نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۴ : ۷۳-۶۳

مقاله پژوهشی

شناسایی پنومونی مانهیمیازیس در بز با استفاده از روش های ایمنوهیستوشیمی، باکتریولوژی و هیستوپاتولوژی

کیوان جمشیدی*
استادیار،گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۰

چکیده

پنومونی مانهیمیوزیس با عامل *مانهیمیا (پاستورلا) هممولیتیکا* یکی از مهمترین عوامل اتیولوژیک پنومونی در گاو، گوسفند و بز می باشد. مطالعه حاضر که در کشتارگاه سمنان به اجرا درآمد به منظور تعیین وجود و میزان شیوع آنتی ژن های *مانهیمیا هممولیتیکا* با استفاده از نشان گذاری ایمنوهیستوشیمی در بافت ریه بزهای مبتلا به پنومونی ذبح شده تثبیت شده در فرمالین و قالب گیری شده در پارافین و سپس مقایسه نتایج ایمنوهیستوشیمی با نتایج جداسازی باکتریایی طراحی شد. به همین منظور ریه های متعلق به ۴۰۲ راس بز ذبح شده در کشتارگاه تحت بازرسی های معمولی پس از کشتار قرار گرفت و پنومونی در ۳۸ مورد (۹/۴۵ ٪) از آنها شناسایی شد. آزمایشات باکتریولوژی و ایمونوهیستوشیمی روی ۳۲ مورد باستثنای ۶ مورد ریه مبتلا به پنومونی کرمی به اجرا درآمد. باکتری *مانهیمیا هممولیتیکا* و آنتی ژن های *مانهیمیا هممولیتیکا* به ترتیب در ۱۲ مورد (۳۷/۵٪) و ۱۴ مورد (۴۳/۷۵٪) از ۳۲ مورد ریه های پنومونیک شناسایی شدند. آنتی ژنهای باکتریایی بیشتر در سلول های اپیتلیال برونشیولی و برونشی، در لکوسیت های دژنره در آلوئول ها، و در لکوسیت های دژنره در نواحی نکروز انعقادی و تا حد کمتری در سلول های اپیتلیومی غدد برونشی و سلول های لنفوئیدی مشاهده شدند. در مجموع شناسایی آنتی ژن های *مانهیمیا هممولیتیکا* در ریه های پنومونیک با استفاده از ایمونوهیستوشیمی بسیار قابل اعتمادتر از روش جداسازی باکتریایی می باشد.

کلمات کلیدی: مانهیمیا هممولیتیکا، ایمونوهیستوشیمی، بز، پنومونی

*نویسنده مسئول: کیوان جمشیدی
آدرس: گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران
پست الکترونیک: k.jamshidi@iau-garmsra.ac.ir

مقدمه

پنومونی عامل اصلی ضرر و زیان اقتصادی به نشخوارکنندگان در سراسر جهان می باشد. *مانهیما هموليتيكا* (*Mannheimia hemolytica*) یکی از مهمترین پاتوژن های شایع در نشخوارکنندگان است که سبب وقوع پنومونی های حاد و خطرناک در نوزادان، بره های شیرخوار و در حال رشد،گوساله ها و بزها می گردد (۱).

پنومونی پاستورلوزیس یک بیماری تضعیف کننده و اغلب کشنده با عامل مانهیما *هموليتيكا* است که عموما بدنبال یک عفونت ویروسی اولیه، بیماری های همزمان یا وجود شرایط محیطی استرس زا بوجود می آید. این فاکتور های زمینه ساز سبب سرکوب ایمنی در میزبان شده که منجر به، کلونیزه شدن، استقرار عفونت و تکثیر در مجاری تنفسی در ریه ها می گردد (۱۳ و ۲).

شناسایی و تشخیص *مانهیما هموليتيكا* با استفاده از روش های باکتریولوژیک در برخی شرایط اغلب سخت می باشد(مثل درمان با آنتی بیوتیک، مواد انجمادی، مواد اتولیتیک و غیره). تکنیک های ایمنوهیستوشیمی (IHC) بسیاری از مشکلات مرتبط با دیگر روش ها برای تشخیص و شناسایی آنتی ژن های *مانهیما هموليتيكا* در بافتهای فیکس شده را از بین می برد (۹). در صورت وجود نمونه های بافتی تثبیت شده در فرمالین برای ارزیابی های تشخیصی آنتی ژن های مانهیما همولیتیکا، استفاده از آزمایشات ایمونوهیستوشیمی، تکنیکی مفید در دست پاتولوژیست های تشخیصی بشمارمی آید (۸). مطالعات دقیق ایمنوهیستوشیمی روی ضایعات پنومونی در گوساله های مبتلا به فرم طبیعی عفونت *مانهیما هموليتيكا* و یا مبتلا به عفونت های تجربی با *مانهیما هموليتيكا* به اجرا در آمده است (۱۶، ۱۴، ۷ و ۶).

