بررسی کشتارگاهی عفونت پاراتوبرکولوزی در گوسفند و بز در شهرستان اصفهان و مقایسه برخی از روشهای مختلف تشخیصی آن

دکتر علی شریف زاده[۱]*،دکتر حسن ممتاز[۲]،دکتر فرهید همت زاده[۳]،دکتر هومن سنجابی[۴]

چکیده

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس یک بیماری عفونی مزمن غیر قابل درمان در نشخوارکنندگان سراسر جهان است. بیماری از نظر اقتصادی حائز اهمیت می باشد و از خصوصیات آن انترو کولیت گرانولوماتوز، تورم عروق لنفاوی موضعی و لنفادنیت است که منجر به بروز علامت شاخص بیماری یعنی کاهش وزن پیشرونده می شود. بیماری در دهه اخیر با تمام وجودش در دامپروریهای ایران به ویژه در گاوداریهای صنعتی چهره نشان داده و خسارات شدیدی در ارتباط با کاهش تولید به ویژه شیر، حذف دام از گله و اشاعه آلودگی به شکل بالینی و غیر بالینی وارد آورده است. به همین منظور و با هدف مشخص شدن وضعیت این بیماری در کشتارگاه صنعتی اصفهان از یکصد رأس گوسفند و بز ارجاعی به آن کشتارگاه به طور همزمان یک نمونه سرم، گسترش مدفوع، گسترش مخاط ایلئوسکال و گسترش غدد لنفاوی تهیه و در مورد نمونه سرم آزمون الایزا صورت پذیرفت. گسترشهای مدفوع، مخاط ایلئوسکال و غدد لنفاوی با دو روش زیل نلسون و فلور و کروم رنگ آمیزی شدند. پس از انجام آزمایشهای مربوطه میزان آلودگی کشتارگاهی گوسفندان پنج و بزهای منطقه دو درصد، در روش مستقیم مشخص گردید. میزان آلودگی به عامل بیماری یون در آزمون الایزا ۶۰٪ مشخص گردید.

واژه های کلیدی : *بیماری یون، مشاهده مستقیم، الایزا، گوسفند ، بز*

An abattoir survey of Paratuberculosis infection in sheep and goat in Isfahan and comparison of some diagnostic methods

Sharifzadeh.A[1], Momtaz.H[2],Hemmatzadeh.F[3] ,Sanjaby.H[4]

1-Department of Microbiology,Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University,Shahrekord Branch,Shahrekord , Iran
2-Department of microbiology,Faculty of Veterinary Medicine , Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord , Iran
3-Department of Microbiology,Faculty of Veterinary Medicine , Tehran University,Tehran,Iran.
4-Graduated of Faculty of Veterinary Medicine , Islamic Azad University,Shahrekord Branch,Shahrekord , Iran

Johne's disease or paratuberculosis is a chronic infective disease which is uncurable in ruminants. The disease has an economical importance. Entrocolitical granulomatosis, lymphangitis and lymphadenitis are the features of the disease that lead to distinct progressive loss weight .The disease has widely spread in industrial husbandaries and cowkeeping houses and can produce heavy loss of milk production, cow breeding and distribution of infection in clinical or nonclinical form. In this study a serum sample, a fecal smear, an ileosecal mucus were taken smear and a lymphatic gland smear simultaneously from 100 sheep and goats in slaughter house of Isfahan. Elisa test was done on the serum samples and the other samples were stained with two methods of zeihl-Nelson and fleurochrom. The infection rate were %5 in the sheep and %2 in the goats by using direct method. The percent age of infection to Johne's disease was %60.

Key words: *Johne's disease,Direct method,Elisa,Sheep, Goat*

مقدمه

بیماری یون اولین بار در سال ۱۸۹۵ بوسیله یون و فروتینگهام در یک رأس گاو مبتلا به تورم روده مزمن با ضایعات ضخیم شدگی و چین خوردگی مخاط روده ای همراه با حضور باسیلهای اسیدفست شناخته شد. در سال ۱۹۰۶ بانگ متوجه شد این بیماری سل نمی باشد و آنرا بیماری یون نامید. عامل بیماری یون، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس است.

