نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ۱، شماره ۱

ناشر: دانشگاه زابل

سردبیر:
تقی زهرایی صالحی؛ *tsaleh@ut.ac.ir*

مدیر مسئول:
داریوش سعادتی؛ *saadatdariush@uoz.ac.ir*

مدیر اجرایی:
احمد راشکی؛ *ah_rashki@usal.es*

هیات دبیران:

افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد بکائیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد جهانتیغ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تقی زهرائی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

ویراستار انگلیسی: مسلم فتح اللهی، مربی گروه زبان انگلیسی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه زابل

طراح جلد: فاطمه قمری، مربی گروه مرمت آثار تاریخی، دانشکده هنر و معماری، دانشگاه زابل

گرافیست: حمیدرضا حسینی، پژوهشیار، معاونت پژوهش و فناوری، دانشگاه زابل، زابل، ایران

آدرس نشریه: زابل، جاده بنجار، دانشگاه زابل، دانشکده دامپزشکی، دفتر نشریه، کد پستی: ۹۸۶۱۳۳۵۸۵۶، تلفن: ۳۱۲۳۲۲۷۱(۰۵۴)، نمابر: ۳۱۲۳۲۲۵۱(۰۵۴)

پست الکترونیک: nfvm@uoz.ac.ir **وبسایت**: nfvm.uoz.ac.ir

پیشگفتار

به نام خدا

دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل در راستای اهداف پژوهشی خود اقدام به انتشار نشریه علمی تازه ها در میکروب شناسی دامپزشکی نموده است، این نشریه در پائیز سال ۱۳۹۶ موفق به اخذ مجوز از وزارت علوم گردید. در حال حاضر این مجله به صورت دو فصلنامه می‌باشد. زمینه‌ی کاری مجله مذکور گستره‌ی پژوهش‌های بنیادی، تحقیقات کاربردی، تحقیقات اپیدمیولوژیک و مطالعات بالینی در زمینه‌ی آخرین تحقیقات میکروب‌شناسی دامپزشکی می‌باشد. مقالات در حوزه های مختلف علم میکروبیولوژی از جمله باکتری‌شناسی، ویروس‌شناسی، قارچ‌شناسی، تک‌یاخته‌شناسی و ایمنی‌شناسی و در حوزه های مرتبط با بیماری‌های عفونی کلیه حیوانات اهلی، پرندگان، آبزیان و حیات وحش قابل پذیرش می‌باشند.

با لطف خدا و تلاش همکاران گرامی در نشریه "تازه ها در میکروب شناسی دامپزشکی"، این نشریه در ارزیابی نشریات علمی کشور که توسط وزارت علوم در سال ۱۴۰۰ انجام گرفت برای دومین سال متوالی به عنوان نشریه علمی با رتبه خوب (ب) پذیرفته شد.

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه

تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

از آنجایی که هدف نشریه پیوستن به نشریات ISC و ISI و کسب استانداردهای بین‌المللی می‌باشد، رعایت موارد زیر در نوشتن مقاله ضروری خواهد بود. شایان ذکر است به مقاله‌های ارسالی که از راهنمای نگارش پیروی نکرده باشند ترتیب اثر داده نخواهد شد.

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

مقاله پژوهشی اصیل (Original Research Article)، گزارش موردی (Case report)، مقاله مروری (Review Article)، مقاله کوتاه (Short Communication) و نامه به سردبیر (Letter to Editor) در رشته میکروب‌شناسی دامپزشکی، دراین مجله پذیرفته می‌شود.

شیوه نگارش مقاله:

متن مقاله در صفحه A4 با ۱۵/۱ بین خطوط و ۵/۲ سانتی‌متر از حاشیه و با نرم‌افزار Word 2003 یا بالاتر و از طریق ثبت نام در سایت مجله به آدرس nfvm.uoz.ac.ir ارسال گردد. جهت هرگونه سؤال و پیگیری با ایمیل مجله: nfvm@uoz.ac.ir می‌توانید در ارتباط باشید.

عنوان مقاله با قلم B Nazanin 16 ضخیم، متن مقاله با قلم B Nazanin 12 معمولی برای مطالب فارسی و Times New Roman 10 برای مطالب انگلیسی، عنوان‌های اصلی (چکیده، مقدمه، مواد و روش و ...) با فونت B Nazanin 14 ضخیم، عناوین فرعی با فونت نازنین ۱۲ ضخیم و ایتالیک و اسامی نویسندگان با فونت B Nazanin 12 ضخیم تایپ شود. همچنین بین کلمات دو یا چند بخشی از نیم‌فاصله استفاده شود.

کلمات لاتین در متن با قلم Times New Roman 10 و اسامی علمی هم در متن فارسی و هم در متن انگلیسی به صورت ایتالیک تایپ شوند. چنانچه کلمه انگلیسی در متن فارسی در داخل پرانتز قرار گیرد، علامت پرانتز به صورت فارسی باشد. اگر از چندین کلمه انگلیسی به صورت پشت سر هم استفاده می‌شود، علامت کاما (،) در بین کلمات به صورت فارسی باشد. از کلمات اختصاری استاندارد به جای کلمات کامل استفاده شود، تمام کلمات اختصاری غیرمتعارف، زمانی که برای بار اول استفاده می‌شود به طور کامل در داخل متن تعریف شود (از به کاربردن اختصارات در عنوان و چکیده اجتناب شود).

اعداد در متن مقاله با فرمت فارسی نوشته شوند و برای علامت اعشار از ممیز استفاده شود و از سایر علائم نظیر نقطه یا کاما به عنوان نماد اعشار استفاده نشود.

برای ترازبندی پاراگراف‌ها از justify low استفاده نشود و ترجیحا از گزینه justify یا Medium justify استفاده شود.

جداول و شکل‌ها در محل مناسب در داخل متن جایگذاری شوند و از ارسال آنها به صورت تصویر خودداری شده و فایل اکسل آنها نیز جداگانه در سایت بارگزاری شود. متن و اعداد داخل جدول با فونت B Nazanin 9 و

وسط‌چین تایپ شوند. سطر اول (عنوان جدول) Bold و بقیه سطرها Regular باشند. پشت زمینه جدول بدون رنگ و طرح (پشت زمینه سفید) باشد، تا حد امکان خطوط عمودی جدول حذف شود و خطوط افقی نیز در حداقل تعداد ممکن باشند.عنوان جدول در بالای آن و عنوان نمودار، شکل و تصویر در زیر آنها آورده شود.

نمودارها ترجیحاً در فایل اکسل طراحی شوند و سپس کپی شده و در فایل مقاله paste شوند. نمودارها طوری پیاده شوند که قابل اصلاح و ویرایش باشند از درج نمودار به صورت عکس در فایل word خودداری شود. همچنین فایل اکسل حاوی نمودار نیز در سایت مجله بارگزاری گردد.

جهت بهتر مشخص شدن مطالب مورد اشکال از طرف داوران و همچنین پاسخ دادن راحت‌تر به آنها و برطرف نمودن ایرادات وارده، بهتر است همه خطوط مقاله از ابتدا تا انتهای آن دارای شماره خط (Line Number) باشند و شماره خطوط به صورت پیوسته باشد.

صفحه اول شامل عنوان، چکیده فارسی (بین ۱۵۰ تا ۲۵۰ کلمه، بدون ذکر نام نویسندگان) و کلمات کلیدی (۳ تا ۵ کلمه) است. عنوان مقاله باید در عین اختصار، گویا باشد و از ۲۰ کلمه تجاوز نکند. چکیده باید به صورت یکپارچه باشد و نباید بخش‌های مختلف آن از هم مجزا شوند. کلمات کلیدی شامل تعدادی (حداکثر ۵ کلمه) از کلمات و عبارات که موضوع اصلی تحقیق حول آنها بوده و در عنوان وجود نداشته باشند و بر اساس حروف الفبا مرتب گردند.

در **صفحه آخر** باید عنوان و چکیده به زبان انگلیسی با همان ساختار چکیده فارسی و حداکثر در ۲۵۰ کلمه ارائه گردد. ضروری است چکیده انگلیسی توسط فردی مسلط به زبان انگلیسی نگاشته شود. همچنین کلمات کلیدی باید به‌صورت انگلیسی(۳ تا ۵ کلمه) ذکر شود.

صفحه دوم به بعد متن مقاله پژوهشی اصیل مطابق با ساختار زیر خواهد بود:

مقدمه: این قسمت هدف مقاله را بیان می‌کند و دلیل منطقی انجام پژوهش و نگارش مقاله را تشریح نموده، سوال مطرح شده و یا فرضیه را به تفصیل توصیف می‌نماید. همچنین در این قسمت باید به سابقه‌ی کار و موارد انجام شده و دستاوردهای کنونی اشاره شود.

مواد و روش‌ها: در این قسمت روش انتخاب نمونه، تعداد نمونه، روش اخذ نمونه و روش انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه آورده می‌شود. همچنین طراحی، مطالعه و نحوه گروه‌بندی‌های افراد یا حیوانات شرح داده می‌شود. در این قسمت باید آزمایشات به طور دقیق شرح داده شوند. اگر از دستگاه یا کیت خاصی برای انجام آزمایشات استفاده شده، باید نام تولیدکننده در داخل پرانتز در جلوی نام دستگاه قید شود. اگر از روش شناخته شده‌ای برای انجام آزمایشات استفاده شده است، باید برای آن روش رفرنس نوشته شود. اگر از روش جدیدی استفاده شده است، باید آزمایشات به نحوی شرح داده شود که محقق دیگری بر اساس این توضیحات بتواند آن آزمایش را مجدداً تکرار نماید. اگر از دارویی استفاده شده باید نام عمومی (ژنریک) دارو، دز مصرفی و راه تجویز آن ذکر شود. باید ذکر شود که از چه روش آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است. اگر از نرم‌افزار خاصی برای تجزیه و تحلیل اطلاعات آماری استفاده شده باید نام نرم‌افزار و شماره آن ذکر شود (مثلاً نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳).

نتـایج: مـتن قسـمت نتـایج بایـد مختصـر و واضـح باشـد می‌تـوان از جـداول، اشـکال، نمودارهـای آمـاری، گراف‌هـا و تصاویر برای تبیـین نتـایج اسـتفاده کـرد. از آوردن جـداول و نمودارهـایی کـه اطلاعـات و داده‌هـای آنهـا در مـتن مقالـه بـه طور کامل آورده شده اسـت، اجتنـاب گـردد. در جـداول و نمودارهـا نبایـد اطلاعـات یکسـانی ارائـه شـود. اگـر تعـداد کمـی یافته و یا یک نتیجه ساده وجود دارد، بهتر است به جای جدول و نمودار، این یافته در متن آورده شود.

تعـداد جـداول و نمودارهـا بایـد متناسـب بـا حجـم مقالـه باشـد. جـدول‌ها بهتـر اسـت بـا اسـتفاده از امکـان Table در Microsoft Word طراحـی شـوند. جـداول بـه صـورت عکـس ارائـه نگردنـد و شـماره‌گذاری متـوالی داشـته باشـند و در مـتن مقالـه بـه شـماره‌ی جـداول بـه صـورت متـوالی اشـاره گـردد. در زیرنـویس جـداول، همـه‌ی اختصـاری‌های غیراسـتاندارد استفاده‌شـده، توضـیح داده شـوند. مـتن جـداول فارسـی باشـد. نمودارهـا در نرم‌افزار Microsoft-Excel با عناوین مشخص و مجزا طراحی شوند و به صورت تصویر درج نگردد.

عکس‌هـا و تصـاویر بـه صـورت فایل‌هـایی از نـوع JPEG و بـا کیفیـت مناسـب آورده شـود. عکس‌هـا بایـد دقیـق و روشن و به نحوی تهیه شـوند کـه از نظـر فنـی چـاپ آن‌هـا بـا کیفیـت مطلـوب در مجلـه مقـدور باشـد. عکس‌هـا و تصـاویر باید شماره‌گذاری متوالی داشته و ترتیب آن‌هـا بـر اسـاس ارجـاع بـه آن‌هـا در مـتن باشـد. اگـر عکـس منتشـر شـده اسـت، منبع اولیه ذکر شود و اجازه‌ی کتبی آن ارائه گردد.

بحث و نتیجه‌گیری: در ایـن قسـمت ضـمن تحلیـل نتـایج به‌دسـت آمـده از تحقیـق، بـه سـایر تحقیقـاتی کـه نتـایج تحقیق اخیر را تأئید و یـا رد می‌کننـد اشـاره شـود. در مـورد تحقیقـاتی کـه نتـایج آنهـا بـا نتیجـه تحقیـق اخیـر همخـوانی نـدارد بایـد در مـورد علـت نـاهمخوانی بحـث شـود و بیـان گـردد کـه تفـاوت مـذکور از کجـا می‌توانـد ناشـی شـده باشـد. عبـاراتی کـه در مقدمـه یـا نتـایج آورده شـده بـا جزئیـات در قسـمت بحـث و نتیجـه‌گیری تکـرار نشـوند. پـاراگراف پایانی به منزله نتیجه‌گیری است. در این پاراگراف روی جنبه‌های مهم و جدید مطالعه تأکید شود.

سپاســگزاری: از کلیـه‌ی افـراد یـا سـازمان‌هایی کـه در فـراهم کـردن تسـهیلات، کمک‌هـای مـالی و یـا تکنیکـی همکاری نموده‌اند و نام آنهـا جـزء نویسـندگان مقالـه نیسـت، تشـکر بـه عمـل آیـد و نیـز در صـورتی کـه مقالـه برگرفتـه از پایان‌نامه و یا طرح پژوهشی مصوب است، شماره ثبت پایان‌نامه یا طرح پژوهشی هم ذکر شود.

منابع: کلیـه‌ی منـابع حتـی منـابع فارسـی بـه انگلیسـی ترجمـه و نوشـته شـوند. در انتهـای منـابع فارسـی بـه زبـان اصـلی آن اشـاره شـود و [In Persian] آورده شـود. منـابع بـه ترتیـب اسـتفاده در مـتن شـماره‌گذاری و طبـق اصـول منابع "ونکوور" مرتـب شـوند، بـرای ارجـاع بـه مقـالات از اعـداد ریاضـی داخـل پرانتـز اسـتفاده شـود بـه طـور مثـال (۱۱). در صورتی که به مراجع پی‌درپـی اشـاره می‌شـود بایـد بـین اولـین و آخـرین شـماره از خـط فاصـله اسـتفاده کـرد، در غیـر این‌صورت از کامـا "،" بایـد سـود جسـت (مثـال: ۹-۷ یـا ۷، ۵). توصـیه می‌شـود جهـت نوشـتن منـابع از نرم‌افـزار مـدیریت منابع از جمله EndNote یاReference Manager استفاده کنید.

نحوه رفرنس نویسی:

مقالــه: نـام خـانوادگی و حـروف اول نـام نویسـنده یـا نویسـندگان (بـین نـام نویسـندگان از کامـا "،" اسـتفاده شـود). عنـوان کامـل مقالـه. نـام کوتـاه شـده مجلـه. سـال انتشـار; دوره(شـماره مجلـه): شـماره صـفحات. در صـورتی‌که تعـداد نویسندگان از ۶ نفر بیشتر باشد پس از نام نفر ششم از عبارت "*et al.*," استفاده شود.

1.**Afkhamnia M, Nouri M, Karimi GH, Banani M, Ghadiri Abyaneh M.** The report of cryptosporidiosis (*cryptisporidium* infection) in commercial chicken farms of Tabriz area. Vet Res Biolo Prod. 2010; 89(1): 2-4 [In Persian].

2. **Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, Capusa C, Fagaras R, Tudorache D, *et al.,*** Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. J Cell Mol Med. 2001; 5(3): 303-10.

کتاب: نام خانوادگی و حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان. عنوان کتاب. شماره چاپ. شهر محل چاپ: ناشر; سال انتشار، شماره صفحه

Philips SJ, Whisnant JP. Hypertension and Stroke. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995, P: 85-93.

مقاله کنفرانسی: نام خانوادگی و حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان. عنوان مقاله کنفرانس، نام کنفرانس; تاریخ کنفرانس; محل تشکیل کنفرانس: نام انتشارات; تاریخ انتشار. شماره صفحه.

Jamshidi J, Pouresmaeili F. Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms with bone mineral density in a population of Iranian women, European Human Genetics Conference 2012; June 23-36, 2012; Nurnberg, Germany: nature publishing group; 2012. P: 390.

پایان نامه: نام خانوادگی و حروف اول نام نگارنده. عنوان. دانشگاه و دانشکده ;تاریخ دفاع.

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly access and utilization (dissertation). St Louis (MO): Washington University; 1995.

منابع اینترنتی: بیش از ۳ منبع ذکر نشود. نام خانوادگی و حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان. عنوان وب سایت [Internet] ، محل انتشار: ناشر; آدرس وبسایت Available from:، تاریخ آخرین به روزرسانی; تاریخ ذکر آدرس اینترنتی

Fehrenbach MJ. Dental hygiene education [Internet]. Place unknown: Fehrenbach and Associates; Available from: http://www.dhed.net/Main.html, updated 2009 May 2; cited 2009 Jun.

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می‌باشد:

گزارش موردی (CaseReport) باید شامل بخش‌های زیر باشد:

* **مقدمه:** شامل زمینه و اهمیت و دلیل نادر بودن مورد گزارشی با ذکر آمارهای گزارش شده قبلی

***معرفی بیمار:** آزمایشات انجام شده برای تشخیص بیماری و نتایج آنها به طور کامل و دقیق ذکر شود.

***بحث**

در تهیه این مقالات باید توجه داشت که در صورتی که محقق بر روی نمونه‌های انسانی کار می‌کند اسرار بیمار محرمانه بماند و همچنین یک فرم رضایت‌نامه از بیمار تهیه گردد و ضمیمه مقاله شود.

مقاله مروری (Review)

مقاله مروری بایستی به یکی از دو شکل زیر تهیه گردد:

*مقالات مروری ساختار یافته (Systematic Review) می‌توانند به صورت متا آنالیز، متا سنتز یا بدون تحلیل آماری باشند. این مقالات دارای اجزاء مقالات پژوهشی اصیل می‌باشند.

*مقالات مروری غیر ساختار یافته فقط از پژوهشگران مجرب و مسلط به موضوع مقاله، که دارای تألیفاتی در آن زمینه هستند، پذیرفته می‌شود. اجزای این گونه مقالات شامل چکیده، مقدمه و بحث و نتیجه‌گیری و حداقل دارای ۵۰ منبع باشند و حداکثر در ۵۰۰۰ کلمه تهیه شوند.

مقاله کوتاه (ShortCommunication)

یک مقاله تحقیقاتی کوتاه، از نظر ساختار مانند مقالات پژوهشی اصیل است و باید حداکثر شامل ۱۵۰۰ کلمه، ۲ شکل یا جدول و یک چکیده کوتاه تا ۱۵۰ کلمه باشد.

نامه به سردبیر (Letter to Editor)

نامه به سردبیر دارای موضوعاتی مانند نقدی بر مقالات قبلی، نقد یا مرور کتابها، تحلیل یک موضوع مرتبط با آموزش میکروب‌شناسی دامپزشکی، گزارش و نقد گردهمایی‌های آموزش میکروب‌شناسی دامپزشکی، شرح و بسط یک ایده و یا باز نمودن یک موضوع پیچیده است و حداکثر باید ۱۰۰۰ کلمه باشد. این مقالات نیاز به ساختار ندارند اما داشتن خلاصه انگلیسی ضروری است.

فایل های فرم تعارض منافع، اسامی نویسندگان و فرم تعهدنامه: نویسندگان بایستی هرگونه کمک مالی دریافتی و تعارض منافع احتمالی را گزارش کنند. گزارش تعارض منافع موجب رد مقاله نمی‌شود، اما گزارش آن الزامی است. فرم تعارض منافع می بایست تکمیل شود و به همراه فایل های مقاله بارگزاری گردد. اسامی نویسندگان نباید در فایل اصلی مقاله ذکر شود، فایل های مربوطه باید دانلود شده، عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، سمت نگارنده(گان) و مرتبه علمی، ایمیل، نام دانشگاه یا مؤسسه پژوهشی که نویسندگان در آن به پژوهش اشتغال دارند به همراه آدرس نویسنده مسئول (نشانی پستی، ایمیل و تلفن)، روی یک صفحه جداگانه به فارسی و انگلیسی ذکر گردیده و به همراه تصویر برگه تعهدنامه امضاء شده و تصویر فرم تعارض منافع بارگزاری گردد.

این فرم باید به صورت دستی تکمیل شود، سپس اسکن گردیده و فایل اسکن شده آن همراه مقاله اصلی بار گزاری شود.

تعهد نامه

سردبیر محترم مجله تازه ها در میکروب شناسی دامپزشکی

با سلام؛

اینجانب به عنوان نویسنده مسئول مقاله زیر که جهت بررسی به آن مجله ارسال شده است، از طرف سایر نویسندگان تایید می نمایم که این مقاله به زبان فارسی و انگلیسی در هیچ مجله داخلی و یا خارجی چاپ نشده است و مطالب درج شده در این مقاله مورد تایید نویسندگان زیر می باشد.

نام و نام خانوادگی نویسنده مسئول: .....

امضاء و تاریخ

عنوان مقاله: ----------

مشخصات کلیه نویسندگان مقاله به ترتیب مندرج در مقاله

نام و نام خانوادگی	آخرین مدرک تحصیلی	محل کار	تلفن تماس	امضاء

آدرس پستی و الکترونیک نویسنده مسئول:

این فرم باید به صورت دستی تکمیل شود، سپس اسکن گردیده و فایل اسکن شده آن همراه مقاله اصلی بار گزاری شود.

فرم تعارض منافع

یکی از علل مخدوش شدن پژوهش، بروز تعارض منافع است؛ تعارض منافع عبارت است از وجود هرگونه منفعت مالی و غیر مالی که احتمال دارد نویسنده یا داور یا سردبیر را در اظهار صادقانه‌ی نظر خود تحت تأثیر قرار دهد. وجود تعارض منافع به خودی خود ایرادی اخلاقی برای یک تحقیق محسوب نمی‌شود. نویسندگان بایستی هرگونه کمک مالی دریافتی و تعارض منافع احتمالی را گزارش کنند. گزارش تعارض منافع موجب رد مقاله نمی‌شود، اما گزارش آن الزامی است.

- ✓ لطفا" در زیر منابع تأمین هزینه‌های پژوهش و نگارش مقاله را به‌طور شفاف معرفی نمایند. چنانچه قراردادی میان پژوهشگر(ان) و حامی(ان) مالی پژوهش منعقد شده است. تصویر قرارداد را نیز به فایل های مقاله پیوست نمایید.

.....

- ✓ **هر گونه تضاد منافعی که در این تحقیق وجود داشته است و نحوه برخورد با آن را بیان نمایید.**

.....

عنوان مقاله: ----------

نام و نام خانوادگی نویسنده مسئول: .....

امضاء و تاریخ

ارزیابی خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدرو الکلی تعدادی گیاه دارویی بر طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

محمد رهنما[۱]، بهمن فاضلی نسب*[۲]، ایوب مزارعی[۳]، سعید شهریاری[۴]

۱- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی پژوهشگاه دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت مقاله: ۵ فروردین ۱۳۹۷، بازنگری: ۱۰ اردیبهشت ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۳۰ تیر ۱۳۹۷

چکیده

باکتری‌ها بیشتر از دیگر عوامل بیماری‌زایی که به وسیله غذا منتقل می‌شوند سبب بروز و شیوع بیماری می‌شوند. مطالعات نشان داده است که اغلب اسانس‌های گیاهی دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند. هدف از تحقیق حاضر بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدرو الکلی گیاهان دارویی، مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری بر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در این مطالعه آزمایشگاهی، اثرات ضد میکروبی عصاره‌های هیدرو الکلی بر باکتری‌ها با روش انتشار در محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری منطبق بر دستورالعمل Bauer و Kirby حاصل گردید. همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، آزیترومایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین جهت کنترل مثبت استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی کمترین تفاوت معنی‌دار انجام شد. عصاره مورد به ترتیب با میانگین ۰/۴۳±۲/۵۰، ۰/۲۵±۱/۶۷ و ۰/۶۶±۲/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین گیاه دارویی بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. عصاره‌ی رزماری با میانگین ۰/۶۶±۱/۲۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین عصاره بر *اشریشیاکلی* بودند. در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که اکثر عصاره‌ها نسبت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین بر باکتری *اشریشیاکلی* مؤثرتر، عصاره مورد نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* مؤثرتر، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثرتر بوده است. با توجه به نتایج تحقیق و افزایش روزافزون مقاومت به مواد آنتی باکتریال سنتتیک، به نظر می‌رسد گیاه مورد و بعد از آن رزماری می‌توانند به عنوان گیاهان مؤثر در پاک‌سازی برخی از باکتری‌ها ازجمله *اشریشیاکلی*، *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، رزماری، سالمونلا تیفی موریوم، لستریا مونوسیتوژنز، مورد*

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

مقدمه

مصرف مدام و بی‌رویه ترکیبات دارویی شیمیایی باعث ایجاد پدیده مهم مقاومت نسبت به میکروارگانیسم‌ها شده و با ایجاد این پدیده اثر داروها ضعیف و یا خنثی شده و در نهایت باعث افزایش مقدار مصرف دارو و تمایل به استفاده از ترکیبات با فرمولاسیون جدیدتر و قوی‌تر می‌شود. ضمناً عیب دیگر استفاده از این داروها افزایش اثرات جانبی آن‌ها بوده که منجر به ایجاد بیماری‌هایی می‌شود که از بیماری اولیه خطرناک‌تر است (۱).

گزارش‌ها حاکی از آن است که بسیاری از اسانس‌های گیاهی دارای اثر بازدارندگی قابل‌توجهی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند (۲) و مشخص شده‌است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می‌باشند (۳). بنابراین اسانس‌های گیاهی در زمینه‌های فارماکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و کلینیکی، فیتوپاتولوژی و نگهداری مواد غذایی، میوه‌ها و سبزی‌ها شدیداً غربالگری شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴). این داروهای گیاهی نزد مردم دارای مقبولیت بیشتری در مصرف هستند (۵) این دلایل علت افزایش موج جدید مطالعات گسترده جهانی و معرفی اثرات ضد باکتری گیاهان مختلف در سال‌های اخیر بوده است (۶).

متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی‌شان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۷) و تخمین زده شده که دست‌کم یک‌سوم کلیه فرآورده‌های دارویی منشأ گیاهی دارند یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته‌اند (۸). به طوری که این مواد علاوه بر جلوگیری از رشد باکتری‌ها و کپک‌های آلوده‌کننده مواد غذایی به‌منظور افزایش عمر نگهداری غذاهای فرآوری شده در سیستم غذایی و نیز افزایش عمر نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها مورد استفاده قرار گرفته اند (۹). استافیلوکوکوس گستره وسیعی از عفونت‌های ساده پوستی تا بیماری‌های تهدیدکننده زندگی (مانند پنومونی، منتژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی سمی) را ایجاد و به عنوان یکی از پنج عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است (۱۰). آلودگی سالمونلایی در انسان به صورت مسمومیت غذایی، گاستروآنتریت، تب تیفوئید و گاهی اوقات سپتی سمی بروز می‌کند (۱۱). انتروتوکسین‌های تولید شده توسط برخی از باکتری‌ها مانند اشریشیاکلی، سالمونلا، استافیلوکوکوس، یرسینیا و کلاستریدیوم، مسمومیت دستگاه گوارش و بروز علائم گوارشی ناشی از آن می‌باشند (۱۲).

تاکنون خواص ضد میکروبی برخی گیاهان بر روی باکتری‌های مختلفی ارزیابی‌شده است. مثلاً خواص بازدارندگی و ضدمیکروبی اسانس و عصاره آویشن روی اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۳، ۱۴)، عصاره آبی مورد بر سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا (۱۵)، عصاره قسمت‌های مختلف زعفران از جمله برگ‌ها، مادگی و کرولا علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس، اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس و قارچ‌ها (۱۶)، عصاره رزماری بر لوکونوستوک مزانتروئیدس، لستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس موتانس و باسیلوس (۱۷) و عصاره بومادران بر کاندیدا آلبیکنس و باسیلوس سوبتیلیس (۱۸) بررسی شده است.

با توجه به این‌که در استان‌های مختلف ایران برخی گیاهان دارویی بیشترین استفاده را دارند و از طرفی نیز استفاده از آنتی بیوتیک‌های مختلف در بین مردم متأسفانه رایج شده (۱۹) لذا در تحقیق حاضر سعی شد تا برخی از این گیاهان دارویی از قبیل رزماری (دامنه‌های کبیر کوه)، بومادران (شیراز)، زعفران (قائن)، آویشن شیرازی (شیراز) و مورد (دامنه‌های کبیر کوه) را از خاستگاه اصلی جمع‌آوری و بر عدم رشد تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای کلیدی (اشریشیاکلی، لستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس) مورد ارزیابی قرار داده و با آنتی بیوتیک‌های رایج (سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، آزیترومایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین) مورد مقایسه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی پژوهشکده زیست فناوری و آزمایشگاه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل اجرا گردید. بدین صورت که مقدار ۱۰ گرم برگ خشک‌شده در سایه و در مجاورت هوا ازگیاهان دارویی تهیه شده (جدول ۱)، آسیاب (مدل basic A11 کمپانی IKA آلمان) و سپس در ۱۰۰ سی‌سی محلول (الکل ۷۰ درصد و آب مقطر ۳۰ درصد) خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر (شرکتUniEquip مدل SKIR-601L کشور آلمان) نگهداری گردید. پس از طی شدن زمان مورد نظر، عصاره‌ها صاف، سپس حلال مورد نظر در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه روتاری (شرکت ایران پارس آزما مدل RO02) تبخیر و باقی‌مانده بعد از خشک شدن برای انجام آزمایش‌ها در یخچال با درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۰، ۲۱).

به‌منظور مطالعه نقش برهم‌کنش عصاره گیاهی (پنج نوع عصاره) و غلظت عصاره (باقی‌مانده عصاره نگهداری شده) در چهار سطح (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر قطر هاله عدم چهار نوع باکتری (*اشریشیاکلی*، *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) به همراه آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، آزیترومایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت و شاهد بدون عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی اثرات ضد میکروبی: در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها بر باکتری *اشریشیاکلی* کد (ATCC 25922)، *لستریا مونوسیتوژنز* کد (ATCC 19118)، *سالمونلا تیفی موریوم* کد (PTTC 1609) و *استافیلوکوکوس اورئوس* کد (ATCC 25923)، تهیه شده از شرکت پاتن تب با روش انتشار در محیط کشت مولر هینتون آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری بررسی (۳۱، ۳۲) و تعیین حساسیت میکروبی نیز به روش Kirby (1966) و Bauer (۳۳) انجام شد.

روش انتشار دیسک (۳۲) هنگامی که این روش توسط سازمان NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) پذیرفته شد به طور گسترده‌ای تا به امروز مورد استفاده قرار گرفت. این روش توسط بوئر، کربی، شریس و تراک توصیف شد (عموماً به آزمون کربی- بوئر معروف است)(۳۳).

تکنیک انتشار دیسک معمولاً به صورت گسترده‌ای در سنجش فعالیت ضد میکروبی یک مهارکننده‌ی مجهول به کار می‌رود (۳۴). در این روش دیسک‌های کاغذی فیلتری استریل شده ۶ میلی‌متری توسط عامل ضد میکروب با غلظت

دلخواه اشباع می‌شود (۳۵). دیسک‌های اشباع شده سپس روی سطح محیط‌های آگار جامد مناسب مانند مولرهینتون، تریپتوکیس‌سوی آگار یا نوترین آگار که از قبل توسط ارگانیسم‌ها تلقیح شده، قرار داده می‌شوند (۳۴).

مقدار تلقیح استاندارد CFU/1mL۱۰۸ برای باکتری و CFU/1mL۱۰۵ برای قارچ می‌باشد (۳۶) و این با استاندارد کدورت ۰/۵ مک‌فارلند برابر است. برخی از پژوهشگران دیسک‌های کاغذی را قبل از قرار دادن روی پلیت‌های تلقیح شده به عامل ضد میکروبی آغشته می‌کنند، در حالی که برخی دیگر ترجیح می‌دهند بعد از قرار دادن دیسک‌های کاغذی روی پلیت‌های تلقیح شده، آن را به عامل ضد میکروبی آغشته کنند (۳۶، ۳۷). زمان خشک شدن دیسک کاغذی تلقیح شده در بین محققان از ۲ ساعت تا یک شب کامل زیر هود لامینار متفاوت است (۳۶). پلیت‌های تلقیح شده به باکتری را ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و تلقیح شده به قارچ را ۴۸ ساعت در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار می‌دهند (۳۵). بعد از انکوباسیون قطر هاله را تا نزدیک‌ترین نقطه‌ای که در آن یک کاهش ۸۰ درصدی رشد را به طور مشخص داریم بر حسب میلی‌متر گزارش می‌کنیم (۳۸).

جدول ۱- مشخصات گیاهان دارویی و بافت‌های مورد استفاده

گیاه دارویی	اسم علمی	بافت مورد استفاده	ماده مؤثره	خواص دارویی	محل جمع‌آوری
رزماری	*Rosmarinus officinalis*	برگ	رزمارینیک	مکمل خوراکی انرژی زا، افزایش انرژی و وزن، حجم ساز، سرشار از ویتامین، رشد عضلات و استخوان(۲۲, ۲۳)	دامنه کبیرکوه – ایلام
بومادران	*Achillea millefolium*	برگ	ماتریکارین	بند آوردن خون، درمان کبودی چشم، رفع گاستریت‌های حاد و مزمن، رفع نفخ و ترش کردن، کاهش فشار خون، درمان نارسایی‌های کیسه صفرا، ازدیاد ادرار و رفع سنگ کلیه، باد شکن و تب بُر، دارای خاصیت ضد باکتری و ضد تورم، رفع ضعف قلب و ورم ماهیچه‌های دل، درمان بیماری‌های عصبی مانند ضعف اعصاب، هیستری، صرع و قلنج‌های تشنج آور، رفع کرمک، کرم آسکاریس، کیست ژیاردیا (۲۴, ۲۵)	شیراز – فارس
آویشن شیرازی	*Zataria Multiflora*	برگ	تیمول	رفع علائم سرماخوردگی، سینوزیت و آنفولانزا، زکام، برونشیت، آسم، گریپ، ضد سرفه، خلط آور و ضدالتهاب دهان و گلو، ضدعفونت بدن، شدت دادن به جریان خون(۲۶, ۲۷)	شیراز – فارس
زعفران	*Crocus sativus*	گلبرگ	کروستین	ضد افسردگی، عامل پیشگیری از کاهش دید در سالخوردگی، ضد سرطان، جلوگیری از سقط جنین و یا برطرف کننده سخت زایی (۲۸)	قائن – خراسان جنوبی
مورد	*Myrtus communis*	برگ	میرتول	آنتی سپتیک، ضد احتقان، قابض، تقویت‌کننده سیستم گوارشی، درمان اختلالات سیستم گوارشی، مجاری ادرار، سینوزیت و سرفه‌های خشک و دارای کاربرد موضعی آن در آکنه، بواسیر و پسوریازیس، کمک به رویش مجدد مو، ضد ریزش، سفیدی مو(۲۹, ۳۰)	دامنه کبیر کوه – ایلام

** شناسایی گونه‌های گیاهی در آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه زابل توسط دکتر سیروس‌مهر انجام شده است.

در این تحقیق نیز دیسک‌ها به مدت ۲ ساعت در زیر اشعه ماورای بنفش قرار گرفتند تا استریل شوند. پس از آن که کدورت باکتری، به کدورت نیم مک فارلند رسید، پلیت‌ها توسط سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی تلقیح شد و دیسک‌گذاری توسط پنس استریل و در کنار شعله انجام و فاصله دیسک‌ها با دیواره پلیت حداقل ۵ میلی‌متر و از یکدیگر حداقل ۲۵ میلی‌متر تعیین شد و بعد از تماس کامل با محیط کشت با سمپلر (Nichipet EXII ژاپن) استریل مقدار ۱۰ میکرو لیتر از عصاره‌های گیاهی روی دیسک‌ها ریخته شد. بعد از انجام مراحل فوق پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴

ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (شرکت memrt آلمان مدل RS232) نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان لازم، قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس دیجیتال (مدل میتوتویو Mitutoyo) کشور ژاپن) با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۳۱، ۳۹).

تجزیه آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده ها با کمک نرم‌افزار Statistic Student نسخه ۹ انجام و با توجه به کمی بودن داده‌ها، ابتدا طبیعی بودن توزیع فراوانی آنها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov تعیین شد (P >۰/۰۵) سپس میانگین پارامترها توسط آنالیز واریانس دو طرفه و برای بررسی اختلاف معنی‌دار از آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار LSD (Least Significant Difference) در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

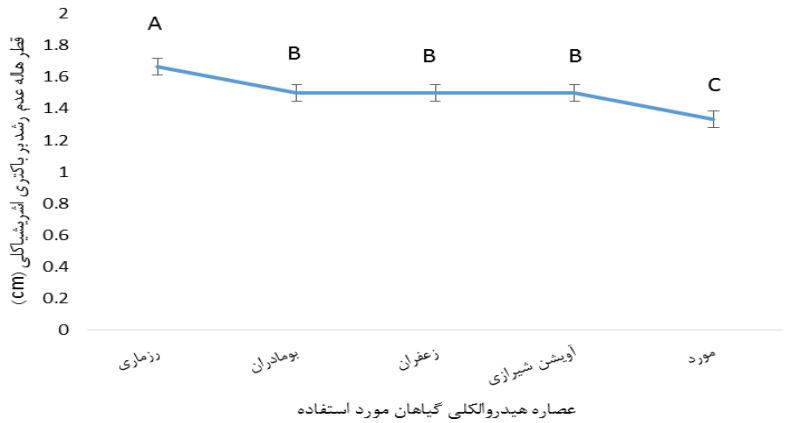
باکتری اشریشیاکلی: نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و همچنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* متفاوت و معنی‌دار در سطح کمتر از ۱ درصد بود (جدول ۲). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره رزماری با میانگین ۱/۶۶ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره مورد با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بودند (شکل ۱). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و کم اثرترین غلظت به ترتیب غلظت‌های ۱۲۰ و ۹۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی عصاره هیدرو الکلی بود. از طرفی نیز غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی رزماری با میانگین ۲ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی مورد با میانگین ۱ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین بود (شکل ۲). در مقایسهی اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که اکثر عصاره‌ها نسبت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین بر باکتری *اشریشیاکلی* اثر مثبت داشته‌اند (شکل ۳).

جدول ۲- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی*

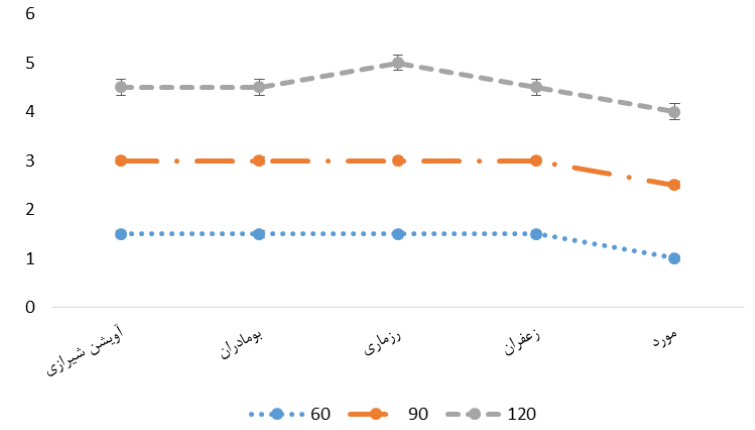
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۰/۵۰	۰/۱۲۵	۶۰	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۰/۳۰	۰/۱۵۰	۶۰	< ۰/۰۱
عصاره غلظت عصاره	۸	۰/۷۰	۰/۰۸۷۵	۳۵	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۷۵	۰/۰۰۲۵		
کل	۴۴	۱/۵۷۵			

باکتری لستریا مونوسیتوژنز: نتایج حاصل از تأثیر عصاره متانولی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و همچنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* متفاوت معنی‌دار در سطح کمتر از ۱درصد بود (جدول ۳). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره مورد با میانگین ۲/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره رزماری با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بودند (شکل ۴). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و کم‌اثرترین غلظت به ترتیب غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی بود. از طرفی نیز

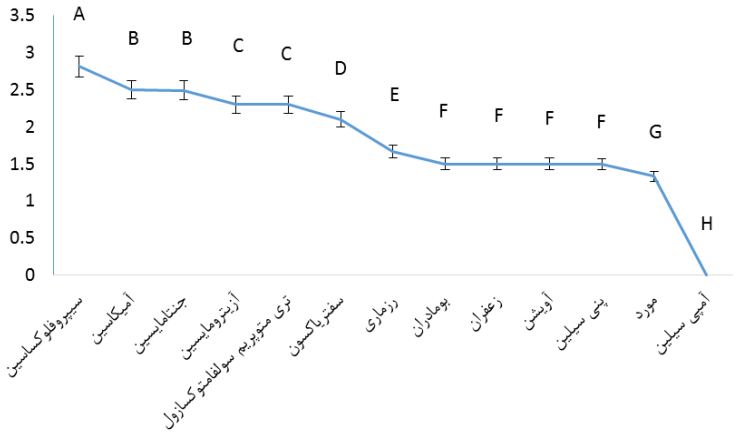
غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره بومادران و زعفران با میانگین ۳/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره‌های رزماری، بومادران و زعفران کم اثرترین بودند (شکل ۵). در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که عصاره مورد نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* اثر مثبت داشته است (شکل ۶).



شکل ۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره‌های گیاهی مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



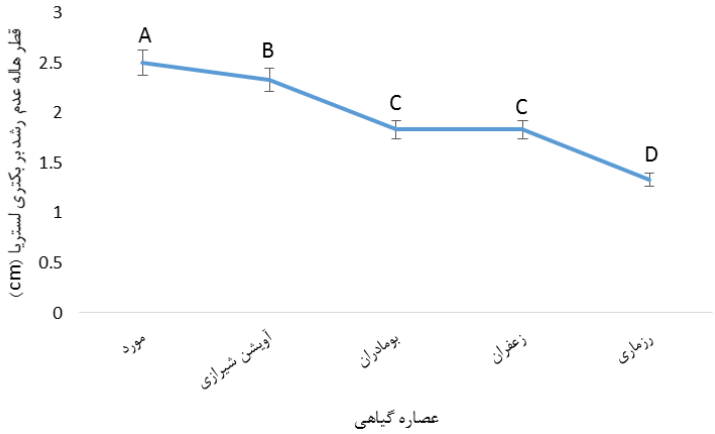
شکل ۲- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره (mg/ml). حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



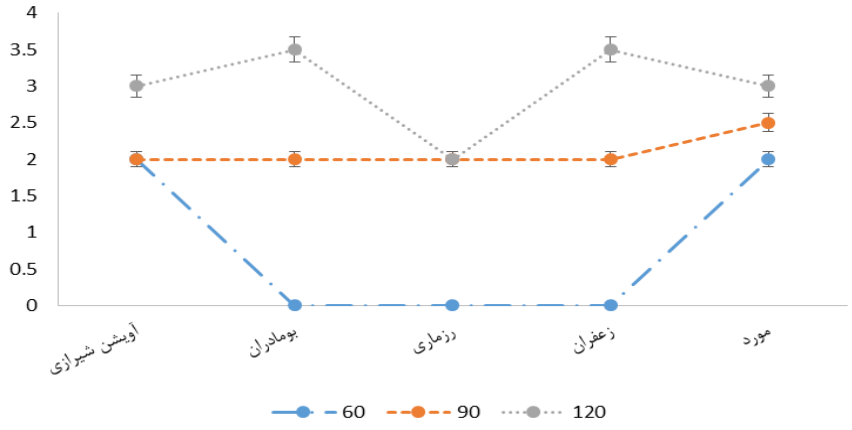
شکل ۳- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* در اثر عصاره‌ها گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

جدول ۳- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز*

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۷/۷	۱/۹۲۵	۹۶۲/۵	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۳۶/۷	۱۸/۳۵	۹۱۷۵	< ۰/۰۱
عصاره * غلظت عصاره	۸	۱۱/۸	۱/۴۷۵	۷۲۳/۵	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۶	۰/۰۰۲		
کل	۴۴	۵۶/۲۶			



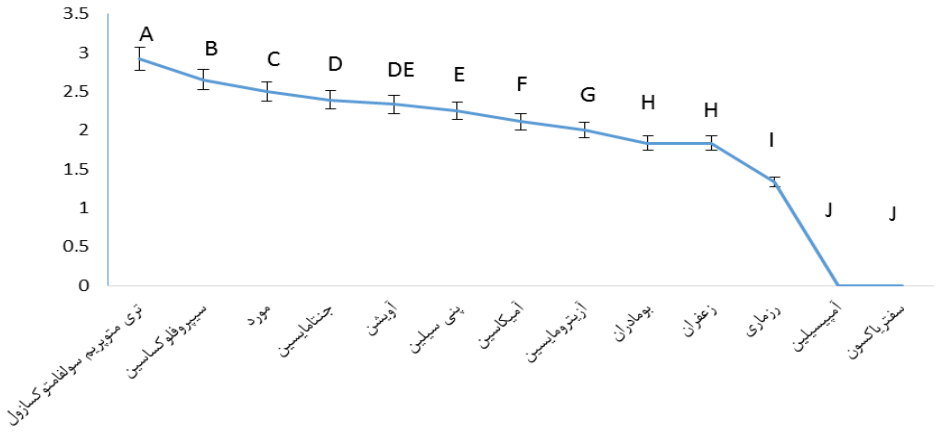
شکل ۴- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* در عصاره‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۵- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره (mg/ml). حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*: نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و همچنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* متفاوت و معنی‌دار در سطح کمتر از ۱درصد بود (جدول ۴). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره مورد با میانگین ۱/۶۷ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره زعفران با میانگین ۰/۸۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بودند (شکل ۷). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و

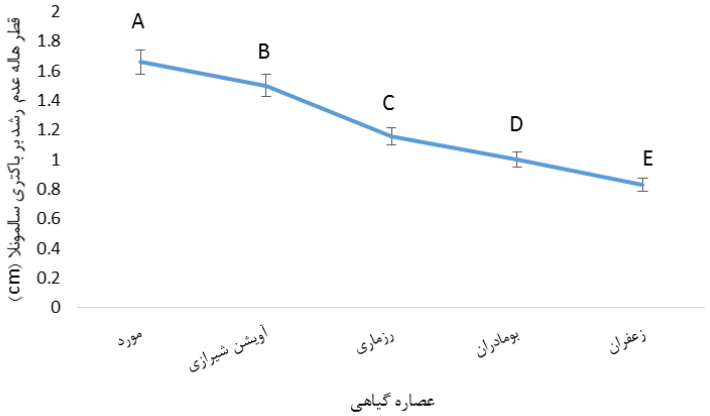
کم‌اثرترین غلظت، غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی بود. از طرفی نیز غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره مورد، رزماری و زعفران با میانگین ۲ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره بومادران و رزماری و زعفران فاقد هرگونه هاله عدم رشد بودند (شکل ۸). در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که عصاره مورد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، جنتامایسین و آمپی‌سیلین بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* اثر مثبت داشته‌اند (شکل ۹).



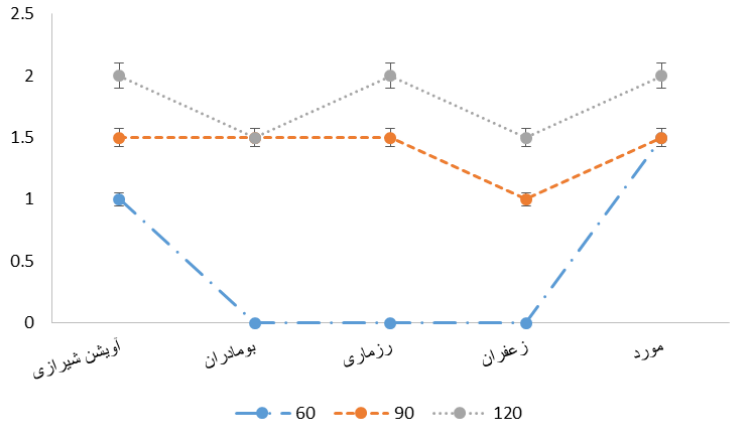
شکل ۶- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* در عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

جدول ۴- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*

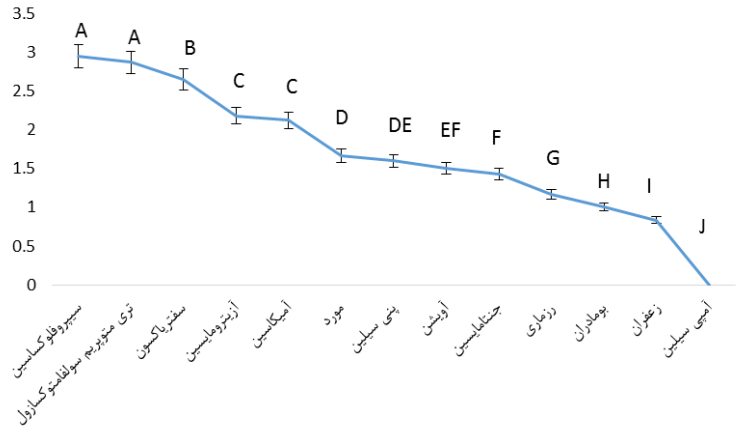
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۰/۷۵	۱/۰۷۵	۵۷۳/۵	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۱۳/۳	۶/۶۵	۳۳۲۵	< ۰/۰۱
عصاره * غلظت عصاره	۸	۳/۲	۰/۴	۲۰۰	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۶	۰/۰۰۲		
کل	۴۴	۲۰/۸۶			



شکل ۷- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در عصاره‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



شکل ۸- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

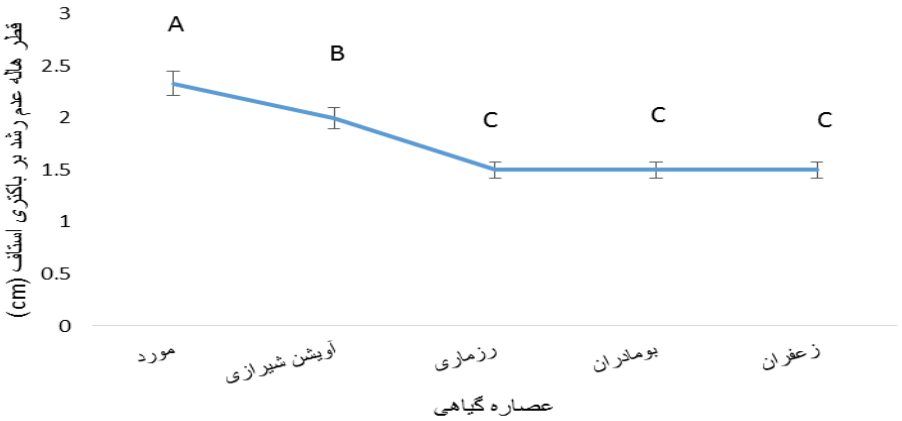


شکل ۹- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس: نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و هم‌چنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* متفاوت معنی‌دار در سطح کمتر از ۱درصد بود (جدول ۵). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره مورد با میانگین ۲/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره‌های زعفران، بومادران و رزماری با میانگین ۱/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره‌ها بودند (شکل ۱۰). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و کم اثرترین غلظت، غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بود. از طرفی نیز غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره مورد و رزماری با میانگین ۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره‌های رزماری زعفران و بومادران فاقد هرگونه هاله عدم رشد بودند (شکل ۱۱). در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که عصاره مورد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ازیترومایسین، جنتامایسین، آمیکاسین و آمپی‌سیلین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مثبت داشته‌اند (شکل ۱۲). هر چند سایر عصاره‌ها نیز شرایط مناسبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند.

