نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ۱، شماره ۲

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 خواص ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی ۲۹ گیاه دارویی بر میکروب‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس*

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

۱- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی پژوهشگاه دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشیار گروه آموزشی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- کارشناس آزمایشگاه گروه آموزشی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

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

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی ۲۹ گیاه دارویی مختلف بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش انتشار در محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری منطبق بر دستورالعمل Bauer و Kirby و همچنین چاهک‌گذاری حاصل گردید. همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، آزیترومایسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین جهت کنترل مثبت استفاده شد. نتایج نشان داد که مؤثرترین عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بر قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* گیاهان مورد، آویشن شیرازی و بابونه و بر قطر هاله عدم رشد *اشریشیاکلی* گیاهان آویشن شیرازی، مورد و رزماری بودند. ضمناً مشخص شد که محیط بر خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی مورد و آویشن شیرازی تأثیر کمتری داشته، اما بابونه‌های مناطق مختلف اثرات متفاوت‌تری داشتند که نشان‌دهنده تأثیر محیط بر خاصیت ضد میکروبی آن‌ها بود. ضعیف‌ترین گیاهان در قطر هاله عدم رشد هر دو نوع باکتری مورد بررسی گیاهان آوندول، شاه‌تره، زوفا، افسنطین، آویشن کوهی و پونه کوهی بودند. بین قابلیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان دارویی در دو روش دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری و روش چاهک‌گذاری تفاوت معنی‌داری وجود داشت به طوری که قطر هاله عدم رشد هر دو نوع باکتری در روش چاهک‌گذاری بیشتر از روش دیسک کاغذی بود. با توجه به نتایج تحقیق و افزایش روزافزون مقاومت به مواد آنتی‌باکتریال سنتتیک، گیاهان مورد، آویشن، بومادران و رزماری می‌توانند به عنوان گیاهان مؤثر در پاک‌سازی برخی از باکتری‌ها از جمله *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: *آویشن، باکتری، بومادران، رزماری، مورد*

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

مقدمه

یکی از مشکلات صنعت غذا و دارو، گسترش سویه‌های میکروبی مقاوم به داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و امروزه به دلیل خاصیت سمی و سرطان‌زایی ترکیبات شیمیایی و سنتزی، استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مزمن توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف و از این رو، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی مانند اسیدهای آلی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌توانند جایگزین مناسب و ایمنی در مواد غذایی باشند (۱). همچنین، در بیماری‌های دهان و دندان و ورم مفاصل و استخوان که کلاژن در معرض تخریب قرار می‌گیرد، ترکیبات فنلی و مواد آنتی‌اکسیدانی این گیاهان می‌توانند از آن جلوگیری کند (۲).

ترکیبات فنلی بخشی از رژیم غذایی انسان را تشکیل داده و بزرگ‌ترین نفع رایج آن فعالیت‌های ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است (۳). فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنلی گیاه مانند اسیدهای فنلی، استیلبن، تانن‌ها، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها معمولاً در برگ‌ها و بخش‌های چوبی مانند ساقه و شاخه وجود دارند. این ترکیبات نقش مهمی در رشد طبیعی گیاه و مقاومت در برابر عفونت و ضربه دارند (۴). تفاوت در مقادیر کمی ترکیب‌های فیتوشیمیایی از جمله ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدها در بین توده‌های مناطق مختلف می‌تواند ناشی از تنوع ژنتیکی یا شرایط اکولوژیکی حاکم بر رویشگاه‌ها باشد (۵). همچنین در تحقیقی دیگر (۶) بین مقادیر فنل کل، محتوای فلاونوئیدها و قابلیت آنتی‌اکسیدانی گونه پنیر باد (W. Somnifera) حاصل از رویشگاه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری گزارش شده است.

فلاونوئیدها ازجمله ترکیبات فنلی هستند که به طور مستقیم باعث مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیل می‌گردند. گزارش شده است که گیاهان حاوی ترکیب‌های فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان می‌دهند (۶). این فعالیت آنتی‌اکسیدانی عمدتاً مربوط به توانایی این ترکیب‌ها به دادن الکترون یا اتم‌های هیدروژن بوده و به همین دلیل از نظر دارویی حائز اهمیت می‌باشند (۷). نکته قابل توجه این که بخش‌های بذر و پوست برخی میوه‌ها از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری حتی نسبت به گوشت برخوردارند. به عنوان نمونه بذرهای انگور و پوست انار فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به گوشت داشته و غنی از پروآنتوسیانیدین هستند که مهارکننده قوی رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌باشند (۸).

رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS= Reactive Oxygen Species) بخش لازمی از حیات بوده که در واکنش‌های بیولوژیک مهمی شرکت داشته و تنها زمانی مفید هستند که در زمان و مکان درستی تولید شوند (۹)، در غیر این صورت می‌توانند مضر بوده و بهترین ترکیبات سلول مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و رنگدانه‌ها را مورد حمله قرار دهند (۱۰). برای خنثی کردن اثر سمی رادیکال‌های فعال اکسیژن، ترکیبات آنتی‌اکسیدانت نیاز است. سلول‌های گیاهی از دو سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی (سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی فنل، کارتنوئیدها) و غیر آنزیمی برای حل این معضل استفاده می‌کنند (۱۱، ۱۲).

تحقیقات نشان داده منبع دریافت فنل‌ها و فلاونوئیدها در نقاط مختلف جهان به نوع رژیم غذایی مردم منطقه وابسته است. برای مثال در کشورهایی همچون ژاپن و چین مصرف چای سبز

تأمین‌کننده این ترکیبات مورد نیاز بدن هست در حالی‌که این مواد در کشورهای غربی با مصرف سیب و پیاز و در کشورهای شرقی با مصرف سبزی‌ها و مواد غذایی تخمیری تأمین می‌شوند (۱۳). در کشور ایران به‌طور جامع نوع خاص استفاده از انواع مواد حاوی آنتی‌اکسیدان وجود ندارد اما با تبلیغات مختلف کارهایی ازجمله مصرف سبزی‌ها به صورت خام و پخته، برگ گیاهان و درختان مختلف (به صورت دم‌نوش، عرقیات، اسانس، عصاره، مربا، شربت، ترشی، مواد شوینده از جمله سدر و حتی مصرف به صورت دلمه و غیره) صورت گرفته که پیرو تحقیقات مختلف، باید از اندام‌های مختلف گیاهان که دارای نوع خاص مواد آنتی‌اکسیدانی بوده استفاده خاصی از آن‌ها بشود.

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مرکبات و سبزی‌ها، بازدارنده‌ی رشد بیماری‌های بالینی مهم بوده و برخی تحقیقات، رابطه بین مصرف میوه‌ها و سبزی‌ها با کاهش بیماری‌های مزمن را تائید نموده‌اند (۱۴). اگرچه میوه‌ها و سبزی‌ها از نظر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی متنوع هستند لیکن آن‌هایی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا دارند معمولاً حاوی آنتی‌اکسیدان‌های بیشتری هستند (۱۵).

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 (۱۶). این مواد علاوه بر جلوگیری از رشد باکتری‌ها و کپک‌های آلوده‌کننده مواد غذایی به منظور افزایش عمر نگهداری غذاهای فرآیند شده در سیستم غذایی و نیز افزایش عمر نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها مورد استفاده قرارگرفته‌اند (۱۷).

استافیلوکوکوس گستره وسیعی از عفونت‌های ساده پوستی تا بیماری‌های تهدیدکننده زندگی (مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندروم 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 (۱۸). آلودگی سالمونلایی در انسان به صورت مسمومیت غذایی، گاستروآنتریت، تب تیفوئید و گاهی اوقات سپتی سمی بروز می‌کند (۱۹). انتروتوکسین‌های تولید شده توسط برخی از باکتری‌ها مانند E. Coli، Staphylococcus aureus و گونه‌های Salmonella، Yersiniaو Clostridium باعث مسمومیت دستگاه گوارش و بروز علائم گوارشی ناشی از آن می‌باشند (۲۰).

تاکنون خواص ضد میکروبی برخی گیاهان بر روی باکتری‌های مختلفی ارزیابی شده است. مثلاً خواص بازدارندگی و ضد میکروبی اسانس و عصاره آویشن روی اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس (۲۱، ۲۲)، عصاره آبی مورد بر سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا (۲۳)، عصاره قسمت‌های مختلف زعفران از جمله برگ‌ها، مادگی و کرولا را علیه باکتری‌های ای‌کولای، استافیلوکوکوس، اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس و قارچ‌ها (۲۴، ۲۵)، عصاره رزماری بر لوکونوستوک مزانتروئیدس، لیستریا منوسایتوژنس، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس موتانس و باسیلوس (۲۶) و عصاره بومادران بر کاندیدا آلبیکنس و باسیلوس سوبتیلیس (۲۷) بررسی شده است.

با افزایش سن و در افرادی که دچار بیماری‌های مشخصی هستند آنتی‌اکسیدان‌های درونی بدن نیازمند کمک‌های خارجی هستند که از طریق آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مواد غذایی به منظور حفظ سلامت غشاهای سلولی تأمین می‌شوند و از آنجا که گیاهان مورد بررسی در این تحقیق استفاده

دارویی گسترده‌ای دارند لذا بهره‌مندی از خصوصیت آنتی‌اکسیدانی آنها در کنار سایر خواص آنها زمینه تحقیق ما قرار گرفت و بر این اساس هدف از تحقیق حاضر نیز ارزیابی ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان دارویی، مورد، زعفران، بومادران، آویشن شیرازی، انشک، آوندول، کلپوره همدانی و رزماری بر باکتری‌های اشریشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۹ ژنوتیپ (جدول ۱) از مناطق مختلف کشور ایران جمع‌آوری و در آزمایشگاه‌های پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش تهیه عصاره هیدروالکلی: مقدار ۱۰ گرم بافت ۲۹ گیاه دارویی مختلف (جدول ۱) در سایه و در مجاورت هوا خشک، آسیاب و سپس در ۱۰۰ سی‌سی محلول (الکل ۷۰ و آب مقطر ۳۰) خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر نگهداری گردید. پس از طی شدن زمان مورد نظر، عصاره‌ها صاف، سپس حلال در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه روتاری تبخیر و باقیمانده بعد از خشک شدن برای انجام آزمایش‌ها در یخچال با درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۸).

بررسی اثرات ضد میکروبی: در این بخش، اثرات ضد میکروبی ۲۹ نوع از عصاره‌های گیاهان دارویی مورد استفاده (جدول ۱) بر باکتری اشریشیاکلی (ATCC25922) و استافیلوکوکوس (ATCC25923) تهیه‌شده از شرکت پاتن طب با روش انتشار در محیط کشت مولر هینتون آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) با استفاده از دو روش دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری و روش چاهک‌گذاری بررسی (۲۹، ۳۰) و تعیین حساسیت میکروبی نیز به روش Bauer و همکاران (۳۱) انجام شد. همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین(CP)، آمیکاسین(AN)، جنتامایسین(GM)، آزیترومایسین(AZM)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول(SXT)، سفتریاکسون(CRO)، پنی‌سیلین (P) و آمپی‌سیلین (AM) جهت کنترل مثبت استفاده شد.

تجزیه آماری داده‌ها: بعد از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه واریانس توسط نرم‌افزار student statistic 9 و همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تجزیه واریانس قطر هاله عدم رشد نوع اعمال تیمار (دیسک‌های کاغذی و چاهک‌گذاری) عصاره هیدروالکلی گیاهان آویشن شیرازی، بابونه، بنه، بومادران، زیره سیاه، انشک، آوندول، پونه کوهی، مورد، الوک، بنه، رزماری، کلپوره همدانی، زعفران، زوفا، کاکوتی، افسنطین، آویشن وحشی، شاه‌تره و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و همچنین اثر متقابل نوع اعمال تیمار عصاره، عصاره گیاهان دارویی مختلف و غلظت‌های مختلف عصاره بر باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس معنی‌دار بود ($P<0.01$)(جدول ۲ و ۳).

تفاوت معنی‌داری بین قابلیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان دارویی در دو روش دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری و روش چاهک‌گذاری وجود داشت به طوری که قطر هاله عدم رشد هر دو نوع باکتری در روش چاهک‌گذاری بیشتر از روس دیسک کاغذی بود (شکل ۳).

جدول ۱- مشخصات گیاهان دارویی مورد استفاده

Row	Plant Nmae	*Latin Nmae*	Origin of Plant	effective material
1	آویشن شیرازی	*Zataria Multiflora*	جیرفت	تیمول
2	بابونه	*German chamomile*	جیرفت	آنته مین، تانن، فیتوسترول، اسید آنته میک
3	بنه	*Pistacia atlantica*	جیرفت	تربانتین، کلوفان
4	بومادران	*Achillea millefolium*	جیرفت	ماتریکارین
5	زیره سیاه	Cuminum cyminum	جیرفت	کارون، لیمون، دی هیدروکارون کاروئول، دی هیدروکاروئول
6	انشک	*Nectaroscordum tripe-dale*	ایلام	---
7	آوندول	*Smyrnium cordifolium Boiss*	ایلام	جرماکرن دی
8	آویشن وحشی	*Thymus vulgaris*	ایلام	تیمول
9	بومادران	*Achillea millefolium*	ایلام	ماتریکارین
10	پونه کوهی	*Mentha longifolia*	ایلام	تیمول
11	مورد	*Myrtus communis*	ایلام	میرتول
12	الوک	*Amygdalus scoparia*	شیراز	آمیکدالوزید، آمیلاگدالین، دیاستاز (سیناپتاز)، آلدئید بنزوئیک
13	آویشن شیرازی	*Zataria Multiflora*	شیراز	تیمول
14	بنه	*Pistacia atlantica*	شیراز	تربانتین، کلوفان
15	بومادران	*Achillea millefolium*	شیراز	ماتریکارین
16	رزماری	*Rosmarinus officinalis*	شیراز	رزمارینیک
17	مورد	*Myrtus communis*	شیراز	میرتول
18	کلپوره همدانی	*eucrium polium*	شیراز	کاریوفیلن اکساید
19	بابونه	*German chamomile*	قائن	آنته مین، تانن، فیتوسترول، اسید آنته میک
20	بومادران	*Achillea millefolium*	قائن	ماتریکارین
21	زعفران	*Crocus sativus*	قائن	کروستین
22	زوفا	*Hyssopus officinalis*	قائن	پینوکامفن، آلفا وبتاپینن، کامفن
23	کاکوتی	*Ziziphora persica*	قائن	ایزومنتون
24	افسنطین	*Artemisia absinthium*	قائن	توژون
25	آویشن وحشی	*Thymus vulgaris*	کاشمر	تیمول
26	بومادران	*Achillea millefolium*	کاشمر	ماتریکارین
27	پونه کوهی	*Mentha longifolia*	کاشمر	تیمول
28	شاه‌تره	*Fumaria officinalis*	کاشمر	فومارین (پروتوپین)، فوماری لین، سیناکتین
29	کلپوره همدانی	*Teucrium polium*	کاشمر	کاریوفیلن اکساید

آزمون تعقیبی LSD نشان داد که مؤثرترین عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بر قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی گیاهان آویشن (شیراز و جیرفت)، مورد (برگرفته از مناطق شیراز و ایلام) و رزماری (شیراز) بودند ضمناً از گیاهان نامبرده هر کدام چند گونه یکسانی نیز از مناطق مختلف جمع‌آوری و مورد ارزیابی قرار داده شدند که نتایج حاصله نشان داد مؤثرترین عصاره، عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، مورد و سپس رزماری بر باکتری *اشریشیاکلی* بوده که نشان‌دهنده تأثیر کمتر محیط بر خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی مورد و آویشن بود.

ضعیف‌ترین گیاهان در قطر هاله عدم رشد هر دو نوع باکتری مورد بررسی گیاهان آوندول، شاه‌تره، زوفا، افسنطین، آویشن کوهی و پونه کوهی بودند.

در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که عصاره مورد، بابونه و سپس آویشن شیرازی و تا

حدودی آویشن وحشی (ایلام) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، پنی‌سیلین، سفتریاکسون، آزیترومایسین، جنتامایسین، آمیکاسین و آمپی‌سیلین بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر مثبت داشتند (جدول ۴). همچنین عصاره‌های گیاه دارویی آویشن شیرازی و سپس رزماری و مورد نیز نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، پنی‌سیلین، سفتریاکسون، آزیترومایسین، جنتامایسین، آمیکاسین و آمپی‌سیلین بر باکتری اشریشیاکلی اثر مثبت داشتند (جدول ۴).

بحث

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مشکلات مختلفی را برای حیوانات و استفاده‌کنندگان از فرآورده‌های حیوانی ایجاد می‌کند که شامل مسمومیت‌های احتمالی در اثر مصرف دارو، باقی ماندن دارو در بافت‌ها و پیدایش سویه‌های مقاوم به عوامل ضد باکتریایی است (۳۲). گیاهان از هزاران سال پیش نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و بهبود کیفیت زندگی انسان‌ها داشته‌اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (۳۳). امروزه فرآورده‌های گیاهی به دلیل دسترسی آسان، راحتی کاربرد و اثرات جانبی کمتر در مقایسه با فرآورده‌های شیمیایی برای درمان اکثر بیماری‌های انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۴). با توجه به افزایش سطح تقاضای عمومی برای استفاده از مرغ ارگانیک و عاری از آنتی‌بیوتیک در چرخه غذایی انسان، استفاده از مواد ضد میکروبی با پایه گیاهی می‌تواند در کنترل بیماری‌های طیور نقش با ارزشی ایفا نماید. در همین راستا، در مطالعه اخیر به بررسی خواص ضد باکتریایی آویشن شیرازی، بابونه، بنه، بومادران، زیره سیاه، انشک، آوندول، بومادران، پونه کوهی، مورد، الوک، رزماری، کلپوره همدانی، بابونه، زعفران، زوفا، کاکوتی، افسنطین، آویشن کوهی، پونه کوهی و شاه‌تره بر باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس پرداخته شد. نتایج نشان داد مؤثرترین عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بر قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* گیاهان مورد (برگرفته از مناطق شیراز و ایلام)، آویشن (شیراز و ایلام) و بابونه (قاین) و همچنین مؤثرترین عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بر قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی گیاهان آویشن (شیراز و جیرفت)، مورد (برگرفته از مناطق شیراز و ایلام) و رزماری (شیراز) بوده‌اند.

مکانیسم ضد میکروبی احتمالاً حاصل ترکیباتی مانند فلاونوئیدها و فلاونول‌ها از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا واکنش‌های غیراختصاصی با پروتئین‌های میکروبی مانند پروتئین‌های خارج سلولی و تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و یا ایجاد اختلال در غشاء سلول میکروارگانیسم‌ها است (۳۵). اثرات ضد میکروبی ساختارهای فنلی در مطالعات پیشین ثابت شده است و همچنین مشاهده شده است که قدرت ضد میکروبی آنها به محل و تعداد گروه‌های هیدروکسیل روی حلقه فنلی بستگی دارد (۳۶).

اعتقاد بر این است که اکثر اسانس‌ها و عصاره‌ها فعالیت‌های ضد میکروبی خود را از طریق تعامل با فرآیندهای مرتبط با غشاء سلولی باکتری‌ها، از جمله انتقال الکترون، شیب یونی، جابجایی پروتئین، فسفوریلاسیون و سایر واکنش‌های وابسته به آنزیم، اعمال می‌کنند (۳۷). هر چند نیز گزارش شده که اثر مهاری بر پمپ ATPase و جلوگیری از سنتز تاژک در باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* را به برخی از ترکیبات فنلی نسبت داده‌اند (۳۸).

حضور اسیدهای فنولیک مانند اسید رزمارینیک و کلروژنیک را در عصاره رزماری از عوامل مؤثر بر باکتری‌های گرم منفی می‌دانند. ازآنجا که حلالیت این ترکیبات در حلال‌های آلی بسیار بیشتر از آب است (۳۹) لذا تأثیر بالای عصاره رزماری بر باکتری اشریشیاکلی می‌تواند به دلیل حضور بیشتر این ترکیبات فعال در عصاره هیدروالکلی باشد.

در مطالعات مختلف نشان داده شده که دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت شامل یک لایه پپتیدوگلیکان است که ساختار ساده‌تری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد و در نتیجه در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی حساسیت بیشتری دارند (۴۰). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که به‌طور میانگین عصاره‌ها بر باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس) نسبت به باکتری گرم منفی (*اشریشیاکلی*) مؤثر بودند اما برخلاف این موضوع برخی از عصاره‌های تهیه شده در این تحقیق (آویشن شیرازی) روی باکتری گرم منفی اشریشیاکلی فعالیت بهتری را نسبت به باکتری‌های گرم مثبت نشان داده است. این مسئله که در برخی تحقیقات، باکتری‌های گرم مثبت به عنوان گونه‌های حساس‌تر شناخته می‌شوند و در برخی دیگر خلاف این موضوع اثبات می‌شود، می‌تواند ناشی از ویژگی‌های فردی و سویه‌ای باکتری‌ها باشد. ضمناً نوع حلال هم در خاصیت ضد باکتریایی عصاره تهیه شده می‌تواند نقش بسیار مهمی داشته باشد (۴۱). به‌طوری‌که در تحقیق دیگری گزارش‌شده که عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به عصاره‌ی متانلی از خود نشان دادند (۴۲). اما در تحقیق دیگر (۴۳) نیز گزارش شده که عصاره‌های آبی (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و اتانولی (۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) حتا تأثیر یکسانی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته‌اند اما عصاره اتانولی (۳/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به عصاره آبی (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تأثیر بیشتری بر باکتری سودوموناس داشته است.

جدول ۲- تجزیه واریانس عصاره گیاهی، میزان و نوع اعمال عصاره بر قطر هاله عدم رشد *اشریشیاکلی*

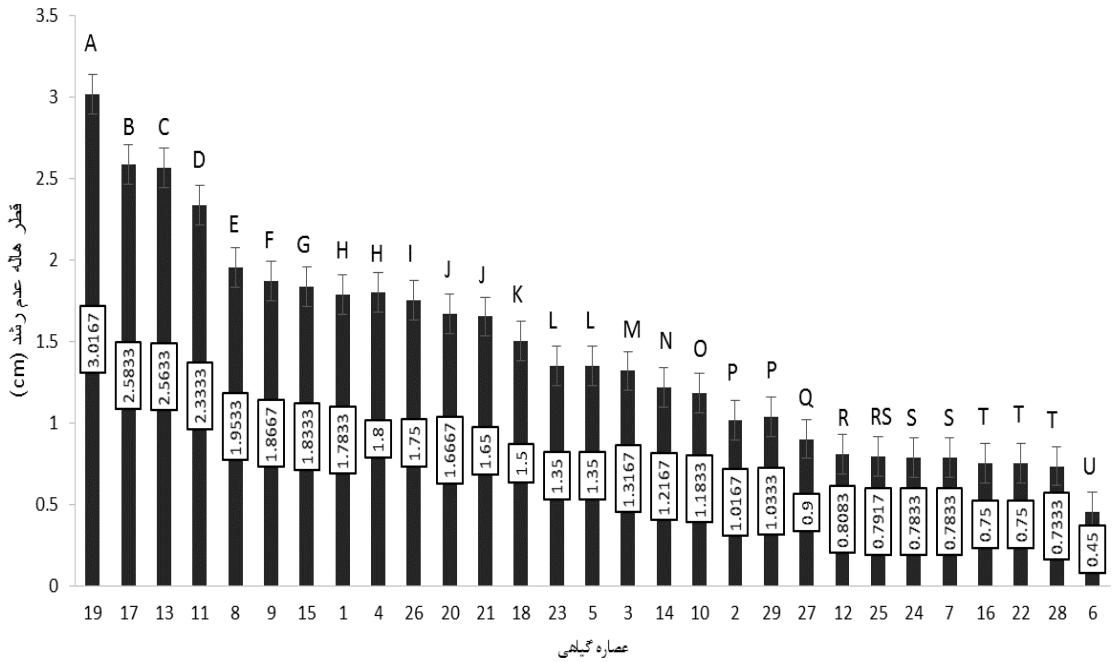
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
نوع اعمال تیمار (K)	۱	۲۰/۰۲	۲۰/۰۲۴۹	۳۷۹۵۵/۷۶ **
عصاره گیاهی (P)	۲۸	۳۱۱/۹۸	۱۱/۱۴۲	۲۱۱۱۸/۸۱ **
غلظت عصاره (L)	۲	۱۶۰/۰۵	۸۰/۰۲۵۹	۱۵۱۶۸۳/۱ **
K × P	۲۸	۱۳۱/۳۵	۴/۶۹۱	۸۸۹۱/۵۲ **
K × L	۲	۱۰/۶۹	۵/۳۴۳۱	۱۰۱۲۷/۴۸ **
P × L	۵۶	۲۸۰/۰۱	۵/۰۰۰۲	۹۴۷۷/۵۵ **
K × P × L	۵۶	۲۶۶/۴۸	۴/۷۵۸۵	۹۰۱۹/۴۵ **
خطا	۳۴۸	۰/۱۸	۰/۰۰۰۵	
کل	۵۲۱	۱۱۸۰/۷۶		

جدول ۳- تجزیه واریانس عصاره گیاهی، میزان و نوع اعمال عصاره بر قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس* اورئوس

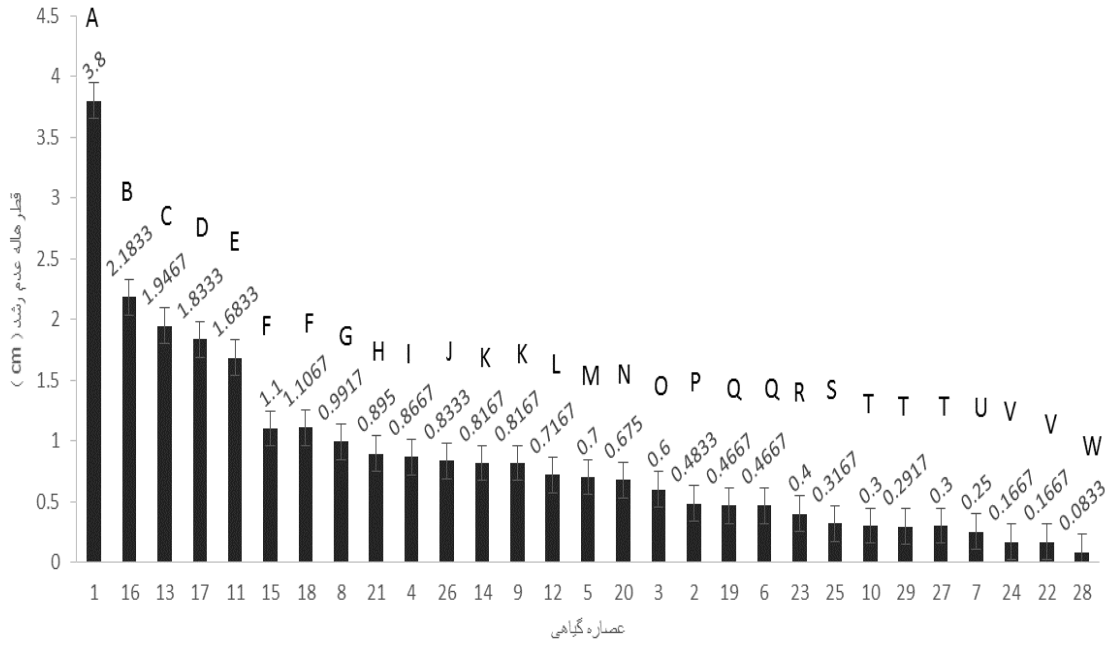
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
نوع اعمال تیمار (K)	۱	۱۵/۹۳۴	۱۵/۹۳۴	۲۱۲۴۵/۰۶ **
عصاره گیاهی (P)	۲۸	۲۱۲/۲۳۲	۷/۵۸	۱۰۱۰۶/۳ **
غلظت عصاره (L)	۲	۲۲۱/۵۹۳	۱۱۰/۷۹۶	۱۴۷۷۲۸/۵ **
K × P	۲۸	۶۴/۷۹۹	۲/۳۱۴	۳۰۸۵/۶۵ **
K × L	۲	۴/۴۴۴	۲/۲۲۲	۲۹۶۲/۹۹ **
P × L	۵۶	۱۷۸/۴۰۷	۳/۱۸۶	۴۲۴۷/۷۹ **
K × P × L	۵۶	۱۳۶/۰۹۶	۲/۴۳	۳۲۴۰/۳۷ **
خطا	۳۴۸	۰/۲۶۱	۰/۰۰۱	
کل	۵۲۱	۸۳۳/۷۶۶		

در تحقیقی (۴۴) اثر ضد میکروبی عصاره‌ی آبی و اتانولی گیاه ترشک به روش انتشار دیسک بر روی ۸ باکتری و ۲ نوع قارچ بررسی شده و اثر آنتی‌اکسیدانی با روش‌های توان احیای آهن و فسفومولیبدنیوم به همراه تعیین مقدار فنل تام نیز صورت گرفته است. نتایج نشان داده که بیشترین اثر به ترتیب بر روی *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسپرژیلوس نایجر* و کمترین اثر بر روی *انتروکوکوس فکالیس* بوده، از طرفی نیز هیچ‌کدام از عصاره‌ها بر روی رشد *پروتئوس* اثری نشان ندادند. در تحقیق انجام شده مشخص شده که عصاره اتانولی دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی بوده، درحالی‌که اثر ضد میکروبی عصاره آبی در حد بسیار ضعیفی بوده و همچنین بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نیز نشان داده که عصاره اتانولی اثر قوی‌تری نسبت به عصاره آبی دارد.

در تحقیقی (۴۵) از اسانس پودر دانه زیره سبز برای بررسی عملکرد ضد باکتریایی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *شیگلا فلکسنری*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *انتروکوک فکالیس* به روش انتشار از دیسک با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله مهاری و تعیین حداقل غلظت مهاری توسط روش میکروبراث دایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص شده است که بزرگ‌ترین هاله عدم رشد مربوط به باسیلوس سرئوس با قطر ۴۴ میلی‌متر و بعد از آن بیشترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب مربوط به باسیلوس سوبتیلیس، *استافیلوکوکوس اورئوس*، شیگلا فلکسنری و *اشریشیاکلی* بوده است و برای انتروکوکوس فکالیس، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی موریوم کمترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده است.



شکل ۱- ارزیابی عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی مختلف بر قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس* اورئوس
(حروف مشترک نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین گیاهان دارویی مختلف است)



شکل ۲- ارزیابی عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی مختلف بر قطر هاله عدم رشد *اشریشیاکلی*
(حروف مشترک نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین گیاهان دارویی مختلف است)

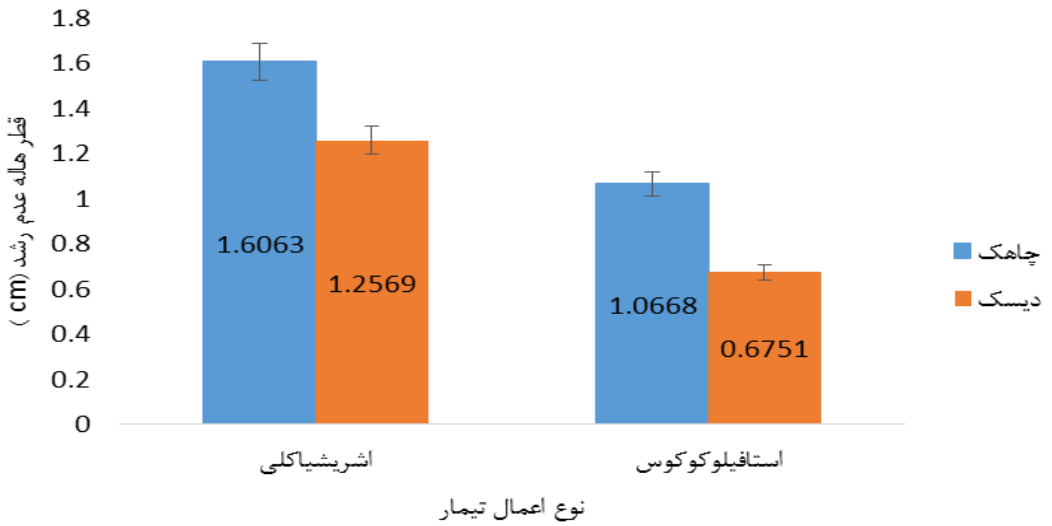
بررسی نتایج MBC و MIC نشان داد که اسانس زیره سبز بیشترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را بر روی *اشریشیاکلی* دارد. گزارش‌شده که عصاره اتانولی مورد بر *استافیلوکوکوس اورئوس* تأثیر مثبت داشته (۴۶، ۴۷) ولی روغن مورد تأثیر بیشتری نشان داده است (۴۶). از طرفی تأثیر بیشتر عصاره هیدروالکلی نسبت به عصاره اتانولی برگ و شاخه گیاه مورد بر باکتری‌های لیستریا مونوسایتوژنز، سودوموناس آئروژینوزا و *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین تأثیر بیشتر عصاره مورد بر باکتری‌های گرم مثبت بوده است (۴۸). در مطالعه‌ای دیگر (۴۹) مشخص شده که اگر چه عصاره هیدروالکلی گیاه مورد تأثیری در فعالیت انتشار نفوذی اشریشیاکلی نشان نداده اما حداقل غلظت کشنده برای اشریشیاکلی بالای ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش داده‌اند و در تحقیقات دیگر نیز از عدم تأثیر عصاره مورد بر اشریشیاکلی حکایت داشته‌اند (۴۶، ۴۸). در تحقیق حاضر مشخص شد که عصاره برگ مورد توانسته مؤثرترین عصاره بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس باشد و بعد عصاره آویشن و رزماری جزو مؤثرترین عصاره‌ها بر باکتری اشریشیاکلی باشند.

در تحقیقاتی اثر ضد میکروبی عصاره آبی گلبرگ (۵۰) و کلاله (۵۱) زعفران را بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی مورد بررسی قرار داده و متوجه شدند که عصاره آبی گلبرگ زعفران بر باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم مؤثر اما بر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتلیس و اشریشیاکلی کم اثر اما عصاره کلاله بر *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر بوده است. در تحقیق حاضر نیز عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر اشریشیاکلی مؤثر بوده اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر معنی‌داری بر *اشریشیاکلی* نداشته، ضمناً عصاره هیدروالکلی زعفران تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تأثیر نداشته اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر آن بر این سویه باکتری بیشتر شده اما در کل عصاره زعفران نسبت به سایر گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق

اثـــر متوســـطی بـــر باکتری‌هـــای *اســـتافیلوکوکوس* و *اشریشیاکلی* داشته است.

جدول ۴- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها و آنتی بیوتیک‌های مختلف بر باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*
(حروف مشترک نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین عصاره گیاهان دارویی مختلف و آنتی‌بیوتیک‌ها است)

اشریشیاکلی		*استافیلوکوکوس*	
میانگین قطر هاله عدم رشد	آنتی بیوتیک و عصاره‌های گیاهی	میانگین قطر هاله عدم رشد	آنتی بیوتیک و عصاره‌های گیاهی
۲/۸۱ a	CP	۳/۱ a	SXT
۲/۶۶ a	۱	۳/۰۱۶۷ a	۱۹
۲/۵ ab	AN	۲/۹۸ ab	CP
۲/۴۹ ab	GM	۲/۶۱ abc	P
۲/۳ abc	AZM	۲/۵۸۳۳ abc	۱۷
۲/۳ abc	SXT	۲/۵۶۳۳ abc	۱۳
۲/۲۰۱ abc	۱۳	۲/۵۱ abcd	CRO
۲/۱۸۳۳ abc	۱۶	۲/۳۳۳۳ abcde	۱۱
۲/۱ abcd	CRO	۲/۱۳ abcdef	AZM
۱/۹۹۲۱ abcd	۸	۲/۱۲ bcdef	GM
۱/۷۸۳۳ abcde	۱۷	۲ cdefg	AN
۱/۷۳۳۳ abcde	۱۱	۱/۹۵۳۳ cdefg	۸
۱/۴۹ abcdef	P	۱/۸۶۶۷ cdefg	۹
۱/۱۰۶۷ bcdef	۱۸	۱/۸۳۳۳ cdefg	۱۵
۰/۹۹۴۲ cdef	۱۵	۱/۸ cdefg	۴
۰/۹۴۱۷ cdef	۹	۱/۷۸۳۳ cdefg	۱
۰/۹۲۱۶ cdef	۴	۱/۷۵ defg	۲۶
۰/۹۰۹۲ cdef	۲۶	۱/۶۶۶۷ defgh	۲۰
۰/۸۹۵ cdef	۲۱	۱/۶۵ efgh	۲۱
۰/۷۶۶۷ def	۱۴	۱/۵ efghi	AM
۰/۷۱۹۲ def	۳	۱/۵ fghi	۱۸
۰/۷۱۶۷ def	۱۲	۱/۳۵ fghi	۲۳
۰/۷ def	۵	۱/۳۵ fghi	۵
۰/۶۷۵ ef	۲۰	۱/۳۱۶۷ fghi	۳
۰/۵۲۴۷ f	۲	۱/۲۱۶۷ ghi	۱۴
۰/۴۹۴۴ f	۱۹	۱/۱۸۳۳ ghi	۱۰
۰/۴۶۶۷ f	۶	۱/۰۳۳۳ hij	۲۹
۰/۴ f	۲۳	۱/۰۱۶ hij	۲
۰/۳۱۶۷ f	۲۵	۰/۹ ij	۲۷
۰/۳ f	۲۷	۰/۸۰۸۳ ij	۱۲
۰/۳ f	۱۰	۰/۷۹۱ ij	۲۵
۰/۲۹۱۷ f	۲۹	۰/۷۸۳۳ ij	۷
۰/۲۵ f	۷	۰/۷۸۳۳ ij	۲۴
۰/۱۶۶۷ f	۲۴	۰/۷۵ ij	۲۲
۰/۱۶۶۷ f	۲۲	۰/۷۵ ij	۱۶
۰/۰۸۳۳ f	۲۸	۰/۷۳۳۳ ij	۲۸
۰/۰ f	AM	۰/۴۵ j	۶



شکل ۳- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* در دو روش دیسک‌های کاغذی و چاهک‌گذاری

اثرات مثبت اسانس رزماری (۵۴-۵۲) بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باسیلوس سرئوس گزارش‌شده است. در تحقیق حاضر نیز عصاره رزماری جزو مؤثرترین عصاره‌ها بر *اشریشیاکلی* اما جزو کم اثرترین عصاره‌ها بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده و تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز بر استافیلوکوکوس هیچ اثری نداشته است. گزارش شده (۳۴) با افزایش غلظت عصاره رزماری تأثیر آن بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بیشتر شده ولی این افزایش به بیش از ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تأثیری نداشته است، اما در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره اتانلی بومادران بر باکتری *استافیلوکوکوس* نسبت به *اشریشیاکلی* مؤثرتر بود و حتی از لحاظ هاله عدم رشد بر هر دو نوع باکتری به‌خصوص *استافیلوکوکوس* نسبت به سایر گیاهان در حد بالایی بوده اما نسبت به آویشن شیرازی و مورد کمتر بود.

گزارش شده که اسانس پونه کوهی بر روی باکتری‌های فسادزا در گوشت (*لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی* و *یرسینیا آنتروکولیتیکا*) مؤثر نبوده در تحقیق حاضر مشخص شد که مؤثرترین غلظت عصاره برگ رزماری بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است

در گزارشی (۵۵) عصاره متانلی گل و برگ بومادران بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آئروژینوزا و *اشریشیاکلی* بررسی شد و مشخص گردید که بیشترین اثر حاصل عصاره گل بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین اثر بر اشریشیاکلی بود هر چند سودوموناس هیچ حساسیتی به عصاره از خودش نشان نداد.

است (۵۶)، اما در تحقیقی دیگر (۵۶) اثر اسانس‌های پونه کوهی و جوز هندی بر رشد و بقاء *استافیلوکوکوس اورئوس* در جوجه کباب آماده پخت مورد بررسی قرار گرفت و به این نتیجه رسیدند که اسانس پونه کوهی مؤثرتر از جوز هندی بوده است. در تحقیق حاضر عصاره پونه کوهی از لحاظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارای سطح پایینی بوده است.

در کل با توجه به این که فنل‌ها و ترکیبات پلی‌فنلی مانند فلاونوئیدها به‌طور گسترده در محصولات غذایی و دارویی یافت شده و نشان داده

شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری دارند (۵۷) و از طرفی افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی منجر به کاهش برخی بیماری‌ها در انسان می‌شود (۵۸) و با در نظر گرفتن اثرات منفی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و نیز با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان عصاره مورد، آویشن شیرازی، بومادران و سپس رزماری را به عنوان جانشینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی پیشنهاد نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق نشان داد که مؤثرترین عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بر قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* گیاهان مورد (برگرفته از مناطق شیراز و ایلام)، آویشن وحشی و شیرازی (شیراز و ایلام) و بابونه (قاین) و همچنین مؤثرترین عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بر قطر هاله عدم رشد *اشریشیاکلی* گیاهان آویشن (شیراز و جیرفت)، مورد (برگرفته از مناطق شیراز و ایلام) و رزماری (شیراز) بودند.

Reference

1. Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology. 2012; 156(1):7-17.

2. Kwok CY, Wong CNY, Yau MYC, Yu PHF, Au ALS, Poon CCW, et al. Consumption of dried fruit of *Crataegus pinnatifida* (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. Journal of functional foods. 2010; 2(3):179-86.

3. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010; 15(10):7313-52.

4. Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (Myrtus communis L.). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2015; 25(127):10-24 [Farsi].

5. Valizadeh J, Bagheri A, Valizadeh J, Mirjalili MH. Phytochemical Investigation of *Withania Coagulans* (Stocks) Dunal In Natural Habits Of Sistan and Balochestan ProvinceOf Iran. Iranian Journal Of Medical and Aromatics Plants. 2015; 31(3):406-17.

6. Sharma R, Samant S, Sharma P, Devi S. Evaluation of antioxidant activities of *Withania somnifera* leaves growing in natural habitats of North-west Himalaya, India. Journal of Medicinal Plants Research. 2012; 6(5):657-61.

7. Shrivastava A, Roy S. *Cucurbitaceae*: A ethnomedicinally important vegetable family. Journal of Medicinal Plants Studies. 2013; 1(4):16-20.

8. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, *et al.* Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology. 2000; 148(2):187-97.

9. Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 24(120):188-208.

10. Jafari R, Manochehri Kalantari K, Ahmadi Mousavi A. Effect of paclobutrazol on accumulation of antioxidants in tomato seedlings under cold stress. Iranian Journal of Biology. 2007;20:206-16 (In Persian).

11. Chen Y, Zhang M, Chen T, Zhang Y, An L. The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of Sabina. South African Journal of Botany. 2006; 72(2):272-9.

12. Mollá S, Villar-Salvador P, García-Fayos P, Rubira JLP. Physiological and transplanting performance of *Quercus ilex* L.(holm oak) seedlings grown in nurseries with different winter conditions. Forest ecology and management. 2006; 237(1):218-26.

13. Wach A, Pyrzyńska K, Biesaga M. Quercetin content in some food and herbal samples. Food chemistry. 2007; 100(2):699-704.

14. Calabro M, Galtieri V, Cutroneo P, Tommasini S, Ficarra P, Ficarra R. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004; 35(2):349-63.

15. Guo C, Yang J. Progress in the study of antioxidant capacity of fruits and vegetables. China public health. 2001; 17:87-8.

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

17. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods (a review). International Journal of Food Microbiology. 2004; 94(3):223-53.

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

19. Shapoori R, Rhnama M, Eghbal-Zadeh S. Study of Salmonella serotypes in chicken meat and egg, and determine the antibiotic susceptibility in Zanjan. Journal of Biological Science. 2009; 2(3):63-71.

20. Kotze M, Eloff J, Houghton P. Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). South African Journal of Botany. 2002; 68(1):62-7.

21. Najjafi-moemen R. To investigate the antimicrobial activity of four medicinal plants of the bacterium *E. coli* colibacillosis poultry. Journal of Agriculture and Natural Resources Research Center in Qom. Journal of Agriculture and Natural Resources Research Center in Qom. 2004; 2:1-15.

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

23. 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 medical journal. 2002; 23(7):802-5.

24. Vahidi H, Kamalinejad M, Sedaghati N. Antimicrobial properties of Croccus sativus L. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2010; 1:33-5.

25. 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.

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

27. 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). Phytotherapy research. 2004; 18(6):451-6.

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

29. Abubakar LA, Mwangi CM, Uku JU, Ndirangu SN. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin, *Tripneustes gratilla*, (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics. 2012; 1(1):19-23.

30. Sharma A, Sharma K. Should Solubility and Zone of Inhibition Be the Only Criteria for Selection of Solvent in Antimicrobial Assay? Advances in Biological Research. 2011; 5:241-7.

31. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology. 1966; 45(4):493-6.

32. Javed M, Durrani F, Hafeez A, Khan R, Ahmad I. Extract of plant mixture on carcass quality of broiler chicks. Arpn J Agric Biol Sci. 2006; 1:115-21.

33. Stickel F, Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. Digestive and liver disease. 2007; 39(4):293-304.

34. 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 (Farsi).

35. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, *et al.* Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of ethnopharmacology. 1996; 50(1):27-34.

36. Shan B, Cai Y-Z, Brooks JD, Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. Journal of agricultural and food chemistry. 2007; 55(14):5484-90.

37. Dorman H, Deans S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied microbiology. 2000; 88(2):308-16.

38. Kazem Alvandi R, A. S, M. AM. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. Comparative Pathobiology. 2010; 7(4):355-64.

39. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, Newall CA. Herbal medicines: Pharmaceutical Press London; 2007.

40. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical microbiology reviews. 2001; 14(1):227.

41. Abdollah Asilian H, Kamrani E, Yousef Zadi M, Keshavarz M. Antibacterial Effect of extraction of sea cucumber extracts *Echinometra mathaei*. Journal of Aquatic Ecology. 2015; 5(3):139-44.

42. Shakouri A, Jvanmar kami Ghazi Mahale O, Soheili F. Antibacterial activity of organs extracted from sea cucumber (*Echinometra mathaei*) in Chabahar beach. Marine biology journal. 2015; 6(25):73-82.

43. Behdani M, Ghazvini K, Mohammadzadeh A, Sadeghian A. Antibacterial activity of Henna extracts against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeroginosa. The Horizon

of Medical Sciences. 2009; 15(2):46-51.

44. Moradi A, Ebrahimipour G, Karkhane M, Marzban A. Surveying the Antioxidant and the Antimicrobial Effects of Aqueous and Ethanolic Extract of *Rumex Alveollatus* L. on In-vitro Indicator Microorganisms. Journal of Fasa University of Medical Sciences/Majallah-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki-i Fasa. 2015; 4(4).

45. Daneshmandi S, Soleimani N, Pourfathollah AA, Sattari M. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of *cuminum cyminum* essential oil. Arak Medical University Journal. 2010; 13(2):75-82.

46. Salvagnini LE, Oliveira JRS, Santos LEd, Moreira RRD, Pietro RCL. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L.(Myrtaceae) leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2008; 18(2):241-4.

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

48. 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. International Journal of Food Properties. 2010; 13(6):1215-24.

49. Ghasemi Pirbalouti A, Jahanbazi P, Enteshari S, Malekpoor F, Hamedi B. Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. Archives of Biological Sciences. 2010; 62(3):633-41.

50. 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. Journal of Medicinal Plants. 2012; 2(42):189-96.

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

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

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

54. 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. Phytotherapy research. 2007; 21(10):989-94.

55. Nemeth E, Bernath J. Biological activities of yarrow species (*Achillea spp*.). Current pharmaceutical design. 2008; 14(29):3151-67.

56. Firouzi R, Shekarforoush SS, Malekzadeh M. Effect of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of Staphylococcus aureus in barbecued chicken. JFST. 2011; 32(2):35-41.

57. Van Acker SA, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJ, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine. 1996; 20(3):331-42.

