

بررسی هیستوپاتولوژیک، مولکولی و سرولوژیک بیماری یون در گاو میش‌های کشتارگاه شهر اهواز

مجتبی اعتصامی^۱، بابک محمدیان^{۲*}، صالح اسماعیل‌زاده^۳، مسعود قربانپور^۴،
محمد رحیم حاجی‌حاجیکلایی^۵ و مهدی پورمهدی بروجنی^۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۲

چکیده

بیماری یون (پاراتوبرکلوزیس) نوعی آنتریت گرانولوماتوز، پیش‌رونده، غیر قابل درمان به ویژه در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی است که به وسیله‌ی میکوباکتریوم آویوم تحت گونه‌ی پاراتوبرکلوزیس ایجاد می‌شود. اطلاعات آماری دقیقی از شیوع بیماری یون در جمعیت گاو میش‌های مناطق مختلف کشور در دسترس نیست. این مطالعه به منظور تشخیص میکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس با روش‌های مختلف تشخیصی شامل: الایزا، PCR، هیستوپاتولوژی و مقایسه‌ی آن‌ها با هم انجام شده است. به این منظور از دی ۱۳۹۵ لغایت مهر ۱۳۹۶ نمونه‌های بافتی از گره‌ی لنفوی ایلئوسکال، دریچه‌ی ایلئوسکال، کبد و همچنین نمونه‌ی خون از ۹۷ رأس گاو میش لاغر کشتار شده با سن بالای دو سال جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. آزمون سرمی میزان آلودگی را ۴/۱ درصد، آزمون مولکولی میزان آلودگی در روده را ۳۲، در عقده‌ی لنفوی ۳۱ و در کبد ۲۴/۷ درصد و آزمون هیستوپاتولوژی با رنگ‌آمیزی اختصاصی زیل-نلسون میزان آلودگی در روده ۷/۲، عقده‌ی لنفوی ۸/۲ و در کبد نیز ۳/۱ درصد نشان داد. با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین در روده‌ی ۱۱ رأس از گاو میش‌ها ضایعات گرانولوماتوزی مشاهده شد ولی فقط نتیجه‌ی آزمون مولکولی ۹ رأس از آن‌ها مثبت بود. سایر یافته‌های هیستوپاتولوژی شامل آنتریت ائوزینوفیلیک، آنتریت لنفوسیتیک، آنتریت گرانولوماتوز، آنتریت موکوسی چرکی به ترتیب به میزان ۳۷/۹ درصد، ۲۹/۳ درصد، ۱۹ درصد، ۱۳/۸ بود. در عقده‌ی لنفوی نیز ۶۸/۶ درصد لنفادنیت گرانولوماتوز، ۲۵/۷ درصد لنفادنیت چرکی و در کبد ۳۲/۶ درصد هپاتیت مزمن، ۱۱/۹۶ درصد هپاتیت مزمن انگلی، ۲۳/۹ درصد پری هپاتیت، ۶/۵ درصد سیروز و ۲۵ درصد لیومیوم مشاهده شد. با توجه به عدم مشاهده‌ی باسیل‌های اسیدفست تیپیک در مطالعه‌ی حاضر می‌توان موارد مشاهده شده‌ی بیماری یون را فرم paucibacillary (اندک باسیلی) تلقی نمود. در عین حال افزایش میزان آلودگی گاو میش‌های شهر اهواز نسبت به مطالعه‌ی قبلی نیازمند توجه جدی‌تر مراجع علمی و اجرایی است.

کلمات کلیدی: بیماری یون، هیستوپاتولوژی، سرولوژی، مولکولی، گاو میش

مقدمه

گاو میش با ویژگی‌های خاص نظیر استفاده از منابع غذایی ارزان، توان بالای سازگاری با محیط و تولید گوشت و شیر با ارزش می‌تواند تحول بزرگی در اقتصاد روستاییان ایجاد کند. دستگاه گوارش از مهم‌ترین دستگاه‌های بدن جانوران محسوب شده و عملکرد مطلوب آن برای ادامه‌ی حیات و کارآیی سایر دستگاه‌های

^۱ دانشجوی دکتری پاتولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: mohammadb@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

^{۲*} دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۵ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۶ دانشیار گروه بهداشت و مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

گردد. ابتدا نوتروفیل‌ها در زیر مخاط محل حضور باکتری‌ها تجمع کرده، در نهایت ماکروفاژها شروع به فاگوسیتوز عامل بیماری می‌نمایند. این باکتری درون ماکروفاژ زنده مانده و به تکثیر خود ادامه می‌دهد. تکثیر و تزايد ارگانیزم در ماکروفاژهای مخاط روده سبب بروز پاسخ گرانولوماتوز همراه با تکثیر و تزايد ماکروفاژها، تشکیل سلول‌های اپی‌تلیوید، سلول‌های غول‌پیکر در پارین و تا حدودی زیر مخاط روده به خصوص در انتهای ایلئوم شده و به افزایش ضخامت مخاط روده و ایجاد سوء جذب می‌انجامد (Baker et al. 2007).

بیماری یون بسته به شدت علائم بالینی، پتانسیل دفع ارگانیزم و تشخیص با استفاده از روش‌های رایج به چهار مرحله‌ی نهفته، تحت‌بالینی، بالینی و بالینی پیشرفته طبقه‌بندی می‌شود (Sohal et al. 2007, Heydamejhad et al. 2017). علائم بالینی در گاو میش مانند گاو شامل لاغری مفرط، اسهال آبکی متناوب یا مداوم و دهیدراتاسیون علی‌رغم دما و اشتهای طبیعی است (Kulsresthal et al. 1980).

در کالبدگشایی افزایش ضخامت مخاط روده همراه با چروکیدگی به علاوه‌ی تورم گره‌های لنفوی مزانتریک مربوطه به خصوص در یک سوم انتهایی ایلئوم دیده می‌شود. در موارد پیشرفته عروق لنفوی در زیر لایه‌ی سروزی به خصوص در سطح مزانتر اغلب برآمده، متسع و ضخیم هستند (Yegani 1998).

این مطالعه به منظور ارزیابی سرمی و مولکولی بیماری یون و ارتباط احتمالی آن با ضایعات پاتولوژیک در روده‌ها و کبد در گاو میش‌های کشتار شده در کشتارگاه اهواز انجام شد.

