مطالعه هیستوپاتولوژیکی ضایعات ریوی و شناسایی مولکولی پاستورلوز و مایکوپلاسموز در کشتارگاه فریمان

منوچهر حسن‌زاده[۱]، سیده آیدا داوری*[۲]، محسن نجیمی[۲]، عباس جمشیدیان[۲]

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ آذر ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۱ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۹ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

پاستورلوز و مایکوپلاسموز مهم‌ترین بیماری‌های تنفسی باکتریایی هستند که از لحاظ اقتصادی سبب کاهش تولید، کاهش وزن، افزایش میزان مرگ و میر در گله‌های گوسفندان شیری و گوشتی می‌شوند. این مطالعه جهت تعیین خصوصیات هیستوپاتولوژیکی و مولکولی ضایعات ریوی ایجاد شده توسط پاستورلوز و مایکوپلاسموز در گوسفندان کشتار شده در فریمان انجام شد. ۴۹۶۰ ریه از گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه فریمان در سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. ۹۰ ریه از ۴۹۶۰ (۱/۸۱ درصد) که از لحاظ ماکروسکوپی مشکوک به پنومونی بودند بررسی میکروسکوپی شدند. واکنش زنجیره پلیمراز جهت شناسایی مولکولی *پاستورلا مولتی‌سیدا* و *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* انجام شد. همچنین، آنالیز آماری مربع کای انجام شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ آنالیز شدند. آنالیز مولکولی نشان‌دهنده ۱۶ نمونه مثبت *پاستورلا مولتی‌سیدا* (۰/۰۳۲ درصد) بود اما *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* در تمامی نمونه‌ها منفی بود. در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی، متداول‌ترین ضایعه، برونکوپنومونی چرکی بود (۱/۱۶ درصد). به‌علاوه، ارتباط آماری معنی‌داری بین سن، جنس و فصل با *پاستورلا مولتی‌سیدا* وجود نداشت ($P> ۰/۰۵$). این یافته‌ها آشکار کرد که *پاستورلا مولتی‌سیدا* یکی از عوامل متداول مسبب پنومونی باکتریایی در گوسفندان کشتار شده در فریمان است و مشخصات هیستوپاتولوژیکی آن قابل توجه می‌باشد.

کلمات کلیدی: *پاستورلا مولتی‌سیدا، ریه، گوسفند، مایکوپلاسما اوی‌نومونیه*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: a.davari@uoz.ac.ir

مقدمه

میکروارگانیسم‌های عفونی متعددی (باکتری، مایکوپلاسما، ویروس‌ها و قارچ‌ها)، در تقابل با سیستم دفاعی بدن میزبان و شرایط محیطی می‌توانند سبب پنومونی شوند (۳). *پاستورلا مولتی‌سیدا* و *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* دو باکتری مهم و مسبب این بیماری هستند (۱۷). *پاستورلا مولتی‌سیدا* یک باکتری گرم منفی و فلور نرمال قسمت قدامی دستگاه تنفس گوسفند است که به‌عنوان متداول‌ترین و مهم‌ترین پاتوژن ثانویه مسبب پنومونی در قسمت‌های خلفی دستگاه تنفس نشخوارکنندگان کوچک شناخته شده است (۱۶). یکی از اصلی‌ترین منابع تأمین پروتئین به‌عنوان بخش اصلی رژیم غذایی روزانه انسان، توسط گوسفند و بز مهیا می‌شود. پنومونی‌های پاستورلوزی به علت کاهش تولید شیر و گوشت، حذف لاشه در کشتارگاه، افزایش میزان درگیری و گاهی مرگ و میر به‌خصوص در بره‌های نوزاد، سبب مضرات اقتصادی قابل توجهی برای دامداران می‌شوند (۱۲، ۱۷، ۱۸).

گونه‌های *مایکوپلاسما* باکتری‌های کوچک فاقد دیواره هستند که سبب بیماری‌های تنفسی در اغلب گونه‌های پستانداران و طیور می‌شوند. *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* در نشخوارکنندگان کوچک سبب تورم پستان، آرتریت مفصلی، بیماری‌های دستگاه تولید مثلی و ضایعات چشمی می‌شود (۱۸). این باکتری همچنین می‌تواند شرایط بدن میزبان را جهت تهاجم پاتوژن‌هایی نظیر *منهمیا هملایتیکا* و *پاستورلا مولتی‌سیدا* مساعد کند (۲۵). پنومونی‌ها بر اساس مشخصات هیستوپاتولوژیکی و میزان شدت (خفیف تا شدید و حاد تا مزمن)، به پنج دسته طبقه‌بندی می‌شوند: برونکوپنومونی چرکی، برونکوپنومونی فیبرینی، پنومونی بینابینی، پنومونی آمبولیک و پنومونی گرانولوماتوزی (۲۶). امروزه روش‌های مولکولی نظیر PCR به علت سرعت، دقت، حساسیت و اختصاصیتی که دارند، به‌عنوان روش‌های قابل اعتماد به صورت گسترده جهت تشخیص عوامل عفونی استفاده می‌شوند و می‌توانند یافته‌های حاصل از روش‌های کیفی نظیر هیستوپاتولوژی را تأیید نمایند (۲۴).