بنابر اطلاعات موجود گزارشی درباره تشخیص عفونت های ریوی با عوامل *مانهیما هموليتيكا* در گوسفندان در شمال شرق کشور وجود ندارد. لذا هدف از تحقیق حاضر، ضمن مطالعه هیستوپاتولوژیک ضایعات، تشخیص وجود آنتی ژن های *مانهیما هموليتيكا* با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی در نمونه های بافت ریه بزهای مبتلا به پنومونی، تثبیت شده در فرمالین و قالب گیری شده در پارافین، و در نهایت مقایسه یافته های ایمونوهیستوشیمی با نتایج باکتریولوژی می باشد.

مواد و روش کار:

در یک بررسی کشتارگاهی برای ارزیابی میزان شیوع پنومونی مانهیموزیس در بز های کشتاری در طول پاییز ۱۳۹۵ و در کشتارگاه شهر سمنان، در مجموع ۴۰۲ راس بز کشتاری، که عمدتاً نر و بین حداقل ۶ ماه تا ۲ سال عمر داشتند یک به یک تحت بازرسی های پس از کشتار به منظور شناسایی علایم ماکروسکپی پنومونی قرار گرفتند.

مطالعات پاتولوژی

ضایعات ماکروسکپی متفاوت پنومونی در لوب های مختلف ریه های متعلق به ۳۸ راس بز (۹/۴۵٪) شناسایی شد، که باستثنای ۶ مورد ابتلا به پنومونی کرمی، بقیه ۳۲ مورد جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک بعدی انتخاب و از آنها نمونه برداری صورت گرفت. نمونه های بافتی از مواضع آناتومیک مشابه ۳۲ مورد ریه پنومونیک اخذ و تحت روش های متداول پردازش بافت جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک قرار گرفتند (۲).

نمونه های بافتی از ریه در ابعاد مناسب (۱×۰/۵×۰/۵ سانتی متر) انتخاب و در فرمالین بافر ۱۰٪ تثبیت شدند.

پس از تثبیت، نمونه ها برای عبور از مراحل مختلف پاساژ بافت در قالب های پارافینی قرار گرفتند. سپس مقاطع بافتی با ضخامت ۴µ تهیه و به روش H&E رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری و توسط فرد پاتولوژیست مورد مطالعه قرار گرفتند.

مطالعات باکتریولوژی

سطح ریه توسط یک اسپاچول داغ استریل، سپس با استفاده از تیغ جراحی استریل، سطح استریل ریه برش داده شد و یک سواپ استریل به داخل آن فرو برده و به خوبی آغشته گردید. در حین کار کاملاً دقت شد تا سواپ استریل وارد برونش ها نگردد.

یک سواپ آغشته شده را در محیط کشت بلاد و سواب دیگر را در محیط مکانکی برده و کشت داده شد. سپس با استفاده از آنس حلقوی در هر دو محیط، کشت خطی سه مرحله ای داده شد (تمامی این مراحل کنار شعله به اجرا درآمد). سپس محیط های کشت به داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ – ۴۸ ساعت انتقال داده شد. نتایج رشد هر پلیت در آگار خون دار و مکانکی جداگانه قرائت گردید و نوع پرگنه بررسی شد. عدم رشد در طی این دوره زمانی، به معنی منفی بودن نتیجه کشت قلمداد گردید.

به منظور تهیه کشت خالص باکتری، از پرگنه های رشد کرده در مرحله اول، مجدداً در آگار خون دار کشت داده شد. سپس از پرگنه های رشد کرده، نمونه ای برای تست اکسیداز و رنگ آمیزی تهیه شد. در صورت مثبت بودن تست اکسیداز و مشاهده باکتری گرم منفی، کوکوباسیل دو قطبی و یا میله ای؛ پرگنه به صورت همزمان به محیط های کشت TSI، SIM، نیترات و اوره برده شد. بعد از قرائت نتایج و تشخیص احتمالی نوع پاستورلا و در صورتی که احتمال مثبت بودن نمونه داده شود، به محیط های قندی انتقال داده تا نوع پاستورلا با قطعیت تشخیص داده شود.

مطالعات ایمونوهیستوشیمی

تکنیک رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC) در مجموع روی ۳۲ مقطع بافتی ریه جهت بررسی بیان آنتی ژن M. hemolytica و با استفاده از تکنیک متداول avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) و استفاده از کیت های تجاری موجود [immunoperoxidase kits (LSAM™ 2 System Dako Corporation, Carpinteria, USA)] و دستوالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده به اجرا در آمد.