۱-گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد ، ایران
۲- گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد،ایران
۳- گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران .
۴-دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

این عامل ارتباط نزدیکی با مایکوباکتریوم اویوم دارد بطوریکه در نامگذاری جدید این گونه به عنوان تحت گونه ای از اویوم یعنی مایکو باکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس شناخته شده است. باکتری اسیدفست، ۱/۵-۰/۵ میکرون طول و ۰/۵ میکرون عرض دارد. (۹ ۷،۸، ۶، ۵، ۴، ۳)این بیماری ابتدا در اروپا شایع بود و به دنبال صادرات دام به سایر کشورها گسترش یافت. هرچندکه خسارات حاصل از مرگ و میر بیماری در کل گله چندان زیاد نیست (حدود ۱٪ در گله های درگیر) اما خسارات حاصل از کاهش تولید، کاهش وزن، ناباروری، حذف زود هنگام، هزینه های کنترل و پیشگیری و مرگ و میر مجموعاً سالیانه خسارات زیادی را در کشورهای آلوده وارد می سازد.

نادعلیان و طباطبائی (۱)در یک بررسی به مدت ۵ سال مختوم به سال ۱۳۷۲ در گاوداریهای اطراف تهران خسارات اقتصادی بیماری را در جمعیت گاوهای بالغ کشور ۱۱۲۸۰۵۶۰۰۰ ریال برآورد کردند(۱). در ایران بیماری یون برای اولین بار توسط خلیلی و طلاچیان (۳) در سال ۱۳۳۹ شناخته شد و منشأ عفونت دامهای وارداتی گزارش گردید. در گوسفند و بز برای اولین بار بهار صفت و همکاران (۳) در سال ۱۳۴۹ عامل یون را از یک رأس بز جدا نمودند. بیماری در دهه اخیر با تمام وجودش در دامپروریهای ایران چهره نشان داده و خسارتهای شدیدی را در ارتباط با کاهش تولید به ویژه شیر، حذف دام از گله و اشاعه آلودگی بشکل بالینی و غیر بالینی وارد می آورد.

با توجه به شواهد موجود بیماری در بسیاری از نواحی بخصوص در گله های عشایری استان فارس رو به افزایش بوده و خسارات جبران ناپذیری را به سیستم دامپروری وارد می نماید. خانقاهی ابیانه (۳) در یک بررسی کشتارگاهی در کشتارگاه زیاران (۲۵۶ رأس گوسفند)، ساوه (۳۲ رأس گوسفند) و خورین در استان مرکزی (۹۱ رأس گوسفند) به ترتیب پنج، دو و صفر مورد مثبت و آلوده پیدا کرد. گودرزی نیز در سال ۱۳۷۵ (۲) به روش مشاهده مستقیم در کشتارگاه بروجرد ۱/۹۹٪ گوسفندان، ۶۴٪ گاوان و ۲/۷۳٪ بزهای کشتار شده را آلوده به یون اعلام نمود. ایرائی نیز در سال ۱۳۷۸ (۱) به روش مشاهده مستقیم در کشتارگاههای استان ایلام میزان آلودگی گوسفندان را ۱/۵٪ و میزان آلودگی بزها را ۳٪ گزارش نمود. بر حسب کارهای انجام شده گرچه تا کنون وقوع بیماری یون در گاو، گوسفند و بز در استانهای مختلف کشور گزارش شده است ولی از میزان، نوع و فراوانی این بیماری در مناطق مختلف کشور هنوز آمار دقیقی موجود نیست (۲).

