شناسایی مایکوباکتریوم اویوم 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 پلیمراز

حسن کریمی [۱]، عبدالرسول نامجو [*۲]، حسن ممتاز [۲]، محمدرضا نامداری [۱]

چکیده

بیماری یون نوعی التهاب مزمن روده ای شدید و پیشرونده است که دستگاه گوارش نشخوارکنندگان اهلی، وحشی و تک سمی‌ها را درگیر می سازد. این مطالعه به منظور تشخیص مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز و رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون بر روی نمونه های بافتی ایلئوم انتخاب شده از گاوهای کشتارشده در کشتارگاه شهرکرد انجام شد. نتایج آزمایش رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون و واکنش زنجیره ای پلیمراز آشیانه ای بترتیب آلودگی ٦/٦٧ ٪ و ٢٦/٦٧٪ را نشان داند. آزمون آماری مک نمار نشان داد که حساسیت آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز بیش از رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون است ($p < ۰/۰۰۱$). میزان توافق کلی بین دو روش ۸۰ درصد و ضریب کاپا ۰/۳۳ محاسبه شد که نشان دهنده توافق ضعیف است ($p < ۰/۰۱$). همچنین رابطه معنی داری بین آلودگی با جنس، نژاد و سن مشاهده نشد($p > ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که آزمون واکنش زنجیرهای پلیمراز 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 پلیمراز*

تاریخ دریافت: ۹۰/٦/١٦ 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، گاومیش آمریکایی، شتر، بوفالو، لاما، گوزن یال دار آفریقایی، گوشتخواران، پرندگان وحشی و بندرت در تک سمی‌ها آلودگی ایجاد می‌کند(١٣،١٤، ١١، ٧، ٥).

مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس عامل بیماری یون است که به اختصار مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس نامیده می‌شود(١٢). 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 درعفونت 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(١٤). از مشخصات پاتولوژیک می‌توان التهاب مزمن گرانولوماتوز ایلئوم، کولون و التهاب عروق لنفاوی و عقده های لنفاوی مزانتریک را اشاره کرد (١٤،۵). مایکو باکتریوم اویوم 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(٦). 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(١٢) 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 (٩،١٢). تکثیر و تزاید ارگانیسم در مخاط روده سبب بروز یک پاسخ گرانولوماتوزی در قسمت انتهایی ایلئوم می‌گردد. این

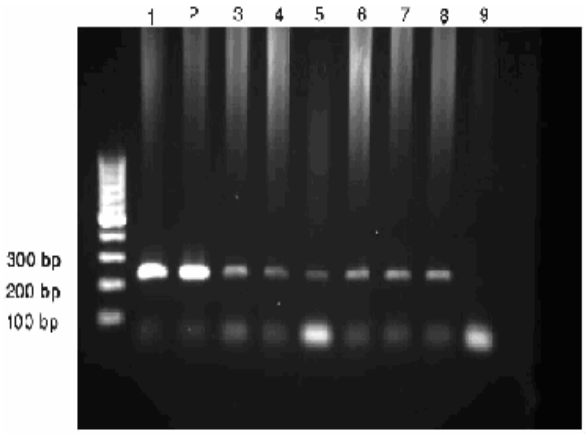
۱- دانش آموخته دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد،ایران
*۲- گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران ar.namjo72@gmail.com

افزایش ضخامت به دلیل تکثیر و تزاید ماکروفاژها و تشکیل سلول‌های اپی تلوئید در لایه های پائینی مخاط و زیر مخاط روده می‌باشد (۵،۱٤). 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 وحامل مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس بوده و علائم تیپیک 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 وخشن 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 میکروسکوپیک مستقیم مدفوع روش سریع و ارزانی است 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 اویوم پاراتوبرکلوزیس به روش رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون و واکنش زنجیره ای پلیمراز 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 برروی 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 نمونه ها، مراحل مختلف آبگیری، شفاف سازی و تهیه بلوک های پارافینی انجام و با تهیه مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون و پس از رنگ آمیزی اختصاصی زیل نلسون (۱٤) با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. حضور لنفوسیت‌ها، 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 اطرافی عقده لنفاوی بعنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شد (۵،۱٤). همچنین قسمتی از انتهای ایلئوم جهت انجام آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز تا زمان آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد (۱) نگهداری شدند. برای این منظور از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNP^{TM} KIT DNA Purification) استفاده شد. بدین صورت که طبق دستور کارخانه سازنده پس از استخراج DNA تا زمان