نتایج

○ یافته های پاتولوژی ماکروسکپی

از مجموع ۴۰۲ راس بزکشتاری که تحت معاینات پس از کشتار قرار گرفتند، علائم ماکروسکپی پنومونی در ۳۸ مورد (۹/۴۵ ٪) مشاهده گردید. ضایعات ماکروسکپی پنومونی با حضور کانون هایی از نواحی سفت به رنگ قرمز- خاکستری یا کانون های نامنظم لوبولی و آتلکتاتیک که عمدتاً محدود به لوپ های قدامی شکمی بودند مشخص شدند. برخی دیگر از ریه های پنومونیک با پنومونی لوبار مشخص شدند، که نواحی قدامی شکمی آنها سفت و به رنگ قرمز تیره یا خاکستری قهوه ای و ضخیم شدن ژلاتینی دیواره بین لوبولی، پلئوریت فیبرینی و نواحی نکروز انعقادی دیده شدند. ضایعات پنومونی کرمی با حضور نواحی قرمز تیره یا خاکستری سبز و سفت در لبه انتهایی لوب های خلفی و نواحی فوقانی خلفی مشخص شدند. این نواحی سفت دارای قوای محکم بوده به صورت

برجستگی های ملایم تا کاملاً برجسته نسبت به نواحی اطرافی دیده شدند. در مطالعه حاضر ضایعات پنومونی در جدول ۱ به ترتیب طبقه بندی و ارائه شده اند.

جدول -۱ : طبقه بندی ضایعات پنومونی

نوع عارضه	تعداد (n)	رخداد (٪)
پنومونی بینابینی	7	۱۸/۴۲
برونکوپنومونی فیبرینی	15	۳۹/۴۸
برونکوپنومونی فیبرینی چرکی	9	۲۳/۷۰
پنومونی کرمی	6	۱۵/۷۸
پنومونی گرانولوماتوز	1	۲/۶۳
مجموع	۳۸	۱۰۰.۰۱

یافته های هیستو پاتولوژیک

از مجموع ۳۲ مورد ریه پنومونیک بررسی شده در این مطالعه به روش ایمنوهیستوشیمی، به استثنای ۶ مورد پنومونی کرمی، ۱۴ مورد ایمنی مثبت (imununopositive) شناسایی شدند که در مطالعات هیستوپاتولوژیک ضایعات عمدتا ترکیبی از پنومونی اگزودایتو و پرولیفراتیو را نشان دادند. بسیاری از ریه های پنومونی دارای ضایعات اگزوداتیو بسیار واضح بودند، در حالیکه ضایعات پرولیفراتیو در برخی از ریه های پنومونیک مشاهده شد. پلئوریت فیبرینی در برخی موارد واضح و مشخص بود. با در نظر گرفتن ضایعات مشخص و واضح از مجموع ۱۴ ریه پنومونیک با واکنش ایمنی مثبت (imununopositive) به مانهیما هملیتیکا، ۱۱مورد برونکوپنومونی فیبرینی، ۱ مورد پنومونی بینابینی، ۲ مورد برونکوپنومونی فیبرینی چرکی را نشان دادند (جدول - ۲).

ضایعات پرولیفراتیو با هیپرپلازی اپیتلیومی (بویژه اپیتلیوم آلوئولی) و تکثیر ماکروفاژها، هیپرپلازی لنفوئیدی اطراف برونشیولی و اطراف عروقی و برونشیت انسدادی مشخص شدند. شکل گیری سلولهای سینسشیال بویژه در مجاری آلوئولی کاملاً مشخص بود. برونشیت و برونشیولیت نکروتیک مالتی فوکال در بسیاری موارد مشاهده شد. ضایعات اگزوداتیو با التهاب های نکروتیک، هموراژیک و فیبرینی مشخص شدند. برونکوپنومونی فیبرینی چرکی با انباشتگی شدید آلوئولی توسط فیبرین، اریتروسیت وسلولهای التهابی همراه بود. عروقی لنفاوی دیواره بین لوبولی و پرده جنب بدلیل تجمع اگزودای فیبرینی سلولی اتساع پیدا کردند (نگاره های ۱- ۴).

ندولهایی که بصورت ماکروسکپی شناسایی شده بودند در نمای میکروسکپی متشکل از نواحی نکروز انعقادی بودند که توسط طیف متراکمی از سلولهای ارتشاح یافته احاطه شده بودند.

○ یافته های باکتریولوژیک

از بین ۳۲ مورد ریه با علائم ماکروسکپی پنومونی، از۱۲مورد (۳۷/۵٪) باکتری *مانهیمیا هملیتیکا*، به ترتیب از ۱۰ مورد برونکوپنومونی فیبرینی، ۱ مورد پنومونی بینابینی و ۱ مورد برونکوپنومونی فیبرینی چرکی، جداسازی و شناسایی گردید. از هیچ یک از ریه های دیگر باکتری *مانهیمیا هملیتیکا* جداسازی نشد.

○ یافته های ایمونوهیستوشیمی

درآزمایشات ایمونوهیستوشیمی آنتی ژن های *مانهیما همولیتیکا* در ۱۴ مورد (۴۳/۷۵٪) از ۳۲ ریه پنومونیک، به استثنای ۶ مورد پنومونی کرمی، شناسایی و تشخیص داده شد.