58. Fazli R, Nazarnezhad N, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of phenols and flavonoids and antioxidant activity of the bark of beech, hornbeam, and pine. Journal of the forest and wood products. 2013; 66(3):339-42.

The Antimicrobial Properties of Hydro-Alcoholic Extracts of 29 Medicinal Plants on *E. coli* and *Staphylococcus aurous* Microbes

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

1- Lecturer, Research Dept. Of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Associate prof., Dep. Of pathology, Veterinary campus, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Lecturer, Dept. Of pathology, Veterinary campus, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: January 08, 2018; Revise: January 30, 2018; Accept: March 11, 2018

Summary

The aim of this study was evaluation of 29 hydro-alcoholic extracts of different medicinal plants on Escherichia coli and Staphylococcus aurous. In this study, the antimicrobial effects of hydro-alcoholic extracts were obtained on the bacteria *E. Coli* and *Staphylococcus aurous* in a culture medium Mueller-Hinton agar diffusion method using 6 mm paper discs method in accordance with the instructions of Bauer and Kirby and Mark wells method. The antibiotics ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, azithromycin, trimethoprim-sulfa methoxazole, ceftriaxone, penicillin and ampicillin were used as positive control. The results showed that the most effective hydro-alcoholic extracts of medicinal plants on the diameter of inhibition zone of Staphylococcus aurous were *Thyme*, *Myrtus* and *Chamomile*, and on the diameter of the inhibition zone of E. coli were *Thyme*, *Myrtus* and *Rosemary*. In addition, it was found that the environmental impact was less effective on the antimicrobial activity of hydro-alcoholic extracts of medicinal plants like Myrtus and Thyme but it was more effective on chamomile. The weakest plants affecting the diameter of the inhibition zone of both types of bacteria studied were *Smyrnium, Fumaria officinalis, hyssop, wormwood, thyme* and *oregano*. There was significant difference between anti-microbial hydro-alcoholic extracts of medicinal plants in two six-millimeter disc and plate-making methods as the diameter of the inhibition zone of both bacteria in the wells of investment was more than paper disc method. In accordance with the results of this project and also considering the increasing resistance to antimicrobial synthetic materials, some medicinal plants like *thyme*, *myrtus* and *rosemary* can be as effective in destroying some bacteria including E. coli and Staphylococcus aurous.

Key Words: *Bacteria, chamomile, Rosmarinus, Myrtus, Thyme*

بررسی وضعیت میکروبی گوشت گوساله در کشتارگاه و برخی قصابی‌های استان تهران

احسان نوروزی[۱]، ولی اله کوهدار[۲*]

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۲- استادیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۸ آذر ۱۳۹۷، بازنگری: ۱۰ بهمن ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۷ بهمن ۱۳۹۷

چکیده

گوشت یکی از غذاهای فسادپذیر است که در صورت تولید و حمل و نقل نامناسب، سریعاً آلوده و فاسد می‌گردد. گوشت آلوده، علت بسیاری از بیماری‌های غذازاد بوده است. در این تحقیق، با روش سوآپ برداری غیر مستقیم، از عضلات نواحی گردن، قلوه‌گاه و ران ۱۵ لاشه گاو، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های اخذ شده پس از شستشوی نهایی در کشتارگاه (۴۵ نمونه) و قصابی (۴۵ نمونه)، از نظر میکروبی مورد آزمون قرار گرفته و تأثیر حمل و نقل بر وضعیت میکروبی مورد مطالعه قرار گرفت. عضلات ران و عضلات گردن با لگاریتم (میانگین ± انحراف معیار) ۰/۴۵± ۴/۹۰ و ۰/۲۱ ±۴/۲۱ به ترتیب آلوده‌ترین و پاک‌ترین مناطق در کشتارگاه از نظر بار میکروبی بوده و آلوده‌ترین و پاک‌ترین نواحی پس از توزیع در بازار، به ترتیب قلوه‌گاه و عضلات ران با لگاریتم (میانگین± انحراف معیار)۰/۲۵± ۶/۱۶ و ۰/۲۴ ۵/۹۲± تشخیص داده شدند. بیشترین آلودگی به *اشریشیاکلی* در کشتارگاه و قصابی‌ها را عضلات ران به ترتیب با لگاریتم (میانگین± انحراف معیار) ۰/۶۳± ۱/۷۳ و ۰/۰۶ ± ۲/۱۴ داشت. ۲۶/۶۷ و ۶/۶۷ درصد از نمونه‌های کشتارگاه و ۳۱/۱۱ و ۸/۸۹ درصد از نمونه‌های قصابی‌ها به ترتیب با *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* آلوده بودند. اختلاف معنی‌داری($p<0.05$) میان میانگین بار میکروبی و همچنین شمارش *اشریشیاکلی* در کشتارگاه و قصابی مشاهده گردید. با توجه به نتایج، کشتار گاو و حمل و نقل گوشت باید تحت شرایط بهداشتی مناسبی انجام شود.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی، سالمونلا، کشتارگاه، قصابی، گوشت گوساله*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: dr.koohdar@gmail.com

مقدمه

کیفیت میکروبی گوشت و فراورده‌های گوشتی از منظر بهداشت عمومی و سلامتی انسان و همچنین از منظر اقتصادی اهمیت فراوانی دارد. وقوع اپیدمی‌های متعدد بیماری‌های ناشی از غذا در مصرف‌کنندگان گوشت و فراورده‌های آن، حاکی از اهمیت این ماده پرارزش غذایی از نظر بهداشت عمومی و سلامتی جامعه می‌باشد. از طرف دیگر فساد این ماده غذایی و از بین رفتن آن، ضرر و زیان زیادی را برای تولید کننده، مصرف کننده و کشور ایجاد می‌نماید (۱، ۲). گوشت حاصل از دام سالم بلافاصله پس از پوست‌کنی آلوده می‌شود و همواره کشتارگاه و ابزارآلات مورد استفاده در آن به عنوان منابع مهم آلودگی گوشت مطرح می‌باشند. از منابع آلودگی حیوانی گوشت، می‌توان به پوست، دستگاه گوارش و تنفس اشاره کرد (۳، ۴). تماس بین پوست و لاشه در زمان کشتار باعث انتقال باکتری‌ها به گوشت می‌شود. چنین میکروب‌هایی در حقیقت با منشأ محیطی بوده و از طریق مدفوع، خاک، آب و یا غذا، پوست را آلوده کرده و از طریق آن، لاشه را آلوده می نمایند (۵). منبع آلودگی دیگر گوشت، حمل و نقل گوشت می‌باشد که می‌تواند موجب افزایش بار میکروبی لاشه گردد. حمل و نقل به وسیله ماشین‌های غیر مجاز یا متخلف که با عدم ضدعفونی و یا خاموش نمودن یخچال، شرایط مناسبی را برای بقاء و رشد میکروب‌ها فراهم می‌آورند، باعث تسریع فسادپذیری گوشت می‌شوند (۶).

وضعیت میکروبی گوشت قرمز و گوشت طیور به شرایط پرورش حیوان، ذبح و فرآوری بستگی دارد. ذبح، حساترین مرحله برای آلودگی گوشت است، اما بخش قابل ملاحظه ای از آلودگی‌ها طی اعمال بعدی اتفاق می‌افتد. آلودگی اولیه سطح گوشت دام‌های سالم، تحت تأثیر شرایط دام و محیط کشتارگاه است. هر یک از مراحل پس از ذبح دام شامل حمل و نقل، سرد کردن، خشک کردن، فرآوری، بسته بندی و نگهداری لاشه، تعیین می‌کنند که چه باکتری‌هایی از میان جمعیت میکروبی اولیه لاشه، زنده م ماند و جمعیت غالب را تشکیل م دهند، به طور کلی ترکیب فلور میکروبی مولد فساد گوشت به عوامل مختلفی بستگی دارد. نحوه نگهداری دام قبل از کشتار، سن دام در زمان کشتار، نحوه کشتار، دمای محیط کشتارگاه و ماشین‌های حمل گوشت و قصابی و نحوه نگهداری گوشت از جمله مهم‌ترین عوامل مؤثر در این زمینه می باشند (۷، ۸). با توجه به افزایش میانگین میزان مصرف سرانه گوشت در جهان طی سال‌های اخیر، مصرف‌کنندگان توجه زیادی به کیفیت، تازگی و سلامتی گوشت دارند (۹). عدم توجه به کشتار مناسب و بهداشتی دام در کشتارگاه و عدم رعایت بهداشت و زنجیره سرما در مراحل حمل و نقل و ارائه گوشت در بازار، دو عامل اصلی در فساد گوشت و کاهش اقبال عمومی در خرید آن می باشد (۱۰، ۱۱). با در نظر گرفتن موارد ذکر شده، این تحقیق به منظور تعیین وضعیت میکروبی گوشت تازه گاو در کشتارگاه و تعدادی از قصابی‌های برخی نواحی تهران و همچنین تأثیر حمل و نقل بر این ویژگی گوشت، انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع اوری نمونه ها: از نمونه‌برداری تصادفی ساده برای تهیه نمونه‌های مورد آزمون استفاده شد. برای نمونه‌برداری، ابتدا هماهنگی لازم از طریق اداره کل دامپزشکی با یکی از کشتارگاه‌های صنعتی استان تهران که روزانه بیش از ۱۰۰ راس گوساله و گاو کشتار می‌کند، انجام شد. جمعاً پانزده لاشه به طور تصادفی در طی روزهای مختلف، انتخاب و

نشانه‌گذاری شد و پس از اتمام کشتار (شستشوی نهایی) نمونه‌برداری از نواحی مختلف (گردن، قلوه‌گاه و ران) به روش سوآپ برداری غیر مستقیم صورت گرفت. با انتخاب سطحی از محل نمونه‌برداری در ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر و کشیدن سوآپ به صورت افقی ده بار و ده بار هم به طور عمودی سوآپ‌کشی و نمونه‌برداری انجام شد (۱۲). پس از انتقال لاشه‌های علامت‌گذاری شده به سردخانه کشتارگاه و سپس به بازار فروش در تهران، مجدداً نمونه‌برداری از محل‌های قبلی، با روش ذکر شده انجام شد. در مجموع ۹۰ نمونه که ۴۵ نمونه مربوط به مرحله پس از شستشوی نهایی در کشتارگاه (پانزده نمونه مربوط به گردن، پانزده نمونه مربوط به قلوه‌گاه و پانزده نمونه مربوط به ران) و ۴۵ نمونه مربوط به مراکز فروش بود، از نواحی ذکر شده اخذ شد و به طور جداگانه تحت شرایط استریل و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید .

آزمون های میکروبی: رقت‌سازی برای هرکدام از نمونه‌ها با استفاده از پیپتون واتر صورت گرفت و سپس از رقت‌های ۴-۱۰ ، ۵-۱۰ و ۶-۱۰ شمارش کلی میکروبی با استفاده از روش کشت مخلوط و با محیط کشت پلیت کانت آگار (مرک)، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و مدت زمان ۷۲ ساعت انجام شد (۱۳). جهت جستجوی باکتری اشریشیا کلی، در ابتدا از محیط لوریل سولفات براث دوبل (مرک) حاوی لوله دورهام با گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس، سپس محیط EC براث (مرک) حاوی لوله دورهام به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و در نهایت از محیط‌های آب پپتونه و مک کانکی آگار (مرک) استفاده گردید و برای شمارش آن نیز، روش بیشترین تعداد احتمالی به کار رفت (۱۴). برای شناسایی سالمونلا، از روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۸۱۰ استفاده شد (۱۵).

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل، ابتدا از آزمون آماری آنالیز واریاس تکراری (Repeated ANOVA) و برای مقایسه شمارش هر کدام از میکروارگانیم‌ها در ۲ مرحله از آزمون آماری تی وابسته (Paired t-test) با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد. از نرم افزار Excel هم برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

نتایج مربوط به آزمون‌های میکروبی در نمونه‌های اخذشده از نواحی مختلف لاشه، در مرحله پس از شستشوی نهایی در جدول شماره ۱ آمده است. کمترین میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در این مرحله با لگاریتم (میانگین ± انحراف معیار) ۴/۰±۰/۲۱ مربوط به عضلات گردن می‌باشد. همچنین بیشترین میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در این مرحله با لگاریتم (میانگین ± انحراف معیار) ۴/۹۰±۰/۴۵ مربوط به عضلات ران می‌باشد. کمترین میزان شمارش اشریشیا کلی در مرحله بعد از شستشوی نهایی، مربوط به عضلات گردن می‌باشد. همچنین بیشترین میزان شمارش اشریشیا کلی در این مرحله، مربوط به عضلات ران می‌باشد. آلودگی به سالمونلا در قسمت‌هایی از لاشه که آلودگی میکروبی بالایی داشتند، مشاهده شد.

نتایج مربوط به بررسی‌های میکروبی نواحی مختلف لاشه، در مرحله پس از توزیع در بازار در جدول شماره ۲ آمده است. کمترین میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در مرحله توزیع در بازار با لگاریتم (میانگین ± انحراف معیار) ۰/۲۴ ± ۵/۹۲ مربوط به عضلات ران می‌باشد. همچنین بیشترین میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در این مرحله با لگاریتم (میانگین±انحراف معیار) ۰/۲۵ ± ۶/۱۶ مربوط به عضلات قلوه گاه می باشد. کمترین میزان

شمارش اشریشیا کلی در نمونه های تهیه شده از بازار همانند مرحله بعد از شستشوی نهایی، مربوط به عضلات گردن بوده و نیز بیشترین میزان شمارش اشریشیا کلی در این نمونه‌ها مربوط به عضلات ران می‌باشد.

جدول شماره۱- میانگین ± انحراف معیار شمارش کلی میکروبی و *اشریشیا کلی* (log_{10} cfu/cm^2) و میزان آلودگی به *سالمونلا* در ۴۵ نمونه اخذ شده از ۱۵ لاشه پس از شستشوی نهایی در کشتارگاه

	شمارش کلی میکروبی	شمارش باکتری *اشریشیا کلی*	میزان آلودگی به *سالمونلا*
	log_{10} cfu/cm^2	log_{10} cfu/cm^2	٪
گردن	۴/۲۱^a ±۰/۲۰	۱/۰۲^a ±۰/۲۵	-
قلوه گاه	۴/۵۸^b ±۰/۴۴	۱/۳۸ ^{b} ±۰/۶۱	۶/۶۷
ران	۴/۹۰^c ±۰/۴۵	۱/۷۳ ^{c} ±۰/۶۳	۱۳/۳

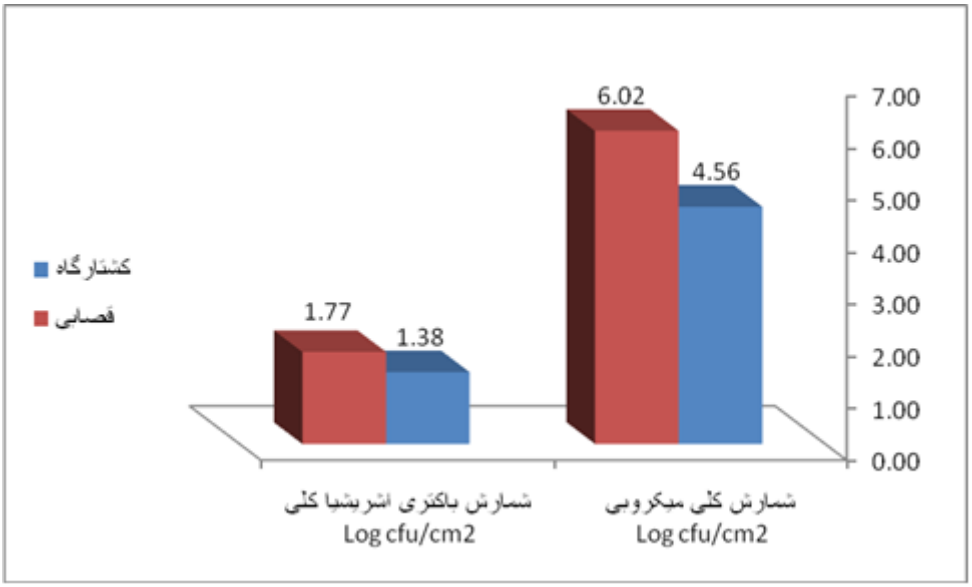
حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$)

جدول شماره۲- میانگین ± انحراف معیار شمارش کلی میکروبی و *اشریشیا کلی* (log_{10} CFU/cm^2) و میزان آلودگی به *سالمونلا* در ۴۵ نمونه اخذ شده از ۱۵ لاشه پس از توزیع در بازار

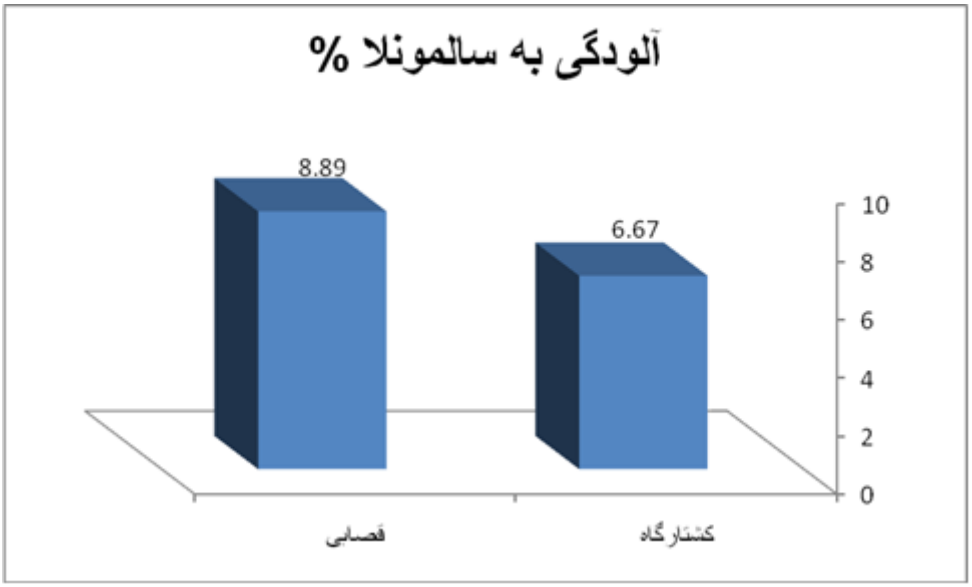
	شمارش کلی میکروبی	شمارش باکتری *اشریشیا کلی*	میزان آلودگی به *سالمونلا*
	log_{10} cfu/cm^2	log_{10} cfu/cm^2	٪
گردن	۵/۹۹^a ±۰/۲۴	۱/۲۱^a ±۰/۱۷	۶/۶۷
قلوه گاه	۶/۱۶^a ±۰/۲۵	۱/۹۶^b ±۰/۳۱	۶/۶۷
ران	۵/۹۲^a ±۰/۲۴	۲/۱۴^b ±۰/۰۶	۱۳/۳

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$)

در نمودار شماره ۱ مقایسه میانگین و انحراف معیار شمارش کلی میکروبی و *اشریشیا کلی* در نمونه‌های اخذشده از لاشه گاو در دو مرحله پس از شستشوی نهایی در کشتارگاه و توزیع در بازار، نمایش داده شده است. شمارش کلی میکروبی و *اشریشیا کلی* در مرحله پس از توزیع در بازار، بیشتر از مرحله شستشوی نهایی مشاهده گردید و این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). نمودار شماره ۲، میزان افزایش آلودگی به *سالمونلا* را در بازار در مقایسه با کشتارگاه نشان می‌دهد.



نمودار ۱- مقایسه (لگاریتم میانگین±انحراف معیار) شمارش کلی میکروبی و شمارش *اشریشیا کلی* در نمونه های مربوط به کشتارگاه و بازار



نمودار ۲- مقایسه درصد میزان آلودگی به *سالمونلا* در نمونه‌های مربوط به کشتارگاه و بازار

بحث و نتیجه‌گیری

فرآیند کشتار گاو و آماد سازی لاشه آن به طور معمول دارای چندین مرحلهٔ عملیاتی است . بررسی‌های مختلف نشان می‌دهند که عملیات پوست‌کنی موجب انتقال میکروب‌ها به لاشه می‌شود. تعداد میکروب‌ها طی عملیات پوست‌کنی، روی لاشه افزایش می‌یابد. جابجائی لاشه و انجام اعمال بعدی روی آن، موجب افزایش تعداد میکروب‌ها می‌شود. افزایش تعداد میکروب‌ها روی لاشه از قواعد لگاریتمی پیروی می‌کند (۴). همواره توصیه می‌شود بهترین روش برای جلوگیری از فساد گوشت، تهیه و تولید آن در شرایط کاملاً بهداشتی است تا جمعیت میکروبی اولیه فرآورده در کمترین میزان خود باشد. رعایت اصول صحیح فرایند تولید و فرآوری به روش کاملاً بهداشتی، باعث کاهش

آلودگی سطحی لاشه‌ها می‌گردد (۷، ۱۶). اعمال مختلفی که در کشتارگاه جهت استحصال گوشت از دام کشتاری انجام می‌شود، باعث آلودگی لاشه و گوشت می‌شوند که غیر قابل پیشگیری بوده و اجتناب ناپذیر است. اما شناسایی منابع آلودگی و کنترل آنها، در کاهش بار میکروبی اولیه بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱۷). شمارش کلی میکروبی یکی از شاخص‌های تعیین کیفیت گوشت می‌باشد. حضور بیش از حد میکروب‌ها (cfu/cm2107<) نشان‌دهنده فساد میکروبی گوشت می‌باشد (۳).

Mukhopadhyay و همکاران در سال ۲۰۰۹ ، میزان شمارش کلی میکروبی در گوشت قرمز موجود در بازار را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که این میزان در ۶۰ درصد از نمونه‌های مورد بررسی کمتر از cfu/cm2106 می‌باشد. اما ۴۰ درصد از نمونه‌ها حاوی بیش از cfu/cm2107 میکروارگانیسم می‌باشند (۱۸). میزان تأثیرگذاری اعمال کشتاری استفاده شده در کشتارگاه دام جهت کاهش میزان باکتری‌های هوازی و انتروباکتریاسه توسط Arthur و همکاران (۲۰۰۴) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میانگین شمارش باکتری‌های هوازی و انتروباکتریاسه پوست گاو به ترتیب log cfu/100cm28/7 و۶/۲ می‌باشد. این مقادیر پس از اتمام مراحل کشتاری و در لاشه‌های سرد به ترتیب log cfu/100cm2 4/1 و ۰/۴ گزارش گردید. در این تحقیق مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی پوست و شمارش باکتری‌های هوازی و انتروباکتریاسه وجود دارد و اعمال کشتاری در کاهش آلودگی لاشه مؤثر بودند (۱۹). Koohdar در سال ۲۰۱۳، تأثیر مراحل کشتار بر وضعیت میکروبی لاشه گاو و گوساله را مورد بررسی قرار داد. آلودگی سطحی لاشه در تمامی قسمت‌های مورد مطالعه و در مراحل مختلف کشتار افزایش نشان داد و به همراه آن میزان اشریشیا کلی نیز افزایش یافت. در این تحقیق آمده است که با شستشوی نهایی لاشه کاهش معنی‌داری (p< ۰/۰۵) در شمارش باکتری‌های هوازی و اشریشیا کلی اتفاق می‌افتد ولی شستشو قادر به حذف همه آلودگی‌ها نمی‌باشد (۲۰).

Bohaychuk و همکاران (۲۰۱۱) وضعیت میکروبی لاشه گاو و خوک را در کشتارگاه‌های آلبرتای کانادا مورد مطالعه قرار دادند. در ۹۹/۸ درصد لاشه‌های گاو و ۹۶درصد لاشه‌های خوک شمارش باکتری‌های هوازی کمتر یا مساوی 105 cfu/cm2 بود و کلی‌فرم‌ها به ترتیب از ۲۲/۴ و ۴۲ درصد لاشه‌های گاو و خوک جداسازی شدند (۲۱). در تحقیق Ahmed و همکاران (۲۰۱۳) میانگین شمارش کلی میکروبی گوشت گاو و گوسفند در کشتارگاه به ترتیب Log cfu/cm2 ۳۵/۵ و ۵/۴۲ و در نمونه‌های اخذ شده از بازار به ترتیب برای گوشت گاو و گوسفند Log cfu/cm2 ۱۵/۷ و ۶/۹۲ گزارش گردید و در میزان شمارش کلی میکروبی در کشتارگاه و بازار اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در خصوص آلودگی به کلی فرم نیز نتایج مشابهی را مشاهده نمودند و ۱/۵ لوگ افزایش شمارش کلی‌فرم‌ها در نمونه‌های مربوط به بازار نسبت به کشتارگاه اتفاق افتاد. شمارش کلی میکروبی در ۵۱ درصد از نمونه‌های مورد آزمون بیش از Log cfu/cm2 6 مشاهده گردید که نشانه آلودگی شدید گوشت بود (۳). درمطالعه‌ای، میزان بار میکروبی به طور میانگین ۱۰۹×۱/۶۴ و cfu/g ۱۰۹×۹۲/۱ به ترتیب در کشتارگاه و قصابی‌ها گزارش گردید و میزان آلودگی به کلی‌فرم‌ها و اشریشیا کلی در نمونه‌های مربوط به قصابی بسیار بالاتر از نمونه‌های کشتارگاه بود (۲۵). معنی‌دار بودن اختلاف میزان آلودگی در نمونه‌های کشتارگاهی در مقایسه با نمونه‌های بازار، در گزارشات سایر محققین هم آمده است (۱۷، ۲۲).

بالا بودن شمارش کلی میکروبی در نمونه‌های مربوط به بازار نسبت به نمونه‌های کشتارگاه نشانه نامناسب بودن روش بارگیری، حمل و نقل و نگهداری گوشت در طول حمل و نقل و قصابی‌ها می‌باشد که ضمن افزایش میزان آلودگی ثانویه، باعث رشد میکروب‌های موجود در سطح گوشت می‌شود (۲۳، ۲۴).

بر اساس استاندارد ملی ایران و رویه نمونه‌برداری سه رده‌ای، حد مجاز شمارش کلی میکروبی در گوشت قرمز به این شکل می‌باشد که از هر ۵ نمونه اخذ شده، ۳ نمونه می‌تواند از 5 ×104 cfu/cm2 میکروارگانیسم بیشتر داشته باشد به شرط آن که این میزان از ×105 cfu/cm2 5 بالاتر نباشد (۲۶). با توجه به این استاندارد، از میان ۴۵ نمونه مربوط به کشتارگاه، تعداد ۱۷ نمونه (۳۷/۷۸ درصد) دارای شمارش کلی میکروبی بیش از 5 ×104 cfu/cm2 بوده و از این تعداد، در ۴ نمونه (۸/۸۹ درصد) تعداد میکروارگانیسم‌ها بیش از 5 ×105 cfu/cm2 (بیش از حد استاندارد) مشاهده شد. به عبارتی با در نظر گرفتن و رعایت اصول بهداشتی و مدیریتی در کشتار دام، آلودگی میکروبی لاشه به طور وسیعی رخ نداده است، ولی با اصلاح روش کشتار و فرایند تولید گوشت برای ارائه گوشت با بار میکروبی در محدوده استاندارد، از طریق بکارگیری عملیات مناسب فراوری و همچنین پیاده‌سازی سیستم HACCP می‌توان شرایط بهداشتی لاشه را ارتقاء داد. مطابق با استاندارد یاد شده، تعداد اشریشیا کلی می‌تواند در ۲ نمونه از ۵ نمونه مورد بررسی، بین cfu/cm250 تا ۵۰۰ باشد. در این مطالعه، ۱۲ نمونه از ۴۵ نمونه مربوط به کشتارگاه (۲۶/۶۷ درصد) حاوی اشریشیا کلی بودند. در همه نمونه‌ها میزان اشریشیا کلی در محدوده استاندارد ملی ایران بود. مطابق استاندارد میکروبیولوژی گوشت قرمز، در ۲۵ گرم یا سانتی‌متر مربع از نمونه مورد آزمون نباید سالمونلا جدا شود؛ در حالی که، از ۴۵ نمونه مورد بررسی مربوط به کشتارگاه، ۳ نمونه (۶/۶۷) آلوده به سالمونلا بود. در میزان میانگین شمارش کلی میکروب‌ها و اشریشیا کلی نمونه‌های مربوط به قصابی، افزایش مشاهده گردید و این مقادیر به ترتیب به میزان log 46/1 cfu/cm2 و ۰/۳۹ افزایش یافت. مقایسه میانگین شمارش کلی میکروبی و اشریشیا کلی نمونه‌ها در دو محل کشتارگاه و قصابی با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری بین میزان متغیرها در این دو محل وجود دارد($p< ۰/۰۵$)و انتقال لاشه گاوهای کشتار شده از کشتارگاه به بازار، باعث افزایش شمارش کلی میکروبی و اشریشیا کلی می‌شود. ۲۷ نمونه از ۴۵ نمونه مربوط به بازار (۶۰ درصد) دارای بار میکروبی بیش از 5 ×104 cfu/cm2 بوده و در ۹ نمونه از این تعداد (۲۰ درصد) تعداد میکروارگانیسم‌ها بیش از 5 ×105 cfu/cm2 (بیش از حد استاندارد) مشاهده شد. ۱۴ نمونه مربوط به بازار (۳۱/۱۱ درصد) دارای اشریشیا کلی بودند. در ۴ نمونه (۸/۸۹ درصد) بیش از cfu /cm2500 اشریشیا کلی شمارش گردید. ۸/۸۹ درصد (۴ نمونه) آلودگی به سالمونلا در نمونه‌های مربوط به بازار یافت شد. جابجایی لاشه و حمل و نقل آن در شرایط نامناسب و غیر بهداشتی، دماهای بالای یخچالی و همچنین نامناسب بودن البسه کارگران حمال گوشت، عدم استفاده از دستکش و وسایل بهداشتی در قطعه‌بندی گوشت و تماس گوشت با زمین، ضمن افزایش آلودگی ثانویه، افزایش رشد میکروارگانیسم‌ها را به دنبال دارد. مطابق مقررات اروپا، لاشه گاو بلافاصله بعد از بازرسی پس از کشتار باید در سردخانه با دمای کمتر از ۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شود. اگرچه این دما رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مثل لیستریا و یرسینیا

و همچنین گروهی از میکروب‌های مولد فساد را متوقف نمی‌کند، ولی بسیاری از میکروب‌های مولد فساد، مسمومیت و عفونت را تحت تأثیر قرار داده و مانع از رشد آنها می‌شود. تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در سطح لاشه و وسعت فساد گوشت به طور مستقیم به دمای سطحی لاشه بستگی دارد. براساس همین قانون، دمای گوشت باید قبل از خروج از کشتارگاه به کمتر از ۷ درجه سانتیگراد برسد و در حین حمل و نقل و نگهداری در قصابی نیز همین شرایط دمایی حفظ گردد (۳۰-۲۷).

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که هم نحوه کشتار و آماده‌سازی لاشه گاو و هم نحوه انتقال لاشه از کشتارگاه به بازار، نیازمند بازنگری و بهبود فرایند و اجرای سیستم‌های بهداشتی نظیر HACCPو GMP می‌باشد تا وضعیت میکروبی لاشه‌ها در حد قابل قبول و استاندارد باشد. با تحقق این مهم، سلامتی مصرف‌کننده و افزایش مدت زمان ماندگاری گوشت نیز محقق خواهد شد.

سپاسگزاری

ضمن تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی با شماره ثبت ۱۴۰۴ می‌باشد.

References

1. Addis M. Major Causes of Meat Spoilage and Preservation Techniques. Food Sci Qual Manag. 2015; 41: 101- 115.

2. Kumar P, Rao J, Haribabu Y, Manjunath M. Microbiological Quality of Meat Collected from Municipal Slaughter Houses and Retail Meat Shops from Hyderabad Karnataka Region, India. APCBEE Procedia; 2014, 8: 364 – 369.

3. Ahmad M, Sarwar A, Najeeb M, Nawaz M, Anjum A, Ali M, Mansur N. Assessment of Microbial Load of Raw Meat at Abattoirs and Retail Outlets. J Animal & Plant Sci. 2013; 23(3): 745-748.

4. Algino RJ, Ingham SC, Zhu J. Survey of Antimicrobial Effects of Beef Carcass Intervention Treatments in Very Small State-Inspected Slaughter Plants. Food Micro Saft. 2007; 72 (5): 173-179.

5. Gill CO, Landers C. Effects of spray-cooling processes on the microbiological conditions of decontaminated beef carcasses. J Food Prot.2003; 66: 1247-1252.

6. Sudhakar G, Bhandare AM, Paturkar V, Waskar S, Zende RJ. Bacteriological screening of environmental sources of contaminationin an abattoir and the meat shops in Mumbai, India.As. Ind j food agric. 2009; 2(3): 277-287.

7. Cerveny J, Meyer JD, Hall PA. Microbiological Spoilage of Meat and Poultry Products in: Compendium of the Microbiological Spoilage, Of Foods and Beverages. Food Microbiology and Food Safety, WH. Sperber and MP. Doyle (Eds.). NewYork: Springer Science and Business Media; 2009, p: 69- 868.

8. Sulley MS. The hygienic standard of meat handling in the Tamale metropolis. B.Sc. Dissertation. University for Development Studies of Tamale. 2006; p: 23-29.

9. Selvan P, Narendra R, Babu S, Sureshkumar V. Microbial Quality of Retail Meat Products Available in Chennai city. American j Food Tech. 2007; 2 (1): 55-59.

10. Chambers PG, Grandin T, Heinz G, Srisuvan T. Guidelines for humane handling, transport and slaughter of livestock. RAP Publication; 2001, p: 6-80.

11. Heinz G, and Hautzinger p. Meat Processing Technology for Small to Medium Scale Producers. FAO, Bangkok. RAP Publication; 2007, p: 20-98

12. Bell RG. Distribution and sources of microbial contam ination on beef carcasses. J Appl micro. 1997; 82: 292-30011. Heinz G, Hautzinger P. Meat Processing Technology. For Small-To Medium scale Producers. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific; 2007, P: 45-117.

13. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 5272-1 and2. Microbiology of the food chain —Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.2015 1st. Edition.

14. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 2946. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Detection and enumeration of presumptive Escherichia coli -Most probable number technique. 2006. 2nd. Edition.

15. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 1810. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 2015. 4th. Revision.

16. McEvoy JM, McDoherty AB, Sheridan JJ. Contamination of carcasses during hide removal and use of a test bacterial decontamination system on beef hide. The National Food Center; 2000, Research Report No: 25.

17. Adzitey F. Abdul-Aziz A, Moses O. Microbial Quality of Beef in the Yendi Municipality of Ghana. Global J Ani Sci Res. 2014; 2(1): 607-614.

18. Mukhopadhyay HK, Pillai RM, Pal UK, Ajay VJ. Microbial quality of fresh chevon and beef in retail outlets of Pondicherry Tamilnadu. J Vet Ani Sci. 2009; 5(1): 33-36.

19. Arthur TM, Bosilevac JM, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, Kent MP, *et al.* *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, enterobacteriaceae, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. J Food Prot. 2004; 67: 658-665.

20. Koohdar VA. Study of beef carcass bacterial contamination in Karajrak slaughterhouse. J. Food Hyg. 2013; 3 (10): 43- 51.

21. Bohaychuk VM, Gensler GE, Barrios PR. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. Can Vet J. 2011; 52: 1095-1100.

22. Ali NH, Farooqui A, Khan AY, Kazmi SU. Microbial contamination of raw meat and its environment in retail shops in Karachi, Pakistan. J Infec Develo C*ont*. 2010; 4: 382-388.

23. Bhandare SG, Sherikar A T, Paturkar AM, Waskar VS, Zende RJ. A comparison of microbial contamination of sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. Food Contr. 2007; 18: 854-868.

24. Haneklaus AN. Challenges of pathogen control in beef cattle production and processing in South Texas. PhD thesis, Texas A&M University. 2013.

25. Bogere P, Angubua Baluka S. Microbiological Quality of Meat at the Abattoir and Butchery Levels in Kampala City, Uganda. Int J Food Saft. 2014; 16: 29-35

26. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 2394. Microbiology red meat - Carcasses, minced red meat - Specifications and test methods.2008. 1st. Revision.

27. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. Euro food saft auth J. 2015; 13(1): 3991.

28. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals). Euro food saft auth J. 2013b; 11(6): 3266.

29. Savell JW, Mueller SL, Baird BE. The chilling of carcasses. Meat Sci. 2005; 70: 449-459.

30. TNO (Netherlands Organisation for Applied Scientific Research). Analysis of temperature profiles of beef and veal carcasses in cooling cells and trucks. Report R11286. TNO innovation for life, 2013; p: 54.

Study on Microbial Quality of Beef Meat at the Slaughterhouse and Some Butcheries in Tehran

Ehsan Norozi[1], Valiollah Koohdar[2]*

1- Graduated student, College of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2- Assistant professor, Department of Food Hygiene and Control, College of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Receive: December 19, 2018; Revise: January 30, 2019; Accept: February 6, 2019

Summary

Meat is one of the perishable foods that can be contaminated and spoiled fast, if the process of production and transportation are inappropriate. Contaminated meat has been implicated in many cases of foodborne illnesses. In this study; neck, flank and rump sites of 15 beef carcasses were sampled with indirect swabbing method. Obtained Samples from final washing stage in slaughterhouse (n=45) and butcheries (n=45) were analyzed for microbial load and the effect of transportation on microbial quality were studied. In slaughterhouse, rump and neck muscles with 4.90±0.45 and 4.21±0.20 log cfu/cm^2 were the highest and lowest contaminated areas for Total Viable Count, respectively; but in butcheries, flank and rump with 6.16±0.25 and 5.92±0.24 log cfu/cm^2 were the highest and lowest contaminated areas for Total Viable Count, respectively. The most contaminated area for *E coli* count in slaughter-house and butchers were rump with 1.73±0.63 and 2.14±0.06 log cfu/cm^2, respectively. 26.67% and 6.67% of slaughterhouse samples and 31.11% and 8.89% of butcheries samples were positive for *E. coli* and *Salmonella*, respectively. There were significant differences ($p< 0.05$) between the mean of Total Viable Count and *E coli* count of the abattoir and butcheries samples. According to the results, good hygienic practices should be used in beef slaughtering and transportation of meat.

Key words: *E coli, Salmonella, slaughterhouse, butchery, beef meat*

شناسایی و تایپینگ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از موارد ورم پستان بالینی گاوی در شهرستان سنندج بر اساس آنالیز PCR-RFLP ژن *aroA*

سعید خانی[۱]، الهام احمدی*[۲]

۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

دریافت مقاله: ۲۴ آذر ۱۳۹۶، بازنگری: ۱۴ دی ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۲ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم پستان عفونی در دام‌های اهلی است. به دلیل وجود سویه‌های متعدد *استافیلوکوکوس اورئوس* و تفاوت‌های سویه‌ای در بازآرایی آلل‌های کروموزمی، روش‌های ژنوتایپینگ متفاوتی همچون آنالیز DNA کروموزمی توسط هضم آنزیمی به منظور تایپینگ ژنتیکی باکتری معرفی شده‌اند. در بررسی حاضر، برای اولین بار تنوع ژنتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان بالینی گاوی در شهرستان سنندج بر اساس آنالیز PCR-RFLP ژن *aroA* ارزیابی گردید. در این تحقیق تعداد ۱۲۰ نمونه شیر ورم پستان گاوی به روش استریل جمع‌آوری و بررسی گردید. *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده به روش کشت و آزمایشات روتین باکتریولوژیکی، با روش PCR مبتنی بر ژن *aroA* آنالیز شد. قطعه حاصل از تکثیر با اندازه ۱۱۵۳ جفت باز توسط آنزیم تعیین حدودی *TaqI* هضم و قطعات ایجاد شده الکتروفورز شدند. ۲۸ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش فنوتیپی جداسازی و قطعه مورد نظر در تمام جدایه‌ها مشاهده شد. در هضم آنزیمی، دو نوع الگوی هضم قابل نام‌گذاری براساس مطالعات قبلی ایجاد شد. ژنوتیپ B در ۲۳ مورد (۸۲ درصد) و ژنوتیپ N در پنج مورد (۱۸ درصد) شناسایی شد. نتایج نشان می‌دهند که *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد ورم پستان بالینی در سنندج دخیل بوده و علیرغم وجود ژنوتیپ‌های محدود، تنوع سویه‌ای در جدایه‌های این باکتری در منطقه وجود دارد. عدم شناسایی ژنوتیپ جهانی A و نیز ژنوتیپ اختصاصی باکتری در سنندج، برای اولین بار گزارش می‌شود.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، سنندج، ورم پستان گاوی، aroA ، PCR-RFLP*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: elham.ahmadi.vet@gmail.com

مقدمه

ورم پستان گاو در سرتاسر جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گاوهای شیری قلمداد می‌گردد که به دلیل کاهش مقدار تولید شیر و نیز افت کیفیت آن و همچنین تهدید سلامت دام و انسان باعث ایجاد خسارت اقتصادی گسترده می‌شود. اگرچه باکتری‌های فراوانی می‌توانند باعث ایجاد این بیماری شوند، *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل عفونی ورم پستان است که پس از سازگار شدن با بافت غده، به سرعت تکثیر یافته و به دلیل ایجاد واکنش‌های التهابی به آسیب بافتی منجر می‌شود (۱). شیوع بیماری در یک گله اغلب توسط یک سویه باکتری ایجاد و به شیوع بعدی بیماری در بین همان گونه دامی و در همان منطقه می‌انجامد.

در این شرایط جداسازی و شناسایی سویه درگیر به منظور شروع درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب، از ضرورت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. اگرچه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سخت رشد نبوده و به راحتی قابل کشت و جداسازی است، با این وجود به دلیل وجود سویه‌های متعدد باکتری و تفاوت‌های سویه‌ای در بازآرایی آلل‌های کروموزومی و محتوای عوامل ژنتیکی کمکی متغیر، روش‌های سریع و اختصاصی مبتنی بر DNA توسعه یافته‌اند (۲). در سال‌های اخیر آنالیز چندشکلی طولی قطعات برشی (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) ژنوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* متعاقب تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) به‌طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی و تایپینگ باکتری معرفی شده‌اند (۲، ۳).

ژن *aroA* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مسئول سنتز آنزیم ۵- انول پیرووبل شیکیمات ۳- فسفات سنتاز (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate: EPSP synthase) به عنوان ششمین آنزیم کلیدی در چرخه هفت مرحله‌ای سنتز اسید آمینه‌های آروماتیک (شیکیمات) است. این آنزیم با کاتالیز نمودن فسفوانول پیروات (phosphoenolpyruvate: PEP) و شیکیمات-۳- فسفات (shikimate-3-phosphate: S3P) آنرا به ۵- انول پیرووبل شیکیمات ۳- فسفات (۵- enolpyruvylshikimate 3-phosphate: EPSP) و فسفات غیرآلی تبدیل می‌کند. دو نوع آنزیم EPSPS با تشابه اسید آمینه‌ای کمتر از ۵۰ درصد شناسایی شده است. کلاس I به طور طبیعی نسبت به آنزیم گلیفوزات (glyphosate) که معمولاً در گیاهان و باکتری‌ها قابل شناسایی است حساس می‌باشد. برعکس، آنزیم EPSPS کلاس II دارای تحمل طبیعی نسبت به گلیفوزات بوده و میل پیوندی بالایی برای PEP دارا است (۴). به دلیل وجود موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن *aroA*، جایگاه شکست آن در سویه‌های مختلف باکتری برای آنزیم آندونوکلئاز تعیین حدودی *TaqI* متفاوت است و در نتیجه الگوهای حاصل از هضم آنزیمی ژن می‌تواند به عنوان ابزاری بسیار مناسب جهت ژنوتایپینگ این باکتری باشد. از سوی دیگر تایپینگ مولکولی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند در توسعه برنامه‌های کنترلی جامع ورم پستان، ردیابی منبع عفونت و نیز راه‌های انتشار آن حائز اهمیت باشد (۵). این روش برای اولین بار توسط Marcos و همکاران (۵) به منظور شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گرفت. براساس تحقیق آنها نشان داده شد که می‌توان از روش تکثیر ژن *aroA* به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای تشخیص این باکتری بهره جست. همچنین El-Huneidi و همکاران در کشور عمان (۶) و دستمالچی و همکاران در شمال غرب ایران (۷) از روش تکثیر ژن *aroA* به منظور ژنوتایپینگ

جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از موارد ورم پستان گاوی استفاده نمودند. طالبی ساعتلو و همکاران (۸) تکثیر ژن *aroA* را به منظور تایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های پوست و دستگاه ادراری انسان مورد استفاده قرار داده‌اند. با توجه به عدم وجود اطلاعات در زمینه وضعیت ژنوتیپی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مسبب ورم پستان در شهرستان سنندج، در این مطالعه از تایپینگ ژن *aroA* به منظور تفریق سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان گاوی در گله‌های سطح شهرستان استفاده گردیده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری، جداسازی و شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس: در این تحقیق مشاهده‌ای-مقطعی تعداد ۱۲۰ نمونه شیر ورم پستانی در بازه زمانی شش ماهه، از دی ماه ۱۳۹۵ تا خرداد ۱۳۹۶ از گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان بالینی حاد در اواسط دوره شیرواری و در شهرستان سنندج جمع‌آوری و شماره‌گذاری گردید. انتخاب دام‌ها براساس وجود ورم پستان بالینی به دنبال مشاهده و لمس غدد پستان، وجود لخته خون و یا چرک در شیر و نیز علائم التهابی در کارتیه‌ها بود. جدول ۱ توزیع فراوانی نمونه‌های شیر ورم پستانی اخذ شده را نشان می‌دهد. قبل از نمونه‌گیری انتهای کاریته‌ها با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد استریل و چند قطره‌ی اول دور ریخته شد و سپس از هر کاریته حدود ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر در ظروف نمونه‌گیری استریل ریخته و پس از مخلوط کردن، به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج منتقل و در کوتاه‌ترین زمان ممکن کشت شدند. روش نمونه‌گیری براساس روش نمونه‌گیری استاندارد (۹) می‌باشد.

جدول ۱- توزیع فراوانی نمونه‌های شیر ورم پستانی اخذ شده در شهرستان سنندج

تعداد زایش	گاوداری صنعتی	گاوداری نیمه صنعتی
یک شکم	۱۱	۹
دو شکم	۱۴	۱۵
سه شکم	۱۳	۱۳
چهار شکم و بیشتر	۲۲	۲۳
مجموع	۶۰	۶۰

به منظور جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه شیر روی محیط برد پارکر آگار (مرک، آلمان) کشت گردید. پلیت‌ها به مدت ۳۶-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پرگنه‌های خاکستری - سیاه رنگ احاطه شده با هاله شفاف به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شدند. رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز بر روی تک‌کلنی‌های رشد یافته انجام گرفت. جدایه‌های کوکسی گرم مثبت و کاتالاز مثبت به محیط مانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند (۱۰). کلنی‌های زرد رنگ رشد یافته بر روی محیط مانیتول سالت آگار به عنوان نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در محیط تریپتیک سویا براث (مرک، آلمان) حاوی گلیسرول و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آنالیز مولکولی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس: به منظور استخراج ژنوم باکتری برای استفاده در آزمایشات مولکولی، از کیت استخراج DNA ژنومی باکتری‌های گرم مثبت شرکت سیناژن (تهران، ایران) و براساس پروتکل شرکت سازنده استفاده شد.

آزمون PCR برای تأیید تشخیص باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* براساس تکثیر ژن *aroA* و با استفاده از جفت پرایمر با توالی Forward primer: 5′-AAG GGC GAA ATA GAA GTG CCG GGC-3′ متناظر با نوکلئوتیدهای ۶۳-۴۰ و Reverse primer: 5′-CAC AAG CAA CTG CAA GCA T -3′متناظر با نوکلئوتیدهای ۱۱۹۲-۱۱۷۴ انجام شد (۵). سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) و واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر(BioRad, T100 (USA صورت گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط مادر X۲ (سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای آغازگر، دو میکرولیتر DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ نانوگرم و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه دوبار تقطیر آماده شد. چرخه دمایی واکنش تکثیر ژن*aroA* شامل مراحل دناتوریزاسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه، ۴۰ سیکل تکرار مراحل دناتوریزاسیون در ۹۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک و نیم دقیقه، و مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود (۵). الکتروفورز محصول حاصل از تکثیر بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با SYBRSafe (اینویتروژن، آلمان) و در حضور ۱۰۰ bp plus DNA ladder (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. کنترل مثبت مورد استفاده، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه استاندارد ATCC 29213 و کنترل منفی مخلوط مادر فاقد DNA است.

