نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ۲، شماره ۱

ناشر: دانشگاه زابل

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

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

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

هیات دبیران:

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

محمد بکائیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

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

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

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

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

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

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

تقی زهرانی 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

بررسی و شناسایی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک در منطقه سیستان

وحیده کدایی[۱]، زهرا راشکی قلعه‌نو[۲*]

۱- دانش آموخته ژنتیک، گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استادیار میکروب شناسی و ژنتیک مولکولی، گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

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

چکیده

برخی از سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی خارج روده‌ای می‌توانند باعث عفونت مجاری ادراری در جوامع انسانی شود. امروزه مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باعث بروز مقاومت در بین جمعیت‌های باکتریایی شده است. این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌های مقاومت بها تتراسایکلین و بررسی میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی مولد عفونت ادراری انجام گرفت. در این تحقیق توصیفی- مقطعی، ۳۵۰ نمونه ادراری طی ۶ ماه از افراد مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی زابل جمع آوری و اشریشیاکلی با استفاده از روش‌های مرسوم باکتری شناسی تعیین هویت شد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس توصیه‌های موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) با استفاده از روش انتشار دیسک انجام و سپس برای شناسایی ژن‌های *tetA*, *tetB* و *tetC* از روش PCR استفاده گردید. از مجموع ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جمع آوری شده، بیشترین میزان مقاومت مربوط به تتراسایکلین (۵۷ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به سفتازیدیم (۳۴ درصد) بود. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، آزترونام و سفوتاکسیم به ترتیب ۴۴، ۴۴ و ۴۰ درصد بود. در میان ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین، ۳۲ ایزوله (۵۶/۱۴ درصد) دارای ژن *tetA*، ۲۸ ایزوله (۴۹/۱۲ درصد) دارای ژن *tetB* و ۶ ایزوله (۱۰/۵۲ درصد) دارای ژن *tetC* بودند. ۱۶ ایزوله (۲۸/۰۷ درصد) همزمان دو ژن (۱۵ ایزوله دو ژن *tetA* و *tetB* و یک ایزوله دو ژن *tetA* و *tetC*) و ۳ ایزوله (۵/۲۶ درصد) نیز هر سه ژن را داشتند. ۱۴ ایزوله (۲۴/۵۶ درصد) فاقد ژن‌های مورد مطالعه بودند. مقاومت به تتراسایکلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و حضور ژن‌های *tetA* و *tetB* در سویه مولد عفونت ادراری نشانه‌های هشدار دهنده در منطقه سیستان است. مطالعه حاضر به شدت محدود کردن مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها شامل تتراسایکلین را توصیه می‌کند. انجام مطالعات بیشتری در سایر مناطق کشور ضروری به نظر می‌رسد تا اقدامات مناسب‌تری نسبت به روش‌های درمانی رایج صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک، ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین، مقاومت به تتراسایکلین*