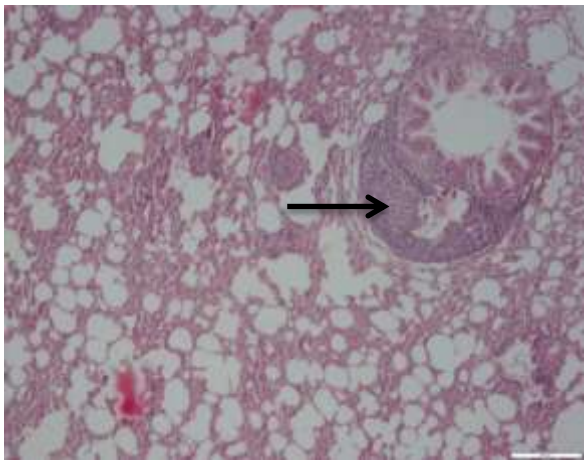
حضور آنتی ژن های اختصاصی *مانهیما همولیتیکا* (immunoperoxidase labelling associated with M.haemolytica antigens) عمدتا درون سلول های اپیتلیومی برونش ها و برونشیول های کوچک و پنوموسیت ها مشاهده شد. این تجمعات آنتی ژن های نشان دار معمولاً به صورت گرانولار و/ یا منتشره و به رنگ قهوه ای در سیتوپلاسم این سلول ها وجود داشتند. آنتی ژن های باکتریایی همچنین درون لکوسیت های دژنره شده و ماکروفاژ های درون آلوئولی، درون تجمعات متراکم لکوسیت ها در اطراف بافت های نکروزه و در لکوسیت های دژنره در نواحی نکروز انعقادی مشاهده شدند. این دسته از لکوسیت های دژنره واکنش منتشره شدیدی علیه آنتی ژن های مانهیمیا همولیتیکا نشان دادند (نگاره های ۶ و ۵).

به علاوه این آنتی ژن های باکتریایی درون لنفوسیت ها و پلاسماسل های ارتشاح یافته در اطراف عروق و برونشیول ها و درون سلول های اپیتلیومی غدد برونشی کمتر مشاهده شدند. توزیع آنتی ژن ها معمولاً ارتباط نزدیکی با حضور ضایعات پنومونی در ریه ها داشت.

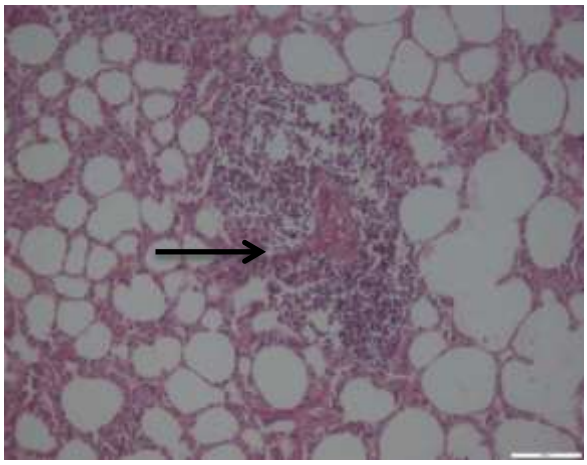
طیف واکنش ایمنی (imununoreactivity) از ملایم تا متوسط تا شدید درون سلولهای توپوشی مجاری هوایی، درون پنومونوسیت ها و نوترفیل ها و سلولهای ماکروفاژ بویژه در کانونهای التهابی متفاوت بود. در مواردی که واکنش ایمنی (imununoreactivity) در محدوده متوسط و شدید مشاهده شد الگوی ضایعه برونکوپنومونی فیبریتی بود در حالیکه در مواردی که واکنش ایمنی در محدوده ملایم طبقه بندی شده بود الگوی ضایعه برونکو پنومونی چرکی یا پنومونی بینابینی بود (جدول ۲).

جدول - ۲: بررسی مقایسه ای نتایج حاصل از مطالعات ایمونوهیستوشیمی، باکتریولوژی و هیستوپاتولوژی
طیف واکنش ایمنی از ملایم + تا متوسط ++ تا شدید +++ طبقه بندی شده است

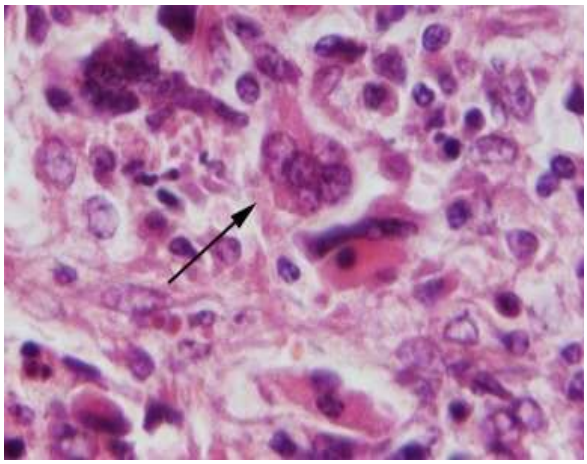
شماره نمونه	نمونه های ایمنی مثبت +IHC	نمونه هایی که از آنها M. hemolytica جدا سازی شد	الگوی پنومونی	طیف واکنش ایمنی
1	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
2	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	++
3	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
4	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
5	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
6	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
7	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
8	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
9	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
10	+	+	برونکوپنومونی فیبرینی	+++
11	+	-	برونکوپنومونی فیبرینی	++
12	+	+	پنومونی بینابینی	+
13	+	-	برونکو پنومونی فیبرینی چرکی	+
14	+	+	برونکو پنومونی فیبرینی چرکی	++
جمع	۱۴ مورد	۱۲	۱۴ مورد	