جدول ۵- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۵/۳	۱/۳۲۵	۶۶۲/۵	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۳۴/۳	۱۷/۱۵	۸۵۷۵	< ۰/۰۱
عصاره * غلظت عصاره	۸	۵/۲	۰/۶۵	۳۲۵	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۶	۰/۰۰۲		
کل	۴۴	۴۴/۸۶			



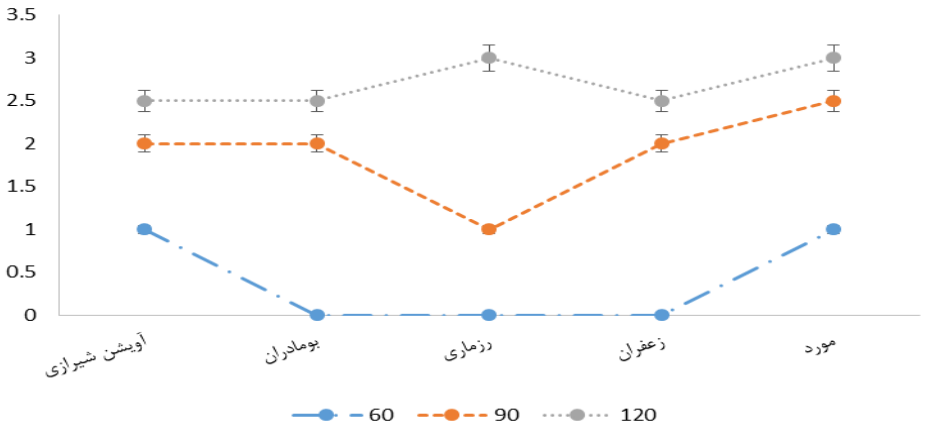
شکل ۱۰- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در عصاره‌های مختلف.
حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

بحث و نتیجه‌گیری

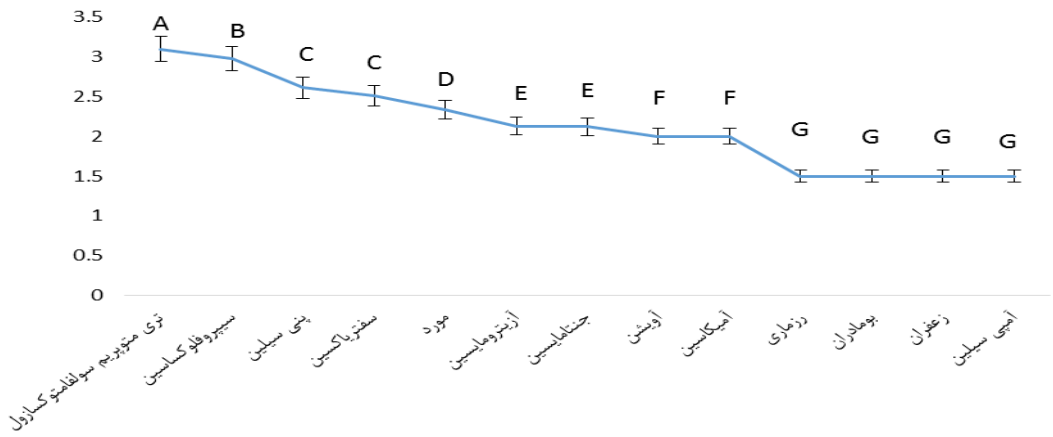
نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد استفاده نشان داد که عصاره رزماری با میانگین ۱/۶۶ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره مورد با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بر باکتری *اشریشیاکلی* بود. عصاره مورد با میانگین ۲/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره رزماری با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* بودند. عصاره مورد با میانگین ۱/۶۷ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره زعفران با میانگین ۰/۸۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم اثرترین عصاره بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بودند. عصاره مورد با میانگین ۲/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره‌های زعفران، بومادران و رزماری با میانگین ۱/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره‌ها بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند.

گزارش شده که عصاره اتانولی مورد بر *استافیلوکوکوس اورئوس* (۴۰، ۴۱) تأثیر مثبت داشته ولی روغن مورد تأثیر بیشتری نشان داده است (۴۱). ضمناً تأثیر مثبت سایر عصاره‌های استخراجی کلروفرم، اتیل استات و متانول برگ مورد و همچنین وابستگی این عصاره‌ها به غلظت آن‌ها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* (۴۲) و تأثیر بیشتر عصاره متانولی نسبت به عصاره اتانولی برگ و شاخه گیاه مورد بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین تأثیر بیشتر عصاره مورد بر باکتری‌های گرم مثبت بوده است (۴۳). در مطالعه‌ای مشخص شده که اگرچه عصاره متانولی گیاه مورد تأثیر بالایی در فعالیت انتشار نفوذی *اشریشیاکلی* نشان نداده اما حداقل غلظت

کشنده برای *اشریشیاکلی* بالای ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش داده‌اند (۴۴) و در تحقیقات دیگر نیز از عدم تأثیر عصاره مورد بر *اشریشیاکلی* حکایت داشته‌اند (۴۱، ۴۳). Houshmand و همکاران در تحقیقی بیشترین اثربخشی عصاره گیاه مورد بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت ۲/۵ درصد با قطر هاله عدم رشد حدود ۱۶ میلی‌متر و کمترین اثربخشی عصاره گیاه مورد در غلظت ۵ درصد بر لاکتوباسیل با قطر هاله عدم رشد حدود ۶ میلی‌متر گزارش دادند و در کل به این نتیجه رسیدند که عصاره مورد با غلظت‌های مختلف دارای اثرات متفاوت بر روی باکتری‌ها است (۴۵).



شکل ۱۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



شکل ۱۲- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

در تحقیق دیگر نیز غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره هیدرو الکلی مورد بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین تأثیر را نشان داده که اختلاف معنی‌داری با تمامی تیمارهای دیگر و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد داشته اما بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* تأثیری نداشته و فقط در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *اشریشیاکلی* تأثیر داشته است (۴۶). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره برگ مورد توانسته مؤثرترین عصاره بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و کم اثرترین عصاره بر

باکتری *اشریشیاکلی* باشد. ضمناً با افزایش غلظت عصاره مورد، فعالیت ضد میکروبی آن نیز زیاد شده به طوری‌که بیشترین تأثیر را در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر داشته است. لازم به ذکر است که کم اثرترین غلظت عصاره گیاه مورد بر *اشریشیاکلی* غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی لیتر بوده از طرفی هر چند با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد میکروبی آن نیز زیاد شده اما نتوانسته از ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشتر، تأثیر مثبت داشته باشد و در کل نتایج خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدرو الکلی مورد در این تحقیق با نتایج ارایه شده (۴۰، ۴۱، ۴۴، ۴۶) مشابهت داشت. ضمناً در تحقیق دیگری قطر هاله عدم رشد عصاره گیاه مورد (۱۰درصد) بر روی *استافیلوکوکوس آرئوس* ۳۵ میلی‌متر و بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* ۱۸ میلی‌متر بوده است (۴۷). در تحقیق حاضر نیز قطر هاله عدم رشد عصاره مورد بر باکتری *استافیلوکوکوس* ۳۰ میلی‌متر بود.

Afshar-Mohammedan و همکاران اثر ضد باکتریایی عصاره متانول اسیدی کلاله و گلبرگ گونه‌های مختلف زعفران (کروکوس کروکوس، کروکوس اسپیشوس و ساتیووس کاسپیوس) بر روی دو نوع باکتری گرم‌مثبت (*باسیلوس سابتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) و دو باکتری گرم‌منفی (*اشریشیاکلی* و *پسودوموناس ائروجینوسا*) از طریق سنجش قطر هاله عدم رشد باکتری به روش میزان نفوذ چاهک و تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد بررسی و به این نتیجه رسیدند که *باسیلوس سوبتیلیس* حساس‌ترین باکتری و *اشریشیاکلی* مقاوم‌ترین باکتری به عصاره‌ها بود. همچنین عصاره گلبرگ گونه کروکوس ساتیووس و عصاره‌ی کلاله گونه *کروکوس اسپیشوس* اثر مهاری بیشتری روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان داده‌اند (۴۸).

در تحقیقات دیگری اثر ضد میکروبی عصاره آبی گلبرگ (۴۹) و کلاله (۵۰، ۵۱) زعفران بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی مورد بررسی قرار داده و متوجه شدند که عصاره آبی گلبرگ زعفران بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* مؤثر اما بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *اشریشیاکلی* کم اثر اما عصاره کلاله بر اشریشیاکلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر بوده است. Barani و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی زعفران بر باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*، *کاندیدا آلبیکنس* و *لاکتوباسیل* را بررسی و به این نتیجه رسیدند که عصاره آبی و الکلی زعفران بر روی هر سه باکتری اثر مهاری داشته، اگرچه که قدرت آن‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین) کمتر بوده است. ضمناً عصاره الکلی زعفران در از بین بردن قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* از عصاره آبی مؤثرتر بوده است (۵۲). در تحقیق حاضر نیز عصاره هیدرو الکلی گلبرگ زعفران بر *اشریشیاکلی* مؤثر بوده اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر معنی‌داری بر *اشریشیاکلی* نداشته، ضمناً عصاره هیدرو الکلی زعفران تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تأثیر نداشته اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر آن بر این سه سویه باکتری بیشتر شده حتی مؤثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* عصاره گلبرگ زعفران به همراه عصاره برگ بومادران (در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بوده است اما نسبت به سایر گیاهان بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کم‌اثرترین بوده است. ضمناً نتایج این تحقیق با نتایج (۴۸، ۵۲) مشابهت داشت.

در تحقیقی اثرات مهاری عصاره گیاه رزماری بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص شده

که *پروتئوس میرابیلیس* و *انتروکوکوس فاسیالیس* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به رقت‌های ۱، ۱/۲ و ۱/۴ و *انتروکوکوس فاسیالیس* و *اشریشیاکلی* حساس‌ترین باکتری‌ها نسبت به رقت‌های ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ و ۱/۶۴ اسانس رزماری بودند (۵۳). در تحقیقی عصاره الکلی برگ و سرشاخه‌های گل‌دار خشک‌شده گیاه رزماری، گیاه علف چای و گیاه کاجیره به روش چاهک در غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ گرم در میلی‌لیتر ارزیابی و گزارش دادند که در سه ساعت اولیه در هر سه غلظت باکتری *اشریشیاکلی* در حضور عصاره الکلی گیاه رزماری رشد کمتری نسبت به دو گیاه دیگر داشته و در این میان کمترین اثر مربوط به عصاره الکلی گیاه علف چای بوده اما از ساعت سوم به بعد، این تغییرات حالت معکوس پیدا می‌کنند و کاهش رشد باکتری *اشریشیاکلی* در حضور عصاره الکلی علف چای بیشتر از دیگر عصاره‌ها بوده است (۵۴).

نتایج حاصل از مطالعه Golshani و Dawoodi (۵۵) نشان داده که قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی رزماری بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بین ۸ تا ۱۵ میلی‌متر و همچنین قطر هاله عدم رشد در *سودوموناس آئروژینوزا* بین ۱۵ تا ۱۸ میلی‌متر مشاهده گردیده است. در تحقیقی دیگر جهت بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس رزماری مشخص گردیدکه میزان هاله عدم رشد این اسانس بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱۸ میلی‌متر بود (۵۶) و همچنین دیگر اثرات مثبت اسانس رزماری بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* گزارش شده است (۵۶، ۵۸).

در تحقیق حاضر عصاره رزماری مؤثرترین عصاره بر *اشریشیاکلی* بوده و با افزایش غلظت عصاره تأثیر معنی‌دار بیشتری داشته است که با نتایج قبلی (۵۳، ۵۴) ارایه شده مشابهت داشت، اما کم‌اثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* و جزو کم اثرترین عصاره‌ها بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بوده و تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز بر هیچ کدام از سه سویه نامبرده هیچ اثری نداشته است، اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر آن بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* بیشتر شده ولی این اثر با افزایش بیش از ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معنی‌دار نبوده است. مؤثرترین غلظت عصاره برگ رزماری بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است. ضمناً مشخص شده عصاره هیدرو الکلی رزماری در غلظت های بالا (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تأثیر مؤثرتری داشته است. قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی رزماری بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تحقیق حاضر ۱۵ میلی‌متر بوده که با نتایج قبلی (۵۵، ۵۶) ارائه شده مشابهت دارد.

در گزارشی غلظت‌های مختلف (۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره هیدرو الکلی گل و برگ بومادران به روش انتشار چاهک بر *استافیلوکوکوس آرئوس*، باسیلوس سرئوس، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* بررسی و مشخص شده که عصاره گل بیشترین تأثیر بر باکتری *استافیلوکوکوس* آرئوس (با میانگین ۱۳ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) و کمترین تأثیر (با میانگین ۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) بر *اشریشیاکلی* داشته، هر چند *سودوموناس* هیچ حساسیتی به عصاره از خودش نشان نداده بود (۵۹). Ataei و همکاران اثر ضد قارچ و ضد باکتری عصاره‌های بومادران، بابونه و ریوند در مقایسه با دهان‌شویه‌های شیمیایی کلرهگزیدین ایرانی و خارجی را بر برخی باکتری‌ها و قارچها بررسی و به این نتیجه رسیدند که عصاره ریوند بیشترین اثر ضد

باکتریایی را از خود نشان داده و سپس عصاره بومادران و بابونه به ترتیب در مرحله بعدی قرار داشته‌اند. از نظر اثر ضد قارچی هر سه عصاره اثر بسیار ضعیفی نشان دادند (۶۰).

Shirazi و همکاران عصاره متانولی برگ مورد (*Myrtus communis* L.)، برگ و سرشاخه‌های گل‌دار مریم‌گلی (*Saliva officinalis* L.)، ریزوم و ریشه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، پوست خارجی نارنج (*Citurs bigaradia* L.)، ریشه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)، برگ و سرشاخه‌های گل‌دار بومادران (*Achillea millefolium* L.)، برگ افسنطین (*Artemidia absinthium* L.)، میوه گل پر (*Heraclim persicum* Desf. ex Fischer)، دانه و برگ اسپند (*Peganum harmala* L.) و پوست شیطان زیتون (*Melia ozedarach* L.) را بر روی هلیکوباکترپیلوری مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های گیاهی افسنطین، شیطان زیتون، شیرین‌بیان، مریم‌گلی، مورد به ترتیب با ۱۵، ۱۴، ۱۴، ۱۴، ۱۳ و ۱۱ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد بر *هلیکوباکترپیلوری* اثر مهاری داشته ولی سایر عصاره‌های گیاهی اثر مهاری قابل توجهی نداشتند (۶۱). در تحقیق حاضر نیز میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره هیدرو الکلی بومادران به روش انتشار دیسک بر باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* آرئوس ۱۵ میلی‌متر، *سالمونلا تیفی موریوم*، ۱۰ میلی‌متر و *لستریا مونوسیتوژنز*، ۱۸ میلی‌متر بود که با نتایج ارائه شد ه قبلی (۵۹، ۶۱) مشابهت داشت. از طرفی عصاره هیدرو الکلی بومادران به ترتیب بیشتر از ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* تأثیر نداشته اما خاصیت ضد میکروبی آن با افزایش غلظت بر *استافیلوکوکوس* آرئوس و *لستریا مونوسیتوژنز* بیشتر شده است. در کل عصاره بومادران در غلظت‌های پایین اثر متوسط و ضعیف ضد باکتریایی داشته و نسبت به گیاهانی از جمله مورد، آویشن شیرازی، رزماری ضعیف‌تر بوده است، اما در غلظت‌های بالا اثر متفاوت‌تری داشته و حتی تا ۳۵ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* نیز داشته است.

با توجه به این که هر تحقیقی کمی و کاستی‌هایی دارد و تحقیق حاضر نیز مستثنی نبوده لذا پیشنهاد می‌گردد در مرحله بعدی مواد مؤثره گیاهانی که بیشترین نقش را در خاصیت ضد میکروبی داشتند به طور مستقیم مورد ارزیابی قرار گیرد تا نتیجه‌گیری نهایی به طور دقیق‌تر ارائه شود هر چند نویسنده مسئول این مقاله دارای چشم انداز تحقیقاتی تصویب شده در دانشگاه زابل به نام تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی بوده که در مراحل بعدی تحقیقات زنجیرواری خود این کار را نیز انجام خواهد داد.

مؤثرترین عصاره بر *اشریشیاکلی* عصاره رزماری (غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بوده است. مؤثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* عصاره مورد بوده ولی در سطوح بالاتر (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره زعفران و بومادران بیشترین تأثیر را داشته‌اند. مؤثرترین عصاره بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* عصاره مورد بوده از طرفی در سطوح بالاتر (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره مورد به همراه عصاره رزماری و آویشن بیشترین تأثیر را داشته‌اند. مؤثرترین عصاره بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره مورد بوده از طرفی در سطوح بالاتر (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره مورد به همراه عصاره رزماری بیشترین تأثیر را داشته‌اند. در کل مؤثرترین عصاره بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره مورد و بر باکتری *اشریشیاکلی* عصاره رزماری است.

References

1- Pinto RJ, Marques PA, Neto CP, Trindade T, Daina S, Sadocco P. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. Acta Biomater. 2009; 5(6):2279-89.

2- Marilena C, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Asteraceae. Int J Food Microbiol. 2005; 95(2):187-95.

3- Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils. J. Agric. Food Chem. 2005; 53:9452-8.

4- Fooladvand Z, Fazeli-nasab B. Antibacterial activities of *Stachys lavandulifolia Vahl*. extract against eight bacteria. JHD (An International Journal on Medicinal Herbs). 2014; 5(1):13-8.

5- Mosaddegh M, Naghibi F. Iranian traditional medicine, past and present in traditional medicine and materia medica. Tehran: TMRC Pub. 2002:2-20.

6- Fazeli-Nasab B, Rahnama M, Mazarei A. Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(149):63-78 (In persian).

7- Azadbakht M, Morteza-semnani K, Khansari N. The essential oils composition of Achillea wilhelmsii C. Koch. Leaves and flowers. J Med Plants. 2003; 2:55-559.

8- Omidbeigi R. Production and processing of medicinal plants. Tarrahan Nashe press, Tehran. 2007:176 [In persian].

9- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods (a review). Int J Food Microbiol. 2004; 94(3):223-53.

10- Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 2005; 22(4):273-92.

11- Shapoori R, Rhnama M, Eghbal-Zadeh S. Study of *Salmonella* serotypes in chicken meat and egg, and determine the antibiotic susceptibility in Zanjan. J Biol Sci. 2009; 2(3):63-71.

12- Kotze M, Eloff J, Houghton P. Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). S. Afr. J. Bot. 2002; 68(1):62-7.

13- Sangclic O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano. Wissenchaft Und Technologic. 2003; 36(5):467-73.

14- Najafi Momen R, Torabi Goudarzi M, Bahonar A, Akbari H, Darabi M. Clinical Evaluation of the Effect of Myrtle Oil on the Oral Lesions of FMD in Cattle. J Med Plants. 2011; 2(38):135-41 [In persian].

15- Al-saimary LE, Bakr SS, Jaffar T, Al-saimary AE, Al-Muosawi R. Effect of some plant extracts and antibiotics on Psendo minas aeruginosa isolated from various burn cases. Saudi med. j. 2002; 23(7):802-5.

16- Vahidi H, Kamalinejad M, Sedaghati N. Antimicrobial properties of Croccus sativus L. Iran J Pharm Res. 2010;1:33-5.

17- Larrán S, Ringuelet JA, Carranza MR, Henning CP, Ré MS, Cerimele EL, et al. In vitro fungistatic effect of essential oils against Ascosphaera apis.JEOR. 2001; 13(2):122-4.

18- Sokmen A, Sokmen M, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Ünlü M, et al. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini Afan*. (Asteraceae).Phytother Res. 2004; 18(6):451-6.

19- Hosseinzadeh F, Sadeghieh Ahari S, Mohammadian-erdi A. Survey the Antibiotics Prescription by General Practitioners for Outpatients in Ardabil City in 2013. J Ardabil Uni Med Sci. 2016; 16(2):140-50.

20- Ebrahimzadeh MA, Hosseinimehr SJ, Hamidinia A, Jafari M. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Pharmacol online. 2008; 1:7-14.

21- Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr j biotechnol. 2006; 5(11):1142-5.

22- Cisarova M, Tancinova D, Medo J, Kacaniova M. The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of Aspergillus species. J Environ Sci Health B, Pesticides. 2016; 51(10):668-74. Epub 2016/06/21.

23- Felsociova S, Kacaniova M, Horska E, Vukovic N, Hleba L, Petrova J, et al. Antifungal activity of essential oils against selected terverticillate penicillia.: AAEM. 2015; 22(1):38-42. Epub 2015/03/18.

24- Kermanshah H, Kamangar SS, Arami S, Kamalinegad M, Karimi M, Mirsalehian A, et al. The effect of hydro alcoholic extract of seven plants on cariogenic bacteria--an in vitro evaluation. Oral Health Dent Manag. 2014; 13(2):395-401. Epub 2014/07/06.

25- Jaimand K, Ahrabi Asli H, Monfared A. Extraction and Determination of Quercetin in *Achillea millefolium* L., *Achillea bieberstinuii Afan.* and *Achillea tenuifolia Lam*.JSSM . 2011; 27(3):529-39.

26- Sharafati Chaleshtori R, Rafieian Kopaei M, Rokni N, Mortezaei S, Sharafati Chaleshtori A. Antioxidant Activity of Zataria Multiflora Hydroalcoholic Extract and Its Antibacterial Effect on Staphylococcus Aureus. J Mazandaran Univ Med

Sci 2013; 22(1):88-94 [In persian].

27- Shokri H, Sharifzadeh A. Zataria multiflora Boiss. A review study on chemical composition, anti-fungal and anti-mycotoxin activities, and ultra-structural changes. J Herbmed Pharmacol. 2017; 6(1):1-9.

28- Mohammadi D, Fazeli-Nasab B. Overview medicinal properties and hazards of saffron stigma and petals with an emphasis on the anti-tumor effects and lowers blood pressure. 2nd national conference on medicinal plants and permanent agriculture; Hamedan2014.

29- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Eslami S. Effect of Increasing the Polarity of Solvent on Total Phenol and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Myrtle (Myrtus communis L.). J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(126):68-81 [In persian with abstract English].

30- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (Myrtus communis L.). J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(127):10-24 [In persian].

31- Abubakar LA, Mwangi CM, Uku JU, Ndirangu SN. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin, *Tripneustes gratilla*, (Echinoidea). Afr. J. Pharmacol. Ther. 2012; 1(1):19-23.

32- Heatley N. A method for the assay of penicillin.Biochem J. 1944; 38(1):61-5.

33- Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American J clin pathol. 1966; 45(4):493-6.

34- Freixa B, Vila R, Vargas L, Lozano N, Adzet T, Cañigueral S. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants.Phytother Res . 1998; 12(6):427-30.

35- Salie F, Eagles P, Leng H. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species.J Ethnopharmacol. 1996; 52(1):27-33.

36- Bariş Ö, Güllüce M, ŞAHİN F, Özer H, Kiliç H, Özkan H, et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of Achillea biebersteinii Afan.(Asteraceae). Turkish J Biol. 2006; 30(2):65-73.

37- Nostro A, Germano M, D'angelo V, Marino A, Cannatelli M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity.J Appl Microbiol. 2000; 30(5):379-84.

38- Regiater F. Rules and regulations. Antibiotic susceptibility disks: correction. Fed Regist. 1973; 38:2576-84.

39- Jahan N, Khatoon R, Shahzad A, Shahid M, Ahmad S. Comparison of antibacterial activity of parent plant of Tylophora indica Merr. with its in vitro raised plant and leaf callus. Afr j biotechno. 2013; 12(31).

40- Alem G, Mekonnen Y, Tiruneh M, Mulu A. Invitro antibacterial activity of crude preparation of myrtle (*Myrtus communis*) on common human pathogens. Ethiop med j. 2008; 46(1):63-9.

41- Salvagnini LE, Oliveira JRS, Santos LEd, Moreira RRD, Pietro RCL. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) leaves. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(2):241-4.

42- Gholamhoseinian-Najar A, Mansouri S, Rahighi S. Effect of sub-inhibitory concentrations of myrtus communis leave extracts on the induction of free radicals in *Staphylococcus aureus*; A possible mechanism for the antibacterial action. Asian J Plant Sci. 2009; 8(8):551-6.

43- Amensour M, Bouhdid S, Fernandez-Lopez J, Idaomar M, Senhaji NS, Abrini J. Antibacterial activity of extracts of Myrtus communis against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. Int J Food Propert. 2010; 13(6):1215-24.

44- Ghasemi Pirbalouti A, Jahanbazi P, Enteshari S, Malekpoor F, Hamedi B. Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. Arch. of Biol. Sci. 2010; 62(3):633-41.

45- Houshmand B, Mortazavi H, Alikhani Y, Abdolsamadi H, AhmadiMotemayel F, Zare Mahmoudabadi R. In Vitro Evaluation of Antibacterial Effect of *Myrtus* Extract with Different Concentrations on Some Oral Bacteria. J Mash Dent Sch. 2011; 35(2):123-30.

46- Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S, Nasery F. Antibacterial Effect of *Myrtus Communis* Hydro-Alcoholic Extract on Pathogenic Bacteria ZJRMS. 2013; 15(6):19-24.

47- Kilani S, Abdelwahed A, Ammar RB, Hayder N, Ghedira K, Chraief I, et al. Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian) Cyperus rotundus. JEOR. 2005; 17(6):695-700.

48- Afshar-Mohammedan M, Kordi S, Mashhadi-Nejad A. Antibacterial activity of stigma and petal of different species of saffron (*Crocus Spp*.). J Cell Mol Res (Iranian J Biol). 2016; 29(3):265-73.

49- Gandomi Nasrabadi H, Azami Sarokelaei L, Misaghi A, Abbaszadeh S, Shariatifar N, Tayyar Hashtjin N. Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts from petal of saffron (*Crocus sativus* L.) on some foodborne bacterial pathogens. J Med Plants. 2012; 2(42):189-96.

50- Razzaghi R, Nourbakhsh R, Hemmati Kakhaki A, Saberi Najafi M. Antimicrobial effect of saffron. 3rd national congress on saffron, Iran [In persian]. 2003.

51- Tayel AA, El Tras WF. Possibility of fighting food borne bacteria by Egyptian folk medicinal herbs and spices extracts. J Egypt Public Health Assoc. 2009; 84(1-2):21-32.

52- Barani Karbasaki F, Hossenzadeh H, Fazli Bazzaz BS, Hoda V, Ghazvini K, Ajami B-a-m. Evaluation of Antimicrobial effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron on Oral Path-

ogenic Microbes (Streptococcus Mutans, Lactobacillus, Candida Albicans). J Mashhad Dent Sch. 2016; 40(3):203-12.

53- Ahmadyasbchin S, Mostafapor-rami M, Rajaee-maleki S. The in Vitro Inhibitory Effects of the *Rosemary* Essential Oil on Some Gram Positive and Negative Bacteria. Scientific J Ilam Univ Med Sci. 2016; 24(2):80 - 9.

54- Mashreghi M, Momtazi F. Comparison of the Antibacterial Effects of Various Concentrations of Alcoholic Extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Carthamus tinctorius* on the Growth Phases of Esherichia coli O157. J Rafsanjan Univ Med scie. 2012; 11(2):103-14.

55- Golshani Z, Dawoodi V. In vitro study of antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* leaf extract against some pathogens. Arak Med Univ J. 2013; 16(77):82-9.

56- Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytother Res. 2007; 21(10):989-94.

57- Tsai P-J, Tsai T-H, Ho S-C. In vitro inhibitory effects Phytother Res of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. Food chem. 2007; 105(1):311-6.

58- Seydim A, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Res Int. 2006; 39(5):639-44.

59- Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M, Mohammadi-Seichani M. Antibacterial activity of methanol extracts of flowers and leaves of yarrow. Qom Univ Med Sci J. 2011; 5(3):50-6.

60- Ataei Z, Abdolahi H, Naderi Poor S, Mohamadi S. An in vitro study of the effects of Yarrow, Chamomile and Rhubarb herbal extracts on candida albicans and common oral bacteria JIDAI. 2006; 18(3):25-31 [In persian].

70- Shirazi M, Amin G, Akhondi Lavasani B, Eshraghi S. Study of Antibacterial Properties of Adiantum capillus-veneris Extract on Eight Species of Gram Positive and Negative Bacteria. J. Med Plants. 2011; 4(40):124-32 [In persian].

Evaluation of antimicrobial activity hydro alcoholic extract of some medicinal herbs against a range of Gram-positive and gram-negative bacteria

Mohammad Rahnama[1], Bahman Fazeli-Nasab [*2], ayoub Mazarei [3], Saeed Shahriari [4]

1- Department of nutrition and animal breedings, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
3 M.Sc. of Plant medicinal, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Department of pathobiology, Veterinary campus, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: March 25, 2018; Revise: April 30, 2018; Accept: July 21, 2018

Summary

Bacterial have caused the outbreak of diseases more than any other pathogens that are transmitted by food. The aim of this study is to evaluate the extracts of the medicinal plants, saffron, yarrow, thyme and rosemary on the bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial effects of hydro-ethanol extract on the bacteria was surveyed using diffusion method in a culture medium Mueller-Hinton agar by paper discs (6 mm) based on Bauer and Kirby instructions. The antibiotics *ciprofloxacin*, *amikacin*, *gentamicin*, *azithromycin*, *trimethoprim-sulfamethoxazole*, *ceftriaxone*, *penicillin* and *ampicillin* were used as positive control. Means square was conducted by Least Significant Difference (LSD) test at five percent of probability level ($P<0.05$). Myrtus Extract is the most effective medicinal plant on the bacteria *Listeria*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*, respectively; with an average of 2.5±0.43, 1.67±0.25 and 2.33±0.66 cm the diameter of bacterial inhibition zone. Rosemary Extract is the most effective medicinal plant on the bacteria *E.coli*, respectively with an average of 1.25±0.66 cm the diameter of bacterial inhibition zone. Comparison of the effect of plant extracts with antibiotics was used in this research, and it was found that most of the extracts were more effective than *ampicillin* and *penicillin* on the bacterium E. coli. *Myrtus* extract, compared with all antibiotics, was more effective on bacteria *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus*. According to the results and increasing resistance to antimicrobial synthetic materials; Myrtus, and after that, rosemary plant can be as effective in destroying some bacteria like; *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*.

KeyWords: *E. coli, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus*

بررسی میزان شیوع انگل‌های خونی در گاوهای شهرستان تربت جام در سال ۱۳۹۴

جعفر حسین زاده مرزناکی*[۱]، محمدرضا یوسفی[۲]، معین میرهزاری[۳]، عبدالهانی شجاعی[۳]

۱- عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
۲- گروه انگل شناسی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
۳- دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل ، ایران
۴- دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل، ایران

دریافت مقاله: ۲۴ خرداد ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۰ تیر ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۳۹۷

چکیده

انگل‌های تک یاخته ای *پیروپلاسما* به دلیل ایجاد بیماری و مرگ و میر شدید در حیوانات اهلی و اهمیت انتقال برخی از جنس و گونه‌های آن‌ها به انسان، سبب ایجاد خسارت‌های اقتصادی و بهداشتی فراوان در سراسر جهان می‌گردند. بیماری‌های ناشی از *تیلریا* و *بابزیا* هر سال در مناطق مختلف کشورمان در طی فصول بهار و تابستان با شروع فصل فعالیت کنه، در حیوانات اهلی شیوع پیدا می کنند. هدف از این تحقیق تعیین شیوع انگل‌های خونی در گاوهای مشکوک به زردی در شهرستان تربت جام می‌باشد. این مطالعه در طی بهار و تابستان ۱۳۹۴ بر روی ۲۱۰ رأس گاو مشکوک به زردی در این شهرستان انجام گرفت. پس از معاینه‌ی بالینی و مشاهده نشانه‌های درمانگاهی، جهت بررسی انگل‌های خونی اقدام به تهیه گسترش خونی از ورید گوش گردید. گسترش خونی تهیه شده در آزمایشگاه با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که ۳۶ درصد گاوهای مورد بررسی آلوده به *تیلریوز* و ۶ درصد آلوده به *بابزیوز* و ۱۰ درصد آلوده به *آناپلاسموز* می باشند، همچنین در این بررسی ۸ درصد آلودگی توأم *تیلریا* و *آناپلاسما* مشاهده شد. بنابراین با توجه به حضور انگل‌های خونی درگاوهای منطقه و همچنین اهمیت بندپایان در انتقال آنها، می‌توان جهت کنترل آلودگی‌های فوق علاوه بر درمان دامهای مشکوک به آلودگی، به مبارزه با این بندپایان نیز اقدام نمود.

واژگان کلیدی: انگل‌های خونی، شهرستان تربت جام، گاو

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: j.hossienzadeh@chmail.ir

مقدمه

در زیـرردهٔ *پیروپلاسـما* مطـابق بـا طبقـه‌بنـدی لواین کـه در سـال ۱۹۶۱ انجـام گرفتـه اسـت، انگل‌هـای خـونی مهـره داران قـرار دارنـد. ایـن تـک یاختـه‌ها کوچـک و دارای تشـکیلات رأسـی تحلیـل رفتـه هسـتند و تولیـد مثـل در آن‌هـا از طریـق تقسـیم دوتـایی یاشـیزوگونی انجـام مـی‌پـذیرد. ایـن انگل‌هـا از طریـق کنـه‌ها انتقـال مـی‌یابنـد. دو خـانوادهٔ مهـم بابزیـده و تیلریـده در ایـن گـروه قـرار دارنـد.جنس *بابزیـا* ارگانیسـمی اسـت کـه بـه اشـکال مختلـف در داخـل گلبول‌هـای قرمـز مشـاهده مـی‌گـردد. دارای تولیـد مثـل غیـر جنسـی بـوده و در رنـگ آمیـزی رومانوفسـکی، بـا سیتوپلاسـم آبـی و تـوده کروماتینی قرمـز داخـل آن قابـل تشـخیص مـی‌باشـد. درجـنس *تیلریـا* مجموعـه رأسـی کـاملاً تحلیـل رفتـه اسـت. اشـکال گـرد، بیضـی، باسـیلی یـا نـامنظم اسـت. نـاقلین تـک یاختـه *تیلریـا*، گونه‌های کنه *هیالوما* مـی‌باشـند. تـک یاختـه آناپلاسـما یـک ریکتزیـا محسـوب مـی‌گـردد و بـه دلیـل شـباهت زیـاد آن بـا *تیلریـا*، شناسـایی و تفکیـک آن‌هـا از هـم ضروری بـه نظـر مـی‌رسـد. دو گونـه *آناپلاسـما مارژینالـه* و *آناپلاسـما سـنتراله* از تـک یاختـه فـوق گـزارش گردیده است کـه انتقـال آن‌هـا توسـط گـزش مگس‌هـای خـون‌خـوار ماننـد جـنس *استوموکسـیس* و کنـه‌ها صـورت مـی‌پـذیرد (۶). *تیلریـوز* و *بـابزیوز* مهـم‌تـرین بیماری‌های منتقله توسط کنه در گـاو مـی‌باشـند کـه بـا علائمـی شـامل تـب، زردی، لاغـری و هموگلوبیمـوزی بروز مـی‌نمایـد (۵). در حـال حاضـر، پیشـگیری بیمـاری پیرامـون کنتـرل نـاقلین، کـاربرد روش‌هـای بهداشـتی مناسب و ایمن‌سازی دور مـی‌زنـد. بـه طـور کلـی کنتـرل و جلـوگیری از تمـاس کنـه‌ها و حشـرات خـون‌خـوار ناقـل بـا گاوهـای در حـال چـرا در چراگـاه یـا مراتـع دامداری دشوار است. بـا وجـود ایـن کنتـرل حشـرات در جهت کـاهش آلـودگی بنـدپایان مـؤثر اسـت. بـه همـین دلیـل مـا را بـر آن داشـت تـا بـا مطالعـه شـیوع ایـن انگل‌هـا کمکـی بـه درمـان و پیشـگیری از بـروز ایـن بیماری در منطقه کند.

مواد و روش‌ها

ایـن بررسـی کـه در سـال ۱۳۹۴ بـر روی ۲۱۰ عـدد گاو مشکوک بـه زردی مراجعـه‌کننـده بـه کلینیـک‌هـای دامپزشکی شهرستان تربـت جـام بـه عمـل آمـد. پـس از معاینـه‌ی بـالینی و مشـاهده نشـانه‌های درمانگـاهی هم‌چون تـب، بـزرگ شـدن عقـده‌های لنفـاوی سـطحی، رنـگ پریـدگی یـا زردی مخاطـات، هموگلوبینـوری دام مشکوک بـه زردی تلقـی مـی‌شـد. سـپس بـا اسـتفاده از سرسـوزن اسـتریل وریـد گـوش سـوراخ شـده و بـا تهیـه یـک قطـره خـون بـر روی لام منتقـل شـده، سـپس گسـترش نـازک تهیـه و شـماره زده شـده اسـت. از هـر دام حـداقل ۳ گسـترش خـونی تهیـه شـد و بـا متـانول ۹۶ درجـه فـیکس گردیـده اسـت. در آزمایشـگاه دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد بابـل لام‌هـای تهیـه شـده بـا رنـگ گیمسـا رنـگ‌آمیـزی شـد. گسـترش‌هـای رنگ‌آمیـزی شـده بـا میکروسـکوپ نـوری از نظـر وجـود انگل‌های خونی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

از ۲۱۰ رأس گـاو مشـکوک بـه زردی ۷۶ مـورد آلوده بـه *تیلریـا* و ۱۳ مـورد آلـوده بـه *بابزیـا* و ۲۱ مـورد آلـوده بـه *آناپلاسـما* و ۱۷ مـورد آلـودگی تـوام *آناپلاسـما* و *تیلریا* مشاهده شد (جدول ۱).

بیشـترین میـزان آلـودگی بـه *تیلریـوز* در سـن ۲ تـا ۴ سـالگی مشـاهده شـد و کمتـرین میـزان در سـن بالای ۴ سال بود و بیشـترین میـزان آلـودگی بـه *بـابزیوز* در سـن ۲ تـا ۴ سـالگی مشـاهده شـد و کمتـرین میـزان در سـن بـالای ۴ سـال بـود، همچنـین بیشـترین میـزان آلـودگی بـه *آناپلاسـما* نیـز در سـن ۲ تـا ۴ سـالگی مشـاهده شـد. میـزان آلـودگی بـه تیلریـوز، بـابزیوز و آناپلاسـموز تفـاوت معنـی‌داری بـا افـزایش سـن دام

نشان می‌دهد (جدول ۲)(شکل ۱).

جدول ۱- شیوع و شدت آلودگی به انگل‌های خونی در گاوهای شهرستان تربت جام

نام انگل	تعدادآلوده	درصد آلودگی	فاقد آلودگی	درصد
تیلریا	۷۶	٪۳۶	۱۳۴	٪۶۴
بابزیا	۱۳	٪۶	۱۹۷	٪۹۴
آناپلاسما	۲۱	٪۱۰	۱۸۹	٪۹۰
آناپلاسما و *تیلریا*	۱۷	٪۸	۱۹۳	٪۹۲

بیشترین میزان آلودگی به *تیلریوز* در سن ۲ تا ۴ سالگی مشاهده شد و کمترین میزان آلودگی در سن بالای ۴ سال بود و بیشترین میزان آلودگی به *بابزیوز* در سن ۲ تا ۴ سالگی مشاهده شد و کمترین میزان آلودگی در سن بالای ۴ سال بود همچنین بیشترین میزان آلودگی به *آناپلاسما* نیز در سن ۲ تا ۴ سالگی مشاهده شد. میزان آلودگی به تیلریوز، بابزیوز و آناپلاسموز تفاوت معنی‌داری با افزایش سن دام نشان می‌دهد (جدول ۲)(شکل ۱).

جدول۲- درصد گاوهای آلوده به انگل‌های خونی براساس سن حیوان

سن/ انگل	۰-۲	۲-۴	بالای ۴
تیلریا	٪۳۲,۸	٪۴۴,۷	٪۲۲,۳
بابزیا	٪۳۰,۸	٪۴۶,۱	٪۲۳
آناپلاسما	٪۲۸,۵	٪۶۱,۹	٪۹,۵

بحث و نتیجه‌گیری

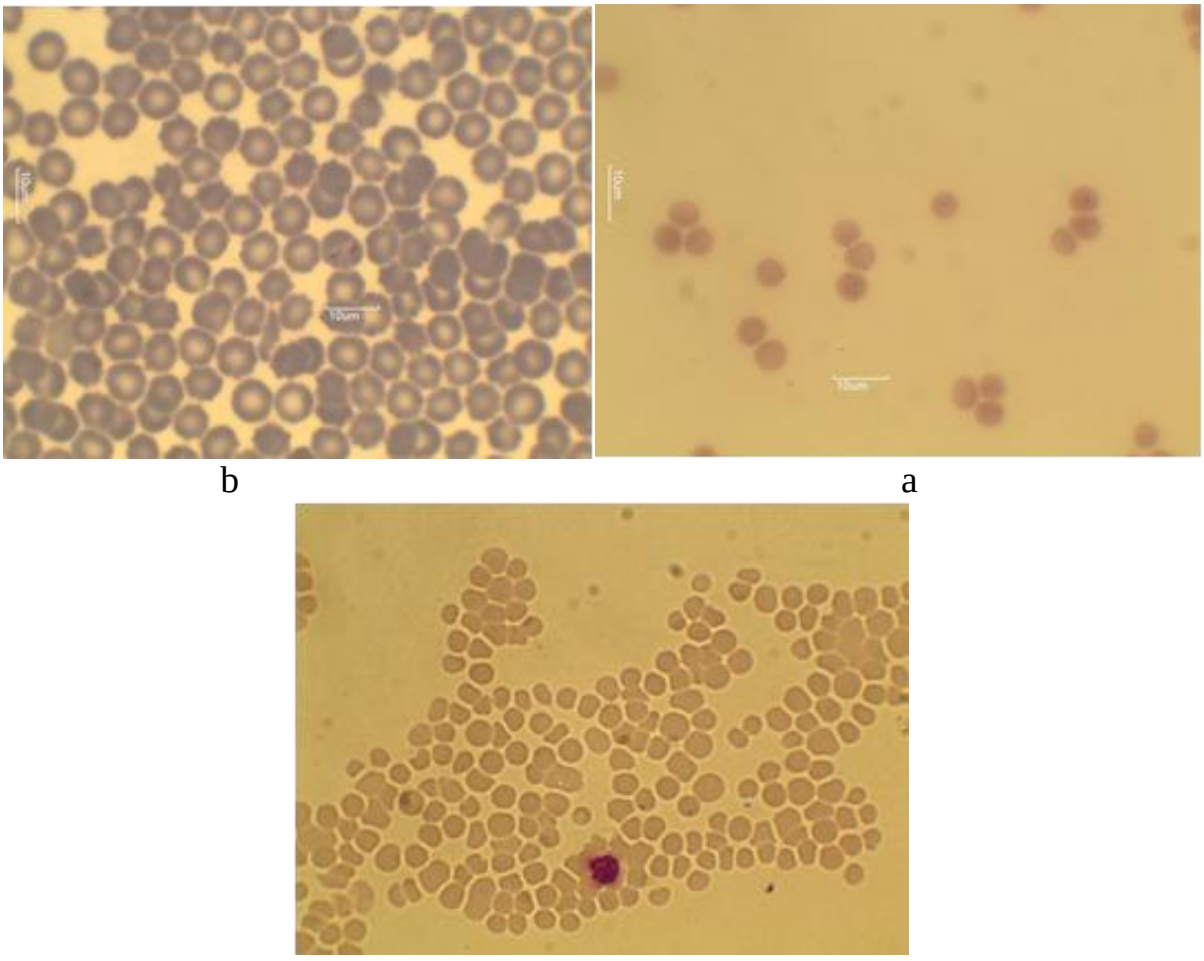
بر طبق نتایج به دست آمده بیشترین موارد آلودگی به انگل خونی مربوط به *تیلریا* بود که از ۲۱۰ رأس گاو مشکوک به زردی ۷۶ مورد (۳۶درصد) آلودگی مشاهده شد و کمترین میزان آلودگی مربوط به *بابزیا* بود که ۱۳ مورد(۶ درصد) مشاهده گردید. همچنین در این مطالعه آلودگی توأم *تیلریا* و *آناپلاسما* ۱۷ مورد (۸ درصد) مشاهده شد و آلودگی آناپلاسما ۲۱ مورد (۱۰ درصد) مشاهده شد.

در مطالعه‌ای که توسط Chaudhry و همکاران در کشور پاکستان بر روی ۱۰۰ گاو انجام گردید، ۲۹ درصد آلوده به *بابزیا* بودند که از این میزان ۱۱ درصد مربوط به آلودگی *بابزیا بویس* و ۱۸ درصد آلوده به *بابزیا بایژمینا* بودند (۲). در مطالعه دیگر در پاکستان با استفاده ار تکنیک PCR، ۱۰۰ نمونه خون گاو از نظر آلودگی به *بابزیا* و *تیلریا* مورد آزمایش قرار گرفت. در این بررسی آلودگی به *تیلریا* آنولاتا در ۳۶ راس گاو، *بابزیا بایجمینا* در ۱۳ راس گاو و *بابزیا بویس* در ۷ رأس گاو تعیین گردید (۳).

در یک بررسی دیگر توسط ضیاپور و همکاران در سال ۲۰۰۸ که روی گاو و گوسفند و بز مشکوک به *بابزیا* در استان مازندران بر اساس تهیه گسترش خون صورت گرفته، نتایج حاصل نشان داد که ۱۸/۳ درصد گاوها، ۱۶/۳ درصد گوسفندان و ۲۲/۲۷ درصد بزها آلوده به *بابزیا* بودند (۸).

در بررسی دیگری که توسط Silva و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از روش‌های سرولوژی و Nested-PCR جهت تشخیص *بابزیا بایژمینا* و *بابزیا بویس* در کشور پرتغال انجام شد، از ۴۰۶ نمونه مشکوک به علائم *بابزیوزیس* گاوی ۷۹ درصد به *بابزیا* بویس و ۵۲ درصد به *بابزیا بایژمنیا* آلوده بودند (۷).

در یک مطالعه مولکولی، نعمان در سال ۱۳۹۱ آلودگی به *تیلریا* در ۲۳/۹ درصد و بدون آلودگی به *بابزیا* را در گاوهای شیری در استان اصفهان تعیین نمود (۴).



b a

c

شکل ۱- انگل *بابزیا* (a) ، انگل *تیلریا* (b) ، انگل آناپلاسما (c)

عزیزی و همکاران در سال ۱۳۸۶، ۱۴۰ رأس گاو بالای یکسال را در شهرکرد از نظر آلودگی به *تیلریا* مورد بررسی قرار دادند و میزان آلودگی به *تیلریا آنولاتا* را با روش PCR به میزان ۴۰ درصد تعیین نمودند (۱).نتایج حاصله از این بررسی نشان داد که آلودگی به انگل‌های خونی در گاوهای شهرستان تربت جام نسبتاً زیاد می‌باشد، لذا لازم است مطالعات تکمیلی در این زمینه انجام گرفته و راهکارهای مناسبی در رابطه با پیشگیری و کنترل این بیماری ارائه گردد.

سپاسگزاری

از زحمات کلیه همکاران آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه آزاد بابل سپاسگزاری می‌نمایم.

References

1.Azizi H, Shiran B, Farzaneh Dehkordi A, Salehi F, Taghadosi C. Detection of theileria annulata by PCR and its comparison with smear method in native carrier cows. Biotech. 2008; 7(3): 574-577. [In Persian].

2. Chaudhry ZI, Suleman M, Younus M, Aslim A. Molecular detection of babesia bigemina and babesia bovis in crossbred carrier cattle through

PCR. Pakistan J Zool. 2010; 42:201-204.

3. Durrani AZ, Kamal, N. Identification of ticks and detection of blood protozoa in friesian cattle by polymerase chain reaction test and estimation of blood parameters in district kasur, pakistan. Trop Anim Health Prod. 2010; 40: 441-7

4. Noaman V. Molecular study on theileria and Babesia in cattle from Isfahan province, central Iran. J Parasit Dis. 2010. [In Persian].

5. Radostis OM, Gay CC, Hinchliff K.W, constable P.D. Veterinary Medicine. W.B. Saunders, London. 2007; 1483- 1530.

6. Ranjbar Bahadori Sh. Shamshadi B. Veterinary Parasitology. IAUG; 2011. [In Persian].

7. Silva G. First survey for babesiabovis and babesia bigemina in fection in cattle from central and southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. Vet. Parasitol. 2009; 166:66-72.

8. Ziapour SP, EsFandiari B, Yossefi MR. Study of the prevalence of boesiosis in domesticated animals with suspected signs in Mazandaran province, north of Iran, during 2008. J Anim Vet Adv. 2011; 10: 712-714. [In Persian].

Prevalence of blood parasites in Cattle in Torbat Jam city during 2014

Jafar Hossienzadeh marzenaki[*1], Mohammad Reza Youssefi[2], Moien Mirhezari[3], Abdulhani Shojae[3]

1- Member of the young researchers club, Islamic Azad University, Babol
2- Department of Veterinary Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol
3- Graduated Student, Islamic Azad University, Babol

Receive: June 14, 2018; Revise: July 11, 2018; Accept: September 6, 2018

Summary

Protozoan parasites of Pyroplasma, due to the illness and death of domestic animals, and the importance of the transfer of some of its genus and species to humans, cause many economic and health damages around the world. Diseases caused by Theileria and Babesia every year in different parts of our country during spring and summer seasons with the beginning of the activity season of chigger, even in early autumn, are prevalent in domestic animals. The purpose of this study was to determine the prevalence of blood parasites in cows suspected of being infected with jaundice in Torbat Jam city. This study was conducted in spring and summer of 2015 on 210 cows suspected of being yellow fevered in this city. After the clinical examination and observation of clinical signs, blood samples from the vein were developed to examine the parasites. The blood spread was stained with Giemsa color and was studied by optical microscope. The results showed that 36% of the studied cows were infected with Theileria, 6% were infected with Babesia, 10% were infected with Anaplasma, and 8% wereinfected Theileria and Anaplasma. Therefore, in view of the presence of blood parasites in the cows of the region and the importance of arthropods in their transmission, it is possible to combat these arthropods in order to control the above-mentioned contaminations, in addition to treating suspected contaminated animals.