مطالعات فراوانی در رابطه با پنومونی‌های باکتریایی در گوسفند یا توصیف ضایعات پاتولوژیک آنها و تشخیص مولکولی عوامل آنها در ایران و سایر کشورها انجام شده است (۱، ۳، ۶، ۱۱، ۱۲، ۱۷، ۲۰، ۲۲). بیماری پاستورلوز به‌عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام از لحاظ بهداشت عمومی مورد توجه است و می‌تواند در انسان عفونت‌های تحت بالینی، مزمن و حتی حاد ایجاد کند (۱۶). کشتارگاه دام فریمان، به‌عنوان اولین کشتارگاه صنعتی دام در شرق کشور از اهمیت خاصی برخوردار است (https://gooshtfariman.com). این کشتارگاه در جاده فریمان، نزدیک به شهرستان فریمان (در ۷۵ کیلومتری مشهد مقدس) و در شمال شرق استان خراسان رضوی واقع شده است و از آب و هوای نیمه‌کوهستانی، که جهت کشاورزی و دامپروری مناسب است، برخوردار می‌باشد. با وجود اهمیت استراتژیک کشتارگاه فریمان و واردات غیر قانونی دام از کشورهای همسایه شرقی ایران (۲۳)، مطالعه و بررسی خاصی در رابطه با پنومونی‌های دامی توسط محققین و دامپزشکان بخش خصوصی در این منطقه صورت نگرفته است. بنابراین، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی مشخصات ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژی ضایعات ریوی همراه با تشخیص مولکولی پاستورلوز و مایکوپلاسموز در گوسفندان کشتارشده در کشتارگاه صنعتی فریمان انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در مطالعه حاضر، از ۴۹۶۰ گوسفند نر و ماده از تمامی گروه‌های سنی و

نژادهای مخلوط ارجاعی به کشتارگاه صنعتی فریمان به صورت تصادفی در طول سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ استفاده شد. مراحل مراجعه به کشتارگاه و جمع‌آوری نمونه‌ها در هر چهار فصل سال در بازه زمانی مذکور انجام گرفت. از مجموع ۴۹۶۰ ریه مورد بررسی، از ۹۰ بافت ریه که در بررسی ماکروسکوپی به پنومونی باکتریایی مشکوک بودند جهت بررسی هیستوپاتولوژی و مولکولی نمونه‌برداری شد. هر نمونه با حفظ مشخصات میزبان، به دو قسمت تقسیم گردیده، نیمی از آن جهت بررسی پاتولوژیک در فرمالین بافر ۱۰ درصد و نیمی دیگر جهت بررسی مولکولی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل قرار گرفت. نمونه‌های فریز شده جهت استخراج DNA توسط نیتروژن مایع به صورت پودر ریز و یکدست در آمدند.

ارزیابی هیستوپاتولوژیکی: نمونه‌های بافتی تازه با ابعاد ۱×۱×۰/۵ سانتی‌متر از ۹۰ گوسفند مشکوک به پنومونی در بررسی‌های ماکروسکوپیک کشتارگاهی، بلافاصله در فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت شدند و جهت تثبیت بهتر، فرمالین نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت تعویض گردید. پس از انجام مراحل روتین تهیه بافت (آبگیری با اتانول، شفاف‌سازی با زایلل، آغشتگی و قالب‌گیری در پارافین مذاب) توسط دستگاه اتوتکنیکون، برش‌های بافتی با ضخامت میانگین ۵ میکرومتر توسط میکروتوم روتاری در آزمایشگاه هیستوپاتولوژی تهیه و طبق روش متداول رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ شدند. اسلایدهای حاصله توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و ضایعات موجود در هر اسلاید به صورت جداگانه ثبت و عکس‌برداری شد تا با مشخصات ماکروسکوپیک بافت‌ها در بررسی کشتارگاهی مطابقت داده شود. نتایج ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک در جداول جداگانه‌ای به ثبت رسیدند که در قسمت نتایج آورده شده است.

روش استخراج DNA و واکنش زنجیره پلیمراز (PCR): DNA از نمونه‌های فریز شده توسط کیت تجاری سیناژن (DNPTM, CinnaGen Co., Iran) طبق دستورالعمل کیت مذکور استخراج و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. توالی ژن KMT1 توسط روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (5′-KMT1T7: ATCCGCGATTTACCCAGTGG-3′ و KMTSP6: 5′-GCTGTA AACGAACTCGCCAC-3′) بر اساس پژوهش‌های قبلی (۱۲)، جهت شناسایی *پاستورلا مولتی‌سیدا* تکثیر شد. PCR در حجم نهایی 15 µl شامل 2 µl از DNAی استخراج شده، بافر ۱x، mM ۰,۳ از dNTP، 1.5 mM از MgCl2، ۱۰ Pmol/µl از هر آغازگر و یک واحد Taq DNA پلیمراز تهیه شد. برنامه PCR به صورت ۳۵ چرخه شامل: ºC ۹۴ به مدت یک دقیقه (جداسازی اولیه دو رشته)، ºC ۹۴ به مدت دو دقیقه (جداسازی دو رشته)، ºC 55 به مدت ۵۴ ثانیه (اتصال پرایمرها)، ºC ۷۲ به مدت ۱/۵ دقیقه (تکثیر رشته‌ها) برای دستگاه ترموسایکلر انتخاب شد. پس از اتمام چرخه‌ها، یک تکثیر نهایی در ºC ۷۲ به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت.

شناسایی توالی‌های ژن ۱۶S rRNA اختصاصی *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* توسط روش PCR و با استفاده از آغازگرهای LMF1 (5′-TGAACGGAATATGTTAGCTT-3′) و LMR1 (5′-GACTTCATCCTGCACTCTGT-3′) بر اساس پژوهش‌های قبلی صورت گرفت (۴). برنامه PCR به صورت ۳۰ چرخه حرارتی شامل: ºC ۹۴ به مدت پنج دقیقه (جداسازی دو رشته)، ºC ۵۵ به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال پرایمرها)، ºC ۷۲ به مدت ۵۰

ثانیه (تکثیر رشته‌ها) و در نهایت، یک تکثیر نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه برای دستگاه ترموسایکلر انتخاب شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید جداسازی و زیر نور فرابنفش مشاهده شدند.

آنالیز آماری: ارتباط متغیرهای مستقل (فصل نمونه‌گیری، سن و جنس گوسفندان) با متغیرهای وابسته (آلودگی با باکتری‌های مذکور در مطالعه حاضر) توسط آزمون مربع کای بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ >P در نظر گرفته شد.