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

مقدمه

اشریشیاکلی از ساکنین طبیعی روده‌ی انسان و حیوان به شمار می‌رود و مقاومت دارویی این باکتری اهمیت زیادی به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان‌ها دارد. این باکتری از مهم‌ترین علل میکروبی شایع در عفونت‌های ادراری است که به علت کسب پلاسمیدهای کدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و پمپ‌های انتشار به خارج تتراسایکلین، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و تتراسایکلین مقاوم شده‌اند و می‌توانند در بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل سپسیس، عفونت‌های زخم،گاستروانتریت و مننژیت نوزادی زندگی بیمار را تحدید کند (۱، ۲). به همین دلیل، درمان بیماری‌های ناشی از آن با مشکل مواجه شده است. مقاومت تتراسایکلینی یک مدل جالب برای مطالعات اکولوژی مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. تتراسایکلین عملکرد ضد باکتریایی خود را به وسیله اتصال به جزء 30s ریبوزوم باکتریایی و مهار سنتز پروتئین نشان می‌دهد. یکی از سریع‌ترین ضد باکتری‌های وسیع‌الطیف است که از دهه ۱۹۴۰ توسعه یافته و در مقیاس وسیعی تولید می‌شود. بجز استفاده آن در طب انسانی و دامپزشکی، در تحریک رشد محصولات کشاورزی و باغبانی نیز کاربرد دارد (۳، ۴). تتراسایکلین در درمان عفونت‌های اشریشیاکلی در انسان به‌کار برده نمی‌شود، ولی مقاومت به تتراسایکلین در عفونت‌های ناشی از اشریشیاکلی رایج می‌باشد. مقاومت باکتریایی به تتراسایکلین بیشتر به روش انتشار به خارج و به صورت انرژی‌خواه می‌باشد، که تتراسایکلین را به بیرون از سلول باکتریایی منتقل می‌کند. ژن‌های *tet(A), (B), (C), (D), (E), (Y), (I)* در باکتری‌های گرم منفی نیز سیستم‌های انتشار به خارج را کد می‌کنند (۶-۴). پمپ‌های تتراسایکلین بر اساس توالی اسید آمینه‌ای به ۶ گروه تقسیم بندی می‌شوند، که Tet(A), Tet(B), T(C), Tet(D) و Tet(E) به علت تشابهات آمینواسیدی که با هم دارند در گروه ۱ قرار می‌گیرند. اکثر پمپ‌های انتشار به خارج تتراسایکلین به صورت اختصاصی تنها در ایجاد مقاومت به تتراسایکلین شرکت دارند (۷). شش ژن به عنوان ژن‌های مقاومت تتراسایکلین مورد هدف قرار گرفته‌اند، که از بین آنها تنها ژن‌های *tetA, tetB, tetC* شناسایی شده‌اند (۸). ژن *tetB* در ۸۰ درصد از ایزوله‌های جدا شده مقاوم به تتراسایکلین وجود دارد. در ۲۵ درصد ایزوله‌های جدا شده مقاوم به تتراسایکلین، هیبرید دو ژن *tetA* و *tetC* در تمام دوره‌های مطالعه وجود دارد. این درصدها، در مراحل اولیه کمتر شایع هستند (۹، ۱۰).

در ایران مطالعات فراوانی بر روی سویه‌های اشریشیاکلی بیمارستانی انجام شده و کمتر به بررسی ژن‌های عامل مقاومت به تتراسایکلین و میزان شیوع آن در مناطق مختلف ایران پرداخته شده است. از این رو شناسایی سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین و تعیین نوع ژن‌های دخیل جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیکی، کنترل و درمان مناسب عفونت ادراری حائز اهمیت می‌باشد، لذا شناسایی الگوی مقاومتی این باکتری در هر منطقه جغرافیایی می‌تواند به‌عنوان راهنمایی برای درمان تجربی چنین عفونت‌هایی ارزشمند باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری: این مطالعه توصیفی- مقطعی در یک بازه زمانی شش ماهه از ابتدای فروردین لغایت پایان شهریور ماه سال ۱۳۹۱ انجام گردید. در مجموع تعداد ۳۵۰ نمونه طبق شرایط استریل از ادرار میانی بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی شهرستان زابل

جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. در آزمایشگاه کلیه ایزوله‌ها با انجام تست‌های افتراقی شامل کشت در محیط TSI، تولید اندول، بررسی از نظر داشتن حرکت در محیط SIM، واکنش در محیط VP,MR و سیمون سیترات بررسی شد و ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جدا گردید.

بررسی مقاومت ضد میکروبی ایزوله‌ها:

واکنش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش کربی بائر و بر اساس دستورالعمل مؤسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) انجام گردید (۱۱). محیط کشت مولر هینتون آگار با ضخامت ۵ میلی‌متر به طور یکنواخت در تمامی پلیت‌ها در شرایط استریل تهیه شد. سپس با سواپ استریل از کشت میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند (CFU/ml ۱۰۸ ×۱/۵) درسطح پلیت تلقیح گردید. بعد از آن، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (30µg)، سفوتاکسیم (30µg)، سفتازیدیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg) و آزترونام (30µg) خریداری شده از شرکت پادتن طب بر روی سطح پلیت قرار داده و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از گرماگذاری، به وسیله خط‌کش، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و ثبت شدند. با توجه به جدول همراه دیسک‌ها، گزارش تست آنتی‌بیوگرام برای هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت حساس (Sensitive)، مقاوم (Resistant) یا نیمه‌حساس (Intermediate) گزارش شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: بعد از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژی، استخراج DNA باکتری مقاوم به تتراسیکلین با استفاده از روش جوشاندن انجام شد (۱۲). به منظور شناسایی ژن‌های *tetA*, *tetB* و *tetC* از آغازگرهای موجود در جدول ۱ استفاده گردید. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. در این واکنش ۲ میکرولیتر از DNA الگو ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix RED 2X (شرکت پیشگام) و ۱ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (۲۰ پیکومول در میکرولیتر) را با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی (denaturation) اولیه در۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل تکثیر شامل واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال پرایمرها (annealing) به DNA الگو در ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو (extension) در۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (final extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگارز ۲ درصد به مدت۴۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر Ladder 100 bp ارزیابی گردید (شکل ۱).

نتایج

در این مطالعه از ۳۵۰ نمونه ادرار تعداد ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جدا گردید که ۶۷ ایزوله (۱۹/۱۴ درصد) از نمونه ادراری افراد مؤنث و ۳۳ ایزوله (۹/۴۲ درصد) متعلق به نمونه ادراری جنس مذکر بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع اشریشیاکلی در بین بیماران مورد بررسی ۲۹ درصد بود. نتایج آزمون کربی بائر نشان داد که ۵۷ ایزوله مقاوم به تتراسایکلین (۵۷ درصد)، ۴۴ ایزوله به سفتریاکسون و آزترونام (۴۴ درصد)، ۴۰ ایزوله به سفوتاکسیم (۴۰درصد) و ۳۴ ایزوله به سفتازیدیم

(۳۴ درصد) مقاوم بودند و ایزوله‌های غیر مقاوم به هر آنتی‌بیوتیک نیز به صورت حساس و نیمه‌حساس گزارش شد که در جدول ۱ نشان داده شده است. بر طبق این بررسی بیشترین میزان مقاومت، مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۵۷ درصد) بود (جدول ۲).

پس از بررسی ۵۷ ایزوله مقاوم به تتراسایکلین، ۳۲ ایزوله از ۵۷ ایزوله مقاوم (۵۶/۱۴ درصد) دارای ژن *tetA*، ۲۸ ایزوله (۴۹/۱۲ درصد) دارای ژن *tetB* و ۶ ایزوله (۱۰/۵۲ درصد) دارای ژن *tetC* بودند، علاوه بر آن ۱۵ ایزوله دارای *tetA* و *tetB* ، ۱ ایزوله دارای *tetA* و *tetC* و ۳ ایزوله هر ۳ ژن مقاومت به تتراسایکلین را دارا بودند (جدول ۳). با توجه به آنچه که در این مطالعه مشخص شد، بعضی از نمونه‌ها حامل دو یا سه ژن مقاومت به تتراسایکلین بوده و مواردی نیز فاقد ژن‌های فوق بودند، که ممکن است دارای دیگر ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین باشند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام آغازگر ها	توالی	اندازه (جفت باز)	منبع
tetA-F	GTGAAACCCAACATACCCC	۸۸۸	این مطالعه
tetA-R	GAAGGCAAGCAGGATGTAG		این مطالعه
tetB-F	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	۷۷۴	این مطالعه
tetB-R	ACTGCCGTTTTTTCGCC		این مطالعه
tetC-F	ACTTGGAGCCACTATCGAC	۸۸۱	این مطالعه
tetC-R	CTACAATCCATGCCAACCC		این مطالعه

جدول۲- درصد مقاومت و یا حساسیت ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی مولد عفونت‌های ادراری به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	مقاوم٪	نیمه حساس٪	حساس٪
آزترونام	۴۴	۲۲	۳۴
تتراسایکلین	۵۷	۵	۳۸
سفتازیدیم	۳۴	۱۶	۵۰
سفتریاکسون	۴۴	۲۶	۳۰
سفوتاکسیم	۴۰	۱۵	۴۵

بحث و نتیجه‌گیری