انجام واکنش واکنش زنجیره ای پلیمـراز، DNA در فریـزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. البته با توجه به غلظـت بـالای عوامـل بازدارنـده ی PCR دربافـت ، قبـل از اسـتخراج DNA، نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق سازی شدند. آزمـایش Nested-PCR با استفاده از زوج پرایمر هـای طراحـی شـده 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 پلیمراز با استفاده ازبازهای پرایمری جفت شده با وزن ۲۳۰ کیلودالتون ساخت شرکت سیناژن ومقایسه آن با نمونه های آلوده با مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس (ستون ۱ تا ۸) وگروه 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 شـد. کنترل مثبت یک تیوپ PCR می‌باشد که بجای DNA نمونه مـورد آزمـایش از DNA سـویه اسـتاندارد بـاکتری مـذکور اسـتفاده شـده اسـت و تیـوپ کنتـرل منفـی دارای کلیـه واکنشگرهای PCR بجز DNA الگو می‌باشد که هم حجم آن آب مقطر اضافه گردید.

PCR مرحله اول: توالی پرایمرهـای مـورد اسـتفاده در ایـن مرحله به صورت زیر است:

ISo-1F: 5'-GTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3'
ISo-1R: 5'-GAGGTCGATCGCCCACGTGA-3'

واکنش گرهای مربوط به PCR مرحله اول در حجـم نهـایی ۲۵ میکرولیتر با هم مخلوط گردیدند. این مخلوط شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA ی الگو، ۰/۲ میکرومـول از هـر پرایمـر، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix ، ۱/۵ میکرومول MgCl2 و ۲/۵ میکرولیتـر بـافر PCR و ۲/۵ واحـد از آنـزیم Taq DNA Polymerase که همگی از شرکت سیناژن ایـران تهیـه شـده بودند. ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید.

واکنش‌گرهای PCR روی یـخ بـا هـم مخلـوط و بلافاصـله نمونه‌ها در دستگاه ترموسـایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) قـرار داده مـی شـدند و برنامـه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقـه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹٤ درجـه سـانتی گـراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گـراد ۵ دقیقـه تنظیم گردید.

PCR مرحله دوم: توالی پرایمرهای این مرحله بـه صـورت زیر است:

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

در این مرحله همه شرایط اعم از مخلـوط واکـنش گرهـای PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق مرحله اول می باشد بـا ایـن تفـاوت کـه DNA الگـوی مـورد اسـتفاده شـامل ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول می باشد که به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق می‌گردد و به مخلوط واکنش اضافه می شود. سپس محصولات PCR با ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفـورز گردید و توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و با اسـتفاده از نور UV مورد ارزیـابی قـرار گرفـت. وجـود قطعـه ۲۳۰ جفت بازی پس از PCR نمایانگر آلوده بـودن نمونـه هـا بـا مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس است. بـه منظـور اطمینـان از عدم وجود موارد مثبت کاذب از DNA تخلیص شده مـایکو باکتریوم اویوم به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد. جهت آنالیز اطلاعات ابتدا داده هـا وارد جـدول SPSS شـده و بـا استفاده از برنامه کا اسکوار و مـک نمـار بـه ترتیـب جهـت ارتباط آلودگی با متغییرهای سـن، جـنس و نـژاد و مقایـسه

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

نتایج

در این مطالعه کشتارگاهی، ازبین ۹۰ گاو نمونه‌گیری شده تعداد ٦ راس (٦/٦٪) به روش رنگ‌آمیزی اختصاصی هیستوپاتولوژیک و ٢٤ راس (٢٦/٦٧ ٪) به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آلوده به مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس بود. شش مورد در هر دو روش مثبت و ٦٦ مورد در هر دو روش تشخیصی منفی گزارش شد. توافق دو روش رنگ‌آمیزی اختصاصی زیل نلسون و واکنش زنجیره ای پلیمراز ۸۰ درصد محاسبه، و بر اساس محاسبه آماره ضریب کاپا (۰/۳۳) اعلام شد که می‌توان گفت توافق دو روش در حد ضعیفی است (p<۰/۰۱). همچنین آزمون مک نمار اختلاف دو روش تشخیصی را بسیار معنی دار دانسته است (p<۰ /۰۰۱). 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 معنی‌دار مشاهده نشد(p>۰ /۰۵).

جدول ۱ـ توزیع فراوانی مطلق و نسبی گاو های سالم و آلوده بر اساس متغیرهای جنس، نژاد، سن در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه صنعتی جونقان در سال ۹۰-۸۹

متغیر / گاوهای نمونه گیری شده	جنس		نژاد		سن			
	نر	ماده	بومی	هولشتاین	۱-۳	۳/۵-۵	۵/۵-۷	>۷/۵
سالم	۲۵ (٪٦٩/٥)	٤١ (٪٧٦)	٢٤ (٪٧٥)	٤٢ (٪٧٢/٥)	۳۹ (٪٧٣/٦)	۱۳ (٪٦٨/٤٢)	۱۰ (٪٧٧)	٤ (٪٨٠)
آلوده	۱۱ ۳۰/٥	۱۳ (٪٢٤)	۸ (٪٢٥)	١٦ (٪٢٧/٥	١٤ (٪٢٦/٤)	٦ (٪٣١/٥٨)	۳ (٪٢٣)	۱ (٪٢٠)
جمع کل	٣٦	٥٤	٣٢	٥٨	٥٣	١٩	١٣	٥

داده‌ها بر اساس تعداد می‌باشد.