مواد و روش کار

با مراجعات تدریجی به کشتارگاه صنعتی اهواز در دوره‌ی زمانی نه ماهه (از دی ۱۳۹۵ لغایت مهر ۱۳۹۶) ۹۷ رأس گاو میش لاغر و با سن بالای دو سال از هر دو جنس جهت نمونه‌گیری انتخاب شدند. نمونه‌ی خون گاو میش‌ها بلافاصله پس از ذبح آن‌ها از ورید وداج اخذ

بدن ضروری است. شناسایی بیماری‌های گاو میش و عوامل ایجادکننده‌ی آن‌ها می‌تواند در افزایش راندمان تولید شیر و گوشت و بهبود پرورش این حیوان اقتصادی، اهمیت فوق‌العاده‌ای داشته باشد (Rajabian Gharib and Khosravi Pour 2016).

عوامل بیماری‌زای متعددی باعث ایجاد اختلال در عملکرد دستگاه گوارش این حیوان می‌شود که یکی از مهم‌ترین این موارد بیماری یون است. بیماری یون (پاراتوبرکلوز) نوعی آتریت گرانولوماتوز، پیشرونده و غیرقابل درمان است که توسط مایکوباکتریوم اوپوم تحت گونه‌ی پاراتوبرکلوزیس^۱ عارض می‌شود (Sivakumar et al. 2006).

MAP یک باکتری هوازی اجباری، مقاوم به اسید و درون سلولی اختیاری است که برای رشد به آهن و مایکوباکتین^۲ نیاز داشته و رشد کندی دارد (Yegani 1998). میزبان‌های طبیعی باکتری مزبور گاو، گاو میش، لاما، گوسفند، بز، گوزن قرمز و خانواده‌ی شتر هستند (Tiwari et al. 2006). مرحله‌ی پیش‌بالینی بیماری یون طولانی بوده و درمان، بی‌نتیجه و غیراقتصادی است. پاراتوبرکلوز از نظر سازمان جهانی بهداشت دام^۳ در گروه B قرار گرفته و سبب محدودیت‌های تجاری می‌شود (OIE 2014).

معمول‌ترین راه ابتلا به بیماری یون، آلودگی مدفوعی-دهانی دام‌های جوان با عامل بیماری است. باکتری از راه دهان وارد دستگاه گوارش می‌شود و معمولاً در مخاط روده‌ی کوچک، گره‌های لنفوی مزانتریک و به میزان کم-تری در لوزه‌ها و گره‌های لنفوی حلق مستقر شده و توسط سلول‌های M به زیر مخاط روده منتقل می‌شود (Momotani et al. 1998). حضور باکتری در پارین و زیر مخاط روده‌ی کوچک باعث بروز واکنش آماسی می‌-

- 1- *Mycobacterium avium* sub sp. *paratuberculosis* (MAP)
- 2- Mycobactin
- 3- World Health Organization

الایزا (Accureader, Taiwan) جهت تفسیر برای هر نمونه، درصد S/P طبق فرمول زیر محاسبه و با توجه به دستورالعمل کیت موارد مثبت، مشکوک و منفی تفکیک شدند.

درصد S/P = [(جذب نوری کنترل مثبت - جذب نوری کنترل منفی) / (جذب نوری نمونه - جذب نوری کنترل منفی)] × ۱۰۰

استخراج DNA از بافت با استفاده از کیت تجاری (سیناژن، ایران) انجام شد. برای این کار طبق دستورالعمل کیت، ابتدا ۲۵-۲۰ میلی گرم از بافت به وسیله تیغ اسکالپل تمیز جدا شده و درون میکروتیوب تمیز قرار داده شد. به هر میکروتیوب، ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز همراه با ۲۰ میکرولیتر ریبتیناز^۵ اضافه شد و با هدف تکمیل فرآیند هضم، به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در این مرحله میکروتیوبها چند بار با حداکثر سرعت به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردیدند. بقیه‌ی مراحل طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. DNAهای استخراج شده تا زمان انجام PCR در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جهت انجام PCR از توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنی اختصاصی MAP یعنی IS900 که در برخی مطالعات استفاده شده است (Anwar Khan et al. 2010, Chaturvedi et al. 2017, Sivakumar et al. 2006)، بهره‌گیری شد. توالی پرایمرهای پیش‌رو و معکوس به ترتیب 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3' و 5'-AATCAACTCCAGCAGCGCGCCTCG-3' بود اجزای مورد استفاده در هر واکنش، در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس^۶ (آمپلیکون، آلمان)، یک میکرولیتر از غلظت ۱۰ میکرومولار هر یک از پرایمرها، پنج میکرولیتر از هر یک از DNAهای استخراج شده و ۵/۵ میکرولیتر آب بود. جهت تکثیر ژن هدف پس از بهینه‌سازی، از برنامه‌ی دمایی شامل واسرشته-

گردید و درون لوله‌های فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. پس از باز شدن حفره‌ی بطنی و بازرسی ماکروسکوپی دقیق دریچه‌ی ایلتوسکال و گره‌ی لنفاوی مزانتریک مربوطه و نیز لب راست کبد، نمونه‌های بافتی مورد نیاز از محل‌های مزبور تهیه و در کیسه‌های نایلونی تمیز نگهداری گردید. لازم به ذکر است که بعد از نمونه‌گیری از هر لاشه، تیغ‌های اسکالپل مورد استفاده تعویض گردید. نمونه‌ها در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

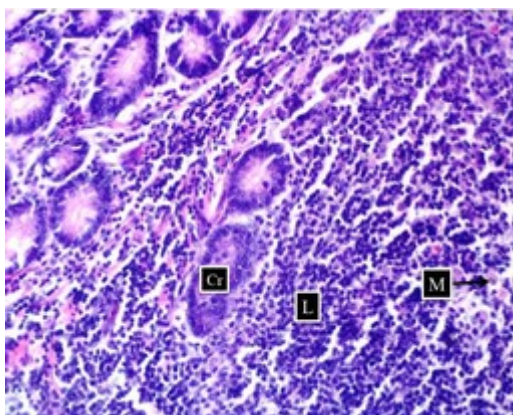
از هر یک از نمونه‌ها، برش‌هایی به قطر حداکثر یک سانتی‌متر تهیه شده و با استفاده از فرمالین بافر ۱۰ درصد، پایدار گردیدند. از نمونه‌های مزبور مطابق روش‌های معمول، مقاطع پارافینی به ضخامت پنج میکرومتر تهیه و به روش هماتوکسیلین-انوزین^۱ و در موارد مشکوک با استفاده از روش زیل‌نلسون^۲ رنگ‌آمیزی شدند.