مواد و روش کار

این بررسی در سطح کشتارگاه صنعتی شهرستان اصفهان و به روش نمونه گیری تصادفی انجام گرفت. به این ترتیب که در روزهای متفاوت هفته به کشتارگاه مراجعه و قبل از کشتار بطور تصادفی از هر ۱۰ رأس گوسفند یا بز موجود در کشتارگاه یک رأس انتخاب و علامت گذاری میگردید. در این حین خصوصیات دام از قبیل نوع دام، جنس و سن دام ثبت شده و پس از کشتار از دامها علامت گذاری شده، نمونه برداری صورت می پذیرفت. نمونه های گرفته شده از ۸۵ رأس گوسفند و ۱۵ رأس بز عبارت بودند از گسترش عقده لنفاوی مجاور دریچه ایلئوسکال، گسترش مخاط دریچه ایلئوسکال و گسترش مدفوع انتهای رکتوم به منظور رنگ آمیزی و پنج میلی لیتر خون از ورید و داج جهت انجام آزمون الایزا در مرحله بعد گسترشها با کمک شعله ثابت شده و به آزمایشگاه ارسال می گردید. پس از لخته شدن و سانتریفوژ خون گرفته شده نیز از سرم جدا گردیده و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری می گردید. هدف از انتخاب این سه محل علاوه بر تعیین وضعیت آلودگی، مقایسه حساسیت هر یک از محل ها در تشخیص دامهای آلوده بود. در آزمایشگاه هر

یک از نمونه ها به طور مجزا با روشهای زیل نلسون و فلور و کروم رنگ آمیزی می گردید. نمونه های مربوط به رنگ آمیزی زیل نلسون در زیر میکروسکوپ نوری جهت مشاهده کلامپهای باکتریائی مورد بررسی قرار می گرفتند. گسترش هائی که در این آزمایش مثبت یا مشکوک بودند جهت تأیید تشخیص و جلوگیری از اشتباهات فردی به مؤسسه رازی ارسال و توسط بخش میکروبیولوژی آن مؤسسه مورد تأئید قرار می گرفت (منظور از نتیجه مثبت مشاهده کلامپهای باکتریهائی اسیدفست در نمونه ها بود) نمونه های مربوط به رنگ آمیزی فلورو کروم نیز در زیر میکروسکوپ فلورسانس بطور مجزا مورد بررسی قرار می گرفت. این کلامپها در زیر این میکروسکوپ رنگ سبز با تلؤلؤ فلورسانس از خود نشان می دادند. در مورد سرمهای فریز شده نیز آزمون الایزا صورت می پذیرفت. این آزمون با استفاده از کیت تجاری Paratuberculosis – Ab شرکت svanova سوئد صورت گرفت.

نتایج

از یکصد رأس دام انتخاب شده از هر کدام ۶ نمونه گسترش مستقیم و یک نمونه سرم به شرح گفته شده در مواد و روش کار تهیه گردید. بدین ترتیب در مجموع سیصد عدد گسترش تهیه شده از عقده لنفاوی مجاور دریچه ایلئوسکال، مخاط دریچه ایلئوسکال و مدفوع انتهای رکتوم با رنگ آمیزی زیل نلسون و میکروسکوپ نوری و سیصد عدد گسترش تهیه شده از همان محلها با رنگ آمیزی فلوروکروم و میکروسکوپ فلورسانس بررسی و در مورد سرمهای مربوطه نیز آزمایش الایزا انجام گردید.

در نتیجه انجام آزمایشات صورت گرفته در مجموع ۲٪ از گسترشهای تهیه شده در رنگ آمیزی زیل نلسون و ۷٪ از گسترشهای تهیه شده در رنگ آمیزی فلوروکروم واجد کلامپهای باکتریائی بودند. در مشاهده مستقیم با رنگ آمیزی زیل نلسون ۱/۲٪ از گوسفندها و ۶/۶٪ از بزها و ۰٪ از دامهای نر و ۴/۶٪ از دامهای ماده آلوده به یون تشخیص داده شدند در حالیکه در رنگ آمیزی فلوروکروم در ۵/۹٪ از گوسفندها و ۱۳/۳٪ از بزها، ۵/۳٪ از دامهای نر و ۹/۳٪ از دامهای ماده کلامپهای باکتریائی مشاهده گردید.