نتایج

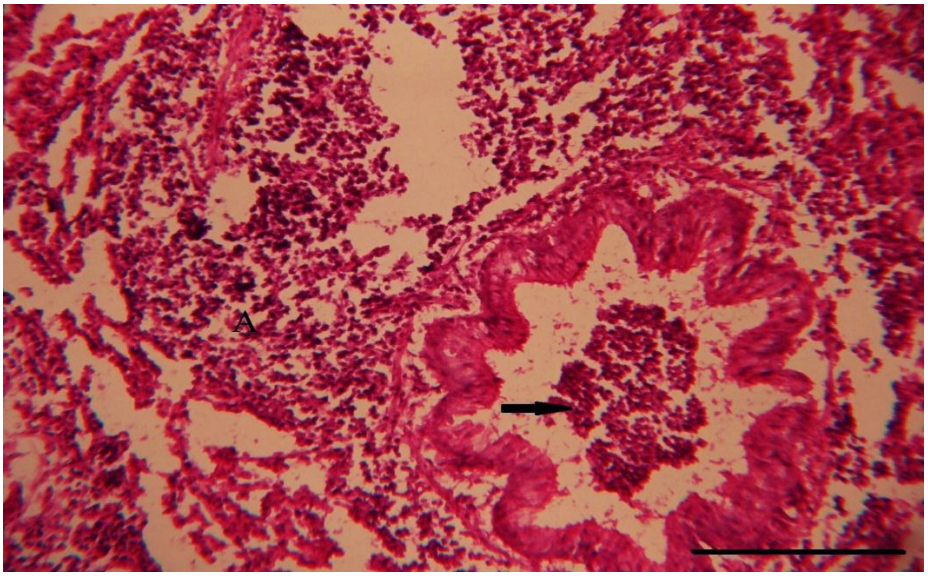
یافته‌های ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژی:

از مجموع ۴۹۶۰ ریه گوسفند مورد بررسی در کشتارگاه صنعتی فریمان، ۱۸۴ مورد (۳/۶۸ درصد) در مشاهده و ملامسه دارای ضایعات ماکروسکوپیک (با چشم غیر مسلح) بودند. از این بین، سفت‌شدگی ریه (لاستیکی و گوشتی شدن قوام ریه) (۴۰ مورد، ۰/۸ درصد) و کیست هیداتید (۳۲ مورد، ۰/۶۴ درصد) بیشترین موارد مشاهده شده را تشکیل دادند. نحوه توزیع ماکروسکوپیک ضایعات ریوی در مطالعه حاضر در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- توزیع فراوانی ضایعات ماکروسکوپیک ریه‌های گوسفندان کشتارشده مشکوک به پنومونی در کشتارگاه صنعتی فریمان

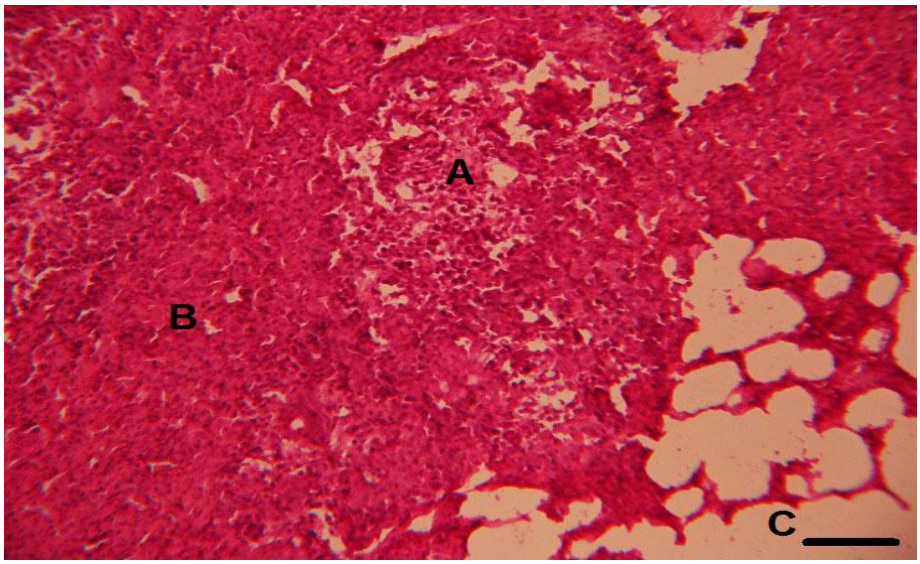
ردیف	ضایعات ماکروسکوپی	فراوانی مطلق (تعداد)	فراوانی نسبی (درصد)	فراوانی نسبی در کل ریه‌ها (درصد)
۱	سفت شدگی	۴۰	۲۱/۷۴	۰/۸
۲	کیست هیداتید	۳۲	۱۷/۴۰	۰/۶۴
۳	پرخونی/خونریزی	۲۳	۱۲/۵	۰/۴۶
۴	چسبندگی و مرمری شدن	۲۲	۱۱/۹۵	۰/۴۴
۵	ترشحات چرکی در مجاری	۱۹	۱۰/۳۳	۰/۳۸
۶	رنگ پریدگی	۱۸	۹/۷۸	۰/۳۶
۷	اتساع مجاری	۱۵	۸/۱۵	۰/۳۰
۸	آبسه ریوی	۸	۴/۳۵	۰/۱۶
۹	تورم بافتی	۷	۳/۸۰	۰/۱۴
	مجموع	۱۸۴	۱۰۰	۳/۶۸

در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی، مجموع ۲۰۲ ضایعه مشاهده شد که فراوان‌ترین پنومونی ایجاد شده از نوع برونکوپنومونی چرکی بود (۵۸/۲۰۲ مورد، ۲۸/۷۲ درصد) (جدول ۲). سفت‌شدگی نامنظم لبولار به‌خصوص در لوب‌های قدامی و شکمی، هیپرمی، تجمع چرک در برونش و برونشیول‌ها، اتساع برونشیول‌ها و تورم بافت ریه از مشخصات ماکروسکوپی این ریه‌ها بود. نفوذ نوتروفیل‌ها به لومن برونشیول‌ها (برونشیولیت) و برونش (برونشیت) و فضاهای بین آلوئولی (شکل ۱)، و نیز وجود خونریزی در موارد حادتر از مشخصات میکروسکوپیک ریه‌های مبتلا به برونکوپنومونی چرکی بود.