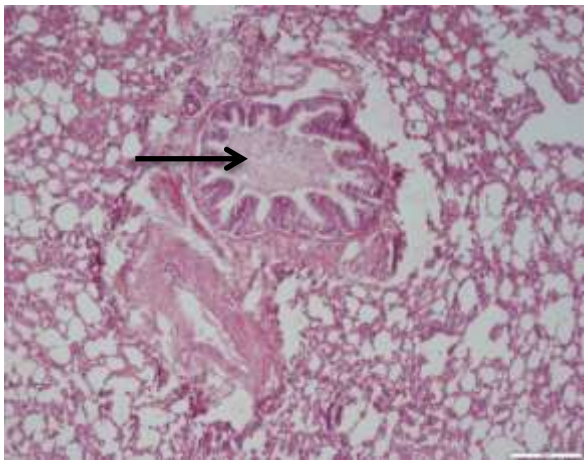
نگاره ۱- ریه بز. نمای هیستوپاتولوژیک برونشیول. ضایعات پرولیفراتیو. هیپرپلازی لنفوئیدی اطراف برونشیولی(پیکان). رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۱۰



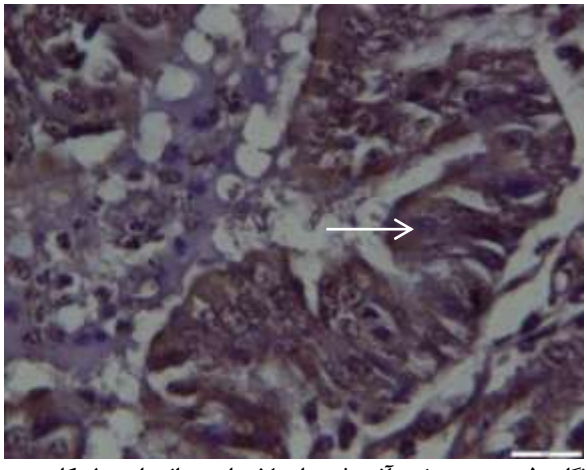
نگاره ۲- ریه بز. نمای هیستوپاتولوژیک عروق خونی. ضایعات پرولیفراتیو. هیپرپلازی لنفوئیدی اطراف عروقی (پیکان). رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۱۰



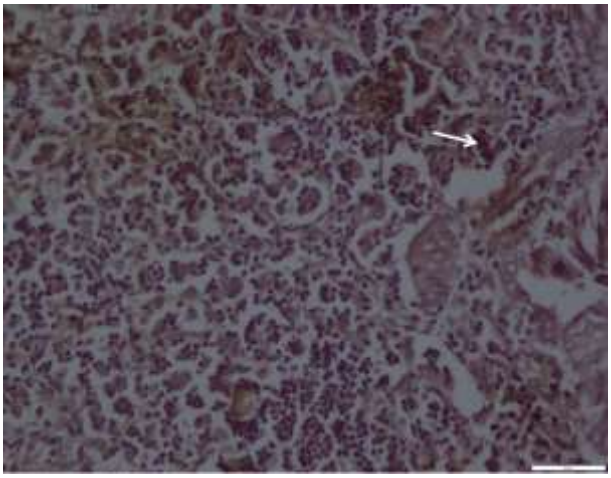
نگاره ۳- ریه بز. شکل گیری سلولهای سینسشیال در مجاری آلوئولی (پیکان). رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۴۰



نگاره ۴- ریه بز. ضایعات اگزوداتیو با التهاب های نکروتیک و فیبرینی و برونکوپنومونی فیبرینی چرکی (پیکان). رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۱۰



نگاره ۵- ریه بز. حضور آنتی ژن های اختصاصی مانهیما هملولیتیکا درون سلول های اپیتلیومی برونشیول های کوچک. این تجمعات آنتی ژن های نشان دار معمولا به صورت گرانولار و/ یا منتشره در سیتوپلاسم این سلول ها دیده می شوند. واکنش ایمونوهیستوشیمی. بزرگنمایی ۱۰۰



نگاره ۶- ریه بز. حضور آنتی ژن های اختصاصی مانهیما هملولیتیکا درون لکوسیت های دژنره شده و ماکروفاژ های درون آلوئولی. واکنش ایمونوهیستوشیمی. بزرگنمایی ۱۰

بحث

باکتری مانهیما هموليتيكا که فلور معمولی مجاری تنفسی فوقانی نشخوار کنندگان بشمار می آید، زمانیکه این حیوانات در اثر فاکتورهای محیطی یا عفونتهای ویروسی همزمان (بویژه PI۳، آدنو ویروس و RSV) دچار استرس شوند، توانایی تکثیردر نازوفارینکس را پیدا می کند. مهمتر اینکه این ویروسها بشکل فاجعه باری حساسیت گوسفند و بز به عفونتهای ثانویه با عامل *مانهیما هموليتيكا* را افزایش می دهند (۵ و ۳).