همچنین در زیر میکروسکوپ نوری در ۱/۲٪ از گسترشهای مخاط ایلئوسکال و مخاط عقده های لنفاوی کلامپهای باکتریائی مشاهده گردید ولی در مورد گسترش مدفوع هیچ کلامپی مشاهده نگردید در حالیکه در زیر میکروسکوپ فلورسانس در ۲٪ از گسترشهای مدفوعی، ۶٪ از گسترشهای مخاط ایلئوسکال و ۳٪ از گسترشهای مخاط عقده های لنفاوی، کلامپهای باکتریائی مشاهده گردید. همچنین در رنگ آمیزی زیل نلسون در ۱/۷٪ از دامهای ۲-۱ ساله و در رنگ آمیزی فلوروکروم در ۸/۵٪ از این دامها کلامپهای باکتریائی مشاهده گردید در حالیکه در مورد دامهای ۳-۲ ساله در رنگ آمیزی زیل نلسون ۳/۲ و در رنگ امیزی فلورکروم ۴/۶٪ واجد این کلامپها تشخیص داده شدند. در دامهای سه سال و بالاتر هیچ کلامپی در هر دو روش رنگ آمیزی مشاهده نگردید. انجام آزمون الایزا نیز در مورد ۶۰ نمونه سرمی (۶۰٪) نتیجه مثبت نشان داد. این آزمون در مورد کلیه نمونه هایی که در رنگ آمیزی با روش زیل نلسون یا فلورو کروم نتایج مثبت نشان داده بودند مثبت مشاهده گردید. در انجام آنالیز آماری به روش مربع کای بین فاکتورهایی مثل جنس، سن، نوع دام و محل نمونه برداری با آلودگی به بیماری ارتباط آماری معنا داری مشاهده نگردید. همچنین بین قسمت های مختلف روده با آلودگی به بیماری نیز هیچگونه ارتباط آماری معناداری مشاهده نگردید. مشخصات نمونه های مثبت در جدول ۱ خلاصه شده است:

جدول۱: مشخصات نمونه ها ی مثبت به روش مشاهده مستقیم

کد نمونه	رنگ آمیزی فلوروکروم			رنگ آمیزی زیل نلسون			سن دام و (سال)	نوع دام	جنس دام
	غده لنفی دریچه ایلئوسکال	مخاط دریچه ایلئوسکال	مخاط انتهای رکتوم	غده لنفی دریچه ایلئوسکال	مخاط دریچه ایلئوسکال	مخاط انتهای رکتوم			
۱	–	+	–	–	–	–	۲-۱	گوسفند	نر
٦	+	+	+	+	+	–	۲-۱	بز	ماده
۱۲	–	+	–	–	–	–	۲-۱	بز	ماده
۲۳	+	+	+	+	+	–	۳-۲	گوسفند	ماده
۲۵	–	+	–	–	–	–	۲-۱	گوسفند	نر
۸۰	–	+	–	–	–	–	۲-۱	گوسفند	ماده
۸۹	+	–	–	–	–	–	۳-۲	گوسفند	نر