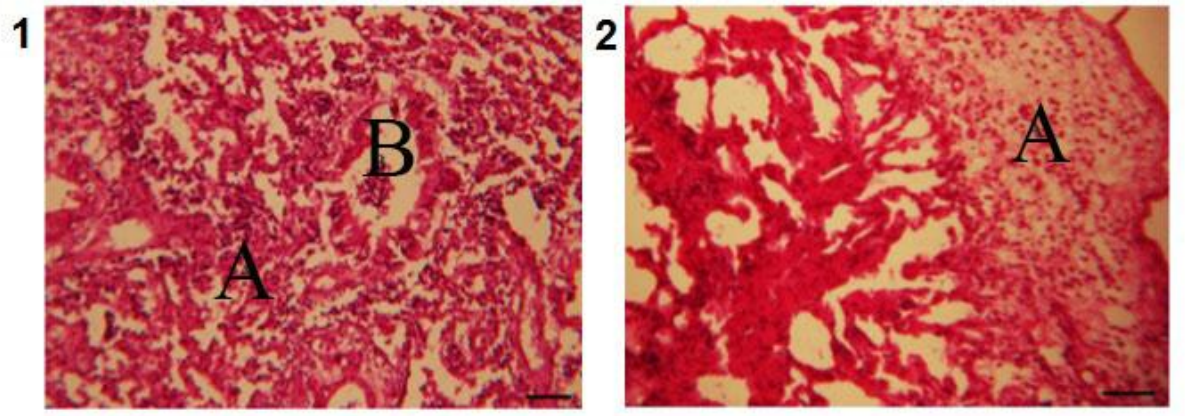


شکل ۱- برونکوپنومونی چرکی همراه با نفوذ نوتروفیل‌ها به داخل برونشیول (فلش) و فضاهای آلوئولی (A) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، مقیاس= ۱۴۰µm)

آبسه‌های ریوی (۱۵/۲۰۲، ۷/۴۲ درصد) با اندازه‌های مختلف (۵-۱ سانتی‌متر) حاوی چرک مایل به زردرنگ بدون بو به‌صورت چند کانونی و اغلب در لوب دیافراگماتیک مشاهده شدند. پنومونی بینابینی در ده ریه بزرگ و رنگ پریده مشاهده شد (۱۰/۲۰۲ مورد، ۴/۹۵ درصد)، که در بررسی هیستوپاتولوژیکی دچار نفوذ منتشره سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای به پارانشیم ریه، اتلکتازی و آمفیزم بودند (شکل ۲). برونکوپنومونی فیبرینی در ۴/۹۵ درصد از ریه‌های گوسفندان درگیر ضایعات میکروسکوپی مشاهده شد (۱۰/۲۰۲). چسبندگی پلورا به پارانشیم ریه، در برخی موارد قوام سخت پارانشیم و ظاهر مرمری سطح ریه از مشخصات اصلی این پنومونی در بررسی ظاهری بود. در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی نیز، چسبندگی پلورا به پارانشیم توسط ترشح فیبرین و نفوذ نوتروفیل‌ها به لومن برونشیول‌ها از مشخصات بارز این پنومونی بود (شکل ۳).



شکل ۲- پنومونی بینابینی همراه با نفوذ سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای به پارانشیم ریه (A)، اتلکتازی (B) و آمفیزم (C) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، مقیاس= ۵۰µm)



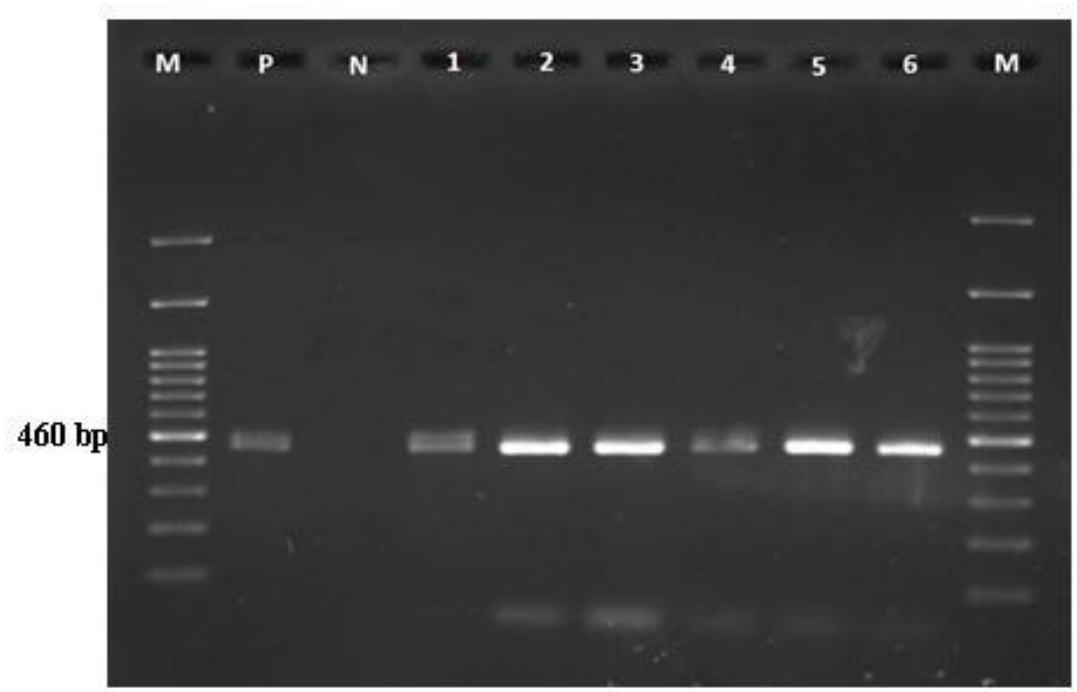
شکل ۳- برونکوپنومونی فیبرینی. (۱): نفوذ نوتروفیل‌ها به فضاهای بین آلوئولی (A) و برونشیول (B) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، مقیاس= ۷۰µm)، (۲): رسوب فیبرین روی پرده جنب (A) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، مقیاس= ۶۰µm)

