

# شناسایی مایکوباکتریوم اوپوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه بافتی ایلئوم در گاوهای ذبح شده در کشتارگاه شهرکرد به دو روش رنگ‌آمیزی اختصاصی زیل نلسون و واکنش زنجیره ای پلیمرز

حسن کریمی<sup>۱</sup>، عبدالرسول نامجو<sup>۲\*</sup>، حسن ممتاز<sup>۲</sup>، محمدرضا نامداری<sup>۱</sup>

## چکیده

بیماری یون نوعی التهاب مزمن روده ای شدید و پیشرونده است که دستگاه گوارش نشخوارکنندگان اهلی، وحشی و تک سمی‌ها را درگیر می‌سازد. این مطالعه به منظور تشخیص مایکوباکتریوم اوپوم پاراتوبرکلوزیس به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز و رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون بر روی نمونه های بافتی ایلئوم انتخاب شده از گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شهرکرد انجام شد. نتایج آزمایش رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون و واکنش زنجیره ای پلیمرز آشیانه ای بترتیب آلودگی ۶/۶۷٪ و ۲۶/۶۷٪ را نشان دادند. آزمون آماری مک نمار نشان داد که حساسیت آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز از رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون است ( $p < 0/001$ ). میزان توافق کلی بین دو روش ۸۰ درصد و ضریب کاپا ۰/۳۳ محاسبه شد که نشان دهنده توافق ضعیف است ( $p < 0/01$ ). همچنین رابطه معنی داری بین آلودگی با جنس، نژاد و سن مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). نتایج نشان داد که آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت تشخیص آلودگی از دقت بالایی برخوردار است و در مراحل اولیه بیماری که تعداد میکروارگانیسم ها اندک است نمی‌توان به نتایج هیستوپاتولوژیک جهت تشخیص بیماری یون اعتماد کرد.

**واژگان کلیدی:** بیماری یون، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، گاو، هیستوپاتولوژی، زیل نلسون، واکنش زنجیره ای پلیمرز

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۲۲

## مقدمه

بیماری یون نوعی التهاب روده ای مزمن است که در دامنه وسیعی از نشخوارکنندگان اهلی و وحشی مانند گوسفند، بز، گوزن، گاو میش آمریکایی، شتر، بوفالو، لاما، گوزن یال دار آفریقایی، گوشتخواران، پرندگان وحشی و بندرت در تک سمی‌ها آلودگی ایجاد می‌کند (۵، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۴).

مایکوباکتریوم اوپوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس عامل بیماری یون است که به اختصار مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس نامیده می‌شود (۱۲). این باکتری کوچک به ابعاد ۰/۵ تا ۱/۵ میکرون، میله ای شکل، کند رشد، گرم مثبت است. برای رشد به منبع آهن و مایکوباکتین احتیاج دارد (۵). زیان‌های اقتصادی در عفونت تحت بالینی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس شامل کاهش ضریب تبدیل غذایی، کاهش تولید مثل، کاهش پروتئین و چربی شیر، حذف زودرس، کاهش وزن در زمان کشتار، افزایش بروز ورم پستان و کاهش باروری است (۱۴). از مشخصات پاتولوژیک می‌توان التهاب مزمن گرانولوماتوز ایلئوم، کولون و التهاب عروق لنفاوی و عقده های لنفاوی مزانتریک را اشاره کرد (۵، ۱۴). مایکو باکتریوم اوپوم پاراتوبرکلوزیس از نظر ساختار ژنتیکی دی اکسی نوکلئیک اسید، بیش از ۹۰ درصد با پاراتوبرکلوزیس شباهت دارد (۵). بیماری یون انتشار جهانی داشته و در گاو بیشتر از گوسفند و بز باعث بیماری می‌شود (۶). راه انتقال آلودگی خوردن آب و مواد غذایی آلوده به مدفوع دام‌های مبتلا است (۱۵). پس از این که مایکوباکتریوم در قسمت میانی روده توسط ماکروفاژها گرفته شد (۱۲) باکتری در داخل ماکروفاژ تکثیر یافته و با از بین بردن ماکروفاژ و ادامه تکثیر خود و تشکیل سلول‌های غول پیکر باعث رشد و گسترش بیماری می‌شود (۹، ۱۲). تکثیر و تزايد ارگانیسم در مخاط روده سبب بروز یک پاسخ گرانولوماتوزی در قسمت انتهایی ایلئوم می‌گردد. این