در مطالعه حاضرارتباط قوی بین الگوی برونکوپنومونی فیبرینی و شدت واکنش ایمنی با باکتری در مواردی که باکتری *مانهیما هموليتيكا* در آنها نشانه گذاری (Labling) شد مشاهده گردید، که نقش پاتولوژیک مهم باکتری در پاتوژنز موارد پنومونی طبیعی بزها را نشان می دهد. با این حال به هیچ وجه نمیتوان احتمال نقش پاتوژنیک دیگر عفونت های ویروسی از قبیل PI۳، ادنو ویوروس و RSV، که به عنوان فاکتور های موثر در ضایعات پنومونیک بررسی شده اند را در مطالعه حاضر ندیده گرفت (۱۹،۱۸،۱۷).

عفونت های ریوی حاد با عامل *مانهیما هموليتيكا* با پاسخ های التهابی فیبرینی چرکی و نکروتیک مشخص می شوند. برونش ها، برونشیول ها و آلوئول های ریوی حاوی ارتشاحات متراکم نوتروفیلی، فیبرینی، مایعات سروپروتئینی و خون می باشند. اگزودا با نکروز پارانشیمی وسیع که در اثر عملکرد فرآورده های سمی مانهمیا هموليتيكا مانند لکوتوکسین، لیپوپلی ساکارید و پلی ساکارید و همچنین فاکتورهای التهابی آزاد شده توسط نوتروفیل ها و دیگر سلول های پروسه التهابی حاد به وجود آمده اند همراه می باشد (۱۵). نکروز انعقادی پارانشیمی چند کانونی ضایعه ی ریوی مشخصه ای به شمار آمده که در ارتباط نزدیک با آنتی ژن های *مانهیما هموليتيكا* به وجود می آید (۱۵).

در مطالعه ی حاضر وجود پنومونی فیبرینی و پنومونی فیبرینی چرکی نکروز دهنده در اکثریت موارد ایمنی مثبت مشاهده شد که کشنده نبودند. علاوه بر این تمام چهارده مورد با واکنش ایمنی مثبت به *مانهیما هموليتيكا* عمدتاً ترکیبی از ضایعات پنومونی اگزوداتیو و پرولیفراتیو را نشان دادند، و یک مورد عمدتا الگوی پنومونی بینابینی را نشان داد. این ضایعات پرولیفراتیو احتمالاً در طول مرحله ترمیم ضایعات برونکو پنومونی با عامل باکتری شکل گرفته است. شکل گیری سلول های سنسیشیال در لومن آلوئول ها احتمالاً میتواند وقوع پنومونی ویروسی اولیه با عامل PI3 یا RSV باشد. این یافته ها در مطابقت با یافته های Yener و همکاران (۲۰۰۹) می باشد (۱۹).

درتحقیق پیش رو اگرچه تکنیک به کار گرفته شده پیش از این در مورد گوسفند، گاو و بز در دیگر مطالعات قبلی نیز مورد استفاده قرار گرفته (۱۹، ۹ و ۸)، ولی بظاهر در نوع خود اولین مطالعه در شمال شرق کشور است که در آن آنتی بادی پلی کلونال علیه آنتی ژن های اختصاصی مانهیما هموليتيكا در بز به کار گرفته شده است. دراین مطالعه بایستی به این نکته اشاره شود که استقرار آنتی ژن ها معمولا ارتباط بسیار نزدیکی با حضور ضایعات داشت. چنین استنباطی را پیش از این Yener و همکاران (۲۰۰۹) نیز در مطالعات خود گزارش دادند (۱۹). علاوه بر این Yener و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که آنتی ژن های اختصاصی مانهیما هموليتيكا را میتوان در نمونه های بافتی تثبیت شده در فرمالین و قالب گیری شده در پارافین حتی پس از ۷ سال نشان داد که گواه بر اهمیت تکنیک

ایمونوهیستوشیمی درمطالعات گذشته نگر می باشد (۱۹).

واکنش ایمنی مثبت (immunoreactivity) درون سیتوپلاسم سلول های اپیتلیومی در برونش ها و برونشیول های کوچک، در پنومونوسیت ها، در لکوسیت های دژنره در نواحی نکروز انعقادی و در آلوئول ها ضعیف، متوسط تا شدید مشاهده شده است (جدول ۲).

این یافته با یافته های Yener و همکاران (۲۰۰۱)، Haziroglu و همکاران (۲۰۱۳) و Haritani و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد.