به منظور هضم آنزیمی محصول حاصل از تکثیر ژن *aroA*، براساس پروتکل شرکت سازنده، مقدار ۱۰ میکرولیتر محصول PCR با مقدار یک میکرولیتر آنزیم*TaqI* Fast digest (سیناژن، ایران) مجاور و به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از پایان مدت زمان انکوباسیون، محصول هضم شده مجددا بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با SYBR Safe در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. در این مرحله از loading dye اختصاصی همراه آنزیم (سیناژن، ایران) به منظور الکتروفورز محصولات هضم‌شده استفاده شد، به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از محصول با ۱ میکرولیتر ازloading dye مخلوط و به هر چاهک منتقل گردید. در الگوی هضم A، پنج باند با اندازه ۵۳۶، ۲۵۴، ۲۴۴، ۸۲ و ۳۲ جفت بازی، در الگوی هضم B، چهار قطعه ۵۳۶، ۳۴۱، ۲۴۴ و ۳۲ جفت بازی، در الگوی هضم C، چهار قطعه ۵۳۶، ۴۹۹، ۸۷ و ۳۲ جفت بازی و در الگوی D، پنج باند ۳۰۰، ۳۴۱، ۲۴۴، ۲۲۰ و ۵۰ جفت بازی ایجاد می‌گردد (۵). الگوی N دارای پنج قطعه ۲۹۷، ۲۵۹، ۲۵۴، ۲۴۴ و ۸۷ جفت بازی است که چون سه قطعه ۲۵۹، ۲۵۴ و ۲۴۴ جفت بازی به صورت یک باند ظاهر می‌شوند ، لذا در نهایت سه باند مشخص در الگوی N به دست می‌آید (۶). در الگوی H که متشکل از چهار قطعه ۵۶۸، ۲۵۴، ۲۴۴ و ۸۷ جفت بازی است، از آن جائی که قطعات ۲۵۴ و ۲۴۴ جفت بازی، به صورت یک باند واحد ظاهر می‌شوند، لذا در مجموع سه باند مشخص مشاهده می‌گردد (۷).

آنالیز آماری داده‌ها: در نهایت، برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین متغیرهای تعداد زایش و نوع گاوداری با میزان شیوع ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز الگوهای RFLP به دست آمده، از نرم افزار SPSS (version 21.0) و آزمون کای اسکوئر استفاده گردید. سطح معنی‌داری به صورت $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج جداسازی و شناسایی باکتری

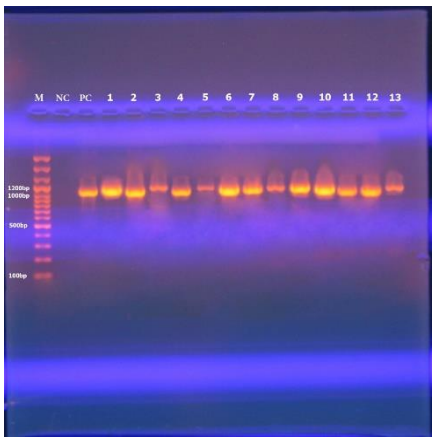
استافیلوکوکوس اورئوس: به دنبال کشت نمونه‌های شیر ورم پستانی جمع‌آوری شده از دامداری‌های صنعتی شهرستان سنندج، از مجموع ۱۲۰ نمونه شیر آلوده، تعداد ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با توجه به خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی آنها جداسازی شد. توزیع فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با توجه به متغیرهای تعداد زایش و نوع گاوداری صنعتی و نیمه‌صنعتی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- توزیع فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر ورم پستانی در شهرستان سنندج

تعداد زایش	گاوداری صنعتی	گاوداری نیمه‌صنعتی
یک شکم	۲	۱
دو شکم	۱	۲
سه شکم	۲	۵
چهار شکم و بیشتر	۶	۹
مجموع	۱۱	۱۷

نتایج آنالیز مولکولی جدایه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس: در تکثیر PCR ژن *aroA* با استفاده از جفت پرایمرهای مذکور و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، باند ۱۱۵۳ جفت بازی مورد انتظار در تمام ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید (تصویر ۱).

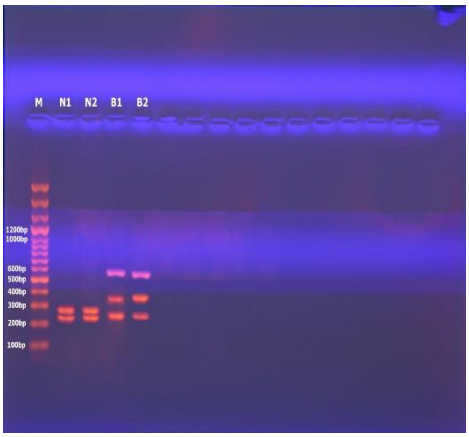


تصویر ۱- تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *aroA*. **M: 100bp plus DNA ladder** (سیناژن، ایران)، **NC**: کنترل منفی، **PC**: کنترل مثبت، ۱۳-۱: محصول **PCR** با اندازه تقریبی ۱۱۵۳ جفت باز در نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر ورم پستانی

در هضم آنزیمی محصول ۱۱۵۳ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *aroA* توسط آنزیم اندونوکلئاز *TaqI*، دو الگوی هضم RFLP مجزا در مجموع ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمد که براساس سیستم ژنوتایپینگ Marcos و همکاران (۵) و El-Huneidi و همکاران (۶) مشخص گردید که ۸۲ درصد جدایه‌ها (۲۳ نمونه) دارای ژنوتیپ B و ۱۸ درصد جدایه‌ها (پنج نمونه) دارای

ژنوتیپ N بودند (تصویر ۲). توزیع فراوانی الگوهای RFLP حاصل از هضم آنزیمی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط آنزیم *TaqI* با توجه به متغیرهای تعداد زایش و نوع گاوداری صنعتی و نیمه‌صنعتی در جدول ۳ نشان داده شده است.

آنالیز آماری داده‌ها: در بررسی آماری نتایج به دست آمده توسط آزمون کای اسکوئر مشخص گردید که با توجه به مقدار P بزرگتر از ۰/۰۵، بین میزان فراوانی ورم پستان ناشی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با نوع گاوداری (P=0.074) و همچنین بین میزان شیوع این نوع ورم پستان با تعداد زایش در دام (P=0.614) اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد. به علاوه، بین توزیع فراوانی الگوهای RFLP حاصل از هضم آنزیمی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر ورم پستانی با نوع گاوداری اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نگردید (P=0.087)، در حالی‌که این اختلاف بین الگوهای RFLP و تعداد زایش معنی‌دار بود (P=0.032).



تصویر ۲- محصول هضم آنزیمی حاصل از تکثیر ژن *aroA* توسط آنزیم اندونوکلئاز *TaqI*. M: نردبان ژنتیکی ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن، ایران)، N1 و N2: الگوی هضم آنزیمی N، B1 و B2: الگوی هضم آنزیمی B.

جدول ۳- توزیع فراوانی الگوهای RFLP حاصل از هضم آنزیمی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر ورم پستانی در شهرستان سنندج

تعداد زایش	گاوداری صنعتی	گاوداری نیمه صنعتی
یک شکم	N=۱ B=۱	N=۱
دو شکم	N=۱	N=۲
سه شکم	B=۲	B=۵
چهار شکم و بیشتر	B=۶	B=۹
مجموع	N=۲ B=۹	N=۳ B=۱۴

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از متداول‌ترین عوامل عفونی ایجاد کننده عفونت‌های بافت پستان در دام‌های اهلی بوده و باعث بروز خسارت اقتصادی گسترده در صنعت دامپروری می‌گردد. این باکتری بر روی پوست سرپستانک و یا در داخل کانال پستانی وجود داشته و در صورت ایجاد شرایط مساعد باعث بروز بیماری ورم پستان با منشأ درون‌زاد می‌گردد. همچنین از طریق دستگاه شیردوشی، فومیت‌ها، حوله مورد

استفاده برای خشک کردن سرپستانک‌ها، دست شیردوش و غیره از دام مبتلا به دام‌های سالم منتقل و باعث اشاعه بیماری در گله با منشأ برون‌زاد می‌شود (۱۱). هدف از تحقیق حاضر ژنوتایپینگ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان بالینی گاوی در شهرستان سنندج براساس الگوهای هضم ژن *aroA* بود.

نتایج برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که ورم پستان گاوی تنها توسط سویه‌های خاص و محدودی با پراکندگی جهانی ایجاد می‌شوند (۱۲، ۲)، در حالی که برخی دیگر از مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های ایجاد کننده ورم پستان عمدتاً دارای محدودیت به هر منطقه و حتی گله خاص هستند (۱۳). سیستم تایپینگ براساس محصول PCR، همچون آنالیز PCR-RLFP ژن*aroA* به دلیل سادگی و سرعت انجام می‌تواند به عنوان یکی از مؤثرترین روش‌ها برای شناسایی و ژنوتایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد (۵).

در این مطالعه از مجموع ۱۲۰ نمونه ورم پستان جمع‌آوری شده از موارد ورم پستان گاوی از گاوداری‌های صنعتی شهرستان سنندج، تعداد ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش فنوتیپی شناسایی و براساس روش مولکولی تکثیر ژن *aroA* مورد تأیید قرار گرفت به گونه‌ای که قطعه ۱۱۵۳ جفت بازی مورد انتظار در تمام جدایه‌ها به‌دست آمد.

به دنبال هضم آنزیمی محصولات حاصل از تکثیر ژن*aroA* توسط آنزیم *TaqI* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشأ شیر ورم پستانی گاو و گوسفند در شمال غرب اسپانیا توسط Marcos و همکاران چهار الگوی هضم A، B، C و D به‌دست آمد (۵). در مطالعه El-Huneidi و همکاران بر روی ژنوتایپینگ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم پستان گاوی در عمان براساس سیستم ژنوتایپینگ Marcos و همکاران (۱۹۹۹) فقط الگوهای A و B مشاهده و ژنوتیپ‌های C و D در هیچ یک از جدایه‌های مورد مطالعه مشاهده نشدند (۶). با این وجود ۵۰ درصد جدایه‌های مورد مطالعه آنها از سیستم ژنوتایپینگ Marcos و همکاران (۵) تبعیت نکرده و به دنبال هضم آنزیمی محصول تکثیر ژن *aroA* توسط آنزیم *TaqI* الگوی جدیدی به عنوان N (از کلمه novel به معنی جدید گرفته شده است) مشاهده شد (۶). در مطالعات دستمالچی و همکاران (۷) به منظور ژنوتایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان گاوی در شمال غرب ایران علاوه بر الگوهای A و B براساس سیستم Marcos و همکاران (۵) و الگوی N براساس سیستم El-Huneidi و همکاران (۶)، الگوی جدیدی به نام H مشاهده گردید. در مطالعه طالبی ساعتلو و همکاران (۸) نیز الگوهای A و B براساس سیستم Marcos و همکاران (۵) و الگوی N براساس سیستم El-Huneidi و همکاران (۶) و الگویH براساس سیستم دستمالچی و همکاران (۷) به دست آمد. در تحقیق حاضر، به دنبال تکثیر ژن *aroA* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان گاو و استفاده از آنزیم تعیین حدودی *TaqI*، براساس سیستم‌های معرفی شده مورد اشاره، الگوهای B و N مشاهده گردید. مطالعات Marcos و همکاران نشان داد که ۳۹ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* متعلق به تیپ A، ۱۳ درصد متعلق به تیپ B، ۳ درصد متعلق به تیپ C و ۴۴ درصد متعلق به تیپ D بودند (۵). در مطالعات El-Huneidi و همکاران، ۳۹ درصد جدایه‌ها دارای ژنوتیپ A، ۱۱ درصد جدایه‌ها دارای ژنوتیپ B و ۵۰ درصد جدایه‌ها دارای ژنوتیپ N بودند (۶). در مطالعات دستمالچی و همکاران (۷) ژنوتیپ‌هایA و B در مجموع دارای بیشترین

فراوانی با۴۱ درصد در مورد ژنوتیپ Aو ۵۰ درصد در مورد ژنوتیپ B بودند. در ۷ درصد جدایه‌ها ژنوتیپ H و در ۲ درصد جدایه‌ها ژنوتیپ N مشاهده گردید. طالبی ساعتلو و همکاران (۸) نشان دادند که در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری و پوست در انسان، تیپ N دارای بیشترین فراوانی (۸۱ درصد) بوده و پس از آن تیپ‌های B (۸ درصد) و H (۸ درصد) و تیپ A (۴ درصد) قرار دارند. در این مطالعه در مجموع ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان بالینی گاوی تیپ B در ۲۳ مورد (۸۲ درصد) و تیپ N در پنج مورد (۱۸ درصد) مشاهده گردید. ژنوتیپ‌های C، D، A وH در هیچ‌کدام از جدایه‌ها وجود نداشت. مقایسه نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، تحقیقات Marcos و همکاران (۵)، El-Huneidi و همکاران (۶)، و دستمالچی و همکاران (۷) با نتایج به دست آمده از مطالعه طالبی ساعتلو و همکاران (۸) نشان می‌دهند که احتمال فراوانی ژنوتیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کننده عفونت‌های بافت پستان گاو در مناطق مورد مطالعه با فراوانی ژنوتیپ‌های غالب *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های انسانی کاملا متفاوت است. یک احتمال برای این مسأله این است که ماهیت ژنتیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد بیماری در بافت‌ها و نیز میزبان‌های مختلف مؤثر است، به این ترتیب که ظاهراً ماهیت ژن‌های حدت بیان شده در یک سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور اولیه به عنوان نوعی عامل تعیین‌کننده مهم در اختصاصیت میزبان و حتی بافت مورد تهاجم عمل می‌کنند (۱۴). همچنین آنالیز ژنتیک جمعیت نیز شواهد قوی از اختصاصیت میزبانی کلون‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* درگیر در موارد عفونت‌های استافیلوکوکوسی انسان و نشخوارکنندگان را نشان می‌دهند (۱۵). اگرچه بررسی اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌ها با تعداد زایش در دام در هیچ مطالعه‌ی دیگری انجام نگرفته است، با این وجود در تحقیق حاضر فراوانی ژنوتیپ N محدود به دام‌های با تعداد زایش یک یا دو و فراوانی ژنوتیپ B به‌طور غالب در دام‌های با تعداد زایش بیش از دو شکم مشاهده گردید. این یافته تا حدودی نشان می‌دهد که علاوه بر ژنتیک و فاکتورهای حدت باکتری، شرایط میزبان نیز در کلونیزه شدن و ایجاد بیماری توسط این جرم مؤثر است.

اگرچه نتایج به دست آمده از این تحقیق محدود به منطقه‌ی جغرافیایی خاصی است، با این وجود، یافته‌های سایر محققین را تأیید می‌کند که تنها ژنوتیپ‌های محدودی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد ورم پستان بالینی گاو درگیر می‌باشند (۱۶). از سوی دیگر، نتایج سایر مطالعات نشان می‌دهند که ژنوتیپ‌های H وN به ندرت از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در موارد ورم پستان گاوی جدا می‌گردند و ژنوتیپ‌های A و B دارای بیشترین فراوانی هستند. نکته جالب اینکه برخلاف سایر مطالعات، ژنوتیپ A در بین هیچ یک از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد ورم پستان گاوی در منطقه سنندج یافت نگردید. اگرچه براساس نتایج سایر محققین این ژنوتیپ در همراهی با ژنوتیپ B، بیشترین عادت یافتگی به بافت پستان گاو را دارد، اما به دلیل وجود تفاوت در تغییرات ژنتیکی ناشی از جهش‌های نقطه‌ای در ژن *aroA* در هر منطقه نسبت به مناطق دیگر (۱۴)، ژنوتیپ A در این مطالعه یافت نشد. با این وجود در مجموع نمی‌توان این نکته را نادیده گرفت که پراکندگی وسیع جغرافیایی در مورد این ژنوتیپ‌ها وجود دارد.

نتیجه‌گیری کلی این‌که ژنوتیپ‌های B و N در ژن *aroA* جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

ایجادکننده ورم پستان در گاو در شهرستان سنندج شناسایی شد. وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین شیوع ژنوتیپ‌ها با تعداد زایش در دام، بیانگر نقش احتمالی شرایط فیزیولوژیکی دام در روند بیماری‌زایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در موارد ورم پستان بالینی است. وجود تنوع ژنتیکی محدودتر به دلیل عدم شناسایی ژنوتیپ‌های A و H گزارش شده از سایر تحقیقات و نیز ژنوتیپ اختصاصی منطقه، برای اولین بار در این مطالعه مشاهده گردید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاران محترم در آزمایشگاه میکروبیولوژی و تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج قدردانی می‌شود. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی به شماره ثبت ۹۴/۱۲۹۰ر-د-د می‌باشد. همچنین بین نویسندگان و نیز با هیچ مؤسسه یا ارگان دولتی و خصوصی تعارض منافع وجود ندارد.

References

1- Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goat sand sheep. Vet Microbiol. 2004; 101(1):101-107.

2- El-Seedy FR, El-Shabrawy M, Hakim AS, Dorgham SM, Ata SN, Bakry MA, *et al.* Recent techniques used for isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from mastitic cows. J Am Sci 2010; 6(12):701-708.

3- Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J Dairy Sci. 2005; 88:3149-3154.

4- Cascon AS, Anguita JC, Hernanz CM, Sa´nchez MS, Yugueros JM, Naharro GC. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol Lett. 1997; 156:199-204.

5- Marcos JY, Soriano AC, Sa´nchez MS, Moral CH, Ramos SS, Smeltzer MS, *et al.* Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. J Clin Microbiol. 1999; 37:570-574.

6- EL-Huneidi W, Bdour S, Mauasnen A. Detection of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* and of a novel *aroA* in Jordanian clinical isolates of *staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; 56:127-132.

7- Dastmalchi HS, Ahmadi M, Mardani K, Batavani RA. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on PCR-RFLP analysis of the *aroA* gene. Comp Clin Path. 2010; 19:163-168.

8- Talebi-Satlou R, Ahmadi M, Ghavam F, Dastmalchi HS. Use of 5- enolpyruvylshikmate-3phosphate synthase encoding gene for typing of *Staphylococcus aureus* isolated from skin and urinary tract Infections of human. Iran J Basic Med Sci. 2012; 15:975-982.

9- Hope AF. Laboratory handbook on bovine mastitis. 1st ed. Madison, Wisconsin: National Mastitis Council (NMC); 1999. p. 113-123.

10- Quinn PJ, Markey Bk, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maguire D. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 1st Ed. New York: Blackwell Science; 2002. p. 315-328.

11- Bhati T, Nathawat P, Sharma SK, Yadav R, Bishnoi J, Kataria AK. Polymorphism in *spa* gene of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. Vet World. 2016; 9(4):421-424.

12- Bendahou A, Lebbadi M, Ennanei L, Essadqui F, Abid M. Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products in North Morocco. J Infect Dev Ctries. 2008; 2:218-225.

13- Sasidharan S, Prema B, Yoga LL. Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. Asian Pac J Trop Biomed. 2011; 1(2):130-132.

14- Van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM, Snijders SV, *et al.* Host and tissue-specific pathogenic traits of *staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2005; 187:4584-4591.

15- De Oliveira LP, Soares e Barros LS, Silva VC, Cirqueira MG. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. Journal of Food Processing and Technology. 2011; 2(6):128-132.

16- Huijps K, Lam TJ, Hogeveen H. Costs of mastitis: facts and perception. J Dairy Res. 2008; 75:113-120.

Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Bovine Mastitis in Sanandaj City Using PCR-RFLP Analysis of the *aroA* Gene

Saeid Khani [1], Elham Ahmadi *[2]

1 - Undergraduate Student of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj
2 - Department of Veterinary Pathobiology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj

Receive: December 15, 2017; Revise: January 4, 2018; Accept: March 3, 2018

Summary

Staphylococcus aureus is one of the most important causes of contagious mastitis in domestic animals. Due to the existence of multiple strains of *S. aureus* and strain variations in chromosomal allelic rearrangement, different genotyping methods, such as analysis of the chromosomal DNA following the enzymatic digestion, are introduced for genetic typing of the bacterium. In the present survey, for the first time, the genetic diversity of *S. aureus* recovered from clinical bovine mastitis in Sanandaj was investigated based on PCR-RFLP analysis of the *aroA* gene. 120 bovine mastitic milk samples were collected aseptically and assessed. *S. aureus* isolated in culture and routine bacteriological methods were analyzed by *aroA* gene-based PCR. The amplicons with a size of 1153bp were digested with *Taq*I restriction enzyme and the fragments were electrophoresed. 28 *S. aureus* strains were isolated in phenotypic method among which the expected amplicon was observed in all of them. In enzymatic digestion, two RFLP patterns, nomenclatural based on the previous studies were generated. Genotype B was detected in 23 (82.14%) isolates and genotype N in 5 isolates (17.85%). The results demonstrate that *S. aureus* is involved in bovine mastitis in Sanandaj and despite the presence of limited genotypes, strain variation of this bacterium exist in the region. The presence of genotype B in all farms implies the same source of infection among farms, which should be considered in control programs of mastitis. Non-detection of universal genotype A and specific genotype of the bacterium in Sanandaj is reported for the first time.

Keywords: *aroA, Bovine mastitis, PCR-RLFP, Sanandaj, Staphylococcus aureus*

بررسی خاصیت ضد باکتریایی(in vitro) برخی گیاهان دارویی بر جدایه‌های بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیایی

علی طاهری میرقائد[۱]*، سید عبدل حبیبی[۱]، مهدی سلطانی[۱]، سهراب احمدی وند[۱]

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۲۶ آذر ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۰ بهمن ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۷ اسفند ۱۳۹۷

چکیده

استرپتوکوکوس اینیایی عامل بیماری استرپتوکوکوزیس، یک بیمارگر زئونوز است که باعث خسارات زیادی به صنعت آبزی پروری در بسیاری از کشورها از جمله ایران گردیده است. در مطالعه کنونی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن باغی(*Thymus vulgaris*)، پونه (*Mentha longiflora*) و زیره سیاه (*Carum carvi*) بر دو جدایه بیماری‌زای *استرپتوکوکوس اینیایی* با روش رقیق‌سازی در محیط مایع و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی و سپس با روش دیسک با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین مقایسه شدند. بر اساس نتایج حداقل غلظت مهار رشد (MIC) اسانس آویشن باغی، پونه و زیره سیاه برای این باکتری به ترتیب ۰/۸، ۰/۸ و ۰/۸-۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و همچنین حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) اسانس‌ها به ترتیب ۰/۸، ۱/۶ و ۱/۶میکرولیتر بر میلی‌لیتر می‌باشد. بعلاوه براساس نتایج جذب نوری روند رشد جدایه‌های باکتری با افزایش غلظت اسانس‌ها کاهش یافته به طوریکه در غلظت‌های MIC و بالاتر تقریباً رشد آنها متوقف شده است. همچنین در روش دیسک میزان قطر هاله عدم رشد ناشی از اسانس آویشن باغی به طور معنی‌داری بیشتر از دیگر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین بود. به طور خلاصه نتایج این آزمایش بیانگر خاصیت ضد باکتری مناسب آویشن باغی بوده و پیشنهاد می‌گردد برای کنترل و درمان بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلا ارزیابی گردد.

کلمات کلیدی: *اسانس گیاهی، استرپتوکوکوزیس، قزل آلا، MBC ، MIC*

* نویسنده مسئول: mirghaed@ut.ac.ir

مقدمه

استرپتوکوکوس اینیایی عامل بیماری فوق حاد و سیستمیک باکتریایی استرپتوکوکوزیس است که سبب بروز خسارات اقتصادی فراوان به صنعت آبزی پروری در بخش وسیعی از جهان از جمله ایران می‌گردد به طوری که تاکنون در بیش از ۳۰ گونه ماهیان آب شیرین، شور و لب شور گزارش شده و حتی به عنوان بیمارگر زئونوز سبب بروز عفونت درانسان نیز می‌شود (۳-۱).

استرپتوکوکوس اینیایی متعلق به جنس استرپتوکوکوس یکی از جنس‌های خانواده استرپتوکوکاسه، یک کوکسی گرم مثبت به‌صورت دو تایی یا زنجیره‌ای و گاهی چند شکلی است که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند و اغلب بی‌هوازی اختیاری و به صورت غیرمتحرک است که سویه‌های دارای کپسول از حدت بیشتری برخوردارند (۱، ۲).

استرپتوکوکوزیس می‌تواند در مدت ۳ تا ۷ روز باعث تلفات بیش از ۵۰ درصد در جمعیت‌های ماهی شود، اگرچه در بعضی موارد شیوع آن به شکل مزمن بوده و با تعدادی کمی تلفات روزانه در مدت بیش از چندین هفته همراه است (۳-۱). با این وجود خسارات و زیان‌های ناشی از این بیماری بسیار بالا می‌باشد به طوری که فقط در آمریکا خسارت سالیانه آن ۱۰ میلیون و در جهان ۱۰۰ میلیون دلار برآورد شده است (۴).

بیماری استرپتوکوکوزیس از سال ۲۰۰۲ به طور پیوسته از مزارع قزل آلای ایران نیز گزارش شده و مهم‌ترین بیماری باکتریایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss) است که تاکنون باعث بروز تلفات سنگین در مزارع پرورشی کشور شده است (۳، ۵، ۶). در حال حاضر از جمله روش‌های مرسوم مقابله با این بیماری‌ها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله انروفلوکساسین و اریترومایسین (۲) و در برخی موارد استفاده از واکسن‌ها می‌باشد (۷).

از مهم‌ترین عوامل محدودکننده استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، ظهور بیمارگرهای مقاوم به آنها در ماهی و انسان است (۸). علاوه بر این، آنتی بیوتیک‌ها سبب کشته شدن باکتری‌های مفید در لوله گوارش میزبان شده و همچنین به خاطر تجمع در محصول نهایی سبب بروز مشکلات سلامتی در مصرف‌کننده می‌گردند (۸، ۹). بنابراین یافتن راه‌های پیشگیری و درمان مناسب برای به حداقل رساندن خسارات اقتصادی ناشی از تلفات این بیماری در مزارع پرورش ماهی و نیز کاهش مشکلات ناشی از مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

در سال‌های اخیر اثرات گیاهان دارویی علیه بسیاری از بیمارگرهای باکتریایی آبزیان مورد ارزیابی قرار گرفته است و به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح می‌باشند (۱۲-۱۰). مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردار می‌باشد و به همین دلیل در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند و برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند (۱۳).

مطالعه کنونی برای ارزیابی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن باغی، پونه معطر و زیره سیاه بر جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* انجام شد. بدین منظور حداقل غلظت باکتری کشی (MIC) و حداقل غلظت مهار رشد (MBC) با استفاده از روش میکرودایلوشن تعیین و همچنین قطر هاله عدم رشد باکتری ناشی از اسانس‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین به روش دیسک کاغذی مقایسه گردید. بعلاوه الگوی رشد باکتری در غلظت‌های مختلف اسانس‌ها با استفاده از جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر ارزیابی گردید.

مواد و روش

اسانس‌ها: اسانس‌های آویشن باغی(*Thymus vulgaris*)، پونه (*Mentha longiflora*) و زیره سیاه (*Carum carvi*) مورد استفاده در این مطالعه به روش steam distillation تهیه شدند (۱۰،۱۲).

باکتری: جهت انجام بررسی کنونی ابتدا دو جدایه بیماری‌زای باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* K11 (HM055572) و Z1 (HM055574) جداسازی شده از مزارع قزل آلای کشور، از قطب بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. باکتری‌ها در شرایط استریل بر روی محیط ژلوز خون دار کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سپس از کلونی‌های رشد یافته ابتدا رنگ آمیزی گرم تهیه و پس از اطمینان از خلوص پرگنه و تعیین مورفولوژی و نوع رنگ آمیزی گرم تجدید کشت ثانویه به عمل آمد و در نهایت پرگنه‌های مناسب برای آزمایشات بعدی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. برخی مشخصات ریخت شناسی جدایه‌های باکتری در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- برخی مشخصات فنوتیپیکی جدایه‌های باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*

مشخصه باکتری	*Z1*	*K11*
شکل باکتری	کوکسی	کوکسی
گرم	+	+
کاتالاز	-	-
اکسیداز	-	-
اندول	-	-
احیاء نیترات	-	-
H_2S	-	-
VP	-	-
آرابینوز و اینوزیتول	-	-
نوع همولیز	*α*	*α*
آرژنین	+	+
سوربیتول	-	-
رشد در pH بین ۵-۹/۵	+	+
رشد در ۶/۵ درصد نمک سدیم	-	-
دمای رشد بین ۴۰-۱۵ درجه سانتی گراد	+	+

تعیین مقادیر حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC): برای تعیین حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس‌ها از روش میکرودایلوشن استفاده شد (۱۰، ۱۲، ۱۴). بدین منظور رقت‌های متوالی از اسانس‌های تهیه شده در محیط TSB و در محدوده ۱۲/۸-۰/۱ میکرولیتر بر میلی لیتر تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده با غلظت نهایی cfu/ml ۱۰۸ × ۳ (معادل یک مک فارلند) به صورت جداگانه به محیط‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون در دمای ۲۵درجه سانتیگراد ، کمترین رقتی که در آن هیچ باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظر گرفته شد. همچنین به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، در شرایط کاملاً استریل از همه لوله‌های فاقد کدورت ۱۰ میکرولیتر از لوله‌های حاوی محیط کشت برداشته و روی محیط ژلوز خون کشت داده شد، پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، MBC با

مشاهده تعداد کلونی‌ها به دست آمد (۱۰، ۱۲، ۱۴).

الگوی رشد باکتری (جذب نوری): برای مطالعه الگوی رشد باکتری‌ها، به میزان ۱۰ میکرولیتر (3×10^8 cfu/ml) از هر یک از جدایه‌ها به محیط TSB حاوی رقت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶ هر یک اسانس‌ها اضافه شد. سپس رشد باکتری‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از تلقیح در دمای ۲۵ درجه با بررسی میزان جذب نوری (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) توسط اسپکتوفتومتر بررسی شد (۱۰). یک تیمار شاهد نیز برای سنجش میزان رشد باکتری در محیط نرمال فاقد اسانس استفاده گردید.

تعیین قطر هاله عدم رشد به روش دیسک: برای مطالعه اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها بر علیه جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* از روش دیسک کاغذی استفاده شد (۱۰، ۱۲، ۱۴). بدین منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی ($1/5\times10^8$ cfu/ml، معادل نیم مک فارلند) بر روی پلیت ژلوز خون کشت داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر یک از اسانس‌ها بر روی دیسک‌های کاغذی اضافه و همراه با دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و انروفلوکساسین و بر روی محیط کشت قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. در قطر هاله عدم رشد هریک از اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بر روی جدایه‌های باکتری مورد مطالعه در ۳ تکرار بررسی و مقایسه شد.

آنالیز آماری: داده‌های به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار در سطح ۹۵ درصد ($p<0/05$) و توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

حداقل غلظت مهار رشد(MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC): نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) و نیز حداقل غلظت کشندگی(MBC) اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه بر روی جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* در جدول ۲ ارائه شده است. میزان MIC هر سه اسانس آویشن باغی و پونه برای هر دو جدایه باکتری به صورت یکسان ۰/۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به دست آمد. در حالی که میزان MIC اسانس زیره سیاه برای جدایه‌های K11 و Z1 متفاوت بوده و به ترتیب ۱/۶ و ۰/۸ میکرولیتر بر میلی لیتر اندازه گیری شد ($p<0/05$). با این وجود میزان MBC برای هر دو جدایه مشابه بوده و اسانس آویشن باغی با حداقل غلظت باکتری‌کشی ۰/۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بیشترین تاثیر را نشان داد. میزان MBC دو اسانس پونه و زیره سیاه برای هر دو جدایه باکتری به صورت مشابه ۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بوده و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با آویشن باغی نشان دادند ($p<0/05$).

الگوی رشد باکتری: اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن باغی بر الگوی رشد جدایه‌های باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در طول موج ۶۰۰ نانومتر در شکل ۱ ارائه شده است. براساس نتایج روند رشد جدایه‌های باکتری با افزایش غلظت اسانس‌ها کاسته شده به طوری که در غلظت‌های MIC و بالاتر تقریباً رشد آنها متوقف شده است. همچنین در غلظت‌های کمتر از MIC با گذشت زمان بر میزان رشد باکتری افزوده شده است. بعلاوه آویشن باغی و زیره سیاه به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را بر روند رشد جدایه‌ها نشان دادند. بعلاوه جدایه K11 کمی مقاوم‌تر از Z1 بود.

جدول ۲- حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه بر روی جدایه‌های باکتری استرپتوکوکوس اینیایی

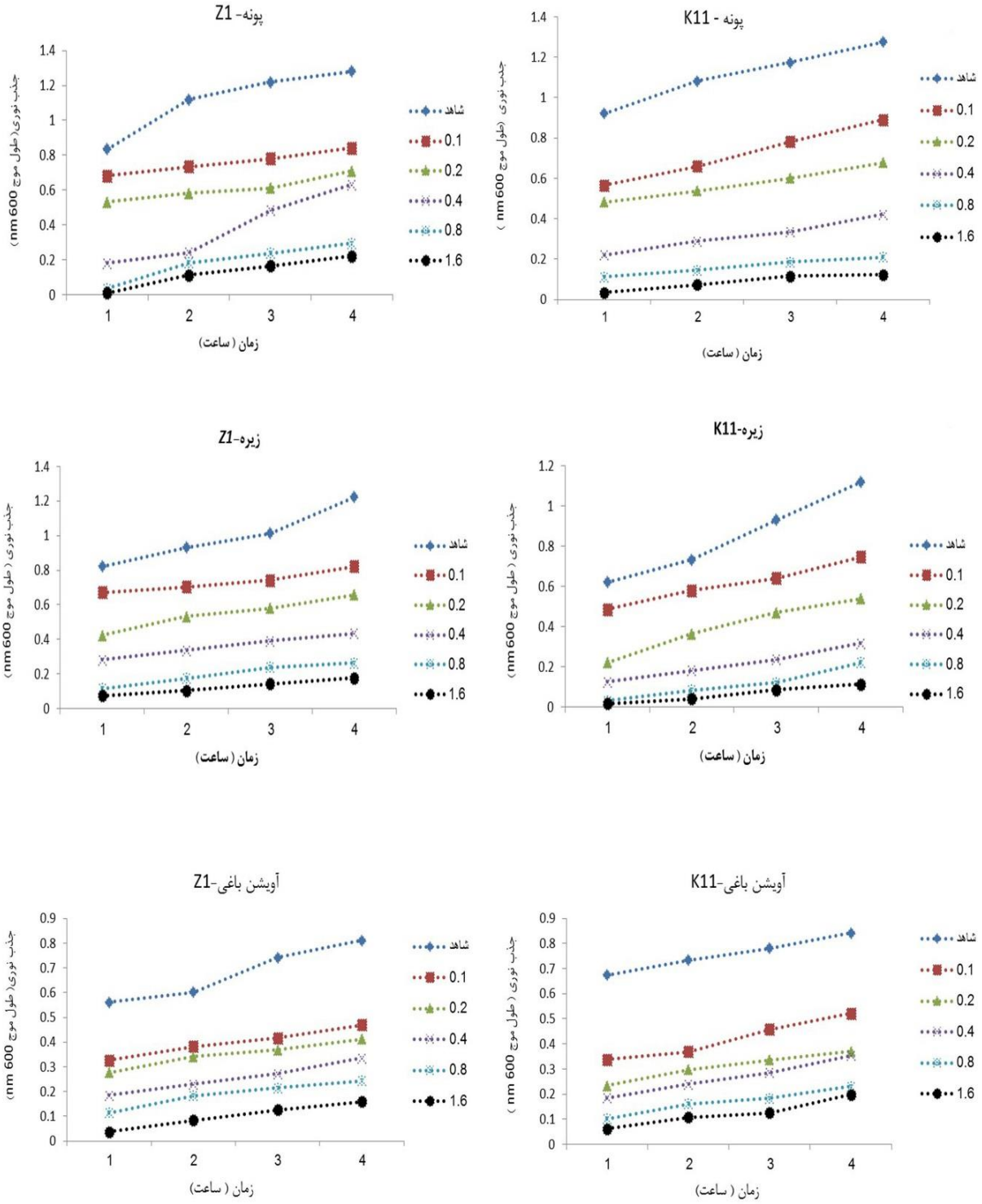
اسانس	سویه باکتری	غلظت (µl/ml)						
		۶/۴	۳/۲	۱/۶	۰/۸	۰/۴	۰/۲	۰/۱
آویشن باغی	K11	–	–	–	MIC MBC	+	+	+
	Z1	–	–	–	MIC MBC	+	+	+
پونه	K11	–	–	MBC	MIC	+	+	
	Z1	–	–	MBC	MIC	+	+	+
زیره سیاه	K11	–	–	MIC MBC	+	+	+	+
	Z1	–	–	MBC	MIC	+	+	+

علامت + و- به ترتیب نشان‌دهنده رشد و عدم رشد باکتری در حضور غلظت‌های مشخص اسانس می‌باشند.

قطر هاله عدم رشد (دیسک): نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد (روش دیسک کاغذی) جدایه‌های باکتری ناشی از هر یک از اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این آزمایش در نمودار ۲ ارائه شده است. جدایه K11 کمی مقاوم تر از جدایه Z1 بوده و قطر هاله عدم رشد کمتری داشت. همچنین اسانس آویشن باغی بیشترین فعالیت ضد باکتریایی علیه دو جدایه K11 و Z1 به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۳۸±۳ و ۴۰±۲ میلی‌متر را نشان داد که حتی کمی بیشتر از میزان به‌دست آمده برای دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین (به ترتیب ۳۰±۲/۵ و ۳۳±۱) و اریترومایسین (به ترتیب ۳۵ ±۱/۵ و ۳۶±۴) بود. در حالی که اسانس زیره سیاه با قطر هاله عدم رشد ۳۱±۴/۵ و ۳۱±۲/۵ میلی‌متر به ترتیب برای جدایه‌های K11 و Z1 کمترین فعالیت ضد باکتریایی را نشان داد. همچنین میزان قطر هاله عدم رشد ناشی از اسانس پونه برای جدایه‌های K11 و Z1 به ترتیب ۱۷±۱/۵ و ۲۳±۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

بحث و نتیجه‌گیری

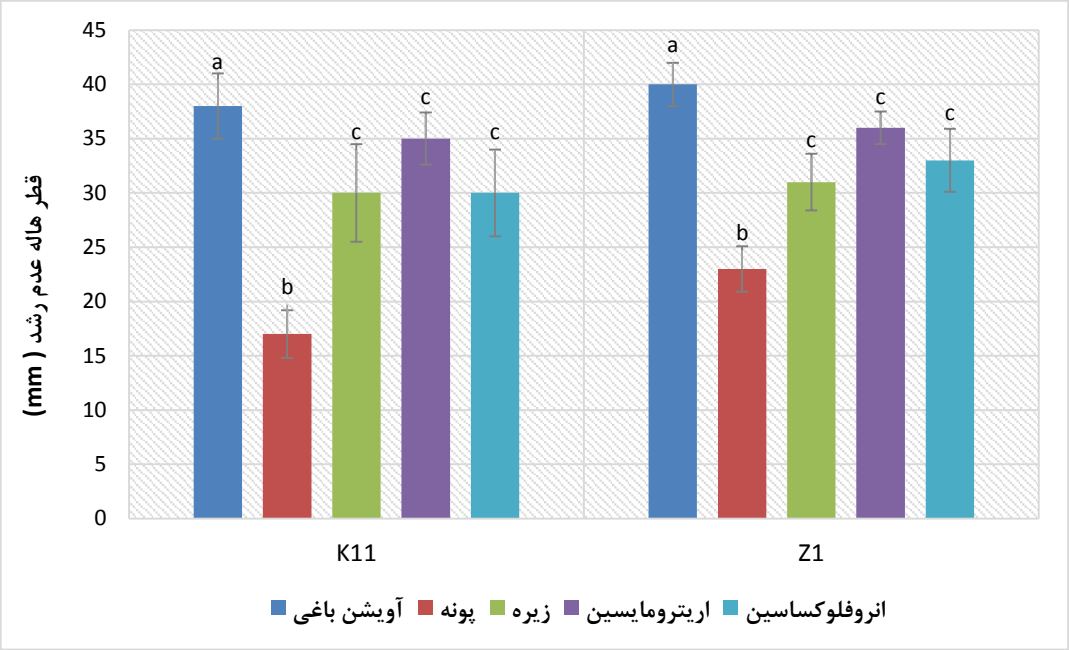
استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های آبزیان است که سبب مرگ و میر بالایی (بیش از ۷۵ درصد) می‌شود و در سطح وسیعی از جهان از جمله ایران گزارش شده است (۳-۱). باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* به عنوان اصلی‌ترین گونه بیماری‌زای مزارع قزل‌آلای کشور مطرح است که باعث خسارات زیادی شده و پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی آن ضروری می‌باشد (۳، ۵، ۶). اگرچه با استفاده از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها این بیماری هم اکنون بهبود می‌یابد، اما با توجه به مشکلات فراوان این داروها ازجمله مقاومت باکتریایی و پیامدهای زیست محیطی، تجمع آنتی‌بیوتیک در بدن ماهی و متعاقباً مصرف‌کنندگان ماهی، جایگزین نمودن گیاهان دارویی دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌تواند بسیار سودمند باشد (۲، ۱۳).



شکل۱- الگوی رشد جدایه‌های (K11 و Z1) باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جداسازی شده از ماهی قزل آلا در حضور غلظت‌های مختلف اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه در طول موج ۶۰۰ نانومتر.

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و انروفلوکساسین بررسی شد که نتایج بیانگر وجود خواص ضد باکتریایی قوی‌تر آویشن باغی نسبت به سایر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها بود. مشابه با این نتایج اثرات ضد

باکتریایی، قارچی و حتی ضد ویروسی گونه‌های مختلف گیاه آویشن به ویژه آویشن باغی در بسیاری از مطالعات in vitro نشان داده شده است (۱۰، ۱۶، ۱۷). بعلاوه در مطالعات in vivo نیز تأثیر مثبت عصاره آویشن باغی بر میزان رشد و همچنین شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین کمان گزارش شده است (۱۸).



شکل ۲- قطر هاله عدم رشد جدایه‌های باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در اثر اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری انروفلوکساسین و اریترومایسین با روش دیسک کاغذی بر روی محیط ژلوز خوندار

بر اساس مشاهدات سلطانی و همکاران (۱۹) با افزایش میزان اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) متعلق به خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*)، فعالیت همولیتیک باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به دلیل سرکوب تولید استرپتولیزین-اس کاهش نشان داده، اگرچه اسانس به طور کامل سبب غیر فعال شدن باکتری نشده ولی سبب کاهش بیان ژن sag A (مربوط به استرپتولیزین-S) و در نتیجه سبب کاهش تولید توکسین باکتری شده است.

بر اساس مطالعات انجام شده آویشن باغی دیگر عضو خانواده نعناعیان دارای میزان بالایی از ترکیبات فنولی (تیمول) و هیدروکربن‌های ترپنی (گاما ترپینن) و کارواکرول است که تا حدودی توجیه کننده فعالیت ضد باکتریایی این گیاه می باشد (۲۰، ۲۱).

اسانس زیره‌ی سیاه (*C. carvi*) خاصیت آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال داشته و اثرات مثبت این گیاه بر رشد ماهی تیلاپیا (۲۲) ، و رشد و فعالیّت ضد باکتریایی موکوس ماهی کپور در برابر دو باکتری گرم منفی (*Serratia marcescens* و *Escherichia coli*) نیز گزارش شده است (۲۳، ۲۴).

در مطالعه حاضر زیره سیاه با حداقل غلظت ممانعت کنندگی ۱/۶-۰/۸ و نیز حداقل غلظت کشندگی ۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، در مقایسه با سایر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها کمترین فعالیت ضد باکتریایی علیه جدایه‌های *استر پتو کوکوس اینیایی*

را نشان داد که با نتایج قطر هاله عدم رشد و الگوی رشد نیز هم‌خوانی داشت. اگرچه میزان MIC و MBC به دست آمده کمتر (فعالیت ضد باکتریایی قوی‌تر) از دامنه گزارش شده برای زیره سبز (به ترتیب ۱/۵۶و۳/۱۲) اما بیشتر (فعالیت ضد باکتریایی ضعیف‌تر) از زیره سیاه ایرانی (به ترتیب ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۲) علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* بود (۲۵، ۲۶).

زیره دارای ترکیبات مؤثره کومین آلدئید، گاما ترپینن، پارا سیمن، بتا پینن، آلفا پینن، میرسن و لیمونن می‌باشد، اگرچه میزان هر یک از ترکیبات مؤثره با توجه به گونه، شرایط زیست محیطی و فصلی مناطق رشد گیاه و روش تهیه اسانس و عصاره می‌تواند متفاوت باشد (۲۷، ۲۸). بنابرین نتایج متفاوت به دست آمده در این مطالعه‌ها می‌تواند ناشی از متفاوت بودن میزان هر یک از این ترکیبات مؤثره و همچنین جدایه باکتری به کار برده شده باشد (۲۶).

در رابطه با اثرات ضد باکتری اسانس پونه معطر، در مطالعه‌ای که توسط محبوبی و حقی در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت (۲۹)، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس پونه برای باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سرئوس و لیستریا مونوسیتوژن، بین ۰/۲۵ تا ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. در مطالعه حاضر نیز، حداقل غلظت مهارکنندگی این اسانس در خصوص باکتری‌های گرم مثبت به کار رفته، در غلظت‌های ۰/۸ و ۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به دست آمده است.

میزان فعالیت ضد میکروبی بستگی به وجود یا فقدان برخی ترکیبات و میزان آنها در گیاه دارد که می‌تواند تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله منطقه جغرافیایی رویش گیاه، واریته گیاهی، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس و یا عصاره متغیر باشد (۲۸-۲۶).

پونه دارای ترکیبات مؤثره پونه، منتول، منتون، تیمول، میرسن، پولگن، سینئول و کارون بوده و بر اساس گزارشات اسانس آن در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و آبی خواص ضد میکروبی قوی‌تری دارد (۲۹، ۳۰). بنابرین دلیل تفاوت نتایج حاصله می‌تواند به دلیل تفاوت در جنس‌های باکتری و همچنین میزان هر یک از ترکیبات مؤثره گیاه و روش تهیه اسانس و عصاره به کار رفته باشد.

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که حساسیت جدایه‌های باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مورد مطالعه به اسانس آویشن باغی نسبت به سایر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های تجاری بیشتر بوده و پیشنهاد می‌گردد این اسانس در درمان و پیشگیری بیماری‌های باکتریایی ماهی به ویژه استرپتوکوزیس ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب پایان نامه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به اجرا در آمده که نهایت تشکر و قدردانی را اعلام می داریم.

References

1- Agnew W, Barnes A. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and candidate for reliable vaccination. Vet Microbiol. 2007; 122: 1-15.

2- Austin B, Austin, D A. Bacterial Fish Pathogens*:* Disease in Farmed and Wild. 738. Fish, 4th *edn.* Springer-Praxis, Goldalming, 2007. 739.

3- Soltani M, Jamshidi S, Shafipour I. Streptococcosis caused by Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 2005; 25:95-106.

4- Shoemaker CA, Klesius PH, Evans JJ. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. Am J Vet Res. 2001; 62: 174-7.

5- Erfanmanesh A, Soltani M, Pirali E, Mohammadian S, Taherimirghaed A. Genetic characterization of Streptococcus iniae in diseased farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. Scientific World Journal. 2012; Article ID 594073, 6 pages. doi: 10.1100/2012/594073.

6- Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, Shokrpoor S, Rahmati-Holasoo H, et al. Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Acta Trop. 2016; 156: 30-36.