Keywords: *Blood parasites, Cattle, Torbat Jam city*

تعیین عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از اورام پستان گاو

سپیده کریمی[۱]، حسن ممتاز*[۲]

۱- دانش آموخته ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

دریافت مقاله: ۲ تیر ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۵ تیر ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ۱۳۹۷

چکیده

ورم پستان گاو یکی از بیماری‌های شایع در گله گاوهای شیری است که توسط عوامل عفونی مختلفی از جمله کلبسیلا پنومونیه ایجاد می‌شود. مطالعه حاضر با هدف ردیابی این باکتری در موارد اورام پستان بالینی و تحت بالینی در گاو و بررسی عوامل بیماری‌زایی این باکتری انجام شد. درمجموع ۱۳۰ نمونه شیر از گاوهای شیری مبتلا به اورام پستان در گاوداری‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری اخذ و پس از کشت میکروبی و تایید مولکولی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده، حضور شایع‌ترین عوامل حدت در این ایزوله‌ها به روش PCR ارزیابی شد. از ۱۳۰ نمونه شیر مورد آزمایش، تعداد ۳۰ نمونه (۱۵/۳۸ درصد) آلوده به کلبسیلا پنومونیه بودند که در این ایزوله‌ها اکثر عوامل حدت در بیماری‌زایی جرم ردیابی شد طوری که ژن‌های fimH و papC با فراوانی ۹۰ و ۶۵ درصد شایع‌ترین و ژن focDE/sfa با حضور ۱۵ درصدی نادرترین ژن حدت ردیابی شده در این ایزوله‌ها بود. حضور انواع فاکتورهای حدت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نشان‌گر دخالت مستقیم این عوامل دربیماری‌زایی باکتری بوده و لازم است جهت شناسایی بیماری‌زا بودن کلبسیلا توزیع حضور عوامل حدت مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *استان چهارمحال و بختیاری، فاکتورهای حدت، کلبسیلا پنومونیه، ورم پستان گاو*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: hamomtaz@iaushk.ac.ir

مقدمه

ورم پستان گاو مسئول زیان‌های عمده اقتصادی در مزارع پروش گاو شیری در سراسر جهان است که خسارات ناشی از آن مربوط به کاهش تولید شیر، افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی و افزایش میزان مرگ و میر می‌باشد (۱). علاوه بر این، ورم پستان می‌تواند تهدیدی برای سلامت انسان باشد و عوامل مولد آن در قالب بیماری‌های زئونوز یا به شکل مسمومیت غذایی در انسان بروز پیدا کنند(۳، ۲). علاوه بر استافیلوکوک‌ها که شایع‌ترین عامل ایجاد ورم پستان گاو هستند، کلی‌فرم‌ها، انتروکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها نیز اغلب از گاوهای مبتلا به ورم پستان جدا می‌شوند (۵، ۴). باکتری‌های گرم منفی به عنوان پاتوژن‌های مولد ورم پستان محیطی شناخته شده‌اند. انتقال باکتری‌های گرم منفی از غدد پستان گاوهای آلوده به گاوهای غیرعفونی به واسطه عوامل محیطی انجام می‌شود. کلی‌فرم‌ها به عنوان اصلی‌ترین عوامل مسبب ورم پستان محیطی بسیاری از زیستگاه‌های موجود در محیط گاو را اشغال می‌کنند. *اشریشیاکلی* جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش حیوانات خون‌گرم است. گونه‌های *کلبسیلا* و *انتروباکتر* از خاک، غلات، آب و روده حیوانات جدا می‌شوند . طول دوره ورم پستان کلی‌فرمی در بیش از ۵۰ درصد موارد حدود ۱۰ روز است ولی امکان طولانی شدن دوره بیماری به بیش از ۳۰ روز نیز وجود دارد. ورم پستان کلی‌فرمی در هر مرحله‌ای از زندگی گاو می‌تواند پستان را مبتلا نماید (۶). یکی از مهم‌ترین عوامل مولد ورم پستان کلی‌فرمی در گاو، *کلبسیلا پنومونیه* است. *کلبسیلا پنومونیه* یک پاتوژن فرصت‌طلب در انسان است که عمدتاً بیماران مبتلا به نقص ایمنی یا افراد سالمند به آن مبتلا می‌شوند. اخیراً گزارش شده است که سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با حدت زیاد قادر به ایجاد عفونت‌های کشنده در افراد سالم است (۷). *کلبسیلا پنومونیه* از حدت بسیار بالایی برخوردار است زیرا به طور طبیعی مجموعه ای از مواد شیمیایی محلول مانند ۱و۳ پروپرانیدول، ۲و۳ بوتانیدول و ۳ هیدروکسی پروپیونیک اسید را تولید می‌کند. مجموعه‌ای از عوامل از جمله پیلی، کپسول پلی‌ساکاریدی و لیپوپلی‌ساکارید دیواره باکتری در بیماری‌زایی این باکتری دخالت دارند (۸).

علی‌رغم مطالعات مختلف انجام شده روی بیماری‌زایی این باکتری در عفونت‌های انسانی، مطالعه جامعی در خصوص نقش عوامل حدت در بیماری‌زایی *کلبسیلا پنومونیه* در موارد ورم پستان گاو انجام نشده است. با توجه به حضور انواع عوامل حدت در *کلبسیلا پنومونیه* و نقش آن‌ها در پاتوژنز این باکتری، مطالعه حاضر باهدف بررسی الگوی ویرولانس در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان گاو انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با هدف تعیین عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان گاو به شرح زیر انجام گرفت:

نمونه گیری: ضمن هماهنگی با اداره دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری و مراجعه به فارم‌های صنعتی در سطح استان تعداد ۱۳۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به اورام پستان بالینی و تحت بالینی دارای نتیجه + تا + + + در آزمایش CMT اخذ گردید. نمونه‌های شیر در حجم ۲۰ میلی‌لیتر در ظروف استریل و از دو شش میانی پستان بعد از ضد عفونی کردن سرپستانک گرفته شد. نمونه‌های اخذ شده در مجاورت یخ و در اسرع وقت به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید.

کشت و جداسازی باکتری کلبسیلا پنومونیه: نمونه‌های شیر ابتدا در محیط غنی‌کننده (TSBمرک –آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند سپس به صورت خطی در محیط جامد (EMB مرک -آلمان) کشت شدند. پرگنه‌های موکوئیدی لاکتوز مثبت انتخاب و پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم منفی درآن‌ها در محیط TSI و اوره کشت و آزمایش IMViC، روی آن‌ها انجام شد. پرگنه‌هایی که دارای واکنش + + – – در آزمایش IMViC، واکنش اسید/اسید در محیط TSI و اوره آز منفی بودند به عنوان پرگنه‌های *کلبسیلا پنومونیه* انتخاب شدند (۹). ایزوله‌های جداشده به منظور مطالعات بعدی در محیط TSB کشت و نگهداری شدند.

آزمایش‌های مولکولی: جهت استخراج DNA ژنومی از ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* رشد یافته در محیط TSB از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. برای این کار مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط TSB در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA جدا و در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان گاو (۱۲)

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر('3-'5)	اندازه محصول (جفت باز)
afa/draBC	afa1 afa2	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750
cnf1	cnf1 cnf2	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498
cnf2	cnf2a cnf2b	AATCTAATTAAAGAGAAC CATGCTTTGTATATCTA	543
csgA	M464 M465	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	200
cvaC	ColV-CF ColV-CR	CACACACAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680
fimH	FimH F FimH R	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508
fyuA	FyuA f FyuA R	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880
ibeA	ibe10 F fibe10 R	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170
iutA	AerJ F AerJ R	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300
kpsMT II	kpsII F kpsII R	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272
PAI	RPAi F RPAi R	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	930
papC	pap1 pap2	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328
PapG II, III	pGf pGr	CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	1070
sfa/focDE	sfa1 sfa2	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410
traT	TraT F TraT R	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290

جهت تأیید قطعی وجود ایزوله‌های جداشده آزمایش PCR، با استفاده از زوج پرایمرهای

ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT و

TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC،

جهت ردیابی ژن ITS۱۶ s-23s، انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. وجود قطعه ۱۳۰ جفت بازی تکثیر یافته در این واکنش نشان‌گر وجود *کلبسیلا پنومونیه* در ایزوله‌های مورد مطالعه بود (۱۱).

جهت ردیابی شایع‌ترین عوامل حدت در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از موارد اورام پستان از زوج‌های پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ به روش PCR استفاده شد:

بسته به اندازه قطعه مربوط به هریک از ژن‌های فوق واکنش PCR در ۳ واکنش جداگانه طبق اجزاء و شرایط ذکر شده در جدول ۲ انجام شد:

جدول ۲- شرایط واکنش PCR جهت ردیابی عوامل حدت در *کلبسیلاپنومونیه*

شرایط PCR (حجم=۵۰ میکرولیتر)	برنامه حرارتی	نام ژن
۵ میکرولیتر =PCR buffer 10X ۱/۵ میلی مول =Mgcl2 ۲۰۰ میکرومول =dNTP mix پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۲۵ واحد ۴ میکرولیتر = DNA	۱ سیکل ۴ دقیقه ---------- **95°c** ۳۰ سیکل ۵۰ ثانیه ---------- **95°c** ۶۰ ثانیه ---------- **58°c** ۴۵ ثانیه ----------**72°c** ۱ سیکل ۸ دقیقه ----------**72°c**	afaldraBC , Cnd1 , CSgA , CVaC , iutA , fyu A
۵ میکرولیتر = PCR buffer 10X ۲ میلی مول =Mgcl2 ۱۵۰ میکرومول =dNTP mix پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۷۵میکرومول آنزیم پلی مراز = ۱/۲۵ واحد ۴ میکرولیتر = DNA	۱ سیکل ۶ دقیقه ---------- **94°c** ۳۴ سیکل ۵۰ ثانیه ---------- **95°c** ۷۰ ثانیه ---------- **58°c** ۵۵ ثانیه ----------**72°c** ۱ سیکل ۱۰ دقیقه ----------**72°c**	Cnfz kpSMTIT PAI PaPC
۵ میکرولیتر = PCR buffer 10X ۲ میلی مول =Mgcl2 ۲۰۰ میکرومول =dNTP mix پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۵ واحد ۴ میکرولیتر = DNA	۱ سیکل ۴ دقیقه ---------- **95°c** ۳۴ سیکل ۶۰ ثانیه ---------- **94°c** ۴۵ ثانیه ---------- **56°c** ۶۰ثانیه ----------**72°c** ۱ سیکل ۱۰ دقیقه ----------**72°c**	fim H ibe A papG $\widehat{\text{II}}$, $\widehat{\text{III}}$ spal fac DE tra T

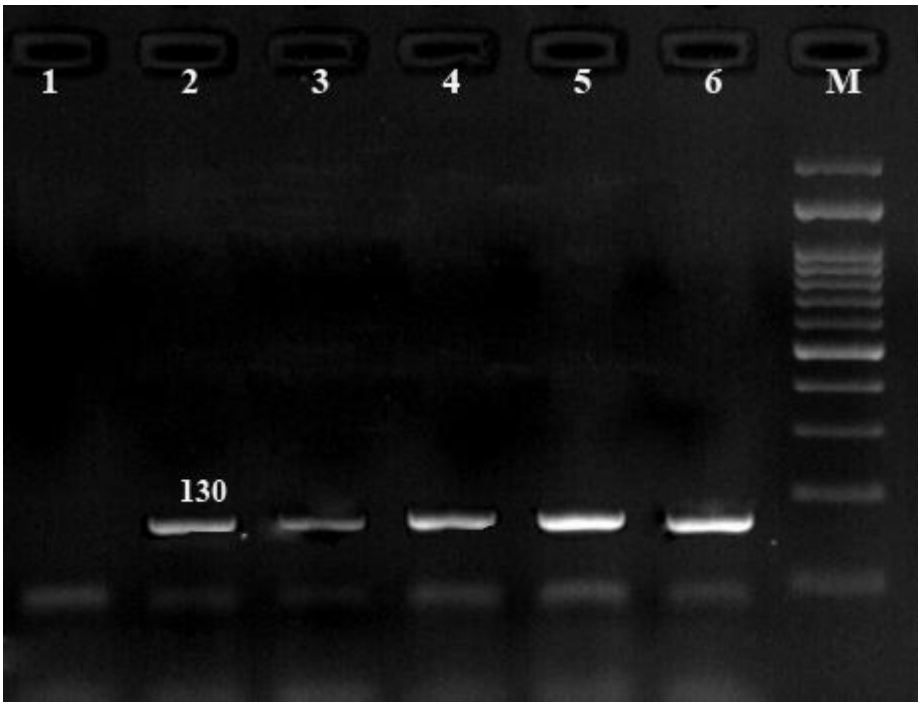
جهت ارزیابی محصول PCR در هرکدام از روش‌های فوق از الکتروفورز محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگاروز استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت حدوداً ۶۰ دقیقه انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز با انتقال ژل به دستگاه قرائت‌کننده ژل(Gel Documentation)، نتیجه مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت آنالیز نتایج حاصل از انجام آزمایش و تعیین ارتباط بین فراوانی آلودگی به *کلبسیلاپنومونیه* و حضور انواع عوامل حدت در ایزوله‌های جدا شده از نرم‌افزار آماری SPSS ver. 18 و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق

فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

از ۱۳۰ نمونه شیر اخذ شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی تعداد ۲۰ نمونه (۱۵/۳۸درصد) آلوده به *کلبسیلاپنومونیه* بودند. ایزوله‌های جداشده در کشت میکروبی با ردیابی ژن S-23SITS۱۶ در آنها به روش PCR تائید شدند که ژل حاصل از ردیابی این ژن در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن S-23SITS۱۶ در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان در گاو (ستون =Mمارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱= نمونه کنترل منفی، ستون ۲= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های ۳-۶= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۳۰ جفت بازی DNA)

در ایزوله‌های جداشده حضور شایع‌ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت ارزیابی شد که نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

همان‌گونه که در جدول فوق مشهود است ۲۰ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* مورد مطالعه واجد اکثر عوامل حدت بوده و در این میان ژن‌های *fimH*، *PapC* با فراوانی ۹۰ و ۶۵ درصد شایع‌ترین و ژن *Sfa/focDE* با فراوانی ۱۵ درصد نادرترین ژن‌های حدت ردیابی شده در ایزوله‌های مورد مطالعه بودند.

در تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از جدول فوق، اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور ژن‌های *cvaC*، *csgA*، *fyuA*، *ibeA*، *iutA*، *Sfa/focDE* با ژن‌های *fimH*، *kpsMTII*، *PapC*، *TraT*، *rpmA* در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p= 0.038) مشاهده شد.

ژل حاصل از ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت مورد مطالعه در شکل ۲ آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

ورم پستان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در گاوهای شیری است که زیان‌های اقتصادی زیادی به ویژه در درمان گاوهای مبتلا ایجاد می‌کند. متداول‌ترین فرم ورم پستان، فرم تحت‌بالینی بیماری است که به علت نداشتن علایم ظاهری قابل

تشخیص نبوده و بیشترین خسارت را به صنعت دامپروری وارد می‌کند (۱۴، ۱۳).

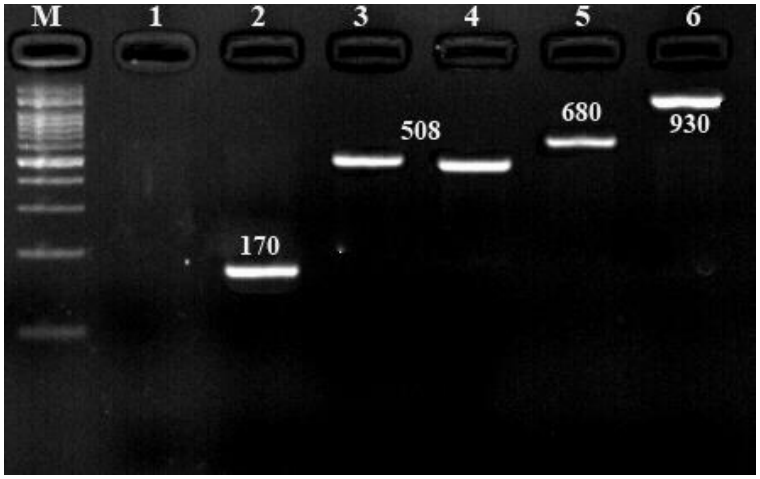
مطالعات مختلفی روی اشکال ورم پستان و عوامل مولد آن در گاوهای شیری در نقاط مختلف دنیا انجام شده و عوامل باکتریایی مختلف در گاوهای مبتلا به ورم پستان گزارش شده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین فروانی ورم پستان‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

کلبسیلاپنومونیه یکی از شایع‌ترین عوامل مواد ورم پستان کلی فرمی در گاو است که در چند ساله اخیر اهمیت زیادی حتی بیشتر از *اشریشیاکلی* پیدا کرده است (۱۵).

Schukken و همکاران (۲۰۰۸) نسبت به افزایش حضور باکتری‌های *کلبسیلا* و *انتروباکتر* در مقایسه با *E. coli* هشدار داده است (۱۶). در مطالعه ما فراوانی ورم پستان‌های کلبسیلایی معادل ۱۵/۳۸ بود. در یک بررسی که در بازه‌ی زمانی ۱۰۰ روز اول پس از زایمان بر روی ۱۵۳ گاو مبتلا به ورم پستان بالینی انجام شد، ۴۰/۵ درصد از موارد ورم پستان از نوع کلی‌فرمی بودند که در ۴ مورد (۲/۶ درصد) *کلبسیلاپنومونیه* جدا گردید (۱۷).

جدول ۳- توزیع ژن‌های کدکننده عوامل حدت در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان در گاو

Gene	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	جمع کل
afa/draBC	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	۸
Cnf1	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	۱۱
Cnf2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	۸
csgA	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	۷
cvaC	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	۶
fimH	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	۱۸
fyuA	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	۶
ibeA	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	۶
iutA	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	۶
kpsMTII	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	۱۲
Pal	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	۱۰
PapC	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	۱۳
papG II,III	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	۹
Sfa/focDE	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	۳
TraT	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	۱۲
rpmA	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	۱۲
WcaG	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	۱۰



شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان در گاو (ستون =M مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۲-۶= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۷۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن ibeA، قطعه ۵۰۸ جفت بازی DNA مربوط به ژن fimH، قطعه ۶۸۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن cvaC، قطعه ۹۳۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن PAI)

در تحقیق Shpigel و همکاران (۱۹۹۷) نیز کلی فرم‌ها با نرخ حضور ۶۰/۲ درصد نسبت به استرپتوکوک‌های محیطی، استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی و سایر گونه‌های غیر باکتریایی، بیشترین فراوانی را داشتند (۱۸). علت تفاوت در فراوانی حضور *کلبسیلا پنومونیه* در موارد ورم پستان بالینی یا تحت بالینی در مناطق مختلف به سطح بهداشت هر منطقه وابسته است و امروزه با پیشرفت سطح بهداشت گاوداری‌ها و رعایت اصول صحیح نگهداری و شیردوشی از دام، شیوع عوامل محیطی مولد ورم پستان از جمله *کلبسیلا پنومونیه* کاهش یافته است.

بروز ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در سه مرحله شامل ورود باکتری به داخل مجرای سر پستانک، چسبیدن باکتری به اپی‌تلیوم مجرای پستان و استفاده از مواد غذایی داخل پستان و نهایتاً تهاجم بافتی ایجاد می‌شود (۱۹). هر کدام از مراحل فوق با دخالت یک یا تعدادی از فاکتورهای حدت در باکتری شکل می‌گیرد.

به دنبال ورود باکتری چسبیدن باکتری به اپی‌تلیوم کانال‌های غدد پستانی با دخالت عوامل فیمبریال از جمله محصولات ژنی *papC, fimH, papG* انجام می‌شود. در مطالعه ما فراوانی حضور ژن‌های فوق در ۲۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد ورم پستان گاو به ترتیب ۹۰، ۶۵ و ۴۵ درصد بود و دو ژن *fimH* و*papC* به‌عنوان شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت شناسایی شدند. این یافته با مطالعات قبلی از جمله مطالعه Paulin-Curlee و همکاران (۲۰۰۷) هم راستا است و در مطالعه فوق نیز ژن *fimH* با فراوانی حضور ۸۶/۹ درصد شایع‌ترین ژن کدکننده عوامل حدت در *کلبسیلا پنومونیه* گزارش شده است (۲۰).

از اصلی‌ترین عوامل غذایی مورد نیاز باکتری جهت رشد در پستان، آهن است و باکتری‌های پاتوژن با دارا بودن عوامل جذب‌کننده آهن یا تولید سیدروفور، آهن مورد نیاز خود را تأمین می‌کنند. از جمله ژن‌های دخیل در تولید ترکیبات جذب‌کننده آهن، ژن‌های *kpsMTII*، *ibeA* و*iutA* هستند که در مطالعه حاضر ژن‌های فوق با فراوانی ۶۰، ۳۰، ۳۰ درصد ردیابی شدند.

در مطالعه Osman و همکاران (۲۰۱۴) ژن‌های حدت دخیل در پاتوژنز *کلبسیلا پنومونیه* ارزیابی

شـدند و ژن *kpsMTII* بـا فراوانـی ۳۶/۷ درصـد بـه عنوان اصلی‌ترین ژن کدکننده آیرون کلاتور گزارش شد (۲۱).

اصلی‌ترین فاکتور حدت در *کلبسیلا پنومونیه* که با قدرت تهاجمی باکتری در ارتباط است، تولید کپسول پلی‌ساکاریدی است که با دخالت نواحی ژنی cps در ژنوم باکتری ایجاد می‌شود. حضور ژن‌های cps در ارتباط با بیوسنتز کپسول پلی‌ساکاریدی در *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. در این حالت ایجاد کلنی‌های موکوئیدی به دلیل وجود ژن‌های کدشونده کروموزومی rcs و مقاومت در برابر عوامل فاگوسیتوزی و سایر عوامل باکتریسیدال سرم به‌واسطه وجود ژن‌های کدشونده پلاسمیدی rpmA می‌باشد (۲۲).

سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در محیط کشت جامد تولید کلنی‌های بزرگ موکوئیدی می‌کنند. چسبندگی زیاد در این سویه‌ها به دلیل حضور چندین ژن از جمله ژن‌های megA، rmpA می‌باشد (۲۳).

در بسیاری از گزارش‌ها، نشان داده شده که ژن *rmpA* به عنوان عامل بیماری‌زا نقش دارد (۲۲). در حالی که مطالعات زیادی بر روی ژن *wcaG* به عنوان یک عامل حدت در مجموعه ژنی cps انجام نشده است. در مطالعه ما ژن‌های *rmpA* و *wcaG* با شیوع ۶۰ و ۵۰ درصدی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان ردیابی شدند که نشانگر دخالت این ژن‌ها به عنوان عوامل حدت اصلی در تولید کپسول پلی‌ساکاریدی و مقاومت *کلبسیلاپنومونیه* به فاگوسیتوز و عوامل باکتریسیدال سرم در پستان می‌باشد.

تهاجم بافتی به دنبال چسبیدن باکتری به سطوح اپی‌تلیال و مقاومت در برابر بیگانه‌خواری با تولید عوامل بیماری‌زای مختلف از جمله محصولات ژنی *cnf1* و*cnf2* شکل می‌گیرد. پروتئین‌های تولیدی از این ژن‌ها به کلونیزه شدن باکتری در اپی‌تلیوم پستان و تکثیر آن کمک می‌کنند و در مطالعه ما به ترتیب در ۵۵ و ۴۰ درصد از ایزوله‌های جدا شده از موارد اورام پستان ردیابی شدند. مطالعه انجام شده توسط Kanevsky-Mullarky و همکاران (۲۰۱۴) نشانگر صحت یافته فوق بود و در مطالعه فوق نیز ژن‌های *cnf1* و *cnf2* به عنوان عوامل اصلی کلونیزه شدن باکتری معرفی شدند (۲۴). در مجموع نتایج حاصل از مطالعه ما نشانگر فروانی نسبتاً بالای *کلبسیلا پنومونیه* در ایجاد ورم پستان‌های کلی‌فرمی درگاو بود و نشان داد که بیماری‌زایی باکتری با دخالت انواع مختلف فاکتورهای حدت شکل می‌گیرد و استفاده از آزمایش PCR به عنوان یک آزمایش دقیق و حساس جهت ردیابی ژن‌های حدت می‌تواند در شناسایی سریع باکتری‌های پاتوژن و برنامه‌ریزی صحیح جهت کنترل موارد اورام پستان در گاو و مدیریت صحیح گاوداری‌ها مفید باشد.

References

1- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? Vet J. 2006; 171(3):398-407.

2- Blum S, Heller ED, Krifucks O, Sela S, Hammer-Muntz O, Leitner G. Identification of a bovine mastitis Escherichia coli subset. Vet Microbiol. 2008; 132(1-2):135-48.

3- Fernandes JB, Zanardo LG, Galvão NN, Carvalho IA, Nero LA, Moreira MA. Escherichiacoli from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. J Vet Diagn Invest. 2011; 23(6):1146-52.

4- Smulski S, Malinowski E, Kaczmarowski M,
Lassa H. Occurrence, forms and etiologic agents of mastitis in Poland depending on size of farm. Med Weter. 2011; 67(3):190-3.

5- Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of

the potential role of microbial biofilms. Pathog Dis. 2016; 74(3). Pii: ftw006.

6- Hogan JS, Gonzalez RN, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW, *et al.* Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison, Wisconsin, USA: National Mastitis Council. Inc.; 1999. P.85-91.

7- Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumonia*e: a new and dangerous breed. Virulence. 2013; 4(2):107-18.

8- Kang Y, Tian P, Tan T. Research advances in the virulence factors of *Klebsiella pneumonia*e--A review. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2015; 55(10):1245-52.

9- Amos DB, Joklik WK, Wilfert CM, Willett HP. Zinsser microbiology. 20nd ed. Norwalk: Conn. Appleton Lange; 1992. P.569-76.

10- Shahriari F, Imamjomeh A. PCR, Introduction to bio techniques. 1nd ed. Mashhad: Imam Reza University; 2002. P.56-9. [In Persian].

11- Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). Feyz. 2017; 21(1):74-82. [In Persian].

12- Momtaz H, Jamshidi A. Shiga toxin producing Escherichia coli isolated from chicken meat in Iran: serogroups, virulencefactors, and antimicrobial resistance properties. Poult Sci. 2013; 92(5):1305-13.

13- Dobbins CN Jr. Mastitis losses. J Am Vet Med Assoc. 1977; 170(10 Pt 2): 1129-32.

14- Losinger WC. Economic impacts of reduced milk production associated with an increase in bulk-tank somaticcell count on US dairies. J Am Vet Med Assoc. 2005; 226(10):1652-8.

15- Mohammad Sadegh M, Askari Badouei M, Gorjidooz M, Daneshvar M, Koochakzadeh A. A Study on the clinical Coliform mastitis of Holstein cows on Garmsar suburban dairy farms. J Vet Microbiol. 2012; 8(2):137-49. [In Persian].

16- Schukken YH, Barkema HW, Lam TJ, Zadoks RN. Improving udder health on well managed farms: mitigating the perfect storm. In: International Conference on the Mastitis Control from Science to Practice. The Haque 2008; 10(2):21-35.

17- Bradley AJ, Green MJ. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. J Dairy Sci. 2000; 83(9):1957-65.

18- Shpigel NY, Chen R, Winkler M, Saran A, Ziv G, Longo F. Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. Res Vet Sci. 1994; 56(1):62-8.

19- Hassani Tabatabaie AM, Firouzi R. Animal diseases due to bacteria. 3nd ed. Tehran: Tehran University; 2016. P. [In Persian].

20- Paulin-Curlee GG, Singer RS, Sreevatsan S, Isaacson R, Reneau J, Foster D, *et al*. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumonia*e in dairy cows. J Dairy Sci. 2007; 90(8):3681-9.

21- Osman KM, Hassan HM, Orabi A, Abdelhafez AS. Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumonia*eisolated from buffalo and cow mastitic milk. Pathog Glob Health. 2014; 108(4):191-9.

22- Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumonia*e using capsular type-specific, variable-number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol. 2010; 59(Pt 5):541-7.

23- Tavakol M, Momtaz H. Molecular characterization of serotypes and capsular virulence genes in cps gen group of *Klebsiella pneumonia* isolated from Tehran hospitals. J Microbiol World. 2017; 10(1):17-25. [In Persian].

24- Kanevsky-Mullarky I, Nedrow AJ, Garst S, Wark W, Dickenson M, Petersson-Wolfe CS, *et al.* Comparison of virulencefactors in *Klebsiella pneumonia*e strainsassociated with multiple or single cases of mastitis. J Dairy Sci. 2014; 97(4):2213-8.

Detection of virulence factors in *Klebsiella pneumonia* strains isolates from bovine mastitis

Sepideh Karimi[1], Hassan Momtaz*[2]

1- Post graduated of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2- Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: June 23, 2018; Revise: July 16, 2018; Accept: September 11, 2018

Summary

Bovine mastitis is one of the epidemic diseases in dairy cattle that is created by various infectious agents. The aim of this study was tracking of these bacteria in the cases such as bovine subclinical and clinical mastitis and studying of virulence factors of these bacteria. Overall, 130milk samples were collected from dairy cattle's in the Chaharmahal and Bakhtiyari Province. The samples were affected with mastitis and were isolated and went through microbial culture and molecular confirmation of Klebsiella pneumonia strains. Finally, presence of the most prevalent virulence factors in these strains was detected by PCR method. Of the 130milk samples examined, 30 samples were positive (15.38%) to Klebsiella pneumonia. Of these strains, most of the virulence factors were detected in these bacteria, so that fimH and papA genes by excess of 65and 90% had the highest prevalence and sfa/focDE gene with 15% presence had the lowest rate of virulence gene in these isolates. Presence of all kinds of virulence factors in the Klebsiella pneumonia isolates indicated direct intervention of these factors in pathogenicity of bacteria. In order to detect Klebsiella pneumonia pathogen, we must study the presence distribution of virulence factors.

Keywords: *Bovine mastitis, Chaharmahal and Bakhtiyari, Klebsiella pneumonia, Virulence factors*

ارزیابی میزان شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از تخم‌مرغ بومی و صنعتی

زهرا حصیری[۱]، ابراهیم رحیمی*[۱]، حسن ممتاز[۱]، آرمان روح افزا[۲]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد
۲- دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد

دریافت مقاله: ۶ تیر ۱۳۹۷، بازنگری: ۳ مرداد ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۱ شهریور ۱۳۹۷

چکیده

گونه‌های اسینتوباکتر دارای انتشار وسیعی بوده و همچنین فرضیاتی در خصوص انتقال این باکتری از مواد غذایی به انسان نیز وجود دارد. تخم‌مرغ همواره در زمره پرمصرف‌ترین و غنی‌ترین منابع غذایی بشر به‌شمار می‌رود. این مطالعه، به منظور ارزیابی شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی اسینتوباکتر بومانی در تخم‌مرغ بومی و صنعتی انجام شد. در این راستا، مجموع ۱۰۰ نمونه تخم‌مرغ بومی و صنعتی از شهرستان‌های استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. از پوسته و محتویات آنها جمعاً ۲۰۰ نمونه تهیه و مطابق روش استاندارد، پس از کشت در محیط‌های اختصاصی از نظر حضور اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های مشکوک به منظور تعیین هویت قطعی تحت آزمون PCR قرار گرفتند. از ۲۰۰ نمونه پوست و محتویات تخم‌مرغ، ۲ نمونه (۱ درصد) آلوده به اسینتوباکتر بومانی تشخیص داده شدند. پس از انجام تست آنتی‌بیوگرام مشخص شد که هر دو ایزوله مورد آزمون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین مقاوم، نسبت به تری‌متوپریم سیپروفلوکساسین یک ایزوله مقاوم و یک ایزوله نیمه‌حساس و نسبت به کاربنسیلین یک ایزوله حساس و یک ایزوله نیمه‌حساس بودند. بر اساس شواهد موجود، آلودگی تخم‌مرغ به اسینتوباکتر بومانی عمدتاً از طریق عوامل محیطی و آلودگی‌های ثانویه رخ می‌دهد. عدم توجه به نکات لازم در طول پروسه تولید، عرضه، نگهداری و مصرف تخم‌مرغ می‌تواند منجر به انتقال باکتری به مصرف‌کننده گردد. لذا به نظر می‌رسد با پایش به موقع و رعایت نکات بهداشتی در کلیه مراحل فوق، می‌توان از انتقال آلودگی به انسان جلوگیری به عمل آورد.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی، تخم مرغ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: ebrahimrahimi55@yahoo.com

مقدمه

گسترش روزافزون سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، یکی از معضلات بهداشتی است که باعث شده است تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر و در دسترس در درمان این عفونت‌ها کاهش یابد (۱). *استینتوباکترها* کوکوباسیل‌های گرم منفی، غیرمتحرک، اکسیداز منفی، فرصت طلب، هوازی اجباری و معمولا کپسول‌دار هستند که توانایی تخمیر نداشته و زندگی در محیط‌های مرطوب را ترجیح می‌دهند و بر روی محیط‌های معمولی آزمایشگاهی به آسانی رشد می‌کنند. از مهم‌ترین گونه‌های این جنس، *استینتوباکتر بومانی* است که به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی از قبیل پنومونی، سپتی سمی، مننژیت، اندوکاردیت، عفونت‌های دستگاه ادراری، پوستی و زخم جراحی شناخته شده است (۲، ۳، ۴). *استینتوباکتر*بومانی به عوامل ضد میکروبی مقاومت فراوان نشان می‌دهد که این مقاومت می‌تواند ذاتی و یا از طریق به‌دست آوردن عوامل ژنتیکی مقاومت باشد. اکثر سویه‌های *استینتوباکتر بومانی* به آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، کلاولانیک اسید، پنی‌سیلین ضد استافیلوکوکی، سفالوسپوری‌های با طیف وسیع (به جز سفتازیدیم و سفپیم)، تتراسایکلین، ماکرولیدها، ریفامپین و کلرامفنیکل مقاوم هستند. مقاومت به بتالاکتامازهای غیرکارباپنمی در این باکتری به‌طور بسیار شایعی با تولید بیش از حد سفالوسپورینار همراه است. مقاومت به عوامل ضد میکروبی در میان ایزوله‌های کلینیکی در درمان عفونت‌ها اختلال ایجاد کرده و همچنین می‌تواند اثر ناخوشایندی بر روی نتایج کلینیکی و هزینه‌های درمانی بگذارد (۵ ، ۶). *استینتوباکتر بومانی* انتشار وسیعی در طبیعت داشته و در خاک، آب و زباله موجود است. همچنین گاهی از پوست و لایه‌های مخاطی و ترشحات انسان‌ها و محیط بیمارستان جدا شده است (۷). در برخی موارد گزارشاتی مبنی بر جداسازی این ارگانیسم از مواد غذایی نیز به چشم می‌خورد.

امروزه بیماری‌های منتقله از راه غذا، یکی از مشکلات اصلی بهداشتی و از عوامل خسارات اقتصادی در بین کشورهای صنعتی و غیرصنعتی به شمار می‌رود (۸). در حال حاضر با افزایش سریع جمعیت و احتیاج روزافزونی که به مواد غذایی و بالأخص مواد پروتئینی احساس می‌شود، تأمین نیازهای غذایی انسان‌ها در درجه اول اهمیت در جوامع بشری قرار گرفته است. تخم‌مرغ همواره به عنوان یک منبع پروتئین حیوانی در تغذیه انسان مورد استفاده قرار گرفته است و با توجه به اینکه فرضیاتی در خصوص حضور *استینتوباکتر بومانی* در مواد غذایی نیز وجود دارد، جداسازی این ارگانیسم از تخم‌مرغ نیز می‌تواند امری محتمل به نظر برسد.

افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح مرغداری‌ها عمدتاً موجب پیدایش مقاومت ضد میکروبی در پاتوژن‌های احتمالی موجود در گوشت و تخم‌مرغ می‌شود، که به صورت یک معضل جهانی مطرح می‌باشد (۹). توجه به این که در صورت مصرف مواد غذایی آلوده به استینتو باکتر بومانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک توسط انسان، امکان ایجاد مقاومت دارویی در شخص مصرف‌کننده نیز وجود دارد، لذا در مطالعه حاضر به ردیابی حضور *استینتوباکتر بومانی* در تخم‌مرغ بومی و صنعتی و بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه به روش مقطعی- توصیفی بوده و بدین منظور در بازه زمانی تابستان ۱۳۹۶ تا زمستان ۹۶ از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری، ۱۰۰ نمونه تخم‌مرغ، شامل ۵۰ نمونه تخم‌مرغ صنعتی و ۵۰ نمونه تخم‌مرغ بومی جمع‌آوری گردید (جدول شماره ۱). نمونه‌ها جهت بررسی میزان

آلودگی به *اسینتوباکتر بومانی* در شرایط سترون به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. از پوسته و محتویات آنها جمعاً ۲۰۰ نمونه تهیه و از نظر حضور *اسینتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور، ابتدا توسط سواپ استریل از سطح پوسته تخم‌ها نمونه‌گیری انجام و به محیط نوترینت براث انتقال یافت. سپس، سطح تخم‌ها به وسیله اتانول ۹۶ درصد ضد عفونی و پوسته آهکی آنها با قیچی استریل شکسته شده و متعاقباً محتویات هر تخم توسط سواپ استریل مخلوط و به محیط نوترینت براث انتقال یافته و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه، توسط سواپ استریل از هر لوله، نمونه برداشت و به محیط مک‌کانکی آگار و بلاد آگار به روش خطی کشت داده و پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از رشد باکتری بر روی محیط‌های کشت و انجام رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل و کوکوباسیل‌های گرم منفی، تست اکسیداز انجام گرفت. در مرحله بعد نمونه‌های اکسیداز منفی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مانند کشت بر روی محیط مک‌کانکی آگار، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، تست سیترات و کشت بر روی محیط حاوی قند گلوکز بررسی شده و حضور *اسینتوباکتر بومانی* تشخیص داده شد. در ادامه به منظور تایید قطعی حضور این باکتری، هر نمونه به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تأیید قطعی هویت این باکتری، مطابق روش Turton و همکاران، از آزمایش PCR در حضور زوج پرایمرهای F: 5′- TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3′ و R: 5′- TGGATTGCACTTCATCTTGG-3′ استفاده شد. این ژن در دمای واسرشتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، و دمای اتصال ۵۷ درجه ۴۵ ثانیه، دمای باز شدن ۷۲ درجه ۱ دقیقه و دمای باز شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، تکثیر شد (۱۰).

در ادامه به منظور بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده، به روش دیسک دیفیوژن و مطابق روش CLSI اقدام شد. بدین ترتیب که در ابتدا سوسپانسیون باکتری‌های تعیین هویت شده، پس از انکوباسیون در ۴۷ درجه سانتی‌گراد و رسیدن به کدورت نیم مک فارلند به روش کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار طبق دستورالعمل CLSI پخش و دیسک‌گذاری انجام شد و سپس به مدت ۲۳ ساعت درانکوباتور نگهداری شده و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و با جدول CLSI مقایسه شد (۱۱). آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شامل تتراسایکلین، جنتامایسین، تری متوپریم، سیپروفلوکساسین و کاربنسیلین بود.

جدول ۱- شیوع *اسینتوباکتر بومانی* در تخم‌مرغ دام چهارمحال و بختیاری بر اساس روش PCR

نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت
پوسته تخم‌مرغ بومی	۵۰	۰
محتویات تخم‌مرغ بومی	۵۰	۰
پوسته تخم‌مرغ صنعتی	۵۰	۲ (۴ درصد)
محتویات تخم‌مرغ صنعتی	۵۰	۰
مجموع	۲۰۰	۲ (۱ درصد)

نتایج

در این مطالعه، مجموع ۱۰۰ نمونه تخم‌مرغ از نظر حضور *اسینتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه از روش کشت و PCR جهت تأیید قطعی حضور این باکتری استفاده شد، سپس مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها مورد بررسی قرار گرفت. بر پایه آزمایشات میکروبی و آزمون PCR، حضور دو باکتری (۱ درصد) *اسینتوباکتر بومانی* به تأیید نهایی رسید. هر دو ایزوله مثبت از پوسته تخم‌مرغ‌های صنعتی جدا شده (۴ درصد) و محتویات تخم‌مرغ صنعتی و نمونه‌های پوسته و محتویات تخم‌مرغ‌های بومی فاقد آلودگی گزارش شدند. نتایج وضعیت آلودگی نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

پس از تأیید حضور *اسینتوباکتر بومانی* در دو نمونه پوسته تخم‌مرغ صنعتی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به پنج آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری شده و مشخص شد که هر دو ایزوله مورد آزمون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین مقاوم، نسبت به تری‌متوپریم سیپروفلوکساسین یک ایزوله مقاوم و یک ایزوله نیمه‌حساس و نسبت به کاربنسیلین یک ایزوله حساس و یک ایزوله نیمه‌حساس بودند. جدول ۲ وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه را به طور خلاصه نشان می‌دهد.

جدول ۲- مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از تخم‌مرغ

نتیجه	آنتی‌بیوتیک				
	تتراسایکلین	جنتامایسین	تری‌متوپریم	سیپروفلوکساسین	کاربنسیلین
حساس	-	-	-	-	۵۰
نیمه حساس	-	-	۵۰	۵۰	۵۰
مقاوم	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۵۰	-
مجموع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت *اسینتوباکتر بومانی* و به اثبات رسیدن مقاومت آن نسبت به بسیاری از عوامل آنتی‌بیوتیکی بازدارنده، در این مطالعه به بررسی حضور این باکتری در تخم‌مرغ بومی و صنعتی پرداخته و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت. از ۲۰۰ نمونه پوست و محتویات تخم‌مرغ، ۲ نمونه (۱ درصد) آلوده به *اسینتوباکتربومانی* تشخیص داده شدند. پس از انجام تست آنتی‌بیوگرام مشخص شد که هر دو ایزوله مورد آزمون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین مقاوم، نسبت به تری‌متوپریم سیپروفلوکساسین یک ایزوله مقاوم و یک ایزوله نیمه‌حساس و نسبت به کاربنسیلین یک ایزوله حساس و یک ایزوله نیمه‌حساس بودند (جدول ۱). *اسینتوباکتر بومانی* در دهه اخیر عامل بسیار مهمی جهت به وجود آوردن عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان‌هاست. همان‌طور که گفته شد، در سالهای گذشته گونه‌های *اسینتوباکتر* نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم گردیده و سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* با مقاومت دارویی چندگانه نیز به تعدد گزارش شده است.

طبق گزارشی در سال ۲۰۱۵، Shaykh Baygloo و همکارانش از بخش ICU بیمارستانی در اصفهان ۸۰ نمونه عفونی از بیمارانی که دچار عارضه

سوختگی شده بودند، برداشت و مورد مطالعه قرار دادند. از مجموع ۸۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۱۰ ایزوله (۱۲/۵ درصد) *اسینتو باکتر* شناسایی شد که هر ۱۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* بوده و دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند (۱۲). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشابهت دارد. در سال ۱۳۹۴ مطالعه‌ای توسط توکل و ممتاز بر روی ۱۲۱ نمونه ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از عفونت‌های بالینی انجام شد. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه، بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با فراوانی ۹۰/۹۰ درصد و بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، نیتروفورانتوئین و مروپنم با فراوانی ۱/۶۵ درصد مشاهده شد (۱۳). از مقایسه نتیجه مطالعه فوق‌الذکر و مطالعه حاضر می‌توان برداشتی همسو داشت. در مطالعه دیگری که در سال ۱۳۹۳ توسط نورمحمدی و همکاران در شهرکرد انجام شد، تعداد ۱۰۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* از بخش‌های مختلف سه بیمارستان آموزشی واقع در شهرکرد جداسازی و میزان حساسیت آنها نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم (۹۴ درصد)، سفوتاکسیم (۹۳درصد)، سفپیم (۹۱ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۹ درصد)، نورفلوکساسین (۸۷ درصد)، ایمی‌پنم (۸۶ درصد)، جنتامایسین (۸۵ درصد)، توبرامایسن (۶۷ درصد) و آمیکاسین (۶۵ درصد) بوده و بیشترین حساسیت در برابر آنتی بیوتیک‌های کلیستین (۷۶ درصد) و آمپی سیلین سولباکتام (۷۰ درصد) گزارش شد. همچنین ۹۳ درصد از ایزوله‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه داشتند (۱۴). نتیجه مطالعه مذکور و مطالعه حاضر مؤید یکدیگر بوده و به اهمیت جلوگیری از ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی تاکید می‌کنند. طبق نتایج حاصله از مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، از مجموع ۱۲۰ ایزوله جداسازی شده از بیماران بیمارستانی در شرق چین، تعداد ۶۴ (۵۳ درصد) نمونه دارای مقاومت دارویی چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، جنتامایسین، آمپی‌سیلین - سولباکتام، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین بودند (۱۵). Wayne و همکارانش در سال ۲۰۱۶ پژوهشی در راستای ارزیابی میزان حساسیت ضد میکروبی *اسینتوباکتر بومانی*‌های جداسازی شده از بیماران دو بیمارستان واقع در لس‌آنجلس انجام دادند. بر طبق گزارشات حاصل از این مطالعه، از مجموع ۳۸ نمونه مورد بررسی، سه چهارم نمونه‌ها به ایمی‌پنم‌ها و مروپنم‌ها مقاوم بوده و تمامی نمونه‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین و هر چهار آنتی‌بیوتیک سفالوسپورینی مورد مطالعه مقاومت نشان دادند (۱۶). نتایج مطالعه فوق با مطالعه حاضر کاملا همخوانی داشته و حاکی از وجود سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در مناطق مختلف جهان می‌باشد. در سال ۲۰۱۸ مطالعه‌ای در عراق صورت گرفت که نتایج آن حاکی از مقاومت صد درصدی هر ۱۱۲ ایزوله مورد مطالعه نسبت به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین و حساسیت صددرصدی آنها نسبت به کلیستین بود (۱۷). از مقایسه نتایج مطالعه فوق‌الذکر و تحقیق حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که اگرچه در میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مورد بررسی در هر دو مطالعه تفاوت‌هایی وجود دارد اما در زمینه وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی در هر دو کشور عراق و ایران وضعیت نگران کننده و کمابیش مشابهی مشاهده می‌شود.

محیط غیر جانوری نیز از لحاظ وجود *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی قرار گرفته است.

رافعی و همکارانش در سال ۲۰۱۵، پژوهشی در زمینه اپیدمیولوژی *اسینتوباکتر بومانی* در مواد غذایی و دام‌های کشور لبنان به انجام رساندند. در این راستا ۷۳ نمونه آب، ۵۱ نمونه خاک، ۳۷ نمونه شیر خام گاو، ۵۰ نمونه گوشت خام گاو، ۷ نمونه پنیر و ۳۷۹ حیوان مورد مطالعه قرار گرفتند. ۶/۹ درصد از نمونه‌های آب، ۲/۷ درصد از نمونه‌های شیر، ۸ درصد از نمونه‌های گوشت، ۱۴/۳ درصد از نمونه‌های پنیر و ۷/۷ درصد از حیوانات مورد ارزیابی، آلوده به *اسینتوباکتر بومانی* گزارش شدند (۱۸).

در مطالعه‌ای که در زمینه وجود *اسینتوباکتربومانی* بر روی گوشت خام در کشور سوئیس انجام پذیرفته است، Lupo و همکارانش در سوئیس ۲۴۸ نمونه گوشت خام را در بازه زمانی نوامبر ۲۰۱۲ تا می۲۰۱۳ جمع‌آوری کرده و از نظر حضور *اسینتوباکتر بومانی* مورد آزمایش قرار دادند. این نمونه‌ها شامل ۵۰ نمونه گوشت گوساله، ۵۰ نمونه گوشت گاو، ۵۰ نمونه گوشت خوک، ۹۴ نمونه گوشت مرغ و چهار نمونه گوشت بوقلمون بود. از مجموع این ۲۴۸ نمونه، به طور کلی ۶۲ نمونه (۲۵ درصد) از نظر حضور *اسینتوباکتر بومانی* تأیید شدند. به طور دقیق، ۴۳ نمونه گوشت مرغ (۴۵/۷ درصد)، هر چهار نمونه گوشت بوقلمون (۱۰۰درصد)، ۹ نمونه گوشت گوساله (۱۸درصد)، سه نمونه گوشت گاو (۶ درصد) و سه نمونه گوشت خوک (۶ درصد) آلوده به *اسینتوباکتر بومانی* بودند. در ادامه، ۳۹ ایزوله *اسینتو باکتر بومانی*، شامل ۲۴ نمونه جداسازی شده از گوشت مرغ، هشت نمونه گوشت گوساله، چهار نمونه گوشت بوقلمون، دو نمونه گوشت گاو و یک نمونه گوشت خوک به منظور تشخیص میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند. از مجموع ۳۹ ایزوله، مقاومت به پیپراسیلین، تازوباکتام، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین ۲/۵ درصد و مقاومت به کلیستین و تتراسایکلین ۵ درصد گزارش شد. به بیان مشخص‌تر، مقاومت به کلیستین و تتراسایکلین در یک ایزوله جدا شده از گوشت گوساله، مقاومت به تتراسایکلین در دو ایزوله جدا شده از گوشت بوقلمون و مقاومت به سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم فقط در ایزوله‌های جدا شده از گوشت مرغ مشاهده شده و مقاومتی نسبت به کاربانپنم و جنتامایسین گزارش نشد (۱۹). مقایسه نتایج مطالعه مذکور و مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اگرچه میزان شیوع *اسینتوباکتر بومانی* در گوشت کشور سوئیس بیش از تخم‌مرغ ایران بوده است اما ایزوله‌های جداسازی شده از ایزوله‌های مورد مطالعه در این کشور میزان مقاومت بسیار اندکی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها نشان دادند، در حالی که بر طبق مطالعه حاضر اگرچه این ارگانیسم در تخم‌مرغ ایران شیوع فراوانی نداشته است اما ایزوله‌های جداسازی شده مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از خود نشان دادند که این مسأله می‌تواند به دلیل تجویز ناصحیح آنتی‌بیوتیک در مرغداری‌ها و یا طی نشدن دوره پرهیز از مصرف، در ایران باشد. همانطور که مشاهده شد، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک در بین سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد مطالعه در این تحقیق، با بعضی از مطالعات مشابه دیگر در نقاط مختلف جهان و ایران از لحاظ درصد مقاومت متفاوت است. این اختلافات می‌توانند ناشی از توزیع متفاوت ژن مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در مکان‌های مختلف و یا مربوط به تفاوت در نحوه تجویز و همچنین تفاوت در نوع آنتی‌بیوتیک‌های تجویزی و رایج در نقاط مختلف دنیا باشد، اما موضوع مشترک در بین تمام این تحقیقات، گستردگی زیاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در جهان است که نشان‌دهنده خطر بالقوه *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در دنیا می‌باشد.

استفاده آنتی بیوتیک در طیور معمولاً به منظور درمان است. با توجه به افزایش روز افزون مقاومت‌های آنتی بیوتیکی لازم است کشت آنتی‌بیوگرام انجام گیرد و با توجه به حساسیت دارو تجویز شود. مصرف بی‌رویه و بدون اطلاع از حساسیت و مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک می‌تواند مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را پیچیده‌تر نماید. بنابراین، شناسایی سریع و به موقع جدایه‌های مقاوم، به منظور جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد. همچنین جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید دو فاکتور عمده یعنی استفاده بدون محاسبه از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر داشت (۲۰). جهت جلوگیری از ایجاد مقاومت در سروتیپ‌های مختلف *اسینتوباکتر* و سایر باکتری‌های مشابه نیز توصیه می‌شود که از مصرف ناصحیح آنتی‌بیوتیک در مرغداری‌ها و دامپروری‌ها اجتناب نموده و در صورت تجویز، دوره پرهیز دارویی دام قبل از کشتار طی شود، زیرا جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌توانند از طریق مصرف فراورده‌های دامی به انسان منتقل شده و مخاطرات فراوانی را ایجاد کنند.