نمونه‌های خون پس از رسیدن به دمای محیط، با سرعت ۴۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شده و سرم‌های حاصله تا زمان انجام الایزا در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آزمون الایزای غیر مستقیم با استفاده از کیت ساخت شرکت ID.VET^۳ فرانسه، پس از مجاورسازی نمونه‌های سرم با آنتی‌ژن مایکوباکتریوم فلئو^۴ جهت جلوگیری از ایجاد واکنش متقاطع انجام شد. سرم‌ها، طبق دستور شرکت سازنده، رقیق و همراه با کنترل‌های مثبت و منفی به گوده‌های پلیت اضافه شد و پس از ۴۵ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه و شستشو، کونزوگه به تمامی گوده‌ها اضافه گردید. در نهایت، پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه و شستشو، به گوده‌ها، کروموژن - سوبسترا افزوده شد و پس از ۱۵ دقیقه و اضافه کردن محلول متوقف‌کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر، جذب نوری هر گوده با دستگاه خواننده‌ی

- 1- Hematoxylin and Eosin (H&E)
- 2- Ziehl - Neelsen (ZN)
- 3- Innovative Diagnostics Veterinary
- 4- *Mycobacterium phlei*

5- Ribotinas
6- Master Mix

تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در نمونه‌های مبتلا به آنتریت لنفوسیتیک شامل نفوذ سنگین انبوهی لنفوسیت به همراه پلاسماسل‌ها، تعداد کمی ماکروفاژ در پرزها، در میان کریپت‌های لیبرکوهن (تصویر ۱) و زیر مخاط دریچه‌ی ایلئوسکال روده بود.



تصویر ۱: آنتریت لنفوسیتیک. به نفوذ گسترده لنفوسیت‌ها (L) همراه با معدودی ماکروفاژ (M) در پارین یکی از نمونه‌های روده توجه شود. کریپت لیبرکوهن (Cr). (رنگ آمیزی H&E، X20)

در ۱۱ مورد (۱۹ درصد) از نمونه‌ها آنتریت گرانولوماتوز تشخیص داده شد که همراه با نفوذ تعداد زیادی سلول‌های التهابی مانند ماکروفاژ، سلول‌های تی‌لیوید، سلول‌های غول‌پیکر لنفوسیت و پلاسماسل در پارین (تصویر ۲) و زیر مخاط روده بود. در ۷ مورد از آنها (۶۴ درصد)، اجرام اسیدفست گرانولی در سلول اپی‌تلیوید مشاهده گردید (تصویر ۳).

در بررسی نمونه‌های تهیه شده از گره‌ی لنفوی مزانتریک ۹۷ رأس گاومیش تحت مطالعه، در ۶۲ نمونه ضایعه‌ی مشهودی دیده نشد ولی در ۳۵ مورد ضایعاتی به شرح جدول ۲ مشاهده گردید.

سازی^۱ اولیه در دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر (۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه)، تکثیر (۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه) و تکثیر نهایی در ۷۲°C به مدت پنج دقیقه استفاده شد. در هر واکنش، جهت کنترل منفی از آب مقطر و از DNA استخراج شده از MAP (مؤسسه-ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ ایمن (سینازن، ایران)، در کنار نردبان ژنی ۱۰۰bp (سینازن، ایران) الکتروفورز شد.

نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه‌ی ۱۶ نرم‌افزار SPSS و با بهره بردن از آزمون‌های مربع کای و کوکران^۲ با درجه‌ی اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج پاتولوژی

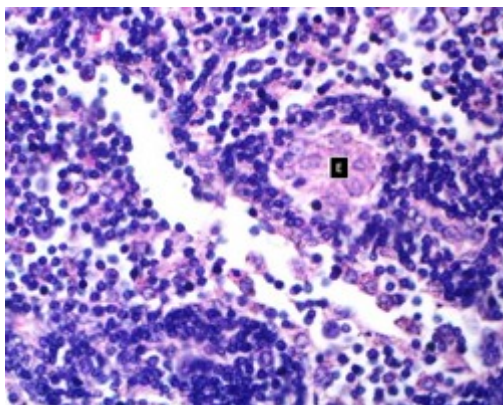
از نظر ظاهری درجات مختلفی از ضخیم شدگی مخاط دریچه‌ی ایلئوسکال همراه با چین‌خوردگی آن در ۸ نمونه مشاهده گردید. در بررسی میکروسکوپی نمونه‌های تهیه شده از دریچه‌ی مزبور، ضایعات متنوعی به شرح جدول ۱ در ۵۸ نمونه دیده شد.

جدول ۱: یافته‌های پاتولوژیک دریچه‌ی ایلئوسکال روده

نوع ضایعه	تعداد	درصد
آنتریت ائوزینوفیلیک	۲۲	۳۷/۹
آنتریت لنفوسیتیک	۱۷	۲۹/۳
آنتریت گرانولوماتوز	۱۱	۱۹
آنتریت موکوسی و موکوسی چرکی	۸	۱۳/۸
مجموع	۵۸	۱۰۰

- 1- Denaturation
- 2- Cochran's test

تعدادی سلول اپی‌تلوئید در ناحیه‌ی قشری (تصویر ۴) و در یک نمونه با حضور سلول غول‌پیکر همراه بود.