ردیف	ضایعات میکروسکوپیک	فراوانی مطلق (تعداد)	درصد فراوانی به کل ریه‌ها	درصد فراوانی نسبت به دیگر ضایعات
۱	برونکوپنومونی چرکی	۵۸	۱/۱۶	۲۸/۷۲
۲	اتلکتازی	۲۴	۰/۴۸	۱۱/۸۹
۳	کیست هیداتید	۲۳	۰/۴۶	۱۱/۳۹
۴	هیپرمی	۱۵	۰/۳۰	۷/۴۲
۵	آبسه ریوی	۱۵	۰/۳۰	۷/۴۲
۶	برونشیولیت	۱۴	۰/۲۸	۶/۹۴
۷	پنومونی بینابینی	۱۰	۰/۲۰	۴/۹۵
۸	برونکوپنومونی فیبرینی	۱۰	۰/۲۰	۴/۹۵
۹	پنومونی کرمی	۷	۰/۱۴	۳/۴۶
۱۰	برونشیت	۷	۰/۱۴	۳/۴۶
۱۱	آمفیزم	۷	۰/۱۴	۳/۴۶
۱۲	خونریزی	۶	۰/۱۲	۲/۹۷
۱۳	کلسیفیکاسیون	۶	۰/۱۲	۲/۹۷
	مجموع	۲۰۲	۴/۰۴	۱۰۰

جدول ۲- توزیع ضایعات ریوی میکروسکوپیک در گوسفندان مشکوک به پنومونی کشتارشده در کشتارگاه صنعتی فریمان

نتایج مولکولی و آماری: *پاستورلا مولتی‌سیدا* از ۱۷/۷۷ درصد (۱۶/۹۰ مورد) از ریه‌های مشکوک به پنومونی باکتریایی جدا شد. محصولات تکثیر شده از ژن اختصاصی این باکتری با ردیف ۴۶۰ bp از واکنش PCR به دست آمد (شکل ۴). توزیع فصلی این نمونه‌های مثبت در طول بهار، تابستان، پاییز و زمستان به‌ترتیب ۳، ۲، ۵ و ۶ مورد بود. برونکوپنومونی چرکی، هیپرمی، خونریزی، اتلکتازی

و آمفیزم، برونشیت و برونشیولیت، آبسه‌های ریوی و کیست هیداتید از جمله ضایعات مختلف مشاهده‌شده در این ریه‌ها در بررسی هیستوپاتولوژیک بودند. در حالی که *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* از هیچ‌کدام از نمونه‌ها جداسازی نشد و فراوانی آن صفر بود. آنالیز آماری نشان داد که هیچ ارتباط آماری معنی‌داری بین ریه‌های مبتلا به *پاستورلا مولتی‌سیدا* و متغیرهای مستقل (سن، جنس و فصل) وجود ندارد (جدول ۳).



شکل ۴- نتایج الکتروفورز در ژل برای شناسایی *پاستورلا مولتی‌سیدا*. M: سایز مارکر DNA، چاهک P: کنترل مثبت، چاهک N: کنترل منفی، چاهک‌های ۶-۱: نمونه‌های مثبت

جدول ۳- شیوع عامل *پاستورلا مولتی‌سیدا* به تفکیک سن، جنسیت و فصل در گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه صنعتی فریمان

متغیرها	سطوح	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت	تعداد نمونه منفی	آزمون مربع کای	سطح معنی‌داری آماری P<۰,۰۵
فصل	بهار	۲۲	۳	۱۹	۳/۱۴۱	(P=۰/۳۷۰)
	تابستان	۲۳	۲	۲۱		
	پاییز	۲۲	۵	۱۷		
	زمستان	۲۳	۶	۱۷		
سن	زیر دو سال	۴۲	۶	۳۶	۰/۶۵۷	(P=۰/۴۱۸)
	بالای دو سال	۴۸	۱۰	۳۸		
جنسیت	نر	۴۷	۷	۴۰	۰/۵۶۰	(P=۰/۴۵۴)
	ماده	۴۳	۹	۳۴		

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مولکولی پژوهش حاضر نشان داد که