7- Soltani M, Alishahi M, Mirzargar S, Nikbakht G. Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iran J Fish Sci. 2007; 7: 129-40.

8- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J. Appl. Microbiol. 2006;100: 1103–1113.

9- MacMillan J. Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk? World Aquaculture. 2001; 32: 49-68.

10- Soltani M, Ghodratnama M, Taheri MA, Zargar A, Rouhollahi SH. The effect of *Zataria multiflora Boiss*. and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout farms. Journal of Veterinary Microbiology. 2013; 9 (1):1-13. (In Persian).

11- Adel M, Safari R, Ghitanchi AH, Zorriehzahra MJ. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of some Iranian medical herbs against *Yersinia ruckeri*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2016; 15(3):1108-1123.

12- Roomiani L, Soltani M, Akhondzadeh Basti A, Mahmoodi A. Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Nisin on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in a Food Model System, Journal of Aquatic Food Product Technology. 2017; 26 (10): 1189-1198.

13- Van Hai N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. Aquaculture. 2015; 446: 88–96.

14- Ahmadivand S, Soltani M, Ahmadpoor M, Eagderi S. Antibacterial effects of Rue (*Ruta graveolens*) extract against pathogenic bacteria (*Lactococcus garvieae & Aeromonas hydrophila*). Journal of breeding and aquaculture. 2015; 3 (6): 11-18. (In Persian).

15- Gonçalves GMS, Bottaro M, Nilson AC. Effect of the Thymus vulgaris essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. 2011; 32 (3):375-380.

16- Soković M, Glamoclija J, Cirić A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojević J, et al. Antifungal activity of the essential oil of Thymus vulgaris L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. Drug Dev Ind Pharm 2008; 34(12): 1388-93.

17- Koch C, Reichling J, Schneele J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. Phytomedicine. 2008; 15(1-2): 71-8.

18- Azizi E, Yeganeh S, Firouzbakhsh F, Janikhalili K. Effects of dietary Supplemental thyme essence (*Thymus vulgaris L.*) on growth, hematological and serum biochemical parameters of Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). JAIR. 2016; 4 (2):45-61. (In Persian).

19- Soltani M, Ghodratnama M, Ebrahimzadeh-Mosavi HA, Nikbakht-Brujeni G, Mohamadian S, Ghasemian M. Shirazi thyme (*Zataria multiflora Boiss*) and Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oils repress expression of sagA, a streptolysin S-related gene in Streptococcus iniae. Aquaculture. 2014; 430: 248–252.

20- Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, El Bachiri A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. IJAB 2009; 11(2): 205–8.

21- Borugă O, Jianu C, Mişcă C, Goleţ IGruia AT, Horhat FG. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. J Med Life. 2014; 3:56-60.

22- Ahmad MH, Abdel Tawwab M. The use of caraway seed meal as a feed additive in fish diets: growth performance, feed utilization, and whole-body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Aquaculture. 2011. 314: 110-114.

23- Roohi Z, Imanpoor M R, Hajimoradloo A, Salmanian Ghahderijani M. Effect of herbal supplements of caraway (*Carum carvi*) and fenugreek (Trigonella foenum graecum) on antibacterial activity and soluble protein of mucus in *Cyprinus carpio* fingerlings. J. Aqu. Eco. 2016; 6 (1):128-136.

24- Roohi Z, Imanpoor MR, Jafari V, Taghizadeh V. Effect of different levels of caraway on growthperformance and some blood parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Environment. 2015; 7(1): 105-112. (In Persian).

25- Sanchooli N. In Vitro Antibacterial Effects of Essential Oils onSome Fish Pathogenic Bacteria. Journal of Veterinary Microbiology. 2016; 12, (1): 1-10. (In Persian).

26- Mirghaed A, Abiavi T, Hassani F, Shafie Sh. Evaluation of the antibacterial activity of Bunium persicum essential oil against fish bacterial pathogens. J. Aqu. Eco. 2018; 7 (4):159-165. (In Persian).

27- Foroumadi A, Asadipour A, Arabpour RF, Amanzadeh Y. Composition of the essential oil of *Bunium persicum (Boiss*.) from Iran. Journal of Essential Oil Research. 2002; 14: 161-162.

28- Nostro A, Gernano MP, Angelo VA, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bio

autography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000; 30: 379-384.

29- Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium L.* essential oil. J Ethnopharmacol. 2008; 119(2):325-7.

30- Gaeini Z, Sohrabvandi S, Sobhani R, Soleimani M.. Characteristics of pennyroyal essential oils. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2013; 7 (5) : 661-668. (In Persian).

In vitro Antibacterial Activity of Some Medical Plants against *Streptococcus iniae*

Ali Taheri Mirghaed[1*], Seyed Abdol Habibi [1], Mehdi Soltani [1], Sohrab Ahmadi vand [1]

1- Department of Aquatic Animals Health and Diseases, Veterinary faculty, Univercity of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: December 17, 2018; Revise: February 9, 2019; Accept: February 26, 2019

Summary

The zoonotic bacteria *Streptococcus iniae* is the causative agent of streptococcosis associated with serious economic losses in the world aquaculture industry, including Iran. The antimicrobial activities of *Thymus vulgaris*, *Carum carvi*, and *Menthalong flora* essential oils were determined against two pathogenic isolates of *S. iniae* using broth microdilution, and were compared with erythromycin and enrofloxacin antibiotics by disk diffusion assay. Also, bacterial growth was followed by OD at 600 nm**.** The minimum inhibitory concentration (MIC) of the *T. vulgaris, C. carvi,* and *M. flora* essential oils were 0.8, 0.8, and 0.8-1.6 µl/ml; and the minimum bactericidal concentration (MBC) values were found as 0.8, 1.6, and 1.6 µl/ml; respectively. Moreover, the growth of isolates was reduced by increasing essential oils concentration. In addition, disk diffusion assay revealed that the antimicrobial activity of *T. vulgaris* essential oil is significantly higher than the other plants, as well as erythromycin and enrofloxacin antibiotics. These findings support the use of *T. vulgaris* for the control of streptococcosis in trout farms.

Key words: *essential oil, Streptococcusis, trout, MIC, MBC*

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره (*Teocrum polium*) بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوسفند

علی مقصودی[۱،۲،۳*]، سعیده سعیدی[۳]

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه بیوانفورماتیک، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت مقاله: ۱۲ شهریور ۱۳۹۷، بازنگری: ۳۰ مهر ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۶ بهمن ۱۳۹۷

چکیده

باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*(*Staphylococcus aureus*) از جمله رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است و بین انسان و دام شایع است. بر همین اساس، هدف مطالعه حاضر جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیک سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم بود. همچنین اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات گیاه کلپوره (*Teocrum polium*) بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد. برای این منظور گیاه کلپوره از منطقه سیستان جمع‌آوری گردید. تهیه عصاره به کمک دستگاه روتاری و با کمک روش تقطیر در خلاء انجام گرفت. تعداد ۱۰ سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان به کمک روش‌های بیوشیمیایی جداسازی شد. با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- بائر، حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اکساسیلین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سفازولین و ونکومایسین مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها در تیمار با عصاره‌های گیاه کلپوره با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک تعیین شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هر سه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات درجات متفاوتی از مهارکنندگی را بر روی ۱۰ سویه باکتری جداسازی شده دارند. با این وجود عصاره اتیل استات گیاه کلپوره در غلظت‌های پایین‌تری خاصیت مهارکننده بر روی بیشتر سویه‌های باکتری جداسازی شده داشت. همانند خاصیت مهارکنندگی قوی‌تر عصاره اتیل استات کلپوره، این عصاره در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و متانولی خواص کشندگی قوی‌تری نیز علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره اتیل استات گیاه کلپوره می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های متداول باشد.

واژگان کلیدی: *آنتی‌بیوتیک، استافیلوکوکوس اورئوس، حداقل غلظت مهارکنندگی، سیستان، فعالیت ضد میکروبی، کلپوره*

* نویسنده مسئول: Alimaghsoudi@uoz.ac.ir

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس‌ها متعلق به رده فیرمی باکتریا و خانواده میکروکوکاسه هستند و آنتروتوکسین استافیلوکوکی تولید می‌کند. این سم در مقابل حرارت مقاوم بوده و از جمله مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی در انسان می‌باشد. این باکتری‌ها، گرم مثبت، بی‌حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری‌اند (۱). اعضاء این جنس دارای بیش از ۲۰ گونه می‌باشد که در زیستگاه‌های مختلف پراکنده‌اند. برخی از آنها در پوست، غدد پوستی و غشاهای مخاطی جانوران مختلف وجود دارند و از طریق فرآورده‌های حیوانی از جمله پنیر، شیر و گوشت و منابع محیطی مثل خاک و شن و گرد و غبار، هوا و آب‌های طبیعی به انسان منتقل می‌شوند (۴-۲). برخی از گونه‌های این باکتری برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند (۱) و برخی دیگر در فساد مواد غذایی نقش دارند (۵). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است. علاوه بر این عامل ایجاد زخم‌های پوستی و دمل نموده و در برخی موارد باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار خطرناک و مقاوم به درمان می‌گردد (۶). مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* در فرآورده‌های دامی به‌دست آمده از گوسفند نیز گزارش شده است (۷).

پیش از انقلاب صنعتی، گیاهان دارویی به عنوان منبع اصلی مواد دارویی به طور وسیع توسط مردم مورد استفاده قرار می‌گرفت، تا اینکه داروهای مدرن شیمیایی به بازار آمدند و به دلیل تولید انبوه، این داروها در مقیاس وسیع و قیمت نسبتاً ارزان در دسترس همگان قرار گرفتند. دانش پزشکی نوین نیز بر پایه درمان با ترکیبات مؤثر دارویی شیمیایی شکل گرفت و به تدریج طب سنتی به حاشیه رفت. متعاقب فراگیر شدن داروهای شیمیایی، استفاده از مواد طبیعی دارویی به طور چشمگیری کاهش یافت، ولی در سال‌های اخیر به دلیل افزایش آگاهی در مورد خواص و آثار مفید مواد دارویی طبیعی زمینه استفاده روزافزون از آنها فراهم شده است (۸). علاوه بر داروهای گیاهی (که مواد متشکله آنها بر اساس ترکیبات گیاهی فرموله شده است)، گیاهان دارویی نیز به تنهایی می‌توانند بخشی از نیاز به دارو را مرتفع نمایند. از آن جمله می‌توان به عصاره و اسانس این گیاهان اشاره نمود. این‌گونه ترکیبات اغلب به دلیل خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی شناخته می‌شوند (۹).

هرچند در دنیا کلپوره (*Teucrium polium*) به عنوان یک گیاه بومی مناطق مدیترانه‌ای شناخته می‌شود، اما در بین خزانه بزرگ گیاهان دارویی بومی ایران، این گیاه را می‌توان نام برد که به خواص دارویی متعدد آن پرداخته شده است (۱۰). کلپوره گیاهی خوش‌بو و متعلق به تیره نعناع بوده و گیاهی پایا، علفی، دارای بوته‌های تقریباً چوبی به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و دارای ظاهر سفید و پنبه‌ای می‌باشد. گل‌های کلپوره به رنگ‌های سفید، سفید مایل به زرد و یا زرد دیده می‌شود. وضع ساقه گیاه نیز به صورت پرشاخه یا خوابیده دیده می‌شود. این گیاه در زمین‌های شنی و ماسه‌ای، در نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می‌روید (۱۱). کلپوره در طب سنتی به طور وسیع برای درمان رماتیسم، التیام زخم‌ها، درمان التهاب و کنترل قند خون استفاده می‌شده است (۱۲). برای کلپوره اثرات ضد درد، تب بر، ضد تشنج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز ذکر شده است (۱۳). بر همین اساس، در مطالعه حاضر نخست جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان (حومه شهر زابل) انجام شد. سپس مقاومت آنتی‌بیوتیک سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم بررسی

گردید و در نهایت اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی گوسفندان منطقه سیستان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره: گیاه کلپوره از منطقه سیستان جمع‌آوری شده و در دمای اتاق و شرایط سایه خشک گردید. برای تهیه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره مقدار ۱۰ گرم پودر خشک گیاه به طور جداگانه به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌ها در ظروف شیشه‌ای 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. عصاره به دست آمده وزن شده سپس در حلال DMSO (۱۰درصد) حل شد. عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در آزمایشات ضد میکروبی در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شد.

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از گوسفندان: از بینی گوسفندان بومی منطقه سیستان ۱۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده و بر روی محیط‌های کشت بلاد آگار و نوترینت آکار کشت شد. خلوص باکتری‌های جدا شده با آزمون مانیتول، کاتالاز و رنگ آمیزی گرم تأیید شد.

تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار آگار مغذی تلقیح شد. پس از رشد کلونی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شستشو داده شد تا سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردد. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل دربدار حاوی محلول نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن از طریق اندازه‌گیری جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر (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 $1/5\times10^8$ cfu/mL تهیه گردید.

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم: با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- بائر (Kirby-Bauer Disk Diffusion)، حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اکساسیلین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، آمپی سیلین، جنتامایسین، سفازولین و ونکومایسین (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، در ابتدا از تمام سویه‌های باکتری، غلظت ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون (Muller-Hinton Broth, MHB) تهیه و سپس بر روی محیط آگار مولر هینتون (Muller-Hinton Agar, MHA) پخش و کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در فاصله مناسب از یکدیگر قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفته و هاله‌های بازدارنده جهت ارزیابی و تعیین مقاومت/حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، مشخص شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

تعیین میزان حساسیت سویه S. aureus نسبت به عصاره‌های گیاه کلپوره: تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره‌های گیاه کلپوره با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک

انجام شد. در محیط کشت جامد تعداد شش چاهک ایجاد شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ µL از محیط آبگوشت مولر هینتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ µL از محلول رقیق شده از هر یک از عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره اضافه شده و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ µL از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه شد. بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام شد. از چاهک آخر ۱۰۰ µL محیط کشت خارج گردید. مقدار ۱۰ µL از سوسپانسیون میکروبی حاوی $1/5\times10^8$ cfu/mL باکتری(معادل ۰/۵ مک فارلند) به همه چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. اولین چاهکی که پس از قرار دادن در انکوباتور از رشد باکتری جلوگیری کرده بود، به عنوان حداقل غلظت مهارکننده (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) در نظر گرفته شد. برای اطمینان، از چاهک‌های شفاف ۱۰ µL برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانست ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به‌عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) در نظر گرفته شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

نتایج

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمار با آنتی‌بیوتیک‌های در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰ درصد سویه‌ها مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های اکساسین و ونکومایسین هستند، در حالی که درصد حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۱۰۰ درصد)، آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید(۹۰ درصد)، آمپی سیلین- سفازولین و ونکومایسین (۸۰ درصد) بوده است (جدول۲).

جدول۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی

سویه باکتری	وانکومایسین	سفازولین	جنتامایسین	آمپی‌سیلین	آموکسی‌سیلین- کلاولانیک اسید	اکساسیلین
S. aureus 1	مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 2	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 3	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 4	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 5	حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم
S. aureus 6	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 7	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 8	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 9	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
S. aureus 10	حساس	حساس	Sحساس	حساس	حساس	مقاوم

جدول ۲- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس

	وانکومایسین	سفازولین	جنتامایسین	آمپی‌سیلین	آموکسی‌سیلین- کلاولانیک اسید	اکساسیلین
حساس	۸۰	۸۰	۱۰۰	۸۰	۹۰	۰
نیمه حساس	۱۰	۲۰	۰	۲۰	۱۰	۰
مقاوم	۱۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی بر روی ۴ سویه باکتری (سویه‌های ۱، ۴، ۶، ۹) بود که نشان می‌دهد مواد مؤثره محلول در اتانولِ گیاه کلپوره در غلظت‌های بالاتری بر روی این سویه‌ها خاصیت مهارکنندگی دارند، در حالی که رشد سویه ۱۱ با کمترین غلظت (۳/۷۵ ppm) عصاره اتانولی مهار می‌شود. بیشترین غلظت عصاره متانولی مؤثر بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز ۳۰ ppm بود که بر روی سویه‌های ۳، ۷ و ۸ ثبت شد. کمترین غلظت عصاره اتانولی برای مهار باکتری نیز بر روی چهار سویه (سویه‌های ۲، ۵، ۶ و ۹) به مقدار ۷/۵ ppm ثبت گردید که بالاتر از حداقل غلظت مهارکننده عصاره اتانولی بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتیل استات گیاه کلپوره در غلظت‌های پایین‌تری خاصیت مهارکننده بر روی سویه‌های باکتری جداسازی شده داشت، به طوری‌که کمترین غلظت بر روی تمام سویه‌ها در بین سه عصاره، مربوط به عصاره اتیل استات با غلظت ۱/۸۷ بود (بر روی سویه‌های ۳ و ۱۰ باکتری). بر اساس این نتایج نشان داده شد که اتیل استات قابلیت استحصال بخش بیشتری از ترکیبات ضد باکتریایی کلپوره را نسبت به حلال‌های اتانول و متانول دارد. بیشترین غلظت مورد نیاز عصاره اتیل استات کلپوره نیز برای مهار سویه‌های ۲ و ۶ ثبت شد (۱۵ ppm).

جدول ۳- حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) (ppm) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*

سویه باکتری	اتانول	متانول	اتیل استات
S. aureus 1	۳۰	۱۵	۷/۵
S. aureus 2	۱۵	۷/۵	۱۵
S. aureus 3	۱۵	۳۰	۱/۸۷
S. aureus 4	۳۰	۱۵	۳/۷۵
S. aureus 5	۷/۵	۷/۵	۷/۵
S. aureus 6	۳۰	۷/۵	۱۵
S. aureus 7	۱۵	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 8	۱۵	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 9	۳۰	۷/۵	۷/۵
S. aureus 10	۷/۵	۱۵	۱/۸۷

حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در جدول ۴ نشان داده شده است. کمترین غلظت کشنده عصاره اتانولی کلپوره بر روی سویه ۱۱ *استافیلوکوکوس اورئوس* ثبت شد (۷/۵ ppm). بنابراین سویه شماره ۱۱ در مجاورت عصاره اتانولی کلپوره سریعتر از سایر سویه‌ها کشته می‌شود؛ در حالی که برای کشته

شدن اغلب سویه‌ها به غلظت بیشتری از عصاره نیاز است (۳۰ ppm برای ۸ سویه). نیمی از سویه‌ها با غلظت ۱۵ ppm و نیم دیگر با غلظت ۳۰ ppm عصاره متانولی کلپوره کشته شدند در حالی که برای کشته شدن باکتری با عصاره اتیل استات به حداکثر ۳۰ ppm و حداقل ۳/۷۵ ppm عصاره نیاز است. همانند خاصیت مهارکنندگی قوی‌تر عصاره اتیل استات کلپوره، این عصاره در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و متانولی خواص کشندگی قوی‌تری نیز علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد.

جدول ۴- حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره (ppm) علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*

سویه باکتری	اتانول	متانول	اتیل استات
S. aureus 1	۳۰	۳۰	۱۵
S. aureus 2	۳۰	۱۵	۳۰
S. aureus 3	۳۰	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 4	۳۰	۳۰	۷/۵
S. aureus 5	۱۵	۱۵	۱۵
S. aureus 6	۳۰	۱۵	۳۰
S. aureus 7	۱۵	۳۰	۷/۵
S. aureus 8	۳۰	۳۰	۳/۷۵
S. aureus 9	۳۰	۱۵	۱۵
S. aureus 10	۱۵	۱۵	۳/۷۵

بحث

پرورش گوسفند در منطقه سیستان به شیوه سنتی متداول است و گله‌های پرورشی اغلب با تعداد رأس گوسفند کم تا متوسط نگهداری می‌شوند. لذا علاوه بر برنامه واکسیناسیون متداول، معمولاً درمان‌های دیگر از جمله مصرف آنتی‌بیوتیک مرسوم نیست. عدم مقاومت سویه‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوسفندان منطقه سیستان به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌تواند به دلیل متداول نبودن مصرف آنتی‌بیوتیک در پرورش گوسفند در منطقه سیستان باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که هرچند ممکن است ظاهر یک حیوان درگیر بودن آن را با عوامل عفونی بیماری‌زا نشان ندهد، اما وجود پاتوژن‌ها موجب افت عملکرد حیوان می‌شود (۱۴). چنانچه در مطالعه حاضر نشان داده شد، تیمار *استافیلوکوکوس اورئوس* با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم به طور قابل ملاحظه‌ای موجب کشته شدن باکتری می‌شود که این کار می‌تواند به بهبود عملکرد دام کمک کند (به همین دلیل در گذشته به آنتی‌بیوتیک‌ها محرک رشد نیز گفته می‌شد). اما مصرف مداوم آنتی‌بیوتیک برای بهبود عملکرد دام ممکن است موجب شود که بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها وارد گوشت و شیر حیوان شده و سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید کند. از طرفی مصرف دراز مدت این باکتری ممکن است موجب بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گردد. لذا مصرف گیاهان دارویی به منظور کاهش جمعیت میکروبی مضر و بهبود عملکرد حیوان می‌تواند مؤثر باشد.

از جمله مهم‌ترین ویژگی‌های گیاهان دارویی خواص ضد میکروبی آنها برای درمان عفونت‌ها است. برخی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارای خاصیت ضد میکروبی هستند و به روش‌های مختلف از جمله تخریب دیواره سلولی موجب مرگ میکروب

می‌شوند. در یک مطالعه مهم‌ترین مواد مؤثره اسانس گیاه کلپوره شامل آلفا کادینول (alpha-cadinol)، اکسید کاریوفیلن (caryophyllene oxide)، آلفانورولول اپی (alpha muurolol epi)، کادالن (cadalene) و لانجیویربینون (longiverbenone) معرفی شد که مقادیر آنها به ترتیب برابر با ۴۶/۲، ۲۵/۹، ۸/۱، ۳/۷ و ۲/۹ درصد بود (۱۵). آلفا کادینول و آلفانورولول در یک گیاه بومی آمریکای لاتین (*Hedyosmum sprucei*) نیز وجود دارد که به دلیل خواص دارویی ضد میکروبی آن بسیار مورد توجه می‌باشد (۱۶، ۱۷). وجود ماده مؤثره آلفا کادینول همچنین در گیاهان دیگری از جمله *Senecio nutans*، *Tetradenia riparia*، *Saurauia lantsangensis* و *Phoebe formosana* نیز گزارش شده است (۲۰-۱۸).

علاوه بر خواص ضد میکروبی عصاره گیاه کلپوره در محیط کشت علیه میکروب‌های مختلف (۲۱)، خواص متعدد دیگری نیز برای عصاره و اسانس کلپوره ذکر شده است. در یک مطالعه علاوه بر فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی، برای کلپوره اثرات ضد تشنج، ضد التهاب، ضد درد، تب بر و التیام دهنده زخم نیز گزارش شده است (۲۲). همچنین طبق بررسی‌های به عمل آمده بر روی موش نشان داده شده است که مصرف کلپوره در رفع درد، تقویت عملکرد دستگاه گوارش و رفع بیماری‌های دستگاه تناسلی- ادراری نیز مؤثر می‌باشد (۲۳).

در مطالعه دیگری که تاثیر عصاره آبی و الکلی گیاه کلپوره بر قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنس* و دو گونه *مالاسزیا* مورد بررسی قرار گرفته بود، نتایج نشان داد که تأثیر مهاری عصاره اتانولی کلپوره بر هر سه گونه قارچ متفاوت و در ارتباط با غلظت عصاره در محیط کشت بود (۲۴). در مطالعه حاضر نیز علاوه بر غلظت عصاره، نوع حلال (اتانول، متانول یا اتیل استات) و سویه باکتری عواملی بودند که تأثیر بازدارندگی یا کشندگی عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار دادند. در یک مطالعه برای بررسی اثر اسانس کلپوره در کنترل باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی موریوم* موجود در ماست، نتایج نشان داد که اسانس مذکور در دو غلظت ppm ۶۰ و ۸۰ و در تیمار توأم با پروبیوتیک از بالاترین تأثیر بر ممانعت از رشد *سالمونلا* برخوردار بود (۲۵). اخیراً اثر ضد میکروبی انواع عصاره‌های گیاه کلپوره (هیدروالکلی، اتانولی و متانولی) علیه برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ارزیابی شده است و نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی این گیاه از اثرات ممانعت‌کننده مناسبی علیه رشد *سالمونلا* برخوردار است و بیشترین فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی آن علیه *باسیلوس آنتراسیس* گزارش شد، با وجود این *بوردتلا برونشیسپتیکا* حساس‌ترین میکرواورگانیسم نسبت به عصاره متانولی این گیاه بود (۲۶). فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه کلپوره همچنین توسط پژوهشگران غیر ایرانی نیز بررسی شده است و گزارش شده است که این اسانس از اثر باکتری‌کشی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۱:۱۰۰ برخوردار می‌باشد، درحالی که فاقد اثرات ضد میکروبی علیه *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشریشیا کلی* بود (۲۷) که نشان می‌دهد نوع دیواره خارجی باکتری (گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری) بر مقاومت یا حساسیت آن در تیمار با متابولیت‌های ثانویه کلپوره مؤثر است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوسفندان بومی منطقه سیستان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مقاوم نیست و رشد آن در تیمار با آنتی‌بیوتیک مهار می‌شود. از طرفی با توجه به تاثیر پاتوژن‌ها بر افت عملکرد حیوان به نظر می‌رسد استفاده از مواد ضد میکروبی در پرورش گوسفند ضروری باشد. با توجه

به احتمال باقی‌ماندن آنتی‌بیوتیک در گوشت و شیر گوسفند تهدید سلامت مصرف‌کنندگان و از طرفی مقاوم شدن سویه‌های مختلف باکتری‌ها از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از ترکیبات به‌دست آمده از عصاره گیاهان دارویی می‌تواند مفید باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره اتیل استات گیاه کلپوره می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های متداول باشد.

References

1- Emran TB, Rahman MA, Uddin MM, Dash R, Hossen MF, Mohiuddin M, *et al*. Molecular docking and inhibition studies on the interactions of Bacopa monnieri's potent phytochemicals against pathogenic Staphylococcus aureus. Daru: J Faculty of Pharmacy, Tehran Univ Med Sci. 2015;23:26. Epub 2015/04/18.

2- Bortolaia V, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and Staphylococcus aureus on poultry meat. Clinical Microbiol Infect. 2016;22(2):130-40. Epub 2015/12/27.

3- Daka D, S GS, Yihdego D. Antibiotic-resistance Staphylococcus aureus isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. Annals of Clinical Microbiol Antimicrob. 2012;11:26. Epub 2012/01/01.

4- Gasc C, Richard JY, Peyret P. Genome Sequence of Staphylococcus aureus strain HUK16, isolated from Hexachlorocyclohexane-contaminated soil. Genome announcements. 2016;4(2). Epub 2016/04/16.

5- Wu X, Santos RR, Fink-Gremmels J. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of Staphylococcus epidermidis. Food Sci & Nutr. 2015;3(2):158-68. Epub 2015/04/04.

6- Kejela T, Bacha K. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among primary school children and prisoners in Jimma Town, Southwest Ethiopia. Annals Clinical Microbiol Antimicrob. 2013;12:11. Epub 2013/06/05.

7- Simko S, Bartko P. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus mastitis in sheep, sheep milk and its products. Veterinarni medicina. 1996;41(8):241-4. Epub 1996/08/01. Rezistencia na antibiotika u Staphylococcus aureus pri mastitidach oviec, v ovcom mlieku a vyrobkoch z neho.

8- Snowden R, Harrington H, Morrill K, Jeane L, Garrity J, Orian M, *et al*. A comparison of the anti-Staphylococcus aureus activity of extracts from commonly used medicinal plants. J Alt Complement Med. 2014;20(5):375-82. Epub 2014/03/19.

9- Sama Fonkeng L, Mouokeu RS, Tume C, Njateng GS, Kamcthueng MO, Ndonkou NJ, *et al.* Anti-Staphylococcus aureus activity of methanol extracts of 12 plants used in Cameroonian folk medicine. BMC Res Notes. 2015;8:710. Epub 2015/11/26.

10- Purnavab S, Ketabchi S, Rowshan V. Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian Teucrium polium against some of phytobacteria. Nat Prod Res. 2015;29(14):1376-9. Epub 2015/01/15.

11- Sadeghi Z, Kuhestani K, Abdollahi V, Mahmood A. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants of Saravan region, Baluchistan, Iran. J. Ethnopharmacol. 2014;153(1):111-8. Epub 2014/02/11.

12- Mosaddegh M, Naghibi F, Moazzeni H, Pirani A, Esmaeili S. Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. J. Ethnopharmacol. 2012;141(1):80-95. Epub 2012/03/01.

13- Boroomand N, Sadat-Hosseini M, Moghbeli M, Farajpour M. Phytochemical components, total phenol and mineral contents and antioxidant activity of six major medicinal plants from Rayen, Iran. Nat Product Res. 2017:1-4. Epub 2017/04/14.

14- Lu D, Jiao S, Tiezzi F, Knauer M, Huang Y, Gray KA, *et al.* The relationship between different measures of feed efficiency and feeding behavior traits in Duroc pigs. J Anim Sci. 2017;95(8):3370-80. Epub 2017/08/15.

15- Khani A, Heydarian M. Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from Teucrium polium subsp. capitatum (L.). Asian Pacific J Tropic Med. 2014;7(12):956-61. Epub 2014/12/07.

16- Guerrini A, Sacchetti G, Grandini A, Spagnoletti A, Asanza M, Scalvenzi L. Cytotoxic effect and tlc bioautography-guided approach to detect health properties of Amazonian Hedyosmum sprucei essential oil. Evidence-based Complement Alt Med: eCAM.;2016:1638342. Epub 2016/04/28.

17- Ahmad MS, Aslam MS, Hatim MI, Mamat AS, Nisar A. Antioxidant and Total Phenolic Content of Catharanthus roseus Using Deep Eutectic Solvent. Recent Adv Biol Med. 2017;03:7.

18- Su YC, Ho CL. Composition of the Leaf Essential Oil of Phoebe formosana from Taiwan and its

in vitro Cytotoxic, Antibacterial, and Antifungal Activities. Nat Prod Commun. 2016;11(6):845-8. Epub 2016/08/19.

19- Paredes A, Leyton Y, Riquelme C, Morales G. A plant from the altiplano of Northern Chile Senecio nutans, inhibits the Vibrio cholerae pathogen. Springer Plus. 2016;5(1):1788. Epub 2016/11/01.

20- Gazim ZC, Amorim AC, Hovell AM, Rezende CM, Nascimento IA, Ferreira GA, *et al.* Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of Tetradenia riparia (Hochst.) Codd in southern Brazil. Molecules. 2010;15(8):5509-24. Epub 2010/08/18.

21- Oganesian GB, Galstyan AM, Mantsatanyan VA, Shashakov AS, Agababjiyan PV. Phenyl propanoid glycosidded of Teucrium polium. Chem Nat Compounds. 1991;27(5):556-9.

22- Niazmand S, Erfanian-Ahmadpour M, Mousavian M, Saberi Z. The inotropic and chronotropic effects of aqueous ethanolic extract from Teucrium polium on guinea pig isolated heart. Iranian J Basic Med Sci. 2008;10(1):7-13.

23- Heidari MR, Karaminezhad-Ranjbar M, Dadvand E, Jalali S. Evaluation of the analgesic effect of Teucrium polium extract in mice. J Kerman Univ Med Sci. 1999;6(2)::67-76. (Persian).

24- Nadimi M ZM, Madani M. Effect of aqueous and ethanolic extracts of Teucrium polium on Candida albicans and two species of Malassezia. Zahedan J Res Med Sci. 2013;15(8):34-8 (Persian).

25- Mahmoudi R, Zare P, Nosratpour S, Mardani K, Safari A. Hygienic effects of Teucrium polium essential oil against Salmonella typhimorium LT2 in probiotic yoghurt. Urmia Medic J 2014;25(8):769-77.

26- Darabpour E, Motamedi H, Seyyed Nejad SM. Antimicrobial properties of Teucrium polium some clinical pathogens. Asian Pacific J Tropic Medicine. 2010:124-7.

27- Akin M, Oguz D, Saracoglu HT. Antibacterial activity of essential oil from Thymbra spicata var. spicata L. and Teucrium polium (Stapf Brig.). Int J Pharm Appl Sci. 2010;1:55-8.

Evaluation of Inhibitory and Bactericidal Effects of *Teocrum polium* Extracts on Isolated *Staphylococcus aureus* from Nasal Samples of Sistan Indigenous Sheep

Ali Maghsoudi[1,2,3,*], Saeideh Saeidi[3]

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Bioinformatics, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Center of Agricultural Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: September 3, 2018; Revise: October 22, 2018; Accept: February 15, 2019

Summary

Staphylococcus aureus is a gram positive bacterium which has been considered as one of the most common agents of food bacterial poisoning and also as a zoonotic disease. Therefore, the aim of the current study was to isolate different strains of *S. aureus* from nasal samples of sheep from Sistan region and to evaluate antibiotic resistance of the isolated bacteria against common antibiotics. Moreover, the antibacterial activity of ethanol, methanol and ethyl acetate extracts of *Teucrium polium* plant on *S. aureus* was assessed. The plant samples were gathered from Sistan region. Ethanol extracts of plant samples was obtained using vacuum from the center (rotary) apparatus. A total number of 10 *S. aureus* strains were isolated from the sheep nasal samples from Sistan region. Susceptibility to Oxacillin, Amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, Gentamicin, Cefazolin and Vancomycin antibiotics was evaluated by the Kirby-Bauer disk diffusion standard method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of different concentrations of plant extracts were determined on bacteria using dilution in well method. Results of the current study indicated that all of the three ethanol, methanol and ethyl acetate extracts had various bactericidal effects on 10 isolated bacteria. Nevertheless, the ethyl acetate extract was batter than two other extracts due to its higher MIC and MBC in lower concentrations against *S. aureus*. Results obtained from the current study suggest that ethyl acetate extract of *T. polium* would be a suitable alternative for common antibiotics.

Keywords: *Antibiotics, Staphylococcus aureus, Minimum inhibitory concentration, Sistan, antimicrobial activity, Teucrium polium*

بررسی فراوانی گونه‌های ایمریایی و کریپتوسپوریدیایی در ماکیان بومی شهرستان بهبهان، جنوب غرب ایران

ام البنین قاسمیان کریک[1*]، محمدرضا یوسفی [2]، جعفر حسین زاده مرزناکی[3]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.
۲- گروه انگل شناسی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.
۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بابل،دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۹ بهمن ۱۳۹۷، بازنگری: ۷ اسفند ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۹ اسفند ۱۳۹۷

چکیده

کوکسیدیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در صنعت پرورش ماکیان است که توسط گونه‌های ایمریایی و کریپتوسپوریدیایی ایجاد می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع گونه‌های مختلف ایمریایی در ماکیان بومی شهرستان بهبهان، استان خورستان، جنوب غرب ایران می‌باشد. نمونه‌های مدفوع از ۱۰۰ ماکیان بومی متعلق به ۱۱ روستای این منطقه به‌طور تصادفی جمع‌آوری شد. تعداد اووسیست در هر گرم مدفوع با استفاده از روش شناور سازی مک مستر اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفت و اووسیست‌ها برای شناسایی جنس و گونه در محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد اسپرولە شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده شیوع کلی کوکسیدیوز در این مطالعه ۱۵ درصد بود، که شامل *ایمریا اسرولینا* (۱۸درصد)، *ایمریا ماکزیما* (۶۰ درصد)، *ایمریا برونتی* (۵۳/۳)، *ایمریا تنلا* (۳۳/۳ درصد) و *ایمریا مایتیس* (۶۶/۶ درصد) و آلودگی همزمان ایمریا *اسرولینا*+ ایمریا ماکزیما (۴۰ درصد)، *ایمریا تنلا*+ *ایمریا برونتی*+ *ایمریا ماکزیما* (۴۶/۶ درصد) و *ایمریا ماکزیما*+ *ایمریا برونتی* +*ایمریا تنلا* +*ایمریا مایتیس* (۱۳/۲ درصد) شناسایی گردیدند. از مجموع گسترش‌های تهیه شده ۸ نمونه (۸ درصد) مثبت تشخیص داده شدند. این تحقیق اولین گزارش بررسی میزان کوکسیدیوز و کریپتوسپوریدیوز در ماکیان بومی این منطقه می‌باشد. این بیماری‌ها فاکتورهای مهمی در ایجاد خسارات اقتصادی به ماکیان بومی و صنعتی در این منطقه می‌باشند. بنابراین بررسی‌های بیشتر و طراحی استراتژی نظارتی مناسب برای بهبود مدیریت مزارع، ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *بهبهان، کریپتوسپوریدیوم، گونه‌های ایمریا، ماکیان بومی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: ghasemian1249@yahoo.com

مقدمه

تقریباً ۸۰ درصد از ماکیان در کشورهای در حال توسعه به صورت سنتی یا پرورش آزاد با کمترین امکانات و تجهیزات در منازل روستایی و عشایری پرورش داده می‌شوند. معمولاً بیشترین طیوری که نگهداری می‌شوند شامل اردک، غاز و بوقلمون می‌باشند. در میان اینها مرغ دارای بیشترین اهمیت است که در مناطق روستایی و حتی شهری بهبهان هم پرورش داده می‌شود (۱۰). کوکسیدیوز یکی ازمهم‌ترین بیماری‌های انگلی در صنعت پرورش طیور است که باعث خسارت سه میلیارد دلار به این صنعت در سراسر جهان می‌شود (۳). کوکسیدیوز به وسیله تک‌یاخته ایمریا ایجاد می‌گردد (۱۲). تاکنون ۹ گونه ایمریا شناسایی شده است که عبارتند از: *ایمریا تنلا، ایمریا میواتی، ایمریا گانی، ایمریا آسروولینا، ایمریا نکاتریکس، ایمریا ماکزیما، ایمریا میتیس، ایمریا پراکوکس و ایمریا برونتی* (۸، ۱۲، ۱۴). بیماری کوکسیدیوز علیرغم پیشرفت‌هایی در زمینه تغذیه، مایع درمانی ، مدیریت و ژنتیک در سلول‌های اپیتلیال روده رخ می‌دهد (۵). *ایمریا تنلا و ایمریا* نکاتریکس بیماری‌زاترین گونه‌ها بوده و سبب ایجاد ضایعات خونی و مرگ و میر می‌شوند. علایم ممکن است بالینی و یا تحت بالینی باشد. در شکل بالینی عفونت منجر به بروز بیماری با نشانه‌های بالینی مشخص مانند تلفات ناگهانی، اسهال آبکی، موکوئیدی، بی‌اشتهایی، ژولیدگی، بی‌حالی و ضعف، افت وزن و کاهش تولید تخم‌مرغ و افزایش حساسیت به سایر بیماری‌های اپیدمیک مانند مایکوپلاسموز و کلی باسیلوز می‌گردد، این حالت وقتی اتفاق می‌افتد که پرنده تعداد زیادی اواوسیست اسپروله ایمریا را بلع نموده باشد. در شکل تحت بالینی عفونت منجر به بروز بیماری با نشانه‌های بالینی نمی‌گردد اما کاهش رشد و افزایش ضریب تبدیل غذایی و در نتیجه خسارات اقتصادی وجود خواهد داشت، این حالت زمانی رخ خواهد داد که تعداد اووسیست‌های بلع شده توسط حیوان کم باشد (۱۲، ۱۵). کریپتوسپوریدیوم در پرندگان موجب عفونت روده‌ای و تنفسی می‌شود. این بیماری چه از لحاظ مرگ و میر و چه با ایجاد وقفه در رشد طیور پرورشی تأثیرات سوئی به جای می‌گذارد. از طرفی واگیردار بودن این بیماری همانند دیگر بیماری‌های تک‌یاخته ای و مستعد کردن طیور به بیماری‌های دیگر خصوصاً بیماری‌های تنفسی سبب گردیده که اهمیت خاصی به آن داده شود (۹). هدف از انجام این بررسی، شناسایی گونه‌های ایمریا و کریپتوسپوریدیوم و بررسی میزان شیوع آنها در ماکیان بومی شهرستان بهبهان است که با معلوم شدن میزان آلودگی در این منطقه بتوان با اتخاذ روش‌هایی میزان تلفات و خسارات اقتصادی را به حداقل رساند.

مواد و روش کار

در این مطالعه برای بررسی شیوع گونه‌های آیمریا و آلودگی کریپتوسپوریدیایی در ماکیان بومی شهرستان بهبهان، ۱۱ روستای مختلف در طول فصل زمستان ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه به طور تصادفی و به طور مستقیم با تحریک ناحیه مقعد پرنده، ۱۰۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شد. نمونه مدفوع به ظرف‌های پلاستیکی منتقل و شماره هر پرنده روی ظرف نمونه درج گردید. سایر مشخصات مربوط به نمونه‌ها در دفتر ثبت شد. درب ظروف نمونه‌گیری بعد از وارد کردن مدفوع به آنها محکم بسته تا از نفوذ هوا جلوگیری شود. تلاش شد تا نمونه‌ها در مجاورت یخ و در کوتاهترین زمان ممکن به آزمایشگاه انتقال یابند. روش مورد استفاده در این تحقیق جهت تعیین میزان اووسیست در هر گرم مدفوع (OPG) روش ماک ماستر اصلاح شده Modified Mac-master

می‌باشد. در نمونه‌های مثبت، برای تعیین گونه‌ی اووسیست‌های ایمریای موجود در نمونه‌های مدفوع، اووسیست‌ها اسپرولـه شدند. اسپورولاسیون در انکوباتور با دمای ۲۴-۲۶ درجه سانتی‌گراد در محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد انجام شد. بعد از اطمینان از اسپورولاسیون اووسیست ها برای تعیین هر گونه اووسیست روش میکرومتری استفاده و براساس خصوصیات ریخت‌شناسی اووسیست و اسپوروسیست (اندازه، شکل ظاهری، زمان اسپورولاسیون، وجود یا عدم وجود میکروپیل و کلاهک آن، وضعیت دیواره، دریچه، رنگ و فرم جدار اووسیست‌ها و مقایسه آن با گونه‌های تعیین شده در ماکیان)، شناسایی گونه‌ها انجام گرفت. جهت شناسایی کریپتوسپوریدیوم از روش ذیل نلسون اصلاح شده استفاده شده که اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم به رنگ قرمز درخشان دیده می‌شوند. جهت برآورد شیوع و توصیف داده‌های کیفی و درصد از آمار توصیفی استفاده گردید.

جدول۱- میزان شیوع گونه‌ای مختلف ایمریا در ماکیان بومی شهرستان بهبهان

گونه های آیمریا	تعداد نمونه مثبت	درصد آلودگی
ایمریا اسرولینا	۱۲	۸۰
ایمریا ماکزیما	۹	۶۰
ایمریا برونتی	۸	۵۳/۳
ایمریا تنلا	۵	۳۳/۳
ایمریا مایتیس	۴	۲۶/۶
ایمریا اسرولینا+ ایمریا ماکزیما	۶	۴۰
ایمریا تنلا+ ایمریا برونتی+ ایمریا ماکزیما	۷	۴۶/۶
ایمریا ماکزیما+*ایمریا برونتی* +*ایمریا تنلا* + *ایمریا مایتیس*	۲	۱۳/۲

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS تحت ویندوز ویرایش ۱۹ انجام شد.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه مدفوع بررسی شده، ۱۵ درصد نمونه‌ها به کوکسیدیوز و ۸ درصد نمونه‌ها به کریپتوسپوریدیوم آلوده بودند. ۵ گونه آیمریا، *ایمریا اسرولینا*، *ایمریا ماکزیما*، *ایمریا برونتی*، *ایمریا تنلا* و *ایمریا مایتیس* شناسایی گردید. *ایمریا اسرولینا* (۸۰ درصد) شایع‌ترین و به ترتیب گونه‌های *ایمریا ماکزیما* (۶۰ درصد)، *ایمریا برونتی* (۵۳/۳ درصد) *ایمریا تنلا* (۳۳/۳ درصد)، *ایمریا مایتیس* (۲۶/۶ درصد)، و آلودگی همزمان ایمریا *اسرولینا*+ ایمریا ماکزیما (۴۰درصد)، ایمریا تنلا+ ایمریا برونتی+ ایمریا ماکزیما (۴۶/۶ درصد) و *ایمریا ماکزیما*+ *ایمریا برونتی* + *ایمریا تنلا* +*ایمریا مایتیس* (۱۳/۲ درصد) تشخیص داده شدند جدول (۲و۱).

جدول ۲- درصد آلودگی کریپتوسپوریدیوم در ماکیان بومی

درصد آلودگی Cryptosporidium
٪ ۸

۱۱ قطعه از ماکیان آلوده کمتر از ۲۰ هزار اووسیست در هر گرم مدفوع و ۱ قطعه از ماکیان آلوده بین ۲۰ تا ۴۰ هزار اووسیست در هر گرم مدفوع و ۳ قطعه از ماکیان آلوده بین ۴۰ تا ۶۰ هزار اووسیست در هر گرم مدفوع داشته‌اند جدول (۳).

جدول۳- میانگین اووسیست در هر گرم مدفوع (OPG) در ماکیان آلوده (×۱۰۰۰)

میانگین کل	تعداد ماکیان با OPG کمتر از ۲۰ هزار (میانگینOPG)	تعداد ماکیان با OPG بین ۲۰ تا ۴۰ هزار (میانگین OPG)	تعداد ماکیان با OPG بین ۴۰ تا۶۰ هزار (میانگین OPG)
۱۷/۷۶	۱۱(۴/۵۲۷)	۱(۲۷/۴)	۳(۶۳/۱)

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای بررسی شیوع گونه‌های آیمریا و آلودگی کریپتوسپوریدیایی در ماکیان بومی شهرستان بهبهان، ۱۱ روستای مختلف در طول فصل زمستان ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعات اپیدمیولوژیکی بررسی شیوع گونه‌های ایمریا ابزارهای مفیدی جهت پیشگیری و کنترل کوکسیدیوز به شمار می‌آید. میزان شیوع کوکسیدیوز در ماکیان بومی ۱۵ درصد بود که شامل *ایمریا اسروولینا* (۱۸ درصد)، *ایمریا ماکزیما* (۶۰ درصد)، *ایمریا برونتی* (۵۳/۳)، *ایمریا تنلا* (۳۳/۳ درصد) و *ایمریا مایتیس* (۶۶/۶ درصد) و آلودگی همزمان ایمریا *اسروولینا*+ ایمریا ماکزیما (۴۰درصد)، *ایمریا تنلا*+ *ایمریا برونتی*+ *ایمریا ماکزیما* (۴۶/۶ درصد) و *ایمریا ماکزیما*+ *ایمریا برونتی* + *ایمریا تنلا* +*ایمریا مایتیس* (۱۳/۲ درصد) شناسایی گردیدند این میزان آلودگی در مقایسه با بررسی‌های انجام شده در ایران و سایر کشورها کم می‌باشد. در نمونه‌های مثبت تعداد اووسیست بین ۱۰۰۰× ۴/۵۲۷ و ۱۰۰۰× ۶۳/۱ می‌باشد. با وجود بالا بودن تعداد اووسیست در هر گرم مدفوع این ماکیان در هنگام نمونه‌گیری علائم بالینی بیماری را نداشتند.

هادی پور و همکاران (۱۳۹۰)، میزان شیوع بالای کوکسیدیوز (۶۴ درصد) را درماکیان بومی جنوب غرب ایران (شیراز) به دلیل ضعف مدیریتی مزارع ماکیان بومی روستاها دانستند. اگرچه این تحقیق در فصول بهار و تابستان انجام شد که رطوبت مناسب جهت اسپورولاسیون و بقای آن موجود نبود (۵). آشنافی و همکاران (۲۰۰۴)، میزان شیوع کوکسیدیوز را در ماکیان بومی اتیوپی مرکزی (۲۵/۸ درصد) گزارش کرد (۱). انگل ایمریا در بین پرندگان مختلف خرم آباد ۷/۱ درصد گزارش شد (۲). رزمی و کلیدری (۲۰۰۰) در مشهد فراوان‌ترین گونه ایمریا را *ایمریا اسروولینا* (۴۷ درصد) و بعد *ایمریا ماکزیما* (۴۱ درصد) در مزارع مرغ گوشتی گزارش کردند (۱۱).