بحث

بیماری یون دارای دوره کمون طولانی بوده و عامل بیماری می تواند بدون بروز علائم تا مدت زیادی در بدن حیوان باقی مانده و حیوان بدون بروز علائم عامل بیماری را از راه مدفوع دفع کند. در گوسفند و بز اساساً لاغری مفرط نشانه بیماری است گرچه پشم ریزی نیز ممکن است در گوسفند اتفاق بیفتد. در این گونه ها بیماری حادتر از گاو می باشد. آزمایشهای میکروبیولوژیکی از جمله جداسازی باکتری از مدفوع و رنگ آمیزی باکتری از آن بهمراه آزمونهای سرولوژیکی از جمله الایزا آزمون تثبیت عناصر مکمل و آزمایش آگارژل ایمونودیفوزیون مهمترین راههای تشخیص آلودگی به بیماری محسوب میگردند. آزمایش اولیه الایزا دارای ویژگی پائینی می باشد گرچه حساسیت آن خوب است. آزمایش بهبود یافته الایزا دارای ۵۷٪حساسیت و ۹۸/۹٪ ویژگی می باشد. یک کیت جدیدالایزا شناخته شده است که میزان حساسیت آن برای موارد غیر آشکار بیماری ٤۷/۳٪ و ویژگی آن ۹۹٪ می باشد. با این روش۸۰٪ موارد بیماری قبل از بروز علائم درمانگاهی تشخیص داده میشود. بنظر میرسد که علیرغم اینکه در تحقیق حاضر میزان آلودگی سرمی ٦۰٪ در آزمون الایزا اعلام شده است ولی باتوجه به ماهیت داخل سلولی باکتری از یکسو و توانایی آزمون الایزا در ارزیابی ایمنی هومورال از سوی دیگر به احتمال بسیار زیاد میزان آلودگی از این هم بالاتر است که خود زنگ خطر مهمی برای دست اندرکاران امر می باشد. در کلیه موارد مثبت آزمون الایزا و باروش های مشاهده مستقیم هیچگونه جراحت کالبد گشائی،بزرگ شدگی غدد لنفاوی مزانتریک و یا ضخیم شدگی و چین خوردگی مخاط روده ای مشاهده نگردید و به احتمال بسیار زیاد این میزان آلودگی مربوط به دوره قبل از علائم درمانگاهی بیماری است چرا که عموماً به ازای هر مورد دام مبتلا که علائم کلینیکی را نشان میدهد در گله ۲۵-۱۵ دام مبتلا وجود دارد، ماهیت مزمن بودن بیماری از یکسو وچهره درمانگاهی خاص بیماری در گوسفند از سوی دیگر باعث شده که بیماری بصورت پنهان به صنعت دامپروری کشور ضررو زیان زیادی وارد نماید.جستجوی کلامپهای باکتریایی در گسترشهای تهیه شده از مدفوع یابیوپسی مخاط راست روده که رنگ آمیزی شده باشد نیز یکی از روش های تشخیصی است که در مورد یون بکار میرود.این روش سریع و کم هزینه را میتوان در سطح دامداری بکار بست. در روش مستقیم بین مدفوع