۱۷/۷۷ درصد (۱۶/۹۰ مورد) از ریه‌های مشکوک به پنومونی باکتریایی در گوسفندان کشتارشده در کشتارگاه صنعتی فریمان آلوده به *پاستورلا مولتی‌سیدا* هستند ولی نمونه آلوده به *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* وجود نداشت. در پژوهشی که جهت جستجوی *پاستورلا مولتی‌سیدا* در ریه ۵۰۰ گوسفند مبتلا به پنومونی در کشتارگاه کاشان انجام گرفت، میزان آلودگی ۰/۶ درصد اعلام شد و آب و هوای گرم و خشک این منطقه و نیز درمان آنتی‌بیوتیکی زیاد جهت پیشگیری از پنومونی، علت فراوانی پایین پاستورلوز بیان گردید (۹). در پژوهشی دیگر که بر روی ۲۸۲ ریه گوسفندان کشتارشده در کشتارگاه زیاران استان تهران انجام گرفت، آلودگی پاستورلایی ۴۲/۵ درصد اعلام شد که در مقایسه با مطالعه حاضر بیشتر بود. استرس حمل و نقل و کاهش سطح ایمنی از علل اصلی فراوانی زیاد در این مطالعه اعلام شد (۱۲). در یک مطالعه که به‌منظور بررسی میکروبی و هیستوپاتولوژی بر روی ۱۳۳۵ بره با سن کمتر از ۶ ماه در نیجریه انجام شد، ۱۲۶ مورد (۹/۴ درصد) آلوده به *پاستورلا مولتی‌سیدا* بودند (۱۹). دلیل فراوانی پایین این باکتری نسبت به مطالعه حاضر سن کم بره‌ها و آب و هوای گرم منطقه می‌باشد. در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی در گوسفندان با سن بالای دو سال بود. در مطالعه‌ای که در مزارع پرورش گوسفند اسپانیا انجام شد، تأثیر عوامل طبیعی بر ایجاد پنومونی مورد بررسی قرار گرفت که از ۱۰۵۴ دام دچار بیماری تنفسی، *پاستورلا مولتی‌سیدا* از ۱۴ مورد (۱/۳۲ درصد) و گونه‌های *مایکوپلاسما* از ۲۸ مورد (۲/۶۵ درصد) جدا شدند. در این مطالعه پنج عامل طبیعی باد، تغییرات فصلی، تغییرات دمایی، ایجاد شبنم در پوشش گیاهی و بارندگی از مهم‌ترین عوامل ایجاد پنومونی عنوان شد (۱۵). در مطالعه حاضر فراوانی نسبی *پاستورلا مولتی‌سیدا* ۰/۰۳۲ درصد (۱۶/۴۹۶۰ مورد)، بود که آن هم می‌تواند به دلیل آب و هوای سرد، صنعتی بودن منطقه فریمان و ورود بی‌رویه دام قاچاق باشد. در مطالعه حاضر ارتباط آماری معنی‌داری بین شیوع آلودگی به *پاستورلا مولتی‌سیدا* و متغیر فصل وجود نداشت اما طبق نتایج، در نیمسال اول این مطالعه (بهار و تابستان) که در منطقه فریمان تغییرات هوایی به نسبت کمتر و هوا معتدل‌تر می‌باشد شیوع *پاستورلا مولتی‌سیدا* ۵ مورد (۱۱/۱ درصد) و در نیمسال دوم (پاییز و زمستان) ۱۱ مورد (۲۴/۴ درصد) بود. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۴ در اتیوپی انجام شد از ۹۵۲ نمونه سرمی گوسفندان با علائم ظاهری پنومونی ۱۶/۸ درصد نمونه‌ها با آزمایشات سرولوژی از لحاظ آلودگی به *پاستورلا مولتی‌سیدا* مثبت اعلام شد. بیشترین درگیری در فصل تابستان (۶۴ درصد) و کمترین درگیری در فصل زمستان (۱/۹ درصد) اعلام شد (۲). در پژوهش Ezzi و همکاران (۲۰۰۷)، شیوع پاستورلوز در بهار، تابستان، پاییز و زمستان به‌ترتیب ۱/۷۴ درصد، ۲/۵۵ درصد، ۰/۱۲ درصد و ۱/۰۲ درصد گزارش شد (۱۲). اگرچه در مطالعه فوق بر خلاف پژوهش حاضر میزان فراوانی پاستورلوز در فصل تابستان بیشتر بود، اما همسو با مطالعه حاضر نشان‌دهنده عدم وجود ارتباط آماری معنی‌دار بین این بیماری و فصل نمونه‌گیری بودند. همان‌طور که از نتایج مطالعه حاضر بر می‌آید، بین شیوع *پاستورلا مولتی‌سیدا* و جنسیت گوسفندان کشتارشده رابطه آماری معنی‌داری وجود نداشت. شیوع عامل مذکور ۷ مورد (۱۴/۹ درصد) در جنس نر و ۹ مورد (۲۰/۹ درصد) در جنس ماده بود. همچنین بین شیوع عامل *پاستورلا مولتی‌سیدا* با سن گوسفندان کشتارشده نیز ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت. در این مطالعه شیوع آلودگی گوسفندان بالای دو سال ۱۰ مورد (۲۰/۸ درصد) و شیوع آلودگی گوسفندان زیر دو سال ۶

مورد (۱۴/۳ درصد) بود. برآیند نتایج مربوط به سن و جنس دام‌های کشتار شده آلوده به *پاستورلا مولتی‌سیدا* نشان می‌دهد عامل مذکور بیشتر دام‌های ماده بالای دو سال را درگیر می‌کند. یکی از دلایل افزایش پنومونی پاستورلوزی در جنس ماده بالای دو سال را می‌توان نگهداری این دام‌ها در خارج از دامداری‌ها و تغذیه با کیفیت کم در چرای آزاد بیان کرد. در مطالعه عزیزی و همکاران بر روی ۱۰۰۰ لاشه مشکوک به پنومونی در جنوب غرب ایران پنومونی پاستورلوزی با شیوع ۲۴/۵۲ درصد بیشترین شیوع پنومونی میکروبی را به خود اختصاص داد. استرس ناشی از فاکتورهای انگلی و ویروسی علل اصلی ایجاد پنومونی پاستورلایی در این مطالعه اعلام شد (۳). در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه فوق، شیوع پاستورلوز کمتر بود ولی مشابه با این مطالعه، در پژوهش حاضر نیز مواردی از آلودگی‌های انگلی نظیر هیداتیدوزیس همراه با پاستورلوز وجود داشت.

بر خلاف گزارشات وجود پنومونی ناشی از *مایکوپلاسما اوی‌نومونیه* در گوسفندان کشتارشده در مناطق مختلف ایران و جهان (۶، ۱۷، ۲۰، ۲۱، ۲۵)، در پژوهش حاضر این باکتری از هیچ‌کدام از نمونه‌ها جدا نشد.