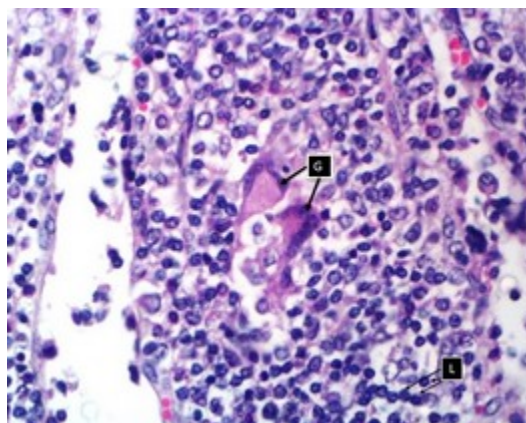
تصویر ۴: لنفادنیت گرانولوماتوز. سلول اپی‌تلیوئید (E) در ناحیه‌ی کورتکس گره لنفاوی مزانتریک (رنگ‌آمیزی H&E، X۴۰)

در بررسی نمونه‌های تهیه شده از کبد ۹۷ رأس گاومیش کشتار شده، تعداد ۶۱ کبد مورد مطالعه ضایعاتی به شرح جدول ۳ گزارش گردید. لازم به ذکر است در برخی کبدهای آسیب دیده بیش از یک ضایعه مشاهده شد.

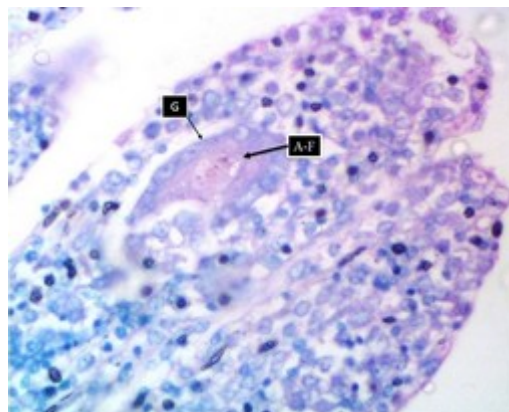
جدول ۳: یافته‌های پاتولوژیک کبد

ردیف	نوع ضایعه	تعداد	درصد
۱	هپاتیت مزمن	۳۰	۳۲/۶
۲	هپاتیت مزمن انگلی	۱۱	۱۱/۹۶
۳	پری هپاتیت	۲۲	۲۳/۹
۴	سیروز	۶	۶/۵
۵	لیومیوم	۲۳	۲۵
	مجموع	۹۲	۱۰۰

از ۲۲ مورد پری هپاتیت، ۱۰ مورد آن همراه با هپاتیت مزمن و ۲ مورد آن همراه با هپاتیت مزمن انگلی بود. از ۲۳ مورد لیومیوم، ۱۱ مورد آن همراه با هپاتیت مزمن و ۵ مورد آن همراه با هپاتیت مزمن انگلی بود. در دو مورد پری هپاتیت و یک مورد هپاتیت مزمن همراه لیومیوم



تصویر ۲: آنتریت گرانولوماتوز. به حضور دو سلول غول‌پیکر (G) همراه با تعداد زیادی لنفوسیت (L) در پارین یکی از نمونه‌های روده توجه شود (رنگ‌آمیزی H&E، X۴۰)



تصویر ۳: سلول غول‌پیکر (G) حاوی اجرام اسیدفست گرانولی (A-F) در یک پرز (رنگ‌آمیزی ZN، X۴۰)

جدول ۲: یافته‌های پاتولوژیک گره لنفاوی

ردیف	نوع ضایعه	تعداد	درصد
۱	لنفادنیت گرانولوماتوز	۲۴	۶۸/۶
۲	لنفادنیت چرکی	۹	۲۵/۷
۳	لیومیوم	۲	۵/۷
	مجموع	۳۵	۱۰۰

از ۲۴ مورد لنفادنیت گرانولوماتوز فقط در ۸ مورد از آن‌ها تنها در تعداد اندکی از سلول‌ها اجرام معدود اسیدفست گرانولی دیده شد. تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در گره‌ی لنفاوی مزانتریک دال بر حضور

در جدول ۴ نشان داده شد. ارزیابی و مقایسه‌ی سه روش تشخیصی در بافت‌های مختلف به ترتیب در جداول ۵، ۶ و ۷ بیان شده است.

اجرام اسیدفست در مقدار بسیار اندک در تعداد بسیار کمی از سلول‌های کوپفر مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی‌های پاتولوژی، سرولوژی و مولکولی بر روی نمونه‌های مربوط به ۹۷ رأس گاومیش

جدول ۴: نتایج سه روش تشخیصی بیماری یون در نمونه‌های مختلف اخذ شده از گاومیش‌های کشتار شده در اهواز

نوع بافت	آزمون	تعداد نمونه	تعداد موارد مثبت	درصد شیوع
روده	PCR	۹۷	۳۱	۳۲
	زیل نلسون	۹۷	۷	۷/۲
کبد	PCR	۹۷	۲۴	۲۴/۷
	زیل نلسون	۹۷	۳	۳/۱
گره لنفاوی	PCR	۹۷	۳۰	۳۰/۹
	زیل نلسون	۹۷	۸	۸/۲
سرم	الایزا	۹۷	۴	۱/۴

جدول ۵: مقایسه آزمون‌های الایزا، زیل نلسون و PCR روده در گاومیش‌های کشتار شده در اهواز

آزمون	نتایج	کل / تعداد	PCR		الایزا		زیل نلسون	
			مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
PCR	مثبت	۳۱	-	-	۴	۲۷	۶	۲۵
	منفی	۶۶	-	-	۰	۶۶	۱	۶۵
الایزا	مثبت	۴	۴	۰	-	-	۴	۰
	منفی	۹۳	۲۷	۶۶	-	-	۳	۹۰
زیل نلسون	مثبت	۷	۶	۱	-	۳	-	-
	منفی	۹۰	۲۵	۶۵	۰	۹۰	-	-

که الایزا آن‌ها مثبت بود در PCR و هیستوپاتولوژی روده هم مثبت بودند.