و مخاط انتهای راست روده تفاوت معنی داری در تشخیص آلودگی وجود نداشته و در هر دو حالت غالباً هنگامی که دام ازلحاظ بالینی مراحل پیشرفته بیماری را گذرانیده و میکروب را به تعداد زیادی دفع می کند مثبت مشاهده می شود. در همین رابطه هنگامی که دام مبتلا به اسهال است را بهترین زمان برای این آزمایش میدانند، چون زمانی که دام اسهال دارد مقدار بیشتری سلولهای پوششی روده همراه مدفوع دفع می شود. لذا این آزمایش به ویژه جهت تأیید موارد درمانگاهی بیماری کاملاً کاربردی است از طرفی چون در دامهای آلوده نسبتاً مقاوم، باکتری به تناوب دفع می شود لذا در موارد منفی می بایست در فواصل زمانی مختلف تعداد متعددی گسترش تهیه کرد. در تجربه حاضر در رنگ آمیزی به روش زیل نلسون در هیچ یک از دامهای آلوده و در روش فلوروکروم فقط دو مورد از موارد آلودگی دفع باکتری از مدفوع مشاهده می گردید که این امر یکبار دیگر ارزش اندک گسترش مدفوع را نسبت به سایر روشهای تشخیصی تأیید می نماید. آزمایش مستقیم گسترشهای تهیه شده از ایلئوم انتهایی و دریچه ایلئوسکال را روش نسبتاً خوبی برای تشخیص آلودگی به یون در کشتارگاه یا در کالبد گشائی دام می دانند و این نواحی بعنوان نواحی انتخابی برای نمونه برداری و آزمایش مستقیم در گوسفند و بزپیشنهاد شده است. در تجربه حاضر نیز گسترش مخاط ایلئوسکال در بیش از ۸۵٪ موارد مثبت در روش مستقیم بخصوص در رنگ آمیزی فلوروکروم آلودگی را نشان داده و مؤید مناسب بودن این نمونه در تشخیص یون پس از مرگ می باشد. با وجودی که درمنابع متعددی از روش تشخیص مشاهده مستقیم گسترشهای تهیه شده از عقده های لنفاوی نام برده شده است ولی این روش را اصولاً غیر حساس در تشخیص یون می دانند چنانچه در تجربه حاضر نیز در مورد حدود ۳۰٪ موارد مثبت در روش مستقیم و رنگ آمیزی فلوروکروم در این ناحیه واجد آلودگی بوده اند. البته باید توجه داشت که نمونه برداری از ناحیه کورتکس عقده های لنفاوی بهتر است چرا که احتمال حضور باکتری در کورتکس عقده بیشتر از مدولا می باشد. آنچه در این قسمت قابل نتیجه گیری است آن است که در برخورد با لاشه یک دام مشکوک به بیماری پاراتوبرکلوزیس نمونه برداری از مخاط دریچه ایلئوسکال در مقایسه با مدفوع ، مخاط راست روده (چنانچه ارزش تشخیص آنرا بر حسب نتایج دیگران برابر با نمونه مدفوع بدانیم) و حتی در عقده لنفاوی مزانتر کاملاً ارجحیت دارد. هم چنین بر اساس نتایج این تحقیق به نظر می رسد که استفاده از رنگ امیزی فلوروکروم بجای روش زیل نلسون باعث افزایش دقت روش مستقیم در جایگاه خود میگردد. گرچه در حساسیت و ویژگی روش مستقیم تردید وجود دارد و نیز تفریق عامل بیماری یون از سایر اجرام اسید فست موجود در مدفوع مشکل می باشد ولی این روش بعنوان انتخاب پس از کشت و آزمونهای سرمی مورد توجه می باشد .

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می دانند از زحمات آقای دکتر تقی زهرایی و دکتر سعید آل آقا بدلیل راهنمائیهای علمی خود قدردانی نمایند.

فهرست منابع

۱.ایرائی، م.(۱۳۷۸) بررسی کشتارگاهی شیوع آلودگی به یون در جمعیت گوسفند استان ایلام. مجموعه مقالات یازدهمین کنگره جهانی دامپزشکی ایران. صفحه ۱۸۳-۱۸۰.
۲.حسنی طباطبائی، ع. فیروزی، ر.(۱۳۸۰) بیماریهای باکتریایی دام، انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۴۳۲-۳۹۸.
۳.خانقاهی ابیانه، ح.(۱۳۷۲) بررسی کشتارگاهی میزان آلودگی به مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس در گوسفند و بز بومی، پایان نامه شماره ۲۲۶۲- دانشکده دامپزشکی تهران

4.Barksdale , L.Kim , K.(1977)Mycobacterium paratuberculosis. Bacteriological review, 14(1) : 217-372.
5.Bethharis,N.Barletta.R.(2001).Mycobacterium avium Subsp.paratuberculosis in veterinary medicine. Clinincal microbiology review, 14 (3) : 489-512.
6.Chiodini , R. (1989).Crohn's disease and the Mycobacteriosis : a review and comparison of two disease entrities.Clinical microbiology review , 2(1) : 90-117.
7.Cocito ,C.Gilot , P.Coene , M.Kesel , M.Poupart , P.Vannuffel , P.(1994).paratuberculosis . Clinical microbiology review , 7(3) : 328-345.
8. kumar,A (1984). Diagnosis of paratuberculosis in sheep, modern veterinary practice, 65 (2):139-241
9.Sorensen,O.Rawluk,S.Manninen,K.Ollis. G.(2003).MycobacteriumParatuberculosis in dairy herds in Alberta. The Canadian Veterinary Journal, 44(3) : 221-226.