. دام های جوان نسبت به این بیماری حساس ترند. دام هایی که واکسینه نشده اند یا به طرز نادرستی واکسیناسیون در آنها صورت گرفته باشد و دام هایی که دارای نقص در سیستم ایمنی هستند نیز به عفونت حساس تر بوده و بیماری در آنها همراه با علائم بالینی بروز می کند. این بیماری سیستم ایمنی را نیز سرکوب می کند. عفونت حاد اسهال ویروسی از راه تضعیف دستگاه ایمنی بدن، سبب بیماری دستگاه تنفسی و گوارشی در گوساله های حساس می شود.

پستی ویروس ها بیش از دو هفته در محیط باقی نمی ماند و به راحتی توسط ضد عفونی کننده ها، از بین می روند. بنابراین انتقال ویروس در درجه اول عمودی (از مادر به نوزاد) یا از راه تنفس یا بلع مواد آلوده با ترشحات یا مواد دفعی (بزاق، ترشحات چشمی، ادرار، مدفوع، منی، جفت و مایعات آمنیوتیک حیوانات آلوده)، رخ می دهد. به طور کلی این ویروس از طریق ایجاد اختلالات تولید مثلی (ایجاد سقط و تولد گوساله های دارای نقایص مادرزادی)، اثرات مضر روی وضعیت گله می گذارد. در گوساله هایی که دچار نواقص مادرزادی می شوند، قبل

از مصرف آغوز سطح آنتی بادی در آنها بالا است علاوه براین متعاقب شکل حاد بیماری، عیار آنتی بادی قابل اندازه گیری وجود خواهد داشت. عفونت جنین همیشه سبب سقط نمی شود، بنابراین حضور ویروس، آنتی ژن ویروس یا آنتی بادی بر علیه آن در جنین سقط شده تأیید کننده سقط به علت BVD نیست و عوامل دیگری ممکن است مسبب سقط در این دامها باشد. آغوز می تواند به مدت 6 ماه و حتی بیشتر گوساله ها را نسبت به بیماری ایمن سازد. دامهای PI میزان زیادی از ویروس را دفع می کنند و بنابراین به عنوان حاملان یا منبع اولیه عفونت، برای گاو های حساس در گله محسوب می شوند. بالاترین میزان دامهای PI در گله، گوساله های زیر 6 ماه هستند. دامهای PI همواره گوساله های PI به دنیا می آورند و پس از آبستن شدن از راه جفت، جنین را آلوده کنند و گوساله های PI جدید، متولد می کنند.

با نمونه گیری تصادفی از گله های انتخاب شده، می توان درصد گاو های PI را در گله برآورد کرد. گاو های PI می توانند تا 5 سال زنده بمانند و طی این مدت باعث انتشار عفونت در گله می شوند. مرحله ویرمی 3 تا 10 روز طول می کشد که البته در موارد فوق حاد، این دوره طولانی تر می شود. گاو هایی که به صورت مادرزادی به بیماری مبتلا می شوند 2 برابر بیشتر از گاو هایی که از راه های دیگر آلوده می شوند مبتلا به شکل شدید بیماری می شوند. از جمله خسارات اقتصادی این بیماری شامل کاهش تولید شیر، حذف اختیاری دامها قبل از سن بلوغ، کاهش ارزش کشتاری دام، مرگ و میر دامهای مبتلا، خسارات ناشی از سقط، مرده زایی، ناقص الخلقه زایی، اختلال در برنامه های تولید مثلی دامها و هزینه های درمان دامهای مبتلا می باشد. زیان های اقتصادی وقتی افزایش می یابد که همه گیری شکل مخاطی بیماری (حالت کشنده بیماری) رخ دهد.

بیماری زایی

ویروس ابتدا از راه دهان و بینی وارد بدن میزبان حساس شده و در لوزه ها، بافت های لمفاوی و اپیتلیوم بینی - حنجره ای تکثیر پیدا می کند. سلول های فاگوسیت کننده، ویروس یا سلول های آلوده به ویروس و یا هر دو را بلع کرده و به بافت های لمفاوی منتقل می کنند و ویرمی 2 تا 4 روز بعد از ورود ویروس دیده می شود. ویرمی مادران آبستن که ممکن است به دنبال آلوده شدن شکل حاد بوده، یا اینکه خود مادر PI باشد، می تواند سبب آلودگی جنین شود. قبل از آلوده شدن جنین، ویروس در جفت تکثیر می یابد. گسترش ویرمی در سیستم ایمنی ناقص جنین،

سبب پذیرش ویرمی توسط سیستم ایمنی آن به عنوان آنتی ژن خودی شده و بنابراین آنتی بادی بر علیه آن ساخته نمی شود.

علائم بالینی

علائم بالینی به سن و مرحله آبستنی گاو، سطح ایمنی گله و وجود استرس در گله بستگی دارد. این بیماری باعث عوارضی چون سقط، مرده زایی، ناقص الخلقه زایی و به دنیا آمدن گوساله های ضعیف می شود. در روز 45-125 از آبستنی، ویروس قادر است به جفت حمله کند. عفونت جنین در ماه سوم یا چهارم آبستنی یعنی قبل از اینکه سیستم ایمنی آن کامل شود، می تواند باعث به دنیا آمدن گوساله های PI شود. عفونت جنین در طی ثلث اول و دوم آبستنی ممکن است باعث مرگ و سقط جنین شود. اگر آلودگی در اواسط آبستنی (100-150 روزگی) رخ دهد، ممکن است نواقص مادرزادی در جنین اتفاق افتد. آلودگی با ویروس عامل بیماری BVD در انتهای آبستنی (ثلث سوم) می تواند باعث آلودگی حاد گاو پس از تولد شود. در این مرحله ایمنی جنین کامل شده و به خوبی بر علیه ویروس پاسخ می دهد، در نتیجه ابتلای جنین در این مرحله سبب نواقص مادرزادی خواهد شد. در این مرحله از آبستنی ممکن است سقط نیز ایجاد شود. عفونت جنین در روز 50-100 آبستنی می تواند باعث سقط یا مومیایی شدن جنین شود.

45-125 روزگی آبستنی ← حمله ویروس به جفت

ماه سوم و چهارم آبستنی ← دامهای مقاوم به عفونت (PI)

ثلث اول و دوم آبستنی ← مرگ و سقط جنین

ثلث سوم آبستنی ← عفونت حاد گاو پس از تولد (نواقص مادرزادی) و سقط جنین

50-100 روزگی آبستنی ← سقط و مومیایی شدن جنین

100-150 روزگی آبستنی (اواسط آبستنی) ← نواقص مادرزادی

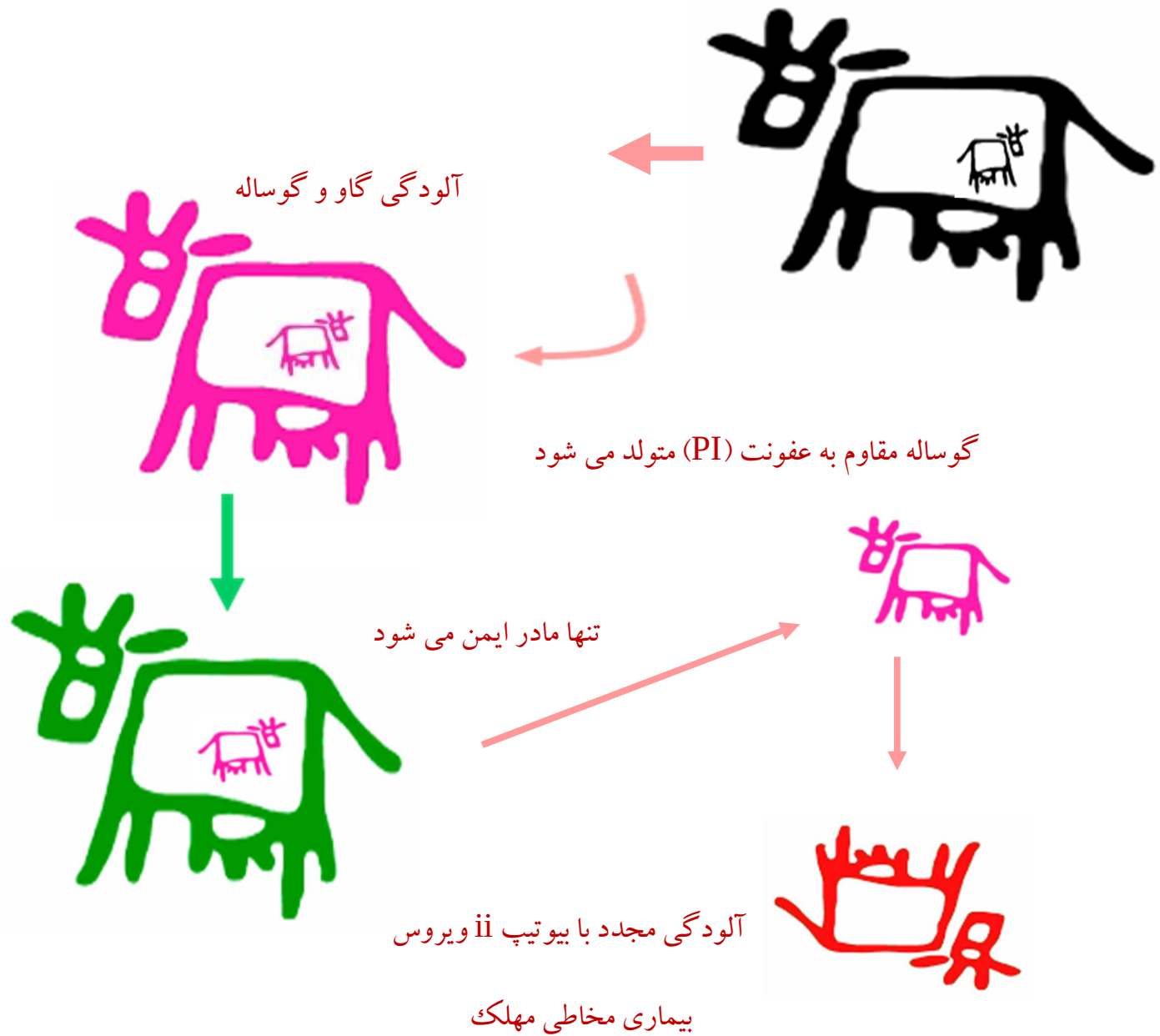
به طور تقریبی 95٪ گاو هایی که به ویروس BVD آلوده می شوند علائمی که به وسیله ویروس ایجاد می شود را نشان نمی دهند، گرچه عفونت BVD مقاومت آنها را نسبت به سایر عفونت ها کاهش می دهد و در نتیجه باعث ایجاد بیماری های ثانویه خواهد شد. علائم بالینی در این موارد بستگی به طبیعت بیماری جدید (ثانویه) خواهد داشت و اغلب تشخیص داده نمی شود که این عفونت ها با ویروس BVD شروع شده اند. به عنوان مثال زمانی که ویروس BVD، ریه گوساله را آلوده کند، ممکن است ویروس باعث بیماری در ریه نشود یا بیماری خفیفی ایجاد کند، با وجود این قابلیت ریه در پاک کردن باکتری هایی که به طور معمول در دستگاه تنفس یافت می شوند از بین می رود و در نتیجه امکان تزايد باکتری ها پیدا شده و بالاخره به آستانه ایجاد بیماری می رسند.

منهمیا همولیتیکا (پاسترولا هولیتیکا)، مایکوپلاسما بوویس، هموفیلوس سومنی و ویروس عامل رینوتراکیت عفونی گاو ها (IBR) از جمله عواملی هستند که عفونت ثانویه ایجاد می کنند. در شکل فوق حاد گاو ها دارای تب 41/6-43/3 درجه سانتی گراد هستند، گاهی اوقات اسهال و بیماری تنفسی را نشان داده و غذا نمی خورند. این شکل بیماری گاو ها را در تمام سنین، مبتلا می سازد و طی 48 ساعت پس از شروع بیماری منجر به مرگ دام می شود. خونریزی و میزان مرگ و میر بالا در سطح گله ناشی از ابتلا به فرم فوق حاد بیماری است. همچنین اسهال خونی و خونریزی های پتشی و اکیموز در صلیبه، خونریزی از بینی، خونریزی در زلالیه، خونریزی های غیر طبیعی متعاقب تزریقات استئوپتروز و کم خونی از علائم دیگر شکل فوق حاد بیماری هستند. شکل حاد بیماری با تب 40-41/1 درجه سانتی گراد و التهاب روده (آنتریت) مشخص می شود. ترشحات زرد رنگ از چشم و بینی، زخم های سطحی در پوزه و دهان حیوان (اروزیون) و اسهال که ممکن است موکوسی-خونی باشد، مشاهده می گردد. اسهال به طور معمول در هر گله ای که به فرم حاد مبتلا شده باشد وجود دارد ولی در هر حیوانی که به این فرم مبتلا است وجود ندارد. اگر عفونت ثانویه کنترل شود بیشتر دامهای مبتلا به فرم حاد، زنده می مانند. این شکل از بیماری در گوساله های تازه متولد شده ممکن است بیشتر شایع باشد ولی به طور معمول به وسیله عفونت های ثانویه که باعث اسهال و پنومونی می شوند پنهان می ماند. دامهایی که به شکل تحت حاد بیماری مبتلا می شوند دارای علائمی چون افسردگی، تب، اسهال خفیف می باشند، اما در مدت کوتاهی بهبودی حاصل می شود. علائم بالینی در شکل مزمن بیماری مشابه، ولی وسیع تر و وخیم تر از فرم های حاد بیماری است. در شکل مزمن بیماری علائمی چون افسردگی، کاهش اشتها، اسهال مزمن، ترشحات زرد رنگ از چشم و بینی، خشکی پوزه، زخم های سطحی

دهان، کچلی و لنگش به علت التهاب بافت های سم مشاهده می شود. دام های مبتلا به این شکل از بیماری، ظاهری بسیار لاغر و غیرقابل مصرف پیدا می کنند. مرگ و میر در اشکال مزمن بیشتر از موارد حاد رخ می دهد. مرگ جنین و سقط، ایجاد نواقص اندام های جنین، کاهش تحمل ایمنی و ایجاد دام های PI (عفونت دائم)، می تواند از عوارض این آلودگی باشد. تعدادی از گوساله های PI در زمان تولد ضعیف هستند و میزان رشد آنها کم است و تلف می شوند. سایر آنها به ظاهر سالم بوده و به بلوغ می رسند. دامهای مبتلا به شکل مزمن بیماری، مستعد بروز بیماری مخاطی هستند و این شکل از بیماری که باعث مرگ دام می شود در گاو های PI رخ می دهد. بیماری مخاطی به شکل انفرادی (میزان ابتلای پایین) در گاو هایی که 6 ماه تا 2 سال دارند رخ می دهد، اما شاید در سنین دیگر نیز بروز کند و با مرگ و میر بالا همراه باشد.

علائم بالینی بیماری مخاطی شامل بی اشتها، تب، اسهال، افت بدنی و مرگ است. جراحات قابل مشاهده شامل زخم پوزه، لب ها، محوطه دهانی و زبان است. اسهال ممکن است به صورت ساده تا خونی باشد. نواقص مادرزادی به دنبال عفونت ممکن است با درگیر کردن دستگاه عصبی باعث عوارضی چون میکروانسفالی (کوچک ماندن مغز)، هیدروانسفالی و هیدروسفالی می شود، در چشم عوارضی چون آب مروارید و میکروفتالمی را ایجاد می کند، در پوست ممکن است باعث مورихتگی (آلوپسی) و عدم تشکیل پوشش خارجی (هیپوتریکوزیس)، در دستگاه عضلانی - اسکلتی می تواند باعث تأخیر رشد، براکیگنیتسم و خمیدگی دائمی مفاصل (آرتروگریپوزیس) شود. اسهال در چند هفته اول مشاهده نمی شود. ابتلای دام در دوره فحلی و قبل از جفت گیری ممکن است باعث کاهش یا تأخیر در تخمک گذاری شود. همچنین امکان دارد در گاو های PI تغییراتی در شکل تخمدانها ایجاد شود که می تواند باعث اختلال در فعالیت آنها شود.

آلودگی به BVD در اوایل آبستنی



تصویر شماره 17- آلودگی دام آبستن به BVD و تأثیر آن بر روی گوساله

بیماری در گوسفند و بز

تماس گاو PI با گوسفند و بز آبستن باعث عفونت پستی ویروسی (بیماری مرزی) و تولد بره ها و بزغاله های PI می گردد.

علائم کالبد گشایی

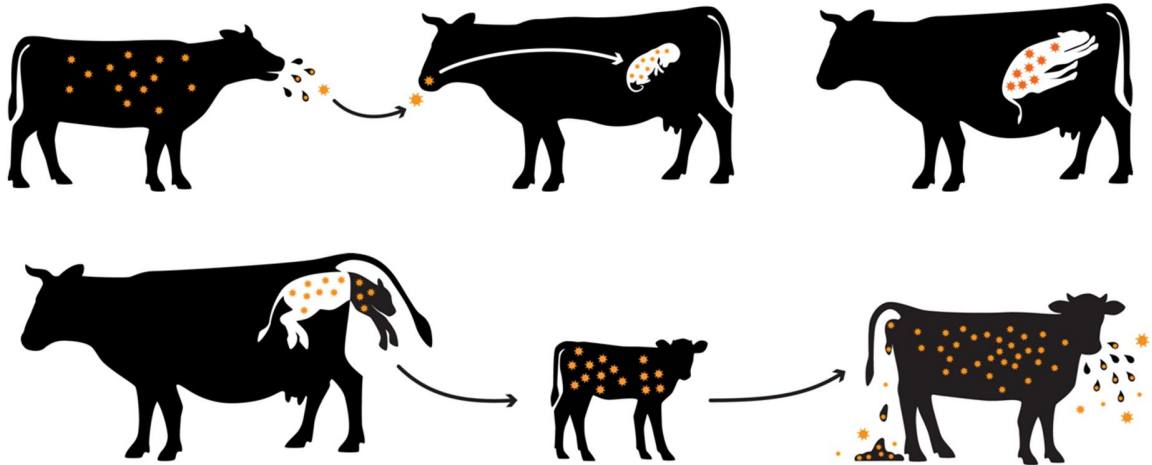
ضایعات کالبد گشایی بیشتر در دستگاه گوارش مشاهده می شود. ممکن است زخم ها را در پاپیل های شکمبه، نگاری، هزارلا و شیردان مشاهده کرد. همچنین ممکن است خونریزی در گره های لمفاوی کولون ها و بزرگ شدن گره های لمفاوی سطحی مشاهده شود. در شکل حاد و فوق حاد بیماری مخاطی، زخم های سطحی با اندکی التهاب در اطراف آن (زیر زخم بافت تازه و قرمز رنگ وجود دارد)، که در پوزه و دهان و به میزان کمتری در حلق، حنجره و قسمت پشتی منخرین مشاهده می شود. این زخم ها در مری به شکل مخطط هستند. همچنین در کالبدگشایی جنین های سقط شده زخم هایی در حفره دهانی، مری و شیردان مشاهده می شود. در شکل مزمن بیماری نکروز اپیتلیوم به شکل پلاک های زرد و ترد به خصوص در زبان و شکمبه مشاهده می شود. التهاب تخمدان در تلیسه های غیر آبستن نیز می تواند از علائم کالبدگشایی در این دامها باشد.

همه گیر شناسی

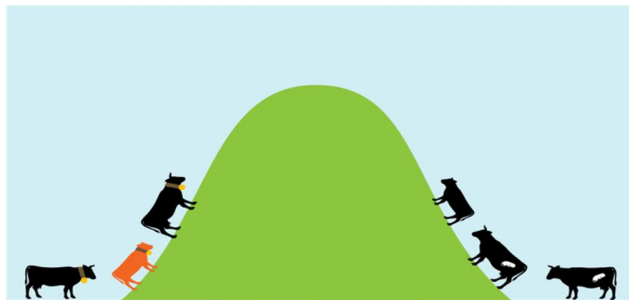
گوساله های PI مهم ترین منبع ویروس برای گسترش بیماری در بین گله ها هستند. گوساله های PI اکثراً تا زمان از شیر گرفتن زنده می مانند و منبع مهمی جهت انتشار بیماری محسوب می شوند. این گوساله ها پس از تولد به طور دائم ویروس را از خود دفع می کنند و در نتیجه، سبب آلودگی گله و آلودگی بین گله ها خواهند شد. ورود آلودگی به گله ممکن است با تماس گاو های دیگر از سایر گله ها یا خرید و وارد کردن دام به گله، ایجاد شود. همه گیری شکل فوق حاد بیماری بیشتر متعاقب واکسیناسیون نادرست و یا ورود دام جدید به گله رخ می دهد. شیوع بیماری در دامهای زیر 1 سال بیشتر است علاوه براین، جنین سقط شده نیز منبع مهمی جهت انتشار عفونت می باشد. نزدیک شدن گله های حساس به گله های آلوده به عنوان مثال در شرایطی که گله مجبور به مهاجرت در

اثر عواملی چون سیل، خشکسالی یا آتش سوزی باشد نیز از عواملی است که باعث انتقال آلودگی بین گله ها می شود. انتقال بیماری بین دامهای سالم ایمن ناچیز است چراکه این دامها آنتی بادی علیه ویروس تولید می کنند. دامهایی که به تازگی آلوده شده اند در انتقال بیماری نقش ندارند. گاو های ماده از طریق جفت گیری با گاو نر آلوده و یا از طریق تلقیح مصنوعی ممکن است به بیماری مبتلا شوند، که می تواند باعث ناباروری و سقط زود هنگام جنین (که منجر به بازگشت به فحلی می شود) گردد. گاو های نر PI، ویروس را از طریق تلقیح مصنوعی وارد گله می کنند. منی این گاو ها می تواند برای یک مدت طولانی به ویروس آلوده باشد و ممکن است تأثیرات نامطلوبی را بر روی برنامه های تولید مثلی گله بگذارد. تلیسه هایی که از طریق این گاو ها مبتلا شده اند معمولاً آبستن می شوند اما می توانند آلودگی را در گله پخش کنند. همچنین عفونت می تواند از طریق جریان هوا در گاو هایی که در فاصله 1/5 تا 10 متری گاوهای PI به مدت 1 هفته نگهداری می شوند، منتقل شود.

اگر گاو های سالم را بعد از حذف گاو های PI بدون تمیز و ضد عفونی کردن وارد جایگاه کنیم، عفونت به دامهای سالم منتقل می شود. اگر دامپزشک از یک دستکش برای معاینه رکتال گاو آلوده و سالم استفاده کند، می تواند باعث آلوده شدن دامهای سالم شود علاوه براین، استفاده از سوزن و دماغ گیر به طور مشترک تا 3 دقیقه پس از اینکه از آن در دام PI استفاده شده باشد می تواند آلودگی را به دامهای سالم منتقل کند. در موارد واکسیناسیون، ویال واکسنی که توسط ترشحات بینی دام PI آلوده شده باشد می تواند آلودگی را به دامهای سالم منتقل کند.



تصویر شماره 18- راه های انتقال BVD



تصویر شماره 19- انتقال آلودگی به علت چراگاه مشترک در BVD

خطر بیماری مشترک

این بیماری برای انسان خطر آفرین نیست

پیشگیری و کنترل

هدف از برنامه کنترل بیماری اسهال ویروسی گاو ها پیشگیری از ابتلای جنین به منظور جلوگیری از تولید دامهای PI، جلوگیری از سقط جنین و مشکلات مربوط به آن است. دامهای PI اولین منبع عفونت برای گله محسوب می شوند. انتخاب گاو های جایگزین گله بر اساس حذف دامهای PI است با وجود این، ممکن است تعدادی از دامهای PI رشد و طول عمر طبیعی داشته باشند و به همین دلیل در گله ماندگار خواهند شد، بنابراین استفاده از آزمایش های دقیق برای مشخص کردن آنها در گله از اهمیت ویژه ای برخوردار است. علاوه بر آزمایش گوساله ها، تلیسه های جایگزین، گاو هایی که تا کنون زایمان نکرده اند، گاو های نر و مادران تمام گوساله هایی که در آزمایش مثبت بوده اند، باید آزمایش شوند. بنابراین لازم است قبل از خرید گاو ها و ورود آنها به گله، آزمایش های زیست ایمنی روی آنها انجام شود، و در صورت امکان، خرید از گله های عاری از BVD صورت گیرد. دامهای خریداری شده باید جدا نگهداری شده و قبل از ورود به گله آزمایش شوند. گوساله های مربوط به گاو های آبستن خریداری شده باید پس از تولد از نظر آلودگی (PI) آزمایش شده و سپس وارد گله شوند. در مورد گاو های شیروار، می توان از آزمایش تانک شیر جهت شناسایی آنتی بادی استفاده نمود، این آزمایش علاوه بر اینکه روش آسان و ارزشمندی است، از نظر اقتصادی به صرفه بوده و استرسی را به دام وارد نمی کند. این کار می تواند به عنوان اولین گام در کنترل بیماری محسوب شود. به طور کلی بهترین توصیه برای کنترل بیماری شامل جلوگیری از خرید دامهای PI یا ناقلین آلوده، به منظور جایگزینی در گله، اجتناب از خرید گاو های آبستن، خارج کردن دامهای PI از گله و واکسیناسیون با استفاده از واکسن های زنده تخفیف حدت یافته و واکسن های غیر فعال شده می باشد.

واکسن تخفیف حدت یافته، دارای خاصیت ایجاد ایمنی برای جنین از راه جفت می باشد بنابراین توصیه شده است که واکسن را به تلیسه های سالم تزریق کنند، اما نباید تصور شود که واکسیناسیون به طور کامل از آلوده شدن جنین جلوگیری می کند. تمام تلیسه ها باید دوبار واکسینه شده و بهترین زمان تجویز واکسن های زنده تخفیف حدت یافته، دو ماه قبل از جفت گیری می باشد. برای ایجاد حداکثر پاسخ ایمنی در تلیسه ها، لازم است تجویز واکسن های غیر فعال نیز قبل از جفت گیری صورت گیرد. تکرار واکسیناسیون باید براساس توصیه کارخانه سازنده واکسن صورت گیرد و تلیسه ها و گاو های ماده باید حداقل سه هفته قبل از زایمان با واکسن زنده واکسینه شوند.

گوساله های گوشتی در 5 تا 7 ماهگی که از شیر گرفته می شوند به طور مشخص سرم منفی بوده یا تیترا آنتی بادی آنها پایین است، بنابراین بهترین زمان واکسیناسیون گوساله ها حداقل سه هفته قبل از اینکه از شیر گرفته شوند است، زیرا در زمان از شیرگیری درصد رخداد عفونت بالاست. دامهای شیری باید در حدود سن 4 ماهگی واکسینه شوند و واکسن یادآور باید در سن 5 تا 6 ماهگی تزریق شود. گاو های گوشتی باید در سن 4 تا 12 ماهگی واکسینه شوند. مزیت واکسن های زنده تخفیف حدت یافته بر علیه BVD این است که به طور معمول نسبت به واکسن های غیر فعال به میزان بیشتری ایمنی متقاطع ایجاد می کنند، بنابراین دام توانایی مقابله بر علیه آنتی ژن های مختلف را به دست می آورد. مزیت دیگر این واکسن ایجاد ایمنی با دوره طولانی تر و کاهش نیاز به تکرار واکسیناسیون می باشد. مضرات آن شامل تضعیف سیستم ایمنی، توانایی آن در ایجاد ناهنجاری در جنین و توانایی در عود حدت ویروس در حین عفونت است. واکسن های غیر فعال شده نه تضعیف سیستم ایمنی به وجود می آورند و نه به جنین آسیب می رسانند. این واکسن ها به علت ایجاد ایمنی با حداقل عفونت، قابل توصیه بوده و در مجموع معایب آنها نیاز به تکرار به علت ایمنی پایین یا دوره کوتاه ایمنی است.

ممکن است دامها به دلایل زیر واکسینه نشوند:

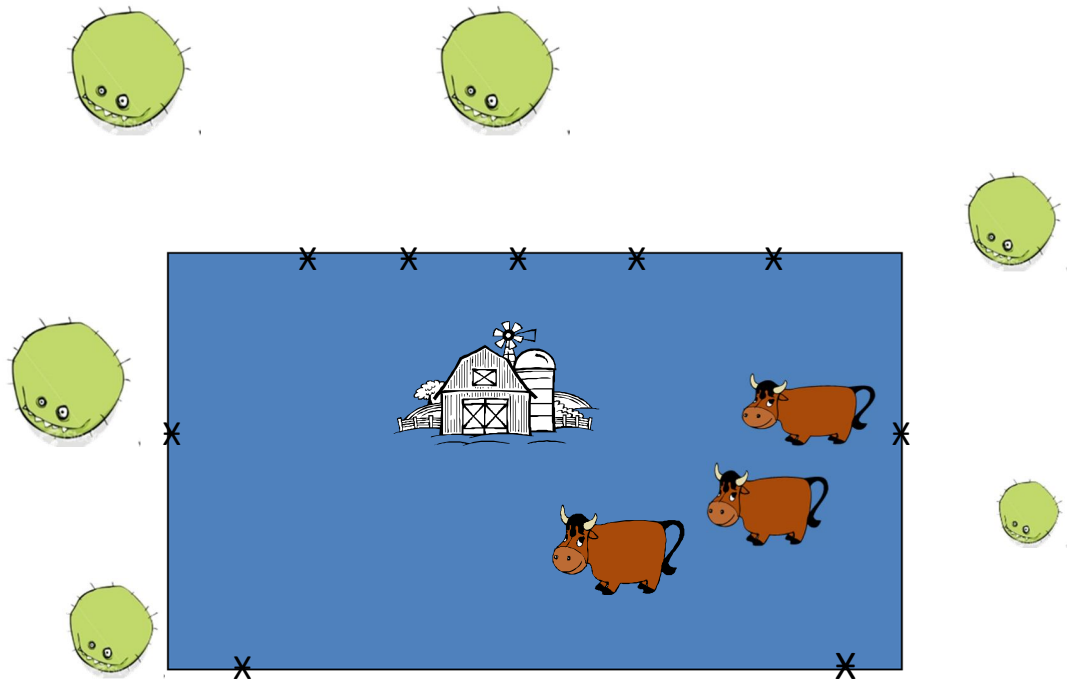
- 1- ممکن است دامداران از فواید و ضرورت واکسیناسیون مطلع نباشند.
- 2- ممکن است دامداران فراموش کنند که به طور منظم دامهایشان را واکسینه کنند.
- 3- ممکن است بخشی از گله را واکسینه کنند در حالی که تصور کرده اند تمام گله واکسینه شده است

حضور مستمر ویروس BVD در گله به علت ضعف آزمایش های تشخیصی نیست بلکه به دلیل نقص در اجرای برنامه های ایمن سازی دامها، برنامه های مراقبت و برنامه های حفاظت زیستی و مهار زیستی می باشد. ترکیبی از برنامه های حفاظت زیستی، واکسیناسیون و راهبرد های محدودیت زیستی جهت کنترل و پیشگیری از بیماری اسهال ویروسی گاوها ضروری است.

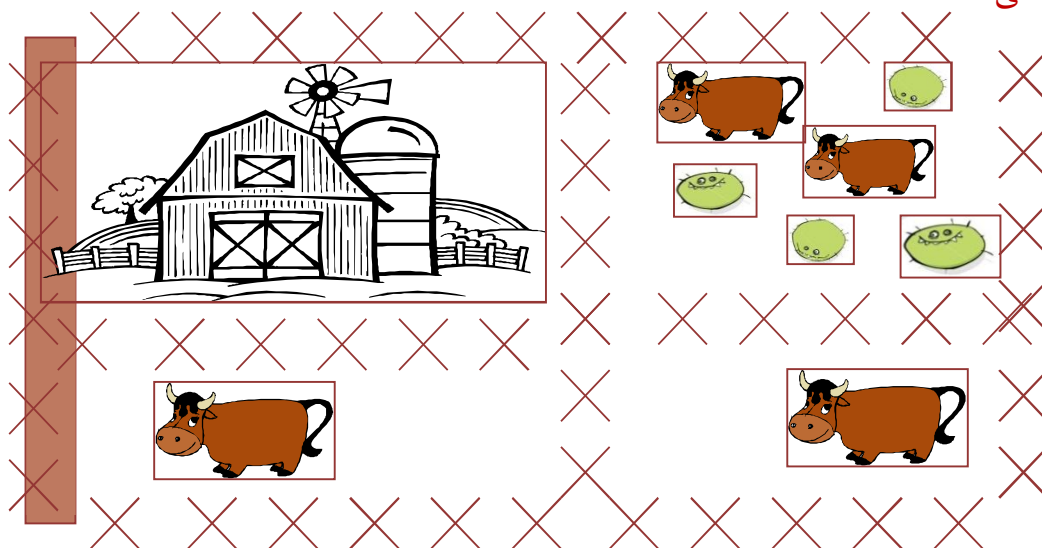
حفاظت زیستی عبارت است از مجموع فعالیتهایی که جهت پیشگیری از ورود عامل بیماری زا به گله یا منطقه صورت می گیرد. هدف از حفاظت زیستی در مورد بیماری BVD جلوگیری از ورود ویروس به گله و پیشگیری از انتقال ویروس به دامهای حساس است. محدودیت زیستی متشکل از راهبردهایی است که جهت کنترل و خروج

بیماری از گله یا منطقه انجام می گیرد. هدف از اعمال محدودیت زیستی در مورد بیماری BVD به حداقل رساندن رخداد بیماری یا شدت آن و محدود کردن کامل ویروس در گله می باشد. علاوه بر این افزایش ایمنی میزبان، حذف گاو های PI از گله و جلوگیری از تماس بین گاوهای آلوده و حساس نیز از جمله فعالیت های برنامه های محدودیت زیستی می باشد. دامهایی که به تازگی وارد گله می شوند باید به مدت 2 تا 3 هفته قرنطینه شوند و در این مدت یا قبل از قرنطینه باید آزمایش های لازم در مورد آنها جهت شناسایی دامهای PI صورت گیرد. دامهای آبستنی که به تازگی وارد گله می شوند نباید در مکانی که سایر گاوهای آبستن حضور دارند زایمان کنند. گوساله های متولد شده از گاو هایی که به تازگی وارد گله شده اند باید به صورت جداگانه نگهداری شوند تا در صورت آلوده بودن شناسایی شوند. در مورد گاو های نر پرواری و تلیسه ها اصول حفاظت زیستی اهمیت بیشتری دارد چراکه این دامها به بیشتر در معرض خطر از ناحیه دامهای PI که به تازگی وارد گله شده اند، قرار دارند.

حفاظت زیستی



محدودیت زیستی



درمان

درمان اختصاصی برای بیماری اسهال ویروسی گاو ها وجود ندارد. در مواردی که بیماری شدید موکوسی همراه با اسهال شدید و زخم در محوطه دهانی در دام وجود دارد پیش آگهی بیماری وخیم بوده و این دامها باید کشتار یا معدوم شوند. دامهایی که به شکل مزمن بیماری مبتلا هستند نیز باید حذف و معدوم شوند.

جمع آوری نمونه

برای انجام آزمایش های تشخیصی دقیق باید جنین به طور کامل به آزمایشگاه ارسال شود، زیرا عوامل پیچیده ای سبب این بیماری و سقط می شود.

نمونه ها جهت تأیید تشخیص

نمونه های بافت شناسی: نمونه از محوطه دهانی، زخم های مری، تیموس، کولون، پلاک های پایر، شیردان، شکمبه، گره های لمفاوی روده بند، قلب و گوش.

نمونه های بافت شناسی جنین سقط شده شامل: ریه، تیموس، طحال، روده، کبد، کلیه، قلب، مغز و چشم (جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری و ایمونوهیستوشیمی) می باشد. نمونه های مذکور باید در فرمالین ثابت شوند.

نمونه های ویروس شناسی: تیموس، تیروئید، طحال، ریه، گره های لمفاوی روده بند، پلاک های پایر. (ISO، آزمون فلئورسنت آنتی بادی، PCR)

از نمونه های خون، سرم (جهت کشت و آزمون خنثی سازی آنتی بادی) و محتویات روده نیز می توان استفاده نمود.

جداسازی ویروس:

می توان ویروس را در تعدادی از کشت های سلولی تک لایه گاوی (مانند کلیه، ریه، بیضه یا شاخک های بینی) جداسازی نمود. رشد هر دو بیوتیپ خوب است. یکی از آلودگی های رایج بافت های تازه گاوی، ویروس های غیرسیتوپاتوژنیک BVD است و کشت های سلولی باید از جهت آلودگی با ویروس توسط آزمایش های منظم

بررسی شوند. کشت های اولیه و ثانویه را می توان به صورت سوسپانسیون سلول در نیتروژن مایع منجمد نمود. می توان با انجام بیش از یکسری پاساژ، آزمایش را تکرار کرد، یا در سوسپانسیون سلول های دیگر سید شود و قبل از استفاده از آن، بررسی شود. می توان با استفاده از رده های سلولی ادامه دار که عاری از BVD هستند این مشکل را حل نمود. سرم جنین گاوی که در کشت های سلولی کاربرد دارد نه تنها باید عاری از ویروس باشد، بلکه باید فاقد آنتی بادی های خنثی کننده ویروس BVD نیز باشد. حرارت دادن (56 درجه سانتی گراد به مدت 30-45 دقیقه) برای تخریب ویروس BVD در سرم آلوده مناسب نمی باشد، به خصوص با پرتو دهی 25 kiloGray (2/5Mrad). بسته های تجاری سرم جنین گاو، به خوبی آلودگی را در PCR نشان می دهند (حتی وقتی ویروس توسط پرتو دهی غیر فعال می شود). می توان از سرم اسب نیز استفاده نمود، اما باعث رشد ضعیف سلول ها می شود.

سلول های بافی کوت، خون کامل، لکوسیت های شسته شده یا سرم برای جداسازی ویروس از دام زنده مناسب می باشند. در گوساله های جوان، حضور آنتی بادی های مادری ممکن است با جداسازی ویروس تداخل داشته باشد. باید سوسپانسیون های بافتی که از دام ها پس از مرگشان تهیه شده است، با روش های استاندارد آماده سازی شوند. می توان منی را نیز بررسی نمود، اگرچه جمع آوری نمونه خون از گاو نر ترجیح داده می شود. گزارشی در مورد گاو نری که ویروس BVD را از طریق منی دفع می کرده اما ویرمیک نبوده است وجود دارد. منی سیتوتوکسیک بوده و باید در محیط کشت رقیق شود. منی رقیق شده، معمولاً به طور مستقیم روی سلول های تک لایه تلقیح می شود، اما ممکن است گاهی اثرات سیتوتوکسیک ایجاد کند. بنابراین بررسی سلول ها با میکروسکوپ و در فواصل بین گرم خانه گذاری ها، اهمیت ویژه ای دارد.

روش های مختلفی برای جداسازی ویروس وجود دارد و همگی باید از حداکثر حساسیت جهت تشخیص ویروس استاندارد برخوردار باشند، که می تواند شامل یک یا تعداد بیشتری پاساژ در محیط آزمایشگاه باشد. روش های معمول جداسازی ویروس با آخرین روش های ایمنی (فلئورسنس یا آنزیماتیک) برای تشخیص رشد ویروس های غیر سیتوپاتیک، استفاده می شوند. بنابراین، لوله های کشت باید روی flying cover slip باشند، در حالی که پلیت های کشت را می توان ثابت و به طور مستقیم به پلیت چسباند.

آزمون های سرم شناسی:

می توان آنتی بادی های ضد BVD را در سرم گاو و با استفاده از آزمون استاندارد خنثی سازی ویروس یا الایزا، شناسایی نمود. کنترل مثبت و منفی سرم استاندارد را باید در تمامی آزمون ها استفاده کرد. برای بررسی وضعیت BVD در گله، آزمون الایزا جهت تشخیص آنتی بادی در نمونه های تانک شیر، مناسب می باشد. یک الایزا با ارزش با واحد های جذبی 0/1 یا بیشتر، مشخص می کند که به احتمال زیاد اخیراً گله در معرض ویروس BVD قرار گرفته است و به احتمال بیشتر، دام های مقاوم ویرمیک در گله حضور دارند. در مقابل ارزش کم یا منفی ($\leq 0/2$)، مشخص می کند که احتمال حضور دام های مقاوم ویرمیک غیر ممکن است. دسته بندی های دیگر نیز وجود دارد که ارزش آن ها متوسط است، که بستگی به نوع سیستم دامپروری دارد.

مشخص شده است که الایزا برای تشخیص دام های مقاوم در گله و بررسی حضور آنتی ژن های ویروس در تانک شیر، آزمون معتبری نیست و ممکن است با آزمون آنتی بادی الایزا تداخل کند. پیشنهاد می شود که وضعیت آنتی بادی تعداد کمی از دام های جوان گله (18-9 ماه) بررسی شود تا مشخص گردد که آیا گله اخیراً در معرض ویروس BVD بوده است یا خیر، اما این بستگی به درجه تماس بین گروه های مختلف دام های گله دارد. می توان از روش Rapid spot test برای غربال گری اولیه به عنوان بخشی از طرح های کنترل و ریشه کنی BVD استفاده نمود.

روش کشت:

هر دو بیوتیپ در کشت های سلولی متنوعی با منشأ گاوی، رشد می کنند. انتظار ما از روش های استاندارد این است که بتوان ویروس غیر سیتوپاتیک را در روز 5-7 و ویروس سیتوپاتیک را در روز 2-4 برداشت کرد. نتایج مطلوب بستگی دارد به عوامل مختلفی چون کشت سلول، روش جداسازی و میزان بذر اولیه ویروس.

بیماری ویروس آکابان

ویروس آکابان متعلق به جنس بونیایویروس از خانواده بونیایویریده است. این ویروس به وسیله مگس ها و پشه ها منتقل می شود. همانند سازی این ویروس هم در ناقل (پشه همتوفاگوس) و هم در میزبان مهره دار اتفاق می افتد. علفخواران به عنوان جزء ضروری چرخه حامل - ویروس - میزبان مطرح هستند. ویرمی ایجاد شده در خون گاو کوتاه مدت است و از 1 تا 9 روز طول می کشد. عفونت حاصل از این ویروس می تواند به سقط، مرده زایی و تولد پیش از موعد بیانجامد. این ویروس با آلوده کردن دام آبستن در مراحل اولیه آبستنی، سبب آلودگی جنین می شود و می تواند باعث ایجاد آسیب های مادرزادی گردد. عفونت و بیماری حاصل از این ویروس در جنین، به مرحله آبستنی و شرایط سیستم ایمنی آن، بستگی دارد. علائم بالینی را می توان در گوسفند، گاو و بز مشاهده کرد. ویروس آکابان سبب آرتروگریپوزیس (خمیدگی دائمی مفاصل)، میکروآنسفال و هیدروآنسفال در گاو می شود.

بیماری زایی

حضور ویروس در خون 2 تا 4 روز است و حداکثر میزان تولید آنتی بادی، 4 تا 5 روز بعد از ویرمی رخ می دهد اما ویروس به صورت کانونی در کوتیلدون ها باقی می ماند و متعاقباً باعث ویرمی در فتوس می گردد. آسیب های التهابی و تحلیل برنده (دژنراتیو) در سیستم اعصاب مرکزی رخ می دهد اما وقوع، شدت و نوع آسیب، به سن و توانایی جنین در ایجاد پاسخ ایمنی بستگی دارد. اولین شکل بیماری، آرتروگریپوزیس است که در گوساله های بالغ تر رخ می دهد، دومین حالت، آرتروگریپوزیس همراه با هیدروآنسفال است و سومین حالت نیز، تنها هیدروآنسفال است. عدم تکامل تمام یا بخشی از قشر نیمکره های مغز منجر به هیدروآنسفال می گردد. در آرتروگریپوزیس تقریباً همه سلول های شاخ شکمی نخاع از بین رفته و عصب رسانی به ماهیچه ها (که باعث انقباض مفاصل می شوند) مختل می شود. معمولاً در این حالت مخچه و ساقه مغز طبیعی هستند.

ممکن است در گوساله ها قبل از بروز آرتروگریپوزیس، عدم تعادل و آنسفالیت غیر چرکی ملایم تا متوسط مشاهده گردد همچنین ممکن است در گوساله ها علائمی چون فلجی شل به دنبال دمیله شدن فعال ثانویه در نواحی حرکتی نخاع، رخ دهد. در برخی موارد، گوساله ها قادر به ایستادن نخواهند بود و استخوان در انتهای قدامی

- پستی ضخیم می شوند. در این گوساله ها هیدروآنسفال در قسمت قدامی و میانی ساقه مغز و کوچک شدن مخچه مشاهده می شود.

بیماری در گاو

حاصل بیماری در گاو های آلوده در فاصله زمانی 104-76 روزگی از آبستنی، غالباً هیدروآنسفال، در فاصله 104-173 روزگی از آبستنی آرتروگریپوزیس و بعد از 173 روزگی پولیومیلیت خواهد بود. عفونت معمولاً در گاو های بالغ تظاهرات بالینی ندارد. با این حال، سخت زایی و بیماری های عصبی که به صورت افزایش تحریک پذیری، لرزش و عدم تعادل بروز می کند، مشاهده شده است.

در گوساله ها علائم بالینی به صورت دو سندرم آرتروگریپوزیس و هیدروآنسفال مشاهده می شود. آرتروگریپوزیس در مراحل اولیه شیوع بیماری و هیدروآنسفال در اواخر شیوع رخ می دهد. البته ممکن است در مراحل میانی شیوع بیماری گوساله هایی با هر دو سندرم نیز مشاهده گردند. در بعضی مواقع نیز تنها یکی از این دو سندرم ظاهر می شوند.

تقریباً همیشه گوساله های مبتلا به آرتروگریپوزیس در هنگام زایمان با مشکل مواجه می شوند و نیاز به کمک دارند. این گوساله ها کوچک بوده و به طور معنا داری با کمبود وزن مواجه هستند اما سم ها، پوشش مو و دندان هایشان به خوبی تا پایان دوره رشد تکامل می یابد. سختی مفاصل به صورت مادرزادی در یک و یا بیش از یک اندام حرکتی وجود دارد که باعث ثابت ماندن مفاصل این اندام (ها) می شود. از آنجایی که سطوح مفصلی آسیب نمی بینند، با بریدن تاندون های اطراف مفاصل، شاهد حرکت آزادانه ی آن ها خواهیم بود. ماهیچه های اندام های آسیب دیده به شدت تخریب می شوند. کیفوز (گوزپشتی) و اسکولیوز (خمیدگی جانبی ستون مهره ها) نیز از علائم متداول هستند.

گوساله های مبتلا به هیدروآنسفال هیچ مشکلی در بلند شدن و راه رفتن ندارند و تنها مسئله در مورد این گوساله ها، عقب افتادگی ذهنی و کوری است. به طور مثال اگر سرپستانک را در دهانشان قرار ندهیم، می ایستند و صدا تولید می کنند. موارد کمی از میکروسفالی در گوساله ها وجود دارد که عوارضی بسیار شدیدتر از هیدروآنسفال

در پی خواهد داشت. این گوساله ها لال هستند و نمی توانند به طور صحیح بایستند و منظم راه بروند. سقط، مرده زایی و زایمان پیش از موعد معمولاً در اوایل شیوع بیماری و قبل از علائم عصبی رخ می دهند.

بیماری در گوسفند

در اثر آلوده شدن گوسفند آبستن در فاصله زمانی 50-30 روزگی از آبستنی، نوزاد به دنیا آمده دچار ناهنجاری های مادرزادی می گردد.

بیماری در بز

عفونت در بز های غیر آبستن به شکل تحت بالینی است. بز های آبستن ممکن است سالم باقی بمانند یا سقط یا مرده زایی داشته باشند و یا جنین آن ها مومیایی شود.

علائم کالبد گشایی

در گوساله ها و بره های هیدروآنسفال، نیمکره های مغز حضور نداشته و این فضای خالی بوسیله ی مایع پر شده است در این حالت منتر طبیعی می باشد. فقدان طناب نخاعی شاخ شکمی نوروں ها مشاهده می شود که منجر به آتروفی اعصاب ماهیچه ها می گردد و به دنبال آن آرتروگریپوزیس (ثابت شدن مفاصل) و دفرمه شدن اسکلت بدن (مثل کج شدن گردن و اسکولیوزیس) رخ می دهد. موارد نادری از این آسیب ها تنها به پورآنسفالی محدود می شوند. گزارش هایی از کاهش اندازه ساقه مغز و هیپوپلازی مخچه نیز وجود دارد.

همه گیر شناسی

یافته های سرم شناسی نشان می دهند عفونت می تواند در گاو، گوسفند، بز، اسب، الاغ و گاومیش ایجاد شود اما بیماری تنها در گوساله، بره و بزغاله بروز می کند. با این وجود، گزارش هایی نادر از تظاهرات بالینی بیماری در گاو ها در مناطق اندمیک وجود دارد و بیماری های عصبی ناشی از این عفونت در گاو های 2 تا 7 ساله نیز مشاهده شده

است. بیماری بیشتر در گوساله ها شایع است و به عنوان یکی از عوامل سقط های همه گیر، مرده زایی و بد شکلی های مادرزادی در گوساله های ایران با شیوع بالا در گله های آلوده محسوب می شود.

خطر بیماری مشترک

دامپزشکانی که به زایش دامها کمک می کنند، اولین افراد در معرض بیماری هستند، زیرا زمانی که آرتروگریپوزیس رخ دهد سخت زایی متداول است. به علاوه بیماری می تواند در اثر گزیده شدن توسط پشه حامل نیز به انسان منتقل شود.

کنترل و پیشگیری

واکسیناسیون تنها راه موثر در کنترل بیماری است. واکسن کشته شده ویروس آکابان که بسیار هم موثر واقع شده است در ژاپن و استرالیا مورد استفاده قرار می گیرد. واکسن دونوبت پیش از آبستنی تلقیح می شود و هر سال نیاز به یاد آور دارد. البته تکرار هر ساله واکسن، به صرفه اقتصادی در مناطقی با شیوع دوره ای بیماری بستگی دارد.

درمان

درمانی برای این بیماری وجود ندارد با وجود این، واکسن هایی که در نواحی همه گیری بیماری استفاده شده مؤثر بوده اند.

جمع آوری نمونه

نمونه ها جهت ارجاع به بخش ویروس شناسی: 2 میلی لیتر خون محوطه صدری فتوس و سرم مادر جهت بررسی های سرم شناسی

نمونه ها جهت ارجاع به بخش هیستوپاتولوژی: مغز، طناب نخاعی، ماهیچه (میکروسکوپ نوری و ایمونوهیستوشیمی)

بیماری زبان آبی

ویروس زبان آبی، یک اوربی ویروس از خانواده رئوویریده است و حداقل 24 سروتیپ از این ویروس شناخته شده است که 8 سروتیپ آن بیماری زا می باشند. بیماری زبان آبی یک بیماری فصلی بوده و جمعیت دامهای اهلی را در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری درگیر می کند. این بیماری به وسیله پشه گزنده *culicoides variipennis* منتقل می شود که می تواند برای چندین هفته ویروس را انتقال دهد. طول زندگی پشه کولیکوئیدس بالغ معمولاً کمتر از 10 روز یا حداکثر چند هفته است و هوای سرد تمامی آن ها را می کشد بنابراین برای تشخیص این بیماری علاوه بر توجه به نشانی های بالینی و علائم کالبدگشایی، بایستی شاخص هایی چون زمان ابتلا و وضع آب و هوای منطقه نیز مورد توجه قرار گیرد. سایر پشه ها نیز می توانند در انتقال بیماری به طور مکانیکی نقش داشته باشند، البته ناقلین مکانیکی نمی توانند ایجاد همه گیری کنند. این بیماری در گوسفند اهمیت بیشتری دارد.

در گاو و گوسفند ممکن است ویروس از جفت بگذرد و موجب سقط یا به وجود آمدن نوزادان غیر طبیعی شود. ویروس زبان آبی واگیردار نیست و انتقال عمودی آلودگی اهمیت ندارد، بنابراین حضور ویروس در طبیعت بستگی به حضور چرخه میزبان و ناقل دارد. گاو به عنوان میزبان و مخزن طبیعی ویروس است. امکان دارد ویرمی برای مدت زیادی طول بکشد، اما چون عامل، تحمل ایمنی ایجاد نمی کند، عفونت دائم (PI) رخ نمی دهد. علت طولانی بودن ویرمی در گاو، حضور ویروس در گلبول های قرمز است که آن را از تأثیر آنتی بادی ها حافظت می کند. با توجه به علائمی چون تورم و نکروز سطحی دهان، پوزه و منخرین، این بیماری باید از طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR)، تفریق شود.

همه گیر شناسی

فاکتورهای اکولوژی نظیر بارندگی شدید، دما و رطوبت بالا نقش مهمی در تشدید جمعیت حشرات و متعاقباً بروز عفونت دارند. در مطالعه ای که بر روی 605 نمونه سرم گوسفند در سال 1386 در آذربایجان غربی صورت گرفت، بیشترین میزان آلودگی در فصول بهار و تابستان (69/1٪) و کم ترین آلودگی در فصول پاییز و زمستان (57٪) گزارش شد. جمعیت کولیکوئیدس ها در مناطق پست و مردابی در این مواقع بسیار زیاد و در ارتفاعات بالای 1200 متر از سطح دریا به صفر می رسند. پشه کولیکوئیدس شب ها فعال بوده و در این هنگام، دامهایی که خارج از

آغل هستند را می‌گردد. همه گیری این بیماری زمانی رخ می‌دهد که شرایط آب و هوایی به ناقل بیماری (پشه کولیکوئیدس و رای پی نیس) اجازه انتشار بیماری را بدهد. پشه‌ها پس از گزش دام ویرمیک می‌توانند به مدت 6-14 روز عفونت را منتقل کنند. چون اکثر کولیکوئیدس‌ها گاو را بعنوان میزبان اصلی خود ترجیح می‌دهند اصولاً گاو مخزن و تشدید کننده جمعیت ویروس است از این رو پرواربندی‌ها بعنوان مناطق پرخطر مطرح می‌باشند که باید در برنامه مراقبت و کنترل بیماری، مدنظر قرار گیرند. گاو‌ها ممکن است بدون هیچگونه علائمی برای 90 روز حالت ویرمی داشته باشند و بیماری را به گوسفندان منتقل کنند. انتقال از راه جفت امکان پذیر است، ولی ویروس به طور مستقیم و یا توسط محصولات حیوانات آلوده، منتقل نمی‌شوند. سویه‌های بومی ویروس زبان آبی ممکن است باعث آلوده شدن دامها شود ولی معمولاً علائم بالینی در آنها بروز نمی‌کند اما چنانچه سویه ای غیر بومی وارد منطقه مورد نظر شود می‌تواند منجر به بروز علائم بالینی گردد. بیماری می‌تواند از طریق منی گاو نر آلوده به گاو ماده منتقل می‌شود.

بیماری زایی

پشه کولیکوئیدس ماده برای انتقال آلودگی به دامها حداقل به یک مرتبه خون خواری احتیاج دارند تا چرخه تخمدانی را کامل کند. ویروس سلول‌های قسمت میانی روده را از طریق گیرنده‌های خود، آلوده می‌کند سپس تکثیر پیدا می‌کند و به تدریج به داخل غدد بزاقی پشه آزاد می‌شود. عفونت می‌تواند از طریق چرخه متناوب بین پشه و نشخوارکنندگان در طبیعت باقی بماند. این ویروس در گوسفند باعث آسیب اندوتلیوم عروق می‌شود، که باعث تغییرات در نفوذ پذیری و خاصیت ارتجاعی عروق به همراه انعقاد داخل عروقی منتشر و نکروز بافت‌ها (به دلیل آسیب عروق و اختلال در خونرسانی به آنها) می‌شود. متعاقب آلودگی پوست، ویروس در گره‌های لمفاوی موضعی تکثیر شده و از آنجا به داخل سلول‌های تک هسته‌ای منتشر شده تا از طریق آنها در بافت‌های لمفاوی و ریه، دومین تکثیر خود را انجام دهند. همزمان با ویرمی، ویروس در اندوتلیوم عروق موضعی می‌شود که باعث نابودی سلول‌های اندوتلیوم و نکروز همراه با ترومبوز و خونریزی میگردد. در گاو آسیب اندوتلیوم کمتر اتفاق می‌افتد. در این دام در مواقع ویرمی ویروس به همراه گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها در خون جریان می‌یابد ولی در آنها تکثیر پیدا نمی‌کند و از این طریق از دسترس آنتی‌بادی‌ها در امان می‌مانند.

علائم بالینی

از نشانی های اصلی این بیماری پرخونی، خیز، التهاب، خونریزی و ضایعات بر روی پوست سم به همراه التهاب است و دامهای مبتلا دارای حرکات متناوب لب ها و زبان هستند. اگر آلودگی در 4-8 هفتهگی آبستنی ایجاد شود، مشکلات بسیاری ایجاد می شود، ولی در زمان های دیگر این گونه نیست و بیشتر سقط جنین ها نیز در این زمان رخ می دهند. آلودگی در اوایل آبستنی می تواند باعث سقط یا نواقص مادرزادی چون هیدرآنسفال، کوچک شدن مغز (میکروسفالی)، خمیدگی اندام ها، کوری و بد شکل شدن فک شود.

عفونت در مراحل ابتدایی آبستنی (در حین 90 تا 100 روز اول آبستنی) ممکن است سبب مرگ جنین (در اثر جذب یا سقط) گردد. عفونت جنین بین 75 و 100 روزگی آبستنی سبب مرده زایی یا زایش گوساله های ضعیف یا گوساله های با نقایص مادرزادی در مغز می شود. در انتهای آبستنی اختلالات سیستم اعصاب مرکزی ناشی از این ویروس ممکن است شامل هیدروآنسفال یا کیست های مغزی باشد علاوه براین، عفونت انتهای آبستنی می تواند سبب زایش زودرس شود. نواقص سیستم اعصاب مرکزی در جنین هایی که بعد از 150 روزگی آلوده می شوند، ایجاد نمی شوند.

بیماری در گوسفند

در گوسفند بعد از یک دوره کمونی که کمتر از یک هفته طول می کشد، تب شدید 41-40/5 درجه سانتی گراد معمول است. تب به مدت 5 یا 6 روز طول می کشد. سپس ریزش از بینی و ریزش بزاق و قرمز شدن مخاط محوطه دهانی و بینی مشاهده می شود. ترشحات بینی موکوسی چرکی و معمولاً محتوی خون است. گوسفندان مبتلا، علائمی چون تب بالا، تورم گوش، صورت و زبان، لب ها، لثه ها و بالشتک دندانی، زخم دهان و بینی، کنده شدن مخاط دهان (که باعث خونی شدن ترشحات بزاق می شود)، بوی بد دهان و لنگیدن را نشان می دهند. پرخونی و زخم بر روی لبها، فرج و مقعد نیز مشاهده می شود. نکروز مخاط به ویژه در قسمت های جانبی زبان که باعث تورم و بنفش رنگ شدن زبان می شود. اسهال و دیسانتری نیز ممکن است رخ دهد و زخم های پا ممکن است باعث التهاب تاج سم و لنگش شود. از دست دادن تمام یا بخشی از پشم در گوسفند ها یکی از علائم رایج بیماری است.

به دنیا آمدن بره های پورآنسفال و نکروز مغز معمول است، همچنین این حالت بعد از واکسیناسیون با ویروس ضعیف شده دیده شده است. مرگ در بیشتر موارد بعد از 6 روز رخ می دهد.

بیماری در گاو

عفونت جنین و بیماری بالینی در گاو نادر است (حتی در مناطقی که بیماری بومی است). گاو ها ممن است به سروتیپ آلوده شده ایمنی پیدا کنند، اما نسبت به سایر سروتیپ ها حساسند. علائم بالینی در گاو شامل تب 40-41 درجه سانتی گراد، سختی در راه رفتن و لنگش در هر چهار اندام حرکتی، ریزش بزاق، ادم لب، بی اشتها، ریزش بینی و تنفس بد بو می باشد. علاوه براین بسیاری از گاو ها دارای زخم بر روی زبان، لب ها، لثه سخت هستند. التهاب شدید تاج سم و در برخی موارد کنده شدن سم ممکن است اتفاق بیفتد. برخی از گاو ها دارای التهاب پوست ناشی از حساسیت به نور و زخم بر روی سرپستان ها هستند.

بیماری در بز

بز ها نیز گاهی توسط ویروس آلوده می شوند، اما به طور طبیعی مقاومتشان بیشتر از گوسفند ها است. در بز ها ممکن است تب ملایمی ایجاد شود. اغلب لب ها، لثه ها، اطراف دندان ها و بینی متورم است. پرخونی مخاطات مشاهده می شود و مخاط دهان و بینی رنگ قرمز متمایل به آبی دارد. زبان متورم و به رنگ آبی تیره در آمده که بلع غذا را دشوار می کند. اگر آلودگی دامهای آبستن در اواسط ماه و یا اواخر دوران آبستنی صورت گیرد، گرچه بزغاله ها آلوده می شوند، ولی طبیعی به دنیا می آیند و این بره ها ویرمی دارند و تا دو ماه، منشأ آلودگی برای دامهای دیگر هستند.

علائم کالبد گشایی

زخم در مخاطات و پوست، خیز عمومی، پر خونی، خونریزی و نکروز در عضلات اسکلتی و قلبی. خونریزی مشخص در پایه سرخرگ ششی از علائم کالبد گشایی است و پرخونی و ادم مخاط شیردان به همراه خونریزی های پتشی و اکیموز نیز ممکن است در کالبد گشایی دامهای بیمار مشاهده گردد.

خطر بیماری مشترک

این بیماری برای انسان خطری ایجاد نمی کند.

کنترل و پیشگیری

از روش های کنترل بیماری نگهداری گوسفندان در شب درون آغل ها است. در فصل هایی که اوج فعالیت ناقل های بیماری است باید گوسفندان را از مناطق مرطوب دور نگه داشت. همچنین باید از ورود گوسفندان به مناطق پست و لجن زار ها در فصل شیوع بیماری جلوگیری کرد و در صورت امکان آنها را به مناطق مرتفع منتقل نمود. کنترل نقل و انتقال دام در سطح مناطق مرزی می تواند از ورود بیماری به کشور جلوگیری کند. اسپری کردن حشره کش ها و سایر موادی که حشرات را از دامها دور می کند بر روی بدن گاو ها و گوسفندان می تواند مفید واقع شود، اما اسپری کردن حشره کش ها در فضا مؤثر نیست. در مناطقی که بیماری بومی است، لازم است که جفت گیری دامها به تعویق بیفتد تا خطر بیماری بر طرف شود. در مورد دام های خریداری شده برای مراکز اصلاح نژاد از دامداری های سطح کشور، لازم است براساس دستورالعمل و ضوابط بهداشتی مراکز تولید و توزیع اسپرم نشخوارکنندگان، برخورد گردد (سرم چنین دام هایی به آزمایشگاه مورد تایید سازمان ارسال و در صورت مثبت بودن تست الیزا، حذف و یا زنجیره خرید قطع می گردد). واکسن مورد استفاده جهت این بیماری واکسن چند ارزشی (پلی والان) تخفیف حدت یافته است. واکسن های این بیماری شامل:

1- واکسن حاوی سروتیپ های 1، 4، 6، 12 و 14

2- واکسن حاوی سروتیپ های 3، 8، 9، 10 و 11

3- واکسن حاوی سروتیپ های 2، 5، 7، 13 و 19

هر کدام از واکسن های فوق باید به طور مجزا با فواصل سه هفته و یک ماه قبل از شروع فصل بیماری تجویز شوند. واکسیناسیون در زمان همه گیری باعث کاهش تلفات می شود. ممکن است واکسنی که به میش تزریق شده است باعث ایمنی بره نشود، بنابراین بره ها باید دو هفته بعد از اینکه از شیر گرفته شدند واکسینه گردند. برای پیشگیری از

جراحی های سیستم اعصاب مرکزی لازم است که واکسیناسیون سالیانه قبل از فصل بیماری انجام شود. در مورد گوسفند نیز لازم است علاوه بر اینکه واکسیناسیون یک مرتبه قبل از فصل بیماری صورت می گیرد، یکبار هم قبل از فصل جفت گیری انجام شود. واکسن بیماری اگر در میش های آبستن استفاده شود، سبب بیش از 20٪ سقط و ایجاد ناهنجاری در جنین خواهد شود. همچنین در مورد میش ها سه هفته قبل از زمان جفت گیری نباید واکسن تجویز شود چراکه دام را به مرحله آنستروس می برد. قوچ ها نیز باید قبل از فصل جفت گیری واکسینه گردند.

درمان

استفاده از محلولی از آب و ضدعفونی کننده رقیق به صورت موضعی می تواند مؤثر باشد. دامهای بیمار باید با الکترولیت و مایعات تحت درمان قرار بگیرند.

جمع آوری نمونه

در مورد ویروس زبان آبی انجماد بافت های آلوده موجب از بین رفتن ویروس می شود.

نمونه های بافت شناسی: زخم های محوطه دهانی و زخم های مخاطی پوستی، شیردان، شریان ششی، عضلات ماهیچه های اسکلتی از بخش های مختلف و عضلات پرزی بطن چپ که تمام بافت های مذکور در محلول مناسب ثابت شده اند. مغز جنین سقط شده (جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری و ایمونوهیستوشیمی).

نمونه های ویروس شناسی: ریه و طحال به صورت خنک شده. بافت های سیستم اعصاب مرکزی و مایعات قفسه سینه جنین سقط شده (جهت انجام آزمایش های ISO, PCR, in situ HYBRID, ELISA, ...)

در صورتی که بخواهیم نمونه ها را برای مدت طولانی نگه داری کنید در حالی که امکان منجمد کردن آن ها وجود ندارد، نمونه های خون باید در ظروف حاوی اکسالات - فنول - گلیسرین نگه داری شوند. اگر امکان منجمد کردن نمونه ها وجود داشته باشد، باید آن ها را در بافر لاکتوز پیتون یا دی متیل سولفواکساید 10٪ در دمای 70- درجه سانتی گراد یا سردتر نگه داری نمود. باید توجه نمود که ویروس نمی تواند در دمای 20- درجه سانتی گراد خیلی دوام پیدا کند. اندام ها و بافت ها بایستی در دمای 4 درجه سانتی گراد به آزمایشگاه ارسال شوند.

علاوه بر این از نمونه های خون و سرم نیز جهت تشخیص این بیماری استفاده می شود. طبق پروتکل سازمان دامپزشکی کشور در سال 1391، در فصول پرخطر از نظر انتقال عفونت، پس از بارندگی و درجه حرارت مناسب جهت ردیابی و پایش می توان از هر گله مشکوک 15 نمونه سرم و 15 نمونه خون EDTA به صورت تصادفی تهیه و برای انجام آزمایش الیزای رقابتی و PCR به آزمایشگاه فرستاد تا وضعیت بیماری مورد بررسی قرار گیرد.

از روش های تشخیصی مشابهی برای دام های اهلی و وحشی استفاده می شود. سیستم های جداسازی متعددی برای BTV به طور معمول استفاده می شود، اما حساس ترین روش تلقیح در تخم مرغ جنین دار است (ECE). اگر عیار ویروس در نمونه های خون پایین باشد (برای مثال در مواردی که نمونه ها چند هفته پس از آلودگی تهیه می شوند)، تلقیح به گوسفند یک روش مفید می باشد. تلاش برای جداسازی ویروس در کشت های سلولی *in vitro* آسان است، اما میزان موفقیت در مقایسه با روش های *in vivo* پایین تر است. EHDV نیز ممکن است در سیستم های جداسازی مشابه BTV جداسازی شود، اما تلقیح اولیه کشت های سلولی مانند سلول های C6/36 نیاز به پاساژ اولیه در ECE را از بین برده و حساسیت خود را حفظ می کند.

جداسازی در تخم مرغ جنین دار:

(i) خون از دام هایی که تب دارند جمع آوری شده و در داخل ظروفی که حاوی EDTA (اتیل آمین دی آمین تترا استیک اسید)، هپارین یا سدیم سیترات است، ریخته می شود. سلول های خونی سه مرتبه با بافر فسفات سالین (PBS) سترون شسته می شوند. سلول های شسته شده مجدداً به PBS یا سدیم کلرید ایزوتونیک تعلیق می شوند و سپس در دمای 4 درجه سانتی گراد ذخیره شده یا بلافاصله برای جداسازی مورد استفاده قرار می گیرند.

(ii) اگر نگه داری نمونه ها برای مدت طولانی در یخچال ممکن نباشد، نمونه های خون در گلیسرین فنول اکسالات جمع آوری می شوند. اگر بتوان نمونه ها را منجمد کرد، باید آن ها را در بافر پپتون لاکتوز یا متیل سولفوکساید 10٪ جمع آوری و آن ها را در دمای 70- یا سرد تر ذخیره نمود. ویروس در دمای 20- نمی تواند برای مدت طولانی باقی بماند.

(iii) در مواردی که بیماری کشنده است، برای جداسازی ویروس ترجیحاً از طحال و گره های لمفاوی استفاده می شود. اندام ها و بافت ها باید در دمای 4 درجه سانتی گراد نگه داری و به آزمایشگاه منتقل شوند. در آزمایشگاه

نمونه ها در PBS یا سالین ایزوتونیک همگن می شوند و به روشی که در زیر توضیح داده می شود برای سلول های خونی استفاده می شوند.

(iv) سلول های خونی شسته شده مجدداً در آب مقط تعلیق می شوند یا در PBS سونیکه می شوند. به مقدار 0/1 میلی لیتر به صورت داخل رگی به تخم مرغ جنین دار (ECE) 9-15 روزه تلقیح می شود.

(v) تخم مرغ ها در اتاقک های مرطوب با دمای 32-33/5 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری و هر روز کندل می شوند. مرگ جنین ها در 24 ساعت اول پس از تلقیح به عنوان موارد غیر اختصاصی در نظر گرفته می شوند.

(vi) جنین هایی که بین روز های 2 و 7 تلف می شوند، در دمای 4 درجه سانتی گراد نگه داری می شوند. جنین هایی که تا 7 روز زنده می مانند، باید کشته شوند. ممکن است جنین های مرده و جنین هایی که تا روز هفتم زنده می مانند، همگن کرده و در دو ظرف جداگانه قرار داده می شوند. جنین های کامل، پس از جدا نمودن سر و اندام هایی مانند کبد، طحال، قلب، ریه و کلیه همگن و سانتریفوژ می شوند.

(vii) می توان ویروس را به طور مستقیم با antigen capture ELISA یا RT-PCR، یا به طور غیر مستقیم با روش های شناسایی آنتی ژن مانند ایمونوفلئورسنس یا ایمونوپراکسیداز پس از تقویت در محیط های کشت شناسایی نمود.

(viii) اگر هیچ یک از جنین ها پس از تلقیح ویروس کشته نشدند باید تلقیحی که از پاساژ مواد در تخم مرغ به دست آمده است، مجدداً در ECE یا کشت سلول پاساژ داده شود.

جداسازی در کشت سلول:

جداسازی ویروس می تواند در کشت های سلولی مناسب مانند Aedes یا Vero، BHK-21، mous L albopictus clone C6/36 (AA) انجام پذیرد. تأثیر جداسازی در سلول های کشت داده شده به میزان قابل توجهی نسبت به ECE پایین تر است. میزان بازیافت در جداسازی اولیه ویروس در ECE و به دنبال آن پاساژ دادن در سلول های C6/36 (AA) جهت تکثیر، بالا است. علاوه براین پاساژ معمولاً برای رده های سلولی جانوری مانند BHK-21 یا Vero صورت می گیرد. در سلول های AA ضرورتاً اثرات سیتوپاتیک (CPE) مشاهده نمی

شود، در حالی که سلول های تک لایه برای ظهور CPE به مدت 5 روز در دمای 37 درجه سانتی گراد، با CO₂ 5% و در شرایط مرطوب بررسی می شوند. اگر هیچ CPE ظاهر نشود یک پاساژ ثانویه در کشت سلول صورت می گیرد. تأیید تشخیص BTV در محیط کشت سلول هایی که دارای CPE هستند با برخی از روش های ایمنی شناسی مانند antigen capture ELISA، ایمونوفلئورسنس، ایمونوپراکسیداز، آزمون خشی سازی ویروس یا RT-PCR صورت می گیرد.

جداسازی در گوسفند:

(i) گوسفند با استفاده از سلول های شسته شده از 10-500 میلی لیتر خون یا 10-50 میلی لیتر سوسپانسیون بافت تلقیح می شود. مواد تلقیح به صورت زیر جلدی در 10-20 میلی لیتر مایع تلقیح می شود. حجم های بالا به جداسازی ویروس کمک می کند اما باید تلقیح به صورت داخل وریدی انجام شود.

(ii) گوسفند ها برای 28 روز نگه داری شده و روزانه از جهت داشتن تب و ضعف ناشی از پاسخ آنتی بادی با استفاده از آزمون های سرم شناسی مانند C-ELISA بررسی می شوند. معمولاً 7 تا 14 روز پس از تلقیح، خون گوسفند حاوی ویروس جدا شده است که می توان آن را به صورت زنده در دمای 4 یا 70- درجه سانتی گراد ذخیره نمود.

رینوتراکت عفونی گاو (عفونت هرپس ویروسی 1 گاوی)

هرپس ویروس 1 گاوی (BHV1) عضو خانواده هرپس ویریده و تحت خانواده آلفا هرپس ویرینه است. تنها یک سروتیپ از این ویروس مشخص شده است. این ویروس مقاومت کمی به شرایط محیطی دارد و می تواند برای 13-5 روز در محیط های گرم زنده بماند، اما زمانی که ویروس در معرض اغلب ضد عفونی کننده ها قرار گیرد، حساس است و از بین می رود. BHV1 باعث آلودگی دستگاه تنفس، دستگاه تولید مثل، جنین و در نتیجه سقط جنین می شود. عفونت BHV1 جنین، طی 24 تا 48 ساعت سبب مرگ سریع آن می شود، اما دفع جنین برای 7 روز به تأخیر می افتد و در نتیجه درجات مختلفی از هضم خود به خودی (اتولیز) در آن رخ می دهد. در اغلب موارد به دنبال آلودگی، جفت ماندگی نیز رخ می دهد.

در معرض قرار گرفتن چندین دام حساس در گله می تواند سبب طوفان سقط (25 تا 60 درصد) شود. سقط انفرادی نیز ممکن است دیده شود، به ویژه در گله هایی که سابقه واکسیناسیون داشته یا در معرض ویروس بوده اند. در مطالعه ای که در سال 1390 بر روی جنین های سقط شده در گله های شیری اطراف تهران صورت گرفت نتایج حاکی از آن بود که بیماری IBR از علل به وجود آورنده سقط بوده و میزان وقوع آن 4٪ گزارش شد. در مطالعه دیگری که توسط شمس و همکاران در سال 1389 بر روی 135 نمونه سرمی اخذ شده از گاو داری های صنعتی مناطق جنوبی ایران با روش الایزای غیر مستقیم انجام دادند، در 39/25٪ از گاو هایی که سابقه سقط داشته اند ردپایی از عفونت با ویروس مولد بیماری IBR یافت شد. خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری شامل سقط جنین، نازایی، کاهش تولید، هزینه های درمان (زمانی که عفونت ثانویه باکتریایی رخ می دهد) و مرگ می باشد.

همه گیر شناسی

IBR بیشتر در دامهای با سن بالاتر از 6 ماه رخ می دهد. میزان ابتلا به این بیماری در گله گاو ها، 20-30 درصد و در موارد نادر به 100 درصد هم می رسد. میزان تلفات ناشی از این بیماری می تواند تا 10٪ برسد ولی غالباً 1٪ است. ورود دام به گله معمولاً باعث وقوع همه گیری می گردد. به علت حالت نهفتگی ویروس و فعال شدن مجدد آن ممکن است گاو هایی که از آلودگی بهبود می یابند، به عنوان منبع عفونت برای گاو های دیگر واقع شوند. همچنین باید توجه داشت که حمل و نقل گاو هایی که مبتلا به شکل پنهان عفونت هستند می تواند باعث فعال شدن

مجدد بیماری و انتشار آن در گله شود. تفاوتی در رویداد بیماری در فصول مختلف مشاهده نمی شود به جز اینکه در دامهای پرواری در فصول پاییز و زمستان که تعداد زیادی از گاو ها در جایگاه بسته در نزدیکی یکدیگر قرار می گیرند، وقوع بیماری بیشتر مشاهده می شود. در کنار هم قرار گرفتن گاو ها از گله های مختلف برای مثال در میادین فروش دام یا زمانی که دامها به کلینیک های دامپزشکی آورده می شوند و یا مخلوط شدن گله ها در اثر از بین رفتن حصار بین مراتع، می تواند باعث انتقال بیماری شود. گاو های نر اگر برای جفت گیری از گله دیگری وارد شوند و سپس به گله خود باز گردند می تواند باعث انتقال بین گله ای بیماری شود.

برای اینکه تشخیص دهیم آیا عفونت پس از درگیر کردن دامها به طور اولیه، می تواند در گله پخش شود یا نه باید تعداد دامهایی که به طور ثانویه (در اثر انتشار بیماری از دامهایی که ابتدا مبتلا شده اند) آلوده گشته اند را برآورد کرد. نسبت دامهایی که به طور ثانویه مبتلا شده اند به تعداد دامهایی که ابتدا در گیر شده اند، میزان انتشار نامیده شده و با R_0 مشخص می شود. چنانچه $R_0 < 1$ باشد، عفونت در گله پخش نخواهد شد و گله از آلودگی در امان است. زمانی که بیماری در گله به وجود آمده است اما R_0 از 1 کمتر شده باشد، بیماری در گله برطرف خواهد شد. زمانی که $R_0 > 1$ است، عفونت می تواند در گله منتشر شود. بنابراین راهکار های کنترلی جهت این بیماری تنها زمانی مؤثر واقع می شود که $R_0 < 1$ باشد. اصلی ترین منبع عفونت ترشحات بینی و قطراتی که در اثر سرفه دامهای آلوده در محیط پخش می شود، ترشحات دستگاه تناسلی، منی و سایر ترشحات بدن می باشد. علاوه بر این عفونت با BHV1 از طریق تماس مستقیم با قسمت های فوقانی دستگاه تنفس، ملتحمه یا غشاهای مخاطی دستگاه تناسلی، نیز منتقل می شود. در بیماری تنفسی انتشار عفونت از طریق آئروسول ها صورت می گیرد. انتقال مقاربتی و استفاده از منی یا وسایل تلقیح مصنوعی آلوده، راه دیگر انتقال آلودگی به دامهای سالم است.

شکل تناسلی بیماری از طریق مقاربتی به دامهای سالم منتقل می شود. ویروس در منی منجمد شده در دمای -196°C درجه سانتی گراد می تواند تا یک سال باقی بماند. همچنین ویروس IBR را حتی 12 ماه پس از ذخیره کردن منی جدا سازی کرده اند. این ویروس می تواند در منی دامهای نر آلوده وجود داشته باشد و این نکته باید در جفت گیری های طبیعی مد نظر قرار گیرد. ویروس در تمام جنین های سقط شده در اثر بیماری IBR وجود دارد و این جنین ها می توانند به عنوان منبع انتقال بیماری عمل کنند. احتمال وقوع همه گیری بیماری تنفسی و سقط جنین در دامهایی که واکسینه نشده اند بسیار بیشتر است. همه گیری شکل عمومی بیماری در گوساله های زیر 10 روز به

علت کاهش ایمنی گله، عدم واکسیناسیون مادران این گوساله ها و پایین بودن ایمنی غیر فعال (که در اثر خوردن آغوز ایجاد می شود) به وجود می آید.

خطر بیماری مشترک

این بیماری برای انسان خطری ایجاد نمی کند.

بیماری زایی

ویروس این بیماری از راه های مختلف باعث آلودگی دامها می شود از جمله عفونت اولیه که باعث درگیری دستگاه تنفسی، چشم ها و دستگاه تناسلی می شود. ویروس می تواند به صورت پنهان در سلول های عصبی و لمفاوی موضعی شود. پس از فعال شدن مجدد ویروس، چرخه نهفتگی تکرار می شود. ویروس BHV1 با از بین بردن سلول های استوانه ای نای بر روی مکانیسم های دفاعی آن تأثیر مشخصی می گذارد. انتشار عفونت از حفره بینی به بافت چشم ممکن است از راه مجرای اشکی صورت گیرد و باعث التهاب و تورم ملتحمه چشم و ایجاد پلاک های چند کانونی در ملتحمه، تورم محیطی قرنیه و عروق دار شدن عمیق شود. ویروس از مخاط بینی از طریق اعصاب سه قلو محیطی به گره اعصاب سه قلو می رسد و باعث آنسفالیت غیر چرکی می شود. همچنین BHV1 ممکن است از طریق لکوسیت های محیطی به جفت منتقل شود و سپس با انتقال به جنین و ایجاد عفونت حاد باعث سقط آن شود.

علائم بالینی

ویروس BHV1 سلول های قسمت فوقانی دستگاه تنفس را مبتلا می کند و سبب تورم مخاط بینی (رینیت)، التهاب حنجره و نای می شود. بسته به سویه ویروس، سن دام و عوامل محیطی شدت بیماری متفاوت خواهد بود. بی اشتها، ناگهانی، سرفه های بلند، تب تا 42 درجه سانتی گراد، پر خونی مخاط بینی به همراه تعداد زیادی کانون های نکروز خاکستری رنگ در غشاء مخاطی تیغه بینی که فقط در قسمت خارجی منخرین قابل مشاهده است، ترشحات سرریزی از چشم و بینی، افزایش ترشح بزاق و در برخی موارد افزایش خفیف تحریک پذیری نیز از علائم بیماری

می باشد. التهاب ملتحمه علامت رایج IBR است و یکی از چشم ها یا هر دو چشم ممکن است درگیر شوند. شکل تنفسی بیماری رایج ترین شکل در گاو های شیری و گاو های گوشتی که واکسینه نشده اند و همینطور گاو های پرواری می باشد. این شکل از بیماری معمولاً کشنده نیست و اکثر تلفات، ناشی از عفونت ثانویه ناشی از برونکوپنومونی باکتریایی می باشد. برونکوپنومونی باکتریایی ایجاد شده در این شکل از بیماری، با کاهش ساز و کار پاکسازی ریه ها و تضعیف سیستم ایمنی میزبان توسط ویروس صورت می گیرد. عفونت های تناسلی ممکن است سبب گسترش ولوواژینیت طاولی در ماده ها یا بالانوپوستیت در نرها شود. در عفونت های تناسلی ناحیه فرج متورم شده ندول ها و وزیکول های کوچک و زخم های موضعی دیده می شود که موقتی بوده و بهبودی خود به خودی در 1 تا 2 هفته رخ می دهد. در این ناحیه ابتدا پاپول های کوچک و سپس زخم های سطحی و زخم های عمیق ایجاد می شود.

سقط حاصل از این عفونت ممکن است در هر مرحله ای از آبستنی رخ دهد، اما متداول ترین زمان بین 4 تا 8 ماهگی آبستنی است. طوفان های سقط در گله هایی رخ می دهد که واکسینه نشده اند. عفونت جنین در ثلث سوم آبستنی ممکن است باعث مومیایی شدن، سقط، مرده زایی یا به دنیا آمدن گوساله های ضعیف شود. جفت ماندگی به دنبال سقط به وجود می آید، اما ناباروری ایجاد نمی شود. التهاب اندومتر رحم، کاهش آبستنی و دوره های فعلی کوتاه بعد از تلقیح با منی آلوده رخ می دهد. گاو های سقطی ممکن است علائم بالینی یا تحت بالینی را نشان دهند. زمانی که علائم بالینی در گاو های سقطی وجود دارد علائم تنفسی یا التهاب ملتحمه را نشان می دهند.

در شکل عمومی بیماری، تورم شدید حنجره و تنگی نفس که باعث اشکال در بلع و پنومونی استنشاقی می شود، مشاهده می گردد. علائم دیگر این شکل از بیماری شامل بی اشتها، تب، ریزش بزاق، التهاب مخاط بینی، التهاب ملتحمه می باشد. مخاط دهان پر خون است و زخم های سطحی در کام نرم که روی آنها را موکوس چسبناکی پوشانده است، التهاب حاد در ناحیه حلق که ترشحات موکوسی چرکی روی این قسمت را می پوشاند، مشاهده می شود. تعداد تنفس افزایش یافته و تنفس سطحی می شود و برونکوپنومونی در این دامها رایج است و صدای بلند تنفسی و صدای ویز و کراکل از علائم دیگر می باشد. همچنین ممکن است به دلیل زخم در شکمبه اسهال نیز در این دامها وجود داشته باشد. مرگ طی 24 ساعت در اثر التهاب گسترده برونشیول ها رخ می دهد. در گوساله های زیر 10 روز بیماری عمومی شدید بوده و منجر به تلفات بالا می شود. گوساله های زیر 6 ماه ممکن

است به آنسفالیت مبتلا شوند که این شکل از بیماری با علائمی چون عدم تعادل، هیجان و افسردگی متناوب و میزان بالای تلفات مشخص می شود. در گاو های شیری ممکن است اولین علامت کاهش تولید شیر باشد. ویروس BHV1 می تواند باعث ورم پستان شود. علاوه بر این، BHV1 می تواند باعث عفونت های نهفته موضعی در گره های عصبی ناحیه لگنی شده و در شرایط خاصی همچون استرس یا تجویز کورتیکواستروئید ها، فعال می شود. واکسیناسیون با اغلب واکسن های زنده تخفیف حدت یافته، توانایی تولید عفونت های نهفته را دارد. اگر ویروس در جفت پنهان شود، سقط جنین 90 روز بعد از واکسیناسیون رخ می دهد. سقط جنین در اثر واکسیناسیون در گاو های 6 تا 8 ماهه شایع تر است.

علائم کالبد گشایی

به علت هضم خود به خودی (به دلیل مرگ سریع جنین) اغلب تغییرات ماکروسکوپیکی جنین سقط شده، مخفی می ماند، اما کانون های خاکستری روشن تا سفید با قطر 1 تا 3 میلی متری در سطح کبد و ریه وجود دارد. ممکن است در اثر خونریزی، این کانون ها قرمز رنگ باشند و کبد اغلب متورم است. این جراحات به ندرت در سایر اندام ها مثل ریه، کلیه، مغز و غیره می تواند مشاهده شود. جفت نیز ممکن است ادماتوز باشد. در گاو های بالغ زخم ها محدود می شوند به عضلات، حفره بینی، حلق، حنجره و نای که منتهی به برونش های بزرگ می شوند. در قسمت فوقانی دستگاه تنفس درجات مختلفی از التهاب به همراه زخم در این ناحیه مشاهده می شود. در موارد شدید بیماری، اکسودای فراوان فیبرینی چرکی قابل مشاهده است. گره های لمفاوی در ناحیه گلو و گردن متورم هستند.

کنترل و پیشگیری

به طور کلی راهکار های کنترلی این بیماری شامل حفاظت زیستی، واکسیناسیون و ریشه کنی بیماری می باشد. گاو هایی که از از بیماری بهبود یافته اند، ایمن می شوند. خرید دام از گله های عاری از بیماری می تواند از ورود عفونت به گله جلوگیری کند. در صورت خرید دام از گله هایی که از پاک بودنشان اطمینان نداریم، باید قبل از ورود این دامها به گله آزمایش های لازم را انجام دهیم. همچنین گاهی لازم است دامهایی که می خواهیم وارد گله کنیم را برای چند هفته قرنطینه کنیم. سیستم بسته نگهداری دامها از ورود عفونت جلوگیری می کند و از نظر

اقتصادی به صرفه است. انجام آزمایش های غربالگری روی سرم دامهای نر برای تلقیح مصنوعی و انتخاب گاو های نر سرم منفی توصیه شده، که از انتقال مقاربتی عفونت جلوگیری می کند. واکسیناسیون برای پیشگیری و کنترل عفونت متداول است، زیرا شیوع بیماری بالا است. واکسن های زنده تخفیف حدت یافته و واکسن های غیر فعال موجود است و برای به دست آوردن بهترین پاسخ ایمنی، توصیه های کارخانه سازنده باید مد نظر باشد تا از اثرات سوء آن ها جلوگیری شود. ایمنی ناشی از واکسن تخفیف حدت یافته، 96-40 ساعت پس از تزریق داخل عضلانی یا تجویز داخل بینی به وجود می آید. واکسن تخفیف حدت یافته باید به طور مناسب حمل و نقل شود تا اثر خود را از دست ندهد. از مشکلات این واکسن این است که ویروس موجود در واکسن می تواند به صورت نهفته در بدن دام قرار گیرد. علاوه بر این گوساله هایی که در آنها این واکسن به داخل بینی تجویز می شود، ویروس می تواند در نای تکثیر شود و به مدت 14-7 روز در محیط پخش شود. به علت خطر واکسن در ایجاد سقط و در معرض قرار گرفتن گاو های حساس، استفاده از واکسن های زنده تخفیف حدت یافته برای گاو های آبستن یا گوساله هایی که از مادران آبستن شیر می خورند، توصیه نمی شود. اگر از ویروس های زنده تخفیف حدت یافته استفاده می شود برای کاهش خطر سقط یا انتقال ویروس به دامهای حساس، زمان واکسیناسیون باید درست انتخاب شود. مزیت واکسن های کشته این است که باعث سقط نمی شوند و حالت نهفته پیدا نمی کنند. علاوه بر این، این واکسن ها ویروس را در محیط پخش نمی کنند. با این وجود ایمنی ناشی از واکسن های کشته به اندازه واکسن های زنده تخفیف حدت یافته نیست. در گله های گوشتی، تلیسه ها قبل از جفت گیری باید واکسینه شوند.

در گاو های شیری ساده ترین راه واکسیناسیون تلیسه ها قبل از جفت گیری (4 تا 6 ماهگی و تکرار آن در 8 تا 12 ماهگی) و در زمان انجام آزمایش دستگاه تناسلی در 30 روز پس از زایش تلیسه ها و گاو ها است. تلیسه های جایگزین باید 2-3 هفته قبل از جفت گیری واکسینه شوند. واکسیناسیون گوساله های زیر 3 روز با واکسن زنده تخفیف حدت یافته باعث تلفات بالا در این دامها می شود. چنانچه در زمان واکسیناسیون ویروس در حالت نهفته باشد، واکسن نمی تواند از دفع مجدد ویروس جلوگیری کند.

سیاست ریشه کنی بیماری در برخی کشور ها جایگزین واکسیناسیون شده است. در این کشور ها گوساله های شیرخوار از سایر دامها جدا می شوند چراکه این گوساله ها در صورت آلودگی، تا زمانی که شیر می خورند از

لحاظ سرمی نسبت به این بیماری منفی هستند، درحالیکه بعد از آن عیار آنتی بادی در آنها بالا می رود. دامهایی که از لحاظ سرمی مثبت هستند حذف یا کشتار می شوند.

درمان

استفاده از ضد میکروب های وسیع الطیف در مواردی که دام مبتلا به التهاب ثانویه باکتریایی و پنومونی شده است، مفید می باشد. درمان التهاب نای دشوار است. استفاده روزانه از ضد میکروب ها ضروری است البته از لحاظ اقتصادی کشتار دامهای مبتلا به صرفه تر است.

جمع آوری نمونه

نمونه های بافت شناسی از جنین های سقط شده یا گوساله های تلف شده (نمونه ها در فرمالین ثابت شده اند): ریه، کبد، نای، کلیه، غده فوق کلیه، شکمبه، مری، حلق، طحال و کوتیلودون ها. نمونه ها را باید در مجاورت یخ و به سرعت به آزمایشگاه ارسال نمود.

نمونه های بافت شناسی از دامهای مبتلا به شکل تنفسی بیماری (نمونه ها در فرمالین ثابت شده اند): توربینت های بینی، نای، حلق، ریه.

سواب بینی باید از 5 تا 10 گاوی که در مرحله ابتدایی آلودگی هستند اخذ شود. ترشحات این گاو ها بیشتر سرریزی است تا موکوسی چرکی. در مواردی که گاو دچار ولوواژینیت یا بالانوپوستیت است سواب باید از دستگاه تناسلی تهیه گردد. سواب نباید به سطوح مخاطی برخورد کند. می توان غلاف قضیب را با نرمال سالین شست و سپس مایع حاصل از شست و شو را جمع آوری نمود. نمونه ها در محیط کشت انتقالی و در دمای 4 درجه سانتی گراد باید ارسال شوند.

نمونه های بافت شناسی در دامهای مبتلا به آنسفالیت (نمونه هایی که در فرمالین ثابت شده اند): نیمی از قسمت وسط مغز (جهت بررسی با میکروسکوپ نوری و انجام آزمایش ایمونو هیستوشیمی)

می توان نمونه ها را از مخاط دستگاه تنفس، گره های لمفاوی ریه ها و لوزه برای شناسایی ویروس جمع آوری نمود.

نمونه های ویروس شناسی (اخذ نمونه ها از جنین های سقط شده یا گوساله های تلف شده): ریه، کبد، کلیه و شکمبه.

نمونه های ویروس شناسی (اخذ نمونه ها از دامهای مبتلا به شکل تنفسی بیماری): ریه، نای، سوآب بینی

نمونه های ویروس شناسی (اخذ نمونه ها از دامهای مبتلا به آنسفالیت): نیمی از قسمت وسط مغز (جهت انجام آزمایش های فلئورسنت آنتی بادی، PCR، ISO)

عفونت هرپس ویروس بزی-1

هرپس ویروس بزی-1 (CpHV-1) یک آلفا هرپس ویروس از خانواده هرپس ویریده است. برخلاف شکل تناسلی، شکل سیستمیک بیماری ناشی از این ویروس در دامهای بالغ مشاهده نمی شود. این بیماری برای بره ها و گوساله ها خطری ایجاد نمی کند. این عفونت از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت است، چراکه باعث خساراتی چون مرگ بزهای جوان (میزان ابتلا و مرگ بالا است)، سقط و مرده زایی در میش ها می شود. البته در گله هایی که قبل از این آلوده شده اند، میزان سقط بالا نیست.

بیماری زایی

در بزغاله هایی که 1 تا 2 هفته از شیر گرفته شده اند، سپتی سمی رخ می دهد و عفونت در اعضای مختلف به ویژه در دستگاه گوارش و تنفس گسترش می یابد. در عفونت جنین، ویروس با ایجاد التهاب در جفت از آن می گذرد و جنین را آلوده می کند.

علائم بالینی

ویروس اغلب سبب عفونت های تحت بالینی و نهفته مثل ولوواژینیت و بالانوپوستیت (که گاهی شکل شدید به خود می گیرد) می شود. همچنین گاهی سبب سقط های شدید می گردد و ممکن است میزان سقط به 50 درصد هم برسد. این ویروس سبب بیماری سیستمیک شدید در بزغاله های 1 تا 2 هفته خواهد شد. این حالت ممکن است در گله هایی که بزهای آن سقط کرده اند و یا حتی سقط نداشته اند دیده شود. قبل از سقط علامت بالینی غالبی وجود ندارد و سقط ناشی از این عفونت در اواخر آبستنی رخ می دهد. در حالت دو قلو آبستنی، ممکن است یک جنین، مرده و دیگری زنده باشد. در صورت ایجاد بیماری تناسلی، پر خونی و ادم فرج، زخم های سطحی فرج و مخاط واژن وجود دارد. ترشحات واژن شفاف تا موکوسی - چرکی است. جراحات ها بعد از حدود یک هفته التیام می یابند. شیوع جراحات تناسلی بعد از جفت گیری و یا به دنبال سقط (اما نه همیشه) رخ می دهد. در بز نر پر خونی و زخم آلت تناسلی و غلاف آن با ترشحات چرکی دیده می شود. نشانه بالینی در بزغاله ها شامل ضعف، بی اشتها، سیانوزه شدن مخاطات و اختلال تنفسی، افزایش ضربان قلب و تنفس، درد شکم، اسهال و اسهال خونی در بعضی از بیماران است. ممکن است وزیکول و زخم هایی در قرنیه مشاهده شود و در برخی موارد ممکن است شاهد التهاب

ملتحمه باشیم. ترشحات سرمی چرکی از بینی، زخم های مخاط دهان و خونریزی های کوچک (پتشی) نیز از علائمی است که می تواند در دام آلوده مشاهده گردد.

علائم کالبدگشایی

زخم و نکروز در مخاط واژن و فرج، التهاب جفت که به طور مشخص در میش ها مشاهده می گردد. در برخی دامهای بالغ پنومونی به همراه اکسودای ضخیم فیبرینی در فضای جنب مشاهده می شود. کانون های ارزنی ناشی از نکروز ممکن است در کبد جنین سقط شده مشاهده شود. در بزغاله های تلف شده، نکروز در مخاط شکمبه، شیردان، روده، سکوم و کولون وجود دارد. علاوه براین، ممکن است این زخم ها بر روی پوست پا نیز مشاهد شوند.

همه گیر شناسی

انتقال عفونت از طریق تنفس یا خوردن علوفه آلوده رخ می دهد، چراکه ویروس در ترشحات بینی، حلق و واژن و همینطور در مدفوع وجود دارد. شکل تناسلی بیماری می تواند از طریق جفت گیری منتقل گردد، به طوری که همه گیری ولوواژینیت پس از جفت گیری مشاهده می شود. دام پس از آلودگی می تواند به مدت 7 روز ویروس را دفع کند. به طور کلی میزان واگیری به ویژه در شکل تناسلی بیماری بالا است.

کنترل و پیشگیری

قرنطینه و آزمایش های سرمی همه بزهایی که به گله وارد می شوند، تنها روش قابل قبول کنترلی است که در حال حاضر می توان پیشنهاد داد. واکسن های غیر فعال شده نیز مفید می باشند، اما به اندازه کافی ایمنی ایجاد نکرده و به صورت تجاری در دسترس نیستند.

درمان

درمانی برای این بیماری وجود ندارد، اگرچه دارو های ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAID) می تواند ناراحتی های دستگاه تناسلی را تخفیف دهد.

جمع آوری نمونه

نمونه های ویروس شناسی (بزغاله تلف شده و جنین سقط شده): کبد، ریه، غدد آدرنال.

نمونه های ویروس شناسی (در بالغین): زخم ها و وزیکول ها در ناحیه تناسلی

نمونه های ویروس شناسی (جهت آزمون PCR و جداسازی ویروس) باید در شرایط خنک ارسال شوند. همچنین

نمونه های فوق باید با فرمالین ثابت شوند.

تب دره ریفت

بیماری تب دره ریفت یا بیماری هپاتیت آنزوتوتیک یا بیماری دره کچ، یکی از علل مهم سقط جنین گوسفند، بز و گاو است. ویروس عامل بیماری عضو خانواده بونیا ویریده و جنس فلپوویروس ها است که اغلب به وسیله پشه ها منتقل شده و مخزن ویروس در مهره داران شناخته نشده است، اما به نظر می رسد نشخوارکنندگان اهلی و وحشی مخزن باشند. علاوه براین، انتقال ویروس از طریق پشه های آئدس در آب های راکد نیز صورت می گیرد. تخم این پشه ها نسبت به شرایط خشک مقاوم هستند و می توانند برای سال ها در محیط باقی بمانند. الگوی این بیماری به صورت وقوع همه گیری همراه علائم بالینی است و یک دوره خاموشی بین وقوع همه گیری ها رخ می دهد. دامهای بومی معمولاً علائم بالینی را نشان نمی دهند. حیوانات آبستن، سقط می کنند و غیر آبستن ها علائم خفیف بالینی دارند. شدت جراحات ها بستگی به سن آبستنی در زمان آلوده شدن دارد. خسارات ناشی از این بیماری شامل مرگ بره ها و گوساله های جوان، سقط جنین و در برخی موارد مرگ گوسفندان و گاو های بالغ می باشد. میزان تلفات در بره ها بیشتر از گوساله ها است.

بیماری زایی

دو روز پس از آلودگی گوسفندان با پشه ها، یک ویرمی 2 تا 5 روزه ایجاد می شود. در این حالت چنانچه پشه ای این دام را نیش بزند می تواند بیماری را به دامهای سالم منتقل کند. در زمانی که دام ویرمیک است، علائمی چون تب، افسردگی و عدم تمایل به راه رفتن را نشان می دهد. ویروس به جفت و جنین (در صورتی که جایگزینی صورت گرفته باشد) حمله می کند سپس ویروس به مغز، نخاع و عضلات اسکلتی تهاجم پیدا می کند. در بره ها و گوساله ها، سلول های کبدی اولین جایی هستند که ویروس در آنجا جایگزین می شود.

سن یک عامل تعیین کننده در پیشرفت عفونت محسوب می شود، به طوری که در دامهای جوان جراحات کبدی (شامل تحلیل رفتن و نکروز شدن) می تواند محدود به تعدادی از سلول ها باشد، سپس پیشرفت کرده و نکروز گسترش یابد و در نهایت منجر به از کار افتادن کبد شود. در دامهای جوان انسفالومیلیت نیز می تواند رخ دهد.

علائم بالینی

چهره غالب بالینی، مرده زایی یا زایش بره های دارای نقایص مادرزادی و مرگ و میر بره ها و گوساله ها است. بیشترین نقص مادرزادی که مشاهده می شود، خمیدگی دائمی مفاصل، براکی گیناتیا، پروآنسفال، میکروسفالی (کوچک شدن مغز)، عدم تشکیل نخاع یا هیپوپلازی نخاع و سایر نواقص CNS است. اسهال متعفن، استفراغ، ترشحات موکوسی چرکی - خونی از بینی، تجمع خون در مخاط چشم، دهان، راست روده و فرج نیز ممکن است در اثر ابتلا به این بیماری در دام مشاهده شود. علاوه براین ممکن است در دامهای آلوده لنگش، تورم تاج سم، نکروز در پوست پستان، سر پستانک و پوست بیضه، کاهش تولید شیر، درد ناحیه شکم و افزایش ترشح بزاق نیز مشاهده شود. این احتمال وجود دارد که تمام سندروم های گفته شده در یک گله دیده شود.

بسته به جمعیت پشه و سطح آلودگی ویروسی آنها، نرخ مرگ و میر گوسفند ها فرق می کند. بره های با سن کم تر از دو هفته بسیار حساس اند. بره ها و گوساله ها بعد از 12 ساعت از دوره کمون ناگهان تب (بالای 41 درجه سانتی گراد) و عدم تعادل نشان داده و مرگ آن ها در 36 ساعت رخ می دهد، که حدود 95-100 درصد بره های مبتلا شده و 70 درصد گوساله ها می میرند. تب در دو مرحله بروز می کند، به این شکل که بعد از افزایش درجه حرارت، در دوره ای دمای بدن دام کاهش می یابد. شکل فوق حاد بیماری در بره های بزرگ تر و در بالغین مشاهده می شود.

در گوسفند و گاو بالغ سقط برجسته ترین علامت است، میش های آبستن اغلب هنگام بیماری و یا پس از بهبود و یا در دوره نقاهت، سقط می کنند. این بیماری گاهی می تواند باعث ایجاد طوفان های سقط در گله شود اما نرخ مرگ و میر گوسفند ممکن است به 20-30 درصد و در گاو تا 10 درصد نیز برسد. در موارد خفیف تر در گاو، تب، لاغری و قطع تولید شیر دیده شده است. در مورد گوسفند، عفونت های مراحل اولیه آبستنی (28 تا 32 روز) اغلب سبب مرگ زودرس جنین و مومیایی شدن می شوند. عفونت بین روز های 32 و 37، سبب غیر طبیعی شدن سیستم اعصاب مرکزی (CNS) و اسکلت حیوان و خمیدگی شدید دائم مفاصل (آرتروگریپوزیس) می شود. عفونت بین روز های 37 تا 48 جراحات های خفیف عضلانی - اسکلتی با آنسفالیت و آنسفالومیلیت غیر چرکی را موجب می شود.

جدول شماره 9- نوع آسیب وارد بر جنین در مراحل مختلف آبستنی

مرحله آبستنی	نوع آسیب به جنین
28-32 روز	مرگ زودرس، مومیایی شدن
32-37 روز	غیر طبیعی شدن CNS و اسکلت حیوان، آرتروگریپوزیس
37-48 روز	جراحات های خفیف عضلانی-اسکلتی، آنسفالیت، انسفالومیلیت غیر چرکی

بیماری در بز

این ویروس در بز بیماری خفیفی ایجاد می کند. پاسخ بز به بیماری اغلب ایجاد تب است و جنین بز های آلوده نیز ممکن است عفونی شوند.

علائم کالبدگشایی

نکروز وسیع در کبد نشانه غالب کالبدگشایی در بیماری تب دره ریفت است. سایر نشانی های غیر اختصاصی شامل احتقان و پتشی در قلب، گره های لمفاوی، کیسه صفرا و دستگاه گوارش می باشد. ممکن است محتویات شیردان و روده در اثر خونریزی به رنگ قهوه ای تیره تا قرمز باشند. هیدروپریکاردیوم، هیدروتوراکس خونریزی در ریه (در اغلب موارد همراه خونریزی ها، ادم نیز مشاهده می شود) از علائم دیگر می باشند. همچنین التهاب خفیف در جفت مشاهده می شود.

همه گیر شناسی

وقوع همه گیری تب دره ریفت در مناطق انزوتیک (مناطق که بیماری در آن ها بومی است)، زمانی که رطوبت محیط بالا است یا به دنبال وقوع سیل رخ می دهد. در این شرایط جمعیت پشه ها در محیط افزایش یافته و حضور آن ها در کنار دامهای اهلی می تواند سبب انتقال بیماری شود. به دنبال بارندگی های سنگین، جمعیت ناقلین در اطراف آب های راکد افزایش یافته و تخم ریزی آن ها در سطح این آب ها صورت می گیرد. طیف وسیعی از انواع پشه ها می توانند ناقل این ویروس باشند. وقوع بیماری بستگی به جمعیت ناقلین دارد از جمله پشه خاکی و کولیکوئیدس می توانند ناقل باشند، اما میزبان نگه دارنده محسوب نمی شوند. ویروس می تواند در شیر، مدفوع و جنین سقط شده وجود داشته باشد. خرید دام و وارد کردن آن به مناطق پاک، یکی دیگر از منابع عفونت می باشد.

خطر بیماری مشترک

انسان می تواند به بیماری مبتلا شود. دوره بیماری در انسان کوتاه است، اما دارای مخاطراتی چون تب خونریزی دهنده، ایجاد عارضه در شبکه و آنسفالیت می باشد. در یک همه گیری در عربستان سعودی 14٪ از افراد مبتلا جان خود را در اثر ابتلا به بیماری از دست دادند. مهم ترین گروه های در معرض خطر کارکنان آزمایشگاه ها، دامداران و دامپروران و دامپزشکان هستند. همچنین این جرم به عنوان بیوتروریسم مطرح است.

کنترل و پیشگیری

واکسنی برای پیشگیری از بیماری در دسترس نیست، اگرچه واکسن زنده تخفیف حدت یافته و واکسن زنده موتاسیون یافته حفاظت خوبی برای حداقل 28 ماه می دهند، اما برای دامهای آبستن توصیه نشده است، زیرا خود واکسن، می تواند سبب سقط و نواقص مادرزادی در نوزادان شود. البته واکسن های کشته، که نیاز به تکرار سالیانه دارند در گله های گاو کشورهایی که بیماری در آن ها بومی است، توصیه شده اند که می توان در دامهای آبستن و حیوانات جوان نیز از آن ها استفاده کرد و همچنین واکسن تخفیف حدت یافته موتاژنی نیز که در گوسفند و گاو هردو حفاظت ایجاد می کند، ارائه شده است، اگرچه در گوسفند گزارشی از سقط در اوایل آبستنی با تجویز این

واکسن وجود دارد. ایمنی پس از عفونت طبیعی برای مدت طولانی و حتی تمام عمر ایجاد می شود. کنترل ناقلین و قرنطینه از راهکارهایی است که در مناطق بومی باید به کار گرفته شود. با از بین بردن حشرات ناقل می توان بیماری را در انسان و حیوان کنترل کرد. دامها نباید در مراتعی که حضور پشه ها رو به افزایش است حضور یابند.

درمان

درمان شناخته شده جدیدی مطرح نیست.

جمع آوری نمونه

ویروس را می توان از خون در لوله های حاوی ضد انعقاد در مرحله تب زای بیماری جدا نمود (5 میلی لیتر خون در مرحله تب زای بیماری). علاوه براین، می توان ویروس را از کبد، طحال و مغز حیوان تلف شده به میزان 5 گرم و از اندام های جنین سقط شده جدا سازی کرد. چنانچه ارسال نمونه ها به آزمایشگاه بیش از 24 ساعت طول بکشد باید آن ها را منجمد و در کنار یخ خشک ارسال گردد.

نمونه های ویروس شناسی: کبد، طحال، مغز (جهت PCR، VI، آزمون فلئورسنت آنتی بادی)

نمونه های بافت شناسی: کبد، طحال، مغز (جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری و آزمایشات ایمونوهیستوشیمی)

در هنگام جمع آوری نمونه ها باید به خطر مشترک بودن بیماری توجه کنید.

عوامل انگلی سقط جنین

توکسوپلاسموز

عامل مولد این بیماری انگل توکسوپلازما گوندی است که در گاو، گوسفند، بز و انسان ایجاد بیماری می کند و عامل سقط جنین و عفونت مادرزادی در گوسفند و بز است. در بسیاری از کشورها توکسوپلاسموز بعد از کلامیدیا به عنوان عامل سقط در گله ها شناسایی شده است. در سال 1388 شیوع توکسوپلاسموز در گوسفندان استان فارس 26/5٪ گزارش شد همچنین در نواحی مرکزی ایران میزان آلودگی 25/5٪، در جنوب غربی کشور 14٪ در شمال ایران 32/5٪ و در شمال شرقی کشور آلودگی گوسفند ها 31٪ و آلودگی بز ها 17٪ (MAT) گزارش شده است. توکسوپلازما گوندی سه مرحله عفونی دارد:

تاکی زوئیت: شکل تکثیر سریع انگل در حین مرحله حاد عفونت در میزبان واسط

برادی زوئیت: حضور در کیست های بافت ها

اووسیست (حاوی اسپوروزوئیت ها): در مدفوع گربه وجود دارد.

میزبان اصلی انگل، خانواده گربه سانان است و میزبان های واسط گستره وسیعی دارد که شامل انسان، گاو، گوسفند و بز است.

سیکل زندگی توکسوپلازما دارای دو مرحله جنسی و غیر جنسی است. سیکل جنسی در گربه ها و گربه سانان وحشی کامل می شود و سیکل غیر جنسی در بدن تمام حیوانات خونگرم می تواند کامل شود. در گربه ها انگل در سلول های پوششی روده تکثیر یافته و اووسیست ها از راه مدفوع دفع شده و توسط میزبانان واسط بلع می شوند. 4-12 روز بعد از اینکه گربه کیست ها را می خورد می تواند میلیون ها اووسیست را از طریق مدفوع خود دفع کند. اووسیست ها حداقل به مدت یک سال می توانند در محیط باقی بمانند و دام با خوردن آنها به بیماری مبتلا می شود. اووسیست ها در برابر سرما مقاوم بوده اما نسبت به خشکی حساس اند.

بیماری زایی

توکسوپلازما گوندیی انگل داخل سلولی است، که به اغلب بافت ها حمله می کند، اما به سیستم رتیکولواندوتلیال و سیستم عصبی تمایل بیشتری دارد. اسپوروزوئیت ها از اووسیت ها یا برادی زوئیت ها از بافت های کیست به داخل سلول نفوذ می کنند و در اپیتلیوم روده تکثیر پیدا می کنند. بعد از تهاجم به سلول، انگل داخل سلول تکثیر یافته و در نهایت با پر شدن سلول از انگل، سلول تخریب می شود که توکسوپلاسمای آزاد شده از راه گردش خون به سایر اعضا می رسد. همزمان با پارازیتمی (حضور انگل در خون) در میش ها تب 41 درجه سانتی گراد حوالی روز های 6 یا 7 بعد از عفونت بروز می کند و این مرحله با گسترش ایمنی در 2 الی 3 هفته کاهش پیدا می کند. در این مرحله ارگانیزم در یک جا موضعی شده و کیست بافتی را تشکیل می دهد. وقتی بدن دام پاسخ ایمنی ایجاد می کند، در عضلات و مغز تاکی زوئیت ها در درون کیست ها به برادی زوئیت تبدیل می شوند که این کیست ها تا زمان حیات دام و تا 60 روز بعد از مرگ می توانند باقی بمانند. در میش های آبستن 14 روز پس از خوردن تاکی زوئیت ها، ارگانیزم، جنین را از طریق سلول های تروفوبلاست آلوده می سازد. در بز های آبستن، توکسوپلازما به جفت هجوم آورده و به جنین منتقل می شود، سپس سقط ایجاد می کند.

خطر بیماری مشترک

توکسوپلاسموز از بیماری های مشترک بین انسان و حیوان است که خانم های باردار بیشترین جمعیت در معرض خطر را تشکیل می دهند. این تک یاخته می تواند بیماری های عصبی مادرزادی و نابینایی در جنین انسان ایجاد کند. آلودگی در اواخر بارداری منجر به تولد نوزادان سالم می شود اما خطر ابتلا به التهاب مشیمیه و شبکیه را در مراحل بعدی زندگی کودک ایجاد می کند بنابراین خانم های باردار نباید در زایمان میش ها دخالت کنند و یا از بره هایی که تازه به دنیا آمده اند مراقبت نمایند. این مراقبت ها نه فقط برای پیشگیری از ابتلا به توکسوپلاسموز، بلکه جهت پیشگیری از آلوده شدن با عوامل عفونی چون کلامیدوفیلا آبورئوس و کوکسیلا بورنتی نیز باید صورت گیرد. علاوه بر این، دامپزشک ها و دامدارانی که در گله های آلوده به زایمان میش کمک می کنند باید مراقبت های لازم را به عمل آورند چرا که این افراد در معرض خطر بالایی قرار دارند. پرده های جنینی و جنین های مرده گوسفند ها و میش هایی که سقط کرده اند، باید با احتیاط جمع آوری شوند و شخصی که این کار را انجام می دهد باید از

دستکش استفاده کند. جمع کردن مدفوع گربه بدون استفاده از دستکش نیز منبع عفونت برای انسان محسوب می شود. دامپزشک ها باید در هنگام تهیه نمونه از دامها اصول جمع آوری نمونه های بیولوژیک که برای انسان خطر آفرین هستند را رعایت کنند. در آزمایشگاه ها نیز باید در محیط محدود از نوع L3 کار انجام شود و اگر مقدور نیست آزمایشگاه های معمولی باید مجهز به هود باشند.

این بیماری در انسان بعد از مصرف شیر خام بز نیز گزارش شده است و در کشور ما نیز مشخص شده است که شیر گاو، بز و گوسفند می توانند عفونت را به انسان منتقل کنند بنابراین بایستی شیر این دامها را قبل از مصرف پاستوریزه کرد یا جوشاند. این بیماری یکی از علل شایع آنسفالیت (التهاب و عدم تشکیل مغز) در افراد مبتلا به ایدز است، علاوه براین، ابتلا به توکسوپلاسموز در افرادی که سیستم ایمنی آنها به نحوی سرکوب شده است مانند افرادی که از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی استفاده می کنند، عمل پیوند عضو انجام داده اند و برای درمان سرطان از شیمی درمانی استفاده می کنند، بیشتر شایع است.

موارد آلودگی در انسان در اثر مصرف گوشت نپخته و یا نیم پز، دست آلوده و مصرف آب و سبزیجات آلوده است. در ایران توکسوپلاسماز گوندی از گوشت و فراورده های گوشتی گوسفند، بز، گاو و مرغ جدا شده است. برادی زوویت های موجود در عضلات و سایر بافت های حیوانات منبع عفونت برای انسان محسوب می شوند. برای پیشگیری از آلودگی از این طریق، گوشت را باید در دمای 12- درجه سانتی گراد به مدت یک روز فریز کرد و یا آن را در دمای 67 درجه سانتی گراد پخت، در این صورت کیست ها از بین می روند. پختن گوشت با استفاده از ماکروویو جهت از بین بردن کیست ها مناسب نمی باشد چراکه ممکن است برخی از کیست ها باقی بمانند.

علائم بالینی

توکسوپلاسموز در دامهای اهلی بیشتر به صورت تحت بالینی بروز می کند. در تاریخچه گله معمولاً تماس با بچه گربه ها چه به طور مستقیم و چه به طور غیر مستقیم (در اثر مصرف علوفه آلوده به مدفوع آنها) وجود دارد. از چند هفته تا چند روز قبل از زمان تولید مثل، در گله ها سقط مشاهده می شود. سقط در میش ها معمولاً در 4 هفته آخر آبستنی رخ می دهد. علائم بیماری، بسته به عضوی که درگیر شده و اینکه بیماری از راه مادرزادی منتقل شده باشد و یا به صورت اکتسابی به وجود آمده باشد، مختلف است. زمانی که مادرزادی باشد، بیشتر به شکل آنسفالیت بروز

می کند و زمانی که عفونت خیلی شدید باشد، پس از تولد تب با پنومونی و التهاب روده وجود دارد. در گوسفند، اگرچه شاید سندرم تب، قطع تنفس، لرزش عمومی، سقط و مرده زایی رخ دهد، اما علائم بالینی بیماری عمومی در میش نادر است و اگر آلودگی در مراحل اولیه آبستنی باشد (قبل از 60-70 روزگی) مهم ترین نشانه، به طور معمول جذب جنین است، در این صورت میش ها به فعلی بر می گردند و یا اینکه نازا می شوند بنابراین میش ها به جز اندکی علائم عصبی، علامت دیگری از بیماری را نشان نمی دهند و به سرعت به وضعیت طبیعی خود باز می گردند.

آلودگی در اواسط آبستنی، به سقط یا مومیایی شدن جنین منجر خواهد شد و اگر آلودگی در روزهای آخر آبستنی (پس از 120 روز) ایجاد شود، دفع جنین، تولد بره های ضعیف یا بره های طبیعی که بعد از 3 تا 4 روز از تولد می میرند، اتفاق می افتد. چنین بره هایی بیش از یک هفته دوام نمی آورند و مشکلات حرکتی داشته و نمی توانند شیر را بمکند. بره هایی که بعد از تولد مبتلا شوند، تب، قطع تنفس، بی اشتهایی و گاهی اسهال را نشان می دهند، اما مرگ در آنها معمول نیست. در میش هایی که قبل از جفت گیری مبتلا شوند، جنین آلوده نخواهد شد.

زمان آلودگی میش		اثر بیماری بر روی جنین	
قبل از جفت گیری		جنین سالم و بدون عوارض	
در روزهای اول آبستنی		جذب جنین و نازایی در میش	
در روزهای آخر آبستنی		بره زنده و دارای عوارض بیماری	
در اواسط آبستنی		سقط یا مومیایی شدن جنین	

بیماری در بز

بز نسبت به گوسفند به توکسوپلاسموز حساس تر است. یک تا سه هفته پس از ابتلا، تب، بی اشتها، ضعف عمومی عضلات، کاهش تنفس و اسهال بروز می کند. برخی از بزها تلف می شوند و آنهایی که زنده می مانند، از نظر بالینی سالم هستند. در بزهای آبستن، امکان سقط و مرده زایی وجود دارد. در بز سقط در اثر نکروز کوتیلودون ها یا تب رخ می دهد و ممکن است سقط در آبستنی بعدی نیز مشاهده شود. میش هایی که در سن 30-90 روزگی آبستنی آلوده می شوند، معمولاً جنین را جذب کرده و یا جنین مومیایی می شود. بیماری عمومی ممکن است با میزان مرگ و میر زیاد به ویژه در بزهای جوان رخ دهد. انتقال افقی در بزهای ماده در گسترش بیماری چندان اهمیتی ندارد. دامداران مناطق مختلف کشور معمولاً در زمانی که از این سقط صحبت می کنند چنین عنوان می کنند که انگار بر روی جفت دفعی گوسفندان، نمک پاشیده شده است که این به دلیل مشاهده مناظر سفید رنگ نکروزه بر روی جفت دامها می باشد.

بیماری در گاو

توکسوپلاسموز در گاو اهمیت چندانی ندارد. در گاو بیماری بیشتر به صورت حاد و همراه با علائمی چون تب، تنگی نفس و علائم عصبی مانند عدم تعادل (آتاکسی) و افزایش تحریک پذیری که به تدریج تبدیل به سستی پیشرونده می شود بروز می کند. مرده زایی و به دنیا آوردن گوساله های ضعیف که مدت کوتاهی بعد از تولد تلف می شوند نیز از علائم دیگر بیماری در گاو است و توکسوپلاسموز در گاو باعث سقط نمی شود. گوساله هایی که به طور مادرزادی مبتلا می شوند دارای علائمی چون تب، تنگی نفس، سرفه، عطسه، ریزش از بینی، تشنجات کلونیک، دندان قروچه و لرزش سر و گردن می باشند و بعد از 2-6 روز تلف می شوند.

علائم کالبد گشایی

در کالبد گشایی، جنین مومیایی یا تجزیه شده، ادم زیر جلدی و در حفرات بدن خونابه همراه با رشته های فیبرین مشاهده می شود. توکسوپلازما موجب التهاب جفت می شود که رنگ کویلوودون ها از قرمز روشن تا تیره بوده و روی آنها کانون های کوچک نکروز به رنگ سفید تا زرد به اندازه 1-3 میلی متر وجود دارد. همچنین ممکن است در کویلوودون ها نقاط کلسیفیه تا اندازه 1 سانتی متر مشاهده شود. از این جراحات می توان به عنوان یک ابزار تشخیصی در سطح گله استفاده کرد. گاهی اوقات کویلوودون ها و مناطق بین کویلوودونی، ظاهر سالمی دارند (بر خلاف آلودگی با کلامیدیا). جنین های مرده به دنیا آمده هیچ ضایعه ماکروسکوپی نشان نمی دهند. التهاب پرده جنب، آب آوردگی قفسه سینه (هیدروتوراکس)، آب آوردگی شکم (آسیت)، تورم گره های لمفاوی، زخم روده و نقاط نکروز در کبد، طحال و کلیه ها ممکن است در کالبد گشایی دامهای مبتلا مشاهده شود. در کالبد گشایی جنین کانون های نکروتیک در مغز، کبد، کلیه و ریه مشاهده می شود اما این کانون های نکروتیک در جفت بهتر مشاهده می شود. جنین های مومیایی شده ظاهری چرمی به رنگ قهوه ای تیره دارند و طول آن ها 8-10 سانتی متر است.

همه گیر شناسی

ابتلای گربه های اهلی و گربه سانان وحشی برای تکمیل سیکل جنسی توکسوپلازما ضروری است، بنابراین این حیوانات نقش کلیدی را در انتشار بیماری دارند. حضور گربه ها در گله های کوچک، موجب ابتلا با درصد بالاتری نسبت به گله های بزرگ می شود. گربه ها با شکار حیوانات آلوده (مانند جوندگان) و مصرف کیست های موجود در لاشه آنها و یا لاشه دام های ذبح شده و خوردن جنین های آلوده، می توانند به بیماری مبتلا شوند. ممکن است انتقال بیماری از طریق جفت بوده و بچه گربه هایی آلوده به دنیا بیایند. علاوه بر این، گربه ها می توانند از طریق پرندگان آلوده، مبتلا شوند که در این صورت تعداد زیادی اوویست در محیط پخش می کنند.

منبع مهم آلودگی، مدفوع گربه ها است که اوویست دارد. 50 گرم مدفوع گربه می تواند حاوی 10 میلیون اوویست باشد، در حالی که دز خوراکی مورد نیاز برای شکل گیری آلودگی در گوسفند، کم تر از 40 اوویست

است. کنسائتره یا علوفه آلوده به مدفوع گربه ها ممکن است حاوی دز های بالای آلوده کننده باشند، بنابراین گربه ها نقش اصلی را در همه گیر شناسی توکسوپلاسموز گوسفند بازی می کنند. گربه ها معمولاً مدفوعشان را در یونجه و علوفه انبار شده دامها، دفن می کنند، همچنین این حیوانات مدفوع آلوده خود را به طور سطحی در زیر خاک مدفون می کنند اما فعالیت کرم های خاکی و سایر موجودات خاکزی، انگل را به سطح خاک می آورد و باعث آلوده شدن علوفه می شود. اووسیست های دفع شده از مدفوع گربه در صورتیکه در معرض تابش خورشید و خشکی قرار نگیرند، می توانند به مدت 18 ماه باقی بمانند.

گربه ها به ندرت علائم بالینی نشان می دهند و در مدت 4-12 روز بعد از خوردن مواد آلوده به انگل، میلیون ها اووسیست از مدفوع خود دفع می کنند و سپس ایمن می شوند که البته در اثر استرس یا بیماری، اووسیست با تعداد کمتری دفع می شود. حیوانات گوشتخوار و لاشخور ها نیز می توانند عامل بیماری را در منطقه پخش کنند. مشخص شده است که شیوع بیماری در نواحی خشک، کم و در مناطق مرطوب و بارانی بیشتر مشاهده می شود. همچنین عفونت در شرایط اقلیمی گرم و نواحی پست شایع تر از شرایط اقلیمی سرد و نواحی کوهستانی است. بارش باران به انتشار بیماری کمک می کند و باعث ماندگاری بیشتر اووسیست در مرتع می شود. اگرچه در نواحی جنوبی ایران با وجود کم بودن رطوبت و بارندگی، به دلیل اینکه درجه حرارت و ارتفاع در قسمت های مختلف این منطقه رنج وسیعی را در بر دارد، آلودگی با این بیماری مشاهده می شود. انتقال مادرزادی در گونه های مختلف متفاوت بوده و بستگی به عواملی نظیر ساختمان جفت، طول آبستنی، وضعیت سیستم ایمنی جنین و مادر دارد. حیوانات ماده ای که به صورت مادرزادی مبتلا شده اند پس از بلوغ، بیماری را به طور عمودی به نسل بعدی خود منتقل می کنند. انگل در شیر، ادرار و یا ترشحات جاری از فرج گوسفندی که سقط کرده است، مشاهده نمی شود. با جدا کردن توکسوپلازما از منی قوچ، احتمال می رود که جفت گیری نیز یکی از راه های انتقال بیماری باشد.

به طور معمول انتشار بیماری در گله هنگام زایش انجام می شود. داشتن مرتع مشترک با سایر دام های اهلی، نگه داری میش های جایگزین در جایگاه بسته در فصل تابستان و خرید گوسفند از سایر گله ها باعث افزایش شیوع بیماری در گله می شود. در ایران شیوع بیماری با افزایش جمعیت دامهای عشایری ارتباط مستقیم دارد.

کنترل و پیشگیری

در کنترل توکسوپلاسموز دامهای اهلی دو نکته مهم وجود دارد: اول کاهش اثرات اقتصادی در این حیوانات و دوم کاهش خطر انتقال به انسان که از گوشت های آنها استفاده می کنند. از بین بردن گربه ها در محیط دامپروری، می تواند از آلوده شدن غذای دام و مراتع جلوگیری کند، اما به علت حضور گربه ها در مناطق نزدیک دامپروری ها، شاید در عمل نتوان این محدودیت را ایجاد کرد. باید مراقبت نمود که گربه ها مدفوعشان را در غذا و بستر دامها دفن نکنند.

عقیم کردن گربه های ماده می تواند مفید باشد چراکه باعث کاهش جمعیت بچه گربه ها می شود. سیلو کردن علوفه در سطل های فلزی باعث کاهش احتمال آلودگی علوفه انبار شده می شود و با این کار جوندگان نیز به انبار غذای دام دسترسی پیدا نمی کنند. فراهم آوردن جعبه ای برای گربه ها جهت دفع مدفوع در انبار علوفه می تواند از آلوده شدن غذای دام جلوگیری کند. **نباید غذا های انبار شده را به میش های آبستن داد و یا اینکه از دادن قسمت های سطحی علوفه های انبار شده به این دامهای آبستن خود داری شود.** همچنین بایستی از نزدیک شدن گربه ها به میش های آبستن جلوگیری نمود که البته این کار در عمل دشوار است. آبخوری باید دارای ارتفاع باشد تا در دسترس گربه ها قرار نگیرد و تا حد امکان غذای حیوان باید در جایی به دور از دسترس گربه ها نگه داری شود. همچنین لاشه های آلوده یا مشکوک باید به گونه ای از بین برده شوند، که گوشتخواران به آنها دسترسی نداشته باشند. پرده های جنینی و جنین های مرده باید دفن و یا سوزانده شوند و **یا از طریق سوراخهای خروج گاز چاه های توالت روستایی به چاه فاضلاب انداخته شوند،** تا از انتقال بیماری به گربه ها و سایر حیوانات جلوگیری به عمل آید. از دادن ضمام و بافت های دام ذبح شده به گربه باید خود داری شود.

ابتلا به توکسوپلاسموز قبل از آبستنی اغلب ایمنی ایجاد می کند، بنابراین دامهایی که سقط می کنند باید برای جفت گیری در فصل بعدی نگه داری شوند. با اینکه خطر انتشار جانبی توسط میش های سقط کرده مطرح نیست، باید جدا سازی میش ها در مراحل اولیه پس از سقط، تا زمانی که تشخیص قطعی صورت پذیرد انجام شود، زیرا امکان درگیری گله با عوامل عفونی دیگر که باعث سقط می شوند نیز وجود دارد.

اووسیست ها با محلول آمونیوم 5٪ در مدت چند دقیقه، با اتانول 95٪ در مدت یک ساعت و با فرمالین 10٪ در مدت 24 ساعت از بین می روند، اما از هیچ یک از این ترکیبات نمی توان برای ضد عفونی کردن غذا و آب استفاده کرد. برادی زوئیت ها و تاکی زوئیت ها نمی توانند به مدت طولانی در محیط باقی بمانند و با فریز کردن و ذوب کردن، خشک کردن و ضد عفونی کردن محیط با مواد ضد عفونی کننده استاندارد و حتی با آب از بین می روند.

تغذیه با موننژین، روزانه 15 میلی گرم به ازای هر رأس از روز 100 آبستنی، سقط را کاهش می دهد. همینطور تغذیه روزانه با دکوکوئینیت به میزان 2 میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن نیز، همین اثر را داشته است. دکوکوئینیت خوشمزه تر بوده و خطر سمیت ندارد و می توان آن را به آب یا غذای میش هایی که از نظر سرمی منفی هستند و احتمال در معرض قرار گرفتن را دارند، اضافه کرد. بهتر است هر دو دارو، قبل از مواجه شدن با عفونت (جهت پیشگیری) در جیره اضافه شوند، چراکه اثر درمانی ندارند.

هیچ واکسنی جهت کنترل توکسوپلاسموز در ایران وجود ندارد.

درمان

در میش های آبستن، درمان با ترکیب توأم سولفامتازین و پریمتامین مؤثر است. از این دارو ها در موارد همه گیری های توکسوپلاسموز جهت درمان دامهای بیمار استفاده می شود. درمان باید طی سه دوره با فواصل 5 روز صورت پذیرد. این دارو از تکثیر انگل جلوگیری می کند اما عفونت را به طور کامل از بین نمی برد و عملکرد دارو در کیست های موجود در بافت ها محدود می شود. ترکیبی از baquiloprim و سولفادیمیدین در کنترل بیماری در میش های غیر آبستن مؤثر است.

جمع آوری نمونه

نمونه های به دست آمده برای جداسازی باید بدون اینکه منجمد شوند در کنار یخ منتقل گردند.

نمونه ها جهت آزمایش های انگل شناسی: مغز، ریه، جفت به صورت تازه یا منجمد

نمونه ها جهت آزمایش های سرم شناسی: مایع قفسه سینه جنین (هماگلوتیاسیون غیر مستقیم)

نمونه ها جهت بررسی های بافت شناسی: کوتیلودون های جفت، ریه، کبد، مغز، نخاع، کلیه و قلب (جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری و ایمونوهیستوشیمی)

تشخیص توکسوپلاسموز با استفاده از نمونه های زیر امکان پذیر است:

جفت

مغز جنین های سقط شده

مایعات جنینی

خون: نمونه خون از میشی که سقط کرده است و نمونه خون بره زنده قبل از مصرف آغوز

مایع مغزی نخاعی

سوآب بینی

جداسازی توکسوپلازما گوندیی از کوتیلودون های جفت (2-5 گرم کوتیلودون)، مغز، مایعات جنین و صفاق و خون قلب جنین سقط شده ای که خیلی دستخوش هضم خودبه خودی (اتولیز) نشده است، می تواند صورت گیرد. بهترین نمونه، مغز جنین سقط شده می باشد و نمونه ها باید تا حد ممکن بلافاصله بعد از سقط تهیه شوند. اگر نتوان آزمایشات لازم را بلافاصله بعد از جمع آوری روی نمونه ها انجام داد، باید نمونه ها را در دمای 20- درجه سانتی گراد منجمد کرد.

نمونه گیری از جفت

5 یا 6 کوتیلودون به همراه غشای بین کوتیلودونی باید در ظروف سترون جمع آوری شود. نمونه گیری از جفت باید قبل از اینکه کثیف شود صورت گیرد. اگر کوتیلودون ها کثیف شوند می توان آنها را با سرم فیزیولوژی شست.

نمونه های بافت شناسی

5 یا 6 عدد کوتیلودون و کل مغز جنین سقط شده که خیلی دچار هضم خود به خودی (اتولیز) نشده باشد، باید به شکل سترون (آسپتیک) تهیه گردد و در ظروف شیشه ای حاوی ثابت کننده مناسب قرار گیرد.

تشخیص پادتن

هنگامی که نمونه خون در زمان سقط جمع آوری می شود، عیار پادتن علیه تکسوپلازما گوندیی بالا است. نمونه خون بره های زنده و ضعیف، قبل از مصرف آغاز می تواند جهت تشخیص عیار پادتن مورد استفاده قرار گیرد.

نمونه های خونی که جهت آزمایشات سرم شناسی تهیه می شوند باید ترجیحاً به صورت سترون (استریل) جمع آوری شده و به لوله های شیشه ای منتقل شوند و در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال گردند.

تشخیص جرم:

جداسازی: جنین سقط شده گوسفند و بز و پرده های جنینی، بهترین نمونه ها جهت جداسازی توکسوپلازما گوندیی با تلقیح به موش آزمایشگاهی می باشند. همچنین بهترین بافت ها شامل مغز جنین و کوتیلودون های جفت است. نتایج مثبت از نمونه های تازه و بدون آلودگی بدست می آید، نمونه ها را نباید منجمد کرد، چراکه این کار انگل را از بین می برد.

(i) با رعایت اصول سترونی، 2-5 گرم کوتیلودون های جفت یا بافت مغز را از جنین سقط شده جمع آوری کنید.

(ii) بافت را با 0/3 مولار بافر فسفات سالین سترون (FBS)، در pH:7/4 و همراه با آنتی بیوتیک (به میزان IU/ml 100 پنی سیلین و 745 IU/ml استرپتومایسین)، در یک stomacher یا هر وسیله ای که باعث نرم شدن بافت می

شود، همگن کنید. می توان برای همگن کردن بافت مغز، آن را 10 مرتبه از سوزن با گیج 16 و بوسیله سرنگ عبور داد.

(iii) به هریک از موش هایی که فاقد آلودگی با توکسوپلازما هستند، از طریق داخل صفاقی 0/5 میلی لیتر از مخلوط همگن فوق تلقیح کنید.

(iv) 6-8 هفته بعد موش ها را بکشید و مغز آن ها را خارج کنید. خون موش ها نیز در این مرحله باید اخذ شود، سرم آن جدا شده و در دمای 20- ذخیره گردد. مغز موش هایی که قبل از 6-8 هفته می میرند نیز، باید برداشت شود.

(v) مغز هریک از موش ها را با حجم مساوی از PBS سترون، از یک سوزن با گیج 16، ده مرتبه عبور دهید تا همگن شود.

(vi) یک قطره (5 میکرولیتر) از تعلیق حاصل را در هر 5 لام پخش کنید.

(vii) سپس آن را خشک و با گیمسارنگ آمیزی کنید، سپس آن را زیر یک cover slip قرار دهید.

(viii) لام ها را زیر میکروسکوپ بررسی کنید. کیست های بافتی با ساختار هایی گرد و با اندازه 5-50 میکرومتر، مشاهده می شود. برادی زوایت های هلالی شکل، به رنگ آبی مشاهده می شود.

یک روش دیگر برای بررسی مغز موش، این است که قسمتی کوچک از مغز قدامی را جدا نمود و آن را با یک cover slip کاملاً له کرد. کیست های بافتی به راحتی در زیر میکروسکوپ قابل شناسایی هستند.

اگر بافت های تلقیح شده آلودگی بالایی با توکسوپلازما گوندی داشته باشند، ممکن است موش ها بعد از 1-2 هفته تلف شوند.

عدم موفقیت در شناسایی کیست های بافت، نشان دهنده عدم آلودگی نمی باشد. می توان سرم موش ها را از لحاظ حضور آنتی بادی های ضد توکسوپلازما بررسی نمود (برای مثال استفاده از آزمون فلئورسنت آنتی بادی غیر مستقیم). اگر نتیجه این آزمایش ها نیز منفی شد، احتمال آلودگی با توکسوپلازما وجود ندارد.

آزمون های سرم شناسی:

برای شناسایی پادتن های ضد توکسوپلازما گوندی، آزمون های سرم شناسی مختلفی وجود دارد. برای نمونه، اساس برخی از این آزمون ها، رنگ تاکی زوایت ها در زیر میکروسکوپ می باشد (مانند (DT) Dye Test و IFA). برخی دیگر از آزمون ها براساس آگلوتیناسیون تاکی زوایت های توکسوپلازما، گلبول های قرمز یا ذرات لاتکس هستند (مانند آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)، آزمون هم آگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA) و آگلوتیناسیون لاتکس ((CA)).

با آزمون الایزا، درجات تغییر رنگ، مشخص کننده میزان آنتی بادی های اختصاصی در یک محلول است.

DT، استاندارد طلایی آزمون های سرم شناسی برای تشخیص آنتی بادی های توکسوپلازما در انسان است.

تاکی زوایت های زنده توکسوپلازما، همراه با عوامل فرعی شبه کمپلمان و سرم آزمایش، قبل از افزودن متیلن بلو، در دمای 37 درجه سانتی گراد برای 1 ساعت، گرم خانه گذاری می شود. آنتی بادی اختصاصی نفوذ پذیری غشاء انگل را تحریک می کند، به طوری که سیتوپلاسم به بیرون نشت می کند. تاکی زوایت ها رنگ نمی گیرند، چرا که به آنتی بادی عرضه نمی شوند تا به رنگ آبی تظاهر یابند (مانند نمونه سرم منفی). DT، دارای حساسیت و ویژگی بالایی در انسان است، اما ممکن است برای سایر گونه ها غیر قابل اطمینان باشد. علاوه براین، DT می تواند به دلیل استفاده از انگل زنده، خطر آفرین باشد. این آزمون گران است و نیاز به مهارت و تخصص بالایی دارد. تاکی زوایت ها باید در کشت سلول و نه در صفاق موش، رشد کنند.

IFA، یک روش ساده است که به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد. تمامی تاکی زوایت های کشته شده با سرم تست رقیق شده، گرم خانه گذاری می شوند. سرم ضد گونه فلئورسانس اضافه شده و نتیجه با کمک میکروسکوپ فلئورسانس مشاهده می شود. آنتی بادی های نشاندار فلئورسنت، برای گونه های مختلف حیوانی، به صورت تجاری موجود می باشند این روش تقریباً ارزان بوده و کیت های آن به صورت تجاری موجود می باشد. با این وجود، از آنجا که این روش احتیاج به میکروسکوپ فلئورسانس دارد و نتایج با چشم خوانده می شود، ممکن است تفاوت های فردی در قرائت نتایج به وجود آید. امکان دارد پیدا کردن برخی از کونزوگه های مختص گونه، دشوار باشد. علاوه بر این، خطر واکنش متقاطع با فاکتور روماتوئید و آنتی بادی های ضد هسته ای، وجود دارد.

DAT، دارای حساسیت و ویژگی بالایی است. تاکی زوآیت های فرمالینه شده توکسوپلازما، به چاهک U شکل پلیت میکروتیتر، اضافه و رقت سرم های تست، آماده می شود، نمونه های مثبت، ایجاد آگلوتیناسیون می کنند که می تواند درجات مختلفی داشته باشند. در حالی که نمونه های منفی، باعث ایجاد یک تکه (در اثر رسوب تاکی زوآیت ها) در کف چاهک می شوند. این آزمون ساده بوده و کیت های آن به صورت تجاری موجود است، اما میزان زیادی آنتی ژن احتیاج دارد. DAT و LAT، اختصاصی گونه نیست و قابلیت استفاده در همه گونه ها را دارد.

در الایزای اصلی، از یک آنتی ژن محلول که از تاکی زوآیت های سویه RH توکسوپلازما به دست می آید، استفاده می شود و این آنتی ژن ها در چاهک های پلیت میکروتیتر، ریخته می شوند. سرم های تست و سپس آنزیم های ضد گونه نشاندار کونزوگه (مانند پراکسیداز نشاندار horse radish ضد IgG گوسفندی)، اضافه می شوند. هر کدام از کونزوگه های متصل شده، باعث ایجاد تغییر رنگ در سوبسترای که به طور مستقیم وابسته به میزان آنتی بادی باند شده دارد، می شوند. این آزمون ساده است و می توان با آن به آسانی تعداد زیادی نمونه را مورد آزمایش قرار داد همچنین می توان به سادگی با کونزوگه ضد گونه انتخابی، این آزمون را انجام داد. کونزوگه های ضد گونه مشخص، سوبسترا ها و کیت های کامل، به صورت تجاری موجود می باشند. به هر حال این آزمون، احتیاج به اسپکتروفتومتر دارد. در آزمایشگاه هایی که باید تعداد زیادی نمونه را بررسی کنند، آزمون الایزا، روش بسیار مناسبی است.

اخیراً از روشی به نام الایزای kinetics (KELA)، استفاده می شود. سیستم KELA، میزان پاسخ بین آنزیم باند شده و محلول سوبسترا که باعث تولید رنگ می شود را اندازه گیری می کند. سه تراکم چشمی، در فواصل 45 ثانیه ای، با استفاده از برنامه مدیریت داده های KELA، خوانده شده و نتایج به دست آمده از لحاظ دامنه، گزارش می شود. ارتباط زیادی بین الایزا و KELA وجود دارد، بنابراین، این دو آزمون ابزار های تشخیصی بسیار مناسبی هستند و تفاوت آن ها فقط در تسهیلات نرم افزاری می باشد.

برای افزایش ویژگی الایزای معمولی، آزمونی وجود دارد که در آن از آنتی ژن های نو ترکیب و آنتی ژن های اختصاصی توکسوپلازما خالص با میل ترکیبی، در مورد گوسفند ها، استفاده می شود. اما استفاده از این آزمون ها رایج نمی باشد.

با الایزای معمولی می توان ایمونوگلوبولین های G و M مخصوص توکسوپلاسما را تشخیص داد، که در این صورت می توان تا حدی توکسوپلاسموز حاد و مزمن را از یکدیگر تفریق نمود. اخیراً استفاده از آزمون های تمایل سنجی، گسترش پیدا کرده است. هنگامی که پاسخ ایمنی به بلوغ خود می رسد، بعد از پایدار شدن عفونت، آنتی بادی هایی که تمایل آن ها برای آنتی ژن افزایش یافته است (functional affinity)، گسترش می یابند. می توان این تمایل را اندازه گیری کرد و جهت تشخیص عفونت فعال یا آلودگی اخیر با توکسوپلاسما گوندیی، استفاده نمود. آزمونی جهت تشخیص تمایل IgG برای آنتی ژن P30 توکسوپلاسما گوندیی در گوسفند، وجود دارد. این آزمون، ابزار تشخیصی مناسبی برای تفریق عفونت های جدید و پایدار می باشد.

نئوسپوروز

سگک میزبان اصلی و واسط برای تک یاخته نئوسپورا کانینوم است. میزبانهای واسط طبیعی شامل گاو، اسب، بز، گوسفند، گوزن، گاومیش، روباه قرمز و شتر است. این انگل به عنوان رایج ترین عامل سقط در گاو ها در بیشتر کشور ها شناخته شده است. مرحله غیر جنسی انگل شامل تاکی زوویت و کیست های نسجی (حاوی برادی زوویت) در میزبان واسط دیده می شود. تاکی زوویت ها مرحله تقسیم سریع انگل بوده که به طور فعال به سلول های میزبان حمله می کنند. برادی زوویت ها مرحله تقسیم کند انگل بوده که در کیست های نسجی با دیواره ضخیم قرار گرفته اند و مرحله مزمن و پنهان عفونت محسوب می شوند.

انتقال انگل از راه جفت در بیشتر میزبانها دیده می شود و روش عمودی که به این نوع انتقال گفته می شود، یکی از مهم ترین راه های انتقال در گاو است. گوشتخواران از راه خوردن بافت های آلوده و یا بلع اوووسیست های هاگدار شده، عفونت را کسب می کنند. سقط ناشی از نئوسپورا کانینوم معمولاً در ابتدای ثلث دوم آبستنی رخ می دهد اما می تواند در سایر ماه های آبستنی نیز رخ دهد که البته خطر سقط در آبستنی های بعدی کاهش می یابد. این انگل تأثیری در میزان آبستنی در گله ندارد و از طریق تلقیح مصنوعی منتقل نمی شود. احتمال سقط در آبستنی های دیگر، در دامهایی که در گذشته به عفونت ناشی از نئوسپورا کانینوم مبتلا بوده اند 5/7 برابر بیشتر از سایر دامها می باشد.

همه گیر شناسی

سقط جنین به صورت بومی و یا همه گیری دیده می شود. در موارد همه گیری در صد بالایی از سقط در زمان کوتاهی رخ می دهد، درحالیکه در مواردی که بیماری بومی است سقط های انفرادی (5٪) در گله به مدت چند سال اتفاق می افتد. سقط جنین هنگامی که در گاو های در معرض خطر طی 6 و 8 هفته بیشتر از 10٪ اتفاق بیفتد، به عنوان همه گیری در نظر گرفته می شوند. انتقال عمودی اصلی ترین راه انتقال بوده، ولی انتقال پس از تولد نیز وجود دارد. بررسی ها نشان داده است که 80-95٪ گوساله های به دنیا آمده از گاو های سرم مثبت، آلوده هستند. انتقال عمودی بیماری اکثراً باعث آلودگی به صورت انفرادی در دامها می شود. طوفان سقط جنین در گاو هایی که به تازگی آلوده شده اند، بیانگر انتقال نئوسپورا کانینوم از راه مدفوعی - دهانی در این گله ها است. هرچند که انتقال

افقی یا انتقال پس از تولد حتی بدون ظهور طوفان های سقط جنین، در برخی گله ها اتفاق می افتد. همچنین انتقال کیست ها یا تاکی زوئیت ها از طریق چشم، بینی و دهان نیز صورت می گیرد. اطلاعات حاصل از سرم شناسی و همه گیر شناسی بیانگر نقش محوری سگ ها در چرخه زندگی این انگل است. خوردن پرده های جفت و جنین های سقط شده به احتمال زیاد مهم ترین منشأ آلودگی در سگ باشد. سگ ها بیشتر از یک مرتبه قادر به دفع اوو سیست ها هستند (بر خلاف توکسوپلازما) بنابر این علاوه بر اینکه نباید امکان تغذیه از جنین های سقط شده، پرده های جنین یا گوساله مرده به سگ ها داده شود، اصولاً نباید سگ ها به محل هایی که احتمال آلودگی غذا و آب مصرفی دامها وجود دارد، نزدیک شده و مدفوع خود را دفع کنند.

خطر بیماری مشترک

این بیماری برای انسان خطری ایجاد نمی کند.

بیماری زایی

این ارگانیسم به اپیتلیوم پرده های جنینی و عروق خونی جفت تمایل دارد و باعث تورم عروق جنین، التهاب و تحلیل پرده کوریوآلانتوئیس و نکروز گسترده جفت می شود. تاکی زوئیت ها به سلول های میزبان نفوذ کرده و در واکوئل های پارازیتوفوروس موضعی می شوند. موضعی می شوند. این تاکی زوئیت ها در ماکروفاژها، مونوسیت ها، سلول های اندوتلیال عروق، فیبروبلاست ها، سلول های کبدی، سلول های توبول های کلیه و در مغز دام آلوده می توانند حضور داشته باشند. درگیری سلول های مغزی نخاعی به همراه اختلال عصبی عضلانی در دام آلوده وجود دارد.

بیماری در گاو

نئوسپورا کانینوم در هر دو نژاد شیری و گوشتی سبب سقط جنین از ماه سوم آبستنی به بعد می شود و بیشتر سقط های ناشی از این انگل در ماه 5-6 آبستنی اتفاق می افتد. جنین ها ممکن است در رحم مرده، باز جذب، مومیایی و یا دچار هضم خود به خود شده، ولی گاهی نیز نارس یا زنده و حتی طبیعی باشند اما با عفونت مزمن متولد می

شوند. حداکثر تا 95٪ گوساله هایی که به طور مادرزادی از مادران بیمار متولد می شوند، از نظر بالینی طبیعی هستند. عفونت های مادرزادی معمولاً با علائمی چون عدم تعادل، فلجی و سایر نقایص عصبی در گوساله های تازه به دنیا آمده مشاهده می شود اما بیشتر عفونت های مادرزادی بدون علائم بالینی هستند و اثر چندانی بر سلامتی گوساله ها ندارند. آلودگی با این انگل احتمال مرده زایی و جفت ماندگی را افزایش می دهد. تلیسه های آلوده میزان شیر کمتری تولید می کنند، این حالت در سایر دامها مشاهده نمی شود. کاهش متوسط افزایش وزن روزانه در گاوهای پرواری به میزان 0/17 تا 0/05 کیلوگرم مشاهده می شود.

بیماری در گوسفند و بز

نئوسپورا کانینوم در بزها باعث سقط های انفرادی می شود اما این عفونت در گوسفند شایع نیست. گوسفند ها و بز های آلوده ممکن است سقط کنند یا نوزادان ضعیف به دنیا بیاورند. این حالت ممکن است در آبستنی های بعدی نیز تکرار شود. گوسفند ها و بز های سقط کرده در اثر آلودگی به این انگل باید کشتار شوند.

علائم کالبدگشایی

در اغلب موارد علائم کالبدگشایی در جنین هایی دیده می شود که در اثر میکوکاردیت دچار از کار افتادگی قلب شده اند. با این وجود ممکن است هضم خود به خودی در بافت مغز مشاهده شود. همچنین زخم های موجود در کبد که بیشتر در موارد همه گیری های سقط جنین ناشی از این انگل مشاهده می شود از علائم کالبدگشایی می باشد.

کنترل و پیشگیری

به دلیل اینکه نئوسپورا کانینوم از راه عمودی حتی تا چندین نسل در گاو ها منتقل می شود، یکی از بهترین روش ها برای پیشگیری از عفونت، آزمایش و حذف گاو های سرم مثبت در گله می باشد. حذف گاو های آلوده و جایگزینی آنها با گاو های غیر آلوده، بستگی کامل به توانایی آزمایش های سرم شناسی دارد. کنترل سگ ها به منظور عدم دستیابی آنها به بافت های آلوده گاو، به ویژه پرده های جنینی توصیه می شود. بررسی ها ارتباط همه

گیری های سقط جنین در گاو ها با حضور سگ در دامداری را نشان داده اند، همچنین به اثبات رسیده است که انتقال عمودی به تنهایی برای ماندگاری عفونت در جمعیت کافی نیست. بنابراین باید از نزدیک شدن سگ ها به گاو ها و دسترسی به بافت های گاوی به ویژه جنین، جفت و بافت های سقط شده جلوگیری کرد و در ضمن روش های کنترل برای جلوگیری از افزایش تعداد سگ های ولگرد نیز، به کار گرفته شود. باید تمام تلاش ها جهت جلوگیری از آلوده شدن آب و غذای دامها به مدفوع سگ صورت گیرد. جفت ها، جنین های سقط شده و گوساله های تلف شده باید از محل زندگی دامها خارج شوند به طوریکه گاوها و سایر میزبان های واسطه نتوانند به آنها دسترسی پیدا کنند.

کشتار دامهایی که به طور مادرزادی آلوده هستند می تواند باعث کاهش سقط در گله شود. گوساله هایی که به طور مادرزادی مبتلا هستند از طریق آزمون های سرم شناسی قبل از مصرف آغوز می توانند شناسایی و کشتار شوند. چنانچه نمونه گیری از خون گوساله ها قبل از مصرف آغوز مقدور نباشد، آزمایش سرم شناسی در سن 6 ماهگی می تواند گوساله های آلوده را شناسایی کند. واکسن تاکی زوییت کشته شده جهت گاو های آبستن وجود دارد، اما واکسیناسیون ممکن است با سیاست های حذف و کشتار تداخل ایجاد کند.

درمان

هنوز دارویی برای جلوگیری از انتقال انگل از مادر به جنین شناخته نشده است. علاوه براین درمان دارویی به علت غیر قابل مصرف شدن شیر، باقی ماندن دارو در گوشت و مشکلات قطع دارو خیلی توصیه نمی شود.

جمع آوری نمونه

نمونه های ارسالی به آزمایشگاه شامل جنین کامل و جفت یا نمونه های مغز، قلب، کبد، مایعات بدن یا نمونه های خون می باشد. نمونه ی مغز جهت بررسی های بافت شناسی و ایمونوهیستولوژیکی باید در فرمالین 10٪ ثابت شود.

تریکومونیازیس

تریکومونیازیس بیماری واگیر دار مقاربتی گاو ها است و عامل آن تک یاخته تریکوموناس فتوس می باشد. تریکوموناس فتوس گلابی شکل بوده و شبیه سر اسپرم گاو است که سه تاژک در قسمت قدامی و یک تاژک در قسمت خلفی دارد. این تک یاخته به گاو تمایل دارد و در دستگاه گوارش گربه نیز یافت می شود، اما در گربه ها بیماری زان نیست یا علائم خفیفی ایجاد می کند، مثلاً سبب اسهال خفیف مزمن می شود.

تریکوموناس فتوس برای بقا وابسته به گاو نر یا ماده است و مدت زندگی آن در خارج از بدن این دامها بسیار کوتاه است، چراکه در درجه حرارت های بالا یا محیط خشک به سرعت از بین می رود و به بسیاری از ضد عفونی کننده ها حساس است. با وجود این، تعدادی از این میکروارگانیسم ها در روند منجمد کردن منی، زنده می مانند. اغلب گاو ها و تلیسه ها به بیماری حساس اند. تریکومونیازیس به طور مشخص با علائمی چون ناباروری، مرگ زودرس جنین، گاهی سقط و تجمع چرک در رحم (پیومتر) در گله بروز می کند. در گاو نر، تریکوموناس به تعداد کمی در غلاف آلت تناسلی موضع میگیرد، در حالیکه به تعداد زیادی روی فورنیکس آلت تناسلی (انتهای داخلی آلت تناسلی) و در رأس آن یافت می شود. عفونت با تولید اسپرم (اسپرما توژنز) و قدرت جفتگیری تداخلی ندارد. در گاو ماده، تریکوموناس 12 تا 19 روز پس از جفت گیری به تعداد زیادی در واژن یافت می شود که از آن به بعد تعداد و فعالیت تریکوموناس ها در ارتباط با سیکل فحلی و مرحله آبستنی است.

بیماری زایی

چسبیدن تک یاخته به سلول میزبان، اولین قدم در ایجاد عفونت است که برای چسبیدن نیاز به pH: 6-7/5 (که pH طبیعی واژن گاو است)، دارد. همچنین این ارگانیسم به سلول هایی که بسیار کراتینه هستند می چسبد (این سلول ها در زمان فحلی در واژن فراوان هستند). پس از چسبیدن به واژن، جرم به رحم و لوله های رحمی گسترش می یابد و سبب ایجاد واکنش های التهابی می شود. تریکوموناس ها در بین دوره های فحلی در رحم باقی می مانند و بدون اینکه با از بین رفتن جسم زرد تداخل داشته باشند، مانع از لانه گزینی تخمک گشوده شده و باعث کاهش باروری می شوند.

تمام تخمک های گشوده از بین نمی روند و بعضی لانه گزینی کرده و تکامل می یابند. همچنین تعدادی از آن ها در زمان هایی بین 3 هفته تا 7 ماه سقط می شوند. در تعداد کمی از موارد، فتوس در رحم می میرد و گندیده شده و پیومترا (تجمع چرک در رحم) با باقی ماندن جسم زرد عارض می شود. مقاومت نسبت به عفونت مجدد، ممکن است به علت تولید موضعی پادتن در دستگاه تناسلی ایجاد شود. در ماده گاو این ایمنی موقتی است و 9 تا 15 ماه بعد، دام دوباره به عفونت حساس می شود.

همه گیر شناسی

تریکوموناس تنها از راه مقاربت انتقال می یابد و گاو نر آلوده در هنگام جفت گیری با احتمال 90 درصد دامهای ماده را آلوده می کند. بیشتر گاو های نر به طور دائمی آلوده باقی می مانند، مگر آنکه به طور کامل درمان شوند، ولی بسیاری از گاو های ماده به خودی خود بهبود پیدا میکنند. چون تعدادی از گاو ها برگشت مکرر به فحلی دارند، گاو های نر دیگر نیز در صورت جفت گیری آلوده می شوند. گاو های نر پیر حساسیت بیشتری دارند و گاو های نر جوان 1 تا 2 ساله حساسیت کم تری به بیماری دارند. آلودگی ممکن است از طریق وسایل آلوده و غیر بهداشتی، هنگام تلقیح یا معاینه دستگاه تناسلی ایجاد شود.

علائم بالینی

علامت اصلی تریکوموناس در گاو ها، نا باروری با افزایش معنا دار فاصله گوساله زایی است و علت این امر، مرگ زودرس جنین در 50 تا 100 روزگی اول آبستنی است. دامپرور اغلب شکایت می کند که حیوانات گله، برگشت مکرر به فحلی داشته و سیکل های نا منظم دارند. اگر آبستنی ادامه یابد، منجر به سقط در ماه های پایین آبستنی می شود. بیشتر گاو هایی که جنین خود را بیشتر از چهار ماه نگه می دارند، گوساله زنده به دنیا می آورند. در کمتر از 10 درصد گاو ها، تجمع چرک در رحم پس از جفت گیری ایجاد می شود، در نتیجه این دامها فحل نخواهند شد و در صورتی که درمانی انجام نشود، عارضه تا ماه ها باقی می ماند.

در گله هایی که برای اولین بار آلوده می شوند، بیشتر گاو ها و تلیسه ها حساس هستند. در گله های با آلودگی مزمن، بیشتر گاو ها ایمنی اکتسابی دارند اما تلیسه هایی که به تازگی زایمان کرده اند حساس هستند و در صورتی

که جفت گیری کنند علائم مشخص عفونت را نشان می دهند. بافت جفت گاو اغلب به وسیله تریکوموناس مورد هجوم قرار می گیرد. در گاو های نر تازه آلوده شده، ممکن است تورم غلاف قضیب یا التهاب پوست و سر آلت تناسلی (بالانوپوستیت) خفیف ایجاد شود که از نظر بالینی قابل تشخیص نیست. گاو های نری که مبتلا به شکل مزمن بیماری هستند، هیچ جراحی را نشان نمی دهند.

خطر بیماری مشترک

انواع مختلفی از تریکوموناس ها وجود دارند به عنوان مثال تری تریکوموناس واژینالیس که عامل بیماری مقاربتی انسان، در دستگاه گوارش دامهای اهلی یافت می شود. اما تریکومونیاژیس جزء بیماری های مشترک بین انسان و دام (زئونوز) محسوب نمی شود.

کنترل و پیشگیری

برنامه ریزی هایی که جهت حذف آلودگی در گله صورت می گیرند، باید بر مبنای جلوگیری از انتقال آلودگی از گاو نر به حیوانات ماده باشد. انجام آزمایش های تشخیصی در گاو های نر، قبل از استفاده از آن ها برای اسپرم گیری، احتمال انتشار بیماری را کاهش می دهد. علاوه براین، استفاده وسیع از تلقیح مصنوعی در کاهش شیوع بیماری مؤثر می باشد. گاو های مورد استفاده برای تلقیح مصنوعی، باید از گله های عاری از بیماری انتخاب شوند. همچنین این دامها باید قرنطینه شوند و دو تا سه بار آزمایش کشت و آزمایش میکروسکوپی در مورد آن ها صورت گیرد. علاوه براین، هر شش ماه یکبار نیز آزمایش گاو های نر مراکز تلقیح مصنوعی برای تأیید عاری بودن از بیماری لازم است.

تک یاخته با آنتی بیوتیک های موجود در اکستندر منی از بین نمی رود و اگر گاو نری در مرکز تلقیح مصنوعی آلوده تشخیص داده شد، تمام اسپرم های تهیه شده از آن گاو باید معدوم شده و یا حداقل تا زمانی که نتیجه آخرین آزمایش این گاو ها منفی شود، اسپرم آن ها معدوم شود. حذف دامهای آلوده، تلقیح مصنوعی، تقسیم گله به دو بخش پاک و آلوده (گله پاک شامل تلیسه های جفت گیری نکرده و گاو های ماده ای است که در معرض گاو های نر آلوده قرار نگرفته اند می باشد و گله آلوده، شامل دامهایی است که باید حذف شوند) و استراحت جنسی 90

روژه گاو های مشکوک (ضمن اینکه جداسازی نیز باید در مورد این دامها صورت بگیرد)، مهم ترین روش های پیشگیری از آلودگی محسوب می شوند. واکسن سلولی تریکوموناس کشته در ماده کمکی روغنی، گاو های نر جوان را ایمن می کند. مقاومت ایجاد شده در گاو نر نسبت به تریکومونیاژیس 2 تا 5 سال است. دو واکسن با فاصله 21 روز از نوع واکسن های تمام پیکر تک یاخته بسیار مؤثر می باشد.

درمان

به طور معمول، درمان گاو های ماده مؤثر نیست و لزومی ندارد چون اغلب در صورت استراحت جنسی به عفونت غالب می شوند. گاو های ماده ای که برگشت مکرر به فحلی دارند، پس از برقراری چند سیکل فحلی از عفونت پاک می شوند، برقراری استراحت 90 روزه به چنین دامهایی امکان بهبودی را می دهد. گاو های ماده ای که سقط می کنند یا آن هایی که تا پایان آبستنی پیش می روند، به سرعت خود را از عفونت پاک می کنند و این امر اغلب در اولین فحلی پس از زایمان یا سقط ایجاد می شود.

تجویز پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ به گاو هایی که دارای چرک در رحم هستند (پیومتر)، می تواند به خروج مایعات چرکی و برقراری سیکل کمک کند، با وجود این عفونت تریکوموناس می تواند با عود پیومتر باقی بماند. درمان به کار رفته در گاو نر با موفقیت نسبی شامل درمان موضعی آلت تناسلی با تری پافلاوین و تجویز خوراکی ایمیدازول ها بوده است. چندین فراورده ایمیدازول برای مثال مترونیدازول به صورت خوراکی یا عمومی به کار رفته و در از بین بردن این میکروارگانیسم مؤثر بوده است. مترونیدازول به صورت داخل وریدی (100 mg/kg) در روز برای 20 روز متوالی یا 75 mg/kg در روز برای 3 درمان متوالی)، در درمان تریکومونیاژیس مؤثر است. ایپرونیدازول در آب مقطر یا سرم فیزیولوژی از 10 تا 30 گرم به صورت تزریق داخل عضلانی عمیق، بر علیه تریکومونیاژیس گاو نر تأثیر داشته است. اثرات ایپرونیدازول در صورتی که حیوان 2 تا 4 روز قبل از تجویز، با آنتی بیوتیک (یک تزریق تتراسیکلین طولانی اثر یا 2 تا 3 روز پنی سیلین استرپتومایسین) درمان شود، بیشتر خواهد شد، زیرا میکروکوکوس های غلاف قضيیب ممکن است ایپرونیدازول را متابولیزه و غیر فعال کنند و سبب کاهش اثر دارو روی تریکوموناس فتوس شوند.

استفاده از چند روش درمانی اثرات بیشتری خواهد داشت. تزریق 30 گرم از دارو در روز اول و به دنبال آن 15 گرم در روز دوم و سوم اثرات درمانی خوبی دارد. در برخی از گاو های نر دو یا سه دوره درمانی لازم است تا حیوان به طور کامل پاک شود. سایر ایمیدازول ها مثل دی متریدازول از راه خوراکی و به میزان 50 میلی گرم در کیلوگرم در روز در گاو نر مؤثر می باشد. اما هزینه درمانی بسیار زیاد است و به علت بد مزه بودن، خوراندن دارو باید با کپسول یا لوله معدی انجام شود. عوارض جانبی این دارو ها شامل بی اشتهاپی و نفخ است. ایمیدازول ها میکروب های بی هوازی و تک یاخته ها را از بین می برند، اما ممکن است میکروارگانیسم های مهم شکمبه را نیز از بین ببرند. در این موارد، تغذیه با علوفه خشبی می تواند از کاهش حرکات شکمبه جلوگیری کند. تریکواستاتین A آنتی بیوتیک مؤثر علیه تریکوموناس فتوس است. آنتی سرم گاوی ضد تریکوموناس فتوس مانع از چسبیدن و سبب آگلوتیناسیون تریکوموناس فتوس زنده می شود بنابراین جلوگیری از چسبندگی به وسیله آنتی سرم گاوی میتواند از تجمع و تهاجم انگلی جلوگیری کند.

جمع آوری نمونه

می توان نمونه ها را از مایعات جنینی و محتویات معده فتوس تازه سقط شده تهیه کرد. اگر فتوس قابل دسترس نباشد، می توان از موکوس مهلبی گاو های مظنون استفاده نمود. موکوس را می توان با اسپیکلوم و یک قاشقک و یا با سرم فیزیولوژی شست و شو و جمع آوری کرد. در این حالت نمونه هایی که بیشتر جواب مثبت می دهند عبارت اند از:

- 1- گاو ها و تلیسه هایی که در خلال دوره پیش فعلی (پرواستروس) هستند (یک هفته قبل از فعلی که گردن رحم شل است)
- 2- گاو ها و تلیسه هایی که 7 تا 21 روز قبل، برای اولین بار در معرض عفونت قرار گرفته اند.
- 3- گاو ها یا تلیسه هایی که ترشحات موکوسی چرکی دارند، یا در معاینه رکتال، مشخص شده است که چرک در رحم آن ها وجود دارد.
- 4- گاو های آبستن 3 تا 5 ماهه

علاوه بر این، با شست و شوی واژن یا با خراش دادن گردن رحم با استفاده از پیپت تلقیح مصنوعی یا برس فلزی می توان نمونه ها را تهیه کرد. همچنین می توان از مواد غلاف آلت تناسلی گاو های نر نمونه گیری کرد. ترشحات غلاف قضیب را می توان با پی پت تلقیح مصنوعی، لاواژ غلاف قضیب، شست و شوی واژن مصنوعی بعد از جمع آوری منی یا با وارد کردن سرم فیزیولوژی و شست و شو دادن غلاف آلت تناسلی جمع آوری کرد.

باید مراقبت نمود که نمونه ها به مدفوع آلوده نشوند، چراکه امکان دارد تک یاخته های روده در مدفوع موجود باشند و ما را دچار اشتباه کنند. برای جلوگیری از آلوده شدن نمونه ها، باید ناحیه فرج تمیز شود، اما نباید برای این کار از مواد ضد عفونی استفاده گردد چراکه این کار تشخیص عامل را با مشکل مواجه می کند. نمونه ها را باید در کمتر از 24 ساعت به آزمایشگاه ارسال کرد و از محیط انتقالی که حاوی آنتی بیوتیک است باید استفاده نمود. در زمان ارسال باید توجه نمود که نمونه ها در معرض نور قرار نگیرند و دمای بسته ارسال نمونه بالای 5 درجه سانتی گراد و زیر 38 درجه سانتی گراد باشد.

تشخیص جرم با بررسی مستقیم یا به وسیله کشت دادن:

یک روش تجربی جهت تشخیص تریکومونیاژیس، به عنوان عامل مشکلات تولید مثلی در یک گله، بر اساس اخذ سابقه بالینی، سقط زود هنگام، بازگشت به فعلی یا چرخه استروس نامنظم، می باشد. تأیید آلودگی بستگی به تشخیص ارگانیزم در مایع جفت، محتویات شیردان جنین سقط شده، نمونه های به دست آمده از شست و شوی رحم، ترشحات پیومترا، موکوس واژن یا ترشحات قضیب گله آلوده دارد. مطمئن ترین نمونه ها برای تشخیص، مواد حاصل از شست و شو یا تخریش قضیب و واژن می باشد.

تعداد ارگانیزم ها در شرایط مختلف، متفاوت است. به طوری که تعداد آن ها در جنین سقط شده، در رحم (چند روز پس از سقط) و گاوی که به تازگی عفونی شده است، زیاد می باشد. همچنین 12-20 روز پس از آلودگی، تعداد این اجرام در موکوس واژن، بسیار زیاد است. در گاو نر آلوده، T.foetus در مخاط پرپیوس و پنیس حضور داشته و به بافت زیر مخاطی هجوم نمی برند. معمولاً توصیه می شود که 1 هفته پس از آخرین جفت گیری از غلاف قضیب نمونه برداری شود.

سارکوسیستوزیس

گونه های جنس سارکوسیستیس از تک یاخته های انگلی، از شاخه Apicomplexa و خانواده سارکوسیستیده هستند که دارای چهار جنس می باشند. در ارتباط با همه اعضای این خانواده، اووسیت هایی که از بدن میزبان اصلی دفع می شود از نوع ایزوسپورایی هستند به این معنا که دارای 2 اسپوروسیت هستند، که در داخل هریک از آن ها 4 اسپوروزویت قرار می گیرد. تمامی این انگل ها 2 میزبان هستند که در مورد همگی آنها انواع گوشتخواران و به خصوص سگ و گربه به عنوان میزبان اصلی و طیف وسیعی از علف خوران و همچنین انسان به عنوان میزبان واسط مطرح هستند. واژه سارکوسیستوزیس به طور کلی برای توصیف مرحله تکثیری از یک عفونت سارکوسیستیس در میزبان واسط استفاده می شود. در حالیکه مرحله مزمن عفونت که با دوام سارکوسیست ها در بافت های عصبی یا عضلانی تشخیص داده می شود، به طور رایج سارکوسپورید یوزیس نامیده می شود.

سارکوسیستیس شکل کیستیک تک یاخته است که به شکل اتفاقی ممکن است در عضلات مخطط و قلبی بسیاری از گونه های حیوانی از جمله گاو، گوسفند، بز و بسیاری از علفخواران دیده شود که کیست حاوی مرحله عفونت را به نام برادی زویت می باشد. عفونت های شدید به این انگل میزان رشد را در دامها کاهش می دهد و می تواند باعث سقط جنین در دامهای آبستن شود. بیشترین زیان اقتصادی مربوط به سارکوسیست هایی است که ایجاد کیست های ماکروسکوپیکی می کنند چراکه در این صورت بخش های بیشتری از گوشت باید حذف شود.

بیماری زایی

تمام گونه های سارکوسیستیس چرخه زندگی مشابهی دارند. میزبان اصلی (قطعی) این بیماری سگ و گربه است که با بلعیدن بافت های میزبان واسط که محتوی کیست های بالغ است، آلوده می شوند. درون معده این حیوانات، بافت خورده شده هضم می شود، سپس دیواره کیست گسسته شده و هزاران برادی زویت بیرون می ریزد. برادی زویت ها روده کوچک را آلوده می کنند و در آنجا تشکیل اووسیت کوکسیدیایی می دهند سپس اووسیت برای آزاد کردن اسپوروسیت ها اسپوروله می شود که وارد مدفوع شده و محتوی اسپوروزویت عفونی می گردد. دفع اووسیت ها یا اسپوروسیت ها ممکن است برای چندین هفته ادامه یابد، از این رو میزبان های قطعی در برابر آلودگی مجدد ایمن نمی شوند.

علاوه بر این، اسپوروسیست ها مقاوم هستند و می توانند برای ماه ها در محیط زنده بمانند. میزبان واسط از طریق بلع اسپوروسیست هایی که آب و غذایشان را آلوده کرده است، مبتلا می شود. اسپوروسیست ها کیست خود را در روده از دست داده و اسپوروسیست های رها شده به دیواره روده نفوذ می کنند، در این حالت عفونت را در سلول های اندوتلیال شریان های کوچک و مویرگ ها بنا می نهند. در این مناطق انگل ها به مروزوآیت تغییر شکل داده و متحمل دو زایش از نوع تولید مثل جنسی (مروگونی) می شوند. پس از دومین زایش مروگونی، مروزوئیت ها به سلول های عضلانی مخطط حمله می کنند و شروع به تشکیل سارکوسیست می کنند.

سارکوسیست ها به تدریج بالغ می شوند و رشد می کنند تا سرانجام حاوی هزاران برادی زوئیت باریک و هلالی شوند. فقط سارکوسیست های بالغ برای میزبان نهایی عفونی هستند. یک همبستگی قوی بین تعداد اسپوروسیت های بلعیده شده و شدت بیماری وجود دارد. در مواردی که میزبان اصلی گربه می باشد، بیماری زایی در میزبان واسط کمتر خواهد بود و همچنین کیست هایی که در اندام های مختلف و به خصوص سلول های عضلانی ایجاد می کند بزرگ هستند و به همین دلیل در کشتارگاه با چشم غیرمسلح نیز روی عضلات دیده می شوند. اما در مورد سارکوسیستیس هایی که میزبان اصلی آن ها سگ است بیماری زایی در میزبان واسط شدید است و کیست هایی هم که ایجاد می شوند کوچک هستند و لذا به صورت ماکروسکوپی دیده نمی شوند.

همه گیر شناسی

منبع عفونت، مدفوع گوشتخوار است. در وحله اول سگ ها و گربه ها که از گوشت خام تغذیه کرده اند یا سایر گوشتخوارانی که با لاشه نشخوارکنندگان مواجهه داشته اند، آلوده می شوند، بدین صورت که میزبان اصلی (گوشتخوار) با خوردن بافت آلوده میزبان واسط، به سارکوسیست بالغ آلوده می شود. انگل ها پس از تکثیر در دستگاه گوارش گوشتخوار، از طریق مدفوع وارد محیط شده، میزبان واسط نیز از طریق خوردن اسپوروسیت های موجود در آب و غذا، آلوده می شود. بنابراین، حضور گربه ها در گله، منبع مهمی برای آلودگی دامها محسوب می شود و گربه ها می توانند با آلوده کردن علوفه و سایر مواد غذایی، عفونت را به دامها منتقل کنند.

حضور سگ گله نیز، احتمال بروز بیماری همراه با علائم بالینی را در دامها افزایش می دهد. علاوه بر این، افزایش میزان آلودگی به این بیماری می تواند باز تاب دهنده آلودگی شدید مراتع به وسیله سگ ها باشد. خطر ابتلا به

سارکوسیتوزیس با بالا رفتن تراکم گله زیاد می شود. مشخص شده است، گاو های گله ای که همزمان با گوسفند ها در یک مرتع چرا می کنند، بیشتر از گاو هایی که به تنهایی چرا می کنند آلوده می شوند. احتمال انتقال تک یاخته از طریق جفت مخصوصاً در گاو وجود دارد.

بیماری در گوسفند و بز

سارکوسیتوزیس در گوسفند و بز نسبت به گاو از اهمیت کم تری برخوردار است و در بیشتر موارد باعث بروز علائم عصبی در این دامها می گردد. بیماری زا ترین گونه سارکوسیت در گوسفند ها S.tenella است. از جمله علائم این بیماری تب (در روز های اول)، بی اشتهایی، کم خونی، لاغری و در برخی موارد سقط جنین می باشد. علاوه براین، ضعف عضلانی، لرزش، کاهش رشد پشم در گوسفند و نارسایی احتقانی قلب (CHF) همراه با عفونت اندوکارد و میوکارد نیز ممکن است در دامهای آلوده مشاهده گردد. گاهی در اثر ابتلا به بیماری، مری عملکرد طبیعی خود را از دست می دهد و در نتیجه این دامها غذای خود را بر می گردانند.

بیماری در گاو

علائم مذکور در گاو با شدت بیشتری همراه است و حتی در صورت عدم درمان ممکن است حیوان در عرض یک ماه تلف شود. یکی از علائم این بیماری در گاو که علامت قابل توجهی است، دم موشی (rat tail) می باشد. در این حالت مو های دم گاو به طوری می ریزد که به دم موش شباهت پیدا می کند، همچنین آلودگی به این تک یاخته می تواند باعث کاهش میزان شیر در گاو های شیری، تنگی نفس (که ممکن است به علت حضور شیزونت ها در ریه ایجاد شود)، لنگش، انقباض ناگهانی عضلات و افزایش بزاق گردد. علائم بالینی سارکوسیتوزیس حاد در گاو شامل تب، ریزش بزاق، بزرگ شدن گره های لمفاوی، کم خونی و سقط جنین می باشد. البته این شکل از بیماری در گاو به ندرت منجر به بروز علائم بالینی می گردد.

کالبد گشایی

مشاهدات کالبد گشایی در دامهای تلف شده در اثر این بیماری می تواند شامل لاغری، لمفادنوپاتی، عفونت سم، کم خونی و آسیت باشد اما شاخص ترین علامت، خونریزی های پتشی و اکیموز در سراسر بدن است. زخم و خراشیدگی در محوطه دهان و مری (احتمالاً به دلیل تخریش های ریز در عروق) مشاهده می شود. حضور شیزونت ها در سلول های اندوتلیال سراسر بدن، ادم، خونریزی در قلب، مغز، کبد، کلیه، ریه و عضلات مخطط از دیگر علائم کالبد گشایی در دامهای آلوده می باشد.

خطر بیماری مشترک

سارکوسیتوزیس جزء بیماری های مشترک است و انسان در چرخه زندگی این تک یاخته به عنوان میزبان اصلی مطرح است. آلودگی در انسان به واسطه گونه *bovihominis* ایجاد می شود، که در اثر مصرف گوشت گاو آلوده موجب ایجاد بیماری در انسان می گردد. البته بیماری در انسان شدید نیست و علائمی همچون تهوع، اسهال و استفراغ مشاهده می شود. در برخی کتب این نظریه مطرح شده است که انسان می تواند به عنوان میزبان واسط هم ایفای نقش کند.

کنترل و پیشگیری

به منظور پیشگیری از این بیماری، باید از ورود گوشت خواران (سگ و گربه) به دامداری و محل نگه داری دامها جلوگیری شود و در صورت نگه داری این حیوانات در دامداری، باید از گوشت پخته برای تغذیه آن ها استفاده نمود. جفت و لاشه ها باید به گونه ای معدوم شوند که میزبان های اصلی نتوانند آنها را مصرف کنند و آب و غذا باید به گونه ای نگهداری و حفظ شود که به مدفوع آلوده نشود، یا حداقل آلودگی را پیدا کند. گاو های آلوده باید مشخص و از گله خارج شوند و وارد شدن تلیسه های آلوده به گله باید محدود شده و یا از آن جلوگیری به عمل آید.

درمان

درمان این انگل بسیار مشکل است. اما در میان داروهای موجود، آسپرولیوم و سالینومایسین می توانند علائم را کاهش دهند. آسپرولیوم با دز 100mg/kg ، می تواند پاسخ مناسبی ایجاد کند. اما دوره درمان با آن بسیار طولانی است و گاهی تا 1 ماه به طول می انجامد. علاوه بر این ترکیبی از آسپرولیوم و هالوفوژنیون می تواند مفید باشد و پاسخ مناسبی ایجاد کند.

جمع آوری نمونه

نمونه های بافت شناسی: نمونه ثابت شده از قلب، عضله اسکلتی (از چندین ناحیه مثل زبان، عضله جوشی)

علل قارچی سقط جنین

سقط جنین قارچی

کپک ها و مخمر های مختلفی در سقط جنین گاو دخالت دارند. اغلب این عوامل، قارچ های ساپروفیت هستند که در محیط های زنده مرطوب شامل خاک، یونجه و سیلو های کم کیفیت، یافت می شوند. در تعدادی از بررسی ها، عوامل قارچی متداول ترین عوامل سقط جنین گاو تشخیص داده شده اند. آسپرژیلوس فومیگاتوس متداول ترین عامل قارچی جدا شده از 60 تا 80 درصد سقط های قارچی است. سایر گونه های آسپرژیلوس شامل آسپرژیلوس فلاوس، آسپرژیلوس ترائوس و آسپرژیلوس نیدولنس، دخالت کم تری دارند.

زایگومیست ها دومین گروه متداول اند که شامل آبسیدیاکوریوم بی فرا، آبسیدیا راموزا، مورتیلرا ولفی، رایزوموکورپوسیلوس و رایزوپس آرمیزوس است. سقط جنین های ناشی از آسپرژیلوس ها و زایگومیست ها در برخی مناطق به عنوان عامل اصلی شناسایی شده اند، اما در اکثر مناطق ایجاد سقط های انفرادی می کنند. پزودولشربایویدی عامل دیگری است که کم تر متداول است. گونه هایی از پنسیلیوم، قارچ های پوستی مثل کورولاریس ژنی کولاتا، اکزوفیلا جینسلمی و وانگیلا درماتیدیس، مخمر ها، به طور معمول جنس کاندیدا یا تورولوپسیس از مهم ترین ارگانیزم های قارچی درگیرند. تعدادی از گزارش ها نشان داده که سقط های مورتیلرا ولفی به دنبال سیلو کردن غیر استاندارد، به ویژه ناکافی بودن زمان نگهداری (تخمیر)، نکوبیدن خوب یا نپوشاندن خوب سیلو، ایجاد شده است.

بیماری زایی

تنفس غبار حاوی عوامل قارچی، راه مشخص ورود قارچ به بدن است و کانون های اولیه ای در ریه ایجاد می شود، اما اعتقاد بر این است که ورود از راه دستگاه گوارش متداول تر بوده و قارچ ها در شیردان و روده ها سبب بروز زخم هایی می شود و گسترش خونی از این نقاط به تمام اعضای بدن به ویژه طحال، کبد، شش و جفت دام آبستن رخ می دهد. فقط جفت مورد هجوم قرار می گیرد و باروری بعدی از بین نمی رود. به هر حال، دستگاه های گوارش و تنفس، متداول ترین راه های ورود قارچ هستند.

اگرچه اغلب کونیدیای قارچی که به قسمت های پایینی دستگاه تنفس می رسند، در همان جا می مانند یا از بین می روند، اما تصور می شود که تعدادی از آن ها ممکن است وارد ریه شده و از راه گردش خون عمومی به جفت برسند. عفونت های شکمبه، زخم های شیردان و جراحات های روده ها نیز ممکن است از عوامل مستعد کننده ورود به خون و رسیدن آن ها به شاخ آبستن باشند، که شاید به علت تسریع نفوذ آن ها از سد های مخاطی است.

به نظر می رسد راه خونی اولین راه ورود عفونت به جنین باشد، زیرا جراحات ها ابتدا در پلاستوم جفت رخ می دهند. زمانی که عفونت ایجاد شود، از یک نقطه به جوانب گسترش می یابد و به نواحی بین کوتیلودونی می رسد. پوست و ریه های رویان نیز در ابتدا مبتلا شده و گاهی اوقات مغز یا کبد نیز مبتلا می شوند. عفونت بالا رونده از دستگاه تناسلی ایجاد نمی شود، تا به عنوان یک راه متداول برای ورود آن باشد. تصور می شود پنومونی که به دنبال سقط در آلودگی مورتیلرلا ولفی رخ می دهد، به علت چرخه ریه - رحم - ریه باشد. اگرچه محل اولیه ورود ناشناخته است، احتمال دارد که اسپور ها از راه دستگاه گوارش وارد شده و سپس از راه عروق یا سیستم لمفاوی به ریه می رسند و بعد در کارنکول جفت موضعی می شوند. بعد از سقط، تعداد زیادی از عوامل قارچی از رحم جذب شده و سبب پنومونی آمبولیک حاد چند کانونی ناگهانی در گاو می شوند. این حالت به طور مشخص 2 تا 4 روز بعد از سقط رخ می دهد.

علائم بالینی

اغلب سقط های قارچی بین 6 تا 8 ماهگی رخ می دهد، اگرچه شاید در دو ماهگی نیز اتفاق بیفتد. رویان پس از آلودگی با گونه های آسپرژیلوس خیلی سریع دفع می شود با وجود این، زمانی که قارچ زایگومیست سبب سقط شده باشد، ممکن است رویان تا 24 ساعت نیز در رحم باقی بماند. به علت تماس شدید جفت با رحم ممکن است جفت ماندگی و عفونت ثانویه نیز ایجاد شود. کارنکول های مادری ممکن است از قاعده کنده شده و در حالیکه هنوز به کوتیلودون ها چسبیده اند، دفع شوند. این حالت به ویژه زمانی که سقط جنین، زایگومیستی است، دیده می شود.

اگر آسیب شدید آندومتر رخ ندهد، اغلب گاو ها به حد کافی بهبود یافته و آبستنی بعدی به وقوع می پیوندد. حدود 25 درصد گاو های آلوده با مورتیلرلا ولفی، سقط جنین می کنند و پنومونی پس از سقط را نشان می دهند، که گاو

های مبتلا تنفس سریع و سطحی و بازدم شدید دارند، مرگ اغلب پس از 72 ساعت از شروع علائم رخ می دهد. علائم پنومونی به ندرت قبل از سقط مشاهده شده است.

علائم کالبدگشایی

التهاب شدید جفت یا نکروز کوتیلودون ها و چرمی و قطور شدن بین کوتیلودون ها، متداول ترین یافته های ماکروسکوپی در سقط جنین های قارچی است. کوتیلودون ها حالت فنجان قهوه یا شکل فنجان دارند، علت آن قطور شدن حواشی کوتیلودون ها است که در تماس بافت های نکروز کارنکول ها بوده اند. التهاب مزمن جفت منجر به بزرگ شدن، قهوه ای شدن و شکننده شدن کوتیلودون ها می گردد همچنین غشاء بین کوتیلودونی چرمی شکل شده و توسط اکسودای قهوه ای رنگی پوشیده می شود. در موارد نادر می ممکن است پرده آمیون ضخیم و چرمی شده و به رنگ سفید، قهوه ای یا زرد مشاهده می شود که این علائم مشابه یوروپلازما دای ورزوم می باشد. با وجود اینکه جراحات های ماکروسکوپی جفت در سقط قارچی به طور کامل مشخص است، اما گاهی اوقات این جراحات ها به سایر عفونت های موجد سقط مثل بروسلوز و کمپیلوباکتریوز مقاربتی نیز شبیه است.

تقریباً در 25 درصد موارد، جراحات های پوست رویان وجود دارد. جراحات ها به شکل گرد برجسته و خشن تا حدودی شبیه جراحات های کچلی است. نواحی اطراف چشم ها و روی سر، شانه ها، پشت و پهلوی ها بیشتر مبتلا می شوند. جراحات های پوست در آلودگی با اسپرژیلوس خشک و چروکیده است، اما زمانی که زایگومیسست ها عامل هستند، ظاهر مرطوبی دارد. از جمله جراحات پوست جنین شامل درماتیت است و پلاک های کوچک، سفید و برجسته بر روی پوست جنین و بیشتر در اطراف گردن و شانه مشاهده می شود. رویان ممکن است لاغر و دهیدراته باشد و ممکن است همه پوست رویان جراحات های چروکیده داشته باشد.

همه گیر شناسی

سقط های قارچی به شکل انفرادی رخ داده و به ندرت بیش از 10 درصد گاو های آبستن یک گله مبتلا می شوند، اما در گله هایی که در فصل زمستان دامها را در مرتع نبرده و در جای بسته نگهداری می کنند، ممکن است تا 30 درصد سقط های گله نیز به این علت باشد، زیرا محیط به شدت با اسپور کپک های یونجه و سیلو آلوده شده است.

کنترل و پیشگیری

مدیریت در کنترل بیماری نقش مهمی دارد. استفاده از تهویه مناسب می تواند احتمال آلوده شدن با کونیدی های قارچ ها را کاهش می دهد. پرهیز از تغذیه دامها با یونجه های مرطوب یا سیلو های کم کیفیت، در پیشگیری از آلودگی و سقط در دامهای آبستن اهمیت دارد.

درمان

استفاده از ضد قارچ ها در گاو های سقط کرده خیلی مؤثر نمی باشد، البته در پیشگیری از آسیب های اندومتر (که باعث جفت ماندگی و عفونت های ثانویه می شود) اهمیت دارد.

جمع آوری نمونه

جفت مفید ترین نمونه برای تشخیص دقیق سقط قارچی است. در صورت امکان باید تمام جفت به آزمایشگاه ارسال شود، زیرا عفونت ممکن است به بخش هایی از جفت محدود شود. کوتیلودون ها یا بافت های رحم (کارنکول) نمونه های انتخابی هستند. رویان یا بافت هایی از رویان به ویژه پوست، ریه ها و محتویات شیردان نمونه های خوبی برای تشخیص به شمار می روند. در رویان آلوده به مورتیلرا ولفی، کبد و مغز متداول ترین بافت های مبتلا هستند. تخریش جفت و پوست رویان مانند محتویات شیردان بعد از اینکه در محلول هیدروکسید پتاسیم یک درصد حل شد، می تواند برای دیدن هایفای قارچ به کار رود.

علل غیر عفونی سقط جنین

در سقط جنینی که در مراحل اولیه رشد جنین رخ می دهد و یا به عبارتی در (EM) Embryonic Mortality (سقطی که در مرحله امبریونیک اتفاق می افتد) در وهله اول توجه ها به سمت عوامل عفونی می رود در حالیکه عوامل غیر عفونی احتمالاً حدود 70٪ و یا بیشتر موارد را شامل می شوند. البته این نوع سقط در حد 10٪ عدد قابل قبولی است اما متأسفانه میزان این سقط تقریباً در حدود 20-40٪ در گاو و 10-30٪ در بز گزارش شده است. این سقط ها اکثراً چند عاملی اند و تشخیص عواملشان نیز مشکل است. بنابراین با توجه به بالا بودن نرخ سقط در دام های اهلی، بررسی عوامل فیزیولوژیک و غیر عفونی آن و توجه به راههای درمانی برخی از آنها می تواند در پیشگیری این مشکل، کمک شایانی کند.

1- نقص کروموزومی:

نقص کروموزومی یکی از علل اصلی شکست آبستنی در مراحل اولیه آن می باشد. چنین ناهنجاری هایی در حدود 20٪ از کل سقط جنین ها را شامل می شوند. در وهله اول جنین ها می توانند به دلیل نقص ژنتیکی غیر نرمال باشند (خطاهایی که در میوز رخ می دهد و یا در باروری تخمک و یا تأثیر عوامل محیطی بر روی جنین) و در مراحل بعدی ممکن است محیط زندگی مادر کفایت لازم را برای حمایت یک آبستنی طبیعی نداشته باشد که این، یا به دلیل ناهنجاری های دستگاه تولید مثلی و یا الگوی هورمونی نامناسب رخ می دهد و در نهایت حتی ممکن است شرایط وراثتی مادر و جنین طبیعی باشد اما باز هم مرگ حادث شود، آن هم به خاطر آنکه رحم، محیط مناسبی برای رشد جنین نیست.

در گاو، بیماریهای ژنتیک قابل برگشت اتوزومال، وابسته به گونه اند. برای مثال یک ناهنجاری قابل برگشت اتوزومال در گاوهای هولشتاین باعث ایجاد کمبود یوریدین مونوفسفات سنتتاز (DUMPS) و کم شدن فعالیت آن در خون شده و نهایتاً کمبود این آنزیم منجر به EM می شود این آنزیم نقشی کلیدی در سنتز نوکلئوتید پیریمیدینی دارد، که جهت رشد و نمو چندین گونه نشخوار کننده و غیر نشخوار کننده ضروری است.

2- عوامل خارجی :

الف) دما

جنین از لحاظ دمایی به مادرش وابسته است. و به خاطر حفظ تعادل گرمایی (تعادل بین گرمای تولید شده و گرمای از دست رفته) دمایش را حدوداً نیم درجه از مادر خود بالاتر نگه می دارد بنابراین حتی تب خوش خیم مادر نیز می تواند برای او مضر باشد. نشان داده شده است که هرگونه استرس گرمایی سبب فعال شدن مکانیسم های تنظیم دمایی مادر می شود، در نتیجه تغییر دمایی بدن جنین بسیار ضعیف است.

روش تنظیم دمای مادر از طریق ↑(افزایش) یا ↓(کاهش) جریان خون رحمی است.

↑انتقال گرما از جنین به مادر → ↑جریان رحمی

↓انتقال گرما از جنین به مادر → ↓جریان رحمی

مطمئناً در این حالت شانت خون از رحم به محیط، سبب کاهش یافتن مواد تغذیه ای منتقله به رحم می شود.

دمای محیطی بالا در حین ماههای اولیه آبستنی سبب ایجاد اثرات مضر برروی جنین خواهد شد و هرگونه افزایش دمای داخل رحمی تأثیر مخربی را روی جنین می گذارد، با اینکه سیستم تنظیم دمای مادر خطر افزایش دما را کاهش می دهد. در گوسفند و دیگر گونه های پستانداران همراه با تغییرات دمای بدن مادر، دمای جنین نیز طبق همان الگو تغییر می یابد.

استرس گرمایی یک مشکل بسیار بزرگ علی الخصوص در گاوهای شیری پر تولید به شمار می رود که این نوع استرس سبب کاهش دریافت ماده خشک می شود. احتمال سقط در حدود 1/05 درصد به ازای هر واحد اضافی دما - رطوبت در روزهای 21-30 آبستنی افزایش می یابد اما هیچ خطری برای بقیه روزها ندارد. استرس گرمایی حاد در این دوران (21-30 آبستنی)، گاوهای آبستن را برای سقط جنین زود هنگام بعدی نیز مهیا می سازد. این نوع استرس قادر به خطر انداختن آبستنی در دوره قبل از جایگزینی جنین نیز می باشد. نکته قابل توجه این است که

رطوبت به تنهایی قادر به تخریب آبستنی نیست و استرس گرمایی نیز از روز 21-30 قادر به ایجاد سقط می باشد ولی جمع این عوامل با یکدیگر (THI: حداکثر دما و حداقل رطوبت) عامل مؤثری جهت ایجاد سقط می باشد.

تب در دوران آبستنی چه در حیوانات و چه در انسان ناگزیر شرایط گرمایی جنین را تحت تأثیر قرار می دهد زیرا که جنین از لحاظ گرمایی کاملاً به مادرش وابسته است. در بزرگسالان تب باعث ایجاد اثرات زیان بار طولانی مدت نمی شود اما در جنین سیتوکین ها و متابولیت ها از جمله $IL1, IL6, TNF\alpha$ می توانند سبب تخریب بافتی گردند زیرا در جنین، سیتوکین ها قادر به عبور از B.B.B هستند. سیتوکین ها همچنین می توانند سبب تخریب نورونی در بافت عصبی شوند و نهایتاً فلج مغزی را سبب گردند. نتیجه آنکه تب در مادر منجر به افزایش دمای مضر داخل رحمی و در جنین باعث ایجاد اثرات مخرب سیتوکین های پیش التهابی بر روی مغز شده و در نهایت مرگ جنین و سقط را به همراه دارد.

(ب) فصل سال:

تغییر و تحولات تولید مثلی در فصول گرم سال، به صورت واضحی دچار تخریب می گردند. به طور مثال در مطالعه زیر یک ارتباط قوی بین سقط و آبستنی در ماههای گرم سال دیده شده است (ماههای گرم شامل: اواخر اردیبهشت ماه تا اوایل مهرماه و ماههای سرد شامل: اواسط مهرماه تا اواسط اردیبهشت ماه است). خطر سقط جنین در گاوهایی که در ماههای گرم سال آبستن شده اند حدود $1/6$ تا $5/4$ برابر بیشتر از آنهایی است که در ماههای سرد سال آبستن شده اند و بالاترین سهم این سقط ها (حدود 54٪) مربوط به دامهای دوقلو آبستن بوده است. همچنین ارتباطی بین فصل تلقیح و سقط جنین زود هنگام وجود دارد. در کشورهای گرم مثل اسپانیا استرس گرمایی تابستانه یکی از فاکتورهای بزرگ دخیل در ناباروری و همچنین سقط محسوب می گردد.

برعکس یافته های بالا، مشاهدات در مکزیک نشان داد که درصد بالایی از سقط ها با کاهش ناگهانی در دمای محیطی همراه است که این کاهش به دلیل بارندگی یا یخ زدگی ایجاد می شود. این مشاهدات مورد تأیید پرورش دهندگان بز این منطقه نیز بوده است.

ج) سوء تغذیه:

کمبود مواد غذایی یا سوء تغذیه می تواند اثر منفی بر روی جنین داشته باشد این عامل یکی از مهمترین عوامل دخیل در ناقص الخلقه زایی و یا مرگ جنین در دوره های نخستین بارداری محسوب می گردد. سوء تغذیه و بالانس منفی شدید انرژی، ممکن است موجب تحت تأثیر قراردادن پیشرفت فولیکولی، کیفیت اووسیت و یا ترشح و تحرک اوویدوکت به عنوان محل فرآیند باروری شود. مواد غذایی در مراحل اولیه جنین را تحت تأثیر قرار می دهند. یک عدم تعادل شدید انرژی، پس از زایمان در گاوهای شیری پر محصول ممکن است کیفیت اووسیت را تحت تأثیر قرار دهد و یا ممکن است موجب بالا رفتن درصد EM پس از تلقیح دام گردد. کمبود ها علی الخصوص یک کمبود جدی در ویتامین ها مثل (ویتامین A و E) و یا دیگر مواد غذایی مثل (مس، سلنیم، روی وید) که به عنوان تنظیم کنندگان متابولیسم، مصرف می شوند می تواند منجر به مرگ جنین و القای سقط در ماههای آخر آبستنی گردد. ویا برعکس آن گاهی دریافت اضافی برخی از عناصر مشکل زا می شود.

کمبود مس:

مس عنصری ضروری برای نشخوارکنندگان محسوب می گردد و کمبود آن در حیوانات مرتعی بسیاری از مناطق دنیا رخ می دهد. کمبود مس، باعث ایجاد ناباروری در نشخوارکنندگان می شود. این عنصر در تشکیل سیستم های آنزیمی بسیاری شرکت می کند و در نتیجه کمبود آن منجر به ظهور علائم متابولیکی و کلینیکی مربوط به فقدان این آنزیم ها می شود. میزان کم مس در جیره غذایی میش ها علاوه بر جلوگیری از جایگزینی جنین سبب القای سقط جنین و یا مرگ جنین نیز می گردد. میزان مس در بزهای سقط کرده کمتر از حالت طبیعی است و وقوع بالای سقط های زودرس در این حیوانات می تواند همراه با کمبود مس باشد.

در گوسفند بالا رفتن غلظت سرمی Cu در طول آبستنی به اثبات رسیده است که علت آن افزایش سنتز سرولوپلاسمین می باشد که آن هم، ناشی از بالا رفتن استروژن در دوران آبستنی است، همچنین افزایش میزان پروژسترون می تواند غلظت مس را افزایش دهد. نتیجه کلی این که افزایش میزان استروژن و پروژسترون با یکدیگر در طول دوران آبستنی می تواند سبب یک اثر هم افزایی برای افزایش سطح Cu سرم گردد. البته وقوع

بالای سقط های زودرس علاوه بر کمبود مس می تواند به علت کمبود فسفر، منیزیم و میزان کلی پروتئین هم باشد اگرچه که در مطالعه میزان کلی پروتئین بین گروه سقط کرده و سقط نکرده تفاوتی ندارد.

کمبود سلنیم و ویتامین E:

سلنیم و ویتامین E جزء مواد غذایی ضروری هستند که در چندین روند متابولیسمی درگیر می باشند. کمبود این عناصر سبب ظهور علائم کلینیکی و متابولیسمی مشابهی در نشخوارکنندگان می گردد. وجود این عناصر در بافت همبند نقش ویژه ای را بر علیه محصولات نهایی واکنش ها و برخی از فرآیندهای اکسیداتیو بازی می کند. سلنیم جهت ساخت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز که عامل تخریب پراکسید های سمی است، مورد نیاز است و ویتامین E نیز همانند اسکوانونجری برای هر پراکسیداز عمل می کند. کمبود این عناصر سبب تحلیل ماهیچه ای و یا به عبارتی ایجاد بیماری ماهیچه سفید در نشخوارکنندگان جوان می گردد و یا اگر این ضایعه قبل از تولد باشد، باعث مرگ مادرزادی جنین شود.

سطح سرمی Se بیشتر از آنکه تحت تأثیر تغییرات فصلی باشد تحت تأثیر تغییرات فیزیولوژیک است. کمترین میزان سلنیم در گوسفند های آبستن و شیرده (علی الخصوص در دوران شیرواری) دیده می شود. علت کاهش سطح Se در این دوران ها افزایش میزان نیاز به سلنیم است که در نتیجه انتقال این عنصر از طریق جفت به جنین و یا از طریق شیر به بره صورت می گیرد. چنین رخدادی مشخص می کند که باید مکمل های سلنیم دار در این دوران ها در اختیار گوسفند ها قرار گیرد.

کمبود روی:

روی عنصری است که به طور وسیعی در سرتاسر بدن توزیع گردیده است و بالاخص در پوست، پشم، مو و شاخ تجمع بیشتری دارد. این عنصر در تشکیل بسیاری از متالوآنزیم هایی شرکت دارد که متابولیسم آراشیدونیک اسید و پروستاگلاندین ها، بالانس آب و کاتیون و پراکسیداسیون غشایی را در بر می گیرند. روی از بیماری های پوستی نظیر پاراکراتوزیز در نشخوارکنندگان جلوگیری می کند و جهت نمو بافت بیضوی در قوچ و لقاح تخم در میش ها، مورد نیاز است. در نتیجه ارتباط تنگاتنگی مابین روی و تولید مثل وجود دارد.

به طور خاص مشخص شده است که کمبود عنصر روی در گاوها سبب سقط می شود. غلظت روی پلاسما در گاوهایی که سقط می کنند کمتر از آنهایی است که سقطی انجام نداده اند. که این مورد می تواند به دلیل افزایش میزان $PGF2\alpha$ باشد که در نزدیکی زایمان رخ می دهد.

کمبود ید:

در شرایط طبیعی میزان ید مورد نیاز در جیره غذایی گوسفندان 0/8 - 0/1 Ppm است. گوسفند حیوان حساس تری نسبت به سایر گونه های مرتعی می باشد. چهار فاکتور در مورد این عنصر مهم است: اول، ید موجود در غذا و آب و خاک. دوم، مواد گواترزا مانند کلم، سویا، دانه کتان، بادام زمینی و ... که با اعمال غده تیروئید برای به دام انداختن ید و تغییر آن به مواد فعال کننده تیروئید دخالت می کنند. سوم، میزان کافی از سلنیم جهت متابولیسم مناسب ید مورد نیاز است. چهارم، عوامل محیطی مثل استرس سرمایی و فصول پر باران میزان نیاز بدن را به ید بالا می برند. کمبود این عنصر سبب رشد ناقص مغز در جنین شده و متعاقباً باعث مرده زایی بره ها می گردد. نکته قابل توجه آنکه این بره ها فاقد پوشش می باشند. علت فقدان پوشش در این حیوانات، نیاز فولیکول های ثانوی تولید پشم به فعالیت غده تیروئید و در نتیجه عنصر ید است.

افزایش کلسیم:

بالا رفتن نسبت Ca/Mg می تواند سقط یا دیگر عوامل پاتولوژیک آبستنی را به همراه داشته باشد. البته از طرفی هم غلظت بالای کلسیم سرم در میش ها علت افزایش میزان باروری در آنها ذکر می گردد و جالب آنست که در گوزن های ماده، افزایش کلسیم میزان باروری را کاهش می دهد.

افزایش اوره:

وقوع سقط از یک طرف و میزان پایین نوزاد آوری از طرف دیگر با میزان بالای اوره سرم ارتباط دارد. در گاوهای شیری غلظت اوره بالای 19 mg/dl منجر به کاهش کارایی دستگاه تولید مثلی، به دلیل مجموع عواملی مثل: تغییر PH رحم، افزایش $PGF2\alpha$ لوله رحمی و کاهش غلظت پروژسترون پلاسما در حیوانات شیرده، می گردد.

افزایش نیترات:

در نشخوارکنندگان ارتباط نزدیکی بین افزایش دریافت نیترات و سقط جنین وجود دارد. نیترات در شکمبه به شکل ساده تر آن یعنی نیتريت تبدیل شده که از طریق دیواره شکمبه قابل جذب است و بدین طریق وارد گردش خون می گردد. این ماده قادر به تبدیل هموگلوبین به مت هموگلوبین می باشد. مت هموگلوبین قادر به حمل اکسیژن نیست و در نتیجه در میزان های بالا، اکسیژن رسانی جفت به طور جدی دچار اختلال می گردد بنابراین هیپوکسی جنین و به دنبال آن مرگ جنین ممکن است رخ دهد.

نکات متفرقه:

در مجموع، عناصری مثل روی، مس و سلنیم در مقادیر بالا از مادر به جنین منتقل می شوند و بنابراین کمبود این عناصر ممکن است سبب سقط در میش ها شود. در میش های سقط کرده غلظت موادی مثل ویتامین E، سلنیم، مس، منیزیم و فسفر به طور چشمگیری کمتر از دامهای سقط نکرده است اما هیچ تفاوت قابل توجهی در مورد روی، ویتامین A و سطح کل پروتئینی در بین این دو گروه وجود ندارد. همچنین درگیری های خیلی شدید سقط در میش ها را مربوط به کمبود ویتامین E، سلنیم، مس، فسفر و منیزیم هم می دانند.

(د) استرس:

استرس عاملی است که تأثیری منفی بر روی راندمان دستگاه تولید مثلی حیوانات می گذارد. چندین مطالعه اپیدمیولوژیکی این فرضیه که شروع سقط به دلیل سطح بالای استرس است را، مورد حمایت قرار می دهند. در گاو سه ماهه اول آبستنی، دوره بسیار پرخطری است زیرا که جنین در این دوران به انواع استرس بسیار حساس است. در سه ماهه اول آبستنی، در برخورد با استرس های فیزیولوژیک، تولید سیتوکین ها بوسیله لنفوسیت های محیطی مادر تغییر می یابد. حتی استرس های متابولیکی توأم با شیردهی، قادر به تحت تأثیر قرار دادن زندگی جنین هستند عوامل استرس زا مثل حمل و نقل، جراحات مکانیکی، جدایی، درد، تغییرات فشار خون، حمله حیوانات وحشی و ... عمل دستگاه تولید مثل را تحت تأثیر قرار می دهند که این تغییر را یا از طریق اعمال اثر بر روی سطح هیپوتالاموسی (GnRH) و یا سطح تخمدانی (پروژسترون) به انجام می رسانند.

محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA)، زمانی که توسط استرس فعال می شود، دارای اثر مهار بر روی دستگاه تولید مثلی جنس ماده است. CRH ترشح GnRH را مهار می کند و گلوکوکورتیکوئیدها ترشح LH را و متعاقباً ترشح هورمونهای استروئیدی تخمدان (استروژن و پروژسترون) مهار می شود. سطوح بالای گلوکوکورتیکوئیدها علاوه بر داشتن اثرات مهار، اثرات مضر نیز بر روی رحم و جنین باقی می گذارد. به علاوه عوامل واسطه ای کلاسیک دخیل در استرس، همانند CRH، آدنوکورتیکوتروپین (ACTH)، کورتیزول یا کاتکولامین ها، فاکتور رشد عصبی نوروتروفین (NGF) یا ماده نوروپپتیدی P به عنوان تنظیم کنندگان اساسی پاسخ های آبشاری استرس شناخته می شوند.

ه) عوامل محیطی:

شرایط محیطی مثل نور طبیعی نامرغوب اصطبل ها، آب آشامیدنی نامطلوب و طرح و نقشه ساختمان، دام ها را با درصد بالایی از سقط جنین روبرو می کند که این ها معمولاً با عواملی مثل تغذیه و یا شیردهی در سطح آغل های نامناسب همراه می شوند.

گاهی علت اساسی سقط ها، استرس های مزمن ناشی از شرایط محیطی است. به عنوان مثال در گوسفند راهکارهای مدیریتی مثلاً برای زایمان، حمل و نقل، شیردوشی و پشم چینی می توانند منجر به افزایش میزان کورتیزول در پلاسما گردند.

3- عوامل مربوط به مادر:

الف) دوقلو آبستنی:

دوقلو آبستنی از دیگر علل شایع EM محسوب می گردد. از دست رفتن جنین در چنین مواردی بیش از موارد تک قلو آبستنی گزارش شده است. میزان سقط جنین در دوقلو آبستن ها 2 تا 3/7 برابر تک زهاست. 11/2 درصد از گاوهای دوقلو آبستن یکی از جنین ها و حدود 13/3 درصد از آنها هر دو جنین را از دست داده اند.

نکته قابل توجه این است که گاوهایی که دچار کیست تخمدانی و یا فقدان یک جسم زردند، بیشتر در معرض دو تخمک گذاری هستند (double ovulation) این حالت فرآیندی نامطلوب در گاو شیری به شمار می رود

زیرا علاوه بر اینکه خطر سقط جنین را افزایش می دهد سبب ایجاد تأثیرات منفی دیگری، از جمله مرده زایی گوساله، وقوع پدیده فریمارتینیسیم، سخت زایی، جفت ماندگی، درمان های پس از زایمان و افزایش مدت برگشت به تولید مثل می گردد. در گاو شیری، میزان مواجهه با دوقلو آبستنی در حدود 2/2 تا 6/9 درصد است که این میزان بیش از حد معمول افزایش داشته است. اگر رژیم غذایی و انتخاب ژنتیکی جهت تولید شیر، به همین منوال ادامه داشته باشد دوقلوزایی نیز در گاوهای شیری در حال افزایش باقی خواهد ماند.

سقط در تک قلو آبستن ها تقریباً 52 روز پس از تلقیح و در دوقلو آبستن ها در روز 75 رخ می دهد. علت بیشتر بودن زمان سقط در گاوهای دوقلو آبستن این است که گاهی ممکن است یکی از جنین ها بمیرد و در چنین شرایطی، آبستنی تا چند هفته قبل از آنکه سقطی رخ دهد ادامه یابد .

(ب) تعداد شکم زایمان (تفاوت تلیسه و غیر تلیسه):

در تحقیق انجام شده نشان داده شد که میزان سقط در تلیسه ها 2/5٪ و در گاوهای چند شکم آبستن 13٪ بوده است. البته نتایجی نیز حاکی از آن است که یک زایمان تأثیر اندکی در چگونگی پیشرفت زایمان بعدی دارد و در حقیقت تأثیر این تفاوت را اندک دانسته است. اما مطالعه دیگری هم نشان دهنده میزان کمتر سقط در تلیسه هاست، تلیسه: 4/2٪ و غیر تلیسه 10/7٪.

(ج) فضای ناکافی رحم:

فضای ناکافی رحم از عواملی است که منتهی به از دست دادن جنین می شود. حضور بیشتر از یک جنین در گاو و اسب باعث ایجاد رقابت بین جنین ها برای دسترسی به آندومتر رحم می گردد. سقط در بزهایی که دارای سه جنین و یا بیشترند، بیشتر از آنهایی است که یک یا دو جنین دارند . ممکن است تغذیه هر جنین از طریق جفت به ازای افزایش تعداد آنها کاهش یابد و این امر نهایتاً منجر به مرگ هر جنین گردد.

(د) تولید شیر

در گاوهای شیری تک قلو، رابطه ای بین تولید شیر و سقط جنین دیده شد. گاوهای تک قلو زایی که کمترین و بیشترین میزان شیر را تا نزدیک زمان تلقیح تولید کرده اند، نسبت به متوسط تولید ها، متحمل سقط بیشتری شده اند.

اما بیشتر یافته ها نشان می دهند که سقط جنین در گاوهای شیری پرتولید بیشتر از کم تولید ها است. یکی از مهمترین عوامل افزایش ناگهانی در تولید شیر بیش از حد معمول، دو قلوزایی است.

در گاوهای پرتولید که ماده خشک بیشتری مصرف می کنند، جریان خون بیشتر به سمت دستگاه گوارش است در نتیجه خون بیشتری به سمت کبد رفته و متابولیسم شدن استروئیدها را افزایش می دهد. پس در عمل، تولید شیر می تواند تأثیری منفی بر روی غلظت پروژسترون در شروع دوران آبستنی داشته باشد بنابراین می توان گفت یکی از علل سقط جنین در گاوهای پرتولید، پایین بودن میزان پروژسترون خون می باشد که این امر نه تنها نشان دادن فحلی، بلکه باروری را نیز تحت تأثیر قرار داده است همچنین سبب سقط جنین اولیه در زمانی می گردد که جفت و جنین، در حال رقابت با درناژ بزرگی از تولید شیر هستند.

تولید شیر، در شروع دوران جنینی با غلظت پروژسترون پلاسما رابطه معکوس دارد بنابراین، پیشنهاد این مورد کاملاً منطقی به نظر می رسد که یکی از عوامل افزایش سقط های اولیه در گاوهای شیری پر تولید کاهش یافتن پروژسترون است که یا در اثر افزایش کاتوبولیسم پروژسترون و یا عملکرد کم جسم زرد حاصل شده و یا در اثر هردو عامل با هم ایجاد گردیده است.

ه) سن:

افزایش مواجهه با سقط جنین در بزهای پیرتر نشان دهنده وجود عوامل غیر عفونی است. زیرا در مورد سقط های عفونی با افزایش سن گله میزان پایین می آید چرا که بر اثر مرور زمان ایمنی حاصل می شود. در بزهای آنغوره آفریقای جنوبی، با افزایش سن، سقط بالا می رود که این به دلیل تغییر حالت غده آدرنالشان می باشد (هیپرآدرنالیزم). در مطالعه انجام گرفته توسط کاسترو در گروهی از بزها که در دوره سنی 23-12 ماه بودند حدود 27/3% سقط دیده شد. پس شواهد حاکی از آن است که یکی از عوامل مهم مؤثر در سقط جنین بالا بودن سن دام است.

(و) ضربه:

ضربه وارده به جنین گاو، در پی تشخیص آبستنی بوسیله توشه رکتال و یا استفاده از اسکنر اولتراسوند ایجاد می شود و می تواند سبب از دست رفتن جنین شود. در گاو تشخیص اولیه آبستنی معمولاً بین روزهای 35-50 دوره انجام می گیرد که این روزها، زمان تکمیل تفریقی جنین است، بنابراین این خطر وجود دارد که جنین آسیب ببیند. اما تحقیقاتی نشان داد که هیچ دلیلی مبنی بر افزایش از دست رفتن جنین در آن زمان و یا کمی پس از آزمایش تشخیص آبستنی وجود ندارد. همچنین تحقیقاتی نشان داده که استفاده از اولتراسوند هیچ اثر منفی روی جنین ندارد و توشه رکتال نیز یک روش ایمن، برای تشخیص آبستنی است به شرط آنکه به صورت صحیح انجام پذیرد.

(ز) جسم زرد:

جسم زرد منبع اصلی تولید پروژسترون در طول دو دوره اول آبستنی گاو، محسوب می گردد. غلظت پروژسترون پلازما در گاوهایی که دارای دو و یا بیشتر جسم زردند تقریباً سه برابر آنهایی است که دارای یک جسم زردند. این موضوع اثرات مثبت وجود یک جسم زرد اضافه را بر روی بقای آبستنی مشخص می کند.

تأثیر مثبتی بین وجود جسم زرد اضافی و بقای آبستنی وجود دارد. اگر تعداد جسم زردها بیشتر از تعداد جنین ها باشد جسم زرد اضافی فاکتور بسیار قوی در بقای آبستنی محسوب می گردد. گاوهایی که دارای یک جسم زرد اضافی اند میزان سقط در آن ها حدود 0/32 درصد کمتر است.

(ح) شرایط بدنی و سایر شرایط غیر طبیعی:

خطر سقط جنین در گاوهایی که یک واحد افت در شرایط بدنیشان (BCS) دارند، از زمان زایمان تا حدود 30 روز بعد از زایمان 2/4 برابر بیشتر از آنهایی است که افتی در شرایط بدنیشان نداشته اند.

میزان سقط در گاوهایی که قبلاً پیومتر و یا جفت ماندگی داشته اند به ترتیب به میزان 2/6 و 1/8 برابر آنهایی است که قبلاً مشکلی نداشته اند. علت این است که جفت ماندگی یا پیومتر قبلی، قادر به تغییر محیط رحمی می باشد که می تواند منجر به سقط جنین شود. جراحات وارده به سطح موکوزال رحمی می تواند شرایط تغذیه ای و اتصال جنین را در طول دوران لانه گزینی تخریب کند.

ارتباطی که بین ورم پستان و سقط جنین وجود دارد، مثالی بر چگونگی مواجهه سیستم ایمنی بدن با یک پدیده در حال پیشرفت، در سیستم تولید مثلی است. علاوه بر این، فرآیندهای التهابی که در ورم پستان حاد و یا لنگش وجود دارند سبب بالا رفتن ترشح پروستاگلاندین ها می شوند که این رخداد سبب لوتئولیز و نهایتاً سقط جنین می گردد. البته در ورم پستان کلینیکی، بالا رفتن میزان سوماتیک سل ها نیز می تواند با سقط جنین در ارتباط باشد.

درصد بسیار کمی از گاوها (0/5٪) دچار آنومالی در آبستنی شان می گردند. این آنومالی ها شامل موارد زیر بوده است که همگی منجر به سقط در اوایل آبستنی شده اند: گاوهای تک قلو آبستنی که دارای یک جسم زرد هستند (0/3٪)، جنین در شاخه مقابل شاخه ی متعلق به جسم زرد واقع شده است (0/2٪) و آبستنی همراه با پیومتر (0/03٪).

در گاو، کیست تخمدانی قبلی و همچنین تولید شیر در زمان آبستنی و یا طول مدت open-days نمی تواند سبب سقط شود.

3.هورمون ها:

الف) گلوکو کورتیکوئید ها:

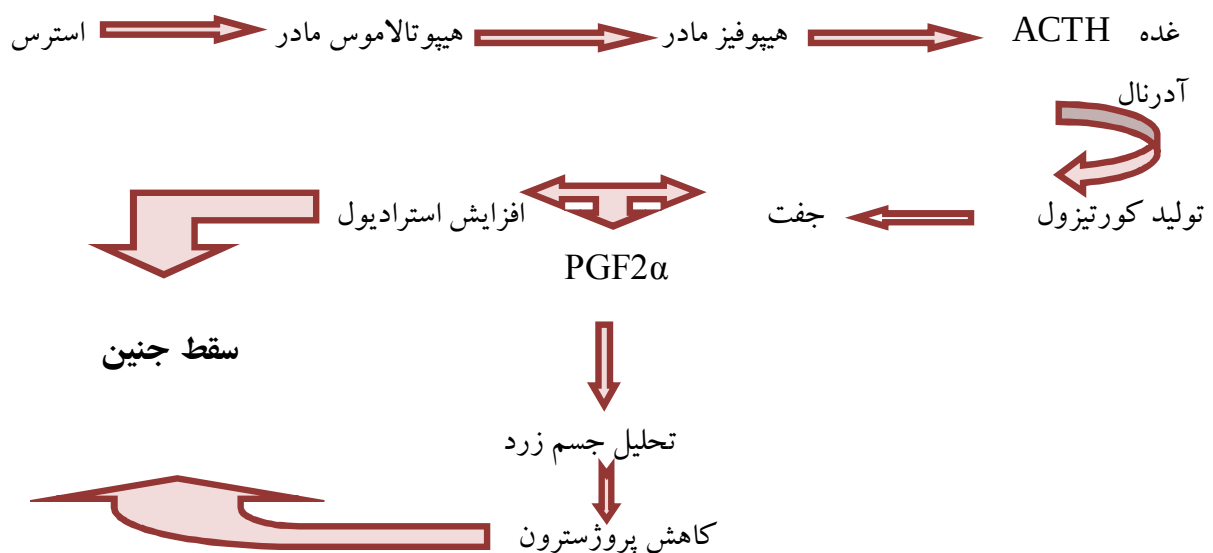
کورتیزول یک سیگنال آندوکرینی است که جنین از آن، جهت راه اندازی اعمالش استفاده می کند. افزایش ترشح ACTH توسط غده هیپوفیز قدامی سبب افزایش شدید ترشح کورتیزول از قشر غده فوق کلیوی می شود. تقریباً استرس از هر نوع که باشد، چه فیزیکی و چه عصبی، قادر به راه اندازی این سیستم است. در حقیقت کلید آغازین سقط های غیر عفونی می تواند در اثر افزایش غلظت کورتیزول باشد که توسط استرسورهای مختلفی ایجاد می گردد از جمله این عوامل، می توان به افزایش یا کاهش ناگهانی دمای محیطی، حمل و نقل، ضربات مکانیکی، جدایی، درد، حمله حیوانات وحشی، رعد و برق و... اشاره نمود.

مقادیر بالای گلوکو کورتیکوئید ها اثرات نامطلوبی را بر روی رحم و جنین بر جای می گذارد و همچنین سبب مهار هورمون LH و ترشح استروژن و پروژسترون می گردد. در بزها نیز ارتباط بین سقط غیر عفونی و افزایش کورتیزول مادری نشان داده شده است.

اگرچه همیشه درصد قابل توجهی از سقط ها منشأ نامعلوم دارند، اما برخی از دانشمندان نشان دادند که سقط های معمول در بز آنغوره (29٪) با متابولیک بالای این حیوان جهت رشد مو، نسبت مستقیم دارد که در ظاهر، با انتخاب گسترده و هم خونی تحریک می شود. در بز، افزایش متوسط میزان کورتیزول، در طول دوسوم ابتدایی آبستنی همراه با سقط جنین اولیه است. افزایش کورتیزول اولیه به علت هیپرپلازی غده آدرنال است که ایجاد اختلال می کند. البته این غدد در بز آنغوره به دلیل انتخاب حیوان برای تولید موی بلند و با کیفیت، توانمند گشته اند.

در ضمن در چندین گونه با القای گلوکو کورتیکوئیدها به جریان خون مادر و یا جنین سقط و یا زایمان زودرس ایجاد شده است.

مکانیسم عمل گلوکو کورتیکوئیدها:



(ب) استرادیول:

عمل اصلی استروژن ها ایجاد تکثیر سلولی و رشد بافت های اندام های جنسی و سایر بافت های مربوط به دستگاه تولید مثل است. البته از طرفی هم سقط جنین زودرس می تواند به دلیل غلظت زیاد استرادیول مادری باشد.

گروهی از محققین دریافتند که میزان کورتیکواستروئیدها در بزهای آنغوره سقط کرده به صورت غیرنرمالی بالاست و از طرفی هم اندازه غده آدرنالشان بسیار بزرگ است که این شرایط سبب ایجاد یک محیط نامناسب برای جنین شده و نهایتاً موجب ادماتوزه شدن جنین می گردد.

ج) پروژسترون:

پروژسترون هورمونی است که برای بقای آبستنی، ضروری می باشد. کمبود این هورمون که به دلیل عدم کفایت جسم زرد اولیه رخ می دهد به عنوان یکی از عوامل EM گزارش شده است اما خوشبختانه چنین وضعیتی مکرراً پیش نمی آید. پروژسترون نه تنها برای بقاء بلکه برای پایه گذاری آبستنی نیز حیاتی است. از اعمال آن حمایت از تخمک گذاری، حمایت از رحم و توسعه بافت پستانی، رشد جنین و توسعه آن، جایگزینی جنین و تشکیل جفت می باشد. همچنین در کنار نقش آندوکروینی اش به عنوان یک استروئید ایمنی نیز عمل می کند. پروژسترون نقش کلیدی در تعامل بین دو سیستم آندوکروینی و ایمنی بازی می کند. تنظیم خونریزی ماهانه، تعمیر بافت و نوزایی، التهاب و رگ زایی از اعمال دیگر آن می باشد.

آبستنی موفق بستگی به میزان تحمل مادر به جنین دارد. پروژسترون در طول آبستنی Tcell های اولیه بافت لنفاوی را بلوکه می کند در نتیجه آبستنی حمایت می شود. که در اینجا یک پروتئین ایمنومودولاتور به نام PIBF نیز دخیل است و همچنین وجود برخی دیگر از ایمنومودولاتورها مثل سلولهای NK نیز به اثبات رسیده است. مسیرهای ژنی و غیر ژنی، فعالیتهای بیولوژیک پروژسترون را واسطه گری می کنند. مسیر ژنی تنظیم کننده پروژسترون به دو گیرنده پروژسترونی شامل PR-A و PR-B وابسته است. PR-A و PR-B از محصولات یک ژن اند که تحت کنترل دو پروموتور مشخص ترجمه شده اند. به طور خلاصه باید گفت که فعالیت القایی پروژسترون که توسط PR-A صورت می گیرد جهت استقرار و بقای آبستنی لازم و کافی است. برعکس فعالیت القایی پروژسترون از جانب PR-B جهت القا و بقای آبستنی ناکافی است.

بعضی از مطالعات در گاو نشان دهنده وجود یک رابطه، بین سطح پروژسترون مادری و شکست آبستنی در مراحل اولیه آن می باشد. دو مورد: یکی بالا رفتن دیر هنگام پروژسترون بعد از تخمک گذاری و دیگری غلظت پائین فاز لوتئال با کاهش پیشرفت جنین همراهند. همچنین تولید ناکافی اینترفرون T از پیشرفت جسم زرد جلوگیری می کند.

بالا رفتن پروژسترون بعد از تخمک گذاری امتیاز ویژه ای است که سبب همگامی بین جنین و رحم می گردد. یک تجزیه و تحلیل کلی نشان می دهد که تأمین پروژسترون سبب پیشرفت آبستنی در حدود 5٪ موارد می گردد. حضور پیک اولیه پروژسترون (ظرف 5 روز پس از جفت گیری و یا تلقیح مصنوعی) سبب تسهیل افزایش طول دوران جنینی شده و در نتیجه سبب ترشح کافی اینترفرون τ می گردد. تنها منبع پروژسترون در طول دوران جنینی جسم زرد اولیه است. عدم کفایت جسم زرد اولیه یکی از علل مرگ جنین می باشد که به ندرت اتفاق می افتد. تیترونی پروژسترون در طول آبستنی افزایش می یابد. در مورد گاو و میش افزایش میزان پروژسترون شان به صورت بارزی بعد از نیمه آبستنی رخ می دهد. یک دوم پروژسترون موجود در پلاسما در روز 100-90 آبستنی در گوسفند از جسم زرد تأمین می شود ونیمی دیگر از جفت تأمین می گردد. تزریق دوز واحد از $\text{PGF2}\alpha$ در میش های آبستن 100-90 روزه سبب تحلیل جسم زرد می گردد اما قادر به ایجاد سقط در میش ها نمی باشد.

4-عوامل مربوط به پدر:

خصوصیات ژنتیکی مربوط به سقط جنین از پدر به جنین منتقل نمی شود بلکه این خصوصیات از مادر به دختر منتقل می گردد اما گذر زمان حقیقت دیگری را آشکار ساخت: گاوهایی که توسط گاو نر خاصی تلقیح شده اند در حدود 2/1 تا 3/4 برابر آنهایی که با بقیه گاوها تلقیح شده اند، سقط نشان می دهند. به طور کل گاوهای نر مختلف را تا حدود 2/5٪ تا 21/2٪ دخیل در سقط می دانند. گاهی یک گاو نر قادر است در حد 21/7٪ میزان سقط را بالا ببرد و گاهی نیز گاو نر دیگر فقط به میزان 0/08٪ سقط جنین ایجاد کند. مؤثر بودن گاو نر در سقط جنین به دلیل نقوص ژنتیکی و آناتومیکی حیوان ذکر گردیده است. از طرفی هم تحقیقاتی نشان دهنده این امر است که گاو نر در سقط جنین نمی تواند دخیل باشد.

دقت داشته باشیم که خطر سقط جنین زودرس با عامل غیر عفونی در شرایط سیستم های مدیریتی فشرده در حال افزایش است. در مورد گوسفند سیستم پرورشی در کشور ما استفاده از چراگاه است که لازم است مکمل های سلنیم دار در این دوران ها در اختیار گوسفندان قرار بگیرد.

با توجه به حساس بودن گوسفند به کمبود ید، مدنظر قرار دادن شرایط آب و هوایی و جغرافیایی و همچنین پوشش گیاهی منطقه لازم به نظر می رسد. اگر پرورش در محیط های کوهستانی انجام می گیرد، باید بدانیم که خاک این مناطق فقیر از ید است در نتیجه میزان ید کافی از طریق گیاهان این نواحی در اختیار دام های ما قرار نمی گیرد پس

تأمین ید جیره ضروری است. اگر در کنار محل چرای دام، محل کشت گیاهان گواترزا از قبیل سویا، کلم، شلغم و ... است نباید به دام اجازه چرا در این زمین ها را بدهیم. در ضمن با توجه به افزایش نیاز بدن به ید در فصول سرد سال و همچنین با افزایش میزان بارندگی ها افزایش میزان ید جیره لازم می باشد. در کنار تمام این شرایط باید به میزان سلنیم جیره هم توجه داشته باشیم تا از متابولیسم موفق ید در بدن دام مطمئن گردیم.

اخذ تاریخچه

اطلاع از موارد زیر در تعیین عامل سقط جنین مفید و ضروری می باشد:

- تعداد و در صد دامهای سقط کرده
- سابقه جابه جایی دام در گله از قبیل خرید دام های جدید و یا قرض گرفتن قوچ و بز نر برای جفت گیری
- اطلاع از سوابق سقط های قبلی گله و عوامل آنها
- سن دام های سقط کرده: آیا شکم های اول سقط دارند یا مسن تر ها یا همه جمعیت؟
- آیا گروه خاصی از دام ها یا نژاد خاصی سقط کرده اند؟
- سن جنین های سقط شده: از دست رفتن آبستنی در روزهای اول است یا مراحل آخر آبستنی؟
- سابقه مایه کوبی و تغذیه گله: از مکمل های معدنی در تغذیه گله استفاده شده است؟ آیا دامها در معرض تغذیه با غذای خاص و جدیدی قرار گرفته اند؟
- سابقه مصرف داروی خاصی مثل ضد انگل ها و...
- فاکتورهای محیطی مانند استرس های مختلف از قبیل گرم یا سرد شدن هوا، حمله حیوان وحشی به گله، گرم شدن شدید هوا در مراحل اولیه آبستنی، حمل و نقل و ...
- بیماری بالینی در دام های سقط کرده، قبل و بعد از سقط

تاریخچه سقط جنین

تاریخ: _____ بخش (شهرستان): _____

نام دامدار / مالک دامداری: _____

نشانی: _____

شهر: _____ استان: _____ کد پستی: _____

نام دامپزشک: _____ شماره تماس: _____

تاریخچه دام

مشخصات دام:

اسم/شماره: _____ سن: _____ نژاد: _____

تاریخ سقط جنین: _____ تخمین زده شده برای تاریخ: _____

طول سر تا دم جنین سقط شده: _____

هرگونه مورد غیر طبیعی که در معاینه کلی جنین های سقط شده یافته اید را توضیح دهید:

هرگونه مورد غیر طبیعی که در معاینه کلی جفت ها یافته اید را توضیح دهید:

تعداد دامهایی که تلقیح شده اند: _____

تاریخ آخرین تلقیح: _____

روش آبستنی برای این دام (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

تلقیح مصنوعی طبیعی تلقیح مصنوعی و طبیعی انتقال جنین کلون کردن

تاریخ آخرین زایمان طبیعی: _____

آیا دام در گذشته هم سابقه سقط جنین داشته است؟ بلی خیر

اگر پاسختان مثبت است تاریخ آن را بنویسید: _____

آیا تا کنون جنین های سقط شده جهت تشخیص و بررسی به آزمایشگاه ارسال شده اند؟

بلی خیر

اگر پاسختان مثبت است، لطفا تاریخ آن را بیان کنید: _____

نتایج چه بود؟ _____

تاریخچه واکسیناسیون (واکسن های مربوطه):

* نتوسپورا بلی خیر

آخرین تاریخ: _____ تاریخ قبلی: _____ تاریخ قبلی: _____

* BVD بلی خیر

آخرین تاریخ: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

* IBR بلی خیر

آخرین تاریخ: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

* لپتوسپیروس 5 بلی خیر

آخرین تاریخ: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

* لیتوسپیرا هارجوبویس بلی خیر

آخرین تاریخ: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

تاریخ قبلی: (کشته/زنده تخفیف حدت یافته) _____

* تریکوموناس بلی خیر

آخرین تاریخ: _____ تاریخ قبلی: _____ تاریخ قبلی: _____

* ویبریوز (جنین آلوده به کمپیلو باکتر) بلی خیر

آخرین تاریخ: _____ تاریخ قبلی: _____ تاریخ قبلی: _____

* کلامیدیا بلی خیر

آخرین تاریخ: _____ تاریخ قبلی: _____ تاریخ قبلی: _____

آیا در دام علائم بالینی مشاهده شده است؟ بلی خیر

اگر پاسخ شما مثبت است بیان کنید که آیا وقوع آن مربوط به

هفته قبل ماه قبل 3 ماه قبل 6 ماه قبل بوده است؟ (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

با چه علائمی؟ (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

تب بیماری تنفسی جفت ماندگی ترشحات چشمی بیماری های روده ای ورم پستان سایر

علائم (علائم را توضیح دهید) _____

هر گونه تغییراتی که در برنامه تغذیه این دام صورت گرفته است را توضیح دهید:

تاریخچه گله

تعداد کل دامهای بالغ در گله: _____ تعداد کل دامهای نابالغ در گله: _____

تعداد دامهای خریداری شده در.....

4 ماه گذشته: _____ سال گذشته: _____

تاریخ آخرین دام خریداری شده: _____

وضعیت سلامت دامهایی که به تازگی وارد گله شده اند چگونه است؟ _____

تولید مثل

چه تعداد سقط جنین در.....

هفته گذشته: _____ ماه گذشته: _____ 6 ماه گذشته: _____

در گله وجود داشته است؟

در چه مرحله ای از آبستنی؟ _____

آیا موردی از این جنین های سقط شده به آزمایشگاه ارسال شدند؟

بلی خیر

اگر چنین است لطفا تاریخ و نشانی آزمایشگاه آن را بیان کنید: _____

نتایج چه بودند؟ _____

آیا در نوزادان به دنیا آمده مشکلی مشاهده می کنید؟ (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

مرده زایی ناقص الخلقگی ضعف عدم تعادل (آتاکسی)

سایر موارد (توضیح دهید): _____

اولین روزی که به طور میانگین بعد از زایمان تلقیح صورت می گیرد (گاو های شیری):

فاصله بین زایش ها (گاو های شیری): _____

تعداد جفت گیری برای هر آبستنی (گاو های شیری): _____

آیا پس از زایش معاینات بطور منظم انجام گرفته است؟ بلی خیر

چه مدت پس از زایش؟ _____

آیا معاینات آبستنی انجام گرفته است؟ بلی خیر

آیا مشکلات جفت گیری در گله وجود دارد؟ بلی خیر

چند درصد؟ _____

مشکلات تولید مثلی گله (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

- آنستروس - سیکل های نامنظم - متريت - فحلی های مکرر - جفت ماندگی - کیست تخمدانی -
سایر موارد (لطفاً توضیح دهید) _____
-

وضعیت سلامت دام

آیا در 6 ماه اخیر بیماری بالینی دیگری در گله وجود داشته است؟

بلی خیر

اگر پاسختان مثبت است نوع عارضه را مشخص کنید (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

تنفسی چشمی روده ای تب ورم پستان

سایر موارد (توضیح دهید): _____

سیستم نگهداری دام:

استانسیون تای استال فری استال مرتع

سایر موارد (توضیح دهید) _____

تغذیه

نوع علوفه: (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

بغولات علوفه خشک گرامینه علوفه چراگاه سیلوی ذرت

سایر موارد: _____

کنسانتره: _____

دانه های تجاری مخلوط: _____

انواع آن: (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید)

ذرت جو سویا پنبه دانه پس مانده تخمیر غلات

سایر موارد: _____

مواد معدنی (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید):

ترکیبات تجاری اضافه کردن ترکیبات معدنی به TMR انتخاب آزاد

برنامه کلی تغذیه ای دامها را شرح دهید (پاسخ مورد نظر خود را علامت بزنید):

تغذیه دامها به صورت جداگانه تغذیه گروهی دامها تغذیه علوفه و کنسانتره به صورت جداگانه

TMR (به تنهایی) علوفه همراه مکمل علوفه بدون افزودن مکمل

TMR و یونجه که به صورت جداگانه به دامها داده می شود

دامهای خشک در یک گروه

هیچ گروه خشکی وجود ندارد

توضیحات:

آیا غذای کپک زده در بین خوراک دام وجود داشته است؟ بلی خیر

آیا از مکمل سلنیم استفاده شده است؟ بلی خیر

اگر پاسختان مثبت است این مکمل با چه روشی تجویز شده است؟

تزریقی خوراکی

سایر توضیحات و نظرات مربوطه در اخذ سابقه دام (در صورت لزوم صفحات اضافی را پیوست کنید):

برای پیشگیری از سقط، داشتن برگه مخصوص پرسش های سقط (چک لیست) برای تشخیص سقط کمک می کند.

پرسش های کلیدی

الف) مشکل چیست؟

- آیا نقص در آبستن شدن دام هاست، یا در از دست رفتن فتوس؟
- آیا دام ها برای آبستنی معاینه می شوند؟
- آیا دام ها غیر آبستن هستند؟
- میزان عدم آبستنی در گاوها و تلیسه ها باید کمتر از 5٪ باشد.

ب) کدام دام ها مبتلا هستند؟

- چه تفاوتی بین گروه دام های آبستن و زایمان کرده و آن هایی که اینگونه نیستند، وجود دارد؟
- آیا دام ها در داخل دامپروری پرورش داده شده اند و مربوط به همین گله می باشند یا از مکان های دیگر خریداری شده اند؟
- چه گروه سنی مبتلا شده است؟
- وضعیت واکسیناسیون چطور است؟
- واکسن های زنده تخفیف حدت یافته استفاده شده است یا کشته؟ واکسن های زنده تخفیف حدت یافته اگر به دام های آبستن یا گوساله های ماده ای که در گذشته از مادران ایمن به دنیا نیامده اند، تزریق شوند، شاید سبب سقط شوند، به همین خاطر در شروع برنامه واکسیناسیون باید دقت کرد.

- وضعیت بدنی دام ها چطور است؟ Body Condition Score (BCS)
- تغذیه دام ها چیست؟ نوع، کیفیت و وضعیت غذا باید در پیشگیری از سقط بسیار مورد توجه قرار گیرد. غذاهای کپک زده علت 3 تا 10 درصد سقط ها هستند. به خاطر داشته باشیم که تنفس اسپورهای کپک، درست مانند خوردن آنها خطرناک است.
- چه دام های نری در معرض دام های ماده بوده اند؟

- در مناطقی که دام ها از مرتع استفاده می کنند، اگر از مرتع مشترک استفاده می شود، بیماریهای مقاربتی باید مد نظر قرار گیرد.
- آیا دام های مبتلا پدر یا مادر مشترک داشته اند؟

ج) چه زمان مشکل رخ داده است؟

- آیا فتوس ها در سن خاصی از بین رفته اند؟ از دست دادن جنین، در ماه های آخر آبستنی شاید به علت نیترات های غذا باشد. هر نوع استرس نیز می تواند محرک ایجاد سقط باشد. عوامل استرس زا مثل حمل و نقل، جراحات مکانیکی، جدایی، درد، تغییرات فشار خون، حمله حیوانات وحشی و ... عمل دستگاه تولید مثل را تحت تأثیر قرار می دهند که این تغییر را یا از طریق اعمال اثر بر روی سطح هیپوتالاموسی (GnRH) و یا سطح تخمدانی (پروژسترون) به انجام می رسانند. در شرایط گله های گوسفند و بز بعد از حمله گرگ به گله می تواند سقط های زیادی به وقوع بپیوندد.
- آیا سقط ها در مرتع رخ داده یا زمانی که جیره گاوها تغییر کرده است؟
- آیا جیره آزمایش شده است؟
- آیا جیره عاری از نیترات هاست؟ سقط های ایجاد شده به علت نیترات ها همراه با علائم بالینی آن در دام های بالغ، مثل شکلاتی شدن، بی رنگ شدن و یا گلگون شدن پوست یا غشاهای مخاطی است.
- آیا تعداد زیادی دام ناگهان درگیر شده اند و یا مشکل به کندی کل گله را فراگرفته است؟
- سقط به طور معمول در حدود 2٪ در شروع فصل زایش رخ می دهد.

د) مشکل کجا رخ داده است؟

- آیا دام های مبتلا و غیر مبتلا در مراتع یا جایگاه های مختلف پرورش داده شده اند؟
- وضعیت دامپروری و تراکم آن چگونه بوده است؟
- آیا دام ها برای غذا یا آب مجبور به رقابت هستند؟

• آیا ورود و خروج گله به آغل از درهای تنگ صورت می گیرد؟ سقط جنین های مکانیکی در گله های گوسفند و بز بسیار حائز اهمیت است. به عنوان مثال عدم آگاهی دامداران در ارتباط با عبور دام های آبستن سنگین، همراه با گله از درهای تنگ آغل، یکی از ساده ترین مسائلی است که می بایست در ارتباط با جلوگیری از سقط های مکانیکی به کار برده شود که به علت عدم آگاهی دامداران منجر به سقط در گله می شود. در شرایط ما اکثریت قریب به اتفاق گله ها جهت ورود به آغل ها می بایست از درهای تنگ عبور کنند همچنین در بسیاری موارد خصوصا در فصل های خشکسالی که تغذیه دستی انجام می شود، دامدار قبل از برگشت گله، آخورهای درون آغل را پر می کند و گوسفندان نیز که به این مسئله شرطی شده اند، رقابت بسیار زیادی را برای ورود به آغل و تغذیه انجام می دهند که این امر باعث افزایش خطر سقط های مکانیکی گله ها می شود.

ه) چه کاری برای سقط صورت گرفته است؟

- آیا دام های سقط کرده، مشخص و جدا شده اند؟
 - آیا جنین سقط شده دیده شده است؟
 - آیا سن جنین سقط شده مشخص شده است؟
 - آیا نمونه ای به آزمایشگاه ارسال شده است؟
 - آیا با بروز اولین سقط، به دامپزشک اطلاع داده شده است؟
 - آیا با آزمایشگاه برای ارسال نمونه ها و انجام آزمایش های خاصی، تماس گرفته شده است؟
 - آیا ارسال نمونه ها بر اساس دستورالعمل های آزمایشگاه صورت گرفته است؟
- به طور معمول آزمایش های زیر را می توان بر روی جنین و جفت سقط شده انجام داد:

- گسترش خون و گسترش از بافت ها
- سرم شناسی
- میکروب شناسی (قارچ، باکتری، تک یاخته و ویروس)
- ایمونوهیستوشیمی
- پاتولوژی
- مولکولی PCR
- میکروسکوپ الکترونی (کوئیلدون ها)
- سم شناسی
- آزمایش های ژنتیکی

(و) نتایج معاینات جفت و فتوس چه بوده است؟

1- آیا جفت طبیعی است؟

باید معاینه تمام جفت و بند ناف انجام شود. اگر جراحی مشاهده شد، باید مشخص شود که آیا علل عفونی است یا غیر عفونی؟ که در حالت غیر عفونی موارد زیر دیده می شود:

- حالت های غیر طبیعی بند ناف (پیچ خوردگی، Strangulation)
- جفت ناکافی (ممکن است سبب خون رسانی ناکافی به جنین شود)
- جدا شدن زودرس و آنروپی ویلی ها
- جفت با کوئیلدون های کم که ممکن است در هیدروپس آلانتوئیس و هیدروپس آمیون وجود داشته باشد.

2- آیا جفت التهاب (پلاستیت) دارد؟

جست و جویهای اختصاصی شامل موارد زیر است:

- نکروز کوتیلدون ها (برای مثال در کمپیلوباکتر، بروسلا، لپتوسپیرا، کلامیدیا و کوکسیلا)
- خونریزی (در لیستریا و کوکسیلا)
- ادم بین کوتیلدون ها (در لیستریا و بروسلا)
- التهاب گرانولوماتوز (در آرکانوباکتر و نوکاردیا)
- جراحات های هیپرپلاستیک (در کوکسیلا، مایکوپلاسما، کلامیدیا و مایکوزیس)
- التهاب چرکی (در آرکانوباکتر پیوژنز)

3- آیا فتوس طبیعی است؟

معاینه فتوس که نشان می دهد دارای جراحات های غیر عفونی است:

- نواقص مادرزادی (نواقص سیستم عصبی و قلبی) نواقص کشنده و عوارض ارثی آکندروپلازی و وضعیت های تغذیه ای مثل کمبود ویتامین آ
- بی رنگ شدن عضلات مخطط (بیماری عضله سفید)

4- حالت های غیر طبیعی فتوس چیست؟

- هیپوپلازی مخچه (BVD)
- حالت های غیرطبیعی استخوان (RVF, BVP)
- درجات اتولیز : مرگ فتوس در رحم و اتولیز در IBR، لپتوسپیرا و آرکانوباکتر پیوژنز، در مقابل خروج زودرس فتوس با حداقل اتولیز در آسپرژیلوس و کلامیدیا
- آنمی و زردی در بابزیا و لپتوسپیرا
- جراحات های کبدی و پنومونی بینابینی در IBR, RVF و یا سپتی سمی ها
- سطوح فیبرینی یا سروزی در سپتی سمی ها
- تورم بند ناف

- عضلات مخطط بی رنگ در نئوسپورا

(ز) آیا نمونه ها درست ارسال شده اند؟

ارسال نمونه ها به دو شکل انجام می شود: یکی انجام کالبد گشایی دقیق و کامل روی فتوس و ارسال نمونه هایی برای آزمایشگاه و دوم اینکه فتوس کامل و بخش هایی از جفت به همراه آن به آزمایشگاه ارسال شوند که درباره شکل اول، پس از کالبد گشایی نمونه های زیر باید به آزمایشگاه ارسال شوند:

- گسترش خون از مادر و جنین
- گسترش از کوتیلدون و محتویات شیردان
- محتویات شیردان، ریه، طحال، کبد، کوتیلدون ها و اندام های مبتلا
- برای کشت باید نمونه ها در کنار یخ بدون اینکه منجمد شوند و در ظروف جداگانه برای هر سقط ارسال شوند
- طحال و ریه برای جدا سازی ویروس
- طحال برای مشخص کردن آنتی ژن BVD با استفاده از الایزا
- برای هیستولوژی، اندام ها و بافت ها باید در فرمالین 10٪ ارسال شوند. ریه (پنومونی)، کبد (نکروز)، طحال و مغز (نئوسپورا)، کلیه و غدد فوق کلیه (نکروز)، غده تیروئید، میوکارد و عضلات مخطط (نئوسپورا و بیماری عضله سفید)
- مایعات سینه ای و شکمی تنها در سقط های اواخر آبستنی که سیستم ایمنی جنین فعال شده، مفید خواهد بود.

با توجه به توضیحات داده شده، برای بررسی سقط جنین یک گله و رسیدن به تشخیص دقیق، پر کردن پرسشنامه و انجام آزمایش های مختلف باید به دقت صورت گیرد و با وجود تمام کارهای بیان شده، باز هم در کمتر از 50 درصد موارد می توان علت را تشخیص داد.

راهنمای سریع سقط جنین گوسفندی

راهنمای سریع برای انتخاب نمونه به منظور تشخیص در موقعیت های عمومی

سقط جنین در گوسفند

نمونه های ارائه شده جنین کامل و جفت، نمونه های انتخابی هستند

جدول شماره 10- بافت های جنینی لازم جهت نمونه برداری

مغز	1/2 عضو - تثبیت شده در فرمالین
سرم میش	3-5ml اختیاری - به نوشته های مربوط به سرم شناسی مراجعه کنید - سرم مربوط به گوسفند ماده
قلب	تثبیت شده در فرمالین قطعه 1/2 cm
کلیه	یک کلیه کامل - تازه - سرد
ریه	1/8 - 1/4 از عضو (تازه - سرد)
جفت	3 کوتیلودون - سرد - تازه
طحال	1/2 از عضو - سرد - تازه
محتویات معده	سرنگ یا لوله 1-3ml
مایع سینه ای	شفاف - بدون آلودگی - تازه - سرد
تیموس	تثبیت شده با فرمالین - سرد شده - تازه قطعه 1/2cm
سوآب های واژینال	اختیاری، از گوسفند ماده ای که به تازگی دچار سقط شده استفاده شود

روش های نمونه گیری:

- 1- بافت ها را منجمد نکنید.
- 3- در هر زمانی که امکان دارد جفت را ارسال کنید.
- 4- سرم های گوسفند ماده را ارسال کنید 1/2 از نمونه یخ زده باقی بماند.

منابع

- 1- اسماعیلی، حسین. اختیارزاده، حسن. ابراهیم زاده، حمید. پرتوی، راضیه. مرحمتی خامنه، بهمن و حامدی، مونا. (1390). ارزیابی برنامه ملی مبارزه با بروسلوز گوسفند و بز در ایران. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. سال 14. شماره 6. ویژه نامه 3. 9-20.
- 2- اسماعیلی، حسین. تاجیک، پرویز. اختیارزاده، حسن. بلورچی، محمود. حامدی، مونا. خلیج مهدی و امیری کریم. (1391). ارزیابی برنامه کنترل و ریشه کنی بروسلوز گاوی در ایران: بررسی اپیدمیولوژی. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره 67. شماره 3. 211-221.
- 3- اصلانی، محمدرضا. (1386). سقط جنین در گوسفند: عوامل اصلی و تشخیص آن ها. چاپ اول. قطب علمی مطالعات سقط جنین و مرگ و میر نوزاد دام های نشخوارکننده. 1-46.
- 4- آمار نامه کشاورزی. دفتر آمار و فناوری اطلاعات، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی وزارت جهاد کشاورزی. 303-294.
- 5- تاج بخش، حسن. احمدی، ملاحظ. فخرزادگان فریده و نادعلیان قلی محمدقلی. (1379). بررسی عفونت های ناشی از کمپیلوباکتر فتوس زیرگونه فتوس در گوسفندداری های اطراف تهران و اصفهان. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره 55. شماره 3. 69-71.
- 6- حسنی طباطبایی، عبدالمحمد و فیروزی رؤیا. (1380). بیماری های باکتریایی دام. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران.
- 7- حمیدیا، زینب. اسماعیلی حسین و شاهورانی الهام. عوامل فیزیولوژیک سقط جنین در دام ها. (1390). کاوش جنوب. سال دهم. شماره 12. 93-99.
- 8- خالداری، مجید. (1387) اصول پرورش گوسفند و بز. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد تهران.
- 9- سازمان دامپزشکی کشور. دستورالعمل های اجرایی و راهنمای بررسی، مبارزه و مراقبت بیماری های دامی. (1390) 38-40.

- 10- ساسانی، فرهنگ. (1388). پاتولوژی تشخیصی دامپزشکی (راهنمای تشخیص بیماری ها و نمونه برداری). چاپ اول. انتشارات پردیس باوران.
- 11- کیوان فرد، هادی. صحت زاده، فرهید و محمودیان، علیرضا. (1385). ترجمه ویروس شناسی دامپزشکی. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران. 247.
- 12- مرکز آمار ایران، خلاصه نتایج آمارگیری از دامداری های کشور در سال 1387. سایت رسمی مرکز آمار ایران
- 13- هورشتی، پرویز. بلورچی، محمود. قراگوزلو، فرامرز و وجگانی مهدی. (1389). سقط جنین در گاو، گوسفند و بز. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران.
- 14- Aitken I.D. (2007). Disease of sheep. 4th ed. Blackwell publishing.
- 15- Arthur G.H. Noakes D.E. Pearson H. and Parkinson T.J. (2001). Veterinary and reproduction and obstetrics. Saunders Ltd.
- 16- Asghari Q, Mehrabani D, Moazzeni M, Akrami F, Kalantari M, Motazedian M.H and et all. (2009), The seroprevalence of ovine toxoplasmosis in Fars province, south Iran, Asian journal of animal and veterinary advances, Vol: 4, No: 6, PP: 332-336.
- 17- Chizari.M, Bahmani.S, Lindner.J.R. (2001). Educational needs of semimigrant nomads of Charmahal va Bakhtiari province, Iran regarding sheep and goat management and production. Journal of international agricultural and extension education. pp:25-4.
- 18- Dobson,H.,Smith,R.F.,(1995). Stress and reproduction in farm animals.J.Reprod.Fertil.,Suppl.49 451-461.
- 19- Entrican G. (2002). Immune Regulation during Pregnancy and Host-Pathogen Interactions in Infectious Abortion. J. Comp. Path., Vol. 126, 79-94.
- 20- Entrican G, Wheelhouse NM. (2006). Immunity in the female sheep reproductive tract. Vet Res; 37:295- 309.
- 21- Esmaeili.H, Ebrahim zadeh. H , Khalaj.M, Rasoli beirami.N, Gholami.H, Hamed M. (23-24 February 2011). Infectious agents of abortion in sheep and goat flocks of Iran. The international congress of large animal practitioners,Tehran-Iran.P: 192.
- 22- Jones,C.T.,Boddy,K.,Robinson,J.S., (1977) .Changes in the concentrations of adrenocorticotrophin and corticosteroid in the plasma of foetal sheep in the latter half of pregnancy and during labour.J.Endocrinol.72,293-300.
- 23- Navidpour Sh and Hoghooghi-rad N, (1998), Seroprevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in buffaloes in Khoozestan province, Iran, Veterinary Parasitology, No:77, PP: 191-194.
- 24- OIE, (2009). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
- 25- Ovine Abortion Quick Guide, available at: <http://vetmed.iastate.edu/diagnostic-lab/user-guide/pathology/ovine-abortion-quick-guide>
- 26- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. and Constable P.D. (2007). Veterinary Medicine. 10thed. Elsevier.

- 27- Razmi G.R, Ghezi K, Mahooti A, and Naseri Z, (2010), A Serological Study and Subsequent Isolation of *Toxoplasma gondii* From Aborted Ovine Fetuses in Mashhad Area, Iran, *J. Parasitol.*, Vol: 96, No: 4, PP: 812-814.
- 28- Razmi GR, Maleki M, Farzaneh N, Talebkhan Garoussi M, and Fallah A.H, (2007), First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran, *Parasitol Res*, Vol: 100, PP: 755-757.
- 29- Rodolakis A., Nettleton P. and Benkirane A. (1998). Manual for laboratory diagnosis of infectious abortion in small ruminants. Food and agriculture organization of the united nation Rome.
- 30- Romero-R, Gabriela Lopez, Maricela Luna-M. (1998) Abortion in goats associated with increased maternal cortisol. *Small Ruminant Research* 30:7-12 .
- 31- Sakhaee E, Abdollahpour G.h, Bolourchi M, Hasani Tabatabayi A.M, Sattari Tabrizi S, (2007), Serologic and bacteriologic diagnosis of bovine leptospirosis in Tehran suburb dairy farms, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Vol: 8, No: 4, PP: 325-332.
- 32- Sargison.N . (2008). *Sheep Flock Health* Blackwell Publishing Ltd.p
- 33- Teankum.K, A. Pospischil, F. Janett, E. Brugnera, L.E. Hoelzle, K. Hoelzle R. Weilenmann, D.R. Zimmermann, A. Gerber, A. Polkinghorne, N. Borel. (2007) Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology* (67) 303–310.
- 34- Vanroose,G., deKruif A, VanSoom A. (2000). Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim Reprod Sci*;60-61:131-43.
- 35- Youngquest.S.R and Threlfael.W.R. (2007). Current therapy in large animal theriogenology, Second edition, Saunders, Elsevier. P:575,671.
- 36- Youssefi MR, Arabkhazaeli F, and Tabar Molla Hassan A, (2009), Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection and Industrial Cattle in Northern Iran, *Iranian J Parasitol*, Vol: 4, No:1, PP: 15-18.