References

25- Tiemersma EW, Bronzwaer S LAM, Lyytikäinen O, Degener JE. Schrijnemakers P, Bruinsma N. European antimicrobial resistance surveillance system participants (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe (19922002-). Emerg infec Dis J. 2004; 10(9):16234-7.

26- Bergogne-Berezin E, Towner Kj. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. Clin Micribiol Rev. 1996; 9(2): 148-165.

27- Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumanii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 1556-1561.

28- Gordon NC, Wareham DW. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35 (3): 219- 26.

29- Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobactetr baumanni* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. Arch Intern Med. 2002; 162: 1515-1520.

30- Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 1379-1382.

31- Biendo M, Laurans G, Lefebvre JF, Daoudi F, Eb F. Epidemiological Study of an *Acinetobacter baumanii* Outbreak by using a Combination of Antibiotyping and Ribotyping. J Clin Microbiol. 1999; 37(7): 2170-2175.

32- Kasimoglu DA, Ayaz ND, Gencay YE. Serotype identification and antimicrobial resistance profiles *Salmonella SPP*. isolated from chicken carcasses. Trop Anim Health Prod. 2010; 42 (5): 893-897.

33- White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, McDermott PF, McDermott S, Wagner DD, Meng J. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meat. Eng J Med. 2001; 345(16): 1147-1154.

34- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. J Clin Microbiol. 2006; 44(8): 2974-2976.

35- Khaledi A, Bahador A, Mansoori N, Ghazali Bina M, Ghazvini K. Determination of antimicrobial resistance pattern of *Acinetobacter baumanii* isolated from patients in intensive care unit (ICU). Med J Mashhad Univ Mel Sci. 2015; 58(7): 376-38. [In Persian].

36- Shaykh Baygloo N, Bouzari M, Rahimi F, Abedini F, Yadegari S, Beigi F. Identification of Genomic Species of *Acinetobacter* Isolated from Burns of ICU Patients. Arch Iran Med. 2015; 18(10): 638 – 642.

37- Tavakol M, Momtaz, H. Detection of the most prevalent antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospital infections and determination of their antibiotic resistance pattern. Biol J Micro. 2015; 4(14): 71-82. [In Persian].

38- Normohamady Z, Zamanzad B, Shavarzi A, Kiani P. Evaluation antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from Shahrekord teaching hospitals in 2013. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 16 (6):1-8. [In Persian].

39- Zhao Sy, Jiang DY, Xu PC, Zhang YK, Shi

HF, Cao HL, Wu Q. An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. Annal clin microbiol antimicrob. 2015; 14 (7):1-8.

40- Warner WA, Kuang SN, Hernandez R, Chong MC, Ewing PJ, Fleischer J, Meng J, Chu Sh, Terashita D, English LT, Chen W, Xu HH. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from two hospital outbreaks in Los Angeles County, California, USA. BMC Infect Dis, 2016; 16 (194): 2-13.

41- AL-Kadmy IMS, Ali ANM, Salman IMA, Khazaal SS. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from Iraqi. N Microb N Infect. 2018; 21: 51-57.

42- Rafei R, Hamze M, Pailhories H, Eveillard M, Marsillier L, Joly-Guillou Ml, Dabboussi F, Kampf M. Extrahuman Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. Appl. Environ. Microbiol. 2015; 81(7): 2359-2367.

43- Lupo Agnese, Vogt Debora, Seiffert Salome, Endimiani Andrea, Perreten Vincent. Antibiotic Resistance and Phylogenetic Characterization of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Commercial Raw Meat in Switzerland. J Food Prot. 2014; 11: 1976-1981.

44- Amini K, Alizade S. Determining the presence of virulence genes Panton Valentine leukocidin PVL and methicillin gene mecA in Staphylococcus aureus. J F Microciol. 2015; 2:(1) 49-58. [In Persian]

Assessment of antibiotic resistance of Acinetobacter baumannii isolated from indigenous and industrial eggs

Zahra Hasiri[1], Ebrahim Rahimi [1*], Hasan Momtaz [1], Arman Rouhafza [2]

1- Young Researchers and Elites Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2- Department of Veterinary, College of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

Receive: September 12, 2018; Revise: July 25, 2018; Accept: June 27, 2018

Summary

Acinetobacter species are widely distributed. There are also hypotheses regarding the transmission of this bacteria from food to humans. Eggs are always among the most consumed and richest human food sources. This study was conducted in order to evaluate the prevalence and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* in indigenous and industrial eggs. In this regard, a total of 100 indigenous and industrial egg samples were collected from Chahar Mahal and Bakhtiari province. Total of 200 samples, including the shell and content of eggs, were prepared. According to the standard methods, samples were cultured and examined for the presence of *Acinetobacter baumannii*. Colonies were identified by PCR method. Out of 200 shell and content samples, 2 shell samples (1%) were found to be infected with *Acinetobacter baumannii*. Antibacterial susceptibility testing of isolated bacteria to selected antibiotics was performed using disk diffusion method based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations. Data were analyzed using SPSS 16 software and frequency distribution table. It was found that both tested samples were resistant to Tetracycline and Gentamicin antibiotics. One sample was resistant and the other one was intermediate to Trimethoprim and Ciprofloxacin. The minor resistance was observed to Carbenicillin. According to the available evidence, egg contamination with *Acinetobacter baumannii* occurs mainly through the environmental factors and secondary contamination. Lack of attention to the necessary points during the process of production, supply, storage and consumption of eggs can lead to the transfer of bacteria to the consumer. Therefore, it seems that it is possible to prevent the transmission of contamination to humans with timely monitoring and compliance with health guidelines in all the above steps.

Keywords: *Acinetobacter baumannii, Antibiotic-Resistant, egg*

بررسی فراوانی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلاهای جداشده از سگ‌های بدون علائم کلینیکی در شهرستان زابل

رضا میر[۱]، زهرا راشکی قلعه‌نو[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی، کارمند اداره کل دامپزشکی استان سیستان و بلوچستان
۲- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل

دریافت مقاله: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۷، بازنگری: ۴ خرداد ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۶ مرداد ۱۳۹۷

چکیده

بیماری سالمونلوز با گسترش بالای جهانی، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوتیک انسان و حیوانات می باشد. مدفوع تقریبا همه حیوانات از قبیل سگ ممکن است به عنوان یک منبع بالقوه عفونت سالمونلا در انسان و حتی دیگر حیوانات باشد. با توجه به افزایش نگهداری سگ در میان مردم، به‌ویژه کسانی که در مناطق روستایی زندگی می‌کنند، خطر افزایش انتقال عفونت سالمونلا به انسان وجود دارد. به دلیل کمبود اطلاعات مربوط به نقش سگ‌ها به عنوان منبع عفونت سالمونلا در انسان در زابل (جنوب شرقی ایران)، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی سالمونلا در سگ‌های منطقه سیستان و نقش آن به عنوان منابع بالقوه عفونت در انسان انجام شد. در این پژوهش نمونه‌ها با استفاده از سواب رکتال از ۲۵۰ سگ روستایی فاقد علائم بالینی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در محیط‌های عمومی و اختصاصی کشت و با استفاده از تست‌های رایج آزمایشگاهی تعیین هویت گردید. سپس ایزوله‌های تعیین هویت شده با استفاده از روش مولکولی (PCR) و پرایمرهای عمومی در سطح جنس مورد شناسایی قرار گرفتند. تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده نیز با استفاده از روش‌های استاندارد انجام شد. در این تحقیق ۵۸ ایزوله سالمونلا از ۲۵۰ نمونه سواب رکتال تعیین هویت گردید. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، جنتامایسین، تتراسیکلین و نالیدیکسیک اسید مشاهده شد. جداسازی سویه‌های زئونوتیک *سالمونلا* از سگ‌های فاقد علائم بالینی، آنها را به عنوان یکی از خطرناک‌ترین عوامل انتشار باکتری *سالمونلا* در محیط و خطری برای بهداشت عمومی و سلامت حیوانات معرفی می‌کند.

واژگان کلیدی: *جنوب شرقی ایران، سالمونلا، سگ*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: zahrarashki@yahoo.co.uk

مقدمه

سالمونلا، باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه، یکی از شایع‌ترین باکتری‌های قابل انتقال از حیوانات و محصولات غذایی حاصل از آنها، به انسان می‌باشد که به دلیل تنوع مخازن حیوانی و انتقال آن از طریق مدفوع بیماری‌های زئونوز را ایجاد می‌کند. با توجه به مقام دوم بیماری سالمونلوز در بین بیماری‌های که از طریق غذای آلوده به انسان و سایر حیوانات منتقل می‌شود، این بیماری یکی از بزرگترین چالش‌های بهداشت عمومی در سراسر دنیا می باشد (۱). دام‌های اهلی چون گوسفند که از مهم‌ترین منابع غذایی انسانی می‌باشند، از مخازن اصلی سروتیپ‌های مختلف *سالمونلا*های زئونوز بوده و نقش بالقوه و خطرناک این حیوانات، به عنوان حاملین فاقد علائم بالینی، در بسیاری از گزارشات بروز بیماری سالمونلوز غذایی در انسان‌ها ثابت شده است (۲).

سروتیپ‌های مختلف باکتری سالمونلا با گستردگی بالای میزبانان، عامل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و حیوان می باشد (۳). سگ‌سانان اهلی و وحشی آلوده فاقد علائم بالینی ممکن است تا ۱۰۰ روز سروتیپ‌های مختلف *سالمونلا* را در مدفوع خود دفع کنند (۴). با توجه به حضور تعداد بالای سگ‌های خانگی و ولگرد در روستاها و عدم رعایت بسیاری از نکات بهداشتی و تماس نزدیک آنها با انسان‌ها، سگ‌های روستایی می‌توانند نقش بسیار مهمی در انتقال این باکتری به روستائیان ایفا کنند. در این مطالعه به بررسی میزان آلودگی نمونه مدفوع به *سالمونلا* در سگ‌های روستایی و ولگرد شهرستان زابل پرداخته شد. همچنین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی *سالمونلا*های جداشده نیز تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در فاصله زمانی فروردین تا شهریور۱۳۹۶ به منظور بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جداشده بر روی مدفوع ۲۵۰ سگ به ظاهر سالم از ۱۵ روستا در منطقه سیستان انجام شد. در این تحقیق نمونه‌ها پس از مقید کردن سگ‌ها با استفاده از سواب رکتال تهیه و در محیط‌های اختصاصی مانند مکانکی، زایلوز لیزین دزوکسیکولات آگار، سالمونلا شیگلا آگار و کروم آگار *سالمونلا* در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت کشت شد. سپس با استفاده از آزمایش های رایج بیوشیمیایی مانند لیزین دکربوکسیلاز آهن دار، اوره آگار، تخمیر قندها، تعیین حرکت و تولید سولفید هیدروژن، متیل رد و وژپروسکوئر تعداد ۵۸ ایزوله *سالمونلا* تعیین هویت گردید.

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *سالمونلا*های جدا شده نسبت به ۱۲ دیسک آنتی‌بیوتیک شرکت پادتن طب، با آزمایش انتشار از دیسک به روش کربی- بائر بر اساس اصول CLSI صورت گرفت. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک عبارت بودند از: استرپتومایسین، تایلوزین، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین، سفتریاکسون، نئومایسین و تتراسیکلین.

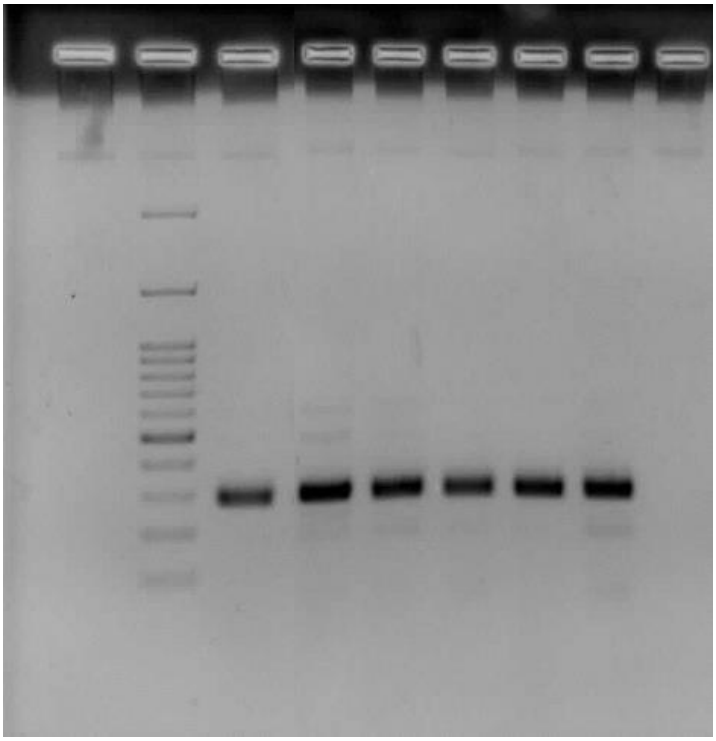
استخراج DNA و انجام PCR : برای استخراج DNA ابتدا ایزوله‌های *سالمونلا* بر روی محیط مغذی براث به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری گردید. پس از سانتریفوژ محلول رویی دور ریخته شد و در دو مرحله با PBS ۱درصد شستشو داده شد. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۸ درجه ساتیگراد جوشانده شد و محلول رویی حاوی DNA ژنومیک برای انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای جدول ۱ و دستگاه ترموسایکلر اپندورف

استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی	اندازه
STF-1	5’- GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA -3’	۲۸۵
STR-1	5’- TCATCGCACCGTCAAAGGAAC -3’	

جهت انجام فرایند PCR آنزیم 2×Master Mix RED از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از 2×Master Mix RED و ۱ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (۲۰ پیکومول در میکرولیتر) با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی (denaturation) اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل تکثیر شامل واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و اتصال پرایمرها (annealing) به DNA الگو در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و طویل شدن رشته الگو (extension) در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (final extension) به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگارز ۲درصد به مدت ۴۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر Ladder 100 ارزیابی شد.



شکل۱- نمونه‌ای از محصول PCR قطعه تکثیر شده با اندازه ۲۸۵ جفت باز

نتایج

پس از انجام آزمون‌های باکتریولوژیک و PCR از بین تعداد ۲۵۰ نمونه مورد مطالعه، ۵۸ ایزوله *سالمونلا* جدا گردید که حاکی از جداسازی *سالمونلا* از ۲۳/۲ درصد سگ‌های مورد مطالعه بود. در این مطالعه تمامی ایزوله‌های جدا شده با انجام تست‌های میکروب شناسی، با روش PCR نیز تأیید شدند (شکل ۱). نتایج حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سالمونلا* نسبت به ۱۲ آنتی بیوتیک در جدول ۲ نشان داده شده است .

از مجموع ۵۸ ایزوله سالمونلا به ترتیب ۹۱/۳۷، ۷۲/۴۱، ۶۵/۵۱ و ۵۶/۸۹ به کوتریموکسازول، جنتامایسین، تتراسیکلین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل (۹۳/۱۰)، تایلوزین (۸۹/۶۵)، سفتریاکسون(۸۶/۲)، انروفلوکساسین (۸۲/۷۵) و سیپروفلوکساسین (۷۴/۱۳) مشاهده شد (جدول ۲). الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی درایزوله‌ها متفاوت بود.

جدول۲: توزیع فراوانی حساسیت *سالمونلا*های جدا شده نسبت به ۱۲ نوع آنتی بیوتیک

آنتی بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
آمپی سیلین	۷	۰۶/۱۲	۵۰	۲۰/۸۶	۱	۷۲/۱
استرپتومایسین	۱۲	۶۸/۲۰	۲۰	۴۸/۳۴	۲۶	۸۲/۴۴
انروفلوکساسین	۴۸	۷۵/۸۲	۸	۷۹/۱۳	۲	۴۴/۳
تایلوزین	۵۲	۶۵/۸۹	۶	۳۴/۱۰	۰	۰
تتراسیکلین	۸	۷۹/۱۳	۱۲	۶۸/۲۰	۳۸	۶
جنتامایسین	۳	۱۷/۵	۱۳	۴۱/۲۲	۴۲	۴۱/۷۲
سفتریاکسون	۵۰	۲/۸۶	۲	۴۴/۳	۶	۳۴/۱۰
سیپروفلوکساسین	۴۳	۱۳/۷۴	۱۵	۸۶/۲۵	۰	۰
کلرامفنیکل	۵۴	۱۰/۹۳	۴	۸۹/۶	۰	۰
کوتریموکسازول	۰	۰	۵	۶۲/۸	۵۳	۳۷/۹۱
نالیدیکسیک اسید	۱۷	۳۱/۲۹	۸	۷۹/۱۳	۳۳	۸۹/۵۶
نئومایسین	۵	۶۲/۸	۳۸	۵۱/۶۵	۱۵	۸۶/۲۵

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق بیانگر آلودگی حدود ۲۳ درصد سگ‌های مورد مطالعه بود. از آنجایی که محل اصلی استقرار *سالمونلا* در بدن حیوانات روده است، یکی از مناسب‌ترین نمونه‌های بیولوژیکی جهت بررسی آلودگی حیوانات به *سالمونلا* نمونه مدفوع می‌باشد. گفته می‌شود دوره‌های دفع *سالمونلا* توسط حیوانات متناوب بوده و جهت تخمین برآورد دقیق آلودگی به سالمونلا نیاز به حداقل ۳ بار نمونه‌گیری از مدفوع می‌باشد (۵)، لذا با توجه به اینکه در این مطالعه تنها امکان یک بار نمونه برداری بود احتمال بالاتر بودن میزان آلودگی به سالمونلا در جمعیت مورد مطالعه، وجود دارد. جدا سازی ۲۳ درصد ایزوله‌های سالمونلا از سگ‌های فاقد علائم بالینی همانند مواردی که در این مطالعه دیده شد، بیانگر آلودگی بالای محیط به سالمونلا و همچنین نقش بسیار مهم سگ‌های روستایی در انتشار سالمونلا در مناطق روستایی می‌باشد. در این مطالعه تمامی ایزوله‌های تعیین هویت شده با روش‌های میکروب‌شناسی با روش PCR نیز تأیید شد. نتایج مطالعات مختلف در راستای مقایسه این دو روش متفاوت بوده است. به عنوان مثال رستگار و همکاران

در سال ۲۰۰۹ اختصاصیت و حساسیت دو روش نامبرده را با مطالعه اخیر تا حدودی مشابه ذکر کردند (۶). از طرف دیگر برخی از محققین چون فدر و همکاران در سال ۲۰۰۱ ضمن گزارش توانایی به ترتیب ۴۴ و ۸۰ درصدی روش‌های کشت و PCR در شناسایی سالمونلا در نمونه آب، اختصاصیت و حساسیت بالاتری را برای PCR عنوان کرده‌اند(۷). با توجه به اینکه ممکن است در صورت وجود تعداد کم باکتری سالمونلا در نمونه مدفوع احتمال رشد آن در محیط کشت باکتریایی کاهش یابد و از طرفی با توجه به حساسیت بالای روشهای مولکولی در شناسایی عوامل بیماری‌زا حتی با تعداد کم، می‌توان علت احتمالی بالاتر بودن *سالمونلا*های شناسایی شده در نمونه مدفوع به روش PCR را نسبت به روش کشت میکروبی در این تحقیق توضیح داد (۸). مطالعات مشابه انجام شده در ایران محدود می‌باشد و نتایج فراوانی آلودگی به *سالمونلا* در جمعیت سگ‌ها در ایران متفاوت گزارش شده است. اولین مطالعه صورت گرفته توسط شیمی و همکاران در سال ۱۳۵۵ بیانگر آلودگی ۱۵/۸ درصدی سگ‌های ولگرد تهران به *سالمونلا* بوده است (۹). در مطالعه جلالی و همکاران باکتری *سالمونلا* از ۱۲/۵ درصد سگ‌های مبتلا به انتریک هموراژیک ارجاعی به درمانگاههای دامپزشکی شهرستان رشت جدا شد که مقداری کمتر از نتایج مطالعه اخیر بود (۱۰). طی جدیدترین مطالعه صورت گرفته بر روی سگ‌های گله منطقه گرمسار ۱۰/۵ درصد سگ‌ها به سالمونلا آلوده بودند. با توجه به گرم و خشک بودن شهرستان گرمسار، پائین‌تر بودن شیوع *سالمونلا* در سگ‌های مورد مطالعه نسبت به مطالعه اخیر قابل توضیح می‌باشد (۱۱). با توجه به اهمیت سالمونلوز مطالعات زیادی در کشورهای مختلف روی آلودگی سگ‌ها به سالمونلا صورت گرفته است. مطالعات سایر محققین حاکی از جداسازی باکتری سالمونلا از ۰/۳۵ درصد سگ‌ها در اسلوواکی، ۲/۴ درصد در ایتالیا و ۱۱ درصد در ترکیه بوده است (۱۲،۱۴) که حاکی از بالا بودن میزان آلودگی سگ‌ها در منطقه سیستان است. که دلیل آن می‌تواند تغذیه سگ‌های روستایی و ولگرد از مرغهای تلف شده در مراکز فروش یا مرغداری‌ها باشد. گزارشاتی مبنی بر فصلی بودن بیماری در دست است. البته جهت اثبات این فرضیه نیاز به بررسی مولکولی ایزوله‌ها و مقایسه فاکتورهای ژنتیکی آنها با یکدیگر می‌باشد. ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها یکی از دلایل عدم پاسخ مناسب به درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها و صرف هزینه‌های درمانی بالا در طب پزشکی و همچنین دامپزشکی می‌باشد. در این مطالعه مقاومت بالای ایزوله‌های *سالمونلا* نسبت به کوتریموکسازول، جنتامایسین، تتراسیکلین و نالیدیکسیک اسید مشاهده گردید.

حساسیت بالای *سالمونلا*های جداشده در این مطالعه حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون، تایلوزین و انروفلوکساسین بیانگرکاربرد مناسب این داروها جهت درمان عفونت‌های ناشی از سالمونلاهای جدا شده ازسگ‌ها در این تحقیق می‌باشد. البته با توجه به متفاوت بودن الگوی مقاومتی ایزوله‌ها، همچنان انجام آنتی بیوگرام قبل از درمان در ارجحیت می باشد. اطلاعات مربوط به الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سالمونلا* در میزبانان مختلف در سیستان، محدود به الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سالمونلاهای* جدا شده از پرندگان گوشتی پرورشی و محلی می‌باشد. مقاومت بالای سالمونلاهای جداشده نسبت به کوتریموکسازول، جنتامایسین و تتراسیکلین در این تحقیق مشاهده شد. شایان ذکر است که آنتی‌بیوتیکهای فوق از پرمصرف‌ترین داروهای مورد استفاده در صنعت طیور در ایران می‌باشند و با توجه به معمول نبودن استفاده از این

آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان سگ‌های روستایی، ممکن است این نوع سالمونلاهای مقاوم از طریق مصرف گوشت پرندگان به این حیوانات منتقل شده باشد. در مطالعه صورت گرفته بر روی سگ‌های چوپان درگرمسار، همه سویه‌های جدا شده به استرپتومایسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، پنی‌سیلین و اریترومایسین مقاوم بودند (۱۵). به نظر می‌رسد که الگوی مقاومت دارویی در هر منطقه بستگی به نوع، میزان و تداوم مصرف داروهای آنتی باکتریال در آن منطقه داشته باشد. وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سالمونلاهای* جداشده از سگ‌های روستایی اهمیت بررسی آنتی بیوگرام قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک در درمان بیماری دامی و انسانی را آشکار می‌کند. آلودگی ۲۳ درصدی سگ‌های فاقد علائم بالینی در این مطالعه که حضور آنها درنواحی روستایی کاملاً پذیرفته می‌باشد و تماس مستقیم و غیر مستقیم آنها با روستائیان بالا بوده و خطر بالقوه بروز سالمونلوز را به خصوص در کودکان و سالخوردگان که دارای سیستم ایمنی ضعیفی هستند یادآوری می‌کند.

References

1- Tabaraie, B., Sharma, B.K., Sharma, P.R., Sehgal, N.R., and Ganguly, N.K. Evaluation of *Salmonella* porins as a broad spectrum vaccine candidate. Microbiol. Immunol. 1994; 38: 553-559.

2- Baker, M.G., Thrnley, C.N., Lopez, L.D., Garrett, N.K., and Nicol, C.M. A recurring salmonellosis epidemic in New Zealand linked to contact with sheep. Epidemiol. Infect. 2007; 135: 76–83.

3- Gas RK, Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. *Salmonella* infection. 12th ed. USA: Blackwell Publishing, Iowa; 2008.

4- Fukata T, Naito F, Youshida N, Yamaguchi T, Mizumura Y, Hirai K. Incidence of *Salmonella* infection in healthy dos in Gifu prefecture, Japan. J Vet Med Sci. 2002; 64(11): 1079-1080.

5- Gentry-Weeks C, Hutcheson HJ, Kim LM, Bolte D, Traub-Dargatz J, Morley P. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:1487-1492.

6- Rastegar M, Ghahraman MH, Nishaboori SH, Jalali M. Isolation of *Salmonella* typhymorium in milks by microbial culture and PCR. Nut. Sci. FO. Tech. 2009; 3(3): 45-52. (In Persian)

7- Feder I, Nietfeld JC, Galland J, Yeary T, Sargeant JM, Oberst R. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection *Salmonella* in porcine fecal and water samples. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2477-2484.

8- Gentry-Weeks C, Hutcheson HJ, Kim LM, Bolte D, Traub-Dargatz J, Morley P. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:1487-1492.

9- Shimi A, Keyhani M, Blurchi M. Salmonellosis in apparently healthy dogs. Vet Rec.1976; 98(6): 110-111.

10- Jalali PA, Beyghi MD, asadpool L. Isolation and antibiotic resistance of *Salmonella* from dogs with hemorrhagic enteritis. J Azad Unive 2010; 9(3): 12-17.

11- Zahrai-Salehi T, Askari-Badouei M,O, Ghiasi S R, Ahrafi-Tamai I. Shepherd dogs as common source for Salomonella enterica serovar Reading in Garmsar, Iran. Tur J Vet Ani Sci 2013; 37(1) 102-105.

12- Kocabiyik AL, Cetin C, Dedicova D. Detection of *Salmonella* spp. in stray dogs in Bursa Province, Turkey: first isolation of *Salmonella* Corvallis from dogs. J Vet Med B Infect Dis Public Health. 2006; 53(4): 194-196.

13- Nastasi A, Massenti MF, Scarlata G, Mammina C, Calco C, Villafrate MR. *Salmonella* and Yersinia enterocolitica in soil and dog faeces. Boll IST Sieroter Milan 1986; 65(2): 150-152.

14- Kozak M, Horosova K, Lasanda V, Bilek J, Kyselova J. Do dogs and cats present a risk of transmition of salmonellosis to humans? Brastisl Lek Listy. 2003; 104(10): 323-328.

15- Emaddi Chashni SH, Hassanzadeh M. Bozorgmehri S. Characterization of the *Salmonella* Isolates from Backyard Chickens in North of Iran, by Serotyping, Multiplex PCR and Antibiotic Resistance Analysis. Arch. Razi Inst 2009; 64(2): 77-83.

Frequency and Antimicrobial Resistance Pattern of *Salmonella* Spp in Asymptomatic Rural Dog in Zabol

Reza Mir [1], Zahra Rashki Ghalehnoo[2*]

1- MSc Student in Microbiology, General Veterinary Officer of Sistan and Baluchestan province
2- Departments of Microbiology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol

Receive: April 22, 2018; Revise: May 25, 2018; Accept: August 17, 2018

Summary

Salmonellosis is one of the most important cases of zoonotic diseases with global distribution. Rural dogs may not show clinical signs of *Salmonella* infection. Faeces of nearly all animal species including dogs may serve as a potential source of *Salmonella* infection to humans and even to other animals. Due to the increase in dog keeping among the people, especially those living within the rural regain in Sistan, there is an increased risk of transmission of *Salmonella* infection to humans. The aim of this study is to determine the carrier status of *Salmonella* in dogs and their role as potential sources of infection to humans. In this research, rectal swabs of 250 asymptomatic rural dogs from Zabol rural regains were cultured in general and specific media, identified by using common laboratory tests, and evaluated by PCR and general primers at the genus level. *Salmonella* isolates were tested for antimicrobial susceptibility, by applying standard methods. In this study, 58 isolates of *Salmonella* were identified from 250 rectal swabs. The highest resistance was to antibiotics co-trimoxazole, gentamycin, tetracycline, and nalidixic acid. Isolation of *Salmonella* spp. from asymptomatic dogs makes it a dangerous source of *Salmonella* and a threat for human and animal health.

Keywords: *Salmonella, dogs, Southeast of Iran*

مطالعه اثر فیلم ژلاتین و اسانس زیره سبز بر ویژگی‌های میکروبی و ارگانولپتیکی فیله مرغ تحت شرایط یخچالی

منیژه رضالو[۱]، زهره مشاک*[۲]، امیر شاکریان[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

دریافت مقاله: ۱۲ تیر ۱۳۹۷، بازنگری: ۷ مرداد ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۹ شهریور ۱۳۹۷

چکیده

گوشت مرغ در صورت نگهداری بیش از ۳ روز در شرایط یخچالی در معرض فساد قرار می‌گیرد. در این مطالعه از پوشش پروتئینی ژلاتین به همراه اسانس زیره سبز جهت تعویق فساد تحت شرایط یخچالی استفاده شد. بدین منظور از ۴ عدد مرغ کشتار روز ۲۴ نمونه فیله مرغ ۷۰ گرمی تهیه شد. نمونه‌ها در گروه تیمار بین فیلم‌های ژلاتین ۴درصد آغشته به سه غلظت اسانس زیره سبز (۰،۰,۳،۰,۶،۰,۹) درصد و در گروه کنترل بین فیلم‌های ژلاتین ۴ درصد تحت شرایط یخچالی قرار داده شدند. باکتری‌های هوازی، باکتری‌های *سایکروفیل*، *آنتریاکتریاسه*، *سودوموناس* و باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک، کشت و شمارش و همچنین ویژگی‌های ارگانولپتیک در طی روزهای ۰، ۲، ۴، ۷ و ۱۲ در این گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس زیره سبز (خصوصاً با غلظت‌های ۰,۶ ، ۰,۹) درصد، تعداد باکتری‌های *انترو باکتریاسه*، *سودوموناس*، سرمادوست، اسیدلاکتیک، کپک و مخمر و تعداد کل باکتری‌ها کاهش یافته بود. در ارزیابی حسی رنگ و بوی مرغ، عدم مقبولیت از روز هفتم به بعد مشهود بود. بهترین حالت فیلم ژلاتین ۴درصد (با توجه به بو و مزه اسانس زیره سبز) در غلظت ۰/۶ درصد اسانس زیره سبز و جهت نگهداری ۷ روزه در شرایط یخچالی توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: *اسانس زیره سبز، خصوصیات میکروبی و ارگانولپتیکی، ژلاتین، گوشت مرغ، نگهداری یخچالی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mashak@kiau.ac.ir

مقدمه

انواع گوشت به ویژه گوشت مرغ و ماهی، اولین انتخاب به عنوان پروتئین حیوانی برای بسیاری از مردم در سرتاسر جهان می‌باشد (۱). تولید جهانی گوشت در سال۲۰۱۴ از ۲۵۰ میلیون تن گذشت و گوشت طیور با ۸۷ میلیون تن پس از گوشت خوک با ۱۰۸/۹میلیون تن در رتبه دوم از نظر تولید قرار گرفت (۲). گوشت مرغ از جمله مواد غذایی با فسادپذیری بالا بوده و در معرض تجزیه شیمیایی و فساد میکروبی قرار دارد، لذا گوشت فاسد خطر بالقوه‌ای برای سلامتی مصرف‌کننده محسوب می‌شود. امروزه با توجه به افزایش آلاینده‌های زیست محیطی و بیماری‌های ناشی از مواد سنتتیک فن‌آوری بسته‌بندی تمایل زیادی در خصوص توسعه دانش و استفاده از پوشش‌های طبیعی حاوی مواد ضد میکروبی درحفظ کیفیت گوشت و افزایش ماندگاری آن وجود دارد (۳). در این بین فیلم‌های خوراکی به عنوان یک مانع نفوذ رطوبت و اکسیژن به مواد غذایی نقش مهمی ایفا می‌کند (۴). در بین مواد سازنده فیلم‌های خوراکی (لیپیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها) به دلیل تشکیل ساختار شبکه‌ای هیدروژنی منظم بهترین موانع اکسیژن هستند (۵). پوشش‌های پروتئینی نسبت به پلی‌ساکاریدها از نظر ممانعت‌کنندگی در برابر نفوذ گازهای اکسیژن و دی‌اکسیدکربن برتری دارند .

ژلاتین یک پروتئین فیبری دناتوره شده توسط هیدرولیز حرارتی جزئی به دست آمده از کلاژن است (۶). یکی از خواص مهم این ترکیب این است که اثرات زیست محیطی کمی دارد، زیرا این فیلم‌ها می‌توانند با غذا مصرف شوند. پوشش‌های ژلاتینی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و ممانعت خوب آنها نسبت به نفوذ اکسیژن سبب می‌شود که به عنوان عوامل ضد اکسایش لیپید و به تعویق انداختن رشد کپک‌ها در گوشت مطرح باشند (۷).

اسانس‌های روغنی به عنوان افزودنی‌های غذایی جهت پیشگیری از رشد پاتوژن‌های غذازاد و عوامل مولد فساد در طیف وسیعی از غذاها نظیر سبزیجات، برنج، میوه، محصولات لبنی، شیر و گوشت استفاده شده است (۸). زیره سبز Cuminin cyminum یک گیاه معطر در خانواده Apiaceae است. در مطالعات متعددی به خواص ضد میکروبی، ضد اکسیدانی و ضد التهابی و ضد سرطانی و ضد جهش‌زا بودن زیره سبز اشاره شده است (۹). ترکیب شیمیایی اسانس‌ها تا حد زیادی به عوامل مختلف از جمله گونه گیاه، رقم گیاه، منشأ جغرافیایی، شرایط اقلیمی، خاک، کاشت، شیوه‌های فرایند برداشت و زمان برداشت، شرایط نگهداری مواد اولیه و تکنیک‌های فرآوری وابسته می‌باشد. بنابراین گیاهان از یک گونه، در شرایط متفاوت (زمان و مکان) پرورش و برداشت ، می‌توانند خصوصیات و ترکیبات شیمیایی متفاوتی داشته باشند (۱۰). بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییرات رشد فلور باکتریایی و خواص ارگانولپتیکی گوشت مرغ تحت تیمار ژلاتین و اسانس زیره سبز در طی نگهداری در شرایط یخچالی بود.

مواد و روش‌کار

تهیه اسانس زیره سبز: اسانس زیره سبز به روش تقطیر با بخار به وسیله دستگاه کلونجر از میوه خشک شده آن در حوالی بیرجند به دست آمد و توسط آزمایشگاه جهاد دانشگاهی تهران تأیید شد. آنالیز ترکیبات اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف مجهز به طیف سنجی جرمی (GC/MS) انجام شد. به کمک اطلاعات کتابخانه‌ای وایلی و با مراجعه با رفرنس‌های موجود در ارتباط با اجزای تشکیل‌دهنده اسانس‌ها و تطابق تصاویر طیف‌سنجی نتایج حاصل تفسیر و اجزای

تشکیل‌دهنده اسانس مشخص گردید. در این مطالعه از سه غلظت (۹، ۰، ۶، ۰، ۳ و ۰) درصد به عنوان گروه تیمار و غلظت صفر درصد اسانس به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

تهیه گوشت مرغ و تیماربندی: چهار مرغ کشتار روز بسته‌بندی شده با وزن ۲-۱/۵ کیلوگرم، از یک کشتارگاه، تحت شرایط استریل و در کنار یخ، تهیه و در اسرع وقت به آزمایشگاه مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج منتقل شد، سپس تحت شرایط استریل، ۲۴ فیله ۷۰ گرمی با ضخامت بین نیم تا یک سانتی‌متری به کمک قیچی و تیغ بیستوری استریل تهیه شد. نمونه‌های گوشت برش‌خورده در بین فیلم‌های ژلاتین ۴درصد با غلظت صفر و همچنین آغشته به سه غلظت ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد اسانس زیره سبز در ۲۴ پلیت استریل قرار داده شدند و تحت شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد در روزهای ۰، ۲، ۴، ۷، ۹ و ۱۲ مورد آزمایشات میکروبی و ارگانولپتیکی قرار گرفتند.

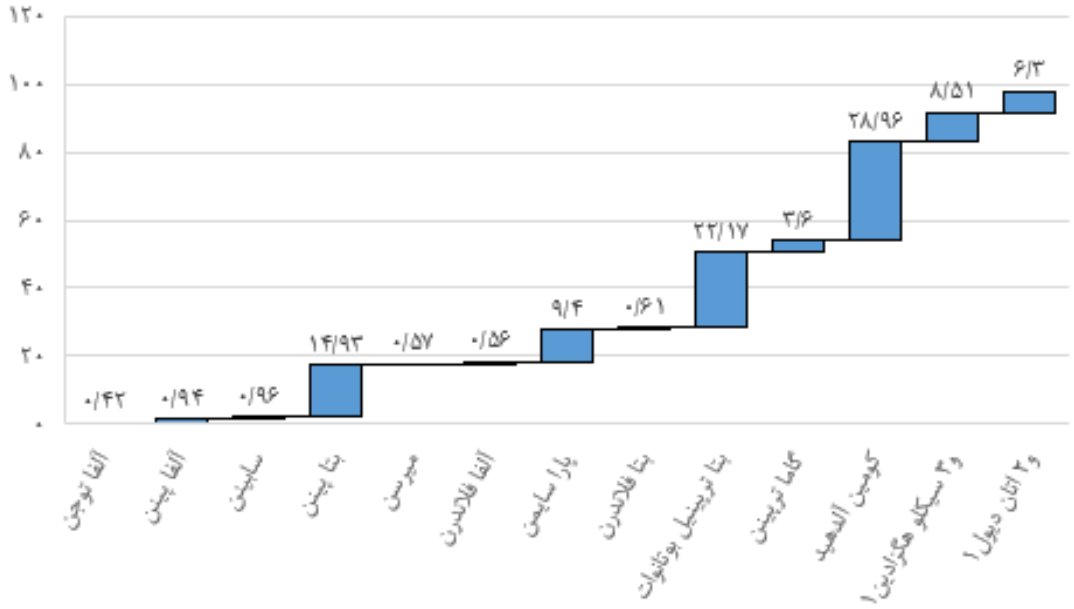
محیط و نحوه کشت و گرمخانه گذاری انواع میکروب‌ها: پس از تهیه رقت‌های متوالی ده برابر از باکتری‌های هوازی، مزوفیل، سایکروفیل، *سودوموناس* و باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک به ترتیب در محیط‌های کشت پلیت کانت آگار،کینگ آگار، *سودوموناس* آگار و ام آر اس آگار به صورت سطحی کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. همچنین جهت کشت باکتری‌های *آنتروباکتریاسه* وکپک و مخمر، به ترتیب از محیط کشت ویولت رد بایل دکستروز آگار و دی کلران رزبنگال کلرامفنیکل آگار استفاده شد و محیط‌های کشت به ترتیب در روز ۱ تا ۲، ۳۷ درجه سانتیگراد و روز ۳ تا ۵ در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری گردیدند. بعد از رشد تعداد پرگنه‌ها در پلیت‌ها شمارش شد. طرز تهیه فیلم بر پایه ژلاتین۴ درصد و غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز، ۹۶ گرم ژلاتین۴ درصد بلوم گاوی در ۲۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه هم زده و با حمام آب گرم دما به ۸۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. در ادامه اسانس زیره سبز با غلظت‌های مختلف ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد اضافه و برای کفگیری از وکیوم استفاده گردید. بعد از این عملیات در پلیت‌های شیشه‌ای ریخته و بعد از ۲۴ ساعت از پلیت جدا گردید و در کیسه فریزر نگهداری شد. ارزیابی ویژگی‌های ارگانولپتیک شامل رنگ و ظاهر، بو، طعم و بافت و بررسی خصوصیات حسی گوشت مرغ یخچالی بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین و غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز با استفاده از تست پانل ۹ نفره تحت شرایط مکان، نور و ظروف یکسان انجام شد. در این روش از پرسش‌نامه‌ای که حاوی امتیازدهی بر اساس رنگ و ظاهر (آنچه که با چشم غیر مسلح دیده می‌شود که این تغییرات ممکن است مطلوب و یا غیرمطلوب باشد)، بافت (میزان قوام محصول)، طعم و مزه (براساس خوش‌آیند بودن و نبودن) و بو (رایحه متصاعد شده از محصول) بود، استفاده شد و امتیازدهی از عدد ۱ تا ۵ بود.

آنالیز آماری: با توجه به کاربرد فیلم خوراکی ژلاتین۴ درصد و کاربرد ۴ نوع تیمار مختلف اسانس ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد مجموعاً ۴۸ بار آزمایشات مختلف میکروبی و ارگانولپتیکی با استفاده از فیلم‌های ژلاتینی – اسانس زیره سبز مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف میانگین نتایج بین حالات مختلف مطالعه با کمک آزمون آماری تست تحلیل واریانس و برای اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated Measures (ANOVA با حد احتمال $p>$ ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اختلافات شاخص کلی بین گروه‌ها و روزها به کمک آزمون تعقیبی دانکن (Duncan) بررسی شد. کلیه

این آزمونها در نرم‌افزار SPSS شماره ۲۱ انجام شد.

نتایج

آنالیز اسانس زیره سبز: اسانس دانه‌های زیره سبز با روش تقطیر با بخار آب به‌دست آمد. بازدهی دانه‌های نمونه گیاه زیره سبز، در تهیه اسانس برابر با ۳/۵ درصد (وزنی/حجمی) بود. ترکیب اجزای اسانس با استفاده از روش رنگ نگاری گازی متصل به طیف‌سنج جرمی در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس تفسیر نتایج به‌دست آمده ۱۳ نوع ترکیب عمده شناسایی شدند که ۹۷/۹۳ درصد از اسانس فوق را تشکیل می‌دادند. عمده‌ترین ترکیب موجود، کومین آلدئید به میزان ۲۸/۹۶ درصد و سایر ترکیبات مهم شامل بتاترپینیل بوتانوات (۲۲/۱۷)، بتاپینن (۱۴/۹۳ درصد) و پاراسایمن (۹/۴۰ درصد) بود. اجزای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱. آنالیز اجزای تشکیل دهنده اسانس زیره سبز

شمارش میکروبی : شمارش کلی باکتری‌های *مزوفیل*، *سودوموناس* و باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک حالات ترکیبی فیلم ژلاتین ۴درصد به تنهایی و به همراه غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز نشان داد که کاهش رشد باکتری‌های مزوفیل، سودوموناس و تولیدکننده اسیدلاکتیک همگام با افزایش غلظت‌های اسانس همراه بود و طی ۱۲ روز به ترتیب در گروه کنترل و تیمار، ۲و ۱ لوگ افزایش باکتری‌ها مشاهده گردید. به عبارتی فیلم ژلاتین به تنهایی در مقایسه با فیلم ژلاتین حاوی اسانس خاصیت ضد باکتریایی کمتری را نشان داد (جدول شماره ۱، ۲ و ۳).

جدول ۱- تعداد باکتری‌های هوازی مزوفیل (Log10 CFU/g) کروه‌های بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین ۴٪ آغشته به غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز

غلظت اسانس زیره سبز (درصد)	روز مطالعه (میانگین±انحراف معیار)					
	صفر	دوم	چهارم	هفتم	نهم	دوازدهم
صفر	۰/۴۹±۴/۸	۰/۴۲±۴/۲۹	۰/۱۱±۴/۷۳	۰/۱۱±۰۵/۱۲	۰/۱۸±۵/۹۷	۰/۱۷±۶/۲۸
۰/۳	۰/۴۹±۴/۸	۰/۱۴±۳/۹۴	۰/۰۸±۴/۱۹	۰/۱۰±۴/۶۰	۰/۱۰±۵/۰۴	۰/۱۲±۵/۹۰
۰/۶	۰/۴۹±۴/۸	۰/۹۲±۳/۸۱	۰/۰۵±۴/۰۷	۰/۲۳±۴/۳۶	۰/۱۴±۴/۷۶	۰/۱۰±۵/۴۳
۰/۹	۰/۴۹±۴/۸	۰/۴۰±۳/۶۶	۰/۰۷±۳/۸۶	۰/۰۷±۴/۰۲	۰/۱۲±۴/۶۸	۰/۱۵±۵/۰۶

جدول ۲-تعداد باکتری‌های *سودوموناس* (Log10 CFU/g) در گروه‌های بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین ۴٪ آغشته به غلظتهای مختلف اسانس زیره

غلظت اسانس زیره سبز (درصد)	روز مطالعه (میانگین± انحراف معیار)					
	صفر	دوم	چهارم	هفتم	نهم	دوازدهم
صفر	۲/۳۸±۰/۱۴	۲/۳۳±۰/۰۴	۲/۴۹±۰/۰۶	۳/۰۴±۰/۲۶	۳/۶۶±۰/۱۵	۴/۰۳±۰/۱۴
۰/۳	۲/۳۸±۰/۱۴	۲/۲۹±۰/۰۲	۲/۳۳±۰/۱۷	۲/۸۰±۰/۰۸	۳/۴۵±۰/۰۷	۳/۹۸±۰/۰۴
۰/۶	۲/۳۸±۰/۱۴	۲/۲۳±۰/۱۲	۲/۲۸±۰/۰۸	۲/۵۸±۰/۰۷	۳/۱۱±۰/۱۶	۳/۴۷±۰/۱۸
۰/۹	۲/۳۸±۰/۱۴	۲/۰۱±۰/۰۷	۲/۱۹±۰/۲۰	۲/۳۷±۰/۱۰	۲/۹۱±۰/۰۵	۳/۲۴±۰/۱۴

جدول۳- تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک (Log10 CFU/g) در گروه‌های بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین ۴٪ آغشته به غلظتهای مختلف اسانس زیره سبز

غلظت اسانس زیره سبز (درصد)	روز مطالعه (میانگین± انحراف معیار)					
	صفر	دوم	چهارم	هفتم	نهم	دوازدهم
صفر	۴/۴۶±۰/۰۹	۴/۹۰±۰/۲۶	۵/۲۳±۰/۱۵	۵/۶۸±۰/۱۲	۵/۹۴±۰/۰۱	۶/۰۲±۰/۳۰
۰/۳	۴/۴۶±۰/۰۹	۴/۶۱±۰/۰۷	۴/۸۹±۰/۰۲	۵/۴۱±۰/۰۷	۵/۷۰±۰/۰۵	۵/۸۳±۰/۲۰
۰/۶	۴/۴۶±۰/۰۹	۴/۲۷±۰/۱۱	۴/۵۴±۰/۰۵	۵/۱۹±۰/۰۴	۵/۳۳ ± ۰	۵/۵۴±۰/۱۱
۰/۹	۴/۴۶±۰/۰۹	۴/۱۲±۰/۱۳	۴/۲۰±۰/۰۸	۴/۸۳±۰/۰۹	۵/۰۶±۰/۲۹	۵/۳۰±۰/۰۹

تعداد سودوموناس‌ها و باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک در هر روز و با افزایش غلظت اسانس به ترتیب و تعداد باکتری‌های مزوفیل روند کاهشی را نشان داد. بین گروه‌های ۰/۶ و ۰/۹ اسانس در کلیه روزها اختلاف آماری معنی‌دار نبود.

شمارش باکتری‌های سرمادوست و باکتری‌های انتروباکتریاسه: اختلاف آماری باکتری‌های سرمادوست و باکتری‌های انتروباکتریاسه بین حالات ترکیبی نوع فیلم ژلاتین– غلظت اسانس بررسی شد که با توجه به نتایج به‌دست آمده، کاربرد غلظت ۰/۹ درصد و ۰/۶ درصد اسانس زیره سبز در مقایسه با سایر غلظت‌ها کاهش بیشتری در تعداد میکروارگانیسم(لوگ) نشان داد. همچنین میزان لگاریتم باکتری‌های سرمادوست خصوصاً پس از کاربرد غلظت‌های افزایشی اسانس زیره سبز در روز صفر اختلاف آماری معنی‌دار بیشتری را نشان داد ($P<0/05$). همچنان که با کاربرد ژلاتین۴ درصد غلظت ۰/۹ درصد اسانس به طور معناداری موجب کاهش تعداد باکتری‌ها شد (جدول ۴ و ۵).