آزمون آماری کوکران نشان داد که بین آزمون پاتولوژی روده با روش PCR روده اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.001$)، ولی بین آزمون الایزا و پاتولوژی روده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

همان‌گونه که در جدول ۵ مشخص است، نتایج پاتولوژی روده حاکی از وجود ۷ رأس گاومیش آلوده به مایکوباکتریوم اوپوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس بود. در مقابل PCR روده دلالت بر ۳۱ رأس و نتیجه‌ی آزمایش الایزا نشان‌دهنده‌ی ۴ مورد آلودگی بود. از ۳۱ رأس گاومیشی که PCR روده‌ی آن‌ها مثبت بود، تنها ۶ رأس در رنگ‌آمیزی زیل-نلسون مثبت بودند و هر چهار موردی

جدول ۶: مقایسه‌ی آزمون‌های الایزا، زیل نلسون و PCR گره لنفوی ایلتوسکال در گاومیش‌های کشتار شده در اهواز

آزمون	نتایج	کل / تعداد	PCR		الایزا		زیل نلسون	
			مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
PCR	مثبت	۳۰	-	-	۳	۲۷	۷	۲۳
	منفی	۶۷	-	-	۱	۶۶	۱	۶۶
الایزا	مثبت	۴	۳	۱	-	-	۳	۱
	منفی	۹۳	۲۷	۶۶	-	-	۵	۸۸
زیل نلسون	مثبت	۸	۷	۱	۳	۵	-	-
	منفی	۸۹	۲۳	۶۶	۱	۸۸	-	-

نتایج آزمون پاتولوژی گره‌ی لنفوی (جدول ۶) حاکی از وجود هشت رأس گاومیش آلوده به مایکوباکتریوم اوویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکلوزیس بود، در حالی که PCR این بافت دال بر ۳۰ مورد مثبت بود که از این تعداد تنها هفت رأس در پاتولوژی مثبت بودند. از چهار رأس گاومیشی که در الایزا مثبت بودند، در سه مورد PCR و

هیستوپاتولوژی گره‌ی لنفوی هم مثبت بود. آزمون کوکران نشان داد، بین پاتولوژی گره‌ی لنفوی با PCR گره‌ی لنفوی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.001$) ولی بین الایزا و پاتولوژی گره‌ی لنفوی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

جدول ۷: مقایسه‌ی آزمون‌های الایزا، زیل نلسون و PCR کبد در گاومیش‌های کشتار شده در اهواز

آزمون	نتایج	کل / تعداد	PCR		الایزا		زیل نلسون	
			مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
PCR	مثبت	۲۴	-	-	۳	۲۱	۳	۲۱
	منفی	۷۳	-	-	۱	۷۲	۰	۷۳
الایزا	مثبت	۴	۳	۱	-	-	۲	۲
	منفی	۹۳	۲۱	۷۲	-	-	۱	۹۲
زیل نلسون	مثبت	۳	۳	۰	۳	۱	-	-
	منفی	۹۴	۲۱	۷۳	۲	۹۲	-	-

نتایج آزمون پاتولوژی کبد (جدول ۷) حاکی از وجود سه رأس گاومیش آلوده به عامل یون بود ولی نتیجه‌ی PCR کبد ۲۴ رأس مثبت ارزیابی شد. از ۲۴ رأس گاومیشی که PCR کبد آن‌ها مثبت بود، هیستوپاتولوژی کبد، دو رأس نیز مثبت شد. از چهار رأس گاومیشی که در الایزا مثبت بودند، در دو مورد PCR و هیستوپاتولوژی کبد هم مثبت بود. آزمون کوکران نشان داد، بین آزمون پاتولوژی کبد با PCR کبد اختلاف معنی‌داری وجود دارد

($P < 0.001$)، اما بین آزمون الایزا و پاتولوژی کبد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

بحث

با توجه به مطالعات محدود بیماری یون در گاومیش و مشخص نبودن وضعیت این بیماری در استان خوزستان و به دلیل اهمیت اقتصادی این حیوان در دامپروری استان، در مطالعه‌ی حاضر وضعیت این بیماری در گاومیش‌های کشتارگاهی اهواز مورد تحقیق قرار گرفت.

۱۵ تا ۸۷ درصد است. از این رو در دام‌های ایذا منفی انجام سایر آزمون‌ها جهت اطمینان از عاری بودن دام از مایکوباکتریوم *اوپوم پاراتوبرکلوزیس* ضروری است (Sweeney et al. 1995).

در مطالعه‌ی حاضر نتایج حاصل از PCR و هیستوپاتولوژی نمونه‌های کبد دال بر آلودگی تعدادی از کبدها به عامل یون بود. در توافق با یافته‌ی فوق، Mutharia و همکاران در سال ۲۰۱۰، Antognoli و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Henning و Rossiter در سال ۲۰۰۱ نیز آلودگی کبد گاو به عامل فوق را گزارش نموده‌اند. همچنین Smith و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز آلودگی کبد گوسفند به عامل یاد شده را گزارش کرده‌اند. نتایج حاصل از PCR بر روی بافت‌های روده و گره‌ی لفاوی به ترتیب ۳۲ و ۳۱ درصد آلودگی را نشان داد در حالی که هیستوپاتولوژی به ترتیب آلودگی ۷/۲ و ۸/۲ درصدی را نشان داد. در مطالعه‌ی کشتارگاهی که در لاهور پاکستان به روش PCR بر روی بافت‌های روده و گره‌ی لفاوی گاویش، به ترتیب دال بر آلودگی ۱۲/۸ و ۱۲/۴ درصدی بود (Anwar Khan et al. 2010) که به مراتب کم‌تر از مطالعه‌ی حاضر است. مطالعه‌ی کشتارگاهی دیگری که در فیصل‌آباد پاکستان به طور هم‌زمان بر روی ۲۵ رأس گاو و ۲۰ رأس گاویش مشکوک به بیماری یون از بین ۴۰۰ رأس گاویش و سه رأس با PCR انجام شد. تنها یک رأس گاویش و سه رأس گاو را آلوده به مایکوباکتریوم *اوپوم* زیرگونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* تشخیص داد و هیستوپاتولوژی چهار دامی که PCR آن‌ها مثبت بود حضور سلول‌های التهابی شامل ماکروفاژ، لنفوسیت و سایر سلول‌های التهابی تک هسته‌ای را نشان داد (Rehman et al. 2017). در مطالعه‌ی بر روی ۴۰۵ رأس گاویش در هند، ۲۰ رأس از نظر هیستوپاتولوژی مشکوک به بیماری یون تشخیص داده شد، در آزمون PCR نتیجه ۱۴ رأس و در آزمون کشت باکتری فقط ۶ رأس از دام‌ها مثبت بودند (Sivakumar et al. 2006). در ترکیه نتایج ایزای سرم