در بررسی ماکروسکوپیک ضایعات ریوی در مطالعه حاضر، فراوانی ریه‌های ضایعه‌دار نسبت به کل ریه‌ها ۳/۶۸ درصد بود که این فراوانی نسبت به مطالعات مشابه انجام شده در اهواز، بیشتر و در مقایسه با ارومیه کمتر بود (۱، ۱۱). علت این تفاوت را می‌توان تأثیر شرایط آب و هوایی بر میزان ضایعات ریوی دانست که منطقه فریمان در مقایسه با اهواز آب و هوای سردتر و کوهستانی و در مقایسه با ارومیه آب و هوای گرم‌تر دارد. در مطالعات صورت گرفته در خارج از کشور نیز فراوانی ضایعات ریوی گوسفندان ضبط شده در اتیوپی و ترکیه به‌ترتیب ۴۴/۵ درصد و ۳۵/۴۰ درصد اعلام شد (۱۰، ۱۳).

در پژوهش حاضر، سفت‌شدگی، کیست هیداتید، پرخونی، چسبندگی و مرمری شدن ریه‌ها نسبت به دیگر ضایعات بیشترین فراوانی را در بررسی ماکروسکوپی به خود اختصاص دادند. در مطالعات اسماعیل‌زاده و همکاران و نیز عراقی‌سوره و همکاران، کیست هیداتید، بیشترین درصد فراوانی در بین ضایعات ریوی را داشتند (۱، ۱۱)، که نسبتاً مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. از علل فراوانی قابل توجه کیست هیداتید در پژوهش حاضر می‌توان به سنتی بودن دامداری‌های منطقه فریمان و نیز همجواری سگ‌های نگهبان با دام‌ها در شرایط غیر بهداشتی اشاره نمود. در بررسی هیستوپاتولوژی در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی ضایعات مربوط به برونکوپنومونی چرکی بود که به نظر می‌رسد استرس ناشی از تغییرات آب و هوایی منطقه، صنعتی بودن شهرستان فریمان و متعاقباً وجود گازهای گلخانه‌ای، همچنین انتخاب ریه‌هایی با ظاهر پنومونی باکتریایی از دلایل افزایش فراوانی این ضایعه نسبت به سایر ضایعات باشد. در مطالعه پاتولوژیک، باکتریولوژیک و انگل‌شناسی در کشتارگاه اهواز، پنومونی بینابینی در مقام اول و برونکوپنومونی در مقام هفتم قرار گرفت که با مطالعه حاضر همخوانی نداشت. ویروس‌ها و گازهای گلخانه‌ای علت افزایش پنومونی بینابینی در این مطالعه اعلام شد (۱۱). در پژوهشی که در شهرکرد توسط کریمی و محمدنیا انجام شد (۱۴)، مشابه با مطالعه حاضر برونکوپنومونی چرکی بیشترین فراوانی را داشت و یکی از دلایل افزایش برونکوپنومونی چرکی در این مطالعه استرس ناشی از آب و هوای سرد منطقه مذکور اعلام شد. در مطالعه پاتولوژیک و باکتریولوژیک پنومونی در بره‌ها در ترکیه، پنومونی فیبرینی، پنومونی بینابینی و برونکوپنومونی فیبرینی بیشترین فراوانی را داشتند و

دلیل افزایش ضایعات پنومونی، سطح پایین بهداشت و فقدان سیستم‌های صنعتی اصلاح نژاد کافی عنوان شد (۱۰)، که از این لحاظ با مطالعه حاضر همخوانی داشت.

نتایج مولکولی مطالعه حاضر نشان داد که *پاستورلا مولتی‌سیدا* یکی از عوامل متداول پنومونی‌های باکتریایی در منطقه فریمان می‌باشد. در بین مشاهدات ماکروسکوپی، سفت‌شدگی ریه و کیست هیداتید نسبت به ضایعات دیگر فراوانی بیشتری داشتند و در مطالعه هیستوپاتولوژی نیز برونکوپنومونی چرکی (در اثر پنومونی پاستورلوزی) نسبت به سایر ضایعات بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. بنابراین نتایج مولکولی، نتایج هیستوپاتولوژی را تأیید نمود. بیماری پاستورلوز به‌عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام از لحاظ بهداشت عمومی مورد توجه است و می‌تواند در انسان عفونت‌های تحت بالینی، مزمن و حتی حاد ایجاد کند. با توجه به وضعیت بهداشتی ضعیف دامداری‌های سنتی منطقه فریمان و ورود غیر قانونی دام به این منطقه، لزوم توجه بیشتر و اقدامات بهداشتی گسترده جهت پیشگیری از این بیماری در این منطقه وجود دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از پرسنل محترم کشتارگاه فریمان، کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل و نیز از جناب آقای دکتر داریوش سعادتی بابت همکاری بی‌دریغشان کمال تشکر را دارند. بودجه این تحقیق به صورت مشترک توسط دانشگاه زابل (No.UOZ_GR_9517_87) و نویسندگان تامین گردید.

References

1- Araghi-Sooreh A, Hoseinzad-Nazlu M, Nassiry M. Study on the prevalence of pulmonary lesions of slaughtered sheep at Urmia abattoir. *Veterinary Clinical Pathology*. 2013; 7(27): 229-38. [In Persian]

2- Ayelet G, Yigezu L, Gelaye E, Tariku S, Asmare K. Epidemiologic and serologic investigation of multifactorial respiratory disease of sheep in the central highland of Ethiopia. *Intern J Appl Res Vet Med*. 2004; 2(4): 274-8.

3- Azizi SH, Oryan A, Shahrani K. Pneumonia in slaughtered sheep in south-western Iran: pathological characteristics and aerobic bacterial aetiology. *Vet Ital*. 2013; 49(1): 109-18.

4- Besser TE, Cassirer EF, Potter KA, VanderSchalie J, Fischer A, Knowles DP, *et al.*, Association of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection with population-limiting respiratory disease in free-ranging Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). *J Clin Microbiol*. 2008; 46(2): 423-30.

5- Chen Y, He H, Pan P, He S, Dong X, Chen Y, *et al.*, Rapid and combined detection of *Mycoplasma pneumoniae*, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus using AllGlo quadruplex quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2016; 65(7): 590-5.