جدول ۴- تعداد باکتری‌های سرمادوست (Log10 CFU/g) در گروه‌های بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین ۴٪ آغشته به غلظتهای محتلف اسانس زیره سبز

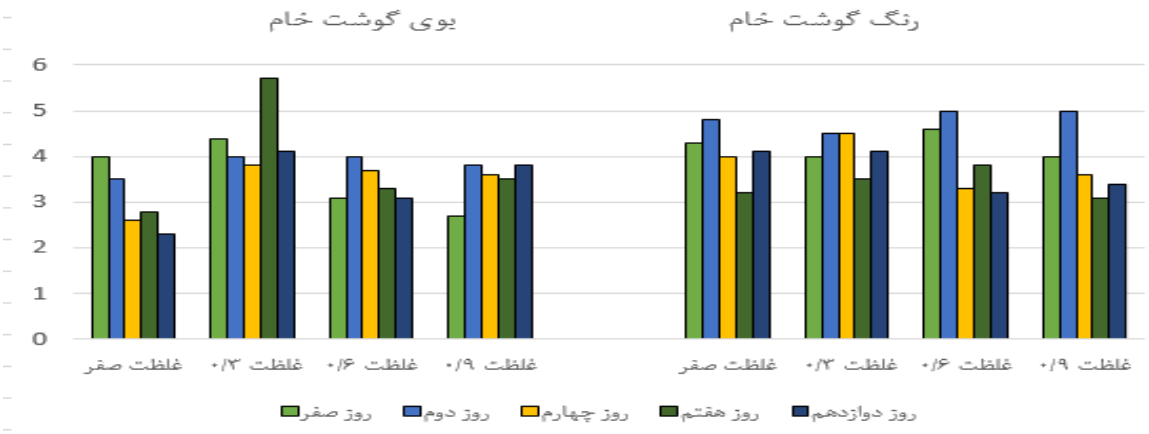
غلظت اسانس زیره سبز (درصد)	روز مطالعه (میانگین± انحراف معیار)					
	اول	دوم	چهارم	هفتم	نهم	دوازدهم
صفر	۰/۰۹±۳/۷۳	۰/۱۶±۳/۴۱	۰/۰۸±۳/۹۸	۰/۱۲±۴/۶۲	۰ ±۵/۷۷	۰ ±۶/۲۶
۰/۳	۰/۰۹±۳/۷۳	۰/۰۸±۳/۳	۰/۰۵±۳/۷۱	۰±۴/۴۳	۰/۰۲±۵/۲۱	۰ ±۵/۸۵
۰/۶	۰/۰۹±۳/۷۳	۰۱±۳/۲	۰ ±۳/۳	۰ ± ۴	۰۴ ±۴/۶	۰ ±۵/۲۱
۰/۹	۰/۰۹±۳/۷۳	۰ ±۲/۹	۰ ±۳/۲	۰±۳/۶	۰ ±۴/۱	۰ ±۴/۴۶

جدول ۵- تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه (Log10 CFU/g) در نمونه‌های بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین ۴٪ آغشته به غلظت‌های محتلف اسانس زیره سبز

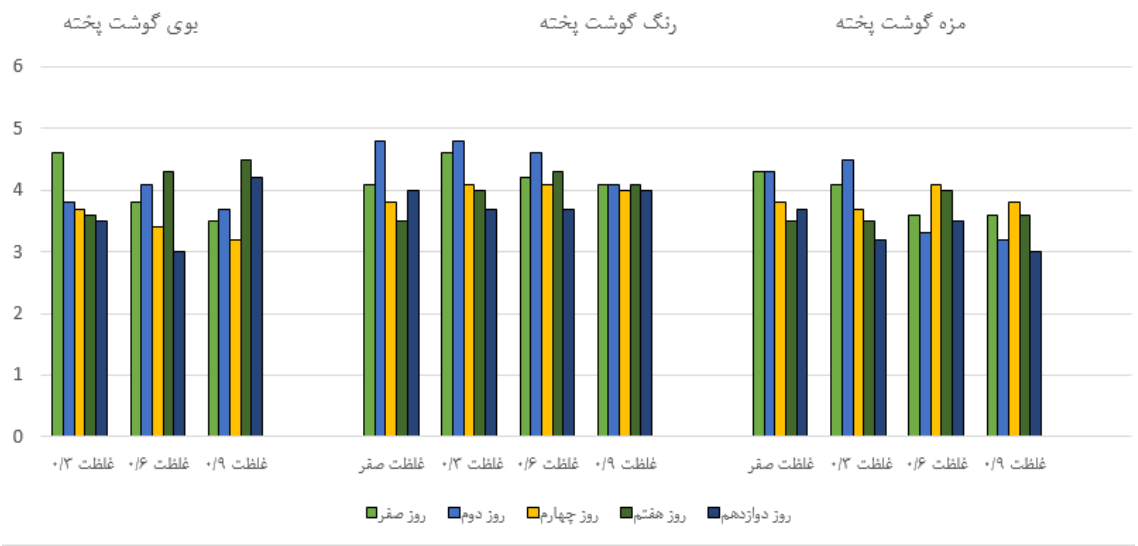
غلظت اسانس زیره سبز (درصد)	روز مطالعه (میانگین± انحراف معیار)					
	صفر	دوم	چهارم	هفتم	نهم	دوازدهم
صفر	۰/۰۸±۲/۶۱	۰/۱±۲/۳۱	۰/۰۸±۲/۹۵	۰/۰۶±۳/۶۳	۰/۰۶±۴/۶۶	۰/۰۶±۵/۲۶
۰/۳	۰/۰۸±۲/۶۱	۰.۹±۲/۳۰	۰/۰۴±۲/۷۳	۰/۰۹±۳/۴۳	۰/۰۷±۴/۲۳	۰/۰۸±۴/۶۵
۰/۶	۰/۰۸±۲/۶۱	۰.۸±۲/۲۵	۰/۰۷±۲/۴۹	۰/۰۷±۳/۰۳	۰/۰۹±۴/۱۲	۰/۰۵±۴/۱۹
۰/۹	۰/۰۸±۲/۶۱	۰۷.±۱/۹۶	۰/۰۵±۲/۱۸	۰/۰۹±۲/۶۳	۰/۰۴±۴/۰۳	۰/۱±۴/۱۱

کپک و مخمر: در دو گروه کنترل و تیمار ضمن روند افزایشی رشد کپک و مخمر بین کلیه غلظت‌ها (صفر با ۰/۳ ، ۰/۳ با ۰/۶ و ۰/۶ با ۰/۹ اسانس) اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید. هر چند فقط بین غلظت صفر و ۰/۹ درصد از نظر آماری معنی‌دار بود. و روند افزایش رشد کپک و مخمر طی ۱۲ روز در مقایسه با رشد و تعداد بقیه موارد باکتریایی کمتر می‌باشد به عبارتی خاصیت آنتی‌میکروبیال در مورد رشد کپک بیشتر از بقیه موارد میکروبی بود.

شاخص‌های ارگانولپتیکی: در ارزیابی حسی رنگ و بوی مرغ (۵: بسیار خوب ۴:خوب ۳: متوسط ۲: بد و ۱: بسیار بد)، عدم مقبولیت از روز هفتم به بعد مشهود بود و بین گروه کنترل با گروه تیمار (غلظتهای ۰/۳ ، ۰/۶ و ۰/۹ درصد اسانس زیره سبز) این اختلاف آماری مشهود بود. نتایج ارگانولپتیک در گوشت خام (رنگ و بو) و گوشت مرغ پخته (رنگ و بو و مزه) نشانگر مصرف گوشت مرغ تا روز هفتم نگهداری در یخچال می‌باشد. بهترین حالت فیلم ترکیبی ژلاتین ۴درصد (با توجه به بو و مزه اسانس زیره سبز) به همراه غلظت ۰/۶ درصد اسانس زیره سبز و جهت ۷ روز نگهداری در شرایط یخچالی توصیه می‌شود (شکل ۲ و ۳).



شکل۲- ارزیابی حسی نمونه‌های گوشت مرغ خام بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین ۴ ٪آغشته به غلظتهای محتلف اسانس زیره سبز



شکل۳- ارزیابی حسی نمونه‌های گوشت مرغ پخته بسته‌بندی شده با فیلم ژلاتین ۴ ٪آغشته به غلظت‌های محتلف اسانس زیره سبز

بحث و نتیجه‌گیری

فیلم خوراکی جایگزین خوبی برای فیلم‌های شیمیایی زیست تخریب ناپذیر جهت افزایش ماندگاری مواد غذایی با منشأ دامی محسوب می‌شوند. این فیلم‌ها به عنوان موانعی برای بخار آب، اکسیژن و دی اکسید کربن بوده و همچنین می‌توانند حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد جلوگیری‌کننده از رشد میکروارگانیسم‌های مولد عفونت و مسمومیت باشند (۱۱). در این مطالعه ضمن بررسی خواص ضد میکروبی بسته‌بندی ژلاتین ۴درصد، تأثیر باکتریو استاتیک غلظتهای مختلف اسانس زیره سبز بر روی رشد میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی، انتروباکتریاسه، سودوموناس ، باکتری‌های سرمادوست و تولیدکننده اسیدلاکتیک و کپک و مخمر بر نگهداری گوشت مرغ در شرایط یخچالی و طی دوازده روز نگهداری بررسی شد.

اثرات ضد میکروبی اسانس زیره سبز در مطالعات مختلفی آورده شده است. به طوری که در مطالعه حسینی جزنی و همکاران (۲۰۰۸) تأثیر اسانس زیره سبز بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه زیره سبز به عنوان یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی معرفی گردید (۱۲).

ناناسومبات و لوهان سوپتاوی (۲۰۰۵) هم اثر ۱۸ اسانس گیاهی مختلف را بر گونه‌های مختلف سالمونلا و چند گونه انتروباکتریاسه مورد بررسی قرار دادند که در این میان اسانس زیره سبز پس از اسانس گیاه میخک و کفیر بیشترین هاله عدم رشد را بر باکتری‌های مزبور نشان داد (۱۲). با آن که مطالعات زیادی درباره خواص ضد باکتریایی اسانس‌های مختلف شده است ولی مقایسه نتایج آنها با یکدیگر بسیار مشکل می‌باشد. از دلایل آن می‌توان تفاوت در روشهای مختلف بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها، منابع تهیه آنها و سویه‌های باکتریایی به‌کار برده شده می‌باشد. بنابراین نتایج به دست آمده در مطالعات، مختلف و بعضاً متفاوت می‌باشد (۸).

بهترین روش برای تهیه اسانس آن تقطیر با بخار آب است. زیرا در این روش اجزای اسانس به وسیله دستگاه GC/mass با درصد خلوص بالا و به صورت مرغوب‌تری استخراج می‌گردند. در مطالعه هایلاوی و همکاران (۲۰۱۰) نیزکه ترکیبات اسانس روغنی

زیره سبز را به روش GC/MS مورد ارزیابی قرار دادند، میزان کومین آلدهید ۳۹/۴۸ درصد، گاماترپینن ۱۵/۲۷، بتاپینن ۱۱/۱۳ درصد و پاراسایمن ۱۱/۸۲ درصد و ۲- کارن- ۱۰- ال ۷/۹۳ درصد گزارش شده است. در این مطالعه نیز مشابه مطالعه مشاک (۱۳۹۴) عمده‌ترین ترکیب موجود در اسانس روغنی زیره سبز، کومین آلدهید به میزان ۲۸/۹۶ درصد و سایر ترکیبات مهم شامل بتاترپینیل بوتانوات (۲۲/۱۷)، بتاپینن (۱۴/۹۳ درصد) و پاراسیمن (۹/۴۰ درصد) بود (۱۳) .

تفاوت درصد اجزای متشکله هر اسانس از جمله اسانس زیره سبز مورد مطالعه در این تحقیق با دیگر تحقیقات می‌تواند تحت تأثیر فصل برداشت، نحوه خشک کردن، سن گیاه، منطقه جغرافیایی رشد گیاه و... باشد. اما در مقالات متعدد مهم‌ترین جزء اسانس زیره سبز کومین آلدهید گزارش شده است. در بررسی لاکوبلیس و همکاران (۲۰۰۵) بیان شد ترکیبات زیره سبز شامل فنول، پینن، آلفا ترپینول، آپی ژنین، فلاوونوئید بوده که علاوه بر آروما‌ی خاص دارای خاصیت ضد میکروبی نیز می‌باشد. این ترکیبات اغلب از طریق ایجاد سوراخ در غشای سلول باکتری‌های گرم مثبت و تخریب غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی، خاصیت ضد میکروبی خود را ازطریق اختلال عمل در غشای سیتوپلاسمی، اختلال در نیروی محرکه پروتونی و انعقاد محتویات سلولی اعمال می‌نماید (۱۴).

ژلاتین مخلوط ناهمگنی از پروتئین‌های محلول در آب با وزن مولکولی بالاست و دارای توانایی بسیار خوب برای تشکیل فیلم می‌باشد (۱۵) . لذا پتانسیل خوب ژلاتین آن را بیشتر به عنوان یک ماده پوشش‌دهنده در محصولات گوشتی مطرح نموده است (۱۵،۱۶). در مطالعات مختلف از فیلم‌های ژلاتینه با درصدهای مختلف استفاده شده است به طوری که نورحنانی و همکاران (۲۰۱۲) پوشش ژلاتین ۴ درصد را مانع خوبی در برابر رطوبت اعلام نموده اند (۱۶). در حالی که آنتونیوسکی و همکاران (۲۰۰۷) از پوشش ژلاتینی (۲۰درصد) جهت حفظ رطوبت گوشت گاو، جوجه و فیله ماهی آزاد استفاده کردند (۱۷). همچنین کوی و همکاران (۲۰۱۸) به منظور کاهش :*E.coli* O157 H7در خیار دریایی از ژلاتین با دو غلظت ۶ و۹ (mg/mL) در۱۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴ روز موفق به کاهش ۴/۲۸ و ۴/۹۷ لوگ باکتری گردیدند. در مطالعه کنونی نیز از غلظت ۴درصد ژلاتین در تهیه فیلم استفاده شده است (۱۹). در بررسی انجام شده، فیلم ژلاتین عامل مهمی در افزایش ماندگاری محصولات گوشتی شده بود (۱۹) و ممانعت خوب آن نسبت به اکسیژن، سبب شده بود که به عنوان عامل ضد اکسایش لیپید و به تعویق انداختن رشد کپک‌ها مطرح باشد (۲۰). در این مطالعه نیز این خاصیت ژلاتین تا روز هفتم مشاهده شد به طوری که تعداد کپک و مخمرها در روز نهم در مقایسه با روز صفر نمایانگر یک لوگ افزایش بود. با توجه به استاندارد شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی (مضربی از10^6) فیلم ژلاتین ۴درصد به تنهایی تا روز نهم نگهداری توانسته بود از فساد گوشت مرغ جلوگیری نماید.

فعالیت کم ضد میکروبی محلول ژلاتینی بیشتر به علت وجود زنجیره الیگوپپتیدی حاصل از آبکافت ژلاتین می‌باشد. در مطالعه او و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که میزان بار باکتریائی فیله‌های تیلاپیا پوشش داده شده با ژلاتین تفاوت معنی‌داری با فیله‌های بدون پوشش هنگام نگهداری در یخچال ندارند (۲۱). در مطالعه کلته صونا و همکاران (۱۳۹۳) نیز میانگین شمارش کلی باکتری‌ها و باکتری‌های سرمادوست در بسته‌بندی فیلم ژلاتین ۴درصد بر روی ماهی طی ۱۲ روز حدوداً ۲ لوگ مشاهده گردید که با نتایج حاصل از

مطالعه ما مشابهت دارد (۲۲). استفاده از افزودنی‌های طبیعی ضد میکروبی نظیر اسانس‌های روغنی در فیلم و یا فیلم‌های با پایه ژلاتینی در بسته‌بندی مواد غذایی با هدف افزایش ماندگاری مواد غذایی افق روشنی را پیش رو دارد . به طوری که مارتوچی و همکاران (۲۰۱۵) از فیلم‌های ژلاتینی حاوی اسانس‌های روغنی اسطوخودوس یا اورگانو یا مخلوطی از آنها در غلظت‌های بین صفر و ۰/۰۰۶ PPm استفاده نمودند در بررسی خواص ضد میکروبی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* رشد بیشتر و باکتری گرم منفی *اشریشیا کلای* رشد کمتری داشتند (۲۳). نتایج مشابهی توسط آلپارسلان و همکاران (۲۰۱۶) نیز در مورد فیلم‌های ژلاتین آغشته به اسانس روغنی برگ پرتقال بر علیه ۵ باکتری غذازاد با استفاده از روش ژل دیفیوژن آگار حاصل شد که بیشترین خصوصیت ضد میکروبی مربوط به *اشریشیاکلی* و سپس استاف *اورئوس* بود (۲۴) . در مطالعه گومز و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی فیلم‌های ژلاتین آغشته به اسانس روغنی میخک صورت گرفت مشاهده نمودند که حلالیت فیلم ژلاتینی افزایش یافته بود که این به دلیل استقرار تعامل بین پروتئین و پلی فنل‌های اسانس در مقایسه با عدم کاربرد اسانس بوده است (۲۵). در مطالعه کاووسی و همکاران (۲۰۱۳)که از فیلم ژلاتین ۱۰درصد و اسانس کاروکرول استفاده نمودند افزایش خاصیت ضد باکتریایی(هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی) را گزارش نمودند. پوشش‌های پروتئینی نسبت به پلی‌ساکاریدها از نظر ممانعت‌کنندگی در برابر نفوذ گازهای اکسیژن و دی اکسیدکربن برتری دارند (۲۶) که این نیز با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. نتایج ارگانولپتیک در گوشت خام (رنگ و بو) و گوشت مرغ پخته (رنگ و بو و مزه) نشانگر مصرف گوشت مرغ تا روز هفتم نگهداری در یخچال می‌باشد. بهترین حالت فیلم ژلاتین ۴درصد (با توجه به بو و مزه اسانس زیره سبز) به همراه غلظت ۰/۶ درصد اسانس زیره سبز و جهت ۷ روز نگهداری در شرایط یخچالی توصیه می‌شود. کاربرد اسانس زیره سبز به دلیل گروه‌های فعال ترپنوئیدی و فنلی اثرات آنتی اکسیدانی فیلم ترکیبی مزبور را بهبود بخشیده است. بنابراین با توجه به این نتایج که نشان‌دهنده کاهش میکروبی همگام با افزایش غلظت اسانس زیره سبز متعدد و عدم تغییر خصوصیات حسی با اعمال تیمارهای آزمایشی در گوشت مرغ در شرایط یخچالی بود می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده توأمان ژلاتین۴درصد همراه با اسانس ۰/۶ درصد زیره سبز می‌تواند تا ۷ روز نگهداری مرغ را در شرایط یخچالی افزایش دهد و بنابراین استفاده از این فیلم پروتئینی ژلاتینه-اسانس زیره سبز برای افزایش مدت نگهداری این محصول پیشنهاد می‌گردد.

References

1. Dave D, Ghaly AE. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. American J agric. biol. 2011; 6(4):486-510.

2- USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. United state department of agriculture. 2014.

3- Ustunol Z. Edible films and coatings for meat and poultry. Edible films and coatings for food applications: Springer; 2009. p. 245-68.

4- Bourtoom T. Edible films and coatings: characteristics and properties. Inter Food Res J. 2008; 15(3):237-48.

5- Yang L, Paulson A. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. Food res inter. 2000; 33(7):571-78.

6- Karim AA, Bhat R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Food Hydrocoll. 2009; 23(3):563-76.

7- Kester JJ, Fennema O. Edible films and coatings: a review. Food technology (USA). 1986.

8- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3):223-53.

9- Abdalla AE, Darwish SM, Ayad EH, El-Hamahmy RM. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. Food Chem. 2007; 103(4):1141-52.

10- Russo M, Suraci F, Postorino S, Serra D, Roccotelli A, Agosteo GE. Essential oil chemical composition and antifungal effects on Sclerotium cepivorum of Thymus capitatus wild populations from Calabria, southern Italy. Rev bras farmacogn. 2013; 23(2):239-48.

11- Vásconez MB, Flores SK, Campos CA, Alvarado J, Gerschenson LN. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. Food Res Int. 2009;42(7):762-69.Hosseini Jazani N, Zartoshti M, Shahabi S. Antibacterial effects of Iranian Cuminum cyminum essential oil on burn isolates of Pseudomonas aeruginosa. Inter J Pharmacol. 2008; 4(2):157-59.

12- Nanasombat S. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonelae and other enterobacteria. KMITL Sci Tech J. 2005; 5(3):527-38.

13- Mashak Z. Predictive mathematical models for evaluation of Cuminum cyminum L. and temperature storage effect on Bacillus cereus in BHI broth. J food microbiol 2016; 2(4):57-70.

14- Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. essential oils. J Agri food chem. 2005; 53(1):57-61.

15- Feng F, Liu Y. Advances in researches on chitosan materials in bone repair. Mater Rev. 2004; 18:65-68.

16- Niani A, Khajeh-Rahimi A-E. Effect of Gelatin Coating on Fatty Acid Composition of Grass Carp (Ctenopharyngodon idella) During Refrigerated-Storage. World J Fish Mar Sci. 2012; 4(5):462-66.

17- Antoniewski MN, Barringer S, Knipe C, Zerby H. Effect of a gelatin coating on the shelf life of fresh meat. J Food Sci. 2007; 72(6).

18- Nur Hanani ZA, Beatty E, Roos YH, Morris MA, Kerry JP. Development and characterization of biodegradable composite films based on gelatin derived from beef, pork and fish sources. Foods. 2013; 2(1):1-17.

19- Cui H, Bai M, Rashed MM, Lin L. The antibacterial activity of clove oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers against Escherichia coli O157: H7 biofilms on cucumber. Int J Food Microbiol. 2018; 266:69-78.

20- Gómez-Estaca J, Montero P, Giménez B, Gómez-Guillén M. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (Sardina pilchardus). Food Chem. 2007; 105(2):511-20.

21- Ou CY, Tsay SF, Lai CH, Weng YM. Using gelatin-based antimicrobial edible coating to prolong shelf-life of tilapia fillets. J Food Qual. 2002; 25(3):213-22.

22- Kalteh S, Alizadeh Doughikollaee E, Yousef Elahi M. Effect of edible gelatin coating on the quality of fish finger of Hypophthalmichthys molitrix during refrigerated storage. J Food Sci Tech (2008-8787). 2015; 12(48):79-88.

23- Martucci JF, Gende LB, Neira L, Ruseckaite RA. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. Ind Crops Prod. 2015; 71:205-13.

24- Alparslan Y, Yapıcı HH, Metin C, Baygar T, Günlü A, Baygar T. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin. LWT-Food Sci Tech. 2016; 72:457-66.

25- Gómez-Estaca J, De Lacey AL, López-Caballero M, Gómez-Guillén M, Montero P. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiol. 2010; 27(7):889-96.

26- Kavoosi G, Dadfar SMM, Mohammadi Purfard A, Mehrabi R. Antioxidant and antibacterial properties of gelatin films incorporated with carvacrol. J Food Saf. 2013; 33(4):423-32.

Study of the effect of gelatin and cumin essential oil on microbial and organoleptic properties of chicken meat under refrigrator conditions

Manizheh Rezaloo[1]; Zohreh Mashak*[2]; Amir Shakerian[3]

1- Graduated M.Sc. from Food hygine and Quality Control, Faculty of veterinary medicine, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Department of food hygiene and quality control, Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic Azad University, karaj, Iran
3- Department of food hygiene and quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Receive: July 3, 2018; Revise: July 29, 2018; Accept: September 10, 2018

Summary

Chicken meat is one of the high-freshness foods and is capable of being kept in refrigerated conditions for 3 days. Four chicken slaughted the same day under sterile conditions and 24 samples of chicken meat (fillet), 70 grams per sample, were prepared. The samples were immersed in 4% gelatin films with three concentrations of essential oil of cumin (0.3.0.6.0.9) and 0% control group of essential oil of cumin under refregrator conditions. Aerobic bacteria, Psychrophile bacteria, Anthrobacteriaceae, Pseudomonas and lactic acid bacteria, and organoleptic properties were studied in these groups during 0, 2, 4, 7 and 12 days. The results showed that with the increasing use of essential oil of cumin, the number of enterobacteriacea, pseudomonas, lactic acid, mold and yeast, and total number of bacteria decreased; and especially with concentrations of 0.6 and 0.9, decreasing was more significant. In the sensory evaluation of chicken's color and odor, the unpopularity was evident from the seventh day onwards. The best 4% gelatin film (due to the smell and taste of cumin essential oil) is recommended at 0.6% cumin essential oil and 7 days in refregrator conditions.

***Keywords**:* Chicken Meat, refrigerator conditions, Gelatin, Cumin essential Oil

مطالعه کمی و کیفی آنتی‌بادی IgY طیور به‌دست‌آمده از تخم برخی پرندگان اهلی و زینتی

محمد مهدی رنجبر*[۱]، محمدحسین بنی طبا بیدگلی[۱]، سعید عالمیان[۱]، نوید داداش پور دواچی[۱]

۱ - موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

دریافت مقاله: ۳۰ بهمن ۱۹۳۶، بازنگری: ۳ خرداد ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۵ مرداد ۱۳۹۷

چکیده

پرندگان در زرده‌ی تخم خود ایمونوگلوبین Y (IgY) که معادل IgG پستانداران است را می‌سازند. در این مطالعه به بررسی کیفی و کمی آنتی‌بادی‌های استخراج شده از زرده‌ی تخم برخی از پرندگان اهلی و زینتی از جنبه‌های مختلف پرداخته شده است. محتوای چربی زرده تخم شش گونه مختلف از پرندگان اهلی و زینتی پس از ضد عفونی و اندازه‌گیری میانگین وزنی و میزان زرده، جدا گردید. میزان سرم به‌دست آمده ثبت و رسوب آنتی‌بادی در دو مرحله متوالی با سولفات آمونیوم صورت گرفت و پس از دیالیز، آنتی بادی استخراج گردید. در مرحله نهایی، OD مقدار کمّی آنتی‌بادی، برای هر کدام از نمونه‌ها به طور جداگانه، در طول موج‌های متفاوت برحسب ml/µg محاسبه و تجزیه و تحلیل انجام گرفت. میانگین وزنی تخم غاز، اردک، مرغ بومی، کبوتر، بلدرچین و مرغ عشق به ترتیب: ۱۴۵/۵، ۶۲/۷، ۵۷/۴، ۱۹/۵، ۱۲/۴ و ۶/۱ گرم و نسبت وزن زرده به وزن تخم ۰/۳۲، ۰/۳۱، ۰/۲۳، ۰/۱۶، ۰/۲۱ و ۰/۲۱ و مقدار سرم به دست آمده به ترتیب برابر با ۵۲، ۱۲/۵، ۱۵، ۳/۷۵، ۳ و ۱/۵ میلی‌لیتر گزارش شد. نتایج غلظت آنتی‌بادی استحصالی از هر تخم نیز به ترتیب قبلی ۶۰۴۵۰ ، ۱۰۶۳۱/۲۵، ۱۲۰۲۶، ۵۲۰۳ و ۲۵۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در OD280 به‌دست آمد. نتایج حاکی از بیشترین آنتی‌بادی استحصالی از غاز و سپس مرغ بومی و همچنین امکان استفاده مناسب از بلدرچین به عنوان جایگزین مرغ بود.

واژگان کلیدی: *آنتی بادی، تخم مرغ، IgY*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mm.ranjbar.phd@gmail.com

مقدمه

آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ پرندگان IgY معادل عملکرد آنتی‌بادی IgG است که در سرم، جفت و آغوز پستانداران یافت می‌شود. در پرندگان (ماکیان) آنتی‌بادی‌های IgY به‌طور انتخابی به گیرنده‌های به‌خصوصی از سرم مرغ متصل و به زرده تخم‌مرغ منتقل می‌شوند و سبب مصونیت جنین آنها می‌گردند (۱).

زمانی که سلول‌های لنفوسیت B در پاسخ سیستم ایمنی هومورال پرنده فعال می‌شوند، تقسیم شده و تبدیل به پلاسماسل تولیدکننده آنتی‌بادی بر علیه یک آنتی‌ژن بخصوص می‌گردند. آنتی‌بادی‌ها (ایمونوگلوبولین‌ها) گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در دفاع علیه عوامل بیماری‌زا نقش ایفا می‌کنند. سه نوع اصلی آنتی‌بادی در پرندگان جهت مواجه شدن با اجرام پاتوژن وجود دارد که عبارت هستند از: IgM IgY, IgG , و IgA ایمونوگلوبین IgY به عنوان فراوان‌ترین ایمونوگلوبین (آنتی‌بادی) در سرم پرندگان شناخته می‌شود (۳،۲).

به‌کارگیری تکنولوژی‌های کارا نظیر تولید آنتی‌بادی در زرده تخم‌مرغ IgY با اهداف کاربردهای درمانی- تشخیصی در حال گسترش روزافزون می‌باشد و جوجه‌ها به عنوان تولیدکننده‌های کارای ایمونوگلوبولین (IgY) در زرده تخم‌مرغ شناخته می‌شوند (۱). IgY موجود در زرده تخم‌مرغ دارای وزن مولکولی 180 KDa است که وزنی بالاتر از همتای IgG خود در پستانداران دارد و همچنین نقطه ایزوالکتریک آن پائین‌تر (۷/۶-۵/۷) است که سبب می‌شود خصوصیات فیزیکو شیمیایی آن اندکی با IgG پستانداران متفاوت باشد. از سوی دیگر، سیستم کمپلمان را فعال نمی‌کند و با فاکتور روماتوئید تداخلی ندارد (۴، ۵).

از نقطه نظر رعایت حقوق حیوانات، ماکیان جایگزین مناسبی برای تولیدکنندگان آنتی‌بادی در مقادیر بالا بوده و نیازی به مهار و استفاده از روش‌های تهاجمی نظیر خون‌گیری نمی‌باشد (۶، ۸).

در مطالعات بسیاری، از IgY به دلیل غیر تهاجمی بودن روش تهیه آن (به سبب برداشت از تخم مرغ و عدم خونگیری)، غنی بودن منبع آن، فاصله فیلوژنتیک این آنتی‌بادی از پستانداران، قیمت ارزان، سادگی دسترسی و کار با آن (۹)، عمر نسبتاً بالای آن نسبت به سایر حیوانات آزمایشگاهی برای تولید سرم و در نهایت در تولید سرم هایپر ایمن استفاده شده است (۱۰). همچنین IgY موجود در زرده تخم‌مرغ جوجه را می‌توان در مقادیر بالا و به آسانی در مقایسه با IgG پستانداران تخلیص کرد. از طرف دیگر IgY در شرایط گوناگون نظیر حرارت، فشار، اسیدی و بازی و اثر آنزیم‌های پرتئولتیک نسبتاً پایدار است. همچنین IgY به پروتئین G و A و پذیرنده (Fc(Fragment of crystallization پستانداران متصل نمی‌شود، در صورتی‌که IgG پستانداران شدیداً تمایل به اتصال به آنها دارد که این امر گاهی منجر به وقوع مثبت کاذب در آزمایشاتی می‌شود که در آنها از IgG پستانداران استفاده می‌شود (۱۱).

تمایل اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن جزء عملکردهای اصلی ایمنی می‌باشد که منجر به خنثی‌سازی (Neutralization) و بی‌حرکت‌سازی (Immobilization) آنتی‌ژن می‌شود. به عنوان یک پلی‌کلونال آنتی‌بادی، IgY قابلیت اتصال به تعدادی از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی مختلف را دارد و توانایی بیشتری جهت پاسخ به آنتی‌ژن‌ها نسبت به مونوکلونال آنتی‌بادی را دارد، از این رو به‌طور رایج به عنوان ابزاری در ایمونولوژی به کار می‌رود. این خصوصیات و مزایای IgY به آن اجازه می‌دهد که محدوده وسیعی از کاربردها از جمله ایمن‌سازی غیرفعال، استفاده در آزمایشات تشخیصی و

جداسازی پروتئین‌ها و درمان بیماری‌ها را داشته باشد (۱۲، ۱۳).

از نگاه اقتصادی، حداقل قیمت هر گرم از IgY حدود ۱۰۰۰ دلار آمریکا است. سالیانه هر مرغ حدود ۳۰ گرم IgY تولید می‌کند. اگر فقط حداقل ۱۰ درصد از آن آنتی‌بادی اختصاصی IgY باشد (حدود سه گرم)، درآمد تقریبی حاصله از هر مرغ در سال حدود ۳۰۰۰ دلار خواهد بود. بنابراین بهینه‌سازی تولید، استخراج و خالص‌سازی IgY می‌تواند ضمن تأمین نیازهای بخش صنعت و محققین و همچنین صرفه‌جویی در هزینه‌های تحقیقاتی، در آینده به منبع درآمد مطمئنی از محل قبول سفارش و فروش آنها تبدیل شود.

آنتی بادی IgY طیور جهت اهداف تشخیصی، پیشگیری و درمان: ماکیان را می‌توان جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه پاتوژن‌های بیماری‌زای متنوعی ایمن کرد. عملکرد اتصالی آنتی بادی‌ها به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور برای کاربردهای گوناگون آن‌ها بوده و آنتی‌بادی می‌تواند در به دام اندازی آنتی‌ژن (Capturing) و واکنش با آنتی‌ژن‌ها شرکت کند، از این بابت میزان عملکرد اختصاصی آن در مقابله و بی‌تحرک‌سازی آنتی‌ژن‌ها خصوصاً پاتوژن‌های باکتریایی و ویروسی حائز اهمیت است.

به عنوان پلی کلونال آنتی‌بادی، IgY قابلیت اتصال به تعدادی از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی مختلف را دارد و لذا توانایی بیشتری جهت پاسخ به آنتی‌ژن‌ها نسبت به مونوکلونال آنتی‌بادی دارد (۱۴،۱۳). به‌طور کلی، روز به روز تمایل به استفاده از زرده تخم‌مرغ جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای اهداف کاربردی و اقتصادی افزایش می‌یابد (۵، ۸، ۱۵). آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ IgY تا به حال به‌طور موفقیت‌آمیزی جهت اهداف علمی (۱۶)، تشخیصی (۱۷)، پیش‌گیرانه (۱۸، ۱۹) و درمانی (۲۰) و همچنین در دامپزشکی در مقابله با باکتری‌هایی نظیر *اشیرشیاکلی* انتروپاتوژنیک (۲۱) استفاده شده است.

تأثیر ایمونوگلوبولین Y در مقابله با باکتری‌های پاتوژن متنوع در پرندگان با موفقیت همراه بوده است. از IgY جهت کنترل *Salmonella enteridis* در جوجه‌ها و اردک‌ها، پیشگیری و درمان کمپیلوباکتر ژژونی در جوجه‌های بیمار، کاهش کلونیزاسیون *Clostridium perfringens* در جوجه های گوشتی، سرکوب کلونیزاسیون *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلای* و *کمپیلوباکتر ژژونی* در مرغ‌های تخم‌گذار، القای مقاومت نسبت به *اشریشیا کلای* عامل عفونت مجرای تنفسی در جوجه‌ها و کنترل عفونت *اشریشیا کلای* در خرگوش‌ها استفاده شده است. از سوی دیگر، مطالعات قبلی نشان داده است که IgY بر علیه سلول‌های *هلیکوباکتر* لیزشده در مرغ توانسته در درمان این عفونت کمک‌کننده باشد (۲۲). اخیراً نیز مشخص شده که آنتی‌بادی های IgY زرده در مرغ‌های هایپرایمن شده به طور غیر فعال قادرند مقاومت را علیه کوکسیدیوز پرندگان تازه از تخم درآمده ایجاد کنند (۲۳).

تحقیقات اخیر نشان داده است که آنتی‌بادی های زرده تخم‌مرغ می‌توانند جایگزینی مفید برای تشخیص و درمان ورم پستان در گاوها با عامل ارگانیسمی باشند. Zhen و همکارانش در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که IgY اختصاصی علیه Mastitis با عامل *استافیلوکوکوس اورئوس* رشد این باکتری را مهار کرده و فاگوسیتوز *استافیلوکوکوس اورئوس* را به وسیله ماکروفاژهای پستان بهبود بخشیده است (۲۴). Marco و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* به وسیله آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ کار کردند و گزارش دادند که رشد این باکتری به‌وسیله IgY اختصاصی در غلظت ۵-۱ میلی‌گرم مهار شد (۲۵). همچنین تجویز ایمونوگلوبولین پرنده IgY جهت محافظت از

عفونت روتاویروسی توسط Ebina و همکاران اثرات سودمندی را نشان داده است (۲۶). از سوی دیگر، برای کنترل مسمومیت غذایی می‌توان آنتی‌بادی مونوکلونال ضد *اشریشیا کلای* و سالمونلا نیز استفاده کرد (۲۷).

آنتی‌ونوم‌ها (پادزهرها) به واسطه ایمن‌سازی پستاندارانی نظیر اسب، بز، خرگوش با سم گونه‌هایی از مار و عقرب و سپس جداسازی ایمونوگلوبولین های تولید شده، به خصوص از خون حاصل می‌شوند و جهت درمان افرادی که مورد گزش عقرب و مار قرار گرفته‌اند، استفاده می‌شوند. به هر حال، تولید آنتی‌ونوم‌ها و تخلیص آن‌ها از خون پستانداران امری مشکل است و ممکن است در کاربرد درمانی باعث ایجاد واکنش‌های بالینی مختلف نظیر شوک انافیلاکسی، واکنش تب‌زایی، بیماری سرم، آرتریت و غیره گردد. به سبب پیشرفت‌های اخیر که در تکنولوژی ایمونوگلوبولین تخم‌مرغ حاصل شده است، تهیه آنتی‌ونوم ضد عقرب‌گزیدگی و مارگزیدگی امری جدید، امن‌تر، راحت‌تر و روشی ارزان‌تر برای ساخت آنتی‌ونوم به حساب می‌آید (۲۸).

تا کنون، چندین نوع IgY تک‌ظرفیتی علیه سموم مار و عقرب در تخم‌مرغ ایمن‌شده تولید شده است، که قادرند سم گونه‌های *Rattlesnake*، *Bothrops*، *Viper*، *cobra* *Indian* و *Krait* را خنثی کنند. به علاوه، IgY چندگانه (چند ظرفیتی) علیه Bitis و Naja با استفاده از سم‌های *B. arientans*، *B. nasicornis*، *B. rhinoceros*، *N. melanoleuca* و *N. mossambica* با ایمن‌سازی جوجه آماده شده است (۲۸).

با توجه به مزایای چشم‌گیر آنتی‌بادی‌های استحصالی از زرده تخم مرغ جوجه که به واسطه ایمن‌سازی اختصاصی آن‌ها حاصل می‌شود به نظر می‌رسد در آینده‌ای نزدیک، این آنتی‌بادی‌ها در مصارف درمانی، پیشگیری و تشخیصی در انسان و حیوانات بیش از گذشته مورد توجه قرار گیرد.

با توجه به هزینه‌های تولید، پرورش و نگهداری در مرغ، حساسیت به بیماری‌های متنوع جوجه مرغ ها و همچنین کلسترول بالای تخم‌مرغ آن، اخیراً تمایل به استفاده از پرندگان جایگزین افزایش یافته است. آقای Scholtz در سال ۲۰۱۰، تأثیر ایمن سازی را بر پاسخ ایمنی بلدرچین‌های تخم‌گذار علیه اورگانیسم‌های باکتریایی سنجید که نتایج آن رضایت‌بخش بود. این مطالعه این ایده را به وجود آورد که در آینده نزدیک ممکن است بتوان از پرندگان دیگر به عنوان منبع IgY استفاده کرد. در این مقاله، به بررسی کیفی و کمی آنتی‌بادی‌های استخراج شده از زرده تخم برخی از پرندگان اهلی و زینتی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه تخم پرندگان: تخم شش گونه مختلف پرنده اهلی و زینتی شامل: غاز، اردک، کبوتر، مرغ بومی، بلدرچین و مرغ عشق، از هر پرنده ۶ تخم، از شهرستان گرگان تهیه گردید. سپس تخم‌ها، از هر نوع آلودگی، تمیز گشته و با الکل ضد عفونی گردیدند و تا زمان استخراج در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و به آزمایشگاه انتقال داد شد.

اندازه‌گیری وزنی و استخراج زرده: پس از اندازه‌گیری میانگین وزنی تخم‌های هر گونه به طور مجزا، آنها را شکسته، غشاء کنار زده شده، محتویات زرده به دقت از سفیده جدا گردید و در لوله مخصوص ذخیره شدند. در گام بعدی، میزان زرده جدا شده، اندازه گیری و در محلول بافر فسفات (PBS)حل شد و سپس با استفاده از کلروفورم محتوای چربی زرده جدا گردید. میزان سرم به دست آمده پس از این مرحله یادداشت شد.

استخراج آنتی‌بادی: در ادامه بر روی سرم به دست آمده دو مرحله رسوب آنتی‌بادی با سولفات

آمونیوم اشباع و سولفات آمونیوم ۴۰درصد بر روی یخ و شیکر بر اساس روش Polson و همکاران صورت گرفت (۲۹). در مرحله بعد مایع رویی دور ریخته شده و رسوب مربوطه محلول بافر فسفات حل شد. سپس دو شبانه روز جهت جداسازی بقایای سولفات آمونیوم در کیسه مخصوص دیالیز، دیالیز شده و در نهایت آنتی‌بادی تخم استخراج گردید .

اندازه‌گیری آنتی‌بادی به‌دست آمده: در مرحله نهایی دانسیته‌ی نوری (OD) آنتی‌بادی استحصالی برای هر کدام از نمونه‌ها به طور جداگانه جهت به‌دست آوردن مقدار کمی آنتی‌بادی برحسب ml/µg محاسبه گردید و نتایج به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

میانگین وزنی تخم‌های غاز، اردک، مرغ بومی، کبوتر، بلدرچین و مرغ عشق به‌دست آمده به ترتیب؛ ۱۴۵/۵، ۶۲/۷، ۵۷/۴، ۱۹/۵، ۱۲/۴ و ۱/۶ گرم بود. سپس وزن زرده اندازه‌گیری و نسبت وزن زرده به وزن تخم به همان ترتیب برابر ۰/۳۲ ، ۰/۳۱، ۰/۱۶، ۰/۲۱ و ۰/۲۱ حاصل شد. مقدار سرم حاصل شده بعد از افزودن محلول بافر فسفات وکلروفرم به ترتیب قبلی برابر با ۵۲، ۱۲/۵، ۳/۷۵، ۳ و ۱/۵ میلی‌لیتر بود. نتایج غلظت آنتی‌بادی استحصالی از هر تخم نیز به ترتیب قبلی ۶۰۴۵۰، ۱۰۶۳۱/۲۵، ۱۲۰۲۶، ۵۲۰۳ و ۲۵۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با دستگاه اسپکتروفتومتری در OD280 به دست آمد. همچنین قابل ذکر است، از تخم‌مرغ عشق به علت حجم پائین محتوای زرده، آنتی‌بادی در مرحله نهایی استحصال نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اولین مطالعه در این زمینه بر روی IgY طیوری اهلی و زینتی در ایران بوده و می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات عمیق‌تر و جزئی‌نگرانه‌تری در این حوزه باشد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از بیشترین آنتی بادی استحصالی از غاز و سپس مرغ بومی بود که این امر احتمالاً به سبب اندازه تخم‌مرغ در این پرنده است. همچنین با توجه به حجم آنتی‌بادی به‌دست آمده در بلدرچین و عرضه تخم آن به صورت تجاری به نظر، می‌تواند گزینه مناسبی در کنار مرغ جهت تولید آنتی بادی IgY باشد.

تا به حال مطالعاتی در مورد ابعاد مختلف خصوصیات آنتی‌بادی IgY در پرندگان انجام شده است که برخی از آنها بر روی آنتی‌بادی‌های استخراجی از سرم و تحقیقات تشخیصی متمرکز شده‌اند (۳۰) و در پرندگانی نظیر طیور، بوقلمون و قرقاول مورد بررسی قرار گرفته‌اند. همچنین Oloyede و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ آنتی‌بادی‌های IgY مستخرج از سه پرنده را مورد بررسی قرار دادند و روابط تکاملی نزدیکی از نظر آنتی‌ژنی را در آنها مشاهده کردند (۳۱).

به نظر می‌رسد در آینده نزدیک تکنولوژی IgY نقش پررنگ‌تری را در مطالعات تشخیصی و درمانی بازی کند و تا اندازه‌ای بتواند جایگزین سروتراپی‌ها معمول شود.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان تخم بلدرچین را به عنوان جایگزین تخم‌مرغ بومی معرفی نمود، اگرچه تحقیقات جامع‌تری در ارتباط با این موضوع مورد نیاز است.

References

1. Rajeswari S, Choraria A, Zhang XY, Antonysamy M. Applications of Chicken Egg Yolk Antibodies (Igy) in Healthcare: A Review. Biomed J Sci & Tech Res. 2018;2(1):1-3.

2- Narat M. Production of antibodies in chickens. A review. Food Technol Biotechnol. 2003;41(3):259-267.

3- Verdoliva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. J Chromatogr B. 2000;749(2):233-242.

4- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard

M, Hugl H, Koch G, et al. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21, 2002. Available from: http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam21.htm.

5- Bollen LS, Hau J. Chicken eggs in polyclonal antibody production. Scand J Lab Anim Sci. 1996, 23(Supp. 1):85-91.

6- Bizhanov G, Vyshniauskis G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. Vet Res Commun. 2000,24(2):103-113.

7- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendation of ECVAN workshop 21. Atla-Altern Lab Anim. 1996,24(6):925-934.

8- Svendsen L, O'Brien D, Stodulski G, Hau J. Use of chickens and exploitation of egg yolk antibody production. In: Welfare and Science (Bunyan J ed). Royal Society of Medicine Press; 1994. P.324-327.

9- Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Roe IH. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg yolk immunoglobulin. J Med Microbiol. 2003;52(3):217-22.

10- Larsson A, Balow R, Lindahl TL, Forsbery P. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution. Poult Sci.1993, 72(10):1807-1812.

11- Sunwoo HH, Lee EN, Menninen K, Suresh MR, Sim JS. Growth inhibition of chicken egg yolk antibody (IgY) on Escherichia coli O157:H7. J Food Sci. 2002;67(4):1486-94.

12- Schade R, Zhang XY, Terzolo HR. Use of IgY Antibodies in Human and Veterinary Medicine. In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds) Bioactive Egg Compounds. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. P.213-222.

13- Zuniga A, Yokoyama H, Albicker-Rippinger P, Eggenberger E, Bertschinger, HU. Reduced intestinal colonisation with F18- positive enterotoxigenic Escherichia coli in weaned pigs fed chicken egg antibody against the fimbriae. FEMS Immunol Med Microbiol. 1997;18(3):153-61.

14- Braun V, Bosch V, Klumpp ER, Neff I, Mayer H, Schlecht S. Antigenic determinant of murein lipoprotein and its exposure at the surface of Enterobacteriaceae. Eur J Biochem. 1976;62(3):555-66.

15- Tini M, Jewell UR, Camenish G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comp Biochem Physiol. 2002,131(3):569-574.

16- Schade R, Hlinak A. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. ALTEX 1996,13(5):5–9.

17- Lonardo MD, Marcante L, Poggiali F, Hamsøikova E, Venuti A. Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus type 16. Arch Virol. 2001,146(1),117-125.

18- Almeida C, Kanashiro MM, Filho R, Mata R, Kipnis TL, Dias da Silva W. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. Vet Rec. 1998,143(21):579-584.

19- Sarker SA, Casswall TH, Juneja FL, Sharmin S, Fuchs GJ, Hammarström L. Randomised, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunised chicken egg yolk immunoglobulin (HEY) in children with rotavirus diarrhea. J Pediat Gastroenterol Nutr. 2001,32(1):19-25.

20- Lemamy GJ, Roger P, Mani JC, Robert M, Rochefort H, Brouillet JP. High affinity antibodies from hen's-egg yolk against human mannose-6- phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (MGP/IGFII-R): Characterization and potential use in clinical cancer studies. Int J Cancer. 1999,80(1):896-902.

21- Amaral JA, Franco MTD, Carneiro-Sampaio MMS, Carbonare SB. Antienteropathogenic Escherichia coli immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunized Leghorn chickens. Res Vet Sci. 2002,72(3):229-234.

22- Kazimierczuk K, Cova L, Ndeboko B, Szczyrk U, Targosz A, Brzozowski T, et al. Genetic immunization of ducks for production of antibodies specific to Helicobacter pylori UreB in egg yolks. Acta Biochim Pol. 2005; 52(1):261-266.

23- Wafaa, A, El-ghany A. Comparision between immunoglobulin IgY and vaccine for prevention of infectious bursal diseases in chickens. Global Vet. 2011,6(1):6-24.

24- Zhen YH, Jin J, J. Guo X, Li Y, Li Z, Fang R, Xu Y. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing Staphylococcus aureus. J Appl Microbiol. 2008;105(5):1529-1535.

25- Guimarães Marco, Amaral L, Batista L, Silva I, Gomes C, and Matta M. Growth inhibition of Staphylococcus aureus by chicken egg yolk antibodies. Arch Immunol Ther Exp. 2009; 57: 377–382.

26- Ebina T, Tsukada K, Umezu K, Nose M, Tsuda K, Hatta H, et al. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk Ig (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide be preparation. Microbiol Immunol. 1990;34(7):617-629.

27- Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2009; 13(2): 295-308

28- Liu S, Dong W, Kong T. Preparation and characterization of immunoglobulin yolk against the

venom of Naja naja atra. Indian J Exp Biol. 2010,48(8):778-85.

29- Polson A, Wechmar MBV, Regenmortel MHVV. Isolation of viral IgYantibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun. 1980;9(5):475-493.

30- Narat M, Biek A, Vadnjal R, and Benina D. Production, Characterization and Use of Monoclonal Antibodies Recognizing IgY Epitopes Shared by Chicken, Turkey, Pheasant, Peafowl and Sparrow. Food Technol Biotechnol. 2004; 42 (3) 175–182.

31-Oloyede O.I, Faparusi S. Characterization of antibodies from egg yolk of some birds. Asian NAT APPL SCI. 2013, 2:2.

Comparative quantities and qualities study on avian IgY antibody obtained from egg yolks of domestic and ornamental birds

Mohammad Mehdi Ranjbar1*, Mohammad Hossein Banitaba bidgoli1[1], Saeed Alamian[1], Navid Dadashpou Davachi[1]

1 - Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj

Accept: August 16, 2018 Receive: February 19, 2018; Revise: May 24, 2018;

Summary

Birds produce IgY immunoglobulin in their egg yolks, which is equivalent to the mammalian IgG. In this study, we investigated the quality and quantity of antibody in egg yolks of some domestic and ornamental birds.Eggs of six different species of domestic and ornamental birds were examined after disinfection and weighing of the yolk content and the content of yolk fat was separated. The serum level was recorded and two consecutive levels of antibody precipitation with ammonium sulfate were followed and after dialysis, the antibody was extracted. At the final stage, the OD values were calculated and analyzed for each sample, separately. Average egg weight of geese, ducks, native chicks, pigeons, quail and chicken eggs were 145.5, 62.7, 57.4, 19.5, 12.4 and 1.6 gram, respectively; and ratio of the yolk weight to egg weight were 0.32, 0.31, 0.23, 0.16, 0.21 and 0.21, respectively. The serum levels were observed as 52 ml, 12.5 ml, 15 ml, 3.75 ml, 3 ml, and 5.1 ml, respectively. The results of the concentration of antibody to each egg were 60450 µg / ml, 10631.25 µg / ml, 12026 µg / ml, 5203 µg / ml and 2535 µg / ml in OD_{280}, respectively. The results showed that the highest antibody production is related to geese and in next turn is for native chicken. Also, the use of quail egg as chicken egg alternative could be advisable.

Keywords: *Antibody, Egg, IgY*

سالمونلوز در گله‌های طیور گوشتی استان گلستان: فراوانی، تعیین گروه سرمی و الگوهای مقاومت دارویی جدایه‌های سالمونلا

سید مصطفی پیغمبری*[۱]، ریما مرشد[۲]، مهناز بازیار[۱]، آرین شریفی[۳]، اوستا صدرزاده[۳]

۱ - گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲ - گروه کشاورزی و دامپزشکی، بنیاد دانشنامه نگاری ایران، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران
۳ - علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد گرمسار، گرمسار، ایران

دریافت مقاله : ۱۸ اسفند ۱۳۹۶، بازنگری: ۱۴ خرداد ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۶ مرداد ۱۳۹۷

چکیده

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در حیواناتی که برای مصارف انسانی پرورش داده می‌شوند سبب ظهور باکتری‌های زئونوز مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها همچون *سالمونلا*های مقاوم و انتقال آنها به انسان از طریق زنجیره غذایی می‌شود. این مطالعه در استان گلستان به منظور بررسی میزان آلودگی *سالمونلا*یی گله‌های گوشتی به عنوان یکی از منابع مهم غذایی انسان و ارزیابی میزان مقاومت دارویی جدایه‌ها انجام شده است. در تحقیق کنونی از ۵۲ فارم گوشتی (مشتمل بر ۸۵ سالن گوشتی) در سنین مختلف نمونه‌برداری انجام شد و ۵۱۰ نمونه مدفوع تجمیع شده به‌دست آمد. نمونه‌ها به منظور جداسازی *سالمونلا* به روش استاندارد کشت داده شدند. سپس با کمک آنتی‌سرم‌های پلی‌والان و مونووالان سروگروپ هر جدایه *سالمونلا* تعیین شد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. از مجموع ۵۱۰ نمونه، چهارده جدایه *سالمونلا* به‌دست آمد (٪ ۲/۷۴ درصد) و میزان شیوع *سالمونلا* بر اساس ۸۵ سالن، ۱۶/۴۷ درصد بود. سه جدایه گروه D و ۹ جدایه گروه C شناسایی شدند و دو جدایه به هیچ کدام یک از گروه‌های سرمی A تا D تعلق نداشتند. در مجموع ۱۳ الگوی مقاومت یافت شد. صددرصد جدایه‌های مورد بررسی نسبت به دو آنتی‌بیوتیک سفیکسیم و سفتریاکسون حساس و در مقابل نالیدیکسیک اسید، فلومکوئین، کلرتتراسایکلین، تایلوزین، اریترومایسین و داکسی‌سایکلین مقاوم بودند. مقاومت چندگانه در برابر حداقل چهار ترکیب ضد میکروبی در تمامی جدایه‌های *سالمونلا* مشاهده شد. بیشترین میزان مقاومت در مقابل ترکیبات ضد میکروبی پرمصرف در صنعت طیور مشاهده شد که کاملاً با پیش‌فرض مصرف بی‌رویه داروهای ضد میکروبی در گله‌ها و ایجاد باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم همخوانی دارد.