در مطالعه‌ی کشتارگاهی Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۰۸ شیوع بیماری یون در ۱۰۰ رأس گاویش در اهواز از طریق تهیه‌ی گسترش بافت (تراشه‌ی مخاطی دریچه‌ی ایلتوسکال) و رنگ‌آمیزی زیل-نلسون، ۳ درصد اعلام گردید. در مطالعه‌ی حاضر شیوع آلودگی به مایکوباکتریوم *اوپوم* زیر گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* بالاتر از گزارش Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۰۸ بود. علت آن را می‌توان انتخاب دام‌های لاغر و با سن بالای دو سال، انجام آزمون‌های مختلف جهت شناسایی مایکوباکتریوم *اوپوم* زیر گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* در گاویش‌های تحت مطالعه و افزایش شیوع بیماری دانست.

شیوع سرمی بیماری یون با انجام آزمایش ایزای جذبی^۱ به عنوان حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین آزمون سرولوژیک تشخیصی بیماری یون (Kurade et al. 2004)، بر روی نمونه‌ی خون ۹۷ رأس گاویش لاغر بالای دو سال، دال بر آلودگی ۴/۱ درصدی بود. شیوع بیماری یون با آزمایش ایذا در سایر کشورها مانند هند ۱۴/۵ درصد (Sivakumar et al. 2007) و در کاستارای ایتالیا ۲/۷ درصد (Desio, et al. 2013)، اعلام شده است. تفاوت نتایج ایذا تحت تأثیر تنوع در روش‌های نمونه‌گیری، روش‌های مختلف آزمایش و نوع آزمایش ایذا است (Desio et al. 2013). به طور مثال در مطالعه‌ی انجام شده توسط Singh و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از کیت ایزای بومی (آنتی‌ژن پروتوپلاسم مایکوباکتریوم *اوپوم* زیر گونه‌ی *پاراتوبرکلوزیس* بومی سویه‌ی *Bison*) شیوع بیماری یون در جمعیت گاویش‌های جوان هند، ۱۲/۱ درصد و در جمعیت گاویش‌های با سن بالا، ۲۴/۴ درصد اعلام شده است.

علی‌رغم پذیرش ایزای جذبی در تشخیص بیماری یون در گاو به عنوان آزمون استاندارد لیکن حساسیت آن در مراحل اولیه‌ی عفونت تا بروز علائم بالینی (تشخیص مراحل اولیه‌ی عفونت تا بروز حداکثر علائم بالینی) بین

را کم‌تر از انجام مستقیم این آزمون بر روی بافت روده گزارش نموده‌اند. تنوع در نتایج آزمون مولکولی وابسته به میزان و کیفیت DNA سلولی و یا کاهش غلظت باکتری در بدن میزبان است.

همان‌طور که مشخص می‌شود یک آزمون به تنهایی نمی‌تواند اکثر حیوانات آلوده به عامل بیماری یون را در گله نشان دهد. در مطالعه‌ی حاضر مقایسه‌ی نتایج آزمون‌های سری، PCR و هیستوپاتولوژی نشان داد از ۱۱ رأس دام دارای ضایعات گرانولوماتوز، تنها ۴ رأس آن‌ها در الایز مثبت بوده‌اند. همچنین از ۱۱ رأس دام مزبور، نتایج PCR ۹ رأس مثبت شد که نشان‌دهنده‌ی توافق قوی بین نتایج هیستوپاتولوژی و مولکولی است اما دال بر توافق متوسطی بین نتایج هیستوپاتولوژی و سری است که این مورد نیز قابل توجیه است زیرا آزمون سری در زمانی که میزان آنتی‌بادی در خون بالا باشد می‌تواند دام بیمار را مشخص کند ولی برای تشخیص فرم بالینی و یا تحت بالینی بیماری یون روش هیستوپاتولوژی نسبت به روش دیگر ارجح است. از آن‌جا که از ۹۷ رأس دام در ۳۱ مورد PCR آن‌ها مثبت شد می‌توان نتیجه گرفت که در مرحله‌ی نهفتگی بیماری یون آزمون مولکولی از روش دیگر بهتر می‌باشد.

در مطالعه‌ی حاضر در هیچ یک از نمونه‌های رنگ-آمیزی شده با روش زیل نلسون باسیل‌های اسید فست تپیک مشاهده نشد. نتایج مشابهی در مطالعه‌ی Sivakumar و همکاران در سال ۲۰۰۶ در گاو‌میش‌های مبتلا به ضایعات درجه‌ی ۱ بیماری یون و در تعدادی از گاو‌میش‌های مبتلا به ضایعات درجه‌ی ۲ گزارش گردید. به عبارت دیگر در مطالعه‌ی یاد شده نظیر مطالعه‌ی حاضر اجرام اسیدفست گرانولی مشاهده شده در ماکروفازها را نشانه‌ی مرگ باسیل‌ها یا تخریب نسبی آن‌ها، نظیر گزارش Kurade و همکاران در سال ۲۰۰۴ در فرم شبه سللی^۱ بیماری یون در گوسفند، تلقی شد.

خون و PCR بر روی شیر و مدفوع ۱۴۷ رأس گاو شیری به ترتیب ۱۲/۲، ۱۳/۶ و ۲۸/۵ درصد اعلام شد (Gumussoy et al. 2015). در مطالعه‌ی کشتارگاهی بر روی ۱۳۴ رأس گاو و گاو‌میش در دو کشتارگاه در پاکستان، از ۱۳۴ رأس، ۱۱/۱۹ درصد هم در زیل نلسون مقاطع بافتی و هم در زیل نلسون گسترش بافتی از نظر MAP مثبت بودند، اما در آزمون سری فقط ۵/۲ درصد آلودگی به بیماری یون را نشان دادند (Sikandra et al. 2012). مطالعه‌ی کشتارگاهی هم‌زمان هیستوپاتولوژیک و مولکولی بر روی ۹۰ رأس گاو در کشتارگاه شهرکرد بیان-گر میزان شیوع یون با زیل-نلسون بافت به میزان ۶/۶ و باروش مولکولی معادل ۲۶/۶۷ درصد بود (Karimi et al. 2011). در مطالعه‌ی هم‌زمان سری و هیستوپاتولوژی بر روی ۲۶۳ رأس گاو به ظاهر سالم در کشتارگاه شمال جردن برزیل به ترتیب ۲۵ درصد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، ۳ درصد با رنگ‌آمیزی زیل-نلسون و ۳ درصد با آزمون سری از نظر یون مثبت تشخیص داده شد (Hailat et al. 2012).