6- Daee AA, Khodakaram-Tafti A, Derakhshandeh A, Seyedin M. Identification of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in sheep with pneumonia in North East of Iran. *Iran J Vet Res*. 2020; 21(1): 15-9.

7- Danesh-Lari S, Tahamtan Y, Hayati M, Kargar M. Rapid and simultaneous identity of virulence factors and capsular typing of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats by Multiplex PCR. *Journal of Microbial World*. 2010; 3(3): 162-8. [In Persian]

8- De Alwis MC. Haemorrhagic septicaemia--a general review. *Br Vet J*. 1992; 148(2): 99-112.

9- Ebrahimi A, Halajifar M, Ataei S, Lotfalian S. Investigation of *Pasteurella multocida* in sheep pneumonic lesions of Kashan abattoir. IJVCS. 2010; 4(1): 29-32. [In Persian]

10- Ertan O. The pathologic and bacteriologic comparison of pneumonia in lambs. *Turk J Vet Anim Sci*. 2005; 30(6): 593-9.

11- Esmaeilzadeh S, Sabbagh A, Mohammadiyan B, Alborzi A, Ghorbanpour M, Pourmahdi M. Study on the prevalence of pulmonary lesions of slaughtered sheep at Ahvaz abattoir. *Iranian Veterinary Journal*. 2011; 9(4): 14-24. [In Persian]

12- Ezzi A, Moradi bidhendi S, Jabbari AR. Survey on pneumonic pasteurellosis in slaughtered sheep and goats at the Ziaran abattoir. *Archives of Razi Institute*. 2017; 62(4): 235-9.

13- Jibat T, Ejeta G, Asfaw Y, Wudie A. Causes of abattoir condemnation in apparently healthy slaughtered sheep and goats at HELMEX abattoir, Debre Zeit, Ethiopia. *Rev Med Vet*. 2008; 159(5): 305-11.

14- Karimi I, Mohammadnia AR. Slaughter of sheep's lung lesions in Shahrekord. *Pajouhesh-Va-Sazandegi*. 2003; 16(1): 78-81. [In Persian]

15- Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, Gonzalez JM, De Las Heras M. Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. *Small Rumin Res*. 2008; 80(1-3): 28-32.

16- Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(12): 3035-9.

17- McAuliffe L, Hatchell FM, Ayling RD, King AI, Nicholas, RA. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in Pasteurella-vaccinated sheep flocks with respiratory disease in England. *Vet Rec*. 2003; 153: 687-8.

18- Nicholas RAJ. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin Res*. 2002; 45(2): 145-9.

19- Odugbo MO, Odama LE, Umoh JU, Lamorde AG. *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: prevalence, clinical and pathological studies. *Small Rumin Res*. 2005; 66(1-3): 273–7.

20- Rong G, Zhao JM, Hou GY, Zhou HL. Seroprevalence and molecular detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in goats in tropical China. *Trop Anim Health Prod*. 2014; 46(8): 1491–5.

21- Sasani F, Raisi A, Moghadam M. Interstitial pneumonia in slaughtered sheep of Tehran province. *Journal of Comparative Pathobiology*. 2006; 3(2): 513-8. [In Persian]

22- Shayegh J, Sharaf J, Mikaili P, Namvar H. Pheno-and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8(16): 3707-10.

23- Taya A, Afzali A, Moosavi nezhad SM. Socio-economic impact of illegal livestock entry on the eastern border provinces, 3rd national conference on combating desertification and sustainable development of Iran Desert Wetlands (Relying on Meighan Desert Wetland); 2012-09-15; Islamic Azad University of Arak, Iran: https://civilica.com/doc/223406; 2012. [In Persian]

24- Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol*. 2009; 40(1): 1-11.

25- Weiser GC, Drew ML, Cassirer EF, Ward AC. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *M. arginini* in bighorn sheep using enrichment culture coupled with genus- and species-specific polymerase chain reaction. *J Wildl Dis*. 2012; 48(2): 449-53.

26- Yang F, Dao X, Rodriguez-Palacios A, Feng X, Tang C, Yang X, *et al.*, A real- time PCR for detection and quantification of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *J Vet Med Sci*. 2014; 76(12): 1631-4.

27- Zachary JF, McGavin MD. Pathologic basis of veterinary disease. 5th ed. Mosby: St Louis; 2011, P: 495-504.

Histopathological study of pulmonary lesions and molecular detection of pasteurellosis and mycoplasmosis in Fariman slaughter house

Manoochehr Hasanzadeh[1], Seyedeh Aida Davari[*2], Mohsen Najimi[2], Abbas Jamshidian[2]

1- Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: December 1, 2021; Revise: January 31, 2022; Accept: February 28, 2022

Summary

The most economically significant bacterial pneumonias are pasteurellosis and mycoplasmosis as causative agents of reduction in production, weight loss, increasing mortality rates in dairy and fattening sheep herds. This study was conducted to determine the histopathological and molecular properties of the lung lesions caused by pasteurellosis and mycoplasmosis in slaughtered sheep in Fariman. A total of 4960 lungs were collected from sheep slaughtered at Fariman abattoir in 2019-2020. 90 of 4960 (1.81%) lungs which were macroscopically suspected to be suffering from pneumonia were examined microscopically. The polymerase chain reaction test was carried out for molecular detection of *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma ovipneumonia*. Furthermore, statistical analysis was performed using the Chi-square test and the data were analyzed by SPSS software version 20. The molecular analysis showed that 16 specimens (0.032%) were positive for *P. multocida*, but *M. ovipneumonia* was negative in all specimens. In the histopathological investigation, the most common lesion was suppurative bronchopneumonia (1.16%). In addition, there was no significant relationship between age, sex and season with *P. multocida* ($P>0.05$). These findings revealed that *P. multocida* is one of the common causes of bacterial pneumonia in slaughtered sheep in Fariman and its histopathological characteristics are notable.

Key words: *Pasteurella multocida, Mycoplasma ovipneumonia, Lung, Sheep*