واژگان کلیدی: *استان گلستان، ایران، سالمونلا، گله گوشتی، مقاومت دارویی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mpeigham@ut.ac.ir

مقدمه

گسترش جهانی عفونت‌های با منشأ غذایی ایجاد شده به وسیله پاتوژن‌های مقاوم در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از نگرانی‌های مهم در بخش سلامت و بهداشت عمومی جامعه است و به عنوان یکی از مشکلات بهداشتی بازپدید از طرف WHO مطرح شده است (۴-۱). *سالمونلا* بیشترین عامل عفونت‌های با منشأ غذایی و سالمونلوز شایع‌ترین بیماری با منشأ غذایی بعد از عفونت‌های *کمپیلوباکتر* است (۵). مرغ و فرآورده‌های گوشتی بزرگ‌ترین منابع سالمونلوز در اکثر کشورهای جهان می‌باشند. گوشت مرغ ممکن است در کشتارگاه با محتویات روده‌ای آلوده شود و ذخیره نامناسب و پخت ناقص آن موجب بقا و حتی تکثیر باکتری گردد (۶). در دو دهه اخیر ظهور *سالمونلا*های مقاوم نیز مشکلات را دوچندان کرده است. استفاده بی‌وقفه و بی‌برنامه از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی دام و طیور باعث شکل‌گیری باکتری‌های مقاوم شده که از طریق چرخه غذایی به انسان نیز انتقال یافته و فرآیند درمانی را در انسان با اختلال مواجه کرده‌اند (۷، ۸). بنابراین برنامه‌ریزی برای کاهش آلودگی *سالمونلا*یی در سطح گله‌های طیور به‌ویژه گله‌های گوشتی به عنوان منبع غذایی انسان باید در دستور کار سازمان‌های مربوطه قرار گیرد و این امر بدون آگاهی از وضعیت کنونی شیوع سالمونلا در گله‌های طیور امکان‌پذیر نخواهد بود. در کشورهای درحال توسعه ارزیابی شیوع سالمونلا به دلیل فقدان سیستم دقیق پایش دشوار است (۹، ۱۲). بنابراین، انجام تحقیقات اپیدمیولوژیک وسیع برای گزارش شیوع سالمونلا در کشور و تفریق سروتیپ‌های آن در مناطق جغرافیایی مختلف امری ضروری است. با توجه به اهمیت موضوع، مطالعه‌ای با هدف جداسازی *سالمونلا* از ۵۲ گله طیور گوشتی شهرستان گرگان و گنبد در استان گلستان و تعیین سروگروپ *سالمونلا*های جداشده با استفاده از آنتی سرم‌های پلی‌والان و تعیین الگوی مقاومت دارویی این جدایه‌ها انجام پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

از ۵۲ مرغداری گوشتی (در مجموع دارای ۸۵ سالن) اطراف شهرستان گنبد و گرگان در استان گلستان نمونه‌برداری انجام شد. هر سالن مرغداری به ۶ ناحیه تقسیم شده و از هر ناحیه، ۱۰ نمونه تازه مدفوعی برداشته شد و نهایتاً هر ۱۰ نمونه در هر سالن با هم مخلوط شد. در مجموع ۵۱۰۰ نمونه تازه مدفوعی به دست آمد که در ۵۱۰ نمونه مخلوط شده مورد بررسی قرار گرفت. جزئیات مربوط به نمونه‌برداری در جدول ۱ به تفصیل آمده است. پس از جمع‌آوری نمونه‌های تازه مدفوعی و مخلوط نمودن هر ۱۰ نمونه یک سالن، تمامی نمونه‌ها به یک محیط غنی‌سازی یعنی سلنیت F اضافه شدند و پس از ۱۸ ساعت باکتری‌ها به محیط‌های انتخابی مک کانکی و *سالمونلا*- شیگلا منتقل شدند. کلنی‌های مشکوک به *سالمونلا* به محیط Triple Sugar Iron (TSI) و اوره برده شدند. جدایه‌ها در محیط‌های بیوشیمیایی مختلف شامل محیط‌های نیترات، آب پپتونه MR-VP و سیترات کشت داده شدند و از لحاظ تخمیر قندهای ترهالوز، دولسیتول و مانیتول نیز مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌ها پس از تأیید به عنوان *سالمونلا* در این محیط‌ها برای تعیین گروه سرمی آماده‌سازی شدند (۱۳). کلیه محیط‌های مورد استفاده از شرکت Merck آلمان تهیه شدند .

برای تعیین گروه سرمی از روش استاندارد آگلوتیناسیون روی لام جهت تشخیص پادگن‌های O استفاده شد. برای این منظور از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان O (A-D) شرکت بهارافشان (تهران، ایران) استفاده شد. جهت تعیین گروه از کشت ۲۴ ساعته و خالص باکتری در روی محیط TSI، شیرابه غلیظی

با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد بر روی یک لام تمیز تهیه کرده و پس از کنترل اتواگلوتیناسیون، یک قطره از آنتی‌سرم‌های موجود را روی آن قرار داده و با هم مخلوط گردید. نتیجه در برابر چراغ و در زمینه سیاه قرائت شد. در صورتی که آگلوتیناسیون در کمتر از ۲ دقیقه مشاهده شود واکنش مثبت تلقی می‌گردد (۱۳).

برای تعیین الگوی مقاومت داروئی جدایه‌های سالمونلا به‌دست آمده از طیور گوشتی، روش کیفی دیسک دیفوزیون به روش استاندارد Kirby-Bauer (14)استفاده شد که قبلاً به‌طور کامل به آن پرداخته شده است (۱۷). اساس این روش به انتشار آنتی‌بیوتیک بر روی محیط آگاردار و ممانعت از رشد باکتری حساس در محوطه حرکت و انتشار آنتی‌بیوتیک استوار است. محیط کشت انتخابی در این روش مولر- هینتون (Merck, Germany) است که رشد پرگنه‌ها را به صورت انفرادی و در کنار هم به طور رضایت‌بخشی فراهم می‌کند. بیست و چهار دیسک ضد میکروبی این مطالعه از شرکت پادتن طب تهیه شدند و مورد استفاده قرار گرفتند که غلظت آن‌ها بر حسب میکروگرم عبارت بودند از :آمپی سیلین (۱۰)، کلرامفنیکل (۳۰)، انروفلوکساسین (۵)، فورازولیدون (۱۰۰)، فلومکوئین (۳۰)، جنتامایسین (۱۰)، لینکواسپکتین (۱۵/۲۰۰)، نالیدیکسیک اسید (۳۰)، نئومایسین (۳۰)، نورفلوکساسین (۱۰)، تتراسایکلین (۳۰)، استرپتومایسین (۱۰)، سولفامتوکسازول + تری متوپریم (۱/۲۵ + ۲۳/۷۵)، دانوفلوکساسین (۱۰)، سفیکسیم (۵)، سفتریاکسون (۳۰)، سفتازیدیم (۳۰)، لووفلوکساسین (۵)، کاناماسین (۳۰)، فلورفنیکل (۳۰)، کلرتتراسایکلین (۳۰)، داکسی‌سایکلین (۳۰)، تایلوزین (۳۰) و اریترومایسین (۱۵).

نتایج

پس از کشت و آزمایشات بیوشیمیایی ۵۱۰ نمونه مدفوع تازه و تجمیع شده از ۵۲ گله مرغ گوشتی دو شهرستان گرگان و گنبد در سنین مختلف ۱۴ جدایه سالمونلا به‌دست آمد (۲/۷۴ درصد) که سه جدایه آن مربوط به یک گله بوده‌اند. در مطالعه حاضر ۲۳ درصد گله‌های گوشتی (۱۲ گله از ۵۲ گله) و ۱۶/۴۷ درصد از سالن‌ها (۱۴ سالن از ۸۵ سالن) آلوده گزارش شده‌اند. نتایج تعیین گروه سرمی در جدول ۱ آمده است (جدول ۱).

براساس این نتایج ۹ جدایه در گروه سرمی C و ۳ جدایه در گروه سرمی D قرار داشتند و دو جدایه به هیچ‌کدام از گروه‌ها (A-D) تعلق نداشتند. الگوی مقاومت ۱۴ جدایه بسیار متنوع بوده و به جز دو جدایه که الگوی یکسان داشتند بقیه جدایه‌ها الگوهای مقاومت متفاوتی از هم را نشان دادند. در مجموع ۱۳ الگوی مقاومت شناسایی شد که در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

همه جدایه‌های مورد بررسی نسبت به دو آنتی‌بیوتیک سفیکسیم و سفتریاکسون حساسیت کامل نشان دادند. در مرتبه بعدی بالاترین حساسیت دارویی از آنِ سفتازیدیم، جنتامایسین، فلورفنیکل، کلرآمفنیکل، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین بود. مقاومت جدایه‌های سالمونلا در مقابل نالیدیکسیک اسید، فلومکوئین، کلرتتراسایکلین، تایلوزین، اریترومایسین و داکسی‌سایکلین ۱۰۰ درصد بوده است. پس از این ترکیبات ضد میکروبی بیشترین مقاومت در مقابل تتراسایکلین، فورازولیدون، لینکواسپکتین و استرپتومایسین ثبت شد.

مقاومت همزمان نسبت به چندین ترکیب ضدمیکروبی در جدول ۴ نشان داده شده است. تمامی جدایه‌های سالمونلا در برابر چهار ترکیب ضد میکروبی به‌صورت همزمان مقاوم بودند. مقاومت

چندگانه حداقل در برابر سه و حداکثر در مقابل ۱۲ ترکیب ضد میکروبی مشاهده شد.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *سالمونلا*

شماره جدایه	شهر جداسازی	سن گله گوشتی (روز)	شماره گله	سروگروپ
۱	گرگان	۳۴	۱	C
۲	گرگان	۴۸	۲	C
۳	گرگان	۲۰	۱۱	C
۴	گرگان	۱۰	۱۸	C
۵	گرگان	۱۰	۱۸	C
۶	گرگان	۱۰	۱۸	C
۷	گنبد	۴۶	۹	N*
۸	گنبد	۴۲	۱۱	C
۹	گنبد	۲۲	۱۳	C
۱۰	گنبد	۴۲	۱۵	D
۱۱	گنبد	۲۷	۱۶	D
۱۲	گنبد	۴۵	۲۴	N
۱۳	گنبد	۳۵	۲۶	C
۱۴	گنبد	۲۲	۳۰	D

جدول ۲- الگوهای مقاومت در بین ۱۴ *سالمونلا*ی جداشده از شهرهای گرگان و گنبد

ردیف	تعداد جدایه	شهر جداسازی	الگوی مقاومت
۱	۱	گرگان	TE, NA, FR, LP, E, D, FF, S, C, TY, CTE
۲	۱	گرگان	TE, NA, FR, LP, E, D, S, C, ENF, TY, CTE
۳	۱	گرگان	TE, NA, FR, LP, E, D, FF, C, TY, CTE
۴	۱	گرگان	TE, NA, FR, LP, E, D, FF, S, TY, CTE
۵	۱	گرگان	TE, NA, FR, LP, E, D, S, AM, TY, CTE
۶	۱	گرگان	TE, NA, FR, LP, E, D, S, TY, CTE
۷	۱	گنبد	TE, NA, FR, LP, N, S, FM, AM, ENF, SXT, K, CAZ
۸	۲	گنبد	TE, NA, FR, LP, N, S, FM, AM, ENF, SXT, K
۹	۱	گنبد	TE, NA, LP, S, FM, NOR, GM, AM, ENF, LOM, DFX
۱۰	۱	گنبد	TE, NA, FR, FM, AM, ENF
۱۱	۱	گنبد	NA, FR, FM, AM
۱۲	۱	گنبد	NA, FR, LP, FM, AM, ENF
۱۳	۱	گنبد	TE, NA, FR, LP, S, NOR, FM, AM, ENF, LOM, SXT, DFX

AM =Ampicilin, C=Chloramphenicol, CAZ=Ceftazidime, D=Doxycycline, DFX=Danofloxacin, ENF= Enrofloxacin, E= Erythromycin, FM=Flumequine, FR=Furazolidone, FF=Flofenicol, GM=Gentamycin, K=Kanamaycin, LOM=Levofloxacin, LP=Linco-spectin, NA=Nalidixic Acid, N=Neomycin NOR=Norfloxacin, S=Streptomycin, SXT= Sulfamethoxazol + Trimethoprim, CTE= Chlortetracycline, TE=Tetracycline, TY=Tylosine

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های ناشی از سالمونلاها در سراسر دنیا و در اکثر گونه‌های حیوانی مشاهده می‌شود. این باکتری در دستگاه گوارش مهره‌داران اعم از پستانداران، پرندگان، خزندگان و ماهیان سیطره پیدا کرده و بسته به سروتیپ، شرایط و عوامل متعدد میزبانی، بیماری‌هایی با نشانه‌ها و عوارض متعدد ایجاد می‌کنند. باکتری از راه مدفوع دفع شده و باعث آلودگی آب، غذا و محیط می‌گردد. انسان و حیوانات در بیشتر موارد در اثر مصرف این گونه مواد آلوده باکتری را وارد دستگاه گوارش خود کرده و در نتیجه این گردش دهانی- مدفوعی تداوم پیدا

مـی‌کنـد. یکـی از مهم‌تـرین دغدغـه‌های مـرتبط بـا سـالمونلا بحـث زوئونـوز و انتقـال آن از گوشـت و فرآورده‌هـای حیـوانی بـه انسـان اسـت. گوشـت مـرغ آلـوده بـه *سـالمونلا* اصـلی‌ترین منبـع انتقـال آلـودگی سـالمونلایی بـه انسـان اسـت کـه از جنبـه بهداشـت عمـومی دارای اهمیـت ویـژه‌ای اسـت، از ایـن رو تشـخیص فراوانـی عفونـت *سـالمونلا* در گلـه‌هـای طیـور صـنعتی بـه منظـور بـه‌کارگیری اقـدامات کنترلـی صحیح در سطح کشور امری ضروری است (۱۵).

جدول۳- میزان حساسیت و مقاومت دارویی جدایه‌های *سالمونلا* و درصد آنها

ردیف	نام آنتی‌بیوتیک	نام شهر مورداستفاده		تعداد جدایه‌های حساس و نیمه حساس به کل جدایه‌های تست شده	درصد	تعداد جدایه‌های مقاوم به کل جدایه‌های تست شده	درصد
		گرگان	گنبد				
۱	آمپی‌سیلین	√	√	۱۴/۵	۷۲/۳۵	۱۴/۹	۲۸/۶۴
۲	کلرامفنیکل	√	√	۱۴/۱۱	۵۸/۷۸	۱۴/۳	۴۲/۲۱
۳	سفیکسیم	√	√	۱۴/۱۴	۱۰۰	۱۴/۰	۰
۴	سفتیریاکسون	√	√	۱۴/۱۴	۱۰۰	۱۴/۰	۰
۵	فلورفنیکل	√	√	۱۴/۱۱	۵۸/۷۸	۱۴/۳	۴۲/۲۱
۶	فورازولیدون	√	√	۱۴/۱	۱۵/۷	۱۴/۱۳	۸۵/۹۲
۷	جنتامایسین	√	√	۱۴/۱۲	۷۲/۸۵	۱۴/۲	۲۸/۱۴
۸	لینکواسپکتین	√	√	۱۴/۲	۲۸/۱۴	۱۴/۱۲	۷۲/۸۵
۹	نئومایسین	√	√	۱۴/۱۰	۴۳/۷۱	۱۴/۴	۵۷/۲۸
۱۰	نالیدیکسیک‌اسید	√	√	۱۴/۰	۰	۱۴/۱۴	۱۰۰
۱۱	انروفلوکساسین	√	√	۱۴/۷	۵۰	۱۴/۷	۵۰
۱۲	استرپتومایسین	√	√	۱۴/۴	۵۷/۲۸	۱۴/۱۰	۴۲/۷۱
۱۳	تتراسایکلین	√	√	۱۴/۱	۱۵/۷	۱۴/۱۳	۸۵/۹۲
۱۴	سفتازیدیم		√	۸/۷	۵/۸۷	۸/۱	۵/۱۲
۱۵	دانوفلوکساسین		√	۸/۶	۷۵	۸/۲	۲۵
۱۶	فلومکوئین		√	۸/۰	۰	۸/۸	۱۰۰
۱۷	کانامایسین		√	۸/۵	۵/۶۲	۸/۳	۵/۳۷
۱۸	لووفلوکساسین		√	۸/۶	۷۵	۸/۲	۲۵
۱۹	نورفلوکساسین		√	۸/۶	۷۵	۸/۲	۲۵
۲۰	سولفامتوکسازول+تری‌متوپریم		√	۸/۴	۵۰	۸/۴	۵۰
۲۱	کلرتتراسایکلین	√		۶/۰	۰	۶/۶	۱۰۰
۲۲	تایلوزین	√		۶/۰	۰	۶/۶	۱۰۰
۲۳	اریترومایسین	√		۶/۰	۰	۶/۶	۱۰۰
۲۴	داکسی‌سایکلین	√		۶/۰	۰	۶/۶	۱۰۰

جدول ۴- الگوی مقاومت چندگانه در بین۱۴ سالمونلای جداشده از شهرهای گرگان و گنبد

تعداد ترکیبات آنتی‌باکتریال	تعداد جدایه‌های مقاوم	درصد جدایه‌های مقاوم
۴ ≤	۱۴	۱۰۰
۵>	۱۳	۸۵/۹۲
۶>	۱۱	۵۷/۷۸
۷>	۱۱	۵۷/۷۸
۸>	۱۱	۵۷/۷۸
۹>	۱۰	۴۲/۷۱
۱۰>	۷	۵۰
۱۱>	۲	۲۸/۱۴
۱۲>	۰	۰

این مطالعه به منظور ارزیابی جداسازی *سالمونلا* از گله‌های گوشتی دو شهر بزرگ استان گلستان طراحی و اجرا شده است. به این ترتیب که از ۵۲ مرغداری گوشتی (دارای ۸۵ سالن) اطراف شهرستان گرگان و گنبد ۵۱۰۰ نمونه تازه مدفوعی جمع‌آوری شد که ۵۱۰ نمونه تجمیع شده مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. پس از کشت و آزمایشات بیوشیمیایی، ۱۴ جدایه سالمونلا حاصل شد. در تعیین گروه سرمی، ۹ جدایه در گروه سرمی C و ۳ جدایه در گروه سرمی D قرار گرفتند و دو جدایه به هیچ‌کدام از گروه‌های (A-D) تعلق نداشتند. بررسی آمار و اطلاعات موجود در زمینه شیوع سالمونلوز در طیور صنعتی در کشور اعداد متفاوتی را نشان می‌دهد. آتابای در سال ۱۳۹۲ در بررسی ۶۱۴ مورد از لاشه‌های ارجاعی به کشتارگاه، ۳۷ جدایه *سالمونلا* به‌دست آورد که معادل ۷/۶۴ درصد آلودگی بود (۱۶). عزت پناه در سال ۹۱ در بررسی میزان آلودگی ماکیان به سالمونلا در شهرستان اراک، از مجموع ۲۴۵ نمونه کلواک ۷۵ مورد (۳۰/۶۱ درصد) سالمونلا جدا کرد (۱۷). ارم در سال ۱۳۹۰ در بررسی آلودگی سالمونلایی مرغداری‌های گوشتی شهرستان قائم‌شهر و حومه از مجموع ۲۲۸ نمونه مدفوعی تعداد ۳۰ جدایه *سالمونلا* جدا کرد که معادل ۱۳/۱ درصد آلودگی است (۱۸). در مطالعه وسیعی که توسط پیغمبری و همکاران در طی ۵ سال بر روی گله‌های گوشتی استان مازندران و گیلان صورت گرفت از شهرستان چالوس و حومه از مجموعه ۱۳۸ نمونه مدفوعی، تعداد ۱۱ جدایه سالمونلا جدا شد که معادل ۸ درصد آلودگی است، از شهرستان لاهیجان و حومه از مجموعه ۱۳۸ نمونه مدفوعی، تعداد ۱۰ جدایه سالمونلا جدا کرد که معادل ۷/۲ درصد آلودگی است؛ بابل، ساری و آمل نیز به‌ترتیب ۳/۰۳، ۱/۱۰، ۱/۰۱ درصد آلودگی سالمونلایی را نشان دادند (۱۹). مرشد در سال ۹۱ در بررسی آلودگی سالمونلایی گله‌های گوشتی آمل از مجموع ۲۲۶ نمونه ۶۲ جدایه سالمونلا به‌دست آورد که معادل ۲۷/۴۳ درصد آلودگی است (۲۰). در مطالعات آتابای در سال ۹۲ همگی جدایه‌ها متعلق به گروه سرمی D بودند (۱۶). ارم در همین سال ۹۳/۳۳ درصد سالمونلای گروه سرمی C و ۶/۶۶ درصد سالمونلای گروه سرمی D جدا کرد (۱۸). در مطالعه پیغمبری و همکاران در استان‌های حاشیه دریای خزر در مجموع ۳۵ ایزوله سالمونلا جدا شد که ۱۷ (۴۸/۵۷ درصد) ایزوله در گروه D و ۱۸ (۵۱/۴۳ درصد) ایزوله در گروه C دسته‌بندی شدند (۱۹). در مطالعه مرشد در سال ۹۱ نیز ۸۰/۶۴ درصد جدایه‌های به‌دست آمده به گروه D، ۱۷/۷۴ درصد به گروه C و ۱/۶۱ درصد جدایه‌ها به هیچ یک از گروه‌ها A تا D تعلق نداشتند (۲۰). به نظر می‌رسد که در طیور بین سروتیپ‌های مختلف چرخش وجود دارد و در دوران خاصی سروتیپی جایگزین سروتیپ دیگر می‌شود (۶). در بسیاری از مطالعات انجام شده در پنج سال اخیر در ایران سروگروپ C غالبیت پیدا کرده و به همراه سروگروپ D و حتی بیشتر از آن در گله‌های طیور یافت می‌شود (۱۸،۱۹،۲۱،۲۲).

الگوی مقاومت دارویی در مناطق مختلف و مقاطع زمانی متفاوت حتی در یک ناحیه ممکن است متفاوت باشد که می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع، میزان و تداوم مصرف داروهای آنتی‌باکتریال باشد. روند استفاده نادرست و بی‌رویه از آنتی‌باکتریال‌ها در واحدهای پرورش طیور به دور از ارزیابی دقیق حساسیت باکتریایی منجر به گسترش ژن‌های مقاومت می‌گردد (۲۳). اهمیت این موضوع در حیواناتی که برای مصارف انسانی پرورش داده می‌شوند از جنبه بهداشت و سلامت عمومی است زیرا این نگرانی وجود دارد که درمان سالمونلوز با منشأ غذایی در انسان پیچیده شود و سویه‌های

مقاوم سبب بیماری طولانی‌تر یا شدیدتری نسبت به سویه‌های حساس شوند. نگرانی دیگر به خاطر افزایش مقاومت نسبت فلوروکینولون‌هاست زیرا این دسته داروهای انتخابی برای درمان عفونت *سالمونلایی* در کودکان و بزرگسالان به شمار می‌روند (۲۴). در مطالعه سالمونلاهای این دو شهر حساسیت در مقابل فلوروکینولون‌ها همچون نورفلوکساسین، لووفلوکساسین، دانوفلوکساسین ۷۵ درصد و انروفلوکساسین ۵۰ درصد بود. دلیل این امر استفاده کمتر از سه آنتی‌بیوتیک اول در گله‌های طیور است چنانچه انروفلوکساسین که به وفور در طیور استفاده می‌شود مقاومت بیشتری را نشان داد. سازمان غذا و داروی امریکا (FDA) استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دسته فلوروکینولون‌ها را در طیور ممنوع اعلام کرده است و تنها به دو آنتی‌بیوتیک دانوفلوکساسین و انروفلوکساسین در گاو و خوک در شرایط خاص اجازه مصرف داده است تا بدین ترتیب از وقوع مقاومت اجتناب‌ناپذیر ممانعت شود (۲۵). همه جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه نسبت به دو آنتی‌بیوتیک سفیکسیم و سفتریاکسون از خانواده سفالوسپورین‌ها ۱۰۰درصد حساسیت نشان دادند. در مرتبه بعدی بالاترین حساسیت دارویی از آنِ سفتازیدیم، جنتامایسین، فلورفنیکل، کلرآمفنیکل، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین بود. مقاومت جدایه‌های *سالمونلا* در مقابل نالیدیکسیک اسید، فلومکوئین، کلرتتراسایکلین، تایلوزین، اریترومایسین و داکسی‌سایکلین ۱۰۰ درصد بوده است که با توجه به طول و تداوم استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح گله‌های طیور ایران قابل پیش‌بینی و توجیه‌پذیر است. پس از این آنتی‌بیوتیک‌ها بیشترین مقاومت در مقابل تتراسایکلین، فورازولیدون، لینکواسپکتین و استرپتومایسین ثبت شد. در بین جدایه‌های مقاوم، وقوع مقاومت چندگانه بسیار شایع بود به طوری که آنها حداقل به ۴ و حداکثر به ۱۲ دارو به صورت همزمان مقاوم بودند.

با توجه به افزایش اهمیت *سالمونلاهای* غیرتیفوئیدی به ویژه *سالمونلاهای* گروه C در انسان و طیور در سال‌های اخیر در جهان و از جمله در کشور ما و نیاز به تحقیقات وسیع و پیشرفته در این زمینه به منظور کاهش و کنترل عفونت در طیور و متعاقباً در انسان، انجام مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده و سراسری بر روی جدایه‌های *سالمونلا*، تعیین سروتیپ، تعیین فاکتورهای خطر و تعیین پاتوژنیسیته در انواع گله‌های طیور مناطق مختلف جغرافیایی کشور پیشنهاد می‌شود.

References

1. Centers for disease control and prevention (CDC). Preliminary food net data on the incidence of infection with pathogen transmitted commonly through food 10 state/2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006; 55(14):392-395.

2- Dalton CB, Gregory J, Kirk MD, Stafford RJ, Givney R, Kraa E et al. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. Commun Dis Intell. 2004; 28(2):211-214.

3- Lynch M, Painter J, Woodruff R, Braden C. Centers for disease control and prevention. Surveillance for foodborne-disease outbreaks United States, 1998-2002. MMWR Surveill Summ. 2006; 55(10):1-42.

4- Much P, Pichler J, Allerberger F. Foodborne infectious outbreaks, Austria 2005. Wien Klin Wochenschr. . 2007; 11 (5-6):139-141.

5- Meldrum RJ, Wilson IG. *Salmonella* and Campylobacter in United Kingdom retail raw chicken in 2005. J Food Protect. 2007; 70:1937-1939.

6- Zahraei Salehi MT. *Salmonella*. University of Tehran press, Tehran, Iran: 1999; 24-29. [Book in Persian]

7- Kikuvi GM, Ombui JN, Mitema ES. Serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolates from pigs at slaughter in Kenya. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(4):243-248.

8- Fallah SH, Asgharpour F, Naderian Z,

Moulana Z. Isolation and determination of antibiotic resistance patterns in Non- typhoid *Salmonella* Spp. isolated from chicken. Enterpathog. 2013; 1(1):17-21. [Article in Persian].

9- Layton AN, Galyov EE. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. Expert Rev Mol Med. 2007; 9(18):1-17.

10- Solghan SM, Dumas NB, Root TP, Quinlan TM, Armstrong LR, Spina NL et al. Multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* in New York State's foodborne diseases active surveillance network counties. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7(2):167-73.

11- Soltan Dallal MM, Taremi M, Gachkar L, Modarressi SH, Sanaei M, Bakhtiari R et al. Characterization of antibiotic resistant patterns of *Salmonella* serotypes isolated from beef and chicken samples in Tehran. Jundishapour J Microbiol. 2009; 2(4):124-131. [Article in Persian].

12- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. Clin Infect Dis. 2004; 38 Suppl 3:S127-134.

13- Waltman WD, Gast RK, Mallinson ET. Salmonellosis. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MM, Pearson JE, and Read WM. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists; 1998.

14- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. 2006; 16th informational supplement. Wayne, PA: CLSI.

15- Gast RK. *Salmonella* infection. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Diseases of Poultry. 12th ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2008; P.636-651.

16- Atabay Z. Bacteriologic survey of hepatic and cardiac lesions in commercial poultry carcasses. DVM thesis, 3482, University of Tehran, Tehran, Iran; December, 2013 (Thesis in Persian).

17- Ezatpanah E, Moradi Bidhendi S, Khaki P, Ghaderi R, Seyedan Jasbi E, Moghtadaee Far S. Isolation, serotyping and antibiotic-resistance pattern of isolated *Salmonella* from chicken of Arak. Iranian Vet J, 2013; 39(2):88-96. [Article in Persian].

18- Eram N, Peighambari, SM, Yazdani A. Study on *Salmonella* spp. in broiler farms around Ghaemshahr: determination of serotypes and their drug resistance. J Vet Lab Res. 2013; 5:85-94. [Article in Persian].

19- Peighambari SM, Morshed R, Shojadoost B, Nikpiran H, Haghbin Nazarpak H, Khakpour M et al. Occurrence of Non-typhoid *Salmonella* in Mazandaran and Gilan Iranian J Vet Clinic Sci. [Article in Persian]. (In Press).

20- Morshed R. Bacteriological study of broiler flocks (*Salmonella* contamination) in Amol city. Pajouhesh & Sazandegi Vet J. 2012; 97:23-28. [Article in Persian].

21- Peighambari SM, Sorahi Nobar M, Morshed R. Detection of *Salmonella* enterica serovar Infantis among serogroup C *Salmonella* isolates from poultry using PCR and determination of drug resistance patterns. Iranian Vet J, 2015; 11(2):54-61. [Article in Persian].

22- Rahmani M, Peighambari SM, Svendsen CA, Cavaco LM, Agerso Y, Hendriksen, RS. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella* enteric serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. BMC Vet Res. 2013; 9:66.

23- Schwarz S, Kehrenbery C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int. Antimicrob. Agents. 2001; 17:431-437.

24- Butaye P, Michael BM, Schwarz S, Barret TJ, Brisabois A, White DG. The clonal spread of multidrug – resistance nontyphi *Salmonella* serotypes. Microb. Infect. 2006; 8:1891-1997.

25- FDA. Extera label use and antibacterials. 2014. Available at: http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/ucm421527.htm

Salmonellosis in broiler flocks of Golestan province: frequency, serogroups and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates

Seyed Mostafa Peighambari[1*], Rima Morshed[2], Mahnaz Baziar[1], Aryan Sharifi[3], Avesta Sadrzadeh[3]

1 - Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2 - Veterinary and Agriculture Group, Iran Encyclopedia Compiling Foundation, Ministry of Science, Research, and Technology, Tehran, Iran.
3 - Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University- Garmsar branch, Garmsar, Iran.

Receive; March 9, 2018; Revise: June 4 2018; Accept: July 28, 2018

Summary

The use of antibiotics in food animal production systems has resulted in emergence of antibiotic resistant zoonotic bacteria such as *Salmonella* that can be transmitted to humans through the food chain. This survey was done to determine *Salmonella* contamination and to evaluate *Salmonella* drug resistance in broiler flocks as one of the most important sources of food in Golestan province. In this survey, samples were taken from 52 broiler farms (85 broiler houses) at different ages and, in total, 510 pooled manure samples were collected. Standard cultural method was performed for *Salmonella* isolation. The serogroup of each isolate was determined by using polyvalent and monovalent *Salmonella* antisera. The occurrence and the level of antimicrobial resistance patterns in *Salmonella* isolates were determined by disk diffusion method. Fourteen *Salmonella* were isolated from 510 pooled samples (2.74%). There was an occurrence rate of 16.47% in 85 houses. Three isolates belonged to group D, 9 isolates belonged to group C, and 2 isolates did not belong to serogroups A to D. Thirteen different patterns of resistance were found. All of the isolates (100%) were sensitive to ceftriaxone and cefixime and resistant to nalidixic acid, flumequine, chlortetracycline, tylosin, erythromycin, and doxycycline. Multiple resistances to at least four antimicrobial drugs were observed in all isolates. The highest resistance rate was found against most prevalent drugs in poultry industry, reinforcing this hypothesis that wide usage of drugs results in the emergence of drug resistant bacteria.

Keywords: *Antimicrobial resistance, Broiler, Golestan province, Iran, Salmonella*

ارزیابی واکسن تهیه‌شده از باکتری کشته‌شده *Vibrio fluvialis* در مرغ تخم‌گذار نژاد هایلاین W36

مجتبی میرزائی*[۱]، محسن نجیمی[۲]، محمد جهانتیغ[۳]، فیروز ابراهیمی[۴]، عباس جمشیدیان[۵]، نرجس حسن فخرآبادی[۶]

۱-دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۲-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۳-گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۴-مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران
۵-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۶-دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل

دریافت مقاله: ۱۸ دی ۱۳۹۶، بازنگری:۱۰ بهمن ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

باکتری Vibrio fluvialis موجب بیماری در ماهیان پرورشی و ضررهای اقتصادی قابل توجه می‌شود. این باکتری پاتوژن انسانی و چندین نوع از ماهیان پرورشی دریایی می‌باشد. استفاده از تکنولوژی ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ (IgY) تا کنون برای کنترل عفونت‌های میکروبی فراوانی مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی و ارزیابی واکسن تهیه شده از باکتری V. fluvialis پس از تزریق به مرغ تخم‌گذار می‌باشد. باکتری V. fluvialis پس از کشت در محیط مایع، با فرمالئین ۰/۰۵ درصد مجاور شد. سپس سلول باکتری به همراه اجوانت فروند به عنوان واکسن به مرغ‌های تخم‌گذار نژاد هایلاین در ۷ نوبت تزریق شد، افزایش وزن مرغ‌ها تا بلوغ جسمی و تولید تخم‌مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس آزمایش الایزا غیر مستقیم برای شناسایی IgG ضد باکتری V. fluvialis طراحی و اجرا شد. تزریق واکسن تهیه شده در افزایش وزن مرغ‌ها در طول آزمایش و تعداد و وزن تخم‌مرغ‌ها معنی‌دار نبود و آزمایش الایزا نشان داد تیتر آنتی‌بادی در سرم مرغ‌های هایپر ایمن شده پس از تزریق چهارمین بوستر به ۱:۱۲۸۰۰ رسیده است. با توجه به نتایج به دست آمده و نتایج مطالعات سایر محققین به نظر می‌رسد، آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY) که همان IgG منتقل شده به زرده است، توانایی مهار بیماری‌زایی این باکتری را در حیوان آزمایشگاهی و مزرعه دارد.

واژگان کلیدی: *اجوانت فروند، مرغ تخم‌گذار، Vibrio fluvialis*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: moj.mirzaei@uoz.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های جنس *ویبریو* ساکنین اکوسیستم‌های آبی دریایی، خلیج‌ها و آب‌های محل پرورش میگو و ماهی هستند، باکتری‌های گرم منفی و خمیده *ویبریو* اکثراً پاتوژن‌های فرصت‌طلب ماهی، خزندگان و پستاندارانند (۱). *ویبریو فلاویالیس* (*V. Fluvialis*) یک باکتری گرم منفی نسبتاً هالوفیل می‌باشد. مورفولوژی این باکتری به شکل میله‌ای صاف تا کمی خمیده است، توانایی حرکت این باکتری از طریق تاژک‌های قطبی آن می‌باشد.

V. fluvialis نیاز به سدیم کلراید دارد، اکسیداز مثبت و نیترات مثبت است که می‌تواند دی-گلوکز و دیگر کربوهیدرات‌ها را تخمیر کند و اسید و گاز تولید کند. این باکتری از آب، مدفوع حیوانات، مدفوع انسان، فاضلاب و محصولات غذایی دریایی جدا شده است. این باکتری در همه بخش‌های سواحل آبی وجود دارد و موجب بیماری در ماهیان پرورشی و ضررهای اقتصادی قابل توجه می‌شود (۲).

آنتی‌بادی Immunoglobulin of Yolk (IgY) در واقع (IgG) منتفل شده از سرم مرغ به زرده تخم‌مرغ می‌باشد (۳). استفاده از زیست فناوری ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ (IgY) با اهداف کاربرد درمانی و تشخیصی در حال پیشرفت است (۴). استفاده از ایمونوگلوبولین‌ها علیه عفونت‌ها اولین بار به وسیله‌ی Bartz و همکاران مطرح شد و تا کنون برای کنترل عفونت‌های میکروبی فراوانی مورد استفاده قرار گرفته است (۵). نتایج مطالعات مختلف ثابت کرده است که ایمونوگلوبولین IgY اثر مهاری بر رشد بسیاری از باکتری‌ها دارد و به طور کلی روز به روز تمایل به استفاده از زرده تخم‌مرغ جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای اهداف کاربردی و اقتصادی افزایش می‌یابد (۶).

مزیت‌های استفاده از مرغ به عنوان میزبان ایمن‌سازی شامل: حجم بالای آنتی‌بادی در یک زرده تخم‌مرغ، نیاز کم به آنتی‌ژن برای ایمن‌سازی، سادگی و هزینه کم برای تخلیص آنتی‌بادی، رعایت حقوق حیوانات (نیازی به خونگیری از مرغ نیست)، طول عمر مرغ نسبت به حیوانات آزمایشگاهی، عدم فعال شدن سیستم کمپلمان پستانداران و عدم تداخل با فاکتور رماتوئید توسط IgY، پایداری نسبی در شرایط اسیدی، بازی و دمایی می‌باشد (۱۴-۷).

آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ تا کنون به طور موفقیت‌آمیزی جهت اهداف علمی (۱۳) تشخیصی (۱۵) پیشگیرانه (۱۶) و درمانی (۱۷) و همچنین در دامپزشکی در مقابله با باکتری‌های بیماری‌زای متنوعی استفاده شده است.

این تحقیق مقدمه‌ای برای تولید آنتی‌بادی IgY اختصاصی ضد باکتری *V. Fluvialis* از زرده تخم‌مرغ‌های هایپر ایمن شده می‌باشد. در این تحقیق غیر فعال شدن باکتری در واکسن تهیه شده بررسی گردید و نیز تأثیر تزریق واکسن بر میزان تولید مرغ تخم‌گذار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر واکسن تهیه شده بر تیتر آنتی‌بادی سرمی مرغ نیز تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری: سویه استاندارد باکتری *V. fluvialis* از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران (IBRC) با کد IBRC-M 10800 تهیه شد، سپس محیط کشت Blood Agar و محیط کشت Brain heart infusion broth طبق دستور شرکت سازنده ساخته شد و در اتوکلاو قرار گرفت و سایر تجهیزات و لوازم مورد نیاز از قبیل سوآپ، لوله‌های آزمایشگاهی، فالکون ۱۵میلی‌لیتری، سرسمپلر و سایر تجهیزات مورد نیاز با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه

استریل شدند. سپس پلیت حاوی کشت فعال باکتری در زیر هود لامینار باز شد و بر روی محیط جامد Blood Agar تجدید پاساژ یافت. پلیت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، باکتری در محیط مایع BHI در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس با ۲۰ درصد گلیسرول مخلوط شد و در فریزر با دمای ۷۳- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در مراحل بعد از آن به عنوان ذخیره باکتری استفاده شد.

تهیه آنتی‌ژن: پس از خارج کردن باکتری *V. Fluvialis* از فریزر، در محیط جامد آگار خون‌دار کشت داده شده و سپس در محیط مایع BHI در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری کشت داده شد. سپس فالکون‌ها در سانتریفیوژ با دور ۳۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، در این مرحله در شرایط استریل هود لامینار، محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری با ۱۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) به خوبی همگن شد و سپس در سانتریفیوژ قرار گرفت و مجدد محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری با ۱۵ میلی‌لیتر PBS همگن شد و مجدد در سانتریفیوژ قرار گرفت این کار ۳ مرتبه تکرار شد تا مطمئن شویم محیط کشت به خوبی از سلول‌های باکتری جدا شده است. سپس رسوب با ۱۰میلی‌لیتر فرمالئین ۰/۰۵ درصد همگن شده (فرمالئین ۰/۰۵ درصد از فرمالئین غلیظ ۳۷ درصد تهیه شد) و در طول شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در انکوباتور شیکردار با دور ۶۰ دور در دقیقه (rpm) قرار گرفت. روز بعد فالکون‌ها در سانتریوفوژ با سرعت ۳۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ شدند، سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلول لیز شده باکتری‌ها مجدداً با ۱۰ میلی‌لیتر PBS همگن شد و این کار ۳ بار انجام شد تا مطمئن شویم فرمالدئین از سلول لیز شده باکتری‌ها به خوبی جدا شده است.

این رسوب با ۱۰ میلی‌لیتر PBS به خوبی همگن شد و سپس به غلظت معادل 1.5×10^8 CFU/ml رسانده شد. بدین صورت که جذب نوری حاصل از آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر بر روی ۱ تنظیم شد. این محلول در دمای۷۳- سانتی‌گراد ذخیره شد و تا انتهای تحقیق به عنوان مخزن سلول لیز شده باکتری استفاده شد (۱۸).

آماده سازی واکسن: برای آماده سازی واکسن ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره سلول لیز شده باکتری در تیوپ دو میلی‌لیتری ریخته شد، که این محلول حدوداً معادل 10^8 CFU/ml غلظت داشت. سپس تیوپ‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 10000 rpm سانتریفیوژ شده و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و ۵۰۰ میکرولیتر اجوانت فروند به آن اضافه شد. (در تزریق اول از اجوانت کامل فروند (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران) استفاده شد و در تزریق‌های بعدی از اجوانت ناقص فروند استفاده شد). این ترکیب به عنوان واکسن مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه و پرورش مرغ تخم‌گذار: تعداد ۸ عدد مرغ تخم‌گذار هایلاین W36 سال ۲۰۱۵ با سن ۸۳ روزگی که آخرین واکسن دوره پولتی را دریافت کرده بودند، (از کشت و صنعت بیدمشک، بیرجند، ایران) به محل نگهداری مرغ تخم‌گذار در دانشکده دامپزشکی انتقال یافت و به‌صورت تصادفی در ۲ گروه مساوی گروه‌بندی شد. دمای اتاق پرورش، رطوبت، طول روشنایی، ترکیبات جیره و سایر نکات پرورشی طبق دفترچه راهنمای پرورش مرغ هایلاین W36 سال ۲۰۱۵ کنترل شد. میزان نور تا بلوغ جسمی مرغ که تقریبا در سن ۱۸ هفتگی بود به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی (با شدت نور تقریباً ۵

تا ۱۵ لوکس) و ۱۲ ساعت تاریکی بود که در نیمه شب ۱ ساعت نور شبانه جهت افزایش مصرف دان در نظر گرفته شد، پس از بلوغ جسمی تحریک نوری انجام شد (۲۵ لوکس، و هفته ای ۳۰ دقیقه به طول روشنایی افزوده شد) تا میزان روشنایی به ۱۶ ساعت رسید و تا پایان دوره به همین صورت ادامه یافت.

قرنطینه محل نگهداری مرغ‌ها: جهت ضد عفونی هوای ورودی سالن از فیلتر لامپ اولترا ویولت (UVC) ۳۰ وات (فیلیپس لهستان) استفاده شد. جهت جلوگیری از ورود آلودگی از طریق درب سالن به ترتیب از فشار منفی و مثبت در اتاق ورودی و محل نگهداری مرغ‌ها استفاده شد. بدین طریق ورود هوا فقط از طریق تهویه‌ها صورت می‌گرفت. برای تهویه از دو عدد فن VPH-15S2S با قدرت تهویه (m^3/h۲۰۰) (شرکت دمنده، ایران) استفاده شد. ورود به داخل اتاق پرورش مرغ‌ها با تعویض لباس‌ها و کفش‌ها و ضدعفونی دست‌ها بود.

جیره: برای هر مرغ متناسب با نیاز روزانه‌اش که در ۱۲ هفتگی در حدود ۵۵ گرم و در ۳۲ هفتگی در حدود ۹۰ گرم بود در دانخوری ریخته شد. فرمول جیره مرغ‌ها در دوره پرورش برای ۱۰۰ کیلوگرم در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- میزان مواد اولیه استفاده شده در جیره برای ۱۰۰ کیلو گرم

ذرت	۶۸ کیلو گرم	دی کلسیم فسفات	۱۱۵۰ گرم
سبوس	۳۲۰۰ گرم	کربنات کلسیم	۱۰۰۰ گرم
سویا	۲۰/۵ کیلوگرم	مکمل	۳۷۵۰ گرم
پودر گوشت دامی	۳۰۰۰ گرم	نمک	۳۲۰ گرم
متیونین	۱۰۰ گرم	روغن سویا	گرم

برنامه ایمن سازی و خونگیری از مرغ‌ها: در روز صفر اولین خونگیری انجام شد سپس در همان روز اولین واکسن تزریق شد پس از آن در هفته اول خونگیری دوم انجام شد و در هفته دوم واکسن دوم (بوستر اول) تزریق شد و تا هفته ۱۳ این عملیات طبق جدول ۲ ادامه یافت. تزریق واکسن با حجم ۵۰۰ میکرولیتر با استفاده از سرنگ انسولین در سینه سمت راست و سمت چپ مرغ انجام شد و در هر سمت نیمی از حجم واکسن در داخل عضله (IM) و نیمی دیگر در زیر پوست (SC) تزریق شد. به گروه مواجهه آنتی‌ژن همراه با اجوانت فروند تزریق شد و به گروه کنترل PBS همراه با اجوانت فروند تزریق شد. تزریقات با فاصله دو هفته تکرار شد در نوبت اول آنتی‌ژن به همراه اجوانت کامل فروند و در نوبت‌های بعدی (بوستر) تزریق آنتی‌ژن به همراه اجوانت ناقص فروند انجام شد.

جدول ۲- تزریقات و خونگیری (B نشان دهنده خونگیری است و عدد مجاور آن شماره خونگیری می‌باشد، V نشان دهنده تزریق واکسن است و عدد مجاور آن نشان دهنده شماره تزریق واکسن می‌باشد)

	روزصفر	هفته۱	هفته۲	هفته۳	هفته۴	هفته۵	هفته۶	هفته۷	هفته۸	هفته۹	هفته۱۰	هفته۱۱	هفته۱۲	هفته۱۳
خونگیری	B0		B1		B2		B3		B4		B5		B6	B7
واکسن	V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7	

الایزا غیر مستقیم: در این مرحله جهت بررسی حضور آنتی‌بادی اختصاصی ضد باکتری *ویبریو فلاویالیس* میزان تیتر آنتی‌بادی در سرم ۲ مرغ از ۴ مرغ هر گروه توسط روش الایزا غیر مستقیم، مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تثبیت آنتی‌ژن در کف چاهک‌های پلیت

الایزا (100 SPL, Korea) میکرولیتر بافر کربنات بی کربنات (pH=9.8) که 10^7 CFU/ml سلول لیز شده باکتری داشت، ریخته شد و پلیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طول شب انکوبه گردید. به منظور کنترل اجزاء واکنش یک چاهک فقط حاوی بافر کوت‌کننده در نظر گرفته شد. شستشوی چاهک‌ها ۳ مرتبه با بافر PBS (PBST حاوی ۰/۵٪ توئین ۲۰) انجام شد. جهت بلاک کردن از ۱۵۰ میکرولیتر شیرخشک ۵ درصد در بافر PBST (حجمی/ وزنی) در هر چاهک استفاده شد و در طول شب در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس شستشوی چاهک‌ها ۴ مرتبه با بافر PBST انجام شد و رقت‌سازی سرم‌ها از ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ انجام شد و سپس میکروپلیت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت انکوبه شد، برای کنترل منفی یک چاهک با NaCl ۹درصد بلاک شد. چاهک‌ها مجددا ۴ مرتبه با بافر PBST شسته شده و ۱۰۰ میکرولیتر از anti-chicken IgG conjugated HRP (Sigma, USA, 1:2000) در هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مجدداً چاهک‌ها ۵ مرتبه شستشو داده شد. سپس ۳ میلی‌گرم سوبسترا OPD (Sigma,USA) در ۵ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات حل شده و ۳ میکرولیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) اضافه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاضر به هر چاهک اضافه شد و پلیت در محل تاریکی قرار گرفت تا واکنش انجام شد. سپس ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار جهت توقف واکنش به هر چاهک اضافه شد. برای قرائت جذب نوری از دستگاه الایزا ریدر(Hiperion MPR4+, Readermark, Germany) در طول موج ۴۹۲ نانومتر استفاده شد. زمانی که OD سرم مرغ‌های گروه مواجهه تقسیم بر OD سرم مرغ‌های گروه کنترل، بزرگتر یا مساوی ۲,۱ شد ($OD_{sample/control} \geq 2.1$) آن چاهک به عنوان تیتر آن سرم انتخاب شد (۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS Statistics 19 انجام شد. از آزمون Independent sample T test برای بررسی معنی‌دار بودن نتایج به‌دست آمده استفاده شد، تفاوت‌های که سطح P value < 0.05 بود معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج کشت باکتری غیر فعال شده توسط فرمالدئید بر روی محیط کشت Blood Agar که با ۳ تکرار انجام شد، نشان داد هیچ کلونی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بر روی محیط کشت ایجاد نشد، که نشان دهنده غیر فعال شدن باکتری در شرایط ایجاد شده بود. همچنین نتایج تزریق واکسن به ۴ مرغ در گروه مواجهه و ۴ مرغ در گروه کنترل و بررسی سلامت مرغ‌ها در طول دوره پرورش در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به اینکه P value برای هیچ کدام از فاکتورهای در نظر گرفته شده، کوچکتر از ۰/۰۵ به‌دست نیامد، لذا تفاوت آماری معنی‌داری در میزان رشد مرغ‌ها و همچنین تعداد تولید تخم‌مرغ و وزن تخم‌مرغ‌ها و وزن کل تخم‌مرغ‌ها حاصل نشد.

یافته‌های آزمایش الایزا بر روی سرم مرغ‌ها در جدول ۴ آمده است. در روز ۱۴ $OD_{s/n}$ برابر با ۲/۸ بود که بزرگتر از ۲/۱ می‌باشد لذا ۱:۱۰۰ به عنوان تیتر در نظر گرفته می‌شود، همچنین در روز ۲۸ و ۴۲ و ۵۶ و ۷۲ این عدد به ترتیب در رقت‌های ۱:۱۶۰۰ و ۱:۳۲۰۰ و ۱:۱۲۸۰۰ و ۱:۱۲۸۰۰ بزرگتر یا مساوی ۲/۱ می‌باشد که این رقت‌ها به عنوان تیتر در نظر گرفته می‌شوند. همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است تیتر سرمی پس از تزریق بوستر ۳ به شدت افزایش پیدا کرده است، همچنین، بعد از روز ۵۶ تیتر سرمی بر روی ۱۲۸۰۰ باقی مانده است، که

نشـان می‌دهـد حـداکثر تیتـر سـرمی قابـل انتظـار بـرای این باکتری (آنتی‌ژن) می‌باشد.