چنانچه ملاحظه می‌شود در مطالعات مشابه میزان موارد مثبت در PCR به مراتب زیادتر از کشت، هیستوپاتولوژی و سرولوژی بوده است، که با یافته‌ی مطالعه‌ی پیش‌رو تطابق دارد. تفاوت در میزان آلودگی در مطالعات یاد شده ممکن است به دلیل تفاوت‌های مکانی، زمانی، نوع پرایمر، نوع نمونه، جمعیت تحت بررسی و غیره باشد. به عنوان مثال بررسی‌ها نشان می‌دهد که PCR بر روی بافت تازه نسبت به بافت پارافینه بسیار حساس‌تر است. در مطالعه‌ی ۱۱ بافت تازه مشکوک به یون همگی آن‌ها در PCR از نظر وجود مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس مثبت تشخیص داده شد ولی از ۱۳ بافت آغشته به پارافین مشکوک به یون هیچ یک در آزمون مذکور از نظر وجود این باکتری مثبت تشخیص داده نشد (Kheirandish et al. 2016). برخی محققین دیگر (Chaturvedi et al. 2017, Gwozdz et al. 1997) نیز حساسیت PCR بر روی گسترش تهیه شده از مخاط روده

حداکثر پتانسیل تولید شیر، افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر، کاهش چربی و پروتئین شیر، افزایش حساسیت دام‌های آلوده به سایر بیماری‌ها مثل آماس پستان و کاهش باروری و افزایش فاصله‌ی بین زایش‌ها شود (Gonda et al. 2007, Yegani 1998) به این ترتیب نیاز ضروری به یک برنامه‌ی اساسی جهت کنترل این بیماری مهم در جمعیت گاومیش شهر اهواز احساس می‌شود.

با آن که گاومیش تا حد زیادی نسبت به بیماری یون مقاوم است (Anwar Anwar Khan et al. 2010, Sivakumar et al. 2006) ولی از مطالعه‌ی حاضر می‌توان نتیجه گرفت که میزان آلودگی در گاومیش‌های شهر اهواز نسبت به مطالعات قبلی افزایش یافته است. در نتیجه بیماری یون بیش‌تر به فرم تحت بالینی و نهفته در جمعیت گاومیش شهر اهواز وجود دارد. ناگفته نماند که این فرم بیماری می‌تواند منشاء خسارات اقتصادی فراوان شامل، کاهش تولید شیر به میزان ۵ تا ۲۵ درصد، نرسیدن به

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه کرد پایان نامه‌های دانشجویان تحصیلات تکمیلی فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

منابع

- Antognoli, M.C.; Garry, F.B.; Hirst, H.L.; Lombard, J.E. and Salman, M.D. (2008). Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Veterinary microbiology*, 127(3): 300-308.
- Anwar Khan, F.; Iqbal Chaudhry, Zafar.; IjZ Ali, Muhammd.; Khan, Shahid.; Mumtaz, Naima and Ahmad, Ijaz. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in tissue samples of cattle and buffaloes. *Tropical Animal Health and Production journal*, 42(4): 633-638.
- Baker, D.C.; Barker, I.K.; Brown, C.C.; Caswell, J.L. and Wittiams, K.J. (2007). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, Vol. 2, 5th ed. Guelph, Ontario Canada, Pp:192-196.
- Chaturvedi, S.; Singh, S.; Srivastava, A.; Gangwar, N.; Kumar, N.; Rawat, K.; et al. (2017). Comparative evaluation of FAT, IS900 PCR and microscopy vis a vis histopathology for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in tissues of goats naturally died in herds endemic for Johne's disease. *Indian Journal of animal science*, 87(6): 658-693.
- Desio, G.; Nizza, S.; Montagnaro, S.; Sasso, S.; De Matrino, L. and Lovane, V. (2013). Estimated prevalence of Johne's disease in herds of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in province of Caserta. *Italian Journal of Animal Science*, 12(8): 48-52.
- Gonda, M.G.; Chang, Y.M.; Shook, G.F.; Collins, M.T. and Kirkpatrick, B.W. (2007). Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Preventive Veterinary Medicine*, 80(2):103-119.
- Gumussoy, K.S.; Abay, S.; Ica, T.; Abay, S.; Aydin, F. and Hizlisoy, H. (2015). Serological and molecular diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39:147-153.
- Gwozdz, J.M.; Thompson, K.A.; Reichi, M.P.; Murray, A.; Manktelow, B.W.; West, D.M. et al. (1997). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in ovine tissue and blood by PCR. *Veterinary Microbiology* 5th ed. Pp: 233-244.
- Hailat, N.; Hemida, H.; Hananeh, W.; Stabel, J.; Rezig, F.; Jaradat, S. et al. (2012). Investigation on the occurrence and pathology of paratuberculosis (Johne's disease) in apparently cattle in Jordan. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5): 879-888.
- Hajikolaei, M.; Ghorbanpoor, M. and Amirsoleymani, M. (2008). Study on *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in buffaloes at Ahwaz abattoir. *Iranian Journal of Vet Clinical Sciences Shahrekord University*, 2(1): 55-60. (in persian)