در مطالعه شیرزاد و همکاران (۱۳۹۰) و قره خانی و همکاران (۲۰۱۴) در مزارع مرغ گوشتی شمال ایران (استان مازندران)، غرب ایران (استان همدان) و تبریز *ایمریا اسروولینا* شایع‌ترین گونه بود (۴، ۱۳).

حیدری و قره خانی (۱۳۹۰) میزان فراوانی آلودگی *کریپتوسپوریدیوم ملهٔ اگریدیس* را در مرغ های بومی شهرستان همدان ۲/۵ درصد گزارش کردند (۷).حق بین نظرپاک و همکاران (۱۳۹۰) فراوانی انگل کریپتوسپوریدیوم را در ۳۰ فارم طیور گوشتی قائم شهر ۲۳/۳۳ درصد نشان دادند (۶).

ایمریا اسروولینا و *ایمریا ماکزیما* به عنوان دو عامل مهم ایجاد کننده کوکسیدیوز تحت بالینی و شایع‌ترین گونه‌ها در ماکیان شناخته شده‌اند که درصد بالای آلودگی به این گونه‌ها از ایمریا در نمونه‌های مثبت، آنها را به عنوان یک خطر بالقوه برای ماکیان بومی منطقه و نیز ماکیان صنعتی مطرح می‌نماید. این تحقیق اولین گزارش بررسی میزان کوکسیدیوز و کریپتوسپوریدیوز در ماکیان بومی شهرستان بهبهان می‌باشد که فاکتورهای

مهمی درفراهم آوردن خسارات اقتصادی به طیور بومی و صنعتی در این منطقه می‌باشند. بنابراین بررسی‌های بیشتر و طراحی استراتژی نظارتی مناسب در جهت مدیریت مطلوب و قوی در مزارع، ضروری به نظر می‌رسد.

References

1- Ashenafi H, Tadesse S, Medhin G, Tibbo M. Study on coccidiosis of scavenging in digenous chickens, in central Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*. 2004; 36(7): 693 – 701.

2- Badparva E, Ezatpour B, Azami M, Badparva M. First report of bird's infection by intestinal parasites in Khorramabad, west Iran. Journal of Parasitic Diseases. 2015; 39(4), 720-724 [In Persian].

3- Dalloul R. A, Lillehoj H. S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert review of vaccine's*. 2006; **5**(1), 143-163.

4- Gharekhani J, Sadeghi-Dehkordi Z, Bahrami M. Prevalence of coccidiosis in broiler chicken farms in Western Iran. *Journal of veterinary medicine*. 2014; 4 [In Persian].

5- Hadipour M, Olyaie A, Naderi M, Azad F, Nekouie O. Prevalence of Eimeria species in scavenging native chickens of Shiraz, Iran. African Journal of Microbiology Research.2011; 5(20). 3296-3299 [In Persian].

6- Haghbin Nazar pak H, Mousavi S.A, Ranjbar Bahadori Sh, Mohammadi Malayeri M. R, Hosseini S. M. Frequency of *Cryptosporidium* infection in broiler breeding flock of Ghaemshahr. *Journal of Veterinary Microbiology*.2011; 7(1): 1-5 [In Persian].

7- Heidari H, Gharekhani J. Evaluation of contamination of humans, livestock and poultry *Cryptosporidium* in Hamadan city and suburbs during the years 1385-1390. *Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Services*.2011; 3 (19): 67-74 [In Persian].

8- Levine P. P. D. Veterinary Protozoalogy. Lea and febiger press.1985; Pp: 130- 142, 178-188, 223-227.

9- Nili, H and Asasi, K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian *influenza* in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathology*.2002; 31: 247-252 [In Persian].

10- Poulsen, j.; Permin, A.; Hindsbo, O.; Yelifari, L. Prevalence and distribution of gastro - intestinal helminthes and haemoparasites in young scavenging chickens in upper eastern region of Ghana, West Africa, Prev Vet Med.1999; 45 (3-4): 237-245.

11- Razmi G.R, Kalideri G. A. Prevalence of subclinical coccidiosis in broiler-chicken farms in the municipality of Mashhad, Khorasan. Iran, *J. Parasitol* .2000; 44:247- 253 [In Persian].

12- Saife Y. M. Disease of poultry, 11th, edition. Iowa state university press, *Ames Iowa*. *Ch*. 34.2003; Pp: 780-785, 865-883.

13- Shirzad M.R, Seifi S, Gheisari H.R, Hachesoo B.A, Habibi H, Bujmehrani H. (2011). Prevalence and risk factors for subclinical coccidiosis in broiler chicken farms in Mazandaran province Iran. Tropical Animal Health and Production. **43**(8): 1601– 1604 [In Persian].

14- Soulsby E.j. L. (1982). Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th ed. Bailliere Tindall, *Academic press, London*. Pp: 630-639, 593 – 664.

15- Zhang Z, Zeng M. (2005). Research advances of drug resistance in chicken's coccidian. *Chinese. J. Vet. Parasitol*; 13:29-36.

Prevalence and Distribution of Eimeria Species and Cryptosporidium Infection in Indigenous Fowls of Behbahan, South West Iran

Omolbanin Ghasemian[1*], Mohammad Reza Youssefi[2], Jafar Hossienzadeh marzenaki[3]

1- Young researchers and Elite club, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.
2- Department of Veterinary Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.
3- Young researchers and Elite club, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Receive: February 8, 2019; Revise: February 26, 2019; Accept: March 10, 2019

Summary

Coccidiosis is one of the most important parasitic diseases in the poultry industry, which is caused by the Eimeria and Cryptosporidic species. The main goal of current study was to investigate the prevalence of different *Eimeria* species in indigenous poultry of Behbahan, Khuzestan province, south west of Iran. Fecal samples were collected randomly in all of the 100 native birds from 11 villages in this region. Number of oocysts per gram of faeces (OPG) was determined by the standard McMaster technique. Identification of oocysts was done on sporulation in 2.5 % potassium dichromate solution. The results showed an overall prevalence of 20% for *Eimeria* sp. Infection contains 15%; *E. acervulina* (80%), *E. maxima* (60%), *E. brunetti* (53.3%), *E. tenella* (33.3%) and *E. mitis* (26.6%) with mixed infections of *E. maxima* +*E. acervulina* (40%), *E. tenella*+*E. brunetti* +*E. maxima* (46.6%), and *E. brunetti* +*E. maxima* + *E. tenella* (2.2%) +*E. mitis* (13.2%) were determined. In order to determine the rate of *Cryptosporidium* infection, the samples were first stabilized using 70% methanol and stained under the Modified Zeheil Neelsen method. They were examined using an optical microscope. From the obtained spreads, 8 samples (8%) have been recognized as positive. This is the first report of coccidiosis in native birds in this region. These diseases may be an important factor in the economic losses of the native and broiler chickens in this region. Further additional research and design control strategies for improving management farms are necessary.

***Key words**: Behbahan, Cryptosporidium, Eimeria spp, Indigenous fowl*

مقایسه خصوصیات میکروبی و فیزیکوشیمیایی گوشت شترمرغ در کشتار سنتی و صنعتی

زهره مشاک[۱]، محمد سعید یارمند[۲]*، علی مجدر لنگرودی[۳]

۱- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه زاد اسلامی،کرج، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم ومهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ بهمن ۱۳۹۷، بازنگری: ۱۱ اسفند ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۳۹۷

چکیده

گوشت شترمرغ از ارزش غذایی بسیار بالایی برخوردار بوده و کشتار آن می‌تواند به روش سنتی در محیط خارج از کشتارگاه، بر روی زمین و بدون تجهیزات مکانیزه و یا به روش صنعتی در کشتارگاه ، با تجهیزات مکانیزه انجام شود. با توجه به احتمال بیشتر خطر آلودگی گوشت شترمرغ در کشتار سنتی، هدف از مطالعه حاضر مقایسه خصوصیات میکروبی و فیزیکوشیمیایی گوشت شترمرغ، بین دو روش کشتار سنتی و صنعتی می‌باشد. ۲۰ قطعه شترمرغ سالم با شرایط پرورش یکسان انتخاب شده و ۱۰ قطعه به روش سنتی و ۱۰ قطعه به صورت صنعتی کشتار شد. خصوصیات میکروبی (باکتری‌های هوازی مزوفیل و سرماگرا، *استافیلوکوکوس اورئوس*، کلی‌فرم و *اشریشیا کلی* و جنس *سالمونلا*) و فیزیکوشیمیایی (اندازه‌گیری میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر) هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. در تمامی آزمون‌های میکروبی تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های گروه کشتار سنتی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کشتار صنعتی بود ($p<۰/۰۵$). نتایج مربوط به آزمون‌های فیزیکوشیمیایی بین دو گروه گوشت شترمرغ اختلاف معنی‌داری نداشت؛ اما درصد پروتئین در نمونه‌های کشتار سنتی از حد مجاز کمتر بود. با توجه به خطرات مرتبط با آلودگی و فساد گوشت‌های شترمرغ، بررسی کیفیت این محصول و مقایسه نتایج کشتار سنتی و کشتار صنعتی امری ضروری به نظر می‌رسد و توصیه می‌شود که کشتار شترمرغ در کشتارگاه‌های صنعتی و با اصول بسته‌بندی بهداشتی انجام پذیرد تا بتوان این فراورده سودمند را تحت شرایط بهداشتی مناسب‌تری به مصرف‌کنندگان عرضه نمود.

کلمات کلیدی: *کشتار سنتی، کشتار صنعتی، کشتارگاه، گوشت شترمرغ*

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

مقدمه

گوشت شترمرغ (*Struthio camelus*) یکی از منابع غذایی سرشار از پروتئین بوده که کلسترول پایین و اسیدهای چرب غیراشباع بالا داشته و از نظر میزان آهن و امگا ۳ بسیار غنی می‌باشد. هر ۱۰۰ گرم گوشت شترمرغ حاوی ۲۱/۵ میلی‌گرم منیزیم، ۲۰۸ میلی‌گرم فسفات، ۳۵۱/۴ میلی‌گرم پتاسیم می‌باشد. در گوشت شترمرغ بر خلاف سایر انواع گوشت، پایین بودن میزان چربی موجب کاهش تردی گوشت نشده است (۱، ۲). عوامل متعددی نظیر نوع سیستم مدیریت مزرعه، تغذیه، سن، نژاد و جنسیت پرنده، حمل و نقل و استراحت قبل از کشتار، روش ذبح، رعایت زنجیره سرد و اصول بهداشتی طی فراوری، نگهداری و توزیع، بر روی کیفیت گوشت شترمرغ (میکروبی و فیزیکوشیمیایی) مؤثر می‌باشد. بررسی وضعیت میکروبی و فیزیکوشیمیایی گوشت می‌تواند شاخص مناسبی جهت بررسی کیفیت آن باشد. آلودگی میکروبی گوشت به میکروارگانیسم‌های پاتوژن (ناشی از بیماری و یا در حین عملیات کشتار) می‌تواند موجب انتقال بیماری‌های غذازاد و آلودگی با میکروارگانیسم‌های مولد فساد (در حین کشتار و یا نگهداری در شرایط زمان - دمایی نامناسب) می‌تواند موجب تخریب فراورده و در هر دو صورت منجر به زیان‌های سنگین اقتصادی برای تولیدکننده شود (۳، ۴). بیماری‌های غذازاد معمولاً علاوه بر علایم گوارشی (معده‌ای-روده‌ای) به شکل اسهال و استفراغ می‌تواند باعث بروز عوارض جدی در مفاصل، قلب، پوست ، چشم و سایر ارگانهای داخلی در بدن انسان شود. در سال‌های اخیر تمامی کشورها و حتی کشورهای پیشرفته شاهد افزایش نگران کننده‌ای در بروز بیماری‌های غذازاد بوده‌اند. مخصوصاً در گوشت شترمرغ به دلیل کاهش سریع pH پس از کشتار (نسبت به گوشت‌های قرمز) و کاهش زمان نگهداری، خطر رشد میکروبی در این فراورده حائز اهمیت فراوان است (۵، ۶).

در فرایند کشتار، آلودگی گوشت با منشأ خود حیوان، محیط کشتارگاه و یا از طریق تماس با پرسنل و تجهیزات کشتارگاه ممکن است ایجاد شود. مراحل کشتار شترمرغ شامل بی‌حسی، خونگیری، ذبح، پرکنی، پوست‌کنی، تخلیه امعاء و احشاء و شقه کردن می‌باشد. آلودگی در طی فرایند کشتار بسته به مراقبتی است که عمدتاً در طی پوست‌کنی و خصوصاً تخلیه امعاء و احشاء صورت می‌پذیرد. در طی پوست‌کنی در نتیجه کاربرد تکنیک غلط، هنگام جداسازی پوست از لاشه، آلودگی زیادی از سطح پوست به بافت‌های زیرین منتقل می‌شود (۷-۵). در طی مراحل تخلیه امعاء و احشاء، آلودگی می‌تواند در اثر پارگی و ریختن محتویات روده یا صفرا بر روی لاشه صورت بگیرد. برش کیسه صفرا، گره‌های لنفاوی و مجاری صفراوی ممکن است سبب آلودگی به گونه‌های مختلف *سالمونلا* و کمپیلوباکتر در لاشه شود. همچنین برش رکتوم و انتهای روده، نیز منبع مهم آلودگی لاشه محسوب می‌شود، چرا که ناحیه مزبور اغلب به طور شدیدی با *E. coli* و *Salmonella spp.* آلوده است. منابع دیگر آلودگی گوشت در طی فرایند کشتار شامل لباس کارگران، تجهیزات فرآوری مثل اره، میزهای استخوان‌گیری و چرخ گوشت، آب به کار رفته جهت شستشوی لاشه، دست‌ها و وسایل کشتار است (۲، ۱۱-۸). کشتار شترمرغ می‌تواند به دو روش متفاوت سنتی و یا صنعتی انجام شود. با توجه به نحوه فراوری گوشت شترمرغ در کشتار سنتی، به نظر می‌رسد که خطر آلودگی در این نوع کشتار بیشتر از کشتار صنعتی باشد. در روش کشتار سنتی کلیه مراحل کشتار بر روی زمین انجام می‌شود؛ در صورتی که در کشتار صنعتی پس از بی‌حس نمودن، بلافاصله پرنده با دو پا و به وسیله زنجیرهای آویزان

از انتهای یک قلاب تی شکل (یک میله افقی) روی یک ریل هوایی برده شده و انتقال پرنده جهت مراحل بعدی کشتار از طریق حرکت دادن روی ریل هوایی انجام می‌شود (۱۲، ۱۳). همچنین در کشتار سنتی زنجیره سرد جهت نگهداری و انبار گوشت شترمرغ وجود نداشته و به دلیل عدم طی شدن مرحله جمود نعشی در لاشه‌ها، خطر آلودگی میکروبی بیشتر است. خون‌گیری در کشتار سنتی در حالت خوابیده و در کشتار صنعتی پس از شوک الکتریکی و در حالت آویزان از پا، انجام می‌شود. در کشتار سنتی، خون باقی مانده در گوشت، به عنوان یک ماده مغذی موجب رشد بیشتر میکروارگانیسم‌ها و قلیایی شدن گوشت و در نتیجه فساد زود هنگام آن می‌گردد. در کشتار صنعتی پس از شوک الکتریکی، سر شترمرغ بریده شده، از پا آویزان می‌شود تا به کمک جاذبه زمین خون به طور کامل از لاشه خارج شود و در ضمن از تماس لاشه با زمین به عنوان یکی از عوامل بروز آلودگی حین کشتار، جلوگیری می‌شود. همچنین ذبح پرنده در حالت آویزان باعث می‌شود تا تخلیه امعاء و احشاء سریع‌تر و با دقت بیشتری انجام گیرد (۹، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷).

یکی دیگر از خطرات کشتار سنتی شترمرغ عدم نظارت دامپزشکی بر فرایند بازرسی قبل و حین کشتار و محیط کشتارگاه است. در کشتار سنتی الزامات مدونی جهت تأسیس و برقراری زنجیره سرد پس از کشتار و همچنین امکانات شستشوی سریع لاشه وجود ندارد. از حدود ۵۰ سال پیش اولین کشتارگاه‌های صنعتی طیور در نقاط مختلف جهان شروع به فعالیت نموده‌اند. هوپکس (۱۹۹۶) اتوماسیون و بهداشت را در رابطه با کشتار طیور بررسی نموده و کشتار طیور به روش صنعتی را امری حیاتی توصیف نمود. طبق این مطالعه در روش کشتار صنعتی علاوه بر افزایش ظرفیت کشتار، با کاهش میزان دخالت نیروی انسانی، آلودگی میکروبیولوژیکی محصولات و تجهیزات در طی تمامی مراحل کشتار قابل کنترل است. در ایالات متحده آمریکا از سال ۱۹۹۸ برنامه کنترل فرایند مطابق با اصول HAACP (تحلیل مخاطرات و نقاط کنترل بحرانی) در تمامی کشتارگاه‌های صنعتی طیور این کشور اجرایی شد (۱۶). مولدر (۱۹۹۹) ضمن ارائه گزارش‌هایی در نشست‌های اتحادیه اروپا در زمینه کیفیت گوشت مرغ از سال ۱۹۷۷ تا ۱۹۹۸، بهداشت گوشت طیور را در حین حمل و نقل، کشتار و فرآوری مورد بررسی قرار داده و عنوان نمود که پیاده‌سازی فناوری‌های جدید (اتوماسیون در فرایند کشتار)، ضمن جلوگیری از بروز آلودگی‌های متقاطع در محصول سبب کاهش انتقال میکروارگانیسم‌ها به لاشه می‌شود (۱۷).

در ایران نیز کاهش کیفیت بهداشتی گوشت مرغ به دلیل آلودگی متقاطع محصولات در خط کشتار سنتی و نیمه‌صنعتی گزارش شده است که دلیل بروز این آلودگی‌ها تماس محصول با مدفوع و عدم رعایت بهداشت محیط و پرسنل است (۱۸). طبق گزارش سازمان دامپزشکی کشور (۱۳۹۷) در ایران حدود ۵۳۰ کشتارگاه دام و طیور فعالیت دارند که از این میان، تنها ۲۵ کشتارگاه به صورت صنعتی فعالیت می‌کنند. با توجه به خطرات مرتبط با آلودگی و فساد گوشت‌های شترمرغ، بررسی کیفیت این محصول و مقایسه نتایج کشتار سنتی و کشتار صنعتی امری ضروری به نظر می‌رسد. با بررسی فیزیکوشیمیایی گوشت شترمرغ می‌توان میزان بروز فساد در این نمونه‌ها را مورد بررسی قرار داد و با مطالعات میکروبی نیز می‌توان میزان آلودگی، نوع عامل بیماری‌زا و راه‌های احتمالی انتقال میکروارگانیسم‌ها را در نمونه‌های گوشت کشتار سنتی و صنعتی شناسایی نمود (۲).

مواد و روش‌ها

جهت نمونه‌برداری، از یک مزرعه پرورش شتر مرغ واقع در استان تهران، ۲۰ قطعه شترمرغ از نژاد آفریقای شرقی (*Struthio camelus camelus*)، با بازه سنی ۱۰ الی ۱۴ ماهه و بازه وزنی ۱۱۰ الی ۱۴۰ کیلوگرم، از هر دو جنس نر و ماده، در تابستان سال ۱۳۹۷ انتخاب شد. شترمرغها تحت شرایط نگهداری و شرایط غذایی مناسب و یکسان به مدت یک هفته تحت نظر قرار گرفتند و سپس تحت شرایط مشابه (عدم بیماری) ۱۰ قطعه به محل کشتار سنتی (مزرعه خصوصی واقع در استان مرکزی) و ۱۰ قطعه به کشتارگاه صنعتی (یکی از کشتارگاه‌های صنعتی استان تهران) انتقال داده شدند و پس از ۴ ساعت انتظار، کشتار آن‌ها انجام گرفت. در روش کشتار سنتی مراحل بریدن سر، پرکنی، پوست‌کنی و تخلیه امعاء و احشاء بر روی زمین و به وسیله یک فرد صورت گرفت. در روش کشتار صنعتی ابتدا بی‌حسی شترمرغها با شوک جریان متناوب الکتریکی ۴۵۰ میلی‌آمپر و با بسامد ۵۰ هرتز به مدت ۱۰ ثانیه انجام گرفت. پس از بریدن سر، لاشه‌ها از سمت پا آویزان شده و مراحل بعدی شامل پرکنی، پوست‌کنی، تخلیه امعاء و احشاء و شقه کردن توسط دستگاه اتوماتیک و در حالت آویزان انجام شد. سپس ناحیه ران هر لاشه برش داده شد و از قسمت‌های داخلی و خارجی گوشت آن به میزان حدود ۲۰۰ گرم نمونه‌برداری شده و درون کیسه‌های پلاستیکی استریل، با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی کرج انتقال داده شدند. بدین ترتیب دو گروه شامل ۱۰ نمونه گوشت کشتار سنتی و ۱۰ نمونه گوشت کشتار صنعتی از نظر ویژگی‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی با هم مقایسه گردید.

آزمون‌های میکروبی: ۲۵ گرم از هر نمونه به همراه ۲۲۵ میلی‌لیتر پپتون واتر (مرک، آلمان) در شرایط استریل به کیسه پلاستیکی استریل انتقال داده شد و به کمک دستگاه مخلوط‌کن (استومیکر اینترسایسنس، فرانسه) به مدت یک دقیقه همگن گردید. سپس از رقت اولیه (رقت 10^{-1}) ساخته شده، در لوله‌های محتوی ۹ میلی‌لیتر محلول پپتون سالت (مرک، آلمان)، رقت‌های متوالی ده برابر تا 10^{-6} تهیه شد. طبق دستورالعمل سازمان استاندارد ایران شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی با استفاده از روش کشت سطحی در محیط کشت پلیت کانت آگار (مرک، آلمان) در ۷۲ h/ ۳۰ °C انجام شد. شمارش باکتری‌های سرماگرا با استفاده از کشت سطحی بر محیط کشت پلیت کانت آگار (مرک، آلمان) و انکوباسیون در دمای ۶/۵°C به مدت ۱۰ روز انجام شد. جهت شمارش و تأیید کلی‌فرم‌ها از محیط کشت ویولت رد بایل لاکتوز آگار (مرک، آلمان) به روش کشت مخلوط دو لایه در ۲۴ h/ ۳۷ °C و سپس کشت در محیط بریلیانت بلو براث (مرک، آلمان) در ۴۸ h/ ۳۷ °C استفاده شد. جهت شناسایی و شمارش *اشریشیا کلی* از محیط کشت لوریل سولفات براث (مرک، آلمان) به روش ۳ MPN لوله‌ای در ۴۸-۲۴ h/ ۳۷ °C، کشت در محیط اختصاصی *اشریشیا کلی* براث (مرک، آلمان) در ۴۸-۲۴ h/ ۴۴ °C و سپس کشت در محیط پپتون واتر در ۴۸ h/ ۴۴ °C و آزمون اندول استفاده شد. شمارش *استافیلوکوکوس ارئوس* از طریق کشت سطحی بر محیط برد پارکر آگار (مرک، آلمان) و انکوباسیون در ۴۸ h/ ۳۷ °C و سپس تایید به کمک آزمون کواگولاز استفاده شد. شناسایی *سالمونلا* نیز طی مراحل پیش‌غنی‌سازی با رقت ۲۵g/۲۲۵ml در آب پپتونه ۱۸ h/ ۳۷ °C، غنی‌سازی در محیط راپاپورت واسیلیادیس سوی براث (مرک، آلمان) در ۲۴ h/۴۱/۵ °C و در محیط مولر-کافمن تتراتیونات

نوبیوسین (مرک، آلمان) در ۳۷ °C/۲۴ h، کشت افتراقی و تکمیلی به صورت کشت سطحی دوتایی بر روی محیط‌های کشت XLD و بیسموت سولفیت (مرک، آلمان) در ۳۷ °C/۲۴ h و سپس تأیید کلنی‌های رشد یافته به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی در محیط‌های کشت سه قندی آهن دار، لیزین آگار حاوی آهن و اوره (مرک، آلمان) و آزمون‌های سرولوژیکی صورت گرفت (۲۴-۱۹).

آزمون‌های فیزیکوشیمیایی: جهت اندازه‌گیری رطوبت گوشت، میزان کاهش وزن نمونه پس از خشک کردن به مدت ۲ ساعت در آون (ممرت، آلمان) در دمای ۱۰۳ °C تعیین شد. مقدار پروتئین به روش کلدال و به کمک دستگاه تکاتور انجام شد. مراحل آزمایش شامل هضم مواد آلی توسط اسید سولفوریک (مرک، آلمان) و سپس عیار سنجی محتوی آمونیاک آزاد تقطیر شده به عنوان فاکتوری قراردادی جهت محاسبه پروتئین خام بود. میزان خاکستر کل به کمک خشک کردن، کربونیزه کردن و سپس خاکستر نمودن نمونه‌های گوشت شترمرغ در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس در کوره، سپس سرد کردن و نهایتاً توزین باقی مانده حاصله بود. چربی کل به روش سوکسله تعیین شد. برای این منظور چربی هر یک از نمونه‌ها به وسیله اتر دوپترول خالص (مرک، آلمان) دردمای ۱۰۱ درجه سلسیوس استخراج شده و سپس حلال به وسیله تقطیر و خشک کردن از بین برده شد و در نهایت باقی‌مانده به کمک ترازو اندازه‌گیری شد (۲۸-۲۵).

نتایج به دست آمده از آزمون‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی با مقادیر مجاز مربوطه مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۱). در آزمون‌هایی که استاندارد ملی ایران حد مجاز را مشخص نموده است، نمونه‌های دارای مقادیر خارج از حد مجاز به عنوان موارد معیوب در نظر گرفته شد (۲۹).

جدول ۱- حدود استاندارد برای گوشت شترمرغ بر اساس استاندارد ملی ایران ۱۸۳۸۴ (۲۹)

	شرح آزمون	حد استاندارد	حداکثر تعداد معیوب قابل اغماض
آزمون‌های میکروبی	شمارش میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی	کمتر از Log_{10} CFU ۴ در گرم	۳ نمونه از ۵ نمونه (۶۰ درصد)
	شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا	*	*
	شمارش میکروارگانیسم‌های کلی‌فرم	*	*
	اشریشیا کلی	کمتر از Log_{10} CFU ۱/۷ در گرم	۲ نمونه از ۵ نمونه (۴۰ درصد)
	استافیلوکوکوس ارئوس	*	*
	سالمونلا	منفی در ۲۵ گرم	هیچ یک از نمونه‌ها
آزمون‌های فیزیکوشیمیایی	رطوبت	*	*
	پروتئین	بیشتر از ۲۰ گرم در ۱۰۰ گرم	میانگین نتایج ملاک است
	خاکستر	*	*
	چربی	کمتر از ۲ گرم در ۱۰۰ گرم	میانگین نتایج ملاک است

* در این موارد استاندارد ملی ایران حدود مجاز را مشخص نکرده است.

تجزیه و تحلیل آماری: برای محاسبه نتایج از نرم‌افزار SPSS Statistics نسخه IBM ۲۵ تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد. پس از بررسی میانگین و انحراف معیار شاخص‌های وابسته کمی این مطالعه در هر گروه، جهت مقایسه نتایج بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون T مستقل با حد احتمال $p<۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج

میانگین و انحراف معیار هر یک از شاخص‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی مورد بررسی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، میزان شمارش میکروبی در تمامی موارد در گروه کشتار سنتی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه صنعتی بود ($p<۰/۰۵$).

در مورد شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی و شمارش *اشریشیا کلی* و همچنین شناسایی *سالمونلا*، نتایج به دست آمده برای هر گروه با حدود مجاز میکروبی مورد مقایسه قرار گرفته و درصد موارد معیوب برای هر شاخص محاسبه شد (نمودار ۱). در هر دو گروه گوشت‌های شترمرغ کشتار سنتی و صنعتی، میزان باکتری‌های مزوفیل هوازی در تمام نمونه‌ها بیش از حد مجاز میکروبی (Log_{10} CFU/g ۴) بوده و از این نظر در مقایسه با میزان استاندارد غیرقابل پذیرش است، ولی تعداد میکروارگانیسم‌ها در گروه کشتار سنتی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کشتار صنعتی بود ($p<۰/۰۵$). در مورد *اشریشیا کلی* در گروه کشتار سنتی ۱۰ نمونه (۱۰۰ درصد) و در گروه کشتار صنعتی ۲ نمونه (۲۰ درصد) موارد معیوب بود که از این لحاظ نمونه‌های مربوط به کشتار سنتی غیرقابل پذیرش و نمونه‌های مربوط به کشتار صنعتی قابل پذیرش بودند. تعداد موارد معیوب قابل پذیرش برای *سالمونلا* صفر است و از این نظر نمونه‌های هر دو گروه کشتار سنتی با ۶ مورد (۶۰ درصد) و گروه کشتار صنعتی با ۲ مورد (۲۰ درصد) غیرقابل پذیرش بودند.

نتایج مربوطه به آزمون‌های فیزیکوشیمیایی بین دو گروه گوشت شترمرغ اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). میزان پروتئین در گروه کشتار سنتی کمتر از حد مجاز (بیش از ۲۰ درصد) بود؛ اما در گروه کشتار صنعتی این میزان در محدوده مجاز قرار داشت. میزان چربی در هر دو گروه سنتی و صنعتی در محدوده مجاز (کمتر از ۲ درصد) بود.

بحث و نتیجه‌گیری

گوشت قرمز اصلی‌ترین و کامل‌ترین منبع برای رفع نیاز پروتئینی انسان است. پیدایش برخی چالش‌ها از جمله وقوع بیماری‌های جدید نظیر بیماری اسفنجی شکل گاوان، صنعت گوشت قرمز دام را با مشکل و نگرانی مواجه کرده است. از طرفی گوشت قرمز به علت بالا بودن میزان کلسترول آن، برای برخی بیماران نظیر بیماران قلبی و نیز افراد مسن ضرر دارد. از منابع جدید پروتئینی می‌توان به شتر مرغ اشاره کرد که اگر چه یک پرنده می‌باشد، ولی گوشت آن به عنوان یک گوشت قرمز به شمار می‌آید. گوشت شترمرغ دارای کلسترول پایین و اسیدهای چرب غیراشباع بالا و از نظر آهن بسیار غنی است، علاوه براین در مقوله بیماری‌های خطرناک و مشترک بین انسان و دام، مصرف آن در مقایسه با گوشت‌های قرمز دیگر نظیر گوشت گاو و گوسفند ایمن‌تر می‌باشد. همچنین مصرف این گوشت‌ها برای بیماران قلبی، ورزشکاران، خانم‌های باردار، کودکان و افراد مسن بسیار مناسب و توصیه شده است (۲، ۱).

جدول ۲- لگاریتم میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی در گوشت شترمرغ‌های کشتار سنتی و صنعتی

	نوع آزمون	نمونه‌های کشتار سنتی	نمونه‌های کشتار صنعتی
آزمون‌های میکروبی	میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی (Log_{10} CFU/g)	۷/۳۸±۱/۱۶ a	۴/۳۳±۰/۲۱ b
	میکروارگانیسم‌های سرماگرا (Log_{10} CFU/g)	۴/۵۷±۰/۶۵ a	۳/۷۹±۰/۶۰ b
	میکروارگانیسم‌های کلی‌فرم (Log_{10} CFU/g)	۴/۴۷±۱/۷۸ a	۳/۲۰±۰/۳۷ b
	باکتری اشریشیا کلی (Log_{10} MPN/g)	۲/۳۷±۰/۶۴ a	۰/۴۰±۱/۲۰ b
	باکتری استافیلوکوکوس ارئوس (Log_{10} CFU/g)	۴/۳۰±۱/۰۶ a	۲/۴۳±۰/۲۱ a
	باکتری *سالمونلا* (تعداد موارد مثبت)	۶ a مورد از ۱۰ نمونه	۲ a مورد از ۱۰ نمونه
آزمون‌های فیزیکوشیمیایی	رطوبت (درصد)	۷۷/۶۴±۴/۰۶ a	۷۵/۵۸±۱/۹۹ a
	پروتئین (درصد)	۱۸/۹۲±۱/۳۳ a	۲۰/۲۲±۱/۴۵ a
	خاکستر (درصد)	۱/۴۵±۰/۳۶ a	۱/۲۸±۰/۲۱ a
	چربی (درصد)	۱/۳۰±۰/۲۷ a	۱/۵۴±۰/۲۳ a

* حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف آماری ($p\leq ۰/۰۵$) می‌باشد.

تحلیل نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو گروه گوشت‌های شترمرغ کشتار سنتی و صنعتی از نظر میکروبی غیرقابل پذیرش هستند. اما تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های کشتار صنعتی به طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های کشتار سنتی بوده است ($p<۰/۰۵$).

مقایسه نتایج این مطالعه با سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه دشوار است، زیرا تا کنون تحقیقات مستندی در مورد وضعیت میکروبی گوشت شترمرغ در کشتارگاه‌های ایران انجام نشده است و هم اکنون کشتار صنعتی شترمرغ در کشتارگاه دام صورت می‌پذیرد. در مطالعات مختلف روش‌های نمونه‌برداری، شناسایی و شمارش میکروبی با هم متفاوت است و این امر می‌تواند موجب اخلال در مقایسه نتایج گردد. علاوه بر آن در اغلب مطالعات، محققین تمایل بیشتری به بررسی تاثیر شرایط نگهداری بر روی کیفیت گوشت داشته‌اند و شرایط کشتار دام کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۳۸-۳۰).

اوتمبا و همکاران (۱۹۹۹) لاشه ۳ نمونه شترمرغ را که به مدت ۵ روز در دمای ۴۰- درجه سلسیوس قرار داشت، از نظر میکروبی و خصوصیات حسی بررسی نموده و تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی و باکتری‌های سرماگرا را به ترتیب حدود ۴ و ۲ Log_{10} CFU/g گزارش نمودند (۳۰). آلونسو کالیا و همکاران (۲۰۰۴) در کشور اسپانیا ۲۰ نمونه گوشت شترمرغ بسته بندی شده را ۳ الی ۷ روز پس از تولید از نظر میکروبی مورد مطالعه قرار دادند. میانگین باکتری‌های مزوفیل هوازی، باکتری‌های سرماگرا و کلی‌فرم‌ها به ترتیب ۷/۳۲، ۶/۶۲ و ۵/۲۹ Log_{10} CFU/g بود که به نظر می‌رسد افزایش موارد میکروبی با طولانی شدن زمان نگهداری آن‌ها در ارتباط باشد (۳۱). کاپیتا و همکاران (۲۰۱۸) خصوصیات میکروبی ۲۳ نمونه لاشه شترمرغ افریقایی را در یکی از کشتارگاه‌های صنعتی اسپانیا، در طی دوره نگهداری یخچالی بررسی کرده و در روز صفر (قبل از یخچال‌گذاری) شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، باکتری‌های سرماگرا و

کلی‌فرم را به ترتیب ۳/۲۱، ۲/۹۴ و Log_{10} CFU/g ۰/۵۹ گزارش نمودند (۳۲). کارما و همکاران (۲۰۰۳) ۶۰ لاشه شترمرغ ذبح شده در یکی از کشتارگاه‌های صنعتی افریقای جنوبی را مورد بررسی میکروبی قرار دادند و لگاریتم تعداد میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم و *استافیلوکوکوس ارئوس* را به ترتیب ۴/۳۲±۰/۶۲، ۲/۵۵±۱/۵۳ و CFU/cm^2 ۲/۸۹±۰/۷۸ Log_{10} گزارش نمودند. همچنین ۱۸/۸ درصد نمونه‌ها آلوده به باکتری *اشریشیا کلی* بوده و میانگین تعداد *اشریشیا کلی* در این نمونه‌ها Log_{10} CFU/cm^2 ۲/۱۵±۰/۹۴ بود. آلودگی‌های گزارش شده در مطالعات فوق نشان می‌دهد که به دلیل حساسیت بسیار بالای گوشت شترمرغ در آلودگی‌های میکروبی، به کار گرفتن فناوری‌های کشتار صنعتی به تنهایی نمی‌تواند موجب کاهش آلودگی میکروبی در این فراورده شود و تامین سلامت گوشت صرفاً با رعایت کامل HACCP از مزرعه اولیه تولید شترمرغ امکان‌پذیر است (۳۳).

در طی هر یک از مراحل کشتار شترمرغ شامل ذبح، خون‌گیری، پر کنی، پوست‌کنی، تخلیه امعاء و احشاء و شقه کردن، شرایط انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مولد فساد به لاشه شترمرغ فراهم بوده و در صورت عدم دقت‌های لازم در کنترل بهداشتی مواد، تجهیزات و پرسنل، گوشت محیط مساعدی برای رشد انواع میکروارگانیسم‌ها خواهد بود. در ضمن مطالعات مختلف نشانگر آن است که عوامل مختلفی از جمله استراتژی تغذیه و پرورش، نژاد، نحوه حمل قبل از کشتار، روش بی‌حسی و نحوه کشتار می‌تواند بر روی کیفیت میکروبی گوشت شترمرغ موثر باشد (۵، ۲). کلوت (۲۰۱۰) از ۲ کشتارگاه صنعتی کشور افریقای جنوبی طی ۷ ماه، ۱۲۰ نمونه گوشت شترمرغ را مورد بررسی قرار داد. میانگین باکتری‌های مزوفیل هوازی در این مطالعه در نمونه‌های تازه ذبح شده Log_{10} CFU/g ۱/۸۸ بود که نسبت به مطالعه حاضر کمتر است. وی درصد آلودگی به کلی‌فرم، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا* را به ترتیب ۹۹/۱۷ درصد، ۳۳/۳۳ درصد و ۰/۸۳ درصد ذکر نمود. باید توجه داشت که شناسایی نهایی *سالمونلا* در تحقیق فوق به روش مولکولی انجام شده است که نسبت به کشت میکروبی روش دقیق‌تری است. همچنین در مطالعه حاضر درصد نمونه‌های گوشت شترمرغ آلوده به *سالمونلا*، در کشتارگاه‌های صنعتی و سنتی به ترتیب ۲۰ درصد و ۶۰ درصد می‌باشد. با توجه به این که *سالمونلا* یک پاتوژن روده‌ای محسوب می‌شود به نظر می‌رسد این میکروارگانیسم در کشتار سنتی در مقایسه با کشتار صنعتی، در حین عدم تخلیه صحیح امعا و احشا به سطح گوشت انتقال یافته است (۳۴). پیش از این جداسازی *سالمونلا* از نقاط مختلف بدن شترمرغ گزارش شده است. ونهوسر و ولش (۱۹۹۵) از روده و کبد ۱۸/۵ درصد نمونه‌های شترمرغ باکتری *سالمونلا* را جداسازی نمودند (۳۵). گوپا و باندا (۱۹۹۷) عنوان نمودند که *سالمونلا* از پرهای ۵۱ درصد شترمرغ‌ها در بدو ورود به کشتارگاه جداسازی شده است (۳۶). در مطالعات هریس و همکاران (۱۹۹۳) میزان شیوع *سالمونلا* را مشابه با مطالعه حاضر، در کشتارگاه‌های صنعتی شترمرغ واقع در ایالت تگزاس ۲۰ درصد گزارش نمودند و همچنین میکروارگانیسم مزبور از سطح پوست ۵/۶ درصد نمونه‌ها جداسازی شد (۳۷).

آلودگی گوشت به باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* اغلب از طریق دست کارکنان و در حین دستکاری لاشه شترمرغ صورت می‌گیرد و آلودگی به باکتری‌های کلی‌فرم نیز می‌تواند از طریق آب، گرد و غبار و همچنین نظیر *اشریشیا کلی* ازطریق انتقال آلودگی‌های مدفوعی (انسان و یا دام) به لاشه

شتر مرغ صورت گرفته باشد. در این مطالعه تمامی نمونه‌ها آلوده به استافیلوکوکوس ارئوس بوده ولی تعداد آن در نمونه‌های کشتارگاه‌های سنتی به طور معناداری بیشتر از گروه کشتار صنعتی است. همچنین تعداد نمونه‌های دارای *اشریشیا کلی* بیش از حد مجاز در کشتارگاه‌های صنعتی ۲۰ درصد و در کشتارگاه‌های سنتی ۱۰۰ درصد بوده است. لی و همکاران (۲۰۰۱) گوشت شترمرغ ۹ کشتارگاه واقع در ایالت‌های اوهایو و ایندیانای کشور ایالات متحده را مورد بررسی قرار داده و درصد آلودگی به *اشریشیا کلی* را ۹۱ درصد ذکر نمودند (۳۸). گیل و همکاران (۲۰۰۰) در یک کشتارگاه صنعتی کشور ایالات متحده آلودگی به *اشریشیا کلی* را در ۶ دام مختلف (گاو اهلی، گاو وحشی، خوک، گوزن، شترمرغ افریقایی و شترمرغ استرالیایی) مورد بررسی قرار دادند که بیشترین درصد آلودگی پس از گوزن در شترمرغ افریقایی (۷۲ درصد) و شترمرغ استرالیایی (۶۴ درصد) گزارش شد (۳۹).

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیفیت گوشت خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن می‌باشد. ناوینا و همکاران (۲۰۱۳) درصد رطوبت، پروتئین، خاکستر و چربی را در ۵ نمونه شترمرغ استرالیایی که در یک کشتارگاه سنتی ایالت ایندیانا ذبح شده بود، به ترتیب ۷۳/۸۰، ۲۲/۸۶، ۰/۸۴ و ۱/۸۱ ذکر نمودند (۴۰). سیلز (۱۹۹۵) ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی گوشت ۳۹ قطعه شترمرغ افریقایی که به روش صنعتی در کشور افریقای جنوبی ذبح شده بودند را مورد بررسی قرار داده و شاخص‌های فوق را به ترتیب ۷۶/۶، ۲۰/۹، ۱/۱۴ و ۰/۴۸ درصد ذکر نمود (۴۱). در مطالعه حاضر نیز این شاخص‌ها در نمونه‌های کشتار سنتی به ترتیب ۷۷/۶۴، ۱۸/۹۲، ۱/۴۵ و ۱/۳۰ درصد و در نمونه‌های کشتار صنعتی به ترتیب ۷۵/۵۸، ۲۰/۲۲، ۱/۲۸ و ۱/۵۴ درصد ذکر شد که در محدوده نتایج سایر مطالعات است. در این مطالعه شاخص‌های فیزیکوشیمیایی بین نمونه‌های کشتار سنتی و نمونه‌های کشتار صنعتی تفاوت معناداری نداشت. اما درصد پروتئین در نمونه‌های کشتار سنتی از حدمجاز کمتر می‌باشد که احتمالاً به دلیل زیاد بودن میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی (میانگین Log_{10} CFU/g ۱/۱۴±۷/۳۸) و امکان بروز فساد میکروبی در این نمونه‌ها است.

در ایران نیز پیرزمانی و خانی امین‌آبادی (۱۳۹۶) کیفیت محصولات عمل‌آوری شده به روش صنعتی و نیمه‌صنعتی را در کشتارگاه‌های طیور استان تهران و سمنان مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج این مطالعه تعداد میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی در نمونه‌های کشتار صنعتی به طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های کشتار نیمه‌صنعتی بود. با توجه به این که در کشتار نیمه‌صنعتی نقل و انتقال لاشه با کمک دست صورت می‌گیرد، آلودگی با میکروارگانیسم‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس ارئوس* در فراورده‌های به دست آمده از لاشه‌های کشتار نیمه‌صنعتی به ترتیب ۴۴ و ۸ درصد بود، در حالی که آلودگی به این دو میکروارگانیسم در نمونه‌های کشتار صنعتی مشاهده نشد (۱۸). در مطالعه حاضر در مورد شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی تعداد میکروارگانیسم‌ها در گروه کشتار صنعتی حدود ۳ واحد لگاریتمی، در مورد *استافیلوکوکوس ارئوس* و *اشریشیا کلی* ۲ واحد لگاریتمی و در مورد کلی‌فرم‌ها و باکتری‌های سرماگرا تعداد میکروارگانیسم‌ها حدود ۱ واحد لگاریتمی کمتر است. این کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به دلیل انجام شوک قبل از ذبح، نحوه مناسب‌تر پرکنی، پوست‌کنی و تخلیه امعاء و احشاء در روش کشتار صنعتی باشد. همچنین در کشتارگاه‌های صنعتی الزامات بهداشتی برای تجهیزات، محیط و پرسنل به طور موثرتری

اجرا می‌شود.

با توجه به مشابهت بسیار نزدیک خصوصیات گوشت شترمرغ با گوشت گاو و روش مشابه ذبح آن‌ها، می‌توان به مطالعات انجام شده در این زمینه اشاره نمود (۳۳). موکارتینی و همکاران (۱۹۹۵) نمونه‌های گوشت گاو کشتارگاه‌های سنتی و نیمه‌صنعتی را در کشور اندونزی از نظر میکروبی با هم مورد مقایسه قرار دادند و با توجه به نتایج، تفاوت قابل توجهی بین نمونه‌های کشتارگاه‌های سنتی و نیمه‌صنعتی از نظر آلودگی به *سالمونلا* (به ترتیب ۱۳/۶ و ۱۵/۵ درصد) و *اشریشیا کلی* (۷۷/۳ و ۷۹/۸ درصد) مشاهده نشد (۴۲).

بهاندار و همکاران (۲۰۰۷) آلودگی میکروبی در نمونه‌های گوشت بز و گوسفند را در ۹۶ نمونه کشتارگاه صنعتی و ۱۴۴ نمونه کشتارگاه سنتی را در کشور هند با هم مقایسه نمودند. هر چند در مرحله پوست‌کنی و تخلیه امعاء و احشاء شمارش میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی در دو گروه تفاوتی نداشتند، اما پس از آب‌کشی نهایی میزان آلودگی در گروه کشتار سنتی حدود Log_{10} CFU/cm^2 ۱ بیشتر از گروه کشتار صنعتی بود که از نظر آماری میزان قابل توجهی است ($p<۰/۰۵$). همچنین در گروه کشتار سنتی ۱۶/۵ درصد از نمونه‌ها آلوده به *سالمونلا* بودند که این آلودگی در هیچ کدام از دام‌های کشتار صنعتی مشاهده نشد (۴۳).

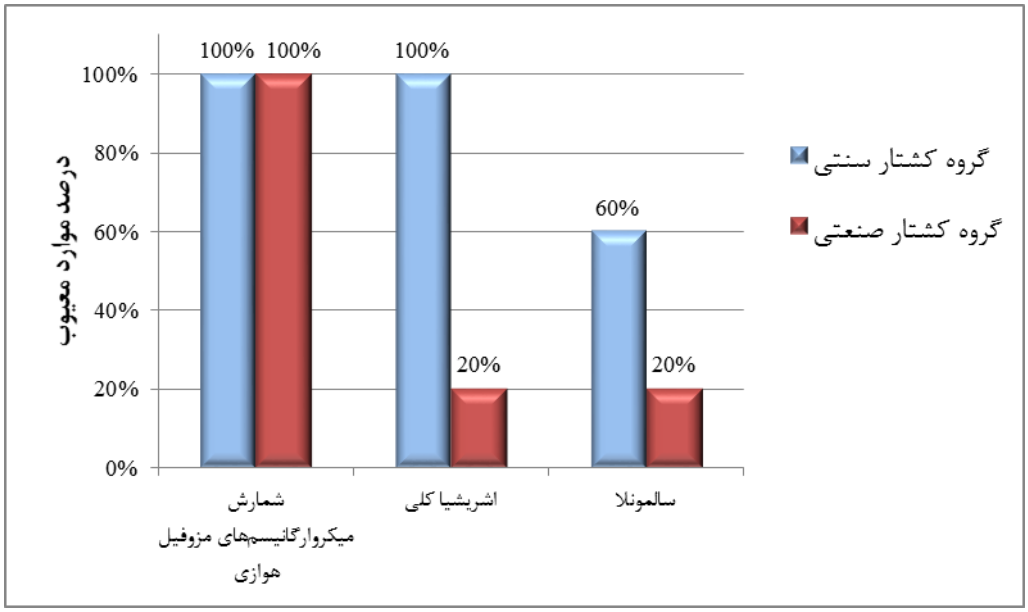
در تحقیق حاضر مقایسه نتایج به دست آمده با حدود مجاز نشان می‌دهد که از نظر حد مجاز باکتری‌های مزوفیل هوازی (کمتر از Log_{10} CFU/g ۴)، *اشریشیا کلی* (کمتر از Log_{10} CFU/g ۱/۷) و *سالمونلا* (منفی در ۲۵ گرم) در نمونه‌های کشتار سنتی به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد و ۶۰ درصد و در نمونه‌های کشتار صنعتی به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۲۰ درصد و ۲۰ درصد نمونه‌ها معیوب است.