جدول ۳- فاکتورهای بررسی شده در مرغ‌ها (نتایج به صورت Mean±SD نشان داده شده است)

	گروه مواجهه	گروه کنترل	آزمون آماری	P value
افزایش وزن	۲۱/۵۴±۱۵۴	۳۵/۵۵±۱۵۶	Independent samples t test	۰/۷۰۸
تعداد تخم‌مرغ تولید شده	۰/۹۸±۲۰	۰/۶۳±۲۰/۴	Independent samples t test	۰/۴۶۸
وزن تخم‌مرغ	۱۶/۵±۴۶/۶	۱۵/۶±۴۶/۹	Independent samples t test	۰/۸۷۷
وزن کل تخم‌مرغ‌ها	۷۱/۶۱±۹۷۸/۶	۵۲/۳۶±۹۸۳/۹	Independent samples t test	۰/۸۷۷

جدول ۴- نسبت میانگین OD در گروه مواجهه به میانگین OD در گروه کنترل (OD Sample/OD Control)

	زمان						
رقت	روز ۰	روز ۱۴	روز ۲۸	روز ۴۲	روز ۵۶	روز ۷۰
۱:۱۰۰	۱/۲	۲/۸	۳/۶	۳/۸	۴/۰	۴/۵
۱:۲۰۰	۱/۱	۲/۰	۳/۴	۳/۵	۳/۷	۴/۳
۱:۴۰۰	۱/۰	۱/۹	۲/۹	۳/۳	۳/۴	۴/۱
۱:۸۰۰	۰/۹	۱/۸	۲/۴	۲/۹	۳/۲	۳/۸
۱:۱۶۰۰	۰/۹	۱/۳	۲/۱	۲/۳	۲/۹	۳/۵
۱:۳۲۰۰	۰/۸	۰/۷	۱/۸	۲/۱	۲/۴	۳/۳
۱:۶۴۰۰	۰/۷	۰/۶	۱/۶	۱/۹	۲/۲	۲/۵
۱:۱۲۸۰۰	۰/۶	۰/۵	۱/۲	۱/۸	۲/۱	۲/۱

نمودار ۱- نمودار افزایش تیتر سرمی طی تزریق واکسن تهیه شده در طول ۱۴ هفته

بحث و نتیجه‌گیری

V. fluvialis باکتری بیماری‌زایی است که علائم روده ای مشابه با *V. cholera* ایجاد می‌کند، درگیری انسان با این باکتری منجر به اسهال آبکی به همراه استفراغ، دل‌درد، دهیدراته شدن متوسط تا شدید و اغلب تب است (۱۹).

طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، واکسن تهیه شده از سلول لیز شده باکتری *V. fluvialis* به همراه اجوانت فروند تأثیر معنی‌داری در افزایش وزن مرغ تخم‌گذار از بلوغ جنسی تا رسیدن به بلوغ جسمی، تعداد تولید تخم‌مرغ و وزن تخم‌مرغ‌ها نداشت. لذا به نظر می‌رسد استفاده از این روش برای ایمن‌سازی مرغ تخم‌گذار به منظور تولید و تخلیص آنتی‌بادی IgY از زرده تخم‌مرغ روش مفید و

مناسبی باشد.

مطالعه‌ای که توسط Zhu و همکاران انجام شد، نشان داد که *ویبریو انگیلاروم* به‌طور مؤثری سیستم ایمنی مرغ‌های تخم‌گذار را بر انگیخته کرده و آنتی‌بادی IgY اختصاصی ضد *ویبریو انگیلاروم* توسط الایزا شناسایی شد (۲۰). در مطالعه حاضر نتایج آزمایش الایزا طراحی شده نشان داد که تیتر سرمی مرغ‌ها علیه باکتری *V. fluvialis* که به عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفته بود از تزریق سومین بوستر به بعد به بالاترین سطح خود رسید و با ادامه واکسیناسیون به فاصله ۲ هفته تیتر همچنان بالا بود که نشان دهنده‌ی هایپر ایمونیزاسیون موفق می‌باشد و تأیید کننده نتایج تحقیق Zhu و همکاران می‌باشد.

طبق تحقیقات Hirai و همکاران استفاده از ایمونوگلوبولین اختصاصی زرده تخم‌مرغ(IgY) علیه *ویبریو کلرا* به‌صورت مؤثری منجر به جلوگیری از بروز وبا در موش‌ها شد (۲۱). تحقیقات Chang-Hong Li و همکاران نشان داد تولید آنتی‌بادی اختصاصی IgY علیه *ویبریو* انگیلاروم (*V.anguillarum*) با موفقیت صورت گرفت و به‌طور مؤثر از عفونت‌های *ویبریو* انگیلاروم پیشگیری کرد (۲۲). در مطالعات Punyokun و همکاران آنتی‌بادیIgY اختصاصی علیه *ویبریو هاروی* به‌طور موفقیت‌آمیزی تولید و تخلیص شد (۲۳).

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق تیتر آنتی‌بادی اختصاصی ضد باکتری *V. fluvialis* در سرم مرغ‌های هایپرایمن شده به شدت افزایش پیدا کرد، لذا به نظر می‌رسد این آنتی‌بادی اختصاصی به زرده تخم‌مرغ هم منتقل خواهد شد و با توجه به تحقیقات سایر محققین در ارتباط با ممانعت از بیماری‌زایی باکتری‌های جنس *ویبریو* به نظر می‌رسد، تولید و تخلیص آنتی‌بادی IgY از زرده تخم‌مرغ‌های هایپر ایمن شده و استفاده از آن در چالش میکروبی حیوان آزمایشگاهی، می‌تواند منجر به کاهش بیماری‌زایی *V. fluvialis* شود، بنابراین نیاز به تحقیق بیشتر در این زمینه می‌باشد و ادامه انجام مراحل این تحقیق در برنامه کاری محققین است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری حرفه ای دامپزشکی می‌باشد که شماره پیگیری پروپوزال پایان نامه در ایرانداک ۱۳۶۰۵۳۵ می‌باشد. نویسندگان برخود لازم می‌دانند که از همکاری کارشناسان دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل از جمله آقای سعید شهریاری و خانم سرگلزایی تشکر نمایند.

References

1- Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Kamkar A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Control. 2006;17(3):183–8.

2- Igbinosa EO, Okoh AI. Vibrio fluvialis: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern. Int J Environ Res Public Health. 2010;7(10):3628–43.

3- Tizard IR. An introduction to veterinary immunology. WB Saunders.; 1977.

4- Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. J Med Microbiol. 2003;52(3):217–22.

5- Bartz CR, Conklin RH, Tunstall CB, Steele JH. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. J Infect Dis. 1980;142(3):439–41.

6- Tini M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comp Biochem Physiol part A Mol Integr Physiol. 2002;131(3):569–74.

7- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. Altern Lab Anim. 1996;24:925–34.

8- Bizhanov G, Vyshniauskis GA. comparison of three methods for extracting IgY from the egg

yolk of hens immunized with Sendai virus. Vet Res Commun. 2000;24(2):103–13.

9- Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods. Elsevier; 1981;46(1):63–8.

10- Polson A, Von Wechmar MB, Van Regenmortel MHV. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun. 1980;9(5):475–93.

11- Larsson A, Balöw RM, Lindahl TL, Forsberg PO. Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review. Poult Sci. 1993;72(10):1807–12.

12- Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. FASEB J. 1990;4(8):2528–32.

13- Schade R, Hlinak A, Marburger A, Henklein P, Morgenstern R, Blankenstein P, *et al.* Advantages of using egg yolk antibodies in the life sciences: the results of five studies. Altern Lab Anim. 1997;25(5):555–86.

14- Sunwoo HH, Lee EN, Menninen K, Suresh MR, Sim JS. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on Escherichia coli O157: H7. J FOOD Sci. 2002;67(4):1486–94.

15- Di Lonardo A, Marcante ML, Poggiali F, Hamsøikova E, Venuti A. Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus type 16. Arch Virol. 2001;146(1):117–25.

16- Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, *et al.* Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001;32(1):19–25.

17- Lemamy G, Roger P, Mani J, Robert M, Rochefort H, Brouillet J. High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): Characterization and potential use in clinical cancer studies. Int J cancer. 1999;80(6):896–902.

18- Li X, Jing K, Wang X, Li Y, Zhang M, Li Z, *et al.* Protective effects of chicken egg yolk antibody (IgY) against experimental Vibrio splendidus infection in the sea cucumber (Apostichopus japonicus). Fish Shellfish Immunol. 2016;48:105–11.

19- Huq MI, Alam AK, Brenner DJ, Morris GK. Isolation of Vibrio-like group, EF-6, from patients with diarrhea. J Clin Microbiol. 1980;11(6):621–4.

20- Zhu X, Zhang Z, Liu Z. Preparation of shrimp Vibrio anguillarum IgY and its effect on protecting from artificial infection. Mar Sci. 2008;2:6.

21- Hirai K, Arimitsu H, Umeda K, Yokota K, Shen L, Ayada K, *et al.* Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to Vibrio cholerae effectively prevents cholera. Acta Med Okayama. 2010;64(3):163–70.

22- Li CH, Lu XJ, Li DF, Chen J. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental Vibrio anguillarum infection in ayu (Plecoglossus altivelis). Fish Shellfish Immunol. 2014;37(1):108–14.

23- Punyokun K, Hongprayoon R, Srisapoome P, Sirinarumitr T. The production of anti-Vibrio harveyi egg yolk immunoglobulin and evaluation of its stability and neutralisation efficacy. Food Agric Immunol. 2013;24(3):279–94.

Evaluation of inactivated Vibrio fluvialis vaccine in Hyline W36 breeding hens

Mojtaba Mirzaei[*1], Mohsen Najimi[2], Mohammad Jahantigh[3], Firouz Ebrahimi[4], Abbas Jamshidian[5], Narjes Hasan Fakhrabadi[6]

1- Graduated doctor of veterinary medicine, Faculty of Veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Department of Clinical Science Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Biology research center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
5- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
6- DVM student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: January 8, 2018; Revise: January 30, 2018; Accept: March 11, 2018

Summary

Vibrio fluvialis causes disease and significant economic losses in breeding fish. This bacterium is considered as a human pathogen and several species of marine spawning fish. The egg yolk immunoglobulin technology (IgY) has been used to control many microbial infections. The purpose of the present study was to evaluate the vaccine prepared from V. fluivialis bacteria after injection into laying hens. V. fluvialis was admixed by 0.05% formaldehyde after culture in a liquid medium. Then, the pathogen along with Freund's adjuvant was injected to the Hyline W36 hens as a vaccine for 7 days. Increase of the weight of the hens was measured until Physical maturity and egg production. Then, an Indirect ELISA was designed to detect IgG Anti V. fluivialis. Injection of the vaccine had no significant effect on weight gain of hens and the number and weight of eggs during the experiment. ELISA test showed that antibody titers in the serum of hyper-immunized hens after injection of the fourth booster reached 1: 12800. According to the results obtained and the results of studies by other researchers, egg yolk antibody (IgY), which is the same as IgG, has been shown to inhibit the pathogenicity in lab and farm animals.

Keywords: *Freund's adjuvant, laying hens, Vibrio fluviali*

بررسی تغییرات تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا در زرده تخم‌مرغ در دوره انکوباسیون و تأثیر آن بر تکثیر داخل تخم‌مرغی ویروس‌ها

لیلا علیزاده ارسی*[۱]، عارف هوشیاری[۱]، علی آمقی رودسری[۱]، ابوالفضل غنی ئی[۲]، بهبود جعفری[۳]، ابوالفضل جعفری ثالث[۴]

۱- بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، کرج، ایران
۲- گروه بیماریهای طیور، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران
۴- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون،کازرون، ایران

دریافت مقاله: ۵ دی ۱۳۹۶، بازنگری: ۲ بهمن ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۶ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

آنتی‌بادی‌های مادری از طریق زرده تخم‌مرغ جذب شده و وارد گردش خون جوجه می‌شوند. ایمنی پاسیو کسب شده از آنتی‌بادی مادری در جوجه می‌تواند اثرات عوامل عفونی را کاهش داده یا از بروز بیماری‌های بالینی جلوگیری کند. بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا از بیماری‌های بسیار مهم و واگیر در پرندگان هستند که خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد می‌کنند. تست ممانعت از هماگلوتیناسیون یکی از تست‌های رایج و عمومی برای تشخیص تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا در پرندگان است. در بررسی حاضر در سه مرحله مقادیر تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا در سرم مرغ مادر، زرده تخم‌مرغ و جوجه یک روزه به روش تست ممانعت از هماگلوتیناسیون اندازه‌گیری گردید. در این بررسی در سه دوره متوالی تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در سرم مرغ مادر اندازه‌گیری و با مقادیر آن در زرده تخم‌مرغ حاصل از همان گله مقایسه گردید. مقادیر تیتر این آنتی‌بادی‌ها در زرده تخم‌مرغ در دوره انکوباسیون در روزهای اول، سوم، ششم، نهم، چهاردهم و هیجدهم اندازه‌گیری شد. همچنین این مقادیر با تیتر آنتی‌بادی در سرم جوجه یک روزه همان گروه تخم‌مرغ‌ها مقایسه گردید. در قسمتی از بررسی با تزریق ویروس‌های نیوکاسل و آنفلوانزا در حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار مقادیر تست EID_{50} در تخم‌مرغ‌های دارای آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا با مقادیر آن در تخم‌مرغ‌های فاقد آنتی‌بادی‌های مذکور (SPF) مقایسه گردید. بررسی آماری نتایج نشان داد که مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در سرم خون مادر تفاوت معنی‌داری با مقادیر این آنتی‌بادی در زرده تخم‌مرغ این گله ندارد ($P>0.05$). نتایج اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در دوره انکوباسیون نشان داد که مقدار این آنتی‌بادی در مدت انکوباسیون در روزهای مختلف و همچنین بین مقادیر آنها در زرده و سرم جوجه یک روزه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P>0.05$). بنابراین می‌توان با اندازه‌گیری آنتی‌بادی در زرده تخم‌مرغ، تیتر آنتی‌بادی را در سرم گله مادر و سرم جوجه حاصل از این تخم‌مرغ‌ها تخمین زد. نتایج تست EID_{50} نشان داد که EID_{50} ویروس نیوکاسل، حاصل از تزریق آن به تخم‌مرغ SPF نسبت به تزریق آن به تخم‌مرغ دارای آنتی‌بادی بالاتر بوده ($P<0.05$) ولی در مورد ویروس آنفلوانزا تفاوت معنی‌داری بین مقادیر EID_{50} در تخم‌مرغ SPF و تخم‌مرغ دارای آنتی‌بادی وجود ندارد ($P>0.05$). لذا در مورد نیوکاسل جهت انجام تست مذکور بهتر است از تخم‌مرغ SPF استفاده گردد.

واژگان کلیدی: *آنتی‌بادی، زرده تخم، ویروس آنفلوانزای پرندگان، ویروس نیوکاس*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: leilaalizadeharsi@gmail.com

مقدمه

ویروس آنفلوانزا جزء خانواده ارتومیکسوویریده و جنس ویروس آنفلوانزا می‌باشد. ویروس به تیپ‌های A، B و C بر مبنای آنتی‌ژن‌های داخلی نوکلئوپروتئین و پروتئین ماتریکس تقسیم می‌شود (۱). ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A بر مبنای ۱۸ پروتئین سطحی هماگلوتینین (H) و ۱۱ نورآمینیداز (N) به تحت تیپ‌هایی تقسیم می‌شوند (۲). با توجه به بیماری‌زایی، این ویروس‌ها را به دو گروه با بیماری‌زایی بالا (HPAI) و بیماری‌زایی کم (LPAI) تقسیم‌بندی می‌کنند (۳). ویروس‌های H7 و H5 عوامل اصلی ویروس‌های HPAI محسوب می‌شوند(۴). ویروس H9N2 که یکی از تحت تیپ‌های شایع طبقه LPAI محسوب می‌شود، در بسیاری از مناطق دنیا از جمله در آسیا و خاورمیانه گزارش شده است (۵). ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 یکی از تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا است که در ایران بومی می‌باشد و مسبب خسارات زیادی در صنعت طیور کشور می‌باشد. این تحت تیپ قابلیت انتقال به انسان را نیز دارد و به عنوان یک پاتوژن زئونوز محسوب می‌شود (۶). ویروس H9N2 جز ویروس‌هایی با بیماری‌زایی پائین محسوب می‌شود که منجر به بیماری‌های تنفسی، کاهش تولید تخم‌مرغ، اسهال و سندرم‌های کلیوی می‌شوند. البته بیماری‌زایی این ویروس‌ها متأثر از عوامل دیگری مانند سن، گونه، شرایط محیطی و مدیریتی و سایر عفونت‌های همزمان نیز می‌باشد (۷). ویروس H9N2 پتانسیل بازآرایی با سایر تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا را دارد (۱۰، ۸). لذا یکی از ویروس‌هایی محسوب می‌شود که توان ایجاد پاندمی را به صورت بالقوه دارا می‌باشد. واکسیناسیون استراتژی مؤثر و اقتصادی جهت کنترل و پیشگیری از ویروس‌های آنفلوانزا محسوب می‌شود (۱۱).

نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت طیور محسوب می‌شود. عامل آن تیپ ۱ پارامیکسوویروس پرندگان می‌باشد و بالغ بر ۲۰۰ گونه پرنده را آلوده می‌کند (۱۲). ویروس‌های نیوکاسل را بر اساس بیماری‌زایی شان در ماکیان به سه گروه ولوژنیک، مزوژنیک و لنتوژنیک تقسیم‌بندی می‌کنند (۱۳). عفونت ویروس نیوکاسل از فرم فوق العاده کشنده تا حالت بدون علائم متغیر می‌باشد (۱۲). از استراتژی‌های مختلف برای کاهش انتشار ویروس و کنترل خسارت‌های اقتصادی آن استفاده شده است. واکسیناسیون به عنوان تنها گزینه ایمن در کنترل بیماری ذکر شده است (۱۴). البته بدیهی است که هیچ برنامه واکسیناسیونی نمی‌تواند جایگزین برنامه امنیت زیستی و رعایت اصول بهداشتی در سطح مزارع قلمداد شود. در ایران از واکسن‌های زنده و کشته برای کنترل بیماری نیوکاسل استفاده می‌شود. بهترین روش تشخیص بیماری، جداسازی و شناسایی عامل می‌باشد. تست‌های سرمی ابزارهای مفیدی در تشخیص عفونت می‌باشند. از این تست‌ها در سطح وسیعی برای تشخیص عفونت در گله‌های طیور استفاده می‌شود. تست مهار هماگلوتیناسیون (HI) رایج‌ترین تستی است که از آن برای ردیابی پاسخ‌های ایمنی در پرنده‌های آلوده استفاده می‌شود (۱۲). ایمنی مادری در طیور از طریق تخم‌مرغ به جوجه منتقل می‌شود و ایمونوگلوبولین‌های ناشی از بیماری یا واکسیناسیون در زرده جمع می‌شوند که آنتی‌بادی‌های موجود، جوجه را تا مدتی بعد از تولد محافظت می‌کند که این مدت بستگی به عیار آنتی‌بادی مورد نظر دارد. با تعیین مقادیر آنتی‌بادی‌های زرده‌ی تخم‌مرغ می‌توان مراحل بیماری در گله‌ها را بررسی و ارزیابی نمود. از این رو مطالعات و بررسی‌های فراوانی جهت جایگزینی استفاده از تست‌های زرده بجای سرم انجام یافته است (۱۵،۱۶). امروزه با توجه به اهمیت

واکسیناسیون گله‌ها خصوصا در یک‌روزگی در واحدهای جوجه‌کشی، چنانچه این تکنیک و فرمول‌ها و تفاوت‌های مقادیر آنتی‌بادی در سرم و زرده‌ی تخم‌مرغ به‌دست بیاید می‌توان با کمترین هزینه نسبت به تعیین زمان واکسیناسیون و انجام اقدامات پیشگیرانه قبل از درآمدن جوجه اقدام نمود. ایمنی مادری باید بتواند جوجه را قبل از دریافت اولین واکسن محافظت نماید، آنتی‌بادی در جوجه یکروزه ارتباط مستقیم با سطح آنتی‌بادی مادر دارد (۱۷). لذا تخمین آنتی‌بادی موجود در جوجه‌ی یک‌روزه می‌تواند ارزیابی میزان حفاظتی علیه بیماری خاصی را راحت‌تر کند، بدین صورت که با رسیدن به الگوی تغییرات و ارتباط سطح آنتی‌بادی مادر، زرده‌ی تخم‌مرغ و جوجه و همچنین احتمال تغییرات در طول دوره‌ی انکوباسیون می‌توان پیش‌بینی دوره حفاظت و همچنین اولین زمان واکسن را مشخص نمود. از طرفی استفاده از تخم‌مرغ برای تکثیر ویروس و با هدف تشخیص و جداسازی ویروس‌ها و همچنین تکثیر و بررسی جهت تولید انواع واکسن‌های زنده و غیرفعال، اهمیت ارزیابی آنتی‌بادی‌های زرده‌ی تخم‌مرغ را بیشتر می‌کند.

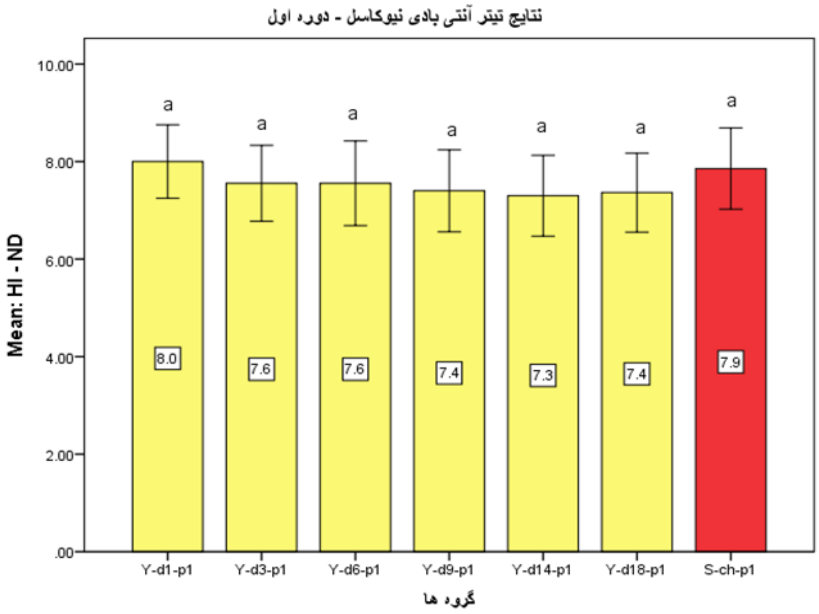
مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۳۰۰ عدد تخم‌مرغ بهداشتی گله مادر تخم‌گذار نژاد لاین واقع در شهرستان ملکان مرغداری فتحی تهیه گردید و تعداد ۳۰۰ تخم‌مرغ SPF وارداتی از شرکت VENKYS کشور هند تهیه گردید. بعد از تهیه تخم‌مرغ‌ها از گله مادر، قبل از شروع انکوباسیون تعداد ۲۰ عدد تخم‌مرغ از هر گروه جهت انجام تست به‌صورت تصادفی برداشته شد و بعد از جداسازی زرده تیتر HI آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا اندازه‌گیری شد. تخم‌مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۶۵ درصد با چرخش اتوماتیک هر سه ساعت یک بار انکوبه گردیدند. در طول دوره انکوباسیون در روزهای سوم، ششم، نهم، چهاردهم و هیجدهم تعداد ۲۰ عدد تخم‌مرغ برای روزهای ذکر شده از دستگاه جوجه‌کشی برداشت شد و به سردخانه منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت تخم‌مرغ‌ها به آزمایشگاه منتقل و زرده آنها جدا گردید. برای انجام تست HI ابتدا در داخل یک ظرف ناودانی مقداری محلول PBS ریخته سپس با استفاده از سرسمپلر هشت کاناله در داخل گوده‌های ستون افقی میکروپلیت V شکل از شماره ۱ تا شماره ۱۲ مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول ریخته و از نمونه سرم‌ها ۵۰ میکرولیتر در گوده‌های ستون اول ریخته و به صورت سریال رقت‌سازی انجام گردید، تا گوده‌ی شماره ۱۲، ۵۰ میکرولیتر بیرون ریخته شد، با استفاده از شیکر لوله‌ای، آنتی‌ژن واحددار را شیک کرده سپس آنتی‌ژن شیک شده را در داخل یک ظرف ناودانی دیگر ریخته به مقدار ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن واحددار نیوکاسل یا آنفلوانزای تهیه شده به گوده‌های شماره‌ی ۱ تا ۱۲ اضافه کرده و درپوش میکروپلیت گذاشته شد و به مدت یک دقیقه بر روی شیکر مکانیکی قرار داده یا به آرامی میکروپلیت را به طور دورانی در دو جهت تکان داده و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده، بعد از ۳۰ دقیقه به تمامی گوده‌ها ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز شسته شده ۱ درصد اضافه گردید. میکروپلیت به مدت ۱۵ ثانیه بر روی شیکر مکانیکی نهاده یا به آرامی میکروپلیت را به طور دورانی در دو جهت تکان داده و بعد از آن به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گذاشته شد و پس از گذشت زمان فوق گودی که ریزش داشت قرائت گردید. برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. داده‌های به دست آمده توسط تست‌های ANOVA وTukey

مـورد تحلیـل و تجزیـه آمـاری قـرار گرفتنـد. نتـایج به‌صـورت میـانگین و انحـراف معیـار (Mean ± SD) نشـان داده شـد، در تمـام مـوارد $p<0/05$ معنـی‌دار تلقی گردید.

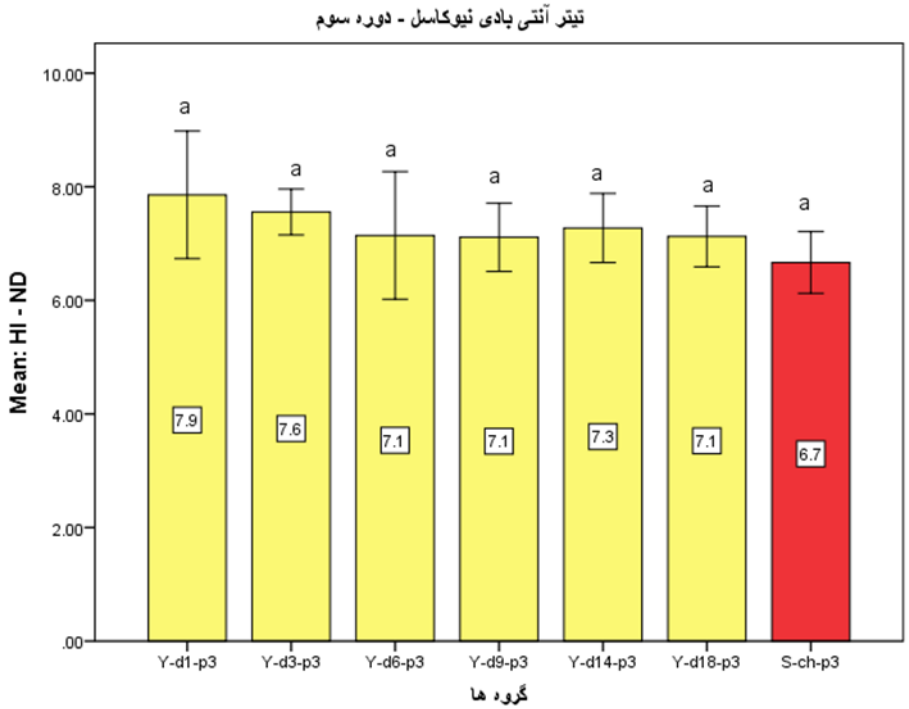
نتایج

انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتی‌بـادی نیوکاسـل در سـه دوره متـوالی در زرده تخم‌مـرغ توسـط تسـت HI انجام گرفت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۱تـا ۳ آمـده اسـت. همین‌طـور انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتی‌بـادی آنفلـوانزا در سـه دوره متـوالی در زرده تخم‌مـرغ توسـط تسـت HI انجـام گرفـت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۴ تا ۶ آمده اسـت. انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتـی‌بـادی آنفلوانزا در سـه هفتـه متـوالی در سـرم خـون گلـه مـادر و زرده تخم‌مرغ‌های حاصـل از همـان گلـه توسـط تسـت HI انجام گرفـت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۷ آمـده اسـت. همچنـین انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتـی‌بـادی نیوکاسل در سه هفتـه متـوالی در سـرم خـون گلـه مـادر و زرده تخم‌مرغ‌های حاصـل از همـان گلـه توسـط تسـت HI انجام گرفـت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۸ آمـده است.

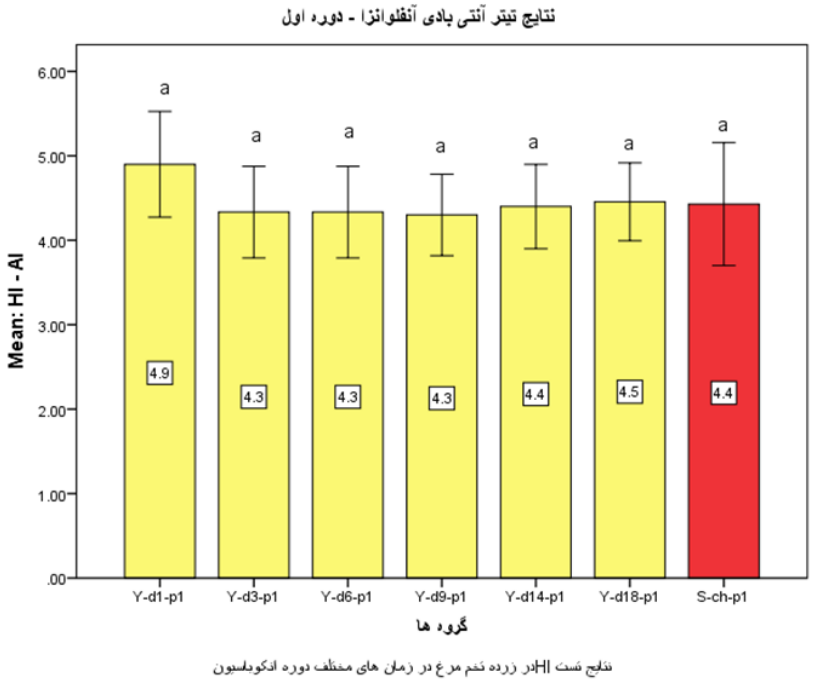


نمودار ۱- نتایج تیتر آنتی بادی نیوکاسل - دوره اول (از گله ۴۱ هفته)

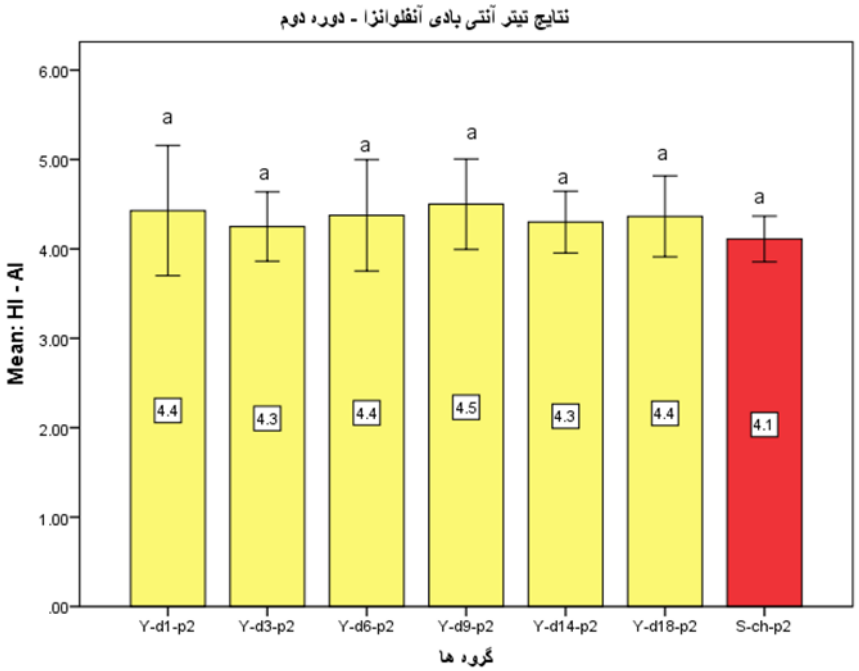
مقایسـه مقـادیر تسـت EID_{50} بـرای ویـروس نیوکاسـل بـا اسـتفاده از تخم‌مـرغ SPF و Local نشـان داد کـه میـانگین آن در تخم‌مـرغ SPF ($Log_{10}10$) و میـانگین آن در تخم‌مرغ Local ($Log_{10}2/9$) اسـت. مقایسـه مقـادیر تسـت EID_{50} بـرای ویـروس آنفلـوانزا بـا اسـتفاده از تخم‌مـرغ SPF و Local نشـان داد کـه میـانگین آن در تخم‌مـرغ SPF ($Log_{10}7/9$) و میـانگین آن در تخم‌مرغ Local ($Log_{10}5/9$) است.



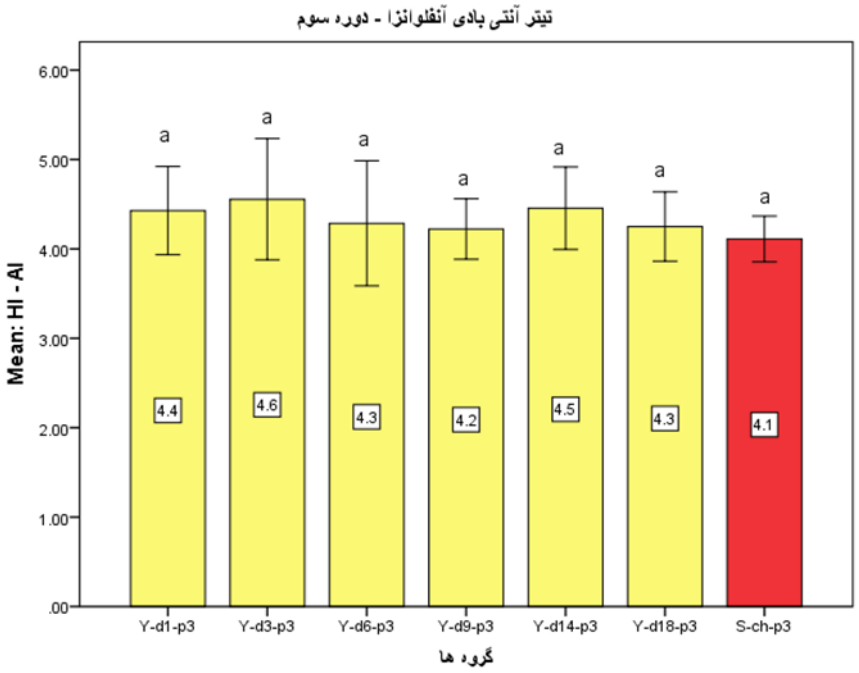
نمودار ۳- نتایج HI نتایج تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل - دوره سوم (از گله ۴۷ هفته)



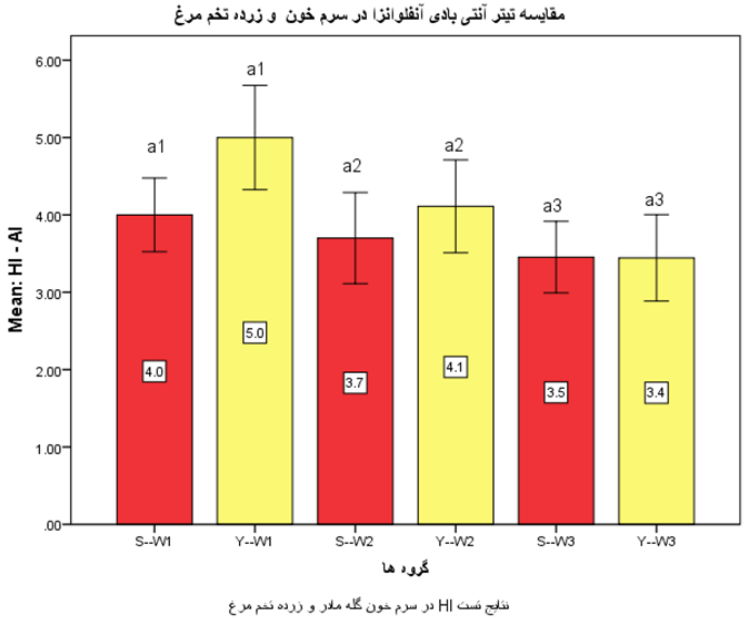
نمودار ۴- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا - دوره اول (از گله ۴۱ هفته)



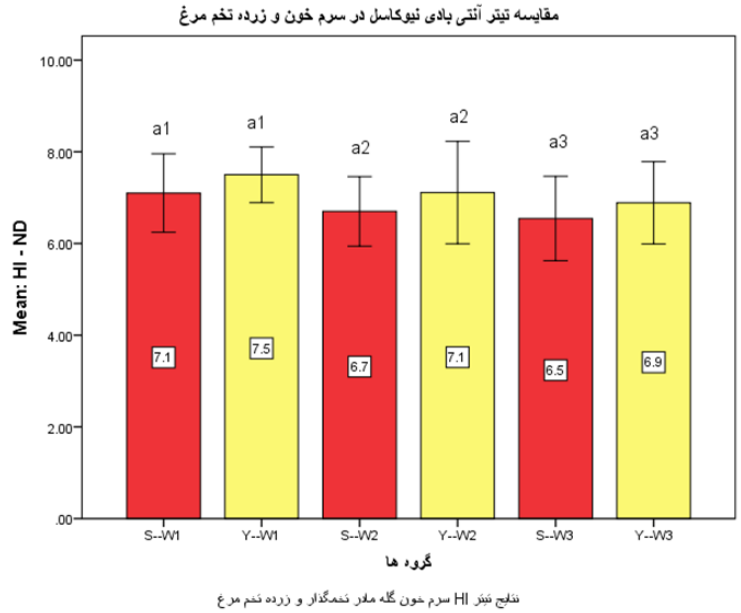
نمودار ۵- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا - دوره دوم (از گله ۴۴ هفته)



نمودار ۶- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا - دوره سوم (از گله ۴۷ هفته)



نمودار ۷- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در سرم خون و زرده تخم‌مرغ



نمودار ۸- نتایج تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در سرم خون و زرده تخم‌مرغ

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی آماری میانگین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در روزهای مختلف دوره انکوباسیون در سه دوره نشان داد که مقادیر این آنتی‌بادی در طول دوره انکوباسیون تغییرات معنی‌داری ندارند ($P<0.05$). نتایج بررسی در سه دوره ارزیابی روند مشابهی را نشان داد و همچنین مقایسه میانگین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده و سرم جوجه‌های حاصل نشان می‌دهد که بین مقادیر این آنتی‌بادی در زرده و سرم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P<0.05$). لذا با توجه به نتایج حاصل می‌توان با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده در طول دوره انکوباسیون مقادیر احتمالی آن را در جوجه‌های

حاصل تخمین زد و قبل از در آمدن جوجه از تخم‌مرغ در واحدهای جوجه‌کشی می‌توان با اندازه‌گیری آنتی‌بادی نیوکاسل ضمن تخمین مقادیر آن در سرم جوجه‌ها نسبت به برآورد وضعیت ایمنی جوجه‌ها و برنامه‌ریزی برای برنامه واکسیناسیون روزهای اول جوجه اقدام لازم را به عمل آورد. همچنین بررسی آماری میانگین تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در روزهای مختلف دوره انکوباسیون در سه دوره نشان داد که مقادیر این آنتی‌بادی در طول دوره انکوباسیون تغییرات معنی‌داری ندارد ($P<0.05$) . نتایج بررسی در سه دوره ارزیابی روند مشابهی را نشان داد و همچنین مقایسه میانگین تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در زرده و سرم جوجه‌های حاصل نشان می‌دهد که بین مقادیر این آنتی‌بادی در زرده و سرم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P<0.05$). لذا با توجه به نتایج حاصل می‌توان با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی آنفلوانزا در زرده در طول دوره انکوباسیون مقادیر احتمالی آن را در جوجه‌های حاصل تخمین زد و قبل از در آمدن جوجه از تخم‌مرغ در واحدهای جوجه‌کشی می‌توان با اندازه‌گیری آنتی‌بادی آنفلوانزا ضمن تخمین مقادیر آن در سرم جوجه‌ها نسبت به برآورد وضعیت ایمنی جوجه‌ها و برنامه‌ریزی برای برنامه واکسیناسیون روزهای اول جوجه اقدام لازم را به عمل آورد. بررسی و مقایسه آماری میانگین تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در سرم خون و زرده تخم‌مرغ در طول سه هفته متوالی نشان می‌دهد که مقادیر این آنتی‌بادی در سرم و زرده تخم‌مرغ تغییرات معنی‌داری ندارد ($P<0.05$). لذا با توجه به نتایج حاصل می‌توان با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی آنفلوانزا در زرده، مقادیر احتمالی آن را در سرم خون گله مادر و یا بالعکس تخمین زد و با اندازه‌گیری آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده می‌توان وضعیت ایمنی گله مادر را ارزیابی نمود. بررسی و مقایسه آماری میانگین مقدار EID_{50} ویروس نیوکاسل در تخم‌مرغ SPF به‌صورت معنی‌داری بیشتر از میانگین آن در تخم‌مرغ Local است ($P\geq0.05$). لذا با توجه به وجود آنتی‌بادی در تخم‌مرغ لوکال در ارزیابی تست EID_{50} ویروس نیوکاسل بهتر است از تخم‌مرغ SPF استفاده گردد. بررسی و مقایسه آماری میانگین مقدار EID_{50} ویروس آنفلوانزا در تخم‌مرغ SPF تفاوت معنی‌داری با میانگین آن در تخم‌مرغ Local ندارد ($P<0.05$). ایمنی مادری جوجه را در اوایل زندگی محافظت می‌نماید و مقادیر آنتی‌بادی زرده فاکتور مهم ایمنی جوجه یک روزه است. بنابراین با تعیین تیتر آنتی‌بادی مادری می‌توان زمان اولین واکسیناسیون جوجه را تخمین زد. خون‌گیری از پرندگان و جداسازی سرم آن برای مونیتورینگ انواع بیماری‌ها یک روش مرسوم می‌باشد ولی مطالعات زیادی انجام یافته که نشان می‌دهد ارتباط خوب و مستقیمی بین مقادیر آنتی‌بادی در سرم و زرده تخم‌مرغ مادر وجود دارد. بنابراین استفاده از تیتر آنتی‌بادی زرده به عنوان روش جایگزینی برای نمونه سرم مطرح گردیده است. جستجوی آنتی‌بادی‌های ویژه عوامل بیماری‌زای طیور در زرده و مقایسه آن با سرم خون توسط محققین مختلف انجام یافته است. برای این جستجو از آزمایشات متداول از جمله تست HI و الایزا برای انواع بیماری‌ها استفاده شده است (۱۸،

۱۵). در بررسی حاضر از روش HI برای تعیین مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا استفاده شد که در حال حاضر در اکثر آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بوداد و همکاران (۱۸) در سال ۲۰۱۲ در بررسی خود تحت عنوان استفاده از آنتی‌بادی زرده برای تخمین سن مناسب واکسیناسیون علیه بیماری بورس عفونی به این نتیجه رسید که تفاوت معنی‌داری در مقادیر تیتر آنتی‌بادی زرده و سرم وجود ندارد که در تحقیق حاضر نیز نتایج نشان داد در مورد آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا تفاوت معنی‌داری بین مقادیر آن در سطح سرم و زرده وجود ندارد که مطابق با یافته‌های محققین فوق می‌باشد.

بیک و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۰۳ در تحقیقی که تحت عنوان، معتبرسازی تست آنتی‌بادی زرده برای تعیین تیتر آنفلوانزا در نژاد لگهورن سفید انجام دادند. تیتر آنتی‌بادی در زرده و سرم متعاقب واکسیناسیون را ارزیابی کردند و نشان دادند مقادیر آنتی‌بادی در سرم در واکسیناسیون با واکسن زنده آنفلوانزا زودتر مشخص می‌گردد. به این معنی که آنتی‌بادی در سرم زودتر از زرده قابل ردیابی است. اما در مواردی که بیماری تازه اتفاق افتاده باشد می‌تواند سطح آنتی‌بادی را در زرده کمتر نشان دهد. اما در بررسی ما با توجه به واکسیناسیون برنامه‌ریزی شده در گله مادر، امکان خطا کمتر وجود داشت. در تحقیق حاضر نیز اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی آنفلوانزا در سرم خون جوجه یک روزه، مرغ مادر و زرده انجام یافت که بیانگر عدم تفاوت سطح معنی‌دار در بین مقادیر آنتی‌بادی زرده و سرم خون آنها بود. و از طرفی به علت عدم تغییرات سطح آنتی‌بادی در طول انکوباسیون، نتایج تحقیق اخیر بیانگر این است که سطح آنتی‌بادی در زرده قبل از انکوباسیون و سطح آنتی‌بادی در جوجه یک روزه حاصل از همان تخم‌مرغ‌ها تفاوت معنی‌داری ندارد و با اطمینان می‌توان سطح آنتی‌بادی جوجه‌ها را با اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی زرده تخمین زد. سانگ ژون و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۰۳ در تحقیقی که تحت عنوان روش غیر مستقیم برای تعیین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در جوجه‌ها به‌وسیله تیتر کردن آنتی‌بادی‌ها در زرده تخم‌مرغ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که همبستگی مثبت بین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده و سرم مرغ مادر و همچنین بین تیتر زرده و سرم جوجه یک روزه وجود دارد و بیان کردند می‌توان از تست HI زرده به عنوان روش جایگزین برای نمونه خون در مرغ مادر و جوجه یک‌روزه استفاده کرد که نتایج آن با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارد.

جیووانی توسی و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۰۵ تیتر آنتی‌بادی *مایکوپلاسما* را در زرده و سرم مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که بین مقادیر آنتی‌بادی موجود در زرده و سرم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و بیان کردند که ارزیابی تیتر آنتی‌بادی زرده یک رهیافت مناسب و عملی برای بررسی شیوع عفونت *مایکوپلاسما* در گله مادر است. که عدم معنی‌دار بودن نتایج حاصل در خصوص آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در ارزیابی زرده و سرم مشابه محققین فوق می‌باشد.

دارل و همکارن (۲۱) در سال ۲۰۰۶ مقادیر آنتی‌بادی آنفلوانزای طیور را در زرده و سرم بررسی کردند. آنها در بررسی خود سطح آنتی‌بادی سرم و زرده را در هفته‌های مختلف متعاقب ایجاد عفونت با ویروس آنفلوانزای پرندگان سویه H_6N_2 اندازه‌گیری کردند و به این نتیجه رسیدند که آنتی‌بادی در سرم نسبت به زرده زودتر ظاهر شده و پیک آن در سرم بیشتر بوده و به مدت طولانی در مقادیر بالا حفظ می‌شود.

اما در تحقیق حاضر مشخص شد که آنتی‌بادی

آنفلوانزا در سرم مرغ مادر تخم‌گذار با مقادیر آن در زرده تفاوت معنی‌داری ندارد که احتمالاً دلیل آن این است که زمان نمونه برداری بعد از به اوج رسیدن پاسخ ایمنی به واکسناسیون بوده است و چنانچه قبل از این زمان نمونه‌برداری انجام می‌شد احتمالا مقادیر آنتی‌بادی در سرم مرغ مادر تخم‌گذار و زرده تخم‌مرغ معنی‌دار می‌شد. بنابراین زمان واکسیناسیون گله مادر و فاصله نمونه‌برداری از آن و همچنین نوع واکسن استفاده شده از جهت زنده یا غیر فعال بودن آن می‌تواند منجر به اختلاف در یافته‌های محققین مختلف شود. از این رو در تفسیر نتایج در نظر گرفتن برنامه واکسیناسیون می‌تواند نحوه نتیجه‌گیری را کاملاً تغییر دهد. با عنایت بر اینکه گله مادر مورد استفاده در این بررسی از واکسن دوگانه غیر فعال روغنی نیوکاسل و آنفلوانزای طیور حدود ۳۵ روز قبل از شروع نمونه برداری استفاده کرده بود لذا این فاصله زمانی باعث شد که تیتر این دو آنتی‌بادی در سرم و متعاقب آن در زرده به پیک برسد و این پیک به خاطر استفاده از واکسن روغنی برای مدتی در اوج حفظ شد و این می‌تواند دلیل اصلی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میانگین تیتر آنتی‌بادی در سرم و زرده در سه دوره متوالی باشد.

آنالیز نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در مواقعی که دسترسی به گله مادر جهت گرفتن نمونه خون و سرم وجود ندارد، می‌توان جهت تعیین عیار آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در گله بجای نمونه سرم از زرده تخم‌مرغ همان گله استفاده کرد و همچنین با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده دقیقاً می‌توان میزان این آنتی‌بادی را در سرم جوجه یک روزه حاصل از همان گله تخمین زد. در صنعت واکسن‌سازی و جداسازی ویروس‌ها جهت بررسی عفونت‌زایی ویروس نیوکاسل بهتر است از تخم‌مرغ SPF استفاده گردد.

References

1- Capua I, Alexander DJ. Ecology, Epidemiology and Human Health Implications of Avian Influenza Virus Infections, In: Capua, I. and Alexander, D.J. (Eds.). Avian Influenza and Newcastle Disease. 2009. P.5 (Winterer Ltd).

2- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, and et al. New world bats harbor diverse influenza a viruses. PLoS Pathog. 2013; 9(10):e1003657.

3- Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol. 2000; 74:3–13.

4- Iqbal M, Yaqub T, Mukhtar N, Shabbir MZ, McCauley JW. Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds. Vet Res. 2013; 44:100.

5- Alexander DJ. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia 2002–2006. Avian Dis. 2007; 51:161–166.

6- Capua I, Alexander DJ. Human Health Implications of Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses. Eur J Clin Microbiol Infect. 2004; 23:1–6.

7- Zhang P, Tang Y, Liu X, Peng D, Liu W, Liu H, Lu S, Liu X. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5-year period (1998-2002). J Gen Virol. 2008; 89(Pt 12):3102-12.

8- Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z., Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. N Engl J Med. 2003; 368(20):1888-97.

9- Ewert DL, Eidson CS, Dawe DL. Factors influencing the appearance of antibody intracheal washes and serum of young chickens after exposure to Newcastle disease virus. Infect Immun. 1977; 18:138-145.

10- Monne I, Yamage M, Dauphin G, Claes F, Ahmed G, Giasuddin M, et al. Reassortant avian influenza A (H5N1) viruses with H9N2-PB1 gene in poultry, Bangladesh. Emerg Infect Dis. 2013; 19(10):1630-4.

11- Shen H, Wu B, Li G, Chen F, Luo Q, Chen Y, Xie Q. H9N2 Subtype Avian Influenza Viruses in China: Current Advances and Future Perspectives. Br J Virol. 2014; 1(2):54-63.

12- Alexander DJ, Senne DA, Newcastle disease and other paramyxoviruses. In: L.D Zavala, ed. Isolation, identification and characterization of avian pathogens. Omnipress. 2008.