- Heidarnejhad, O.; Safi, Sh.; Mosavari, N. and Keshavarz, R. (2017). Sero-prevalence of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy farms of Tehran-Iran using absorbed ELISA assay. *Journal of Comparative Pathobiology*, 14(3): 2239-2246. (in persian)
- Karimi, H.; Namjoo, A.; Momtaz, H. and Namdari, M. (2011). Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in ileum tissue samples in buffaloes at Shahrekord abattoir using ELISA and PCR methods. *Journal of Comparative Pathobiology Azad University*, 8(4): 697-704. (in persian).
- Kheirandish, R.; Sami, M.; Khalili, M.; Shafaei, K. and Azizi, S. (2016). Diagnosis of paratuberculosis in fresh & paraffin embedded samples by histopathology, PCR and immunohistochemistry techniques. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(4): 50-60.
- Kulsrestha, R.C.; Singh, J. and Chandirmani, N.K. (1980). A survey on the prevalence of tuberculosis and Johne's disease in cattle and buffalo in Haryana state. *Haryana Veterinarian*, 19(2): 139-141.
- Kurade, N.P.; Tripathi, B.N.; Rajukumar, K. and Parihar, N.S. (2004). Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Veterinary Pathology*, 41(4):378-387.
- Momotani, E.; Whipple, D.L.; Thiermann, A.B. and Cheville, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology*, 25(2): 131-137.
- Mutharia, L.M.; KlaSSEN, M.D.; Fairles, J.; Babut, S. and Gill, C.O. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3):340-344.
- OIE Terrestrial Manual (2014): Chapter 2.1.11. Paratuberculosis (John's disease).
- Rajabian Gharib, F. and Khosravi Pour, B. (2016). Socio-economic aspects of buffalo breeding. *Journal of Science and Technology Veterinary Histobiology*, 4(1): 4-7. (in persian)
- Rehman, A.; Javed, M.; Rizvi, F. and Khan, M. (2017). Prevalence and Pathology of Paratuberculosis in cattle and Buffaloes at Faisalabad Abattoir. *Pakistan Journal of Agriculture and Science*, 54(1): 189-194.
- Rossiter, C.A. and Henning, W.R. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from thin market cows at slaughter. *Journal of Animal Science*, 79(4): 113-114.
- Sikandar, A.; Cheema1, A.H.; Younus, M.; Aslam1, A.; Zaman, M.A. and Rehman, T. (2012). Histopathological and Serological Studies on Paratuberculosis in Cattle and Buffaloes. *Pakistan Veterinary Journal*, 32(4): 547-551.
- Singh, S.V.; Singh, R.; Sharma, S.; Shukla, N.; Misra, S.; Singh, P.K. et al. (2008): Sero-prevalence of Bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* "Bison type" of goat origin. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(5): 419-433.
- Sivakumar, P.; Tripathi, B.N.; Singh, N.; EzhilPraveena, P. and Saravanan, D. (2007). Seroprevalence of paratuberculosis in Indian buffaloes indian. *Jurnal of Veterinary Pathology*, 31(1): 62-63.
- Sivakumar, P.; Tripathi, B.N.; Singh, N. and Sharma, A.K. (2006). Pathology of naturally occurring paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinarian Pathology*. 43(4): 455-462.
- Smith, S.L.; Wilson, P.R.; Collett, M.G.; Heuer, C.; West, D.M.; Stevenson, M. and Chamber, J.P. (2014). Liver Biopsy Histopathology for Diagnosis of Johne's Disease in Sheep. *Veterinary Pathology*, 51(5): 915-918.
- Sohal, J.S.; Singh, S.V.; Subhodh, S.; Singh, A.V.; Singh, P.K. and Sheoran, N. (2007). *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* diagnosis and strain typing present status and future developments. *Indian Journal Experimental Biology*. 45(10): 843-852.
- Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H.; Buckley, C.L. and Spencer, P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immune sorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(2): 488-495.
- Tiwari, A.; VanLeeuwen, J.A.; McKenna, S.L.B.; Keefe, G.P. and Barkema, H.W. (2006). Johne's disease in Canada. Part I. Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*. 47(9): 874-882.
- Yegani, M. (1998). Johne's diseases. 1th ed, Iran Veterinary Organization, Pp: 68-76, 78-80. (in persian)

Histopathological, molecular and serological study of Johnes disease in buffaloes of Ahvaz

Etesami, M.¹; Mohammadian, B.²; Esmailzadeh, S.²; Ghorbanpoor, M.³; HajiHajikolaie, M.⁴ and Pourmahdi, M.⁵

Abstract

Johne's Disease (paratuberculosis) is granulomatous, progressive enteritis, which is untreatable, especially in domestic and wild ruminants caused by *mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. There is no accurate statistical information on the prevalence of Johnes disease in buffaloes of different regions of the country. This study was performed to detect *mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* with different diagnostic methods: ELISA, PCR, Histopathology and their comparison. For this purpose, from December 2016 to October 2017, Among 97 slaughtered buffaloes, above two years of age with poor physical conditions were collected from blood samples, associated ileocecal lymph nodes, ileocecal valve and liver tissue were transferred to the laboratory. The serum level of infection (ELISA) was 4.1%, The molecular (PCR) test showed an infection rate of 32% in the intestine, 31% in the associated lymph node and 24.7% in the liver, Histopathology examination by Ziehl-Neelsen's specific staining, The prevalence of infections in the intestines are 7.2%, associated lymph nodes are 8.2% and 3.1% in the liver. The granulomatous lesions of the intestine were stained by hematoxylin-eosin (H&E) method in 11 buffaloes, only in 9 buffaloes their molecular test results were positive. Other histopathology findings of eosinophilic enteritis, Lymphocytic enteritis, granulomatous enteritis, mucous purulent enteritis were 37.9%, 29.3%, 19%, 13.8%, respectively. In the associated mesenteric lymph nodes, granulomatous lymphadenitis was 68.6%, purulent lymphadenitis were 25.7%, and in liver chronic hepatitis were 32.6%, chronic parasitic hepatitis 11.66%, perihepatitis 23.9%, cirrhosis 6.5%, and leiomyoma 25% have been observed. Due to the lack of observation of acid-fast bacilli in the present study, acid-fast granular debris (Paucibacillary) form of suspected Johnes disease can be found. At the same time, the increase of Ahvaz buffaloes contamination requires more serious attention to scientific and administrative references than the previous study.

Key word: Johnes's Disease, Histopathology, Serology, Molecular, Buffalo

-
- 1- PhD Student of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
 - 2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
 - 3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
 - 4- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
 - 5- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- Corresponding Author:** Mohammadian, B., E-mail: mohammadb@scu.ac.ir