با توجه به این که درصد مجاز موارد معیوب برای شاخص‌های ذکر شده در مورد کشتار صنعتی به ترتیب ۶۰، ۴۰ و صفر درصد است، بنابراین نمونه‌های کشتار سنتی در هر سه مورد و نمونه‌های کشتار صنعتی در مورد باکتری‌های مزوفیل هوازی و *سالمونلا* غیرقابل پذیرش است.

بنابراین جهت کاهش آلودگی‌های میکروبی گوشت شترمرغ که از ابتدای پرورش شترمرغ در مزرعه مدنظر قرار می‌گیرد، بر صنعتی‌شدن کشتار شترمرغ تاکید می‌گردد. به نظر می‌رسد کشتار صنعتی، دستکاری‌های زاید لاشه توسط کارکنان کشتارگاه را تا حدود زیادی حذف و سبب رعایت اصول بهداشتی و همچنین الزام به نظارت و بازرسی دائمی دکتر دامپزشک بر کشتار، لاشه و بهداشت کشتارگاه می‌گردد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم مزرعه گلبرگ طوبی که در فراهم کردن تسهیلات و کمک‌های مالی و تکنیکی همکاری نموده‌اند، تشکر به عمل می‌آید.



نمودار ۱- درصد موارد معیوب برای شاخص‌های دارای حد مجاز میکروبی در دو گروه شترمرغ‌های کشتار سنتی و صنعتی

References

1- Cooper RG. Ostrich meat, an important product of the ostrich industry: a southern African perspective. Worlds Poult Sci J. 1999; 55(4): 389-402.

2- Mashak Z, Koohdar VA, Radmehr B, The principles of inspection and health meat in livestock and poultry slaughterhouses. Islamic Azad Uniersity Press. Iran. 2016; P: 137 – 213 [In Persian].

3- Grau FH. Microbial ecology of meat and poultry. Advances in meat research. USA; 1986.

4- Nottingham PM. Microbiology of carcass meats. Meat Microbiology. Applied Science Publishers, London; 1982: 46-55.

5- Gracey JF, Collins DS. Meat hygiene practice. Meat Hygiene. Bailliere Tindall; London, 1992: P. 178-204.

6- Roberts D. Bacteria of public health significance. Meat Microbiology. Applied Science Publishers; 1982: P. 331.

7- Gerats GE. What hygiene can achieve--how to achieve hygiene. In Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry: Proc. of the Int. Symposium. Prevention of Contamination, and Decontamination in the Meat Industry. Zeist, The Netherlands, FJM Smulders. Amsterdam: Elsevier, *1987*.

8- Grau FH. Fresh meats-bacterial association. Archiv fur Lebenmittelhygiene, 1979; 30 (3): 87-92.

9- Peel B, Simmons GC. Factors in the spread of Salmonellas in meatworks with special reference to contamination of knives. Aust Vet J. 1978; 54(3): 106-10.

10- Samuel JL, O'Boyle DA, Mathers WJ, Frost AJ. Isolation of Salmonella from mesenteric lymph nodes of healthy cattle at slaughter. Res Vet Sci. 1980; 28(2): 238-41.

11- Samuel JL, O'Boyle DA, Mathers WJ, Frost AJ. The Contamination with Salmonella of bovine livers in an Abattoir. Aust Vet J. 1980; 56(11): 526-8.

12- Sammarco ML, Ripabelli G, Ruberto A, Iannitto G, Grasso GM. Prevalence of Salmonellae, Listeriae, and Yersiniae in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment, and workers. J Food Prot. 1997; 60(4): 367-71.

13- Upmann M, Jakob P, Reuter G. Microbial transfer during cutting and deboning of pork in a small-scale meat processing plant. Dairy, Food Env San. 2000; 20(1): 14-23.

14- Nortje GL, Naumann HD, Laubscher A, Grobler I, Naude L, Oosthuizen W, Jordaan E, Naude RT. Effects of exercise, electrical stimulation and vacuum packaging on bacterial counts and tenderness of fresh beef primal cuts. J Food Prot. 1985; 48(12): 1036-9.

15- Nortje GL, Nel L, Jordaan E, Badenhorst K, Goedhart G, Holzapfel WH, Grimbeek RJ. A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product. Journal of food protection. 1990; 53(5): 411-7.

16- Hupkes H. Automation and hygiene in relation to poultry processing. Factors Affecting the Microbial Quality of Meat 2. Slaughter and Dressing. 1996; 95-8.

17- Mulder RW. Hygiene During Transport, Slaughter and Processing. In Poultry Meat Science. Poultry Science Symposium Series, Vol. 25, Oxford shire, UK: CABI Publishing; 1999, P: 277-285.

18- Prirzamani V, Amin Abadi Khani P. Quality control comparison of processed products in semi-industrial and industrial poultry slaughterhouses. J Vet Microbiol. 2017; 13(1): 55-65 [In Persian].

19- Iranian National Standardization Organization. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part2: Colony count at 30°C by the surface plating technique. INSO. 5272-2. 1st Ed. Iran; 2015 [In Persian].

20- Iranian National Standardization Organization. Microbiology of food and animal feeding Stuffs -Enumeration of psychrotrophicMicroorganisms -Test method. INSO. 2926. 1st Ed. Iran; 2003 [In Persian].

21- Iranian National Standardization Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coliforms. Colony-count technique. INSO. 9263. 1st Ed. Iran; 2007 [In Persian].

22- Iranian National Standardization Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Most probable number technique. INSO. 2946. 2nd Ed. Iran; 2005 [In Persian].

23- Iranian National Standardization Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Enumeration of coagulase Positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Test method Part 1: Technique using baird – parker agar medium. INSO. 6806-1. 1st Ed. Iran; 2005 [In Persian].

24- Iranian National Standardization Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella spp*. INSO. 1810. 4th Ed. Iran; 2015 [In Persian].

25- Iranian National Standardization Organization. Animal feeding stuffs. Determination of moisture and other volatile matter content test method. INSO. 8438. 1st Ed. Iran; 2005 [In Persian].

26- Iranian National Standardization Organization. Animal feeding stuffs. Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. Part 1: Keldahl method. INSO. 10703-1. 1st Ed. Iran; 2007 [In Persian].

27- Iranian National Standardization Organization. Meat and meat products. Determination of total ash test method. INSO. 744. 1st Ed. Iran; 2002 [In Persian].

28- Iranian National Standardization Organization. Animal feeding stuffs – Determination of fat content. INSO. 10700. 1st Ed. Iran; 2007 [In Persian].

29- Iranian National Standardization Organization. Ostrich meat: Specifications. INSO. 18384. 1st Ed. Iran; 2014 [In Persian].

30- Otremba MM, Dikeman ME, Boyle EA. Refrigerated shelf life of vacuum-packaged, previously frozen ostrich meat1. Meat Sci. 1999; 52(3): 279-83.

31- Alonso-Calleja C, Martínez-Fernández B, Prieto M, Capita R. Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. Food Microbiol. 2004; 21(2): 241-6.

32- Capita R, Álvarez-González T, Alonso-Calleja C. Effect of several packaging conditions on the microbiological, physicochemical and sensory properties of ostrich steaks during refrigerated storage. Food Microbiol. 2018; 72: 146-56.

33- Karama M, de Jesus AE, Veary CM. Microbial quality of ostrich carcasses produced at an export-approved South African abattoir. J Food Prot. 2003; 66(5): 878-81.

34- Cloete A. Microbial quality and safety of ostrich meat (Doctoral dissertation). University of the Western Cape, 2010.

35- Vanhooser SL, Welsh RD. Isolation of Salmonella species from ratites. J Vet Diagn Invest. 1995; 7(2): 268-9.

36- Gopo JM, Banda GN. Occurrence of Salmonella on meat and products in an ostrich abbattoir as determined with a DNA probe. S Afr J Anim Sci. 1997; 27(1): 1-6.

37- Harris SD, Morris CA, May SG, Lucia LM, Jackson TC, Hale DS, Miller RK, Keeton JT, Savell JW, Acuff GR. Ostrich meat industry final report. American Ostrich Association, Fort Worth, Texas, USA. 1993.

38- Ley EC, Morishita TY, Brisker T, Harr BS. Prevalence of Salmonella, Campylobacter, and *Escherichia coli* on ostrich carcasses and the susceptibility of ostrich-origin *E. coli* isolates to various antibiotics. Avian Dis. 2001; 45(3): 696-700.

39- Gill CO, Jones T, Bryant J, Brereton DA. The microbiological conditions of the carcasses of six species after dressing at a small abattoir. Food Microbiol. 2000;17(2): 233-9.

40- Naveena BM, Sen AR, Muthukumar M, Girish PS, Praveen Kumar Y, Kiran M. Carcass characteristics, composition, physico-chemical, microbial and sensory quality of emu meat. Br Poult Sci. 2013; 54(3): 329-36.

41- Sales J. Histological, biophysical, physical and chemical characteristics of different ostrich muscles. J Sci Food Agric. 1996; 70(1): 109-14.

42- Mukartini S, Jehne C, Shay B, Harper CM. Microbiological status of beef carcass meat in Indonesia. J Food Saf. 1995; 15(4): 291-303.

43- Bhandare SG, Sherikar AT, Paturkar AM, Waskar VS, Zende RJ. A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. Food Cont. 2007; 18(7): 854-8.

Comparison of Microbial and Physico-Chemical Characteristics of Ostrich Meat in Traditional and Industrial Slaughtering

Zohreh Mashak [1], Mohammad-Saeed Yarmand [2*], Ali Mojadar Langrodi[3]

1- Associate professor, Department of food hygiene and quality control, Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic Azad University,Karaj, Iran.
2- Associate professor, Department of food hygiene and quality control, Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic Azad University,Karaj, Iran.
3- Graduate of phD. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Receive: February 10, 2019; Revise: March 2, 2019; Accept: March 11, 2019

Summary

Ostrich meat has a very high nutritional value and its slaughtering can be carried out in a traditional method outside the slaughterhouse, on the ground floor and without mechanized equipment or can be carried out in the industrial method in the livestock slaughterhouse, hanging from the roof rails and with mechanized equipment. Considering the greater risk of contamination of ostrich meat in traditional killing, the aim of this study was to compare the microbial and physico-chemical characteristics of ostrich meat between two traditional and industrial slaughtering methods. 20 healthy ostriches were selected according to the same breeding conditions, and 10 pieces were slaughtered by traditional method and 10 pieces were slaughtered by industrial method. Microbiological characteristics (counting of psychrotrophic, mesophilic aerobic bacteria, *Staphylococcus areues* and coliform, and identification of *E. coli* and *salmonella*) and physico-chemical measurements (protein, fat, moisture and ash) were analyzed. In all microbial tests, the number of microorganisms in the traditional slaughtering group were significantly higher than industrial killing ($p < 0.05$). The results of physico-chemical tests showed no significant difference between two groups of ostrich meat but the percentage of protein in traditional slaughtering samples was lower than acceptable range, which is probably due to microbial degradation in these samples. Therefore, it is recommended that ostrich slaughtering be carried out in industrial slaughterhouses and with the principles of hygienic packaging so that this product can be provided under better sanitation conditions for supply to consumers.

Key words: *Traditional Slaughtering, Industrial Slaughtering, Slaughterhouse, Ostrich meat*

بررسی اثرات بالینی Marbofloxacin بر ورم پستان‌های بالینی ناشی از *E.coli* در گاوهای شیری نژاد هلشتاین

مسعود طالب خان گروسی[1*]، بابک خرمیان طوسی[2]، ایرج نوروزیان [3]

۱- گروه مامایی و بیماریهای تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران.
۲- بخش مامایی و بیماریهای تولید مثل، گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی، ایران.
۳- استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

دریافت مقاله: ۲۱ بهمن ۱۳۹۷، بازنگری: ۱۱ اسفند ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۳۹۷

چکیده

ورم پستان‌های محیطی در سال‌های اخیر به دلیل کنترل عوامل ایجادکننده ورم پستان‌های واگیردار، افزایش چشم‌گیری یافته است. داروی آنتی‌باکتریال Marbofloxacin از مشتقات Carboxylic acid، نسل سوم از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده Fluoroquinolone است. این آنتی‌بیوتیک فعالیت ضد باکتریال در مقابل باکتری‌های گرم منفی و مثبت دارد. هدف از این بررسی، مطالعه‌ی مقایسه‌ای اثرات بالینی دو محلول تزریقی Marbofloxacin روی درمان ورم پستان محیطی گاوهای شیری با عامل *E.Coli* است. نمونه‌ها از ۸۶ رأس گاو نژاد هلشتاین مبتلا به ورم پستان بالینی تهیه و کشت باکتریایی انجام شد. ۵۰ رأس از دام‌ها آلوده به *E. Coli* بودند که پس از تشخیص آزمایشگاهی، درمان آنها شروع شد. دام‌ها به دو گروه یک و دو تقسیم شدند. دام‌های گروه یک (۲۵ رأس) محلول تزریقی Marbofloxacin (با نام تجاری Kelbomar شرکت دارویی KELA. N. V بلژیک)، به میزان 2mg/kg (۱ میلی‌لیتر/ ۵۰ کیلوگرم وزن زنده دام) را به صورت داخل عضلانی به مدت ۳ روز مستمر دریافت کردند. دام‌های گروه دو (۲۵ رأس) با آنتی‌بیوتیک تزریقی Marbofloxacin با نام تجاری Marbox ساخت شرکت دارویی: Ceva Sante Animal (فرانسه) به میزان 2mg/kg (۱ میلی‌لیتر/ ۵۰ کیلوگرم وزن زنده دام) به صورت عضلانی به مدت ۳ روز، تحت درمان قرار گرفتند. دام‌ها در گروه یک و دو، به ترتیب: ۴۰ و ۵۲ درصد بهبود یافتند. اختلاف آماری معنی‌داری با استفاده از آزمون مربع کای بین دو گروه یک و دو مشاهده نشد (P>0.05).

کلمات کلیدی: *گاو های شیری، ورم پستان، E.coli، Marbofloxacine*

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

مقدمه

هدف از درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، حذف و ریشه‌کنی بیماری‌های عفونی از بدن دام است. درمان با آنتی‌بیوتیک باید همراه با حداقل خطر ایجاد مقاومت باشد تا نه تنها در دراز مدت بتواند کارایی خود را حفظ نماید. بلکه به گونه‌ای باشد که با مصرف مواد پروتئینی با منشأ دامی، منجر به بروز بیماری با باکتری‌های مشترک نگردد. این مسأله به خصوص در مورد استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر Fluoroquinolone ها مطرح است (۱، ۲).

بسیاری از سروتایپ‌های *E.coli* قادر به ایجاد ورم پستان هستند. بروز ورم پستان‌های محیطی در سال‌های اخیر به دلیل کنترل عوامل ایجادکننده ورم پستان‌های واگیردار، افزایش چشم‌گیری یافته است. ورم پستان‌های بالینی با واسطه E.coli در درجه‌ی اول عامل اولیه ایجادکننده ورم پستان‌های تحت بالینی می‌باشد. بیشترین فراوانی عوامل ورم پستان‌های بالینی به ترتیب شامل: *E.coli* (۱۶/۹ درصد) *Staphylococous aureuas* (۱۴/۴ درصد) *S. dysgalactiae* (۸/۹ درصد) است. وقوع ورم پستان کلی فورمی در مراحل اولیه دوره‌ی شیردهی بیشتر از مراحل پیشرفته شیردهی است و میزان عفونت داخل پستان در دورهٔ شیردهی ۴ برابر دورهٔ خشکی می‌باشد. علائم ورم پستان در موارد حاد بیماری می‌تواند متنوع باشد ولی عمده‌ترین نشانی آن، تغییر قوام و رنگ شیر است که به صورت آبکی و زرد، همراه با لخته بوده که می‌تواند تأثیرگذار بر روی کل بدن به صورت تب و از دست دادن اشتها باشد (۳).

در درمان ورم پستان *E.coli*، از طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. باکتری *E.coli* به آنتی‌بیوتیک‌های نسل سوم سفالوسپورین‌ها (نظیر Ceftiofur)، نسل چهارم سفالوسپورین‌ها (مثل Cefquinome)، Fluoroquinonlone ها، جنتامایسین، آمیکاسین، سولفامید-تریمتوپریم و اکسی تتراسیکلین حساس می‌باشد.

داروی آنتی‌باکتریال Marbofloxacin از مشتقات Carboxylic acid، نسل سوم از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده Fluoroquinolone است که دارای فعالیت ضد باکتریال در مقابل باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است. این دارو در امریکا و اروپا برای درمان ورم پستان محیطی با واسطه *E.coli* استفاده می‌شود. مکانیسم عمل آن به درستی مشخص نشده است ولی معتقدند که این آنتی‌بیوتیک با اثر روی DNA باکتری مؤثر بوده و بدین ترتیب اثر باکتریوسایدال دارد. این آنتی‌بیوتیک به صورت صناعی تهیه می‌شود. Marbofloxacinآنتی‌بیوتیکی است که به خصوص برای درمان باکتری‌های گرم منفی در دام‌های مختلف استفاده می‌شود. تلاش‌های چندانی برای بررسی اثرات این دارو بر روی بیماری‌های مختلف ایجاد شده ناشی از عوامل باکتریایی گرم منفی به عمل آمده است، اما هنوز هم اختلافات بالینی در نتایج تجربه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (۷، ۸). Marbofloxacin به صورت خوراکی و تزریقی در دام‌های مختلف کشورهای اروپایی استفاده می‌شود (۴، ۱۱). اما شکل خوراکی آن بیشتر در سگ استفاده می‌شود (۷). مطالعات وسیعی در مورد اثرات این دارو بر روی عوامل مختلف باکتریایی گرم منفی که در بروز ورم پستان گاوها تأثیرگذار است انجام نشده است. هدف از این بررسی، مطالعه‌ی مقایسه‌ای اثرات بالینی دو محلول تجاری تزریقی Marbofloxacin بر روی درمان ورم پستان محیطی گاوهای شیری با عامل *E.Coli* می‌باشد.

مواد و روش کار

از تعداد ۸۶ رأس گاو نژاد هلشتاین مبتلا به ورم پستان بالینی نمونه‌برداری و کشت به عمل آمد. نمونه‌های استحصالی در آزمایشگاه تخصصی

بیماری‌های پستان گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد کشت داده شدند. علایم بالینی ورم پستان در کلیه دام‌های مبتلا به *E.coli* شامل: ترشحات زرد رنگ همراه با قوام آبکی با و یا بدون لخته، قوام پستان و سرپستانک و نیز وضعیت حرارت بافت پستان ارزیابی شد. در این بررسی، دام‌ها از نظر تعداد زایش و روزهای شیردهی ارزیابی شدند. پنجاه رأس از دام‌ها، دارای آلودگی به *E. Coli* بودند که پس از تشخیص آزمایشگاهی، درمان آنها شروع شد. در این بررسی ۵۰ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین بدون سابقه ورم پستان که برای اولین بار مبتلا به ورم پستان شده، در دو گروه یک (۲۵ رأس) و دو (۲۵ رأس) مورد مطالعه قرارگرفتند.

گروه یک: دام‌های تحت بررسی این گروه (۲۵ رأس) محلول تزریقی Marbofloxacin 100mg/ml با نام تجاری Kelbomar شرکت دارویی KELA. N. V بلژیک، به میزان 2mg/kg (۱ میلی‌لیتر/ ۵۰ کیلوگرم وزن زنده دام) را به صورت عضلانی به مدت ۳ روز مستمر دریافت کردند. کلیه دام‌هایی که بلافاصله زایمان کردند، مورد بررسی بالینی ورم پستان قرار گرفتند. متعاقباً ترشحات پستان آلوده‌ای که دارای علایم ورم پستان بالینی بود پس از نمونه‌برداری در لوله‌ی استریل جمع‌آوری شده و به منظور تأیید تشخیص *E.coli* به آزمایشگاه تشخیص درمانگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد ارسال شد. بر اساس دستورالعمل ذکر شده، در طول درمان و پس از گذشت ۳ روز از درمان با داروی مذکور، ارزیابی بالینی پاسخ به درمان به صورت برگشت رنگ و قوام شیر و بافت پستان به عمل آمد.

گروه دو: دام‌های تحت بررسی این گروه (۲۵ رأس) با آنتی‌بیوتیک تزریقی Marbofloxacin با نام تجاری Marbox ساخت شرکت دارویی: Ceva Sante Animal (فرانسه) به میزان 2mg/kg (۱ میلی‌لیتر/ ۵۰ کیلوگرم وزن زنده دام) به صورت عضلانی به مدت ۳ روز پی درپی درمان شدند. جمعیت دامی این گروه نیز همانند گروه یک، مورد ارزیابی بالینی قرار گرفت و پس از تأیید بالینی ورم پستان، ترشحات پستان آلوده پس از نمونه‌برداری در لوله‌ی استریل جمع‌آوری شد و به منظور تأیید تشخیص *E.coli* به آزمایشگاه تشخیص میکروبی مورد تأیید، ارسال شد. نمونه‌های ارسالی پس از کشت مورد ارزیابی آنتی‌بیوگرام قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. اطلاعات به دست آمده با روش آماری مربع کای (χ^2) ($P<0.05$) ارزیابی آماری شد.

جدول ۱- فراوانی باکتریایی *E.coli* و سایر باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های شیر مبتلا به ورم پستان

نوع باکتری	تعداد	(٪)
E.Coli	۵۰	۵۸
Coagulase –negative *Staphylococci*	۵	۶
Staphylococcus aureus	۵	۶
Streptococcus uberis	۶	۷
Enterobacter spp	۱	۱
Streptococcus dysgalatiae	۳	۳
Klebsiella spp	۲	۲
Micrococcus	۱	۱
منفی	۱۳	۱۵
جمع	۸۶	۱۰۰

نتایج

جدول یک نشان دهنده‌ی فراوانی باکتریایی شیر مبتلا به ورم پستان بالینی در دام‌های تحت بررسی می‌باشد.

در این بررسی مشخص شد که اکثر (۵۸ درصد) نمونه‌های جمع‌آوری شده آلوده به *E.Coli* بوده‌اند. جدول۲ نشان دهنده نتایج درمان داروی Marbofloxacin با نام‌های تجاری Kelbomar و Marbox است.

در این بررسی مشخص شد که ۴۰ درصد از دام‌های تحت بررسی با داروی گروه یک بهبود یافتند در حالی که میزان بهبودی در دام‌های دو ۵۲ درصد بود. اختلاف آماری معنی‌داری با آزمون مربع کای بین دو گروه یک و دو مشاهده نشد (P>0.05).

جدول۲- توزیع فراوانی نتایج درمانی داروی Marbofloxacin با نام تجاری Kelbomar و Marbox روی دام‌های مبتلا به ورم پستان *E.coli*

نتایج درمان	گروه		جمع
	یک	دو	
بهبود یافته	۱۰ (۴۰٪)	۱۳ (۵۲٪)	۲۳ (۴۶٪)
عدم بهبودی	۱۵ (۶۰٪)	۱۲ (۴۸٪)	۲۷ (۵۴٪)
جمع	۲۵ (٪۱۰۰)	۲۵ (٪۱۰۰)	۵۰ (٪۱۰۰)

بحث

از سال ۱۹۹۴ به بعد در مورد اثرات Marbofloxacin بر روی دام‌هایی نظیر گاو، خوک، گربه و سگ مطالعات متعددی صورت گرفت (۶). بررسی‌ها نشان داد که نسل سوم Fluoroquinolone ها بر روی ورم پستان حاد E. Coli جدا شده مؤثر بوده است (۵).

به طور کلی ۱۴۰ گونه، تحت گونه و سرواریته باکتریایی از بافت پستان گاو جدا شده است. بنابر شرایط اپیدمیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک عوامل باکتریایی ورم پستان، ورم پستان در گاوهای شیری به ورم پستان واگیردار و محیطی تقسیم‌بندی می‌شوند . ورم پستان محیطی شامل ۳ عامل بیماری‌زای اصلی است که عبارتند از: کلی‌فرم‌ها (به‌خصوص *Esherchia coli* و *Klebsiella spp*) ، *Streptococcus spp.* محیطی و *Trueperella pyogenes* است (۳). درمان دام‌های مبتلا بستگی به نوع ورم پستان ایجاد شده از نظر بالینی و تحت بالینی بودن آنها و وضعیت سلامت دام‌ها دارد (۱۰). درمان گاوهای مبتلا به ورم پستان به صورت موضعی با پمادهای پستانی و درمان‌های عمومی با کمک محلول‌های آنتی‌بیوتیک‌های تزریقی صورت می‌گیرد.

ورم پستان‌های محیطی با منشأ *E. Coli* یکی از انواع ورم پستان‌هایی است که به‌خصوص در فصول سرد و مرطوب سال نسبت به ورم پستان‌های واگیردار شیوع بیشتری دارد. در این بررسی محلول تزریقی Marbofloxacin 100mg/ml با نام تجاری Kelbomar ساخت شرکت دارویی KELA. N. V بلژیک، در دام‌های گروه یک و نیز آنتی‌بیوتیک تزریقی Marbofloxacin با نام تجاری Marbox ساخت شرکت دارویی Ceva Sante Animal (فرانسه) در گروه دو، مورد ارزیابی بالینی قرار گرفت. مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین مصرف این دارو در درمان دام‌های مبتلا به ورم پستان با منشأ *E.coli* موجود نمی‌باشد (جدول۲).

در بررسی انجام شده نشان داده شده است که باکتری *E coli* نسبت به Marbofloxacin بسیار حساس است و این تأثیر در موارد گاوهای مبتلا به ورم پستان و یا گوساله‌های مبتلا به اسهال به خوبی اثبات گردیده است (۶) اما اثرات این آنتی‌بیوتیک در موارد ورم پستان E.coli بیشتر از موارد ابتلای گوساله‌ها به اسهال با منشأ این عامل بیماری‌زا است (۱۲).

در این بررسی مشخص شد که اثر دارو در دام‌های گروه دو بیشتر (۵۲ درصد) از دام‌های گروه یک (۴۰ درصد) است. در ورم پستان‌های گاوهای شیری با منشاء کلی‌فرمی، آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر همراه با داروهای کمک‌کننده نتایج قوی‌تری دارد (۳). این پژوهش نشان داد که از این آنتی‌بیوتیک می‌توان در درمان گاوهای مبتلا به ورم پستان کلی باسیلی بهره‌برداری کرد.

References

1- Aliabadi F. S., Lees P. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2002. 25: 161–174.

2- Boothe, D.M. (2001) Antimicrobial drugs. In Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics, pp. 150–173. W. B. Saunders Co.,Philadelphia, PA. 2001. Page. 185.

3- Constable P. D., Hinchcliff K. W., Done S. H., Grunberg W. Veterinary Medicine. Elsevier. 11th edition. 2017. P. 1904, 1926.

4- Feray Altana, Orhan Corumb, Duygu Durna Corumc, Orkun Atikd, Kamil Uneyd. Pharmacokinetics and bioavailability of marbofloxacin in lambs following administration of intravenous, intramuscular and subcutaneous. Small Ruminant Res. 2018. 159. 5–10

5- Kroemer. S, Galland. D, Guerin-Faublee. V, Giboin. H, Woehrle-Fontaine. F. Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe Vet Rec. 2012. 170(2):53.

6- Meunier, D., Acar, J. F., Martel, J. L., Kroemer, S. & Valle, M. Seven years survey of susceptibility to marbofloxacin of bovine pathogenic strains from eight European countries. Int J Antimicrob Ag. 2004a. 24, 268-278.

7- Meunier, D., Acar, J. F., Martel, J. L., Kroemer, S. & Valle, M. A seven-year survey of susceptibility to marbofloxacin of pathogenic strains isolated from pets. Int J Antimicrob Ag. 2004b. 24, 592-598.

8- Peyrou, M. Bousquet- Melou, A. Laroute, V. Vrins, A. Doucet, M. Y. Enrofloxacin and marbofloxacin in horses: comparison of pharmacokinetic parameters, use of urinary and metabolite data to estimate first-pass effect and absorbed fraction. J. vet. Pharmacol. Therap. 2006. 29, 337–344.

9- Plumb DC Plumb's Veterinary Handbook, 7th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell Publishing, 2011. Page 189.

10- Schneider M, Valle M, Woehrle F, Boisrame B. Pharmacokinetics of Marbofloxacin in Lactating Cows After Repeated Intramuscular Administrations and Pharmacodynamics against mastitis isolated strains. J. Dairy Sci. 2004. 87:202–211

11- Spreng, M., J. Deleforge, V. Thomas, B. Boisrame´, and H. Drugeon. Antibacterial activity of marbofloxacin, a new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. J. Vet. Pharmacol. Therap.1995. 18:284-289.

12- Thomas, A., C. Nicolas, I. Dizier, J. Mainil, and A. Linden. In vitro antimicrobial susceptibility of mycoplasma bovis strains isolated from Belgian cattle. Proceedings from the XXII World Buiatrics Congress 2002, Hannover, Germany.

The Clinical effects of Marbofloxacin on *E.coli* Clinical Mastitis in Holstein Dairy Cows

Talebkhan Garoussi[1]*, M. Khoramian[2], B. Norozian, I[3].

1- Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran-Iran.
2- Section of Theriogenology, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad-Iran.
3-Professor of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran.

Receive: February 10, 2019; Revise: March 2, 2019; Accept: March 11, 2019

Summary

Environmental mastitis has been increased significantly in recent years due to control of contagious mastitis agents. Marbofloxacin is an antibiotic which is the derivative of Carboxylic acid, the third generation of Fluoroquinolone. It has antibacterial activity against gram negative and positive bacterial. The aim of this study was to explore the comparative effects of two injectable solutions of Marbofloxacin on environmental mastitis due to *E. Coli*. Milk samples were taken from 86 dairy cows with clinical mastitis and were cultured. Fifty cows contaminated with E.coli were treated after diagnosis. Animals were stratified into two groups, one and two. The animals in group 1 (No. 25) received injectable antibiotic solution of Marbofloxacin (Kelbomar. KELA. N. V. Belgium), 2mg/Kg, (1ml/50Kg body weight) IM for 3 days. The animals in group 2 (No. 25) received injectable antibiotic solution of Marbofloxacin (Marbox. Ceva Sante Animal. France) 2mg/Kg, (1ml/50Kg body weight) IM for 3 days. The animals in group 1 and 2 were cured 40% and 53%, respectively. There were no significant differences (P>0.05). It is concluded that Marbofloxacincan can be effective on mastitis with *E. Coli* infection.

Key words: *dairy cows, mastitis, E.coli, Marbofloxacin.*

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به‌دست آمده از نمونه‌های بالینی بیمارستان خاتم‌الانبیاء (ص) زاهدان

بهمن هرمزی[۱]، محبوبه بارکزایی[۲]، زهرا راشکی قلعه‌نو*[۳]

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، اداره آموزش و پرورش زابل، زابل
۲- کارشناس ارشد ژنتیک، بیمارستان سیدالشهدا زهک زابل، زابل
۳- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل

دریافت مقاله: ۱۸ دی ۱۳۹۶، بازنگری: ۱۵ بهمن ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۱ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

کلبسیلاپنومونیه ازجمله باکتری‌های عامل عفونت ادراری و یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب و عامل عفونت بیمارستانی محسوب می‌گردد. شیوع مقاومت دارویی کلبسیلا پنومونیه روز به روز رو به افزایش است و بنابراین انجام تست‌های مقاومت دارویی، قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک، ضروری به نظر می‌رسد. هدف این مطالعه تعیین میزان مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بیمارستان خاتم الانبیاء (ص) زاهدان طی سالهای ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۲ با استفاده از روش انتشار دیسک بود. در مطالعه توصیفی- تحلیلی حاضر، تعداد ۸۳ جدایه ی کلبسیلاپنومونیه از نمونه‌های مختلف بالینی در بیمارستان خاتم جداسازی و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. الگوی مقاومت آنتی میکروبی به روش انتشار دیسک (کربی- بائر) انجام گرفت. درصد مقاومت ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه نسبت به سفیکسیم ۸۲ درصد، سفوتاکسیم ۸۱ درصد، سفتریاکسون ۷۳ درصد، سفتازیدیم ۷۲ درصد، آمیکاسین ۶۳٪ ۶۳ درصد، آزیترومایسین ۶۰ درصد، تتراسیکلین و نالیدیکسیک اسید ۵۹ درصد، جنتامسین ۵۸ درصد و ایمی‌پنم ۴۳ درصد تعیین گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که ایمی‌پنم با کمترین درصد مقاومت در مقابل تمام ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، موثرترین آنتی‌بیوتیک بوده است.

واژه‌های کلیدی: *انتشار دیسک، زاهدان، کلبسیلاپنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

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

مقدمه

کلبسیلاپنومونیه باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب است که عاملی عمده در بروز مرگ و میر در بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می‌شود. مقاومت به مواد ضد میکروبی در این باکتری، سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های آن می‌گردد. نوعی از مقاومت به واسطه تولید آنزیم‌هایی به نام بتالاکتامازها صورت می‌گیرد، که عامل مقاومت در برابر بتالاکتام‌ها است (۱). با توجه به اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی که به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت جامعه انسانی مطرح بوده است و بیماران را در بیمارستان‌های سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد و سالانه قربانی‌های زیادی را به خود اختصاص داده است و هزینه‌های درمانی فراوانی بر کشور تحمیل می‌کند، از این رو، سازمان بهداشت جهانی، سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نامید (۲،۳). مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی اغلب توسط ژن‌های پلاسمیدی رمز گردیده و به راحتی در میان انواع باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند (۴، ۵). مقاومت بالای خانواده انتروباکتریاسه به پنی‌سیلین وسفالوسپورین‌ها ناشی از تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف است که می‌تواند به گونه‌های مختلف دیگر نیز منتقل شود (۶). آنتی‌بیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متفاوتی بر روی باکتری‌ها اثر می‌کنند . برای مثال داروهای بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها مانع سنتز دیواره سلولی می‌شوند، آمینوگلیکوزیدها و اریترومایسین بر روی ریبوزوم و سنتز پروتئین اثر می‌کنند و برخی دیگر مانند فلوروکینولون‌ها مانع سنتز DNA باکتری‌ها می‌شوند (۷-۹). میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان انتروباکتریاسه در سراسر جهان متفاوت می‌باشد. اگر چه بیشترین میزان مقاومت در گونه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلاپنومونیه* مشاهده می‌شود اما این مقاومت‌ها در جنس‌های دیگر انتروباکتریاسه مانند انترو باکتر، سیتروباکتر، سراشیا، پرتئوس و سالمونلا هم به‌دست آمده است (۱۰). شناسایی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از جنبه‌های مهمی مانند انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب، تسریع در درمان، کاهش هزینه‌های درمانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، حائز اهمیت است. هدف از این مطالعه، بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بالینی از بیماران بستری در بیمارستان خاتم‌الانبیا (ص) زاهدان است.

مواد و روش‌ها

مطالعه تحلیلی- توصیفی اخیر از شهریور ماه سال ۱۳۹۱ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ به مدت ۷ ماه در بیمارستان خاتم الانبیاء (ص) زاهدان انجام گرفت.

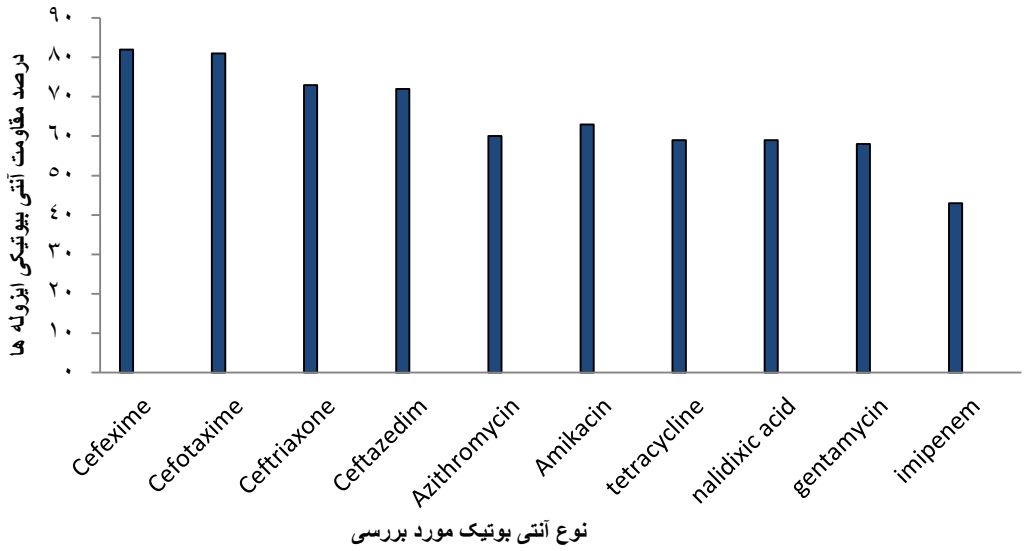
جدایه‌های باکتری: تعداد ۱۵۸۰ نمونه بالینی مختلف از جمله ادرار، خون، چرک، خلط و مایع مغزی- نخاعی از بیماران بستری شده در بیمارستان خاتم زاهدان جمع آوری شد و ۸۳ جدایه *کلبسیلاپنومونیه* بر اساس کشت بر روی محیط‌های مک کانکی آگار، EMB، تست‌هایIMViC و اوره آز تعیین هویت شد (۱۱). از ۸۳ جدایه مورد بررسی، تعداد ۳۳ جدایه (۴۰ درصد) ازنمونه‌های ادراری، ۲۷ جدایه (۳۳ درصد) از نمونه‌های خلط، ۱۲ جدایه (۱۴درصد) از نمونه‌های چرک ، ۶ جدایه (۷ درصد) از نمونه‌های خون و ۵ جدایه (۶ درصد) از نمونه‌های مایع- مغزی نخاعی جمع‌آوری گردید.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از تست آنتی بیوگرام از طریق روش انتشار دیسک (Disk diffusion method) و توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تهیه شده از شرکت پادتن طب، ایران، شامل آمیکاسین (AMK;30ug)،

آزیترومایسین (AZM;30ug)، سفیکسیم (CFM;5ug)، سفوتاکسیم (CTX;30ug)، سفتریاکسون (CRO;30ug)، جنتامایسین (GE;10ug)، ایمی‌پنم (IMP;10ug)، نالیدیکسیک اسید (NA;30ug)، تتراسیکلین (TE;30ug) و سفتازیدیم (CAZ;30ug) ارزیابی گردید. در این روش، سوسپانسیون میکروبی برابر غلظت نیم مک فارلند تهیه و در محیط مولر هینتون آگار، میزان مقاومت میکروبی نسبت به دیسک‌های ذکر شده به روش Kirby – Bauer و بر اساس استانداردهای CLSI سنجیده شد (۱۲).

نتایج

نتایج این تحقیق در مورد ۱۰ آنتی‌بیوتیک، در نمودار ۱ بیان شده است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به سفیکسیم با ۸۲ درصد و کمترین مقاومت مربوط به ایمی‌پنم با ۴۳ درصد بود. همچنین در جدایه‌های مورد مطالعه، مقاومت نسبت به سفوتاکسیم ۸۱ درصد، سفتریاکسون ۷۳ درصد، سفتازیدیم ۷۲ درصد، آمیکاسین ۶۳ درصد، آزیترومایسین ۶۰ درصد، تتراسیکلین و نالیدیکسیک اسید ۵۹ درصد و جنتامایسین ۵۸ درصد بود.



نمودار ۱- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

نقش باکتری‌های فرصت‌طلب به عنوان عوامل اصلی و شایع عفونت‌های بیمارستانی در کلیه سنین کاملاً مشخص است (۱۳). با توجه به این که اعضای خانواده انتروباکتریاسه عامل عمده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند و برخی از آنها به عنوان اعضای فلور طبیعی، سبب ایجاد عفونت‌های فرصت‌طلب می شوند، لذا اتخاذ استراتژی مناسب در درمان این سویه‌ها ضروری به نظر می‌رسد .

درمان آنتی بیوتیکی این عفونت‌ها، که در سال‌های گذشته با آنتی بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین به آسانی مؤثر بودند، متاسفانه امروزه با کسب انواع مقاومت‌ها و از جمله بروز بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (Extended-spectrum-beta-lactamases) مشکل و پرهزینه گردیده است (۱۴). اگرچه توجه بسیاری از محققین بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از بیماران در بیمارستان‌ها و نیز باکتری‌هایی که به طور مستقیم

اثر مخرب بر روی سلامتی انسان دارند معطوف شده است، اما گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک پدیده اکولوژیکی طبیعی است که حاصل میلیون‌ها سال تکامل است (۱۵).

به دلیل استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها در جهان در بخش‌های مختلف از جمله پزشکی، درمان حیوانات، کشاورزی، پرورش زنبور عسل، صنایع نفت و دریایی و نیز استفاده در برخی از آزمایشگاه‌ها جهت مطالعات و دستکاری‌های ژنتیکی، فشار تکاملی برای ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار بالا است (۱۹-۱۶).

در مطالعه حاضر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های روتین مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی نسبتا بالا بود و بیشترین مقاومت‌ها به ترتیب به سفکسیم (۸۲ درصد)، سفوتاکسیم (۸۱ درصد)، سفتریاکسون (۷۳ درصد)، سفتازیدیم (۷۲ درصد) مشاهده شد، در حالی که ۶۳ درصد و ۵۸ درصد ایزوله‌ها، به ترتیب، به آمینوگلیکوزیدهای آمیکاسین و جنتامایسین مقاوم بودند. یافته‌های تحقیق حاضر، نمایانگر بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران بستری شده دارد. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بخش‌های مختلف ایران متفاوت است. طی مطالعه‌ای که توسط قلی پور و همکاران در اصفهان انجام شد، میزان مقاومت برای آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، سفپیم و آمیکاسین به ترتیب ۲۳ درصد، ۱۵ درصد، ۳۲ درصد و ۱۳ درصد گزارش شد که پایین‌تر از یافته‌های مطالعه حاضر بود (۲۰). همچنین طی مطالعه‌ای که در تهران توسط افتخار و همکاران انجام گرفت، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای سفالوسپورین‌های نسل سوم نظیر سفتازیدیم، سفتریاکسون به همراه آنتی‌بیوتیک‌های دیگری نظیر آمیکاسین و جنتامایسین به ترتیب ۴۱ درصد، ۳۷ درصد، ۴۱ درصد و ۴۹ درصد گزارش شد که با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر تفاوت دارد (۲۱). همچنین، مولانا و همکاران میزان مقاومت آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم را ۹۰ درصد و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم را ۶۰ درصد بیان کردند. بررسی این نتایج نشان می‌دهد، میزان مقاومت بیماران مورد بررسی در این تحقیق نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ایمی‌پنم نسبت به بیماران مورد بررسی توسط مولانا و همکاران کمی پایین‌تر است (۲۲). بر اساس مطالعه ساعدی و همکاران در زابل، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای سفالوسپورین‌های نسل سوم نظیر سفتریاکسون و سفتازیدیم ۱۰۰ درصد گزارش شد که کمی بالاتر از یافته‌های مطالعه حاضر بود (۲۳). این تفاوت‌ها می‌تواند به علت مصرف بی‌رویه و غیر اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه سفالوسپورین‌های نسل سوم و پیدایش سویه‌های مقاوم به چندین کلاس دارویی در منطقه مورد مطالعه باشد. در مطالعه حاضر میزان مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم بالا بود که می‌تواند نشان‌دهنده آن باشدکه سویه‌های مقاوم، در شهرستان زاهدان، ممکن است به دلیل رفت و آمد بسیار مهاجران از کشورهای همسایه وارد شده باشند.

همه نتایج حاصل از مطالعه حاضر نگران‌کننده و نشان از افزایش رو به رشد مقاومت‌های چند دارویی در بین باکتری‌های بیماری‌زای بیمارستانی دارد. انتقال این ایزوله‌های بیمارستانی به افراد جامعه ممکن است سبب گسترش مقاومت دارویی و بیماری‌زایی در جامعه به ویژه در افرادی که دارای ضعف سیستم ایمنی هستند، شود. نتایج حاصله نشان از آن دارد که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام معمول، عملاً در درمان عفونت‌های بیش از ۵۵ درصد جدایه‌های *کلبسیلاپنومونیه* در منطقه مورد مطالعه مؤثر نیستند و استفاده از آن‌ها در درمان،

علاوه بر بالا رفتن هزینه‌های درمانی، سبب بروز هر چه بیشتر مقاومت دارویی خواهد شد، در نتیجه ضرورتاً پیشنهاد می‌شود که رژیم درمانی مورد استفاده توسط پزشکان حتماً بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام انجام شده توسط آزمایشگاه میکروب‌شناسی بالینی باشد.

References

1. Escudero E, Vinue L ,Teshager T, Torres C, Moreno MA. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. Res Vet Sci. 2010; 88(1):83-7.

2. Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. World Health Day: antimicrobial resistance and practical solutions. Ann Acad Med Singapore. 2011; 40(4):156-52.

3. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumonia* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(12):5046-54.

4. Mendonc N, Manageiro V, Robin F, Salgado MJ, Ferreira E, Canic M. The lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determination for resistance to clavulanic acid inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(5):1806-11.

5. Walsh TR, Toleman MA. The Emergence of pan-resistant gram-negative pathogens merits a rapid global political response. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:1-3.

6. Bano RJ, Picon E, Gijon P, Hernandes JR, Cisnero S, Pena C *et al.*.Risk factor and prognosis of nosocomial blood stream infections caused by extended-spectrum Blactamase producing *E.coli* .J Clin Microbiol. 2010; 48(5):1726-1731.

7. Gould FK, Brindle R, Chadwic PR, Fraise AP, Hill D, Nathwani D, *et al.* Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. J antimicrob chemother. 2009; 63(5):849-861.

8. Hiramatsu K. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. lancet infect dis. 2001;1(3):618-623.

9. Lowly FD. Antimicrobial resistance; the example of *Staphylococcus aureus*. J clin invest. 2003; 111 (9):1265-1273.

10. Washington C, Stephen A, Janda W, *et al.* Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed.USA: Lippincott Wiiliams & Wilkins. 2006:775-9.

11. Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the United Arab Emirates. Med Princ Pract. 2008; 17(1):32-6.

12. Gangoue PJ, Koulla ShS, Ngassam P, Adiogo D, Ndumbe P. Antimicrobial activity against gram negative bacilli from Yaounde Central Hospital, Cameroon. Afr Health Sci. 2006; 6(4):232-35

13. Patel JB, Weinstein MP, Eliopoulos JM, Jenkins SJ, Lewis II JS, Limbago B, *et al.* Clinical and Laboratory Standards Institute. Performans Standards for Antimicrobial Susceptibility Institute, Pennsylvania, USA, 2017.

14. Marty l, Jarlier V. Surveillance of multiresistant bacteria: justification, role of the laboratory, indicators, and recent French data. Progress en Urlogie.1999; 9:41-49.

15. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, *et al.* Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PLoS One. 2012; 7(4):e34953.

16. Rabani Z, Mardaneh J. Emergence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Detection of Isolates harboring blaCTX gene causing infections in hospital and determination of their susceptibility to antibiotics. Armaghane danesh. 2015; 20(8):689-705.

17. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, *et al.* Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011; 477(7365):457-461.

18. Hernández J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, *et al.* Human-associated extended-spectrum β-lactamase in the Antarctic. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(6):2056-8.

19. Gholipour A, Soleimani N, Shokri D, Mobasherizadeh S, Kardi M, Baradaran A. Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum beta-Lactamase Produced by *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in an Educational Hospital. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(10): e11758.