گزارشاتی از میزان شیوع *مانهیما هموليتيكا* بر اساس مطالعات باکتریولوژی و کشت باکتری در بز به ثبت رسیده که می توان به یافته های Horadagoda و همکاران (۱۹۹۸) به میزان ۷۵٪ و Jasni و همکاران (1990) به میزان ۳۲/۴٪ و Yener و همکاران (۲۰۰۱) به میزان ۳۸٪ اشاره کرد (۱۷، ۱۲ و ۱۰). در مطالعه حاضر این میزان شیوع در بز ۳۴/۳۷ ٪ مشاهده و ثبت گردید. در مطالعه حاضر تلاش شد یافته های باکتریولوژی با یافته های IHC مورد مقایسه قرار گیرد. در مطالعه حاضر آنتی ژن های اختصاصی *مانهیما هموليتيكا* در ۱۴ مورد از ۳۲ مورد ریه های پنومونیک با استفاده از روش IHC شناسایی شد. از بین این ۱۴ مورد IHC مثبت تنها ۱۱ مورد در آزمایشات باکتریولوژیک به عنوان یافته مثبت شناسایی و ثبت شد. این یافته با یافته های Yener و همکاران (۲۰۰۱) که از بین ۱۹ مورد مثبت در آزمایشات IHC تنها ۱۶ مورد مثبت در آزمایشات باکترلوژیک شناسایی کردند مطابقت دارد (۱۷). نتایج حاضر نشان می دهد که ارتباطی بین یافته های ایمنوهیستوشیمی و یافته های باکتریولوژیک وجود دارد. به عبارت دیگر باید گفت که تمام نمونه های مثبت در کشت باکتریایی، IHC مثبت نیز بودند. ولی باید به این نکته نیز اذعان داشت که در روش IHC تعداد موارد *مانهیما هموليتيكا* مثبت بیشتر بود (۱۴ در مقابل ۱۱). از طرف دیگر باید گفت که تشخیص آنتی ژن های *مانهیما هموليتيكا* به روش IHC بسیار قابل اعتماد تر از روش کشت باکتری است. این یافته که میزان موارد مثبت تشخیص آنتی ژن های باکتریایی به روش IHC بیشتر از موارد مثبت تشخیص باکتری به روش باکتریولوژی است را می توان به این حقیقت نسبت داد که آنتی ژن هر دو نوع باکتری زنده و مرده در نمونه IHC مثبت وجود دارد، در حالیکه کشت های باکتریولوژی میکروارگانیزم های مرده را شناسایی نمی کنند (۹).

نتیجه گیری نهایی

این تحقیق اولین مطالعه در استان سمنان است که حضور آنتی ژن های مانهیما هموليتيكا را در موارد پنومونی های طبیعی بز نشان می دهد. درصد موارد مثبت آنتی ژن های تشخیص داده شده به روش IHC بیشتر از نتایج حاصل از کشت و جداسازی باکتری بود و نشان می دهد که روش IHC با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال می تواند ابزار سودمند و مفیدی در تشخیص پنومونی پاستورلایی باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بدون هیچ گونه حمایت مالی و فقط با هزینه شخصی نویسندگان انجام شد. بخش ایمنوهیستوشیمی این پژوهش در آزمایشگاه تخصصی پاستور به اجرا در آمد. نویسندگان بر خود واجب می دانند از زحمات و دقت عمل کارشناسان محترم آزمایشگاه فوق در دستیابی به نتایج پژوهش کمال تشکر را بعمل آورد.

منابع

1) Ackermann, M. R., K.A. Brogden. (2000). Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. *Microbes and infection* **2:** 1079–1088. doi:10.1016/S1286-4579(00)01262-4
2) Bancroft, J. D., G. Marilyn. (2007). Theory and practice of histological techniques. 6th Edn., K, Elsevier-Health Sciences Division. PP: 250-260.
3) Brogden, K.A., H. D. Lehmkuhl., R.C. Cutlip. (2008). M. haemolytica complicated respiratory infections in sheep and goats. *Veterinary Research* **29:** 233–254.
4) Diker, K.S., M. Akan., O. Kaya. (2000). Evaluation of Immunogenicity of Pasteurella hemolytica serotypes in Experimental Models. *Turkish Journal of Veterinary* and *Animal* Sciences **24:** 139–143.
5) Dungworth, D. L. (2016). Respiratory system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, Editors: *Pathology of Domestic Animals*. 4th Ed. **2:** 613–615.
6) Haritani, M., S. Ishino., M. Oka., M. Nakazawa., M. Kobayashi., M. Narita., T. Takizawa. (2006). Immunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions in calves naturally infected with Pasteurella haemolytica. Nippon juigaku zasshi. *The Japanese journal of Veterinary Science* **51:** 1137–41.
7) Haritani, M., M. Nakazawa., K. Hashimoto., M. Narita., Y. Tagawa., M. Nakagawa. (2009). Immunoperoxidase evaluation of the relationship between necrotic lesions and causative bacteria in lungs of calves with naturally acquired pneumonia. *American Journal of Veterinary Research* **51:** 1975–9.
8) Haritani, M., M. Nakazawa., S. Oohashi., Y. Yamada., R. Haziroglu., M. Narita. (2005). İmmunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions induced by P. haemolytica in calves. *American Journal of Veterinary Research* **48:** 1358–62.