13- Beard CW. Serological procedures, In: Purchase, H.G.; Arp, L.H. Domermuth, C.H. and Pear-

son, J.E. (eds), A Labaratory Manual for the Isolation and Identification Avian Pathogens, 3rd ed 1989; p.192-200.

14- Orajaka LJE, Adene DF, Anene BM, Onuoha EA. Seroprevalence of Newcastle disease in local chickens from Southeast derived savannah zone of Nigeria. Revue Elevage Medicine Veterinaire pays Tropicaux. 1999; 52:185-188.

15- Beck JR, Swayne DE, Davison S, Casavant S, Gutierrez C. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. Avian Dis. 2003; 47(3):1196-9.

16- Silva MS, Swayne DE. Serum and egg yolk antibody detection in chickens infected with low pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 2012; 56(3), 601-604.

17- Allan WH, Lancaster JE, Toth B. Newcastlle disease vaccines their production and use. FAO. 1978.

18- Boudaoud A, Mamache B. Use of Egg Yolk Antibodies to Predict Optimal Age of Vaccination against Infectious Bursal Disease (IBD) in Broilers. International Journal of Poultry Science. 2012; 11(2):138-142.

19-Sang-Geon Y, Eva N, Peter JK. Indirect method for prediction of hemagglutination inhibition antibody titers to Newcastle disease virus in chickens by titration of antibodies in egg yolk. J Vet Diagn Invest. 2003; 15:184–187.

20- Giovanni T, Roberto L, Marco T, Roberto C. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of Mycoplasma gallisepticum infection in laying hens in Italy Ital J Anim Sci. 2005;4:272-275.

21- Darrell WT, En-Min Z, Kyoung-Jin Y, Kenneth JK. Detection of antibodies in serum and egg yolk following infection of chickens with an H6N2 avian influenza virus. J Vet Diagn Invest. 2006; 18:437–442.

Evaluation of Antibody Titer Changes against Newcastle Disease and influenza (H9N2) In the Egg Yolk during Incubation Period and its Impact on The Replication of the Viruses

Leila Alizadeh-Arsi*[1], Aref Hoshyari[1], Ali Ameghi-Roodsary[1], Abolfazl Ghaniei[2], Behboud Jafari[3], Abolfazl Jafari-Sales[4]

1- Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj
2- Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia
3- Department of Microbiology, Ahar branch, Islamic Azad University, Ahar
4- Department of Microbiology, Kazeroon branch, Islamic Azad University, Kazeroon

Receive: December 26, 2017; Revise: January 22, 2018; Accept: February 25, 2018

Summary

Maternal antibodies are transferred from hens to their offWinter through the egg yolk where the antibody is absorbed and enters the circulatory system. Passive immunity via maternal antibodies can lessen the effects of clinical diseases in chicks or prevent the incidence of them. Haemagglutination inhibition (HI) test is one of the popular assays for detection of Newcastle disease virus (NDV) and Avian influenza virus (AIV) infections. Newcastle disease and avian influenza disease are very important contagious infections which causes vast economic losses to poultry industry. In this study, antibody titres against NDV and AIV measured in serum of breeders, egg yolk, and day old chicks by HI method. NDV and AIV antibodies compared in serum of breeders and egg yolk of the flock. Level of antibodies in the first, third, 6^{th}, 9^{th}, 14^{th}, and 18^{th} days of incubation measured and compared. These values compared with antibody levels of day old chicks. In another experiment, NDV and AIV injected to eggs via allantoic cavity of eggs. EID50 test was used to compare the eggs with NDV and AIV antibodies and the eggs without antibodies (SPF eggs). There was no significant difference in NDV and AIV titres in serum of breeders and egg yolk samples ($P>0.05$). Also, antibody titres during incubation and serum of day old chicks showed no significant difference ($P>0.05$). Hence, evaluation of egg yolk antibodies is a valuable tool for estimation of antibody levels in serum of breeders and their chicks. Results of NDV EID50 test showed significant difference between eggs with NDV antibodies and SPF eggs ($P<0.05$). But, this comparison about AIV was non-significant ($P>0.05$). Hence, it is better to use SPF eggs for determination of EID50 of NDV.

Keywords: *Avian influenza virus, egg yolk antibody, Newcastle disease virus.*

تعیین گروه‌های فیلوژنیک باکتری‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان زابل

یونس تیموری [۱]، رضا اسمعیل زاده دیزجی [۲*]

۱- دستیار تخصصی، بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
۲- دستیار تخصصی، بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

دریافت مقاله: ۳ آذر ۱۳۹۶، بازنگری: ۲۹ آذر ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۱ بهمن ۱۳۹۶

چکیده

باکتری *اشریشیا کلی* یک ارگانیسم فرصت‌طلب است که می‌تواند در طیور منجر به سندرم‌های کلی‌باسیلوز (کلی‌سپتی‌سمی، پریکاردیت، پری هپاتیت و سالپنژیت و...) گردد. *اشریشیا کلی* دارای ۴ گروه فیلوژنیکی شامل A، B1، B2 و D است. فیلوتایپینگ ایزوله‌های *اشریشیا کلی* روشی مناسب جهت بررسی نوع پراکندگی گروه‌های فیلوژنیک ایزوله‌های *اشریشیا کلی* در مناطق مختلف می‌باشد. بررسی حاضر به منظور تعیین گروه‌های فیلوژنیک *اشریشیا کلی* در شهرستان زابل صورت گرفت، در این مطالعه به منظور تعیین فراوانی گروه‌های فیلوژنیکی باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور گوشتی زابل، ۱۴۴ قطعه جوجه گوشتی مشکوک به کلی باسیلوز نمونه‌گیری شد و در محیط TSB به آزمایشگاه منتقل گردید. با انجام کشت‌های میکروبی و آزمایش‌های بیوشیمایی رایج تعداد ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* تعیین هویت گردید، DNA باکتری‌های ایزوله شده به روش جوشاندن استخراج گردید و به روش triplex PCR گروه‌های فیلوژنیک آنها تعیین شد. در این مطالعه از مجموع ۱۰۰ ایزوله، ۳۶، ۲۷، ۲۳ و ۱۴ درصد به ترتیب در گروه‌های فیلوژنیک B1، D، A و B2 قرار گرفتند. با انجام مطالعه حاضر مشخص گردید که اغلب ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان زابل متعلق به گروه‌های فیلوژنیک B1 بودند.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی، طیور، کلی‌باسیلوز، گروه فیلوژنیک، PCR*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: rezaesmailzade@rocketail.com

مقدمه

سویه‌های *اشریشیا کلی* عامل اصلی بیماری‌هایی چون کلی‌سپتی‌سمی در طیور گوشتی و بومی می‌باشند (۱). این فرم با حضور *اشریشیا کلی* در خون و کلونیزه شدن در ارگان‌های احشایی مختلف شامل قلب، کبد و طحال مشخص می‌شود. عفونت اولیه این باکتری در مجرای تنفسی رخ می‌دهد و در نهایت بیماری‌های گوناگونی را ایجاد می‌کند (۲). عموماً این وضعیت با عفونت کیسه‌های هوایی مشخص می‌شود که ممکن است همراه با سپتی‌سمی، پریکاردیت، پری‌هپاتیت و سالپنژیت باشد (۳). فیلوژنیک شاخه‌ای از علم زیست‌شناسی است که با استفاده از داده‌های توالی‌یابی مولکولی و ماتریکس داده‌های ریخت‌شناسی، به بررسی ارتباط تکاملی گروه‌های مختلف جانداران نظیر گونه‌ها یا جمعیت‌ها می‌پردازد (۴). وجود گروه‌های متمایز فیلوژن در باکتری *اشریشیا کلی* مدت‌هاست تأیید شده است (۵). در حال حاضر چهار گروه شناخته شده شامل A، B1، B2 و D وجود دارد (۶). سویه‌های این گروه‌ها، در ویژگی‌های فنوتیپی خود، از جمله توانایی آنها در استفاده از قندهای مختلف، پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباطات دما و نرخ رشد آنها، متفاوت می‌باشند (۷). اندازه ژنوم نیز در بین این چهار گروه متفاوت است، سویه‌های A و B1 دارای ژنوم‌های کوچکتر از سویه‌های B2 و D می‌باشند (۸).

به نظر می‌رسد سویه‌های این چهار گروه در تمایل به ایجاد بیماری، صفات زیست محیطی و ویژگی‌های پیشینه زندگی، تفاوت‌هایی داشته باشند (۹). اغلب گروه‌های A و B1 همزیست روده‌ای می‌باشند و گروه‌های B2 و به میزان کمتری D شامل سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای هستند (۱۰). بیماری‌زایی هر یک از این گروه‌های فیلوژنیک با فعالیت فاکتورهای بیماری‌زای متفاوتی همراه است (۱۱). مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین گروه‌های فیلوژنیک *اشریشیا کلی* عامل بیماری کلی‌باسیلوز جوجه گوشتی در منطقه سیستان انجام گرفت. نتیجه‌ی این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر جهت بررسی نوع پراکندگی گروه‌های فیلوژنیک ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و متعاقباً درمان دقیق تر بیماری‌های طیور باشد.

مواد و روش‌کار

این مطالعه توصیفی در فاصله‌ی زمانی آذر ماه سال ۱۳۹۳ تا شهریور ماه سال ۱۳۹۴ انجام پذیرفت. به منظور جداسازی باکتری *اشریشیا کلی* عامل کلی‌باسیلوز، از ۱۴۴ قطعه جوجه‌ی مشکوک به بیماری کلی‌باسیلوز از ۸ گله‌ی گوشتی در مناطق مختلف منطقه‌ی سیستان، توسط سوآپ استریل از محوطه‌ی بطنی (ضایعات مختلف بیماری از جمله پری‌هپاتیت، پری‌کاردیت، پریتونیت، عفونت کیسه‌ی زرده، تورم کیسه‌های هوایی و سالپینژیت) نمونه‌گیری شد و در محیط TSB (HIMEDIA) به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل گردید. نمونه‌ها در محیط TSB به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای تعیین هویت نمونه‌ها در محیط کشت Mac Conkey Agar (مرک آلمان) کشت و پس از ۱۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی‌های مشکوک به *اشریشیا کلی* انتخاب شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌های مورد نظر در محیط کشت EMB (مرک آلمان) کشت و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد و در نهایت پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی استاندارد، ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* شناسایی گردید (۱۲).

استخراج DNA و انجام Triplex-PCR: ابتدا ایزوله‌های *اشریشیا کلی* روی محیط براث TSB به

مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتیگراد گرماخانه‌گذاری گردید. از باکتری‌های رشد یافته، DNA ژنومیک به روش جوشاندن استخراج گردید، بدین صورت که چند کلنی باکتری برداشته شد و در ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه وارد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد جوشانده شد و پس از سانتریفوژ، محلول رویی به عنوان DNA الگو در ۲۰- درجه سانتیگراد به منظور انجام واکنش PCR ذخیره شد (۱۳). کیفیت ایزوله‌های استخراج شده و غلظت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهت طراحی پرایمر اختصاصی از نرم افزار CLC Main Workbench و Oligo analyzer استفاده شد، همچنین به منظور بررسی منحصر به فرد بودن پرایمرهای طراحی شده از Blast پایگاه اینترنتی NCBI استفاده گردید و در نهایت از شرکت پیشگام تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

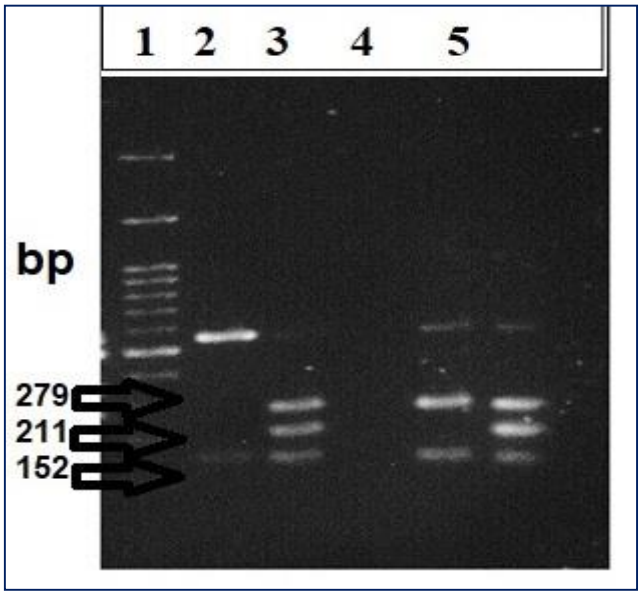
Primer name	Sequence	Length(N)	Band size (bp)	References
ChuA –F ChuA _R	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	۲۰ ۲۰	۲۷۹	(۱۴)
YjaA_F YjaA _R	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	۲۰ ۲۰	۲۱۱	(۱۴)
TspE4C2 _F TspE4C2 _R	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	۲۰ ۲۰	۱۵۲	(۱۴)

برای انجام واکنش PCR مواد مورد نیاز تهیه شد. به طور خلاصه پس از استخراج DNA ژنومی توالی‌های ژن‌های مارکر، chuA، yjaA و قطعه TspE4.C2 با استفاده از روش Triple-PCR تکثیر گردید. برنامه Triple-PCR به صورت یک سیکل در دمای ۳۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۹۰ سیکل شامل: واسرشتگی در دمای ۳۴ درجه به مدت ۹۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۵۵ درجه به مدت ۹۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام پذیرفت (۱۵).

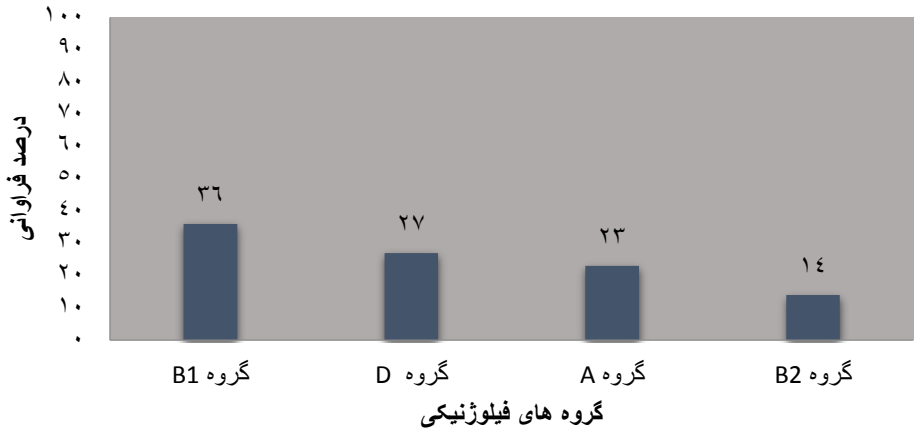
پس از انجام واکنش، ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش، در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر Ladder 100 ارزیابی شد. گروه‌بندی فیلوژنی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای تکثیری ژن‌های فوق به صورت: گروه B2 ($chuA^+$، $yjaA^+$، $TspE4.C2^{\pm}$)، گروه D ($chuA^+$، $yjaA^-$، $TspE4.C2^{\pm}$)، گروه B1 ($chuA^-$، $yjaA^{\pm}$، $TspE4.C2^-$) و گروه A ($chuA^-$، $yjaA^{\pm}$، $TspE4.C2^+$) با استفاده از روش Clermont و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد (۱۵) (شکل ۱).

نتایج

در این مطالعه نمونه‌گیری از ۱۴۴ قطعه جوجه‌ی مشکوک به بیماری کلی‌باسیلوز از ۸ گله‌ی گوشتی در مناطق مختلف شهرستان زابل انجام گرفت و پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی ۱۰۰ ایزوله اشریشیا کلی جداسازی گردید (۶۹/۴۴ درصد). پس از انجام واکنش PCR به روش Multiplex-PCR بر روی DNA های استخراج شده از این ایزوله‌ها، فراوانی گروه‌های فیلوژنی B1، D، A و B2 به ترتیب ۳۶، ۲۷، ۲۳ و ۱۴ درصد مشخص گردید (نمودار ۱). بنابراین گروه فیلوژنی B1 و B2 به ترتیب، بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند.



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش PCR برای تعیین گروه‌های فیلوژنی: ستون ۱ مارکر، ستون ۲ متعلق به گروه فیلوژنیک B1، ستون‌های ۳ و ۶ متعلق به گروه B2، ستون ۴ متعلق به گروه A و ستون ۵ متعلق به گروه D است.



نمودار ۱- فراوانی گروه‌های فیلوژنتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیا کلی پاتوژن پرندگان عامل بیماری کلی‌باسیلوز بوده و موجب آسیب بافت‌های خارج روده‌ای می‌شود (۱۶). این مطالعه برای اولین بار بر روی *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماری کلی باسیلوز و تعیین گروه فیلوژنیک این باکتری در منطقه‌ی سیستان انجام گرفت. نتایج مطالعات گذشته، حاکی از این است که اغلب سویه‌های همزیست *اشریشیا کلی* پاتوژن پرندگان متعلق به گروه فیلوژنیک A می‌باشند (۱۷)، درحالیکه باکتری‌های *اشریشیا کلی* خارج روده‌ای پاتوژن پرندگان (Extra- intestinal pathogenic *E.coli* or ExPEC) اکثراً متعلق به گروه فیلوژنیک B2 و به طور ناچیز متعلق به گروه D می‌باشند (۱۸). این در حالی‌است که در مطالعه Wu و همکارانش در سال ۲۰۱۵، همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، گروه B1 بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از لاشه‌های طیور داشت (۳۴ درصد)(۱۹). همچنین در مطالعات Hiki و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ژاپن که بر روی *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور صورت گرفت، گروه

فیلوژنیک B1 شایع‌ترین گروه بعد از گروه فیلوژنیک A بود (۲۰). در مطالعات Jakobsen و همکارانش در سال ۲۰۱۰، گروه فیلوژنیک A با شیوع ۳۷ درصد شایع‌ترین گروه در بین ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور بود (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر گروه فیلوژنیک A فراوانی کمتری (۲۳ درصد) داشت و یکی از دلایل این اختلافات می‌تواند تفاوت‌های توزیع جغرافیایی در میکروارگانیسم‌ها باشد. برخلاف نتیجه‌ی این مطالعه، حسنی و همکاران از بین ۷۰ ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور در تبریز فقط ۲ ایزوله را متعلق به گروه فیلوژنیک B1 گزارش کردند، ولی همسو با نتایج این مطالعه، گروه فیلوژنیک D دومین گروه شایع در بین ایزوله‌ها بود (۲۲). در بررسی گروه فیلوژنیک *اشریشیا کلی*‌های با منشأ انسانی، اغلب گروه فیلوژنی B2 و D به ترتیب بیشترین فراوانی را داشتند (۲۳،۲۴). این درحالی‌است که عبدی و همکاران در سال ۱۳۹۱، در مطالعه بر *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری انسان منطقه‌ی زابل، بالاترین فراوانی را برای گروه فیلوژنیک B1 گزارش کردند که مشابه نتایج مطالعه ی حاضر بود (۲۵). بنابراین یکی از دلایل تشابه بین نتایج این تحقیق و تحقیق حاضر، را می‌توان به شباهت منطقه‌ی جغرافیایی بین دو مطالعه نام اشاره کرد و همچنین امکان گسترش این گروه در بین انسان و طیور گوشتی از طریق آلودگی مدفوعی-دهانی بیشتر بوده است.

با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که آرایش گروه فیلوژنیک می‌تواند در منطقه‌های جغرافیایی مختلف، متفاوت باشد، که در منطقه‌ی سیستان گروه‌های B1 و D در طیور و گروه‌های B1 و A در انسان غالب‌تر هستند. در حالی که سایر تحقیقات، گروه‌های فیلوژنیک B1 و A را بیشتر در حیوانات و گروه‌های فیلوژنیک B2 و D را بیشتر در انسان غالب گزارش کرده‌اند. همچنین در منطقه‌ی سیستان، *اشریشیا کلی* موجود در طیور و انسان هر دو اغلب از نوع کمنسال بوده ولی بر اساس سایر مطالعات *اشریشیا کلی* مربوط به حیوان بیشتر از نوع کمنسال و انسانی بیشتر خارج روده‌ای می‌باشد.

References

1. Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt JP, Abdul-Aziz T, Logue CM. Colibacillosis. Dis poult. 2013:751-805.

2. Dho M, Lafont J. Escherichia coli colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. Avian Dis. 1982:787-97.

3. Gross W. Diseases due to Escherichia coli in poultry. FAO. 1994.

4. Spaeth R. Morphological character mapping on a molecular phylogeny using pollen variation in the Cryptanthinae (Boraginaceae): Department of Biology, Sonoma State University; 2014.

5. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. Jl of bacteriol. 1984; 157(2): 690-3.

6. Lecointre G, Rachdi L, Darlu P, Denamur E. Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mole biol and evol. 1998; 15(12):1685-95.

7. Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladonicky JM, Whittam TS. Genetic diversity and population structure ;of Escherichia coli isolated from freshwater beaches .Environ microbiol. 2007; 9(9):2274-88.

8. Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of Escherichia coli. Mole Biol Evol. 1998; 15(1):6-16.

9. Gordon DM, Clermont O., Tolley H., Denamur E. Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environ microbiol. 2008; 10(10):2484-96.

10. Asadi S, Solhjoo K, Kargar M, Rezaeian A. Phylogenetic groups of Escherichia coli strains isolated from urinary tract infection in Jahrom city,

southern Iran. J Microbiol World. 2011; 3:245-50. [In Persian].

11. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic Escherichia coli to adhere to and invade bladder epithelial cells. Pathog Dise. 2002; 33(1):23-6.

12. Zahraei-Salehi T, Shayegh J. Veterinary Microbiology and Microbial Disaese. Tehran, University of Tehran Press, 1386:164-176. [In Persian]

13. Sambrook JR, Russell DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. Q Rev Biol. 2001; 76(3):348-9.

14. Mills M, Payne SM. Genetics and regulation of heme iron transport in Shigella dysenteriae and detection of an analogous system in Escherichia coli O157 :H7. J Bacteriol. 1995; 177(11):3004-9.

15. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Applied and environmental microbiology. 2000; 66(10):4555-8.

16. Gross W, Domermuth C. Colibacillosis. Dise poult. 1991; 9:780-97.

17. Kariyawasam S, Scaccianoce JA, Nolan LK. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic Escherichia coli as determined by genomic subtractive hybridization. BMC microbiol. 2007; 7(1):81.

18. Bashir S, Sarwar Y, Ali A, Mohsin M, Saeed MA, Tariq A, *and et al.* Multiple drug resistance patterns in various phylogenetic groups of uropathogenic Escherichia coli isolated from Faisalabad region of Pakistan. Braz J Microbiol. 2011; 42(4):1278-83.

19. Wu H, Xia S, Bu F, Qi J, Liu Y, Xu H. Identification of integrons and phylogenetic groups of drug-resistant Escherichia coli from broiler carcasses in China. Int J Food Microbiol. 2015; 211:51-6.

20. Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, *et al.* Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolated from healthy broilers in Japan. Ir Vet J. 2014; 67(1):14.

21. Jakobsen L, Kurbasic A, Skjøt-Rasmussen L, Ejrnæs K, Porsbo LJ, Pedersen K, *et al.* Escherichia coli isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7(5):537-47.

22. Hassani B, Shayegh J, Ameghi A, Mikaili P, Mahmmudzadeh M. Phylogenic typing of Escherichia coli isolated from broilers with collibacillosis in Tabriz, North West of Iran. Arch Razi Inst. 2013; 68(1):43-6.

23. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+ D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. Gut. 2007; 56(5):669-675.

24. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, *et al.* Comparison of extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(22):7043-50.

25. Abdi HA, Rashki A, Rashki Z, Shahkarami F, Shahraki Z. The Relationship Between Phylogenetic Group and Distribution Of Virulence Genes HlyA, IroN, IucD, FimH In Escherichia Coli Isolated From Female Genital Tract Among Women Attending Gynecology Clinics In Zabol-Iran By Multiplex-PCR. Iran J Med Microbiol. 2014; 7(4):9-15. [In Persian].

Phylogenetic typing of *Escherichia coli* isolates collected from broilers with Collibacillosis in Zabol

Younes Teymouri[1]; Reza Esmailzadeh Dizaji *[2]

1 - PhD candidate, Poultry Diseases, Vet medicine Faculty, Shar E Kord University.
2 - PhD candidate, Poultry Diseases, Vet medicine Faculty, Tehran University.

Receive: November 24, 2017; Revise: December 20, 2017; Accept: February 10, 2018

Summary

Escherichia coli is an opportunistic organism which can cause Colibacillosis syndromes (colisepticemia, pericarditis, perihepathitis, salpingitis and …). E.coli has four phylogenetic groups including A, B1, B2 and D. Phylotyping is an adequate method for surveying the dissipation type of the phylogenetic groups of E.coli isolates in different regions. The present study was conducted to determine the phylogenetic groups of E.coli in Zabol city. In order to determine the frequency of the phylogenetic groups of E.coli in Zabol, 144 broilers suspected of Colibacillosis were sampled and samples were transferred to laboratory in TSB. After culturing and applying some common biochemistry tests, a total number of 100 E.coli were isolated. DNA of all isolates was extracted by boiling method and phylogenetic groups were determined by triplex PCR procedure. In this study; 36 %, 27 %, 23 % and 14 % of 100 E.coli isolates belonged to B1, D, A and B2 phylogenetic groups; respectively. The present study concluded that almost all of E.coli samples which were collected from broilers suspected of Colibacillosis in Zabol belonged to B1 phylogenetic group.

Keywords: *Broiler, Colibacillosis, Escherichia coli, Phylogenetic, Zabol*

مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه علف مار بومی سیستان بر روی *سالمونلا تیفی‌موریوم* مقاوم به آنتی‌بیوتیک

علی مقصودی*[۳،۲،۱]، سعیده سعیدی[۳]

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه بیوانفورماتیک، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت مقاله: ۱۱ آذر ۱۳۹۶، بازنگری: ۱۸ دی ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۳ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

امروزه خواص ضد باکتریایی عصاره گیاهان دارویی به عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی برگ گیاه علف مار بر روی *سالمونلا تیفی‌موریوم* (*Salmonella typhmurium*) جدا شده از طیور در شرایط آزمایشگاهی بود. عصاره اتانولی گیاه علف مار با استفاده از دستگاه خلاء از مرکز (روتاری) استخراج شد. همچنین تعداد ۱۲ سویه باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* نیز از طیور زابل جداسازی شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره الکلی گیاه در غلظت‌های مختلف با روش رقت‌سازی در چاهک بر روی باکتری‌ها تعیین شد. حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نیز با روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی بائر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، تتراسیکلین (۱۶/۶ درصد) و آمیکاسین (۸/۳ درصد) مقاوم می‌باشد. همچنین، عصاره اتانولی گیاه علف مار اثر مهارکنندگی قابل توجهی در برابر *سالمونلا تیفی‌موریوم* از خود نشان داده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که امکان استفاده از عصاره اتانولی گیاه علف مار به عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌های متداول وجود دارد.

واژگان کلیدی: *حساسیت به آنتی‌بیوتیک، طیور، علف مار، فعالیت ضد میکروبی، گیاهان دارویی*

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

مقدمه

در سال‌های اخیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی انسان بوده است. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقاصد غیر درمانی در تغذیه دام، طیور و آبزیان، تجویز خودسرانه آنها بدون توجه به نظر پزشک و شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلاتی را برای سلامت انسان به‌وجود آورده است که در مجموع به آن مقاومت به آنتی‌بیوتیک (Antibiotic resistance) گفته می‌شود (۱،۲).

به دلیل این که هنوز ابزاری برای به کارآمدی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی یافت نشده است و از طرفی ژنوم باکتری‌های بیماری‌زا هر روز در حال تکامل و مقاوم شدن نسبت به درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها هستند، مشکلات پیش روی بشر در مبارزه با عفونت‌ها جدی‌تر شده است. به همین دلیل مطالعات متعددی برای مقابله با بیماری‌های عفونی و همچنین یافتن جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شده است.

یکی از مصارف غیر مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از آنها به عنوان مکمل و افزودنی در تغذیه دام، طیور و آبزیان است که به دلیل از بین بردن باکتری‌های مضر دستگاه گوارش، موجب بهبود رشد حیوانات می‌گردد. به همین دلیل در گذشته به آنتی‌بیوتیک‌ها محرک رشد گفته می‌شد. با توجه به این که مصرف آنتی‌بیوتیک همگام با افزایش مصرف خوراک، به‌ویژه در انتهای دوره پرورش حیوانات گوشتی یا همزمان با اوج تولید در مرغ‌های تخم‌گذار و گاوهای شیری افزایش می‌یابد، مقادیری از آنتی‌بیوتیک مصرف شده از طریق خوراک در محصولات دامی مانند شیر (۳)، گوشت (۴) و تخم‌مرغ (۵)، باقی مانده و موجب مشکلاتی برای سلامتی مصرف‌کنندگان این محصولات آلوده می‌شود. از طرفی، آلودگی حیوانات پرورشی با آنتی‌بیوتیک‌ها موجب شیوع باکتری‌های مضر در محیط زیست نیز می‌شود که در نهایت منجر به آلودگی انسان و حیواناتی می‌گردد که حتی در تماس با آنتی‌بیوتیک‌ها هم نبوده‌اند (۶). راهکارهای متعددی برای یافتن جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه دام و طیور ارائه شده است. یکی از راهکارها، استفاده از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها برای کاهش جمعیت میکروبی مضر دستگاه گوارش می‌باشد (۸، ۷). یکی دیگر از راهکارها، یافتن جایگزین آنتی‌بیوتیک‌هاست که خواص ضد میکروبی قوی داشته باشند. بسیاری از عصاره‌های گیاهی و ترکیبات موجود در آن دارای اثرات ضد باکتریایی می‌باشند. برخی مطالعات خواص ضد باکتریایی علف مار را گزارش نموده‌اند (۹).

گیاه علف مار (*Capparis spinosa*) از راسته میخک‌سانان (Caryophyllales) و تیره Capparidaceae است. این تیره شامل گیاهان علفی یک ساله، پایا یا به صورت درختچه و غالباً با پوشش غده‌ای هستند. در مناطق مختلف کشور ایران و در گویش‌های مختلف اسامی دیگر این گیاه کَبَر یا کِیپِر (معادل انگلیسی آن Caper یا Capparis)، شپله (شفه‌له)، کلکام، لگجی، لیجین و خاروک می‌باشد. هرچند نخستین زیستگاه علف مار به درستی مشخص نیست، اما امروزه دامنه رویش این گیاه در شرایط جغرافیایی متنوعی از اقلیم مدیترانه‌ای و گرمسیر تا بلندی‌های هیمالیا گسترش یافته است. در ایران نیز علف مار در نیمه جنوبی کشور در اغلب مناطق یافت می‌شود.

برخی گونه‌های جنس *Capparis* در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته است. از گلبرگ این گیاه به عنوان چاشنی استفاده می‌شود و میوه آن در فرهنگ‌های مختلف مصارف غذایی و دارویی متعددی دارد که از جمله مهم‌ترین مصارف آن در تهیه ترشی است. البته ممکن است محصولات این

گیاه در برخی افراد ایجاد حساسیت نمایند (۱۰). از سایر بخش‌های این گیاه در تولید دارو و مواد آرایشی استفاده می‌شود. در طی چهار دهه گذشته، گیاه علف مار به دلیل اهمیت اقتصادی آن به عنوان یک گیاه زراعی در برخی از کشورهای اروپایی مانند یونان و ایتالیا مورد توجه قرار گرفته است. گیاه علف مار خواص آنتی‌اکسیدانی قوی نیز دارد (۱۱). همچنین، از میوه و برگ گیاه علف مار در درمان دیابت، عفونت قارچی، عفونت دستگاه گوارش و بیماری‌های پوستی ناشی از انگل‌ها به صورت خوراکی یا ضماد استفاده می‌شود. گاهی از این گیاه برای درمان خشکی و التهاب پوست و به منظور افزایش جریان خون زیر پوست به عنوان ضماد استفاده می‌شود (۱۲).

با توجه به مقاوم شدن برخی سویه‌های باکتریایی به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی، به‌خصوص در طیور پرورشی و از طرفی وجود قابلیت‌های نهفته در گیاهان دارویی بومی ایران برای جایگزینی با برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه علف مار برروی *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدا شده از طیور در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره اتانولی: برگ گیاه علف مار، از شهرستان زابل جمع‌آوری شده و در سایه و دمای اتاق خشک گردید. برای تهیه عصاره اتانولی، مقدار ۱۰ گرم پودر خشک برگ گیاه در داخل ظروف شیشه‌ای با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد. محتوی ظروف به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (Pars Azma- ایران) با سرعت rpm ۱۳۰ مخلوط شده، سپس به وسیله کاغذ واتمن شماره ۲ صاف گردید. جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری (Heidolph- آلمان) و با کمک پمپ خلاء (تقطیر در خلاء) انجام گرفت. پس از این مرحله عصاره به مدت ۴۸ ساعت در آون (Memmert-آلمان) تا جداسازی بقایای حلال و رسیدن به وزن ثابت قرار داده شد. عصاره به‌دست آمده وزن شده سپس در حلال (DSMO) ۱۰ درصد حل شد. عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در آزمایشات ضد میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (۲۱، ۱۲).

تهیه و جداسازی نمونه‌های باکتری: نمونه‌های مدفوع طیور در سال ۱۳۹۳ از شهرستان زابل واقع در منطقه سیستان در شرق ایران جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها ابتدا به مدت ۶ ساعت در محیط نگه‌داری گردیدند. سپس به محیط کشت‌های انتخابی سالمونلا شیگلا آگار و سیمون سولفیت آگار انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در نهایت با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی و محیط‌های کشت افتراقی TSI، MRVP، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات و اوره، ۱۲ سویه باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم از نمونه‌های مدفوع طیور منطقه زابل جداسازی گردید (۲۱، ۱۵).

تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند: برای تهیه یک سوسپانسیون میکروبی همگن، ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره باکتری به محیط کشت شیب‌دار آگار مغذی تلقیح شد. پس از رشد کلونی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شسته شده و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردید. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل دربدار حاوی محلول نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico- آمریکا) در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ مک فارلند، با

محلول نرمال سالین رقیق گردید. بدین ترتیب سوسپانسیون باکتری با غلظت $10^8 \times 1$ cfu/ml تهیه گردید.

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک:

حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (µg10)، تتراسایکلین (µg30)، آمیکاسین (µg30) و پنی‌سیلین (µg15) (پادتن طب، ایران) با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- بائر مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، در ابتدا از تمام سویه‌های باکتری، غلظت ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون تهیه و سپس بر روی محیط آگار مولر هینتون پخش و کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در فاصله مناسبی از یکدیگر قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شده و هاله‌های بازدارنده جهت ارزیابی و تعیین مقاومت و حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، تعیین شد.

تعیین میزان حساسیت ۱۲ سویه سالمونلا تیفی‌موریوم نسبت به عصاره اتانولی علف مار:

حساسیت سویه‌های باکتری دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی نسبت به عصاره علف مار با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک بررسی شد. در این روش ابتدا به چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول عصاره اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه شد و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام شد. در نهایت از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط محیط کشت و عصاره بیرون ریخته شد. به تمامی چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی cfu/ml 10^8 واحد در میلی‌لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده بود به عنوان (MIC) در نظر گرفته شد و برای اطمینان از چاهک‌های شفاف ۱۰ میکرولیتر برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل کرده و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) نشان داده شد (۹، ۱۵).

نتایج

در مطالعه حاضر، فعالیت ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و آمیکاسین علیه سویه‌های به‌دست آمده *سالمونلا تیفی‌موریوم* در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مجاورت اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، رفتار تقریباً مشابهی از خود نشان می‌دهند، اما با این وجود، تفاوت‌هایی در بین سویه‌ها در بروز عملکرد مقاومت یا حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها دیده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰درصد)، آمپی‌سیلین (۱۰۰درصد)، تتراسیکلین (۱۶/۶درصد) و آمیکاسین (۸/۳ درصد) مقاوم بودند (جدول ۱). در جدول ۲ حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره اتانولی میوه علف مار در برابر *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان داده شده است.

جدول ۱- درصد حساسیت سویه‌های باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* مورد بررسی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

	پنی سیلین (P)	آمپی سیلین (MA)	تتراسیکلین (TE)	آمیکاسین (AN)
مقاوم	۱۰۰	۱۰۰	۱۶/۶	۸/۳
حساس	۰	۰	۴۱/۷	۵۸/۳
نیمه حساس	۰	۰	۴۱/۷	۳۳/۳

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره اتانولی میوه علف مار در برابر سالمونلا تیفی‌موریوم

سویه باکتری	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
۱	۲۰	۱۰
۲	۲۰	۱۰
۳	۵	۲/۵
۴	۱۰	۵
۵	۲۰	۱۰
۶	۵	۲/۵
۷	۵	۲/۵
۸	۱۰	۵
۹	۱۰	۵
۱۰	۵	۵
۱۱	۱۰	۱۰
۱۲	۱۰	۵

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای سه منظور درمان، پیشگیری و به عنوان محرک رشد می‌باشد. از جمله مهم‌ترین نگرانی‌های پیش روی بشر در قرن آتی مقاوم‌شدن باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به درمان با آنتی‌بیوتیک است (۱۳). این مشکلات به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که نظارت دقیقی بر مصرف آنتی‌بیوتیک در حوزه دام و طیور به عنوان مکمل غذایی ندارند بیشتر مورد توجه می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نیز درجات مختلفی از مقاومت سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تتراسیکلین و آمیکاسین (۸/۳۳ تا ۱۰۰ درصد) را نشان داد. نتایج مشابهی از سطوح مختلف مقاومت باکتری‌های مختلف از جمله *سالمونلا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعات مختلف گزارش شده است. در آمریکای مرکزی، در طی یک مطالعه برروی ۳۹۲ سویه *سالمونلا* جدا شده در طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ در کشور مکزیک، نشان داده شد که ۲۵/۵ درصد سویه‌ها به آمپی‌سیلین، ۲۳/۴ درصد به کلرامفنیکل، ۱۹/۲ درصد به کوتریموکسازول و ۴۸/۸ درصد به تتراسیکلین مقاوم بودند (۱۴). در مطالعه دیگری که بر روی نمونه‌های *سالمونلای* به دست آمده از دستگاه گوارش جوجه‌های یک‌روزه طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ در استان مازندران ایران انجام شد، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، کوفتاکسیم و سولتریم مشاهده نشد، ولی سویه‌های مختلف *سالمونلا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین (۲۱/۶۶ درصد)، انروفلوکساسین (۶/۶۶ درصد)، نئومایسین (۳۳/۳۳ درصد) و فلومکوئین (۱۱/۶۶ درصد) مقاوم بودند (۱۵).

محصولات غذایی حاصل از پرندگان اهلی (گوشت و تخم‌مرغ) در زنجیره غذایی انسان قرار دارند و آلودگی این محصولات با پاتوژن‌هایی از قبیل *سالمونلا* و *کامپیلوباکتر* می‌تواند سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید نماید. هرچند *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌طور عمده در دستگاه گوارش طیور

مشاهده می‌شود، اما مواردی از آلودگی حیوانات وحشی، گاوهای شیری و خوک نیز با این باکتری مشاهده شده است (۱۶). حتی به نظر می‌رسد برخی گیاهان نیز میزبان *سالمونلا* باشند (۱۷). این موضوع نشان از شیوع بیش از پیش باکتری *سالمونلا* و ضرورت یافتن روش‌های کنترل‌کننده این باکتری بیماری‌زا در مقیاس وسیع برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد.

قدمت استفاده از گیاهان برای اهداف دارویی به دوران باستان برمی‌گردد (۱۸، ۱۹). تحقیقات اخیر به دنبال محصولات گیاهی جدید به عنوان جایگزینی داروها برای درمان بیماری‌ها است (۲۰) و مطالعات متعددی برای معرفی گیاهان مناسب به عنوان باکتری‌کش به انجام رسیده است. در یک مطالعه، تأثیر باکتری‌کشی عصاره‌های مختلف پوست، هسته، آب میوه و گل میوه انار بر *سالمونلای* جدا شده از گوشت مرغ مورد بررسی قرار گرفت (۲۱). در این مطالعه بیشترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به عصاره اتانولی پوست انار بود که مقدار MIC آن در دامنه ۱۰/۷۵ تا ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. خواص ضد باکتریایی عصاره پوست انار به وجود ترکیبات فنلی نسبت داده می‌شود. برخی از این مواد در پوست انار شامل آنتوسیانین‌ها، الاجیتانین‌ها، اسید الاجیک و فلاوانول می‌باشد. در مطالعه دیگری اثرات توأم ضد میکروبی اسانس زیره و آنتی‌بیوتیک نایسین بر روی *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شده است (۲۲). در پژوهش مزبور رشد هر دو باکتری بیماری‌زا در مجاورت توام ۳۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسانس و ۰/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد کاهش داشت. با افزایش دما به ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اثرات باکتری‌کشی اسانس و آنتی‌بیوتیک بیشتر شد. نتایج این مطالعه نشان داد تأثیر توأم آنتی‌بیوتیک و ترکیبات فنلی موجود در اسانس زیره در دمای مناسب بر غشای پلاسمایی باکتری اثر تخریبی داشته و باعث کاهش جمعیت میکروبی می‌شود. گزارش شده است که برخی از پلی‌ساکاریدهای موجود در برگ گیاه علف مار خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریالی دارند (۲۳)، به طوری که، آثار ضد باکتریایی پلی‌ساکاریدهای برگ این گیاه بر باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلای*، *شیگلا* و *سالمونلا*) مؤثرتر از باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس پانیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) بود. به همین دلیل از این ترکیب می‌توان در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده نمود. همچنین خواص ضد میکروبی ریشه گیاه علف مار نیز بررسی شده است (۲۴)، که به وفور در طب سنتی جنوب کشور ایتالیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. خواص ضد باکتریایی ریشه علف مار به ترکیبات هتروسیکلیک آن منسوب شده است.

نتایج بررسی حاضر نشان داد که *سالمونلای* موجود در دستگاه گوارش پرندگان بومی منطقه سیستان درجات متفاوتی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند و نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که عصاره گیاه علف مار بومی منطقه سیستان می‌تواند به تنهایی یا همراه با سایر ترکیبات ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، برای درمان مسمومیت و کنترل سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* مقاوم به آنتی‌بیوتیک شناسایی شده در مطالعه حاضر مفید باشد. برای تأیید نتایج این آزمایش بر روی سالمونلا پیشنهاد می‌شود عصاره گیاه علف مار بر روی باکتری استاندارد نیز مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر ۱۲ سویه شناسایی شده ممکن است سویه‌های دیگری از این باکتری نیز وجود داشته باشد. به همین دلیل استفاده از روش‌های تفریقی مختلف برای شناسایی انواع سالمونلا در منطقه سیستان و سایر مناطق کشور

پیشنهاد می‌شود. همچنین آزمایش بر روی موجود زنده (*in vivo*) برای ارزیابی سمیت احتمالی عصاره، بررسی سایر خواص و اثر آن و به دست آوردن غلظت‌های مناسب برای تجویز بالینی در موجودات زنده لازم است.

References

1- Bartlett JG, Froggatt JW. Antibiotic resistance. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1995; 121(4):392-6.

2- Cellai Rustici M, Mangiantini F, Chiappini E, Bartolome R, Pecile P, Prats G. Antibiotic resistance among *Salmonella enterica* isolates in Southern European children hospitalized for acute diarrhea. Eur J Pediatr. 2006; 165(8):577-8.

3- Ouderkirk LA. Evaluation of two microbiological methods for detecting residual antibiotics in milk. J Assoc off Anal Chem.1976; 59(5):1122-24.

4- Kjeldgaard J, Cohn MT, Casey PG, Hill C, Ingmer H. Residual antibiotics disrupt meat fermentation and increase risk of infection. MBio. 2012; 3(5):1-4.

5- Ezhov VI. Residual amounts of antibiotics in the eggs of laying hens. Veterin. 1970; 46(4):81-3.

6- Haznedaroglu BZ, Yates MV, Maduro MF, Walker SL. Effects of residual antibiotics in groundwater on *Salmonella typhimurium*: changes in antibiotic resistance, *in vivo* and *in vitro* pathogenicity. J Environ Monit. 2012; 14(1):41-7.

7- Islam MM, Yang CJ. Efficacy of mealworm and super mealworm larvae probiotics as an alternative to antibiotics challenged orally with *Salmonella* and *E. coli* infection in broiler chicks. Poult Sci. 2017; 96(1):27-34.

8- Hume ME. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. Poult Sci. 2011; 90(11):2663-9.

9- Vahid H, Rakhshandeh H, Ghorbani A. Antidiabetic properties of *Capparis spinosa* L. and its components. Biomed Pharmacother. 2017; 92:293-302.

10- Alcantara M, Morales M, Carnes J. Food allergy to caper (*Capparis spinosa*). J Investig Allergol Clin Immunol. 2013; 23(1):67-9.

11- Yang T, Wang C, Liu H, Chou G, Cheng X, Wang Z. A new antioxidant compound from *Capparis spinosa*. Pharmaceutical biol. 2010; 48(5):589-94.

12- Zhou H, Jian R, Kang J, Huang X, Li Y, Zhuang C. Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals. J Agric Food Chem. 2010; 58(24):12717-21.

13- Coates AR, Hu Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. British J Pharmacol. 2007; 152(8):1147-54.

14- Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-Garcia MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerg Infect Dis. 2008; 14(3):429-35.

15- Ranjbar Malidareh N, Firouzi S, Ranjbar Malidareh N, Habibi H. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens. Comp Clinic Path. 2012; 22:1065-8.

16- Skov MN, Madsen JJ, Rahbek C, Lodal J, Jespersen JB, Jorgensen JC. Transmission of *Salmonella* between wildlife and meat-production animals in Denmark. J Appl Microbiol. 2008; 105(5):1558-68.

17- Schikora A, Garcia AV, Hirt H. Plants as alternative hosts for *Salmonella*. Trends Plant Sci. 2012; 17(5):245-9.

18- Khan H. Medicinal Plants in Light of History: Recognized Therapeutic Modality. Evid Based Complement Alternat Med. 2014; 19(3):216-9.

19- Lipp FJ. The efficacy, history, and politics of medicinal plants. Altern Ther Health Med. 1996; 2(4):36-41.

20- Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: from farm to pharmacy. Food Chem. 2015; 173:339-47.

21- Wafa BA, Makni M, Ammar S, Khannous L, Hassana AB, Bouaziz M. Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. International Journal of Food Microbiol. 2017; 241:123-31.

22- Tavakoli HR, Mashak Z, Moradi B, Sodagari HR. Antimicrobial activities of the combined use of *Cuminum Cyminum* L. Essential Oil, Nisin and Storage Temperature Against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus in vitro*. Jundi J of Microbiol. 2015; 8(4):e24838.

23- Mazarei F, Jooyandeh H, Noshad M, Hojjati M. Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. Int J Biol Macromol. 2017; 95:224-31.

24- Boga C, Forlani L, Calienni R, Hindley T, Hochkoeppler A, Tozzi S. On the antibacterial activity of roots of *Capparis spinosa* L. Nat Prod Res. 2011; 25(4):417-21.

Study of antimicrobial effects of ethanol extract of caper plant from Sistan on antibiotic resistant *Salmonella typhimurium*

Ali Maghsoudi*[1,2,3], Saeideh Saeidi[3]

1 - Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol.
2 - Department of Bioinformatics, University of Zabol, Zabol.
3 - Center of Agricultural Biotechnology, University of Zabol, Zabol.

Receive: December 2, 2017; Revise: January 8, 2018; Accept: March 4, 2018

Summary

Nowadays, antibacterial effects of medicinal plants are considered as an appropriate alternative of antibiotics. Therefore, the aim of the current study was *in vitro* determination of antimicrobial effects of caper (*Capparis spinosa*) against *Salmonella typhmurium* isolated from poultry. Ethanol extract of caper leaves was extracted using vacuum from the center (rotary) apparatus. Moreover, a total number of 12 *S. typhmurium* strains were isolated from poultry in Zabol. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of different concentrations of plant extract were determined on bacteria using dilution in well method. Sensitivity of bacteria strains to antibiotics were evaluated using Kirby-Bauer disk diffusion standard test. Results of the current study showed that different strains of bacteria are resistant to Penicillin (100 %), Ampicillin (100 %), Tetracycline (16.6 %) and Amikacin (8.3 %). Furthermore, ethanol extracts of caper plant showed significant inhibitory effect on *S. typhimurium*. Results of the current study indicated that there is possibly of using ethanol extract of caper plant as a useful alternative beside usual antibiotics.

Keywords: *Antimicrobial activity, medicinal plants, Antibiotic sensitivity, poultry, Caper*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 1, No. 1, Spring & Summer 2018

Publisher: University of Zabol

Editor-in-Chief: Dr. Taghi Zahraei Salehi, *Full Professor, Department of microbiology & immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Selected as the top one percent of the World's Scientists*.
Director-in-Charge: **Dr. Dariush Saadati**, *Associate Professor, Department of Food hygiene, Faculty of Veterinary, University of Zabol.*
Acting Editor-in-Chief: Dr. Ahmad Rashki, *Associate Professor, Department of Patobiology, Facalty of Veterinary Medicine, University of Zabol.*

Editorial Board

1. **Dr. mohammad bokaeian:** *Full Professor, Faculty of Allied Medicine, Zahedan University of Medical Sciences.*
2. **Dr. Mostafa Peighambari**: *Full Professor, Department of poultry disease, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran.*
3. **Dr. Mohammad Jahantight:** *Full Professor, Department Clinical Sciences, Faculty of Veterinary medicine, University of Zabol.*
4. **Dr. Saeed Hosseinzadeh:** *Full Professor, Food Hygiene and Quality Control Department of Public Health and Food Hygiene, Faculty of Veterinary medicine, Shiraz University.*
5. **Dr. Mohammad Khalili:** *Full Professor, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary medicine, Shahid Bahonar University of Kerman.*
6. **Dr. Ahmad Rashki:** *Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary medicine, University of Zabol.*
7. **DR. Mohammad Rahnama:** *Associate Professor, Department of Food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol.*
8. **Dr. Mohammadreza Mahzounieh:** *Full Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary medicine, Shahrekord University.*
9. **Dr. Reza Hashemi Tabar:** *Full Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad.*
10. **Dr. Afshin Akhond Zadeh Basti:** *Full Professor, Department of Food hygiene and quality control, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran.*
11. **Dr. taghi zahraei salehi:** *Full Professor, Department of microbiology & immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Selected as the top one percent of the World's Scientists.*
12. **Dr. Mohammad Tabatabaei:** *Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary medicine, Shiraz University.*

Executive Director: Habib Dahmardeh, *master of Agroecology*
English Editor: Moslem Fathollahi, Instructor, English Department, Faculty of Literature. University of Zabol**.**
Cover designer: Fateme Ghamari, Instructor, Department of Restoration of Monuments, Faculty of Art and Architecture, University of Zabol.
Graphist: Hamid Reza Hosseini, bioinformatics Researcher, Vice Chancellor for Research & technology, University of Zabol, Zabol, Iran.

Address: Zabol, Bonjar Road, University of Zabol, Faculty of Veterinary Medicine, 9861335856, **Tel**: (054)31232271, **Fax**: (054)31232251
Email: nfvm@uoz.ac.ir
Website: nfvm.uoz.ac.ir