20. Eftekhar F, Rastegar M, Golalipoor M, Mansoursamaei N. Detection of extended spectrum B-lactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in relation to Bla, Bla and Bla Gene Carriage. Iran J Public Health. 2012; 41(3):127-32.

21. Molana Z, Ferdosi Shahandashti E, Gharavi S, Shafii M, Norkhomami S, Ahangarkani F, *et al.* Molecular Investigation of

Class I Integron in *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Intensive Care Unit (Shahid Beheshti Hospital of Babol; 2010). J Babol Univ Med Sci. 2011; 13(6):7-13. [In Persian]

22. Saeidi S, Ghamgosha M, Ali Taheri R, Shiri Y, Solouki M, Hassanpour K, *et al.* Phenotypic and genotypic detection of extended-spectrum β-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Zabol. J Coast Life Med. 2014; 2(9):732-7.

23. Saeidi S, Ghamgosha M, Ali Taheri R, Shiri Y, Solouki M, Hassanpour K, *et al.* Phenotypic and genotypic detection of extended-spectrum β-lactamase producing Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Zabol. J Coast Life Med. 2014; 2(9):732-7.

Antibiotic resistance survey of *Klebsiella pneumonia* isolates collected from clinical specimens in Khatam (PBUH) Hospital, Zahedan

Bahman Hormozi[1], Mahboubeh Barkzaii [2], Zahra Rasheki Ghalehnoo[*3]

1- MSc in Genetics, Zabol educatianal office, Zabol, Iran.
2- MSc in Genetics, Zahak Seyed-al-Shohada Hospital, Zabol, Iran.
3- Departments of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

Receive: March 12, 2018; Revise: February 4, 2018; Accept: January 8, 2018

Summary

Klebsiella pneumoniae is the one of UTI bacteria and relevant opportunistic pathogen that causes nosocomial infections. Antibiotic resistance of the *Klebsiella* species is increasing nowadays; therefore, antibiogram test is necessary before prescribing antibiotics. This research is aimed to determine the rate of antibiotics resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimens of patients referred to Khatam hospital during September 2013 to May 2014 using Kirby-Bauer method. This descriptive and analytic survey was performed on 83 isolates of *Klebsiella pneumonia* collected from Khatam hospital. After phenotypical and biochemical identification of isolate, drug resistance was investigated for 10 antibiotics through the standard CLSI procedure via the Kirby-Bauer method. The percentage of resistance to all of the isolates of *Klebsiela pneumonia* were Cefexime 82%، Cefotaxime 81%، Ceftriaxone 73%، Ceftazidime 72%، Amikacin 63%، Azithromycin 60%، Tetracycline and Nalidixic Acid 59%، Gentamicin 58% and Imipenem 43%. The results indicated that the lowest resistance percent was for Imipenem in all tested Klebsiella; therefore, it can be recommended as the most effective antibiotic for Klebsiella isolates in study area.

Keywords: *Disk diffusion, Zahedan, Klebsiella pneumonia, Antibiotics resistance.*

تعیین گروه‌های فیلوژنتیک *اشریشیا کلی*‌های جدا شده از عفونت کلی‌باسیلوزیس طیور با استفاده از روش Multiplex-PCR

داود تربیت نازلو[۱]، ابوالفضل جعفری ثالث*[۱]، یاشار باقری‌زاده[۱]، محبوبه عبدلی سنجانی[۱]، فرهاد فرهادی[۲]، مهدی ازدیادی[۲]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران
۲- بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، کرج، ایران

دریافت مقاله: ۱۸ آذر ۱۳۹۶، بازنگری: ۴ دی ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۳ بهمن ۱۳۹۶

چکیده

در میان بیماری‌های ایجاد شده توسط *اشریشیا کلی*، نوعی بیماری سیستمیک حاد به نام کلی‌سپتی‌سمی وجود دارد که با حضور *اشریشیا* در خون، کلونیزه شدن در ارگان‌ها شامل قلب، کبد و طحال مشخص می‌شود. هدف از این مطالعه طبقه‌بندی *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت کلی‌باسیلوزیس طیور و بر اساس گروه‌های فیلوژنتیک A ،B1، B2 و D می‌باشد. در این مطالعه ۸۰ سواپ اخذ شده از کبد و محوطه بطنی طیور بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند. کلونی‌های صورتی رنگ جداسازی شده و با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان *اشریشیاکلی* تأئید شدند. سپس با انجام Multiplex-PCR گروه‌های مختلف فیلوژنتیکی شناسایی گردیدند. از بین ۸۰ نمونه ۲۱ جدایه به عنوان *اشریشیا کلی* شناسایی شدند. ۸ جدایه متعلق به گروه A (۳۸ درصد)، ۲ جدایه متعلق به گروه B1 (۵۹ درصد)، ۶ جدایه متعلق به گروه B2 (۶/۲۸) درصد و ۵ جدایه متعلق به گروه D2 (۸/۲۳ درصد) بودند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر گروه‌های مختلف فیلوژنتیک در گله‌های مرغ مادر مشاهده گردید. اغلب آنها در گروه A قرار گرفتند که به عنوان همزیست مطرح می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد که *اشریشیا کلی* پاتوژنیک دارای میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد که ممکن است به طرق مختلف به گله‌های گوشتی انتقال یابد و منجر به تحمیل خسارت اقتصادی به صنعت طیور گردد. بنابراین گام‌های مهمی باید جهت ریشه‌کنی *اشریشیا کلی* پاتوژنیک برداشته شود.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کلی، طیور، کلی‌باسیلوز، گروه فیلوژنتیک*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: a.jafari_1392@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی به طور طبیعی ساکن دستگاه گوارش حیوانات و انسان است که اکثراً به عنوان یک بیماری‌زای فرصت‌طلب محسوب می‌شود (۱). در پرندگان حدود ۱۵- ۱۰ درصد از جمعیت *اشریشیا کلی* (Avian pathogenic Escherichia coli APEC) دارای قدرت بیماری‌زایی بوده که اغلب به‌دنبال آسیب‌دیدگی سیستم ایمنی و یا تضعیف سد دفاعی پرندگان اهلی، باعث ایجاد عفونت‌های سیستمیک یا مزمن می‌شود (۴-۲). کلی‌باسیلوز طیور یکی از بیماری‌های عفونی پرندگان است که باکتری *اشریشیا کلی* عامل بیماری‌زای اولیه یا ثانوی آن است. بیماری‌های ناشی از این عامل شامل: بیماری هجرز ، کلی گرانولوما، تورم صفاق، تورم مجرای تخم ، التهاب غشای مفاصل ، ورم ناف و تورم کیسه‌های هوایی می‌باشند (۲).

کلی‌باسیلوز در تمام انواع و سنین مختلف طیور و همچنین در سایر پرندگان و بسیاری از پستانداران بروز می‌کند. واگیری‌های گزارش شده در طیور غالباً در ماکیان ، بوقلمون و اردک بروز کرده است. عفونت در پرندگان جوان رایج‌تر از بالغها است. این بیماری در سرتاسر دنیا شایع می‌باشد. به هرحال عفونت با *اشریشیاکلی* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در دنیا سالانه ضررهای اقتصادی قابل توجهی را به صنعت طیور کشورها به دلیل افزایش تلفات و افزایش حذف لاشه در فرآیند بازرسی کشتارگاهی تحمیل می‌کند (۵).

مطالعات فیلوژنتیک اخیر نشان می‌دهد که *اشریشیا کلی*‌های پاتوژن خارج روده‌ای اکثراً متعلق به گروه B2 و به میزان کمتر به گروه D متعلق می‌باشند، نتایج حاصل از تایپینگ نمونه‌های حاصل از عفونت‌های ادراری این موضوع را تأیید می‌کند (۶-۷). تحقیقات چندانی در کشور در این خصوص صورت نپذیرفته است. ارزیابی فیلوژنتیکی و تکاملی عوامل ایجاد کننده بیماری‌ها می‌تواند در شناخت هر چه بهتر آنها و راهکارهای مقابله با این عوامل کمک‌کننده باشد. هدف از مطالعه حاضر طبقه‌بندی *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت کلی‌باسیلوزیس طیور و بررسی غالبیت گروه فیلوژنتیک موجود در چنین عفونت‌هایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۸۰ عدد نمونه شامل سواب چرک ناحیه صدری و صفاقی از طیور مرغ مادر مشکوک به کلی‌باسیلوز با علائم بالینی مربوطه در شرایط استریل از مرغداری‌ها، بیمارستان‌های طیور و آزمایشگاه‌های سطح شهر ارومیه اخذ گردید. نمونه‌ها پس از أخذ بلافاصله به آزمایشگاه جهت انجام مراحل کشت و جداسازی انتقال یافت. سواب‌ها در محیط مک‌کانگی‌آگار (Merk 1.05465.0500, Germany) کشت داده شدند و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. کلونی‌های صورتی به روش گرم رنگ آمیزی شدند و تحت کشت مجدد در همان محیط مذکور قرار گرفتند. پس از طی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باکتری‌های مثبت از نظر استفاده از قندها در محیط TSI، اکسیداز ، اوره‌آز، حرکت مثبت، اندول مثبت، متیل رد مثبت، وژس پروسکوئر منفی، و سیترات منفی به عنوان *اشریشیا کلی* شناسایی شدند و در محیط نوترینت براث (Scharlau Microbiology, Spain) جهت انجام کارهای مولکولی نگهداری گردیدند. با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی(Fermentas, Germany) و براساس پروتکل شرکت سازنده کیت، DNA تمامی‌جدایه‌ها استخراج گردید. مشخصات کامل پرایمرها جهت انجام Multiplex -PCR در جدول ۱ آورده شده‌اند.

جدول ۱- خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده برای Multiplex-PCR

نام پرایمر	ژن هدف	اندازه پرایمر (bp)	توالی پرایمر	اندازه قطعه (bp)
T1	*TSPE4.C2*	۲۴	5'- gagtaatgtcggggcattca	۱۵۲
T2		۲۵	5'- cgcgccaacaaagtattacg	
Y1	*yjaA*	۲۰	5'- tgaagtgtcaggagacgctg	۲۱۱
Y2		۲۰	5'- atggagaatgcgttcctcaac	
C1	*chuA*	۲۰	5'- gacgaaccaacggtcaggat	۲۷۹
C2		۲۰	5'- tgccgccagtaccaaagaca	

Mutiplex –PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترکیبات: 5/2 µl بافر PCR، 8/0 µl dNTP، 25/1 µl از هر پرایمر، 6/0 µl Tag polymerase، 1 µl $MgCl_2$، 2 µl DNA الگو و آب مقطر دوبار تقطیر انجام شد. در این واکنش آب مقطر به جای DNA برای کنترل منفی افزوده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به ترتیب زیر انجام شد: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل: واسرشت ثانویه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۷ دقیقه، الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (mg/ml10) در ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت انجام گردید. بعد از مشاهده ژل در Gel Document (USA, Bio Rad) تصویر برداری و ثبت اطلاعات انجام گرفت.

نتایج

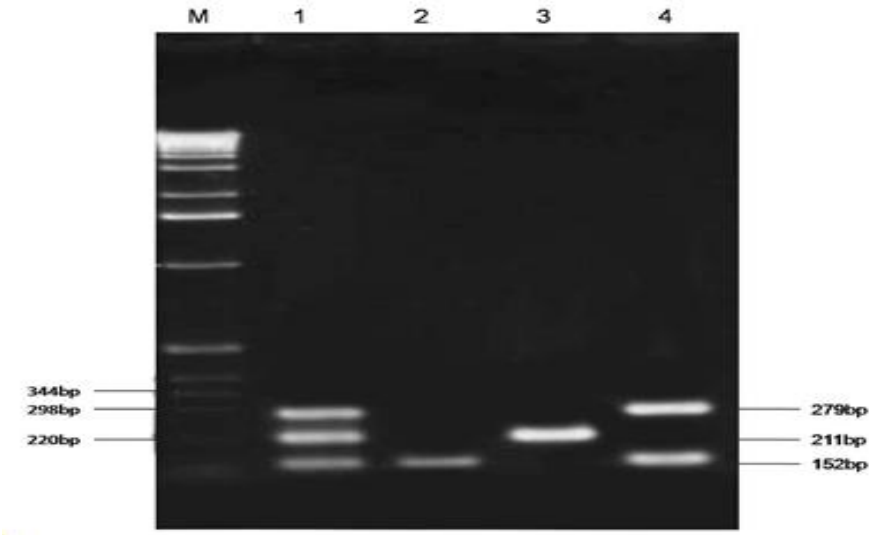
از تعداد ۸۰ نمونه سواب اخذ شده ۲۱ (۲۶/۲۵ درصد) نمونه پس از انجام مراحل رنگ‌آمیزی، کشت و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی شدند. با استفاده از روش Multiplex -PCR 21 جدایه‌ها جهت تعیین گروه فیلوژنتیک مورد بررسی قرار گرفتند.

پرایمرهای مورد استفاده به خوبی توانستند ژن‌های مورد نظر را که شامل *yjaA*، *chuA* و *TSPE4.C2* به ترتیب با اندازه‌های ۲۱۱، ۲۷۹ و bp152 بودند، تکثیر کنند (شکل شماره۱). در کنترل منفی که آب مقطر به جای اسید نوکلئیک اضافه گردید. محصولی مشاهده نشد.

از ۲۱ جدایه *اشریشیا کلی* تعداد ۸ جدایه متعلق به گروه A (۳۸ درصد)، ۲جدایه متعلق به گروه B1 (۵/۹ درصد)، ۶ جدایه متعلق به گروه B2 (۶/۲۸ درصد) و ۵ جدایه متعلق به گروه D2 (۸/۲۳ درصد) می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر از ۸۰ نمونه عفونت کلی‌باسیلوز طیور مادر تعداد ۲۱ جدایه *اشریشیا کلی* مورد شناسایی قرار گرفت. از این بین تعداد ۸ جدایه متعلق به گروه A، ۲جدایه متعلق به گروه B1، ۶ جدایه متعلق به گروه B2 و ۵ جدایه متعلق به گروه D2 به روش Multiplex-PCR مورد شناسایی واقع شدند. در مطالعه قنبرپور و همکاران بر روی موارد اسهال انسانی از ۹۶ جدایه بررسی شده ۵۲/۱ درصد متعلق به گروه A، ۱/۲ درصد متعلق به گروه B1، ۴/۱۰ درصد متعلق به گروه B2 و ۳۵/۴ درصد متعلق به گروه D بودند (۸).



شکل ۱- نتایج Multiplex-PCR، چاهک M: مارکر (Fermentas, Germany)1Kbp ؛ چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و۴ به ترتیب گروه‌های فیلوژنتیک B2، B1، A و D

در تحقیقی دیگر توسط اسعدی و همکاران از ۶۰ باکتری جدا شده از عفونت ادراری در جنوب ایران شایع‌ترین گروه‌های فیلوژنتیک به ترتیب D، A و B1 با فراوانی ۷۰، ۲۳/۳ و ۶/۷ درصد بودند و گروه B2 جدا نگردید (۹). در مطالعه‌ای جهت انجام فیلوژنتیک تایپینگ نمونه‌های ادراری نشان داده شد که ۶۵ درصد جدایه‌ها در گروه B2، ۱۹ درصد در گروه D و ۱۶ درصد در گروه A قرار دارند و هیچ یک در گروه B1 قرار ندارند (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۱۵۵ جدایه *اشریشیا کلی* در شهرستان بم نشان داده شد که در ۷۱/۶ درصد در گروه A، ۲۲/۳ درصد در گروه B1، ۶۷/۹ درصد در گروه B2 و ۱۵/۴۸ درصد در گروه D قرار دارند. همچنین نشان داده شد که مورد ۲۹ جدایه ژن ST در ۳ گروه فیلوژنتیک با فراوانی (۳۸/۴۱ درصد) A، (۲۸/۴۸ درصد) D و (۳۴/۱۰ درصد) B2 توزیع یافته‌اند (۱۱). عبدی و همکارش در سال ۱۳۹۳ توزیع گروه‌های فیلوژنی A، B1، B2 و D در بین ایزوله‌های جداشده را به‌ترتیب: ۱۷، ۶، ۵۵ و ۲۲ درصد گزارش دادند (۱۲). همچنین سهرابی و همکارش با ارزیابی PCR گروه‌های فیلوژنتیک سویه‌های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژنیک نشان دادند که بیشترین میزان فراوانی مربوط به گروه B2 (۶۷/۱۵ درصد)، سپس D (۲۱/۱۷ درصد) و A (۱۱/۶۸ درصد) بود و گروه فیلوژنتیک B1 در ایزوله‌های اوروپاتوژنیک مشاهده نشد. در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* کامنسال فراوانی گروه‌ها به ترتیب مربوط به D ۵۲ درصد، B2 ۲۴ درصد، A ۱۴ درصد و B1 ۱۰درصد گزارش شده است (۱۳). در مطالعه دیگری بر روی طیور گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان تبریز از ۷۰ جدایه بیشترین میزان گروه فیلوژنتیک جدا شده متعلق به گروه A گزارش شد (۱۴). در تحقیق حاضر نیز اکثر نمونه‌های جدا شده از موارد کلی‌باسیلوزیس متعلق به گروه A بودند (گروه باکتری‌های همزیست) نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات قبلی هم‌خوانی دارد (۷و۱۵-۱۷). *اشریشیا کلی*‌های پاتوژن ساکن روده از راه دهانی مدفوعی وارد روده می‌شوند (۱۵). Xia و همکاران معتقدند که گوشت طیور بعنوان یکی از عوامل اصلی انتقال *اشریشیا کلی* از طیور به انسان است (۷). مطالعات فیلوژنتیک اخیر نشان می‌دهد که *اشریشیا کلی*‌های پاتوژن خارج روده‌ای اکثراً متعلق

به گروه B2 و به میزان کمتر به گروه D متعلق می‌باشند، و نتایج حاصل از تایپینگ مؤید این یافته می‌باشد (۶-۷).

اشریشیا کلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در این منطقه، بیشتر متعلق به گروه فیلوژنتیک A و B2 بودند که در مقایسه با سایر مناطق از نظر نوع گروه فیلوژنتیکی متفاوت می‌باشند. همچنین نیاز دارد که نهایت دقت در انتخاب درمان مناسب به عمل آید و از درمان بدون انجام آنتی بیوگرام پرهیز شود. در نهایت، انتخاب استراتژی‌های درمانی بر پایه نظارت‌های مستمر ارگانهای بهداشتی، برای جلوگیری از انتقال باکتری‌های مقاوم از طیور به انسان و نیز جلوگیری از انتقال باقی‌مانده دارویی در لاشه طیور به انسان لازم و ضروری می‌باشد.

References

1. Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6:733–750.

2. Nolan, LK, Barnes, HJ, Vaillancourt, JP, Abdul-Aziz, T, Logue, CM. Colibacillosis. In: diseases of poultry.12thedition. (Swayne, D.E., Mcdougald, L., Nolan, K., Suarez, D.L., Nair, V). Iowa, USA: John Wiley and Sons. 2013; 751-805.

3. Barnes HJ, vaillancourt JP, Gross WB. Colibacillosis in: Diseases of Poultry. Editedby Y. M. Saif, B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beardand L. Macdougol. 11thed. Iowa University press, Iowa, USA, 2003:631-647.

4. Wary C, Davies RH. Colibacillosis. In: poultry diseases. Edited by F.T. W. Jordan, M. Pattison, D. Alexander, and T. Foragher, 5thEd. W. b. Saunders Company, U.S.A., 2002; 125-130.

5. Peighambari, SM, Vaillancourt, JP, Wilson, RA, Gyles CL. Characteristics of Escherichia *coli* isolates from avian cellulitis. Avian. Dis. 1995; 65:116-124.

6. Skjøt-Rasmussen L, Olsen SS, Jakobsen L, Ejrnaes K, Scheutz F, Lundgren B, *et al.* *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(7):656-61.

7. Xia, X, Meng, J, Zhao, S, Bodeis-jones, S, Gaines, SA, Ayers, SL, *et al.* Identification and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* from retai meats. J Food Prot. 2011;74**:**38-44.

8. Ghanbarpour R, Daneshdoost S. Identification of shiga toxin and intimin coding genes in *Escherichia coli* isolates from pigeons (Columba livia) in relation to phylotypes and antibiotic resistance patterns. Trop Anim Health Prod. 2012;44**:**307-12.

9. Asadi S, Solhjoo, K, Kargar M, Rezaeian A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection in Jahrom city, southern Iran. Journal of Microbial World. 2011; 3(4): 245-250. [In Persian]

10. Etebarzadeh Z, Oshaghi M, Amir Mozafari N. Evaluation of Relationship between Phylogenetic Typing and Antibiotic Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli*. J Microbiol World. 2012; 4(3&4):84-92.

11. Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Abdollahi H. Determination of phylogenetic background, fimbrial genes, and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Bam region, Iran. Comp Clin Path. 2014; 23(5):1253–1257.

12. Abdi HA, Rashki A. The phylogenetic study of Uropathogenic *Escherichia coli* strains in Sistan of Iran. J Birjand Univ Med Sci. 2014; 21(3):385-393.

13. Mikaili P, Ameghi A, Shayegh J, Hassani B, Mahmmudzadeh M. Phylogenic typing of *Escherichia coli* isolated from broilers with collibacillosis in Tabriz, North West of Iran. Arch Razi Inst. 2013; 68(1):43-46.

14. Rodriguez-siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC. pathotype. Vet Res.2005;36:241-56.

15. 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**:** 81.

16. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. Vet Microbiol. 2012;154**:**305-15.

17. Sohrabi R, Zeighami H. Determination of Phylogenetic Groups and Antibiotic Resistance in Uropathogenic and Commensal *Escherichia Coli* Isolated from Patients in Zanjan City. Journal of Zanjan University of Medical Sciences & Health Services. 2016; 24(107):107-118.

Identification of phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from colibacillosis in poultry by multiplex-PCR

Davood Tarbiat-Nazloo[1], Abolfazl Jafari-Sales*[2] ,Yashar Bagherizadeh[1] , Mahboubeh Abdoli-senejani[1], Farhad Farhadi[2], Mehdi Ezdiyadi[2]

1- Department of Microbiology, Kazeroon branch, Islamic Azad University, Kazeroon
2- Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj

Receive: December 9, 2017; Revise: December 25, 2017; Accept: February 12, 2018

Summary

Among diseases caused by *Escherichia coli*, there is a severe systemic form termed colisepticaemia, which is characterized by the presence of *E. coli* in the blood, and colonization of organs including the heart, liver and spleen. The aim of the present study was to investigate different phylogenetic groups of *E. coli* isolated from broiler breeder with colibacillosis in Urmia. In this study, eighty swabs collected from liver and lung were cultured on MacConkey agar plates. Pink color colonies were isolated and confirmed as *E.coli* by biochemical tests and followed by multiplex-PCR to identify different phylogenetic groups. Out of 80 samples 21 isolates were identified as *E.coli*. Eight of isolates (38%) were belong to group A, 2 of them (9.5%) were belong to group B1, 6 of them (28.6%) were belong to group B2 and 5 of them (23.8%) were belong to group D2. According to the results of present study different phylogenetic group were observed in breeder herds. Most of them were classified as group A which is commensal. Studies showed that pathogenic *E.coli* has a considerable antibiotic resistance rate which might be transmitted to broilers in different ways and poses economic constraint to poultry industry. Thus, important strides must be made on eradication of different pathogenic *E.coli.*

Keywords: *phylogenetic group, E.coli, poultry, Colibacillosis*

تفاوت دوگروه فیلوژنتیکی A و B2 سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک از نظر توزیع ژن‌های حدت

حسینعلی عبدی*[۱]، نوید طحان زاده[۱]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

دریافت مقاله: ۲ آذر ۱۹۳۶، بازنگری: ۳ دی ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۶ بهمن ۱۳۹۶

چکیده

اشریشیا کلی به عنوان فراوان‌ترین باکتری ایجاد کننده عفونت ادراری معرفی شده است. سویه‌های *اشریشیا کلی* ایجاد کننده عفونت ادراری که به عنوان "یوروپاتوژنتیک" شناخته می‌شوند، حاوی فاکتورهای حدت متنوع می‌باشند. بر اساس مطالعات قبلی سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 به عنوان مهم‌ترین سویه، درحالی که سویه‌های گروه A به عنوان کم‌اثرترین سویه در ایجاد عفونت ادراری مطرح هستند. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی تأیید شد. پس از استخراج DNA ژنومی با روش Triplex-PCR تعداد ۷۲ سویه (۵۵ سویه متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 و ۱۷ نمونه متعلق به گروه A) برای تعیین میزان توزیع ژن‌های حدت انتخاب شدند. فراوانی ژن‌های *cnf1*، *irp2*، *iha* و*ompT* به ترتیب به میزان ۳۹، ۲۹، ۹۲ و ۷۸ درصد مشاهده شد. میزان فراوانی این ژن‌ها در گروه فیلوژنتیکی B2 به مراتب از گروه A بیشتر بود. تفاوت معنی‌داری در میزان توزیع ژن‌های *cnf1* و *irp2* در دو گروه فیلوژنتیکی B2 و A مشاهده شد ($P \geq ۰/۰۵$). از نظر الگوی توزیع ژنی ۱۰ الگوی منحصر به فرد (Ec1-Ec10) برای این دو گروه مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های B2 حاوی ژن‌های حدت بیشتری نسبت به سویه‌های A هستند و احتمالاً نقش مهم‌تری در ایجاد عفونت ادراری دارند.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک، ژن‌های حدت، گروه‌های فیلوژنتیک*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: genetics60@gmail.com

مقدمه

اشریشیا کلی به عنوان عامل عمده عفونت‌های ادراری و مشکلات بهداشتی در بسیاری از کشورهای دنیا مطرح است و به تنهایی توانسته منجر به بروز ناراحتی‌های جسمی و نیز خسارات مالی فراوانی گردد (۱). سویه‌هایی که منجر به عفونت‌های ادراری می‌شوند به نام سویه‌های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک (UPEC) خوانده می‌شوند (۲).

عفونت ادراری از نظر شیوع دومین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی می‌باشد که میزان بروز آن در زنان بسیار بیشتر از مردان است (۳). سویه‌های UPEC می‌توانند انواع فاکتورهای حدت مرتبط با استقرار و بقای باکتری در مجرای ادراری را بیان کنند و از این طریق ایجاد عفونت در دستگاه ادراری نمایند (۴).

از مهم‌ترین فاکتورهای حدت این سویه‌ها می‌توان به فاکتورهای مربوط به سیستم جمع‌کننده آهن، چسبندگی و سنتز سموم کشنده سلول اشاره کرد. این عوامل حدت به تکثیر و تهاجم باکتری در دستگاه ادراری کمک می‌کند (۵).

سویه‌های *اشریشیا کلی* واجد چهار گروه فیلوژنتیکی اصلی به نام‌های A، B1، B2 و D می‌باشند. مطالعات نشان داده که توزیع ژن‌های مختلف حدت دراین چهار گروه متفاوت است و مطالعات قبلی نشان می‌دهد که نوع گروه - فیلوژنتیک این میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در بیماری‌زایی آنها دارد (۶). سویه‌های خارج روده‌ای بیماری‌زا اساساً درگروه B2 و به مقدارکمتر درگروه D هستند. درحالی که سویه‌های کومنسال متعلق به گروه A و B1 می‌باشند. امروزه تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی در باکتری *اشریشیا کلی* با استفاده از حضور یا عدم حضور ژن‌های *chuA*، *yjaA* و قطعه DNA به نام TspE4.C2 انجام می‌شود (۷). نتایج حاصل از مطالعات سویه‌های خارج روده‌ای نشان داده که سویه‌های متعلق به گروه B2 بسیار بیماری‌زاتر از سویه‌های متعلق به گروه D هستند، در حالی که سویه‌های گروه A و B1، اغلب عاری از عوامل حدت خارج روده‌ای می‌باشند (۸).

اولین قدم برای مقابله و مهار بیماری‌زایی باکتری UPEC شناسایی فاکتورهای مهم حدت آن است. با کسب اطلاعاتی درخصوص فراوانی فاکتورهای حدت سویه‌های UPEC و نحوه‌ی توزیع آنها در گروه‌های مختلف فیلوژنتیکی می‌توان در ادامه راهکارهای مقابله و مهار آنها را نیز مورد بررسی و مطالعه قرار داد. از سویی بر اساس اکثر مطالعات قبلی در این زمینه تأکید بر درجه بیماری‌زایی به مراتب بیشتر سویه‌های *اشریشیا کلی* B2 نسبت به سویه‌های A شده است. بنابراین انتظار می‌رود که میزان شیوع ژن‌های حدت در سویه‌های متعلق به این دو گروه تفاوت معنی‌داری داشته باشد. بنابراین مطالعه حاضر جهت تعیین میزان توزیع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت سیتوتوکسین نکروز دهنده ۱(*cnf1*)، سیدروفور یرسینیا باکتین (*irp2*)، آدهسین غیر هموآگلوتینین(*iha*) و پروتئاز غشای خارجی (*ompT*) در گروه‌های فیلوژنتیکیA و B2 *اشریشیا کلی* به روش Multiplex-PCR انجام گرفت .

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۲۵نمونه از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بستری شده در بیمارستان‌های منطقه سیستان و بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های شهر زابل در فاصله زمانی مرداد تا آذر ۹۲ جمع‌آوری گردید. نمونه‌های ادرار در ظرف استریل جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک کانکی آگار وEMB کشت شد وپس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای۳۷درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها شمارش شدند. سپس آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند اکسیداز،

تخمیرقندها، حرکت، ایندول، اوره آز، احیای نیترات، MR-VP، H2S و سیمون سیترات انجام شد و نهایتاً تعداد ۱۰۰ نمونه *اشریشیا کلی* تشخیص داده شد.

در این مطالعه جهت استخراج DNA ژنومی از روش جوشاندن استفاده شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای انجام Multiplex-PCR به طور خلاصه، با حجم نهایی۱۶میکرولیتر (۲ میکرولیترDNA، ۱میکرولیتر از هر مخلوط پرایمر(حاوی هر چهار پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۸ میکرولیتر Master Mix RED 2× (شرکت پیشگام، ایران)، ۴ میکرولیتر آب دیونیزه) و با برنامه دمایی: واسرشتگی (denaturation) اولیه: ۱ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۴ دقیقه، واسرشتگی: ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها (annealing) برای ۴۵ ثانیه در C59°، طویل شدن (extension) برای ۱ دقیقه، در C72° و طویل شدن نهایی (final extension) یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، انجام شد. جدایه‌ها بر اساس داشتن یا فقدان انواع ژن‌های حدت الگوبندی شدند. برای تعیین گروه‌های فیلوژنی از روش Triplex-PCR که در سال ۲۰۰۰ توسط Clermont و همکاران توصیف شد استفاده گردید (۷). در این روش ژن‌های مارکر *chuA, yjaA* و TspE4.C2 با پرایمرهای جدول ۲ تکثیر گردید. گروه‌بندی فیلوژنتیکی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای تکثیری ژن‌های فوق تعیین شد. ژن‌های بیماری‌زای مورد نظر با استفاده از فرایند Multiplex-PCR با آنزیم TaqDNAPolymerase تکثیر گردید. بررسی محصول Triplex-PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد و Multiplex-PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و سایز مارکر ۱۰۰bp صورت گرفت. از سویه *E.coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و از آب مقطر استریل به جای DNA به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده برای این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول۱- مشخصات پرایمرها برای تکثیر ژن‌های حدت

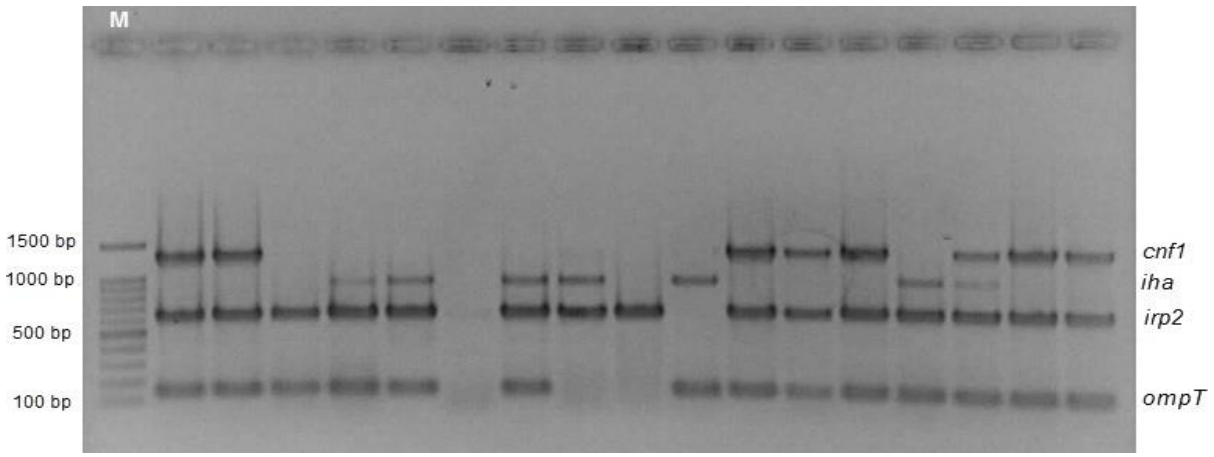
ژن		توالی پرایمرها(′3-′5)	اندازه (bp)
cnf1	F	AGGCAGGAATAAACCAGGAGGT	۱۲۸۶
	R	ACGAGCAGAATTTGACACACGA	
iha	F	CTGGAAGTCAGCATTCGTGGAA	۹۳۴
	R	GATGCCACTCATCCTCAGCAAA	
irp2	F	AGCATCGCCTGCTAAAACTGAA	۶۲۳
	R	CAGACGATGCAGGGCGTTATTA	
ompT	F	TGCGATCAGCTCTTTTGCTTCT	۱۴۴
	R	AGTTGACTGACTTTTCGGCCTC	

آنالیز آماری با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. برای آنالیز حضور ژن‌های حدت در دو گروه فیلوژنتیکی A و B2 از آزمون دقیق فیشر استفاده گردید.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه *اشریشیا کلی* تعداد ۷۲ نمونه متعلق به گروه‌های فیلوژنتیکی A (۱۷ نمونه) و B2(۵۵ نمونه) بودند. بقیه نمونه‌ها در گروه‌های فیلوژنتیکی B1 و D قرار گرفتند و از این مطالعه حذف شدند. فراوانی ژن‌های حدت cnf1، iha، irp2 و ompT به ترتیب ۳۹، ۲۹، ۹۲ و ۷۸ درصد در بین ۷۲ نمونه دیده شد. شکل ۱ نمونه الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد را برای ژن‌های حدت نشان می‌دهد. تمام نمونه‌های گروه فیلوژنتیکی A فاقد ژن

توکسین *cnf1* بودند. بیشترین مقدار ژن‌های حدت در گروه فیلوژنتیکی B2 مشاهده شد. فقط در یک سویه از نمونه‌های فیلوژنتیکیB2 ژن *irp2* دیده نشد. هیچ کدام از سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی A فراوانی ژنی بالاتری نسبت به گروه B2 نداشتند. تفاوت معنی‌داری($P \geq 0/05$) برای حضور ژن‌های *cnf1* و *ompT* در دو گروه فیلوژنتیکی A و B2 مشاهده شد (جدول ۲).



شکل۱- الکتروفورز در ژل آگارز برای محصولات Multiplex-PCR

جدول۲- توزیع ژن‌های حدت در دو گروه فیلوژنتیکی B2 و A

ژن	تعداد	Aتعداد سویه گروه	B2تعداد سویه گروه	P value
cnf1	۲۸	۰	۲۸	۰۰۲۶/۰
iha	۲۱	۲	۱۹	۲۲۳۶/۰
irp2	۶۶	۱۲	۵۴	۵۳۱۶/۰
ompT	۵۶	۳	۵۳	۰۰۶/۰

جدول۳ - الگوهای مختلف توزیع ژنی

الگو	گروه فیلوژنتکی	cnf1	iha	irp2	ompT	تعداد نمونه
Ec1	B2	+		+	+	۲۵
Ec2	B2			+	+	۱۰
Ec3	B2	+	+	+	+	۱۰
Ec4	B2		+	+	+	۱۵
Ec5	B2, A			+		۱۲
Ec6	B2	+		+		۱
Ec7	A					۲
Ec8	A		+		+	۳
Ec9	A		+	+		۱
Ec10	A				+	۱
جمع		۲۸	۲۱	۶۶	۵۶	۷۲

بر اساس نوع الگوی توزیع ژن‌ها در دو گروه فیلوژنتیکی B2 و A تعداد ۱۰ الگو مشاهده شد که با عنوان Ec1 تا Ec10 در جدول ۳ آمده است. دو سویه متعلق به گروه A فاقد چهار ژن مورد مطالعه

بودند و دو سویه متعلق به B2 حاوی تمام ژن‌های مورد مطالعه بودند. ۱۲ سویه فقط حاوی ژن *irp2* بودند که یک سویه متعلق به گروه B2 بود و ۱۱ سویه دیگر متعلق به گروه A بودند. ژن *iha* و *cnf1* برعکس دو ژن دیگر، در هیچ سویه‌ایی به تنهایی دیده نشد و به همراه حداقل یک ژن دیگر بود. در هیچ کدام از ۱۷ سویه A بیش از دو ژن حدت نداشتند.

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه بر روی جدایه‌های *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از عفونت‌های ادراری در دو گروه فیلوژنتیکیA و B2 در منطقه سیستان انجام شد. در مطالعه حاضر از روش Multiplex PCR برای بررسی حضور ۴ ژن حدت (*cnf1*، *iha*، *irp2* و*ompT*) و ۳ ژن (*chuA*، *yjaA* و قطعه DNA به نام TspE4.C2) تعیین‌کننده گروه‌بندی فیلوژنتیکی استفاده شد. روش Multiplex PCR یک روش مطالعه ژنوتیپی مناسب است که جهت بررسی هم‌زمان چندین ژن در یک واکنش PCR با وقت و هزینه کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقایسه دو گروه فیلوژنتیکی از نظر توزیع ژن‌های حدت اهمیت آنها را برای تعیین درجه شدت بیماری‌زایی ایجاد شده توسط سویه مربوطه می‌تواند تعیین کند.

در این مطالعه معلوم شد که در بین ایزوله‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک فراوانی سویه‌های B2 خیلی بیشتر از سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی A می‌باشد. اطلاعات مطالعه ما در این مورد با اکثر مطالعات قبلی همخوانی دارد (۱۲- ۸). رژیم غذایی به عنوان عامل کلیدی در تعیین فراوانی گروه‌های فیلوژنتیکی *اشریشیاکلی* در پستانداران گزارش شده است (۱۳)، علاوه براین موقعیت جغرافیایی جمعیت‌های انسانی نقش مهمی را در ساختاربندی جمعیت‌های *اشریشیا کلی* دارد و پیشنهاد می‌شود که سطح بهداشت می‌تواند به عنوان عامل مؤثر در تنوع ایزوله‌های بومی هر منطقه، خصوصاً در مناطق گرمسیری نقش داشته باشد (۱۴).در پژوهش حاضر بر اساس توزیع ژن‌های حدتی مورد مطالعه در بین ۷۲ ایزوله *اشریشیا کلی*، ۱۰ الگوی توزیع ژنی منحصر به فرد مشاهده شد (جدول۳). دو سویه حامل تمام ژن‌های حدت مورد مطالعه بود که آن هم به گروه فیلوژنتیکی B2 تعلق داشت. در دو سویه هیچ یک از ژن‌های حدت مورد مطالعه مشاهده نگردید که این ایزوله متعلق به گروه فیلوژنتیکی A بود. نتایج این مطالعه با پژوهش انجام شده در رومانی همخوانی دارد (۱). با توجه به توزیع ژنی در دو گروه B2 و A بیشترین توزیع ژن‌های حدت در ایزوله‌های گروه B2 و کمترین در گروه A مشاهده شد، مطالعات قبلی نیز این نوع توزیع ژنی را تأیید می‌کند (۱۰،۱۱، ۸). در یک مطالعه در تهران که توسط کریمیان و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی سویه‌های یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری انجام شد نتایج متفاوتی گزارش شد. این گروه فراوانی ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* را به ترتیب ۵۰، ۵، ۱۸ و ۱۱ درصد گزارش کردند (۱۵). علت تفاوت در نتایج می‌تواند ناشی از تفاوت در منطقه جغرافیایی یا تفاوت آب و هوایی باشد. در پژوهش دیگر نویسنده بر روی ۱۰۰ سویه *اشریشیا کلی* خارج روده‌ایی ایجاد کننده عفونت تناسلی زنانه مقدار ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و*ompT* به ترتیب به میزان ۱۰، ۸، ۶۳ و ۴۵ درصد گزارش شد (۱۶). این نتایج به نتایج مطالعه حاضر نزدیک است و احتمالاً دلیل تفاوت جزئی با نتایج مطالعه حاضر می‌تواند در نوع متفاوت سویه‌های *اشریشیا کلی* و یا جامعه آماری بزرگتر نسبت به این مطالعه باشد . همچنین در این مطالعه از مجموع ۱۳۲ ایزوله *اشریشیاکلی* ۱۴ و ۶۰ درصد به ترتیب در گروه‌های فیلوژنتیکی Aو B2 قرار گرفتند و بیشترین میزان توزیع ژن‌های حدت در گروه B2 قرار داشت. این میزان زیاد توزیع

ژن‌های حدت در گروه B2 کاملاً با نتایج تحقیق اخیر مطابقت دارد. همچنین در تحقیق دیگر نویسنده روی ۹۴ نمونه *اشریشیا کلی* مدفوعی، فراوانی ژنی ۸ ژن بررسی گردید که فراوانی ژنی ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* به ترتیب به میزان ۴، ۲۶، ۹۲ و ۶۷ درصد بودند (۱۷). به علت اینکه سویه‌های *اشریشیا کلی* مدفوعی می‌توانند منبع خوبی برای ایجاد عفونت ادراری خصوصاً در زنان باشند. این نتایج به جز فراوانی ژنی *cnf1* با نتایج ما مطابقت نزدیکی دارد و دلیل تفاوت فراوانی ژنی ژن *cnf1* می‌تواند به علت تفاوت در نوع سویه‌های *اشریشیا کلی* باشد.

فراوانی بالای ایزوله‌های گروه B2 و شیوع بالای ژنی ایزوله‌های این گروه نشان‌دهنده اهمیت و قدرت بالای بیماری‌زایی ایزوله‌های UPEC متعلق به گروه B2 می‌باشد. با شناسایی ژن‌های حدت مهم ایزوله‌هایUPEC، مطالعات تکمیلی جهت طراحی واکسن علیه پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها برای کنترل عفونت ادراری ناشی از *اشریشیا کلی*، می‌تواند در دستور کار محققان آینده قرار گیرد.

References

1- 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.

2- Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. EMBO J. 2000;19(12):2803-12.

3- Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity ,and economic costs. Am J Med. 2002;113(1):5-13.

4- Tiba MR, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008;50(5):255-60.

5- Janke B, Dobrindt U, Hacker J, Blum-Oehler G. A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic E. coli strain 536 and the E. coli K-12 strain MG1655. FEMS Microbiol Lett. 2001;199(1):61-66.

6- Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis. 2001;183(1):78-88.

7- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the*Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000;66(10):4555-8.

8- Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol. 2005;295(6):383-404.

9- Navidinia M, Peerayeh SN, Fallah F, Bakhshi B. Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in *Escherichia coli* isolated from children. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(10).

10- Bashir S, Haque A, Sarwar Y, Ali A, Anwar MI. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic E. coli from Faisalabad region of Pakistan. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012;11(1):23.

11- Zhang L, Foxman B, Marrs C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. J Clin Microbiol. 2002;40(11):3951-5.

12- Abdi HA, Rashki A. Comparison of Virulence Factors Distribution in Uropathogenic E. coli Isolates From Phylogenetic Groups B2 and D. Int J Enteric Pathog. 2014;2(4): e21725

13- Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiol. 2003;149(12):3575-86.

14- Escobar-Páramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, *et al.* Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol. 2004;70(9):5698-700.

15- Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res. 2012;6(39):6811-6.

17- Rashki A, Abdi H. The Relationship between Phylogenetic Groups and Pathogenicity Encoding Genes with regards to Extra-Intestinal *Escherichia coli* Isolates' Factors using Multiplex-PCR Method. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2015;17(2):36-42.

18- Rashki A, Abdi HA, Shookohi M. Prevalence of Genes Encoding Outer Membrane Virulence Factors Among Fecal *Escherichia coli* Isolates. Int J Basic Sci Med. 2017;2(1):52-7.

The difference between two phylogenetic groups A and B2 of Uropathogenic *E. coli* strains in terms of distribution of virulence genes

Hosein Ali Abdi*[1]; Navid Tahanzadeh [1]

1 - PhD Student in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.

Receive: November 23, 2017; Revise: December 24, 2017; Accept: January 12, 2018

Summary

Escherichia coli is the most abundant bacterium that causes urinary tract infections. The *E. coli* strains that cause urinary tract infections, known as "Uropathogenic *E.coli* (UPEC)", contain various virulence factors. According to previous studies, the strains belonging to the phylogenetic group B2 are the most important strains, whereas strains of group A are the least effective strains for causing urinary tract infections. In this study, 100 samples of *E. coli* isolated from patients with urinary tract infection were confirmed by standard biochemical methods. After extraction of genomic DNA, 72 strains (55 strains belonging to phylogenetic group B2 and 17 samples belonging to group A) were selected by Triplex-PCR method to determine the distribution of virulence genes. The frequency of virulence genes *cnf1*, *irp2*, *iha* and *ompT* were observed to be 38.88%, 29.16%, 91.66% and 77.77%, respectively. The frequency of these genes in phylogenetic group B2 was significantly higher than group A. Significant difference was observed in the distribution of *cnf1* and *irp2* genes in both phylogenetic groups B2 and A ($P \leq 0.05$). In terms of gene distribution pattern, 10 unique patterns (Ec1-Ec10) were observed for these two groups. The results of this study showed that strains B2 contain more virulent genes than strains A and may have an important role in the development of urinary tract infections.

Keywords: *Uropathogenic Escherichia coli, Phylogenetic groups, Virulence genes*

مروری بر عوامل عفونی سقط جنین گوسفند و بز در ایران

محمد جواد بهزادی شهربابک*

استادیار گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت مقاله: ۲۱ بهمن ۱۳۹۷، بازنگری: ۱۲ اسفند ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۳ اسفند ۱۳۹۷

چکیده

سقط جنین یکی از معضلات پرورش دهندگان گوسفند و بز در سطح کشور است و خسارت اقتصادی قابل توجهی را به دامداران تحمیل می‌کند. دلیل عمده‌ی سقط جنین در گوسفند و بز عوامل عفونی هستند. بعضی از این عوامل مثل بروسلا و توکسوپلاسما عامل بیماری‌های مشترک بین انسان و دام نیز هستند. با توجه به نقش مهم پرورش گوسفند و بز در معیشت مردم ایران، شناخت دقیق عوامل عفونی سقط دهنده در گله‌های گوسفند و بز به لحاظ اقتصادی و بهداشت عمومی اهمیت بسیاری دارد. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی تمام مقالاتی است که به شناسایی عوامل عفونی باکتریایی، ویروسی و تک یاخته‌ای سقط جنین گوسفند و بز در ایران پرداخته‌اند. بنابراین تمام مقالات مربوط به سقط جنین گوسفند و بز، تک تک عوامل عفونی سقط دهنده و شیوع آن‌ها که در محدوده‌ی جغرافیایی ایران یا کشورهای همسایه انجام شده بود در پایگاه‌های اطلاعاتی شامل Science Direct، Pub Med، Scopus، Google Scholar، Magiran و Iran Doc جستجو شد. از بین مطالعات انگلیسی و فارسی پیدا شده ۳۶ مورد در زمینه‌ی سقط جنین گوسفند و بز بود که نتایج آن‌ها برای بررسی بهتر به صورت جدول تدوین شد. بر اساس مطالعاتی که عوامل سقط جنین گوسفند و بز را در استان‌های مختلف ایران بررسی کرده‌اند گونه‌های بروسلا، توکسوپلاسما، کلامیدوفیلا، کمپیلوباکتر و سالمونلا از شایع‌ترین عوامل سقط در کشور محسوب می‌شوند. هیچ مطالعه‌ای در کشور به ردیابی عوامل ویروسی در سقط جنین گوسفند و بز نپرداخته است.