Haziroglu, R., K. S. Diker., J. Turkarslan., M. Y. Gulbahar. (2013). Detection of Mycoplasma ovipneumoniae and Pasteurella haemolytica Antigens by an Immunoperoxidase Technique in Pneumonic Ovine Lungs. *Veterinary Pathology* **33:** 74–76.

9) Horadagoda, N. U., M. C. L. Alwis., S. G. Wettimuny., C. S. V. B. Anthony., A. A. Vipubasiri., M. C. L. De-Alwis. (1981). Bacteriological studies on normal and pneumonic lungs of goats in Sri Lanka. *Ceylon Veterinary Journal* **29:** 13-19.
10) Hsu, S.M., L. Raine, H. Fanger. (2016). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. Journal of Histochemistry and Cytochemistry **291:** 577–580.
11) Jasni, S., M. Zamri-Saad, A. Kamal-Hizat., A. R. Mutalib., N. Salim, A. R. Sheikh-Omar. (2011). Seasonal occurrence of caprine pneumonic pasteurellosis in central Peninsular Malaysia. *Jurnal Veterinar Malaysia* (JVM) **2:** 147–148.
12) Keles, I., Z. Woldehiwet., R. D. Murray. (2006). In-vitro studies on mechanisms of immunosuppression associated with bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Comparative Pathology*, **118:** 337–45.
13) Narita, M., K. Kimura., N. Tanimura., S. Arai., T. K. Katsuda. (2000). Immunohistochemical characterization of calf pneumonia produced by the combined endobronchial administration of bovine herpesvirus 1 and Pasteurella haemolytica. *Journal of Comparative Pathology* , **123:** 126–34. doi:10.1053/jcpa.2000.0402
14) Slocombe, R. F., J. Malark., R. Ingersoll., F. J. Derksen., N. E.

Robinson. (2008). Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *American Journal of Veterinary Research* **46:** 2253–2258.

15) Whiteley, L. O., S. K. Maheswaran., D. J. Weiss. (2010). Immunohistochemical localization of P.haemolytica A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine Pasteurella pneumonia. *Veterinary Pathology***, 27:** 150–61. PMID: 2191489, DOI: 10.1177/030098589002700302

16) Yener, Z., K., Gürtürk, M.Y., Gülbahar, H.Solmaz. (2001). Pathological and bacteriological studies on pneumonia in goats slaughtered at Bitlis slaughterhouse. *Veteriner Bilimleri Dergisi* **17**: 13-20 DOI: 10.1046/j.1435-6935.2002.00025

17) Yener, Z., Y. S. Sağlam., N. Timurkaan., F. Ilhan. (2005). Immunohistochemical Detection of Parainfluenza Type 3 virus Antigens in Paraffin Sections of Pneumonic Caprine Lungs. *Journal of veterinary medicine* **52:**268–271. doi:10.1111/j.1439-0442.2005.00724.x

18) Yener, Z., F. Ilhan., Z. Ilhan., Y. S. Saglam. (2009). Immunohistochemical detection of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica antigens in goats with natural pneumonia. *Veterinary Research Communication* **33:**305-13. doi: 10.1007/s11259-008-9178-z.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 1,
Spring & Summer 2022

Detection of Pneumonic Manheimiosis in Slaughtered Goats using Immunohistochemistry, Bacteriology and Histopathology

Keivan Jamshidi*
Assistant Professor, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, IAU, Garmsar Branch Iran
Received: 9 July 2019 *Accepted: 1 October 2020*

Abstract

Pneumonic Mennheimiosis caused by Mannheimia (Pasteurella) haemolytica is one of the most important etiological agent of pneumonia in cattle, sheep, and goats throughout the world. This study was conducted in Semnan province, North East Iran to determine the incidence and prevalence of M. haemolytica antigens using immunohistochemistry labelling of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of goats with natural pneumonia and slaughtered in slaughterhouse and then comparing its results with the results of bacterial isolation.

For this purpose, a total of 402 goat lungs slaughtered at abattoir were grossly examined and pneumonia was detected in 38 cases (9.45 %). With the exception of verminous pneumonia which were observed in 6 cases, bacteriological and immunohistochemical examinations were performed on 32 pneumonic lungs. The presence of M. haemolytica and its antigens were detected in 12 (%37/5) and 14 (% 43.75%) out of 32 pneumonic lungs respectively.

Bacterial antigens were found most frequently in the cytoplasm of bronchial and bronchiolar epithelial cells, in the degenerating leukocytes in the alveoli, and in the degenerating leukocytes in the necrotic area, less frequently in the epithelial cells of bronchial glands, and lymphoid cells.

In conclusion, detection of M. haemolytica antigens in pneumonic lungs using immunohistochemistry appear to be more reliable compared to bacterial isolation.

Keywords: Mannheimia haemolytica, İmmunohistochemistry, Goat, Pneumonia

**Corresponding author: Keivan Jamshidi*
Address: Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, IAU, Garmsar Branch Iran..
E. mail: k.jamshidi@iau-garmsra.ac.ir