بین متغییرها بر اساس آزمون کا اسکوار اختلاف آماری معنی دار مشاهده نشد (P >۰ /۰۵).

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

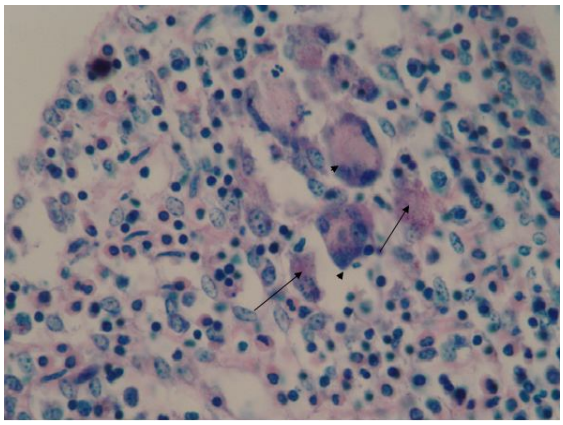
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز / رنگ آمیزی زیل نلسون	مثبت		منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	درصد	فراوانی	فراوانی	درصد
مثبت	٦	٢٥	۰	۰	٦	٦/٦٧
منفی	١٨	٧٥	٦٦	١٠٠	٨٤	٩٣/٣٣
جمع	٢٤	١٠٠	٦٦	١٠٠	٩٠	١٠٠

نتیجه آزمون مک نمار نشان می‌دهد بین دو روش تشخیص آلودگی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس اختلاف آماری بسیار معنی داری وجود دارد (۰۰۱/ p<۰).

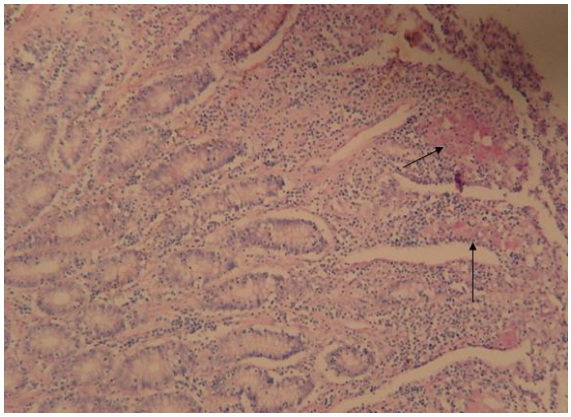
یافته‌های هیستوپاتولوژیک

مطالعات میکروسکوپیک مقاطع ایلئوم در گاوهای آلوده به مایکوباکتریوم پارا توبرکلوزیس یک آنتریت گرانولوماتوز مزمن رانشان 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 سلول‌های آماسی مزمن باعث پهن شدن خمل‌های روده و تحلیل غدد لیبرکوهن شده بود

(نگاره ۲). در قسمت‌هایی از ایلئوم دژنراسیون و نکروز ویلای و در ناحیه زیر مخاط ادم مشاهده شد. در مخاط ژوژنوم این ضایعات چندان واضح نبود. همچنین در بخش قشری زیر کپسول تعدادی از عقده‌های لنفاوی ایلئو سکال پلاسماسل، ماکروفاژ و جایانت سل مشاهده شد.



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



نگاره ۲ـ 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 می‌سازد. این بیماری انتشار جهانی داشته و به نظر می‌رسد شیوع آن در بعضی کشورها در حال افزایش است(۲). خوشبختانه در 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 می‌شود. در این مطالعه به شناسایی مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه بافتی ایلئوم با استفاده از تکنیک‌های هیستوپاتولوژیک و مولکولی بدون توجه به علائم کلینیکی پرداخته شد که به روش رنگ آمیزی زیل نلسون ٦/٦٧٪ از کل نمونه‌ها، مثبت تشخیص داده شدکه با توجه به نتایج بدست آمده به روش Nested-PCR، فراوانی نسبی دام‌های آلوده به روش رنگ‌آمیزی زیل نلسون نسبت به روش Nested-PCR پایین است. امروزه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بعنوان یک روش جدید در تشخیص مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس است اما در خصوص حساسیت و ویژگی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گزارشات مختلف بیان می‌شود(۱، ۳،١٤) و همچنان روش کشت میکروبی بسیار اختصاصی عمل می‌کند 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 رنگ‌آمیزی اختصاصی زیل نلسون برروی نمونه‌هایی از دستگاه گوارش تقریبا ٦/٦٧٪ و به روش آزمون واکنشی زنجیره‌ای پلیمراز ٢٦/٦٧٪ بود که بر اساس آزمون مک نمار اختلاف آماری معنی‌داری بین رنگ‌آمیزی اختصاصی بافتی زیل نلسون و PCR وجود دارد($p<۰/۰۰۱$)، اما اختلاف آماری معنی داری بین فراوانی آلودگی با متغیرهایی همچون سن، جنس، نژاد مشاهده نشد($P>۰/۰۵$). بر اساس نتایج مطالعه حاضر تعداد ٦ نمونه (٦/٦٧ ٪) با هر دو آزمایش رنگ‌آمیزی اختصاصی و واکش زنجیره‌ای پلیمراز مثبت و تعداد ٦٦ نمونه ٧٧/٣٣ درصد در هر دو روش تشخیص منفی گزارش