واژگان کلیدی: *ایران، سقط جنین، عوامل عفونی، گوسفند و بز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: dvm.behzadi@gmail.com

مقدمه

در کشورهای منطقه غرب آسیا پرورش گوسفند و بز از نظر جمعیت و ارزش محصولات تولیدی از مهم‌ترین شاخه‌های دامپروری است. گوسفند و بز به دلیل داشتن ویژگی‌های مطلوبی از جمله قدرت سازش در شرایط مختلف محیطی، توقع کم در مصرف خوراک، قدرت راه‌پیمایی بالا و ارزش محصولات تولیدی اهمیت فراوانی در تأمین مواد پروتئینی جامعه دارند (۱). در ایران نیز اقتصاد بسیاری از خانواده‌های روستایی و حتی شهری به پرورش گوسفند و بز وابسته است که این خانواده‌ها عمدتاً از اقشار متوسط و ضعیف و در نتیجه آسیب پذیر جامعه هستند (۲).

سقط جنین از مهم‌ترین عوامل زیان اقتصادی در گله‌های گوسفند و بز در تمام دنیا محسوب می‌شود و در کشور ما نیز سالانه دامداران را در مناطق مختلف متضرر می‌کند. سقط جنین علاوه بر کاهش میزان تولد بره و بزغاله موجب کاهش تولید شیر و عوارض ثانویه بر دستگاه تولید مثل حیوان مثل جفت‌ماندگی و آندومتریت می‌شود (۳).

مطالعات متعددی در سراسر دنیا نشان داده است که بیشتر موارد سقط جنین در گوسفند و بز ناشی از عوامل باکتریایی، ویروسی و تک یاخته‌ای هستند (۴). به طور معمول درصد وقوع سقط در گله‌ها کمتر از ۲ درصد است. نسبت قابل قبول سقط‌های مشهود در گله بایستی کمتر از ۵ درصد باشد. وقتی میزان سقط از ۵ درصد در یک گله بیشتر می‌شود لازم است که یک بررسی کامل صورت گیرد. میزان سقط مزمن بین ۲ تا ۵ درصد نشان دهنده‌ی یک مشکل اندمیک است که ممکن است نیاز به رسیدگی داشته باشد (۵).

عوامل غیر عفونی سقط در گوسفندان به ندرت باعث میزان سقط بالای ۲ درصد در گله می‌شوند و زمانی که سقط از این میزان در گله بیشتر است به احتمال زیاد یک عامل عفونی منجر به سقط شده و باید تشخیص داده شود (۶). شناخت این عوامل در هر منطقه کمک فراوانی به کنترل آن‌ها و در نتیجه کاهش خسارات ناشی از سقط جنین می‌کند.

به دلیل فاصله بین ایجاد عفونت و دفع جنین مرده و اتولیز شدن جنین در بسیاری از موارد تشخیص عامل عفونی مسبب سقط دشوار است. وقتی یک بررسی کامل صورت گیرد دقت تشخیص بین ۳۰ تا ۴۰ درصد امکان پذیر است (۵). خوشبختانه در مورد گوسفند و بز تشخیص پاتوژن عامل سقط نسبت به گونه‌های اهلی دیگر به دلیل در دسترس بودن جنین کامل و جفت سقط‌شده آسان‌تر است (۷). عوامل عفونی شایع سقط جنین میش که در سراسر دنیا مطرح هستند شامل کلامیدوفیلا آبورتوس، توکسوپلاسما گوندی، کمپیلوباکتر فتوس، بروسلا آبورتوس، گونه‌های سالمونلا و لپتوسپیرا، کوکسیلا بورنتی و بعضی عوامل ویروسی مانند ویروس بوردر و بلوتانگ هستند (۷-۵).

در کشور ایران در مطالعات متعددی عوامل سقط جنین گوسفند و بز را در مناطق مختلف و با روش‌های متفاوت ردیابی کرده‌اند. قطعاً بررسی این مطالعات در کنار هم می‌تواند به فهم بهتر عوامل شایع سقط جنین در جمعیت گوسفند و بز کشور کمک کند. مطالعه‌ی حاضر به مرور تحقیقاتی پرداخته است که عوامل عفونی سقط جنین گوسفند و بز را در ایران بررسی کرده‌اند. هدف از این مطالعه مشخص نمودن عوامل عفونی رایج سقط جنین گوسفند و بز در سطح کشور بر اساس مطالعات انجام شده و نیز تعیین عواملی است که جای بررسی و ردیابی در مناطق مختلف کشور دارند.

جدول ۱- مطالعات انجام شده در زمینه‌ی تشخیص عوامل عفونی سقط جنین گوسفند و بز در ایران

		سال	منطقه	گونه	روش آزمایش	تعداد نمونه	میکروب‌های شناسایی شده
۱	شریف زاده	۲۰۰۹	شهرکرد	گوسفند	پی سی آر	۳۸	۱۳/۱٪ بروسلا، ۵۰٪ *سالمونلا آبورتوس*، ۱۰/۶٪ بروسلا و سالمونلا توأماً، ۲۶/۳٪ شناسایی نشده
۲	هاشمی	۲۰۱۲	چهارمحال و بختیاری	گوسفند	پی سی آر	۳۸	۲۳/۶۸٪ سالمونلا
۳	شریف زاده	۲۰۰۶	چهارمحال و بختیاری	گوسفند	پی سی آر	۵۴	۴۴/۴٪ سالمونلا آبورتوس اویس، ۱۸/۶٪ بروسلا، ۱۱/۱٪ توأم سالمونلا و بروسلا، ۲۵/۹٪ هیچکدام از این دو
۴	صابری	۲۰۱۱	تبریز	گوسفند	پی سی آر و الایزا	۱۰۰	۱۲٪ *بروسلا ملی‌تنسیس*
۵	تاجبخش	۱۹۹۶-۱۹۹۸	اصفهان	گوسفند	کشت	۸۵	۱۳/۳-۰/۶٪ *کمپیلوباکتر فتوس* در گله های درگیر
۶	زهرائی صالحی	۱۹۹۹	تهران	گوسفند	کشت	۸	۱۰۰٪ *کمپیلوباکتر فتوس فتوس*
۷	فیروزی	۲۰۰۳	شیراز	گوسفند	جداسازی	۱۹۸	۱۱/۱٪ بروسلا، ۱۰/۶٪ سالمونلا، ۴٪ کمپیلوباکتر، ۱۴/۱٪ ای. کلای
۸	قره خانی	۲۰۱۲	همدان	گوسفند	جداسازی	۲۲۶	۵/۳٪ بروسلا، ۰/۴۴٪ کمپیلوباکتر، ۱۶/۳۷٪ ای. کلای
۹	ملک شاهی	۲۰۱۶	لرستان	گوسفند	پی سی آر	۵۰	۴٪ *بروسلا ملی‌تنسیس*، ۸٪ *سالمونلا آبورتوس*، ۴٪ کلامیدوفیلا، *کمپیلوباکتر فتوس* و *لپتوسپیرا اینتروگانس* یافت نشد
۱۰	راد	-	-	گوسفند	پی سی آر	۵۴	در مواردی کلامیدوفیلا یافت شد.
۱۱	صفرپور	۲۰۱۴-۲۰۱۵	چهار محال و بختیاری، اصفهان و خراسان رضوی	گوسفند	پی سی آر	۱۰۰	۲۰٪ کلامیدوفیلا در روش real time و ۹٪ در پی سی آر معمولی
۱۲	محزونیه	۲۰۱۱-۲۰۱۲	چهار محال و بختیاری	گوسفند	پی سی آر nested	۴۸	۵۲٪ کلامیدوفیلا
۱۳	کبیری	۲۰۱۳-۲۰۱۴	چهار محال و بختیاری، اصفهان و خراسان رضوی	گوسفند	پی سی آر	۹۸	۴/۹٪ *کمپیلوباکتر فتوس*، آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* یافت نشد
۱۴	صادقی	-	مرکزی	گوسفند و بز	جداسازی	۷۰	فقط از ۲۲ مورد باکتری جدا شد که ۲/۸٪ لیستریا، ۱/۴٪ کمپیلوباکتر، ۷/۱٪ باسیلوس، ۵/۷٪ *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱/۴ استرپتوکوکوس، ۴/۳ ٪ ای. کلای، ۵/۷٪ اولیگلا، ۱/۴٪ انتروکوکوس، ۱/۴٪ آئروموناس بودند.
۱۵	براتی	۲۰۱۴-۲۰۱۷	شهرکرد و باغ ملک	گوسفند و گاو	پی سی آر	۱۱۷	۵۶/۴۱٪ کلامیدوفیلا
۱۶	عالم	۲۰۱۱-۲۰۱۲	تبریز	گوسفند	پی سی آر	۵۰	۲۶٪ *کلامیدوفیلا آبورتوس*
۱۷	فروتنی	۲۰۱۰-۲۰۱۱	تبریز	گوسفند	سرولوژی و پی سی آر	۷۰	۸/۵٪ در سرولوژی لپتوسپیرا ۱۰٪ در پی سی آر لپتوسپیرا
۱۸	حملی	۲۰۱۰-۲۰۱۱	تبریز	گوسفند	پی سی آر	۱۳۲	۹/۰۹٪ *کمپیلوباکتر فتوس* و ۱/۵٪ *کمپیلوباکتر ژژنی*؛ *کمپیلوباکتر کولای* یافت نشد
۱۹	سعادتی	۲۰۱۵-۲۰۱۶	سیستان	گوسفند	پی سی آر	۷۸	۱۹/۲٪ *بروسلا ملی‌تنسیس*، ۱۶/۶٪ *کوکسیلا بورنتی*، ۱/۳٪ *سالمونلا آبورتوس اویس*، ۷/۷٪ کمپیلوباکتر

۲۰	هرکی نژاد	۲۰۱۰	زنجان	گوسفند	پی سی آر	۱۲۹	۵۱/۵۲٪ کمپیلوباکتر *کوکسیلا بورنتی*، *کلا میدوفیلا آبورتوس*، *سالمونلا انتریکا*، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *بروسلا آبورتوس* و *لپتوسپیرا اینتروگانس* پیدا نشد
۲۱	اسدپور	۲۰۰۹-۲۰۱۰	تبریز	گوسفند	سرولوژی مادر و پی سی آر جنین	۷۰	۵/۷٪ مادران و ۸/۵٪ جنین‌ها نئوسپوروز
۲۲	قره خانی	۲۰۱۱-۲۰۱۲	همدان	گوسفند	سرولوژی	۳۵۸	۲/۲٪ میش‌های سقط کرده به نئوسپورا مثبت بودند.
۲۳	عزت پور	۲۰۱۱	الشتر- لرستان	گوسفند	سرولوژی	۵۸۶	۱/۱۳٪ عفونت نئوسپورایی در میش‌های سقط کرده و ۱/۷٪ در میش‌های سقط نکرده
۲۴	هرکی نژاد	۲۰۱۵	زنجان	گوسفند	پی سی آر	۱۳۲	۵۱/۹٪ کمپیلوباکتر سالمونلا، یرسینیا و بروسلا پیدا نشد.
۲۵	قربان پور	۲۰۰۵	اهواز	گوسفند	سرولوژی	۱۴۵	۱۳٪ از میش‌های با سابقه سقط نسبت به کلامیدیا سرم مثبت بودند.
۲۶	خلیلی	۲۰۱۵	همدان	گوسفند و بز	پی سی آر	۳۲	*کوکسیلا بورنتی* پیدا نشد.
۲۷	رزمی	۲۰۰۶-۲۰۰۸	مشهد	گوسفند	سرولوژی و انگل شناسی	۳۲۵	۵/۲٪ توکسوپلاسما
۲۸	حمیدی‌نژاد	۲۰۰۸	اهواز	گوسفند	سرولوژی	۱۵۰	۸۵٪ توکسوپلاسما در میش‌های سقط کرده و ۵۸٪ در میش‌های بدون سابقه سقط
۲۹	قره‌خانی	۲۰۱۱-۲۰۱۲	همدان	گوسفند	سرولوژی	۵۰۸	۳/۱٪ توکسوپلاسما
۳۰	حبیبی	۲۰۱۲	قزوین	گوسفند	پی سی آر	۱۸	۶۶٪ توکسوپلاسما
۳۱	رزمی	۲۰۰۹-۲۰۱۳	خراسان رضوی	گوسفند	پی سی آر	۱۱۲	۱۶/۰۷٪ توکسوپلاسما
۳۲	حمیدی‌نژاد	۲۰۱۷	لرستان	گوسفند	پی سی آر	۱۴۲	۷٪ توکسوپلاسما
۳۳	حقوقی راد	۲۰۱۴	اردبیل	گوسفند	پی سی آر	۷۵	توکسوپلاسما یافت نشد.
۳۴	رسولی	۲۰۱۳	چناران(خراسان رضوی)	گوسفند	چندین روش	۶۹	۲۳-۳۴٪ توکسوپلاسما
۳۵	سنجرانی	۲۰۱۷	سیستان	گوسفند	پی سی آر	۷۹	۱۶/۴۵٪ توکسوپلاسما

عوامل باکتریایی

بروسلا: دو گونه‌ی *بروسلا اویس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* می‌توانند در گوسفند و بز آلودگی ایجاد کنند و منجر به سقط جنین شوند (۵، ۶). به نظر می‌رسد بزها به صورت جهانی مستعد ابتلا به *بروسلا ملی‌تنسیس* هستند در صورتی که ابتلای گوسفندان به این ارگانیسم بر اساس نژاد متفاوت است (۷).

برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۲۸ *بروسلا ملی‌تنسیس* از شیر یک بز سقط کرده جدا شد و ۲ سال بعد مطالعاتی نقش آن را در ایجاد سقط گوسفند و بز در گله‌های اطراف اصفهان نشان داد و هم اکنون در تمام مناطق کشور اندمیک است. میزان شیوع بروسلوز در جمعیت گوسفند و بز روستایی ۲/۱ درصد برآورد گردیده است. بیوتایپ 1

بروسلا ملی‌تنسیس در گوسفند، بز و انسان به عنوان بیوتایپ غالب و بومی کشور بوده است (۸، ۹). در مطالعه حملی و همکاران در گله‌های گوسفند اطراف تبریز تست سرولوژیک روی ۱۰۰ میش سقط کرده ۱۲ درصد آلودگی سرمی به گونه‌های بروسلا را نشان داد و بررسی مولکولی جنین سقطی این میش‌ها نیز میزان ۱۲ درصد آلودگی به بروسلا را تأیید کرد ضمن اینکه آزمایش PCR سویه واکسنی Rev-1 *بروسلا ملی‌تنسیس* را در آن‌ها نشان داد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که واکسیناسیون با واکسن Rev-1 در میش‌های آبستن می‌تواند منجر به سقط شود (۱۰). مطالعه‌ی اسماعیلی و همکاران نیز ایجاد سقط جنین در گله‌های گوسفند و بز در مناطقی از کشور را با عامل واکسن Rev-1 گزارش کرده به طوری‌که این سویه از جنین‌های سقطی جدا شده است (۹).

در بررسی عوامل باکتریایی سقط جنین گوسفندان اطراف شیراز از ۲۰/۵ درصد جنین‌های سقطی گونه‌های بروسلا جدا شد (۱۱).

در مطالعه سعادتی و همکاران در جنین‌های سقطی گوسفند بلوچی در منطقه سیستان به روش PCR ۱۹/۲ درصد عفونت بروسلا شناسایی شد (۱۲). در مطالعات دیگری نیز روی جنین‌های سقطی آلودگی به بروسلا ۵/۳ درصد در همدان (۱۳) و ۴ درصد در لرستان (۱۴) و ۱۳/۱ درصد در شهرکرد (۱۵) تشخیص داده شد.

با توجه به سهمی که باکتری بروسلا در سقط جنین در بررسی‌های انجام شده در استان‌های مختلف کشور داشته است و همچنین مطالعات دیگری که شیوع بروسلوز را در جمعیت گوسفند و بز کشور نشان می‌دهد (۹) علیرغم تلاش سازمان دامپزشکی در مبارزه با بیماری، بروسلوز هنوز یکی از عوامل سقط جنین در جمعیت گوسفند و بز است.

کلامیدوفیلا: باکتری *کلامیدوفیلا آبورتوس* عامل سقط انزئوتیک میش‌ها است و به عنوان شایع‌ترین عامل سقط جنین گوسفند در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله کشورهای اروپایی و غرب ایالات متحده آمریکا مطرح است (۶). در ایران مطالعات معدودی دخالت این باکتری را در سقط جنین گوسفند در مناطق مختلف نشان داده است. در مطالعه عالم و همکاران بررسی مولکولی ۵۰ جنین سقط شده در شهر تبریز نشان از ۲۶ درصد آلودگی با *کلامیدوفیلا* را داشت (۱۶). مطالعات مشابه میزان آلودگی ۵۶/۴۱ درصد در شهرکرد و باغ ملک (۱۷)، ۵۲ درصد در استان چهارمحال و بختیاری (۳)، ۴ درصد در استان لرستان (۱۴)، ۲۰ درصد در نمونه‌های استحصالی از استان‌های چهارمحال و بختیاری، اصفهان و خراسان رضوی (۱۸) را به *کلامیدوفیلا* نشان داد. در مطالعه‌ی دیگری آزمایش PCR جنین‌های سقطی گاو در استان چهارمحال و بختیاری نیز ۱۷/۹۳ درصد آلودگی به *کلامیدوفیلا* (۱۹) را اثبات کرد. مطالعه سرمشناسی روی میش‌های با سابقه سقط در اهواز آلودگی به *کلامیدوفیلا* را ۱۳ درصد نشان داد (۲۰).

همچنین در یک بررسی سرمی گسترده توسط اسماعیلی و همکاران روی ۱۴۴۰ رأس گوسفند از ۱۱۳ گله و ۷ استان کشور شیوع سرمی به *کلامیدوفیلا آبورتوس* در ۲۵/۶ درصد گوسفندان و ۸۱/۴ درصد گله‌ها گزارش شد (۲۱) و مطالعات سرمی دیگر نیز با این گزارش همخوانی دارد (۲۰). در کشورهای همسایه از جمله ترکیه نیز نقش *کلامیدوفیلا* در سقط جنین گوسفند و بز و گاو نشان داده شده است (۲۲، ۲۳).

مطالعاتی که در کشورهای اروپایی صورت گرفته، نشان می‌دهد اهمیت *کلامیدوفیلا* در موارد سقط جنین بز به اندازه آنچه در مورد گوسفند مشاهده شد نیست (۶). با توجه به اینکه ردیابی *کلامیدوفیلا* از طریق کشت امکان پذیر نیست و

آزمایش‌های مولکولی معمول نیز در این زمینه چندان موفق نیستند، استفاده از nested PCR برای پیدا کردن DNA کلامیدیا توصیه شده است (۳). همین مسأله می‌تواند نشان دهد که سهم کلامیدیا از آنچه در مطالعات ذکر شده بیان شد احتمالاً بالاتر باشد.

کمپیلوباکتر: *کمپیلوباکتر فتوس* زیرگونه‌ی فتوس از عوامل شایع سقط جنین گوسفند در دنیا محسوب می‌شود (۶). در ایران نیز نقش این عامل در سقط جنین مورد مطالعه بیشتری نسبت به سایر عوامل قرار گرفته است. بیشترین درصد آلودگی به *کمپیلوباکتر* در بین این مطالعات توسط هرکی نژاد و همکاران گزارش شده است که از ۱۲۹ سوآپ مهبلی میش‌های افشاری استان زنجان با سابقه سقط با روش PCR میزان آلودگی ۵۱/۹ درصد به کمپیلوباکتر تأیید شد. در همین مطالعه میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر* در میش‌هایی که بره سالم متولد کرده بودند ۲۳/۵۲ درصد گزارش شد (۴). اختلاف آماری معنی‌دار بین میش‌های با سابقه سقط و بدون سابقه سقط از لحاظ داشتن عفونت *کمپیلوباکتر* نشان‌دهنده نقش این عامل در سقط جنین‌های منطقه بوده است. مطالعه مشابهی در استان زنجان همین یافته را تأیید می‌کند (۲۴). سایر مطالعات میزان آلودگی ۱۳/۳-۰/۶ درصد در گله‌های استان اصفهان (۲۵)، ۴ درصد در اطراف شیراز (۱۱)، ۰/۴۴ درصد در همدان (۱۳)، ۴/۹ درصد در نمونه‌های استحصالی از استان‌های چهارمحال و بختیاری، خراسان رضوی و اصفهان (۲۶)، ۱/۴ درصد در استان مرکزی (۲۷)، ۱۰/۵۹ درصد در تبریز (۲۸) و ۷/۷ درصد در منطقه‌ی سیستان (۲۹) به کمپیلوباکتریوز را در جنین‌های سقطی گوسفند گزارش کرده‌اند. زهرائی صالحی نیز *کمپیلوباکتر فتوس* را از تمام ۸ مورد جنین سقطی یک گله‌ی میش در تهران جدا کرد (۳۰). البته مطالعات معدودی نیز نتوانسته‌اند آلودگی به *کمپیلوباکتر* را در جنین‌های سقط شده شناسایی کنند (۱۴).

در مجموع این مطالعات نشان می‌دهند که باکتری‌های جنس *کمپیلوباکتر* به عنوان عامل سقط جنین گوسفند در کشور ما اهمیت دارند اگر چه شاید در مقایسه با باکتری‌های جنس بروسلا و کلامیدوفیلا سهم کمتری در موارد سقط داشته باشند.

سالمونلا: چندین سروتیپ از باکتری‌های جنس *سالمونلا* عامل سقط جنین در گوسفند و بز هستند که شامل *س. آبورتوس اُویس*، *س. تیفی‌موریوم*، *س. دابلین* و *س. مونتی ویدئو* هستند (۶). از آنجایی که این سروتیپ‌ها همه‌جایی هستند می‌توانند در همه‌ی مناطق به میزان متغیری عامل سقط جنین گوسفند و بز باشند. دو مطالعه که نقش این ارگانیسم را در ایجاد سقط جنین گوسفندی در استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی مولکولی قرار داده‌اند آلودگی به *س. آبورتوس اویس* را در جنین‌های سقطی ۴۴/۴ درصد (۳۱) و ۲۳/۶۸ درصد (۳۲) گزارش کرده‌اند. مطالعات مشابهی در مناطق اطراف شیراز، استان لرستان و منطقه سیستان به ترتیب میزان آلودگی ۱۹/۶ درصد (۱۱)، ۸ درصد (۱۴) و ۱/۳ درصد (۱۲) را داشته‌اند. در استان زنجان دو بررسی مولکولی مجزا روی سوآپ مهبلی میش‌هایی که سقط جنین را پشت سر گذاشته بودند عامل سالمونلایی پیدا نکردند (۴، ۲۴).

لیستریا: دو گونه‌ی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *لیستریا ایوانووی* عامل سقط جنین گوسفند و بز هستند. لیستریا توزیع جهانی دارد و عامل حدود ۲ درصد از سقط‌های گوسفندی در بریتانیا است (۶). همان‌طور که از اطلاعات جدول ۱ مشخص است، در ایران بررسی چندانی در تعیین سهم لیستریا در

موارد سقط جنین گوسفندی صورت نگرفته است. تنها در مطالعه‌ی صادقی و همکاران در استان مرکزی از ۲/۸ درصد جنین‌های سقطی گوسفند و بز لیستریا جدا شده است (۲۷). در بعضی از معدود مطالعات انجام شده اثری از این باکتری در جنین‌های سقط شده یافت نشده است بنابراین به نظر می‌رسد این ارگانیسم سهم چندانی در ایجاد سقط در ایران نداشته باشد. البته لازم است مطالعاتی به طور ویژه این باکتری را در جنین‌های سقطی مناطق مختلف کشور مورد بررسی قرار دهند.

لپتوسپیرا: سروارهای متعددی از باکتری جنس *لپتوسپیرا* می‌توانند منجر به سقط جنین گوسفند و بز شوند (۶). در ایران از بین مطالعات معدودی که حضور *لپتوسپیرا* را در جنین‌های سقطی ردیابی کرده‌اند، بیشتر آن‌ها موفق به پیدا کردن این ارگانیسم نشده‌اند (۱۴، ۲۴، ۲۶). در مطالعه فروتنی و همکاران در تبریز تیتر بالای پادگن *لپتوسپیرا* در ۱۰ درصد میش‌های سقط کرده گزارش گردید در حالی‌که DNA *لپتوسپیرا* در ۸/۵۷ درصد جنین‌های سقط شده یافته شد (۳۳). بررسی موارد سقط جنین در یکی از گاوداری‌های تبریز نیز میزان آلودگی ۷/۸ درصد به *لپتوسپیرا* را نشان داد (۳۴). هر چند گزارش‌های مثبت از حضور *لپتوسپیرا* در جنین‌های سقطی در ایران به ندرت است ولی با توجه به میزان شیوع سرمی بالایی که در استان‌های مختلف و در جمعیت گوسفند، بز و گاو گزارش شده است (۳۹-۳۵)، جا دارد مطالعات دقیق‌تری نقش این ارگانیسم را در ایجاد سقط جنین تعیین کند.

کوکسیلا: *کوکسیلا بورنتی* یکی از عوامل نادر سقط در اروپا است. بررسی‌هایی که صورت گرفته نشان از شیوع این عامل در جمعیت گوسفند و بز کشور ایران دارد ولی مطالعات معدودی در ایران نقش این باکتری را در موارد سقط جنین بررسی کرده است. در بعضی از این مطالعات عامل *کوکسیلا* پیدا نشده است (۲۴، ۴۰) و یک مورد نیز آن را در جنین‌های سقطی (۱/۳ درصد) شناسایی کرده است (۱۲). مطالعاتی که شیوع *کوکسیلا بورنتی* را در جمعیت گوسفند و بز و گاو و شیر آن‌ها بررسی کرده‌اند حاکی از شیوع قابل توجه آن در گله‌های استان‌های مختلف ایران می‌باشد (۴۳-۴۱). به نظر می‌رسد بایستی مطالعات ویژه‌ای برای تعیین میزان دخالت *کوکسیلا* در سقط جنین گوسفند و بز در کشور انجام شود.

عوامل باکتریایی غیر اصلی

بسیاری از باکتری‌های دیگر در گوسفند و بزهای سقط کرده یا جنین‌های سقطی شناسایی شده‌اند. این باکتری‌ها سقط‌های تکی و انفرادی ایجاد می‌کنند و در سطح گله مشکلی دیده نمی‌شود. بیشتر این عفونت‌ها با سپتی سمی اولیه مادر شروع شده، با موضعی شدن باکتری در کارانکل رحمی و کوتیلودون‌های جفت ادامه می‌یابد (۷). از این دسته عوامل، *اشریشیا کلای*(۱۱، ۱۳، ۲۷)، *باسیلوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس*، *اولیگلا*، *انتروکوکوس*، *آئروموناس* (۲۷) در موارد سقط جنین گوسفند در ایران شناسایی شده است. البته باید توجه داشت که این باکتری‌ها ممکن است به صورت آلودگی‌های جانبی و در حین نمونه‌گیری آلودگی ایجاد کرده باشند و نسبت دادن آن‌ها به عنوان عامل سقط باید با تأمل صورت گیرد (۷).

عوامل تک یاخته‌ای

توکسوپلاسما: *توکسوپلاسما گوندی* یکی از رایج‌ترین عوامل سقط جنین میش و بز در بسیاری از کشورهای دنیا است. این تک یاخته توزیع جهانی دارد (۵). این تک یاخته در بعضی کشورها از جمله انگلیس و نیوزلند پس از کلامیدوفیلا دومین عامل متداول سقط گوسفندی به شمار می‌رود (۶). در

ایران مطالعات متعددی به جستجوی *توکسوپلاسما* در موارد سقط گوسفندی پرداخته‌اند. حمیدی‌نژاد و همکاران میش‌های با سابقه سقط اخیر و میش‌های بدون سابقه سقط را در منطقه اهواز از نظر آلودگی به *توکسوپلاسما* مورد مقایسه سرولوژیک قرار دادند و میش‌های سقط کرده به طور قابل ملاحظه ای نسبت به میش‌های بدون سابقه سقط آلوده‌تر بودند (۴۴). مطالعه‌ی مشابه دیگری نیز همبستگی شدید بین سابقه سقط در میش‌های استان همدان و عفونت *توکسوپلاسمایی* آن‌ها را تأیید کرد (۴۵). مطالعاتی که با روش PCR به جستجوی *توکسوپلاسما* در مغز جنین سقط شده پرداخته‌اند میزان آلودگی ۷ درصد در لرستان (۴۶)، ۶۶ درصد در قزوین (۴۷)، ۱۶/۰۷ درصد در خراسان رضوی (۴۸) و در سیستان ۱۶ درصد (۴۹) را گزارش کرده‌اند. در یک بررسی مولکولی روی ۷۵ جنین سقطی در منطقه اردبیل آلودگی به *توکسوپلاسما* یافت نشد (۵۰). بررسی سرم‌شناسی مایعات جنین‌های سقطی آلودگی ۵/۲ درصد را در مشهد نشان داد (۵۱). مطالعات دیگری نیز نقش *توکسوپلاسما* را در ایجاد سقط جنین در گله‌های گوسفند و گاو ایران نشان داده‌اند (۵۲، ۵۳). نقش عفونت *توکسوپلاسمایی* در موارد سقط جنین انسانی کشور در مطالعات کم رنگ نشان داده شده است (۵۴-۵۶). مطالعات متعددی میزان شیوع بالای *توکسوپلاسموزیس* را در جمعیت گوسفند، بز، گاو استان‌های مختلف کشور تأیید کرده‌اند (۵۷-۶۰).

نئوسپورا: عفونت *نئوسپورایی* اگر چه در مورد گاو شایع است و در ایران نیز به عنوان عامل سقط جنین در مزارع پرورش گاو مطرح شده اما در گوسفند و بز نادر است. با این حال گزارش‌هایی مبنی بر نقش این تک یاخته در ایجاد سقط جنین گوسفندان قزل و ماکویی شمال غرب ایران (۶۱) و میش‌های استان همدان (۵۳) وجود دارد. البته مطالعه‌ی دیگری در غرب کشور تفاوت قابل ملاحظه‌ای در شیوع سرولوژیک *نئوسپورا* بین میش‌های سقط کرده و میش‌های بدون سابقه سقط نیافته است و به این ترتیب نقش *نئوسپورا* را در سقط جنین میش‌های منطقه رد کرده است (۶۲). قطعاً با توجه به شیوع این تک یاخته در گله‌های گوسفند و بز ایران (۶۳، ۶۴) انجام مطالعات بیشتر برای ردیابی *نئوسپورا* در سقط جنین گوسفند و بز در کشور لازم است.

عوامل ویروسی

ویروس بلوتانگ(Bluetongue virus)، ویروس بیماری بوردر(Border disease virus)، هرپس ویروس بز(Caprine herpesvirus)، ویروس کاشه والی(Cache valley virus) و ویروس آکابان(Akabane virus) از جمله ویروس‌هایی هستند که به عنوان عامل سقط جنین در گوسفند و بز در دنیا مطرح هستند. همان طور که از اطلاعات جدول ۱ مشخص است، در ایران نقش ویروس‌ها در سقط جنین گوسفند و بز مورد جستجو قرار نگرفته است اگر چه که نقش بعضی ویروس‌ها در سقط جنین گاوی بررسی شده است (۶۵). شیوع بعضی از این عوامل ویروسی مثل ویروس بلوتانگ(۶۸-۶۶) و ویروس بیماری بوردر (۱۱) جمعیت گوسفند و بز کشور تأیید شده است و جای مطالعه ویژه بر نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد سقط جنین وجود دارد.

References

1. Ensminger ME, Parker R. Sheep & goat science. 5th, editor. Danville: The Interstate Printers & Publishers, Inc.; 1986.

2. Saadat-Noori M, Siah-Mansoor S. Sheep Husbandary and Management. Tehran: Ashrafi Publication. 1992.[In Persion]

3. Mahzounieh MR, Golbooy Daghdari S, Pour Ahmad R. Detection of Chlamydophila abortus in sheep abortions in Chaharmahal va Bakhtiari Province using Nested PCR. IVJ. 2014; 10(2): 74-80. [In Persion]

4. Saleh M, Harkinezhad M, Salmani V. Detection of some bacterial causes of abortion in Afshari sheep using Real Time PCR detection and sensitivity assessment of Campylobacter primers. JO AGRIBIOTECH. 2014; 6(3): 107-20. [In Persion]

5. Youngquist RS, Threlfall WR. Current Therapy in Large Animal Theriogenology-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2006.

6. Noakes DE. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics E-Book: Elsevier Health Sciences; 2009.

7. Njaa BL. Kirkbride's diagnosis of abortion and neonatal loss in animals: John Wiley & Sons; 2012.

8. Esmaeili H. Brucellosis in Islamic republic of Iran. JMB. 2015; 3(3-4): 47-57.

9. Esmaeili H, Ekhtiyar Zadeh H, Ebrahimzadeh H, Partovi R, Marhamati Khameneh B, Hamedi M, et al. Evaluation of the national sheep and goat brucellosis control program in Iran. AMUJ. 2012; 14(6): 9-20.

10. Saberi Hasan Abadi M. Evaluation of the frequency of Brucella Abortion in sheep farms around Tabriz by PCR and ELIZA Methods: Veterinary Faculty, Tabriz Univesity; 2012. [In Persion]

11. Firouzi R. Bacteriological study of abortion in ewes of Shiraz area. Iran J Vet Res. 2006; 61(1): 15-7. [In Persion]

12. Mahdavi Roshan H, Saadati D, Najimi M. Molecular detection of Brucella melitensis, Coxiella burnetii and Salmonella abortusovis in aborted fetuses of Baluchi sheep in Sistan region, south-eastern Iran. IJVR. 2018; 19(2): 128.

13. Gharekhani J, Karimi Makhsus A, Sadeghi B, Rasuli MR. Investigation of bacterial agents of abortion of sheep in Hamadan province, The 2nd National Congress Of Veterinary Laboratory Sciences; 12-13 December 2012; Semnan University-Iran: p: 105. [In Persion]

14. Malakshahe K. Investigating of bacterial agents in abortion of sheep in Lorestan province by PCR method: Veterinary Faculty, Shahrekord University; 2017. [In Persion]

15. Sharifzadeh A, Doosti A, Gaafarian M. The comparison between molecular and bacteriological detection for identification of abortion agents caused by Brucella and Salmonella in sheep in Shahrekord town. J Microbiol word. 2009; 2(2): 101-4. [In Persion]

16. Alem M, Asadpour R, Jafari Joozani R, Nofouzi K. Molecular Detection of Chlamydophila Abortus In Aborted Fetal Tissues by Using Polymerase Chain Reaction (PCR) In Tabriz, Northwest of Iran. JCMR. 2017; 9(1): 35-8.

17. Barati S, Moori-Bakhtiari N, Najafabadi MG, Momtaz H, Shokuhizadeh L. The role of zoonotic chlamydial agents in ruminants abortion. IJM. 2017; 9(5): 288.

18. Safarpour A. Molecular detection of Chlamydophila abortus, from aborted lambs using Real-time PCR assay.: Veterinary Faculty, Shahrekord University; 2016. [In Persion]

19. Doosti A, Arshi A. Molecular Study for Detection of Chlamydia psittaci caused Abortion in Iranian Cattle. JPAM. 2012; 6(3): 1133-8.

20. Ghorbanpoor M, Goraninejad S, Heydari R. Serological study on enzootic abortion of ewes in Ahvaz, Iran. Anim Vet Adv. 2007; 6(10): 1194-6.

21. Esmaeili H, Bolourchi M, Mokhber-Dezfouli MR. Seroprevalence of Chlamydia abortus infection in sheep and goats in Iran. Int J Vet Res. 2015; 9(2): 73-7.

22. Gokce H, Kacar C, Genc O, Sozmen M. Seroprevalence of Chlamydophila abortus in aborting ewes and dairy cattle. Bull Vet Inst Pulawy. 2007; 51(10): 9-13.

23. Kalender H, Kiliç A, Eröksüz H, Muz A, Kilinç Ü, Taşdemir B. Identification of Chlamydophila abortus infection in aborting ewes and goats in Eastern Turkey. Rev Med Vet. 2013; 164(6): 295-301.

24. Saleh M, Harkinezhad MT, Marefat A, Salmani V. An outbreak of abortion in Afshari sheep with probable involvement of Campylobacter fetus. Int J Vet Res. 2013; 7(1): 51-6.

25. Tadjbakhsh H, Ahmadi M, Fakhrzadegan F, Nadalian M. A survey on Campylobacter fetus subsp fetus infections in sheep around Tehran and Esfahan. Iran J Vet Med. 2000; 55(3): 69-71. [In Persion]

26. Kabiri F, Mahzounieh M, Ebrahimi KA, Mokhtari A. Genomic identification of campylobacter fetus and leptospira introgans in aborted sheep fetuses in the selected provinces of Iran by PCR. J C P. 2016; 10(2): 1917-26. [In Persion]

27. Sadeghi MR, Ghaem Maghami SS, Bakhshesh M, Moradi S, Ganji A, Ahmadi M. Evaluation of the Outbreak of bacterial abortions of sheep and goats in Markazi province. VMJ. 2009; 2(4): 6. [In Persion]

28. Fallah S, Hamali H, Jafari Joozani R, Zare P, Norsaadat G. A molecular (PCR) survey on

abortions caused by Campylobacter spp. in sheep flocks located on the suburb of Tabriz. IJVST. 2014; 6(1): 23-9.

29. Hosein Abadi E, Saadati D, Najimi M, Hasanpour M. Molecular epidemiology of Campylobacter Fetus in aborted fetuses of Baluchi sheep in Sistan region. IJVST. 2018; 10(1): 47-52.

30. Zahraei Salehi T. Outbreak of abortion associated with *campylobacter fetus* subsp. fetus. Iran J Vet Res. 1999; 54(2): 11-4.

31. Sharifzadeh A, Doosti A, Khaksar K. A multiplex PCR for the detection of Brucella spp. And Salmonellaabortusovis from aborted ovine fetus. IJVS. 2008; 3(1): 109-11. [In Persion]

32. Hashemi S, Mahzounieh MR, Yek Taneh F, Sheykhi N. Evaluation of the Prevalence of salmonella abortion in sheep of Chaharmahal and Bakhtiari province. The 2nd National Congress Of Veterinary Laboratory Sciences; 12-13 December 2012; Semnan University-Iran: p: 231.[In Persion]

33. Froutani P, Hamali H, Jozani RJ, Abdollahpour G, Katayon N, Norsaadat G. A survey on abortions caused by Leptospira spp. in sheep flocks located on the suburb of Tabriz-Iran. Wulfenia. 21(1): 134-44.

34. Hamali H, Jafari Joozani R, Nofouzi K, Ashrafi Halan J, Jabbari Noghabi H. Prevalence of leptospirosis, Campylobacteria and Brucella abortion in dairy cattle around Tabriz by molecular method. IVJ. 2013; 9(2): 50-9. [In Persion]

35. Haji Hajikolaei M, Ghorbanpour M, Gharibi D, Abdollapour G. Serologic study on leptospiral infection in sheep in Ahvaz, southwestern Iran. IJVR. 2007; 8(4): 333-6.

36. Haji Hajikolaei M, Rezaei S, Ghadrdan Mashhadi A, Ghorbanpour M, Abdollahpour G. Comparison of Leptospira interrogans infection in the goats and sheep. Int J Vet Res. 2016; 10(2): 113-9.

37. Abdollahpour G, Shafighi ST, Sattari Tabrizi S. Serodiagnosis of leptospirosis in cattle in north of Iran, Gilan. IntJVetRes. 2009; 3(1): 7-10.

38. Ebrahimi A, Nasr Z, Kojouri GA. Seroinvestigation of bovine leptospirosis in Shahrekord district, central Iran. IJVR. 2004; 5(2): 110-3.

39. Firouzi R, Vandyousefi J. A serological survey on bovine leptospirosis in Shiraz, Iran. Iran J Vet Res. 2000; 1(2): 118-23.

40. Khalili M, Nourollahifard SR, Abiri Z, Edalati Shokat S. Detection of Coxiella burnetii as one of the causes of infectious abortions in small ruminants by PCR in the Hamedan province. Vet Microbiol. 2016; 11(2): 129-34. [In Persion]

41. Asadi J, Khalili M, Kafi M, Ansari-Lari M, Hosseini SM. Risk factors of Q fever in sheep and goat flocks with history of abortion. Comp Clin Path. 2014; 23(3): 625-30.

42. Ezatkhah M, Alimolaei M, Khalili M, Sharifi H. Seroepidemiological study of Q fever in small ruminants from Southeast Iran. J Infect Public Health. 2015; 8(2): 170-6.

43. Khalili M, Diali HG, Mirza HN, Mosavi SM. Detection of Coxiella burnetii by PCR in bulk tank milk samples from dairy caprine herds in southeast of Iran. Asian Pac J Trop Dis. 2015; 5(2): 119-22.

44. Hamidinejat H, Goraninejad S, Ghorbanpoor M, Nabavi L, Akbarnejad F. Role of Toxoplasma gondii in abortion of ewes in Ahvaz (South-West Iran). Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52(10): 369-71.

45. Heidari H, Gharekhani J, Tavoosidana G. Role of toxoplasmosis in abortion of ewes in western Iran: a serological study. Sci Parasitol. 2013; 14(2): 99-103.

46. Nourmohammadi M, Hamidinejat H, Tabandeh M, Goraninejad S, Bahrami S. Genotyping of zoonotic toxoplasm gondii isolated from aborted fetuses of ewes of Lorestan province based on SAG2, SAG3 and GRA6 molecular markers. JAUMS. 2017; 17(3): 343-52. [In Persion]

47. Habibi G, Imani A, Gholami M, Hablolvarid M, Behroozikhah A, Lotfi M, et al. Detection and identification of Toxoplasma gondii type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin Province of Iran. Iran J Parasitol. 2012; 7(3): 64.

48. Danehchin L, Razmi G, Naghibi A. Molecular detection of Toxoplasma gondii infection in aborted fetuses in sheep in Khorasan Razavi province, Iran. Int J Vet Res. 2017; 11(2): 147-54.

49. sanjarani g. A study on the prevalence of *toxoplasma gondi* infection in aborted Baluchi sheep fetuses in Sistan district using PCR method: Veterinary Faculty, University of Zabol; 2017. [In Persion]

50. Shahbazi G, Hoghughi Rad N, Madani R, Shjaie S. Evaluation of gene GRA6 IN subtraction of *Toxoplasma gondii* genotypes using PCR-RFLP method in aborted fetuses of Ardabil region. J C P. 2013; 10(3): 1027-32. [In Persion]

51. Razmi GR, Ghezi K, Mahooti A, Naseri Z. A serological study and subsequent isolation of *Toxoplasma gondii* from aborted ovine fetuses in Mashhad area, Iran. J Parasitol. 2010; 96(4): 812-4.

52. Rasuli M, Movasseghi AR, Sami M. Confirmation of the prevalence of Toxoplasmic abortion in a sheep herd with different laboratory methods, The 2nd National Congress Of Veterinary Laboratory Sciences; 12-13 December 2012; Semnan University-Iran: p: 122. [In Persion]

53. Gharekhani J. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in aborted cattle in Hamedan, Iran. JAVAR. 2014; 1(2): 32-5.

54. Saki J, Mohammadpour N, Moramezi F, Khademvatan S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women who have aborted in comparison with the women with normal delivery in Ahvaz, southwest of Iran. ScientificWorldJournal. 2015;

2015(10): 1-4.

55. Matin S, Shahbazi G. Study on abortion associated with *Toxoplasma gondii* in women based on PCR detection of aborted placenta and maternal serology in Ardabil, International Conference on Medical and Clinical Microbiology; 3-4 July 2017; Bangkok, Thailand: P: 2.

56. Ghasemi FS, Rasti S, Piroozmand A, Bandehpour M, Kazemi B, Mousavi SGA, et al. Toxoplasmosis-associated abortion and stillbirth in Tehran, Iran. J Matern-Fetal Neonatal Med. 2016; 29(2): 248-51.

57. Movassaghi AR, Rassouli M, Fazaeli A, Salimi-Bejestani MR. Outbreak of ovine congenital toxoplasmosis in Iran, confirmed by different diagnostic methods. J Parasit Dis. 2016; 40(1): 152-6.

58. Hashemi-Fesharki R. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goats in Iran. Vet Parasitol. 1996; 61(1-2): 1-3.

59. Hashemzadeh Farhang H, Nowzari N, Moazzeni F. Evaluation of seroprevalence of Toxoplasmosis in sheep and goats in Tabriz by ELISA method. Vet Clin Pathol(Veterinary Journal Tabriz). 4(1): 753-7. [In Persion]

60. Sharif M, Sarvi S, Shokri A, Teshnizi SH, Rahimi M, Mizani A, et al. *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in Iran: a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res. 2015; 114(1): 1-16.

61. Asadpour R, Jafari-Joozani R, Salehi N. Detection of *Neospora caninum* in ovine abortion in Iran. J Parasit Dis. 2013; 37(1): 105-9.

62. Ezatpour B, Alirezaei M, Hassanvand A, Zibaei M, Azadpour M, Ebrahimzadeh F. The first report of *Neospora caninum* prevalence in aborted and healthy sheep from west of Iran. Comp Clin Path. 2015; 24(1): 19-22.

63. Gharekhani J, Esmaeilnejad B, Rezaei H, Yakhchali M, Heidari H, Azhari M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Iranian goats. Ann Parasitol. 2016; 62(2): 111-4.

64. Vajdi Hokm Abad R, Khan Mohammadi M, Moniri Sarabi MR. Evaluation of the Prevalence of *Neospora Caninum* in sheep in Mianeh by competitive ELIZA and indirect immunofluorescence. VMJ. 2014; 7(1): 59-66. [In Persion]

65. Sasani F, Vazirian A, Javanbakht J, Aghamohammd Hassan M. Detection of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion by PCR and histopathology assays. AJCEM. 2013; 1(2): 35-9.

66. Mozaffari AA, Khalili M, Sabahi S. High seroprevalence of Bluetongue virus antibodies in goats in southeast Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2014; 4: S275-S8.

67. Najarnezhad V, Rajae M. Seroepidemiology of Bluetongue disease in small ruminants of north-east of Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(6): 492-5.

68. Imandar M, Hasanpour A, Hasanzadeh M, Mousakhani F, Pourbakhsh SA. Evaluation of Bluetongue Virus Infection in Sheep in Khoy city using the competitive ELIZA method. J C P. 2014; 11(1): 1135-42.

A Review on Infectious Agents of Sheep and Goats Abortion in Iran

Mohammad javad behzadi shahrbabak*

Assistant Professor, Depertment of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, Zabol university, Zabol,Iran.

Receive: February 10, 2019; Revise: March 3, 2019; Accept: March 4, 2019

Summary

Abortion is one of the problems of sheep and goats breeders in Iran and imposes significant economic losses on farmers. Infectious agents are the most common reason for abortion in sheep and goats. Some of these agents, such as Brucella and Toxoplasma, result in zoonotic diseases. Regarding the important role of sheep and goat breeding in livelihood of the people, it is very important in terms of economics and public health to accurately know the abortive infectious agents in sheep and goat flocks. The purpose of this study was to investigate all the literature which attempts to diagnose bacterial, viral and protozoan agents of sheep and goat abortion in Iran. Therefore, all articles related to abortion of sheep and goats, individual infectious agents and their prevalence in the geographical area of Iran or neighboring countries in databases including Science Direct, Pub Med, Scopus, Google scholar, Magiran and Iran doc were searched. Of the English and Persian studies found, 36 studies were conducted on abortion of sheep and goats that their results were inserted in a table for better evaluation. Based on studies that examined the causes of abortion of sheep and goats in different provinces of Iran; Brucella, Toxoplasma, Chlamydophila, Campylobacter and Salmonella are the most common causes of abortion in the country. No study has tracked the viral agents in abortion of sheep and goats in Iran.

Key words: *Iran, Abortion, Infectious agents, Sheep and goat*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 1, No. 2, Autumn & Winter 2019

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