۱- دانش آموخته دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران namjo72@gmail.com

اما روش قابل اطمینانی برای ردیابی و شناسایی مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس در مدفوع گاو نیست (۱)، از طرفی شناسایی دام‌های دفع کننده عامل بیماری بدون علائم بیماری و عفونت آشکار مهمترین کار در کنترل و ریشه‌کنی بیماری یون است. هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی مایکوباکتریوم اوپوم پاراتوبرکلوزیس به روش رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون و واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی نمونه‌های تهیه شده از انتهای ایلئوم گاوهای ذبح شده در کشتارگاه صنعتی شهرکرد و تعیین میزان توافق (ضریب کاپا) بین این دو تکنیک تشخیصی است.

### مواد و روش کار

این مطالعه کشتارگاهی، از سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ بر روی ۹۰ راس از ۹۰۰ رأس گاو کشتار شده گاو بالای یک سال که به صورت تصادفی، با فواصل معین در خط کشتار انتخاب شده بودند انجام شد. نمونه گیری از قسمت‌های انتهایی روده باریک (ایلئوم) انجام و نمونه در فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت گردید. پس از پایدار شدن نمونه‌ها، مراحل مختلف آبیگری، شفاف سازی و تهیه بلوک های پارافینی انجام و با تهیه مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون و پس از رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون (۱۴) با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. حضور لئوسیت‌ها، سلول‌های شبه پوششی و تجمع باسیل‌های اسیدفاست قرمز رنگ در داخل سلول‌های شبه پوششی و سلول‌های بزرگ چند هسته‌ای در بخش پارین پرزهای ایلئوم، کریپت ها و زیر پارانشیم اطراف عقده لنفاوی بعنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شد (۵،۱۴). همچنین قسمتی از انتهای ایلئوم جهت انجام آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز تا زمان آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد (۱) نگهداری شدند. برای این منظور از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNP™ KIT DNA Purification) استفاده شد. بدین صورت که طبق دستور کارخانه سازنده پس از استخراج DNA تا زمان

افزایش ضخامت به دلیل تکثیر و تزايد ماکروفاژها و تشکیل سلول‌های اپی تلئوئید در لایه های پائینی مخاط و زیر مخاط روده می‌باشد (۵،۱۴). تمایل برای عفونت در قسمت انتهایی ایلئوم را می‌توان به وسیله افزایش دانسیته پلاک‌های پایر در این نقطه از روده توجیه نمود (۵). مراحل ایجاد بیماری در گاو عبارت است از: مرحله اول یا عفونت خاموش در گوساله‌ها، تلیسه‌ها گاوهای جوان که در همان ماه‌های اول زندگی آلوده شده‌اند و با تست‌های سرلوژیک نمی‌توان بیماری را در حیوان ردیابی کرد (۵،۱۲). مرحله دوم یا فرم تحت کلینیکی بیماری که اغلب حیوانات در این مرحله بالغ و حامل مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس بوده و علائم تپیک بیماری را نشان نمی‌دهند و بندرت با حساس‌ترین آزمون‌های آزمایشگاهی مثل کشت مدفوع بیماری قابل ردیابی است (۵،۱۲). مرحله سوم یا فرم کلینیکی که در دام‌های بالغ و بزرگسال دیده شده و دارای علائم کاهش وزن، اسهال، کاهش درجه حرارت بوده و نتیجه کشت مدفوع اغلب دام‌ها در این مرحله مثبت است و عیار پادتن با روش الیزا و آزمایش آگار ژل ایمونودیفیوژن قابل ردیابی می‌باشد. مرحله چهارم، مرحله پیشرفت بیماری است، دام‌های مبتلا در مراحل پیشرفته بیماری کاهش وزن، لاغری مفرط، زبر و خشن شدن پوشش بدن، اسهال آبکی را نشان می‌دهند (۵،۱۲). مهمترین ضایعات ماکروسکوپی در فرم پیشرونده بیماری یون، آتروفی عضلات، ادم تحت فکی، کاهش وزن، ایجاد پلاک های فیبروزه و رسوب کلسیم در آئورت، تورم عقده های لنفاوی ایلئوسکال، ضخیم شدن و چین و چروک دار شدن مخاط روده بویژه در قسمت‌های انتهایی ایلئوم است (۵). تشخیص قطعی بیماری با ترکیبی از تشخیص بالینی، آزمایشات باکتری شناسی، سرولوژی و مولکولی امکان پذیر است (۱). اما کشت مدفوع بعنوان تست طلائی معرفی شده است (۱،۱۵). از آنجائی که آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع روش سریع و ارزانی است

۲۰۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میکرومول  $MgCl_2$  و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase که همگی از شرکت سیناژن ایران تهیه شده بودند. ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید.

واکنش گره های PCR روی یخ با هم مخلوط و بلافاصله نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) قرار داده می شدند و برنامه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه تنظیم گردید.

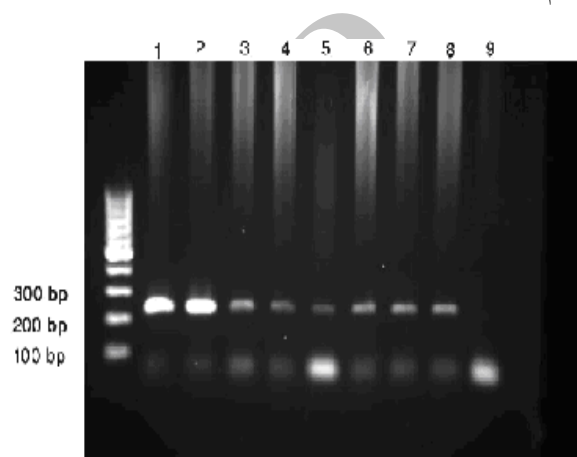
PCR مرحله دوم: توالی پرایمرهای این مرحله به صورت زیر است:

ISi-2F: 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3'

ISi-2R: 5'-AATCAACTCCAGCAGCGCGCCTCG-3'

در این مرحله همه شرایط اعم از مخلوط واکنش گره های PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق مرحله اول می باشد با این تفاوت که DNA الگوی مورد استفاده شامل ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول می باشد که به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق می گردد و به مخلوط واکنش اضافه می شود. سپس محصولات PCR با ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت. وجود قطعه ۲۳۰ جفت بازی پس از PCR نمایانگر آلوده بودن نمونه ها با مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس است. به منظور اطمینان از عدم وجود موارد مثبت کاذب از DNA تخلیص شده مایکو باکتریوم اوپوم به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد. جهت آنالیز اطلاعات ابتدا داده ها وارد جدول SPSS شده و با استفاده از برنامه کا اسکوار و مک نما به ترتیب جهت ارتباط آلودگی با متغیرهای سن، جنس و نژاد و مقایسه

انجام واکنش و اکنش زنجیره ای پلیمرز، DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. البته با توجه به غلظت بالای عوامل بازدارنده ی PCR دریافت، قبل از استخراج DNA، نمونه ها به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق سازی شدند. آزمایش Nested-PCR با استفاده از زوج پرایمر های طراحی شده از روی ژن IS900 که توسط De Meneghi در سال ۲۰۰۵ معرفی شده بود انجام شد (۸) (نگاره ۳).



نگاره ۳- نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از بازهای پرایمری جفت شده با وزن ۲۳۰ کیلوالتون ساخت شرکت سیناژن و مقایسه آن با نمونه های آلوده با مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس (ستون ۱ تا ۸) و گروه شاهد سالم (ستون ۹). ۸ نمونه از نظر باند ۲۳۰ جفت بازی هدف مثبت بوده.

در کلیه آزمایشات PCR از شاهد مثبت و منفی استفاده شد. کنترل مثبت یک تیوپ PCR می باشد که بجای DNA نمونه مورد آزمایش از DNA سویه استاندارد باکتری مذکور استفاده شده است و تیوپ کنترل منفی دارای کلیه واکنشگرهای PCR بجز DNA الگو می باشد که هم حجم آن آب مقطر اضافه گردید.

PCR مرحله اول: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مرحله به صورت زیر است:

ISo-1F: 5'-GTTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3'

ISo-1R: 5'-GAGGTTCGATCGCCACGTGA-3'

واکنش گره های مربوط به PCR مرحله اول در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با هم مخلوط گردیدند. این مخلوط شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA ی الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر،

حساسیت دو روش تشخیصی و از ضریب کاپا برای محاسبه میزان توافق نتایج روش های تشخیصی استفاده شد.

## نتایج

در این مطالعه کشتارگاهی، از بین ۹۰ گاو نمونه گیری شده تعداد ۶ راس (۶/۶٪) به روش رنگ آمیزی اختصاصی هیستوپاتولوژیک و ۲۴ راس (۲۶/۶۷٪) به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز آلوده به مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس بود. شش مورد در هر دو روش مثبت و ۶۶ مورد در هر دو روش تشخیصی منفی گزارش شد. توافق دو روش

رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون و واکنش زنجیره ای پلیمرز ۸۰ درصد محاسبه، و بر اساس محاسبه آماره ضریب کاپا (۰/۳۳) اعلام شد که می توان گفت توافق دو روش در حد ضعیفی است ( $p < 0/01$ ). همچنین آزمون مک نمار اختلاف دو روش تشخیصی را بسیار معنی دار دانسته است ( $p < 0/001$ ). فراوانی گاو های سالم و آلوده کشتار شده بر اساس متغیرهای جنس، نژاد، و سن در جدول ۱ آمده است. بین میزان آلودگی و سن، جنس و نژاد اختلاف آماری معنی دار مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

جدول ۱- توزیع فراوانی مطلق و نسبی گاو های سالم و آلوده بر اساس متغیرهای جنس، نژاد، سن در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه صنعتی جوققان در

سال ۹۰-۸۹

متغیر	جنس		نژاد		سن		
	نر	ماده	بومی	هولشتاین	۱-۳	۳/۵-۵	۵/۵-۷
گاوهای نمونه گیری شده							
سالم	۲۵ (۶۹/۵٪)	۴۱ (۷۶٪)	۲۴ (۷۵٪)	۴۲ (۷۲/۵٪)	۳۹ (۷۳/۶٪)	۱۳ (۶۸/۴۲٪)	۱۰ (۷۷٪)
آلوده	۱۱ (۳۰/۵٪)	۱۳ (۲۴٪)	۸ (۲۵٪)	۱۶ (۲۷/۵٪)	۱۴ (۲۶/۴٪)	۶ (۳۱/۵۸٪)	۳ (۲۳٪)
جمع کل	۳۶	۵۴	۳۲	۵۸	۵۳	۱۹	۱۳

داده ها بر اساس تعداد می باشد.

بین متغیرها بر اساس آزمون کا اسکووار اختلاف آماری معنی دار مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ).

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی نمونه های بافتی ایلتوم روده گاو بر حسب نتایج رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون و PCR

واکنش زنجیره ای پلیمرز رنگ آمیزی زیل نلسون	مثبت		منفی		جمع
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی
مثبت	۶	۲۵	۰	۰	۶
منفی	۱۸	۷۵	۱۰۰	۶۶	۱۱۸
جمع	۲۴	۱۰۰	۱۰۰	۶۶	۱۲۴

نتیجه آزمون مک نمار نشان می دهد بین دو روش تشخیص آلودگی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس اختلاف آماری بسیار معنی داری وجود دارد ( $p < 0/001$ ).

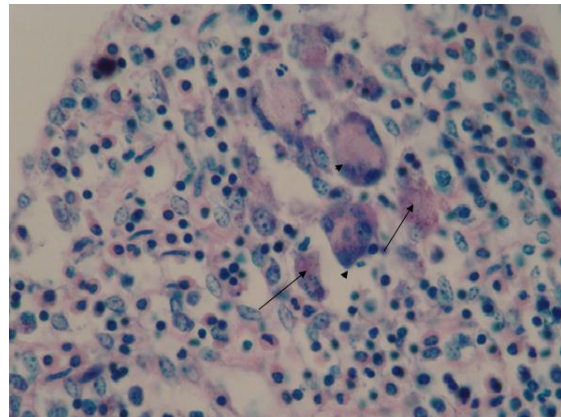
## یافته های هیستوپاتولوژیک

مطالعات میکروسکوپی مقاطع ایلتوم در گاوهای آلوده به مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس یک آنتریت گرانولوماتوز مزمن را نشان داد که در ناحیه پارین مخاط لنفوسیت،

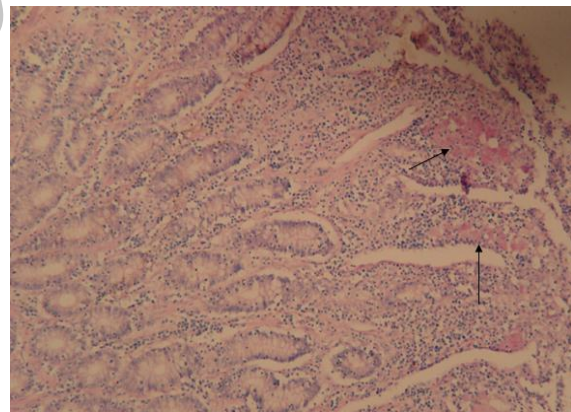
پلاسماسل، تعدادی جایانت سل و تعداد زیادی ماکروفاژ که در داخل سیتوپلاسم ماکروفاژها باکتری های اسید فاست مشاهده شد (نگاره ۱). تراوش سلول های آماسی مزمن باعث پهن شدن خمل های روده و تحلیل غدد لیبرکوهن شده بود

چند سال اخیر با گسترش تکنیک های تشخیصی مطالعات سودمندی در خصوص تعیین مقدار آلودگی به مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس صورت گرفته (۲،۳) چرا که بررسی میزان شیوع آلودگی در واقع مقدمه ای جهت مبارزه و کنترل این بیماری محسوب می شود. در این مطالعه به شناسایی مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه بافتی ایلنوم با استفاده از تکنیک های هیستوپاتولوژیک و مولکولی بدون توجه به علائم کلینیکی پرداخته شد که به روش رنگ آمیزی زیل نلسون ۶/۶۷٪ از کل نمونه ها، مثبت تشخیص داده شد که با توجه به نتایج بدست آمده به روش Nested-PCR، فراوانی نسبی دام های آلوده به روش رنگ آمیزی زیل نلسون نسبت به روش Nested-PCR پایین است. امروزه واکنش زنجیره ای پلیمرز بعنوان یک روش جدید در تشخیص مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس است اما در خصوص حساسیت و ویژگی، واکنش زنجیره ای پلیمرز گزارشات مختلف بیان می شود (۱، ۳، ۱۴) و همچنان روش کشت میکروبی بسیار اختصاصی عمل می کند و بعنوان یک آزمون استاندارد طلایی جهت تشخیص بیماری است اما جهت تشخیص به شش تا دوازده هفته زمان نیاز دارد (۱، ۳). این مطالعه نشان داد که میزان آلودگی به روش رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون بر روی نمونه هایی از دستگاه گوارش تقریباً ۶/۶۷٪ و به روش آزمون واکنشی زنجیره ای پلیمرز ۲۶/۶۷٪ بود که بر اساس آزمون مک نمار اختلاف آماری معنی داری بین رنگ آمیزی اختصاصی بافتی زیل نلسون و PCR وجود دارد (۰/۰۰۱ < p)، اما اختلاف آماری معنی داری بین فراوانی آلودگی با متغیرهایی همچون سن، جنس، نژاد مشاهده نشد (۰/۰۵ > P). بر اساس نتایج مطالعه حاضر تعداد ۶ نمونه (۶/۶۷٪) با هر دو آزمایش رنگ آمیزی اختصاصی و واکنش زنجیره ای پلیمرز مثبت و تعداد ۶۶ نمونه ۷۷/۳۳ درصد در هر دو روش تشخیص منفی گزارش

(نگاره ۲). در قسمت هایی از ایلنوم دژنراسیون و نکروز ویلای و در ناحیه زیر مخاط ادم مشاهده شد. در مخاط ژورنوم این ضایعات چندان واضح نبود. همچنین در بخش قشری زیر کپسول تعدادی از عقده های لنفاوی ایلنوسکال پلاسماسل، ماکروفاژ و جایانت سل مشاهده شد.



نگاره ۱- ماکروفاژهای حاوی باکتری اسید فاست (پیکان) و تشکیل اپی تلوئید (پیکان). سلول های جایانت (سر پیکان) در ناحیه مخاط پهن شده ایلنوم. Ziehl- Neelsen × 1000



نگاره ۲- افزایش ماکروفاژهای حاوی اسید فاست و تشکیل اپی تلوئید (پیکان). Ziehl- Neelsen × 53

## بحث

سالیان درازی است که حضور بیماری یون در ایران تایید شده است و این بیماری خسارات غیر قابل جبرانی به صنعت دامپروری و دامداری کشور ما وارد می سازد. این بیماری انتشار جهانی داشته و به نظر می رسد شیوع آن در بعضی کشورها در حال افزایش است (۲). خوشبختانه در

حساسیت واکنش زنجیره ای پلیمرز به میزان زیادی به ارگانسیم موجود در بافت وابسته است (۱۷). نتایج تحقیق حاضر نمایانگر توانایی و دقت آزمایش طراحی شده برای تشخیص و تکثیر مناسب ژن IS900 در مخلوط واکنش می باشد. به دلیل آن که ژنوم میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس دارای ۱۰ کپی از ژن IS900 می باشد (۳، ۱۴) لذا تکثیر ژن مذکور با PCR توان تشخیص بیماری یون را حتی در مراحل اولیه بیماری که تعداد میکروارگانسیم ها ناچیز است دارا می باشد با توجه به نتایج حاضر و ضریب کاپا می توان ادعا کرد که روش واکنش زنجیره ای پلیمرز آشیانه ای نسبت به رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است. از اینرو شناسایی دام های آلوده بدون علائم بالینی در یک گله بیشترین اهمیت را در اپیدمیولوژی یک بیماری دارد. به علت جنبه های خاص بیماری یون از جمله دوره کمون طولانی و عدم آگاهی کافی از خطرات اشکال تحت بالینی آن موجب شده تا دامداران توجه کمتری نسبت به اهمیت بیماری یون داشته باشند و برای کنترل این بیماری آگاه نمودن آنها جهت آشنایی با این بیماری ضروری است (۳، ۵، ۱۳) چرا که بیماری یون به علت خسارات اقتصادی و بهداشتی به صنعت دامداری کشور و حذف زودرس مبتلایان ضریب پایین تبدیل غذایی در دام های مبتلا کاهش باروری، کاهش تولید شیر و هزینه بالای مصرف داروهای گوناگون در اثر تشخیص نادرست بیماری و ضبط لاشه های مبتلا در کشتارگاه از اهمیت بسزایی برخوردار است.

### تشکر و سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای دکتر مصطفی فغانی عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جهت انجام محاسبات آماری کمال سپاس دارد.

شد. که بر این اساس توافق کلی بین دو روش تشخیص ۸۰ درصد و ضریب کاپا ۰/۳۳ محاسبه شد که نشان می دهد بین این دو روش توافق ضعیفی وجود دارد ( $p < 0.01$ ). نمونه هایی که واکنش زنجیره ای پلیمرز مثبت اما رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون منفی نشان داد به عنوان منفی کاذب در نظر گرفتیم که حدود ۲۰ درصد موارد را به خود اختصاص می دهد. بنابراین آزمایش رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون ۲۰ درصد از موارد مثبت را نتوانست تشخیص دهد که علت این امر حضور آلودگی تحت بالینی بدون نشان دادن علائم بیماری است. از این رو واکنش زنجیره ای پلیمرز آشیانه ای - (Nested PCR) یک روش ایده آل برای تشخیص بیماری یون است و می تواند حساسیت آزمون را تا ۱۰ درصد افزایش دهد (۳). استفاده از DNA تخلیص شده میکوباکتریوم اویوم به عنوان نمونه کنترل منفی در این مطالعه از ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری کرد. Huntley و همکاران در مطالعه ای بر روی ۱۴ گاو میش کوهان دار آمریکایی که مشکوک به بیماری یون بودند به مقایسه ۶ روش کشت مدفوع، کشت بافت، واکنش زنجیره ای پلیمرز، رنگ آمیزی زیل نلسون، رنگ آمیزی اورامین، رنگ آمیزی ایمینو هیستوشیمی جهت تشخیص باکتری پرداختند. تعداد موارد مثبت شده در کشت مدفوع شامل ۵ مورد از ۱۴ مورد (۳۷/۵٪) در کشت بافت ۱۲ مورد (۸۵/۷٪) در واکنش زنجیره ای پلیمرز، ۱۴ مورد (۱۰۰٪) بود. همچنین رنگ آمیزی زیل نلسون و اورامین به ترتیب ۷ مورد (۵۰٪) و ۵ مورد (۳۷/۵٪) حیوانات مبتلا شناسایی شدند. در رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی ۵۳ تا ۹۳٪ از حیوانات شناسایی شدند. نتایج Huntley و همکاران نشان داد که تست واکنش زنجیره ای پلیمرز حساس تر از کشت باکتریایی یا رنگ آمیزی است و این تست قابل اعتماد ترین تکنیک در شناسایی حیوانات آلوده و بهترین راه تایید تشخیص عفونت با باکتری عامل بیماری یون است (۱۰)، که با مطالعات Sivakumar و همکاران (۲۰۰۶) و مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج Whittington و همکاران بر روی بافت های نشخوارکنندگان مبتلا به یون نشان داد میزان

## فهرست منابع

- from *Mycobacterium avium*. *Vet Microbiol*; 65(3):209-13.
- 10- Huntley, J. F., Whitlock, R.H., Bannantine, J.P., stable, J.P. (2005): comparison of diagnostic dedection Methods For *Mycobacterium avium* sub sp. Paratuberculosis in Nort American bison. *vet Pat* . 42(1): 42-51
- 11- Motiwala, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J., Kapur, V and Sreevatsan,S. (2004): Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates recovered from wild animal species. *J Clin Microbiol*,42(4):1703-12.
- 12- Radosttis, O.M., Gay, C.C, Hinchliff, K.W and Constable, P. D. (2007): *Veterinary medicine A textbook cow, sheep, goats and hourses (10<sup>th</sup> ed) . saunders elsevier. 1017-1030*
- 13- Sevilla, I, Li L., Amonsin, A., Garrido, J.M., Geijo,M.V., Kapur,V. and Juste, R.A. (2008): Comparative analysis of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. *BMC. Microbiol.* 25(8):204.
- 14- Sivakumar, P., Tripathi, B.N., Singh, N and Sharma, A.K. (2006): Pathology of naturally occurring paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet. Pathol. Jul.* 43(4):455-62.
- 15- Wells, J.E., Bosilevac J.M., Kalchayanand, N., Arthur, T.M., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L and Koohmaraie., M. (2009): Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in ileocecal lymph nodes and on hides and carcasses from cull cows and fed cattle at commercial beef processing plants in the United States. *J Food Prot.*;72(7):1457-62.
- 16- Whipple, D.L., Callihan, D.R and Jarnagin, J.L. (1991): Cultivation of *Mycobacterium* paratuberculosis from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diagn Invest* ;3(4):368-73.
- 17- Whittington, R.J., Reddacliff, L., Marsh, I and Saunders, V. (1999): Detection of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 77(6):392-7.
- ۱- سیدین، م. ح. تاجبخش، ح. زهرایی صالحی، ت. شناسایی مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه های مدفوع گاوهای نژاد هولشتاین- فریزین با استفاده از روش های کشت و مولکولی. *مجله تحقیقات دامپزشکی* ۱۳۸۹، ۶۵ (۲): ۱۳۵-۱۴۰
- ۲- نادعلیان، م. ق. حسنی طباطبائی، ع. م و میرعارفین، م. (۱۳۷۵). مطالعه گذشته نگر خسارات اقتصادی ناشی از بیماری یون گاو در گاوداری اطراف تهران. *مجله پژوهش و سازندگی*. ۳۳ (۴): ۱۲۶-۱۲۹
- ۳- نصیری، م. ر. جهاندار، م. ح. سلطانی، م. مهدوی، م و دوستی، م. (۱۳۹۱): شناسایی و تعیین سویه مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (MAP) به روش REA و PCR بر اساس قطعات درون جایگیر IS1311 و IS900. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱ (۴): ۸۳-۹۵.
- 4- Begg, D.J., O'brien, R., Mackintosh, C.G and Griffin J.F. (2005): Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect Immun*, 73(9):5603-11.
- 5- Brown, C.C., Baker,D. C., and Barker\_K. (2007): *Alimentary system: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. Baker D C, Barker I K, Brown CC, Caswell JL, Wittiams KJ. Volume 2. (5<sup>th</sup> ed):222-230*
- 6- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J and Merkal R.S. (1984): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet*, 74(3):218-62.
- 7- Clarke, C.J. (1997): The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol.* 116(3):217-61.
- 8- De Meneghi, D., Nebbia, P., Robino, P and Zoppi, S. (2006): detection and excretion pattern of *Mycobacterium avian* subspecies paratuberculosis of milk of asymptomatic sheep and goats by nested-PCR. *ScienceDirect*; 66:116-120.
- 9- Dei, R., Tortoli, E., Bartoloni, A., Simonetti, M.T and Lillini , E. (1999): HPLC does not differentiate *Mycobacterium* paratuberculosis