شد. که بر این اساس توافق کلی بین دو روش تشخیص ۸۰ درصد و ضریب کاپا ۰/۳۳ محاسبه شد که نشان می‌دهد بین این دو روش توافق ضعیفی وجود دارد (p<۰/۰۱). نمونه‌هایی که واکنش زنجیره ای پلیمراز 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 می‌دهد. 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 پلیمراز آشیانه‌ای - (Nested PCR)یک روش ایده آل برای تشخیص بیماری یون است و می‌تواند حساسیت آزمون را تا ۱۰ درصد افزایش دهد(۳). استفاده از DNA تخلیص شده مایکو باکتریوم اویوم به عنوان نمونه کنترل منفی در این مطالعه از ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری کرد. Huntley و همکاران در مطالعه ای برروی ۱٤گاو میش کوهان دارآمریکایی که مشکوک به بیماری یون بودند به مقایسه ٦ روش کشت مدفوع، کشت بافت، واکنش زنجیره ای پلیمراز ، رنگ آمیزی زیل نلسون، رنگ آمیزی اورامین، رنگ آمیزی ایمینو هیستوشیمی جهت تشخصص باکتری پرداختند. تعداد موارد مثبت شده در کشت مدفوع شامل ۵ مورد از ۱٤ مورد (۳۷/۵٪) در کشت بافت ۱۲ مورد (۸۵/۷٪) در واکنش زنجیره ای پلیمراز ، ۱٤ 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 زنجیره‌ای پلی مراز حساس‌تر 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(۲۰۰٦) و مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج Whitington و همکاران بر روی بافت‌های نشخوارکنندگان مبتلا به یون نشان داد میزان حساسیت واکنش زنجیره ای پلیمراز به میزان زیادی به ارگانیسم 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 می‌باشد. به دلیل آن که ژنوم مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس دارای ۱۰ کپی از ژن IS900 می‌باشد(۳، ۱٤) لذا تکثیر ژن مذکور با PCR توان تشخیص بیماری یون را حتی در مراحل اولیه بیماری که تعداد میکروارگانیسم ها ناچیز است دارا می‌باشد با توجه به نتایج حاضر و ضریب کاپا می‌توان ادعا کرد که روش واکنش زنجیره ای پلیمراز آشیانه ای نسبت به رنگ‌آمیزی اختصاصی زیل نلسون از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است. از اینرو شناسایی دام‌های 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 دام‌های 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 شهرکردجهت انجام محاسبات آماری کمال سپاس دارد.

فهرست منابع

۱- سیدین، م .ح. تاجبخش، ح. زهرایی صالحی، ت. شناسایی مایکباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه های مدفوع گاوهای نژاد هولشتاین- فریزین با استفاده از روش های کشت و مولکولی. مجله تحقیقات دامپزشکی ۱۳۸۹، ٦٥ (۲): ۱٤۰-۱۳٥

۲-نادعلیان، م.ق. حسنی طباطبائی، ع. م و میرعارفین، م . (۱۳۷٥). مطالعه گذشته نگر خسارات اقتصادی ناشی از بیماری یون گاوی در گاوداری اطراف تهران. مجله پژوهش و سازندگی. ۳۳(٤). ۱۲٦-۱۲۹

۳-نصیری، م . ر. جهاندار، م . ح. سلطانی، م. مهدوی، م و دوستی، م.(۱۳۹۱): شناسایی و تعیین سویه مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (MAP) به روشREA و PCR بر اساس قطعات درون جایگیر IS900 و IS1311 . مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱ (٤):۸۳-۹٥.

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. (5th 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 from Mycobacterium avium. Vet Microbiol; 65(3):209-13.

10- Huntley, J. F., Whitlock, R.H., Bannantine, J.P., stable, J.P. (2005): cornparison 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 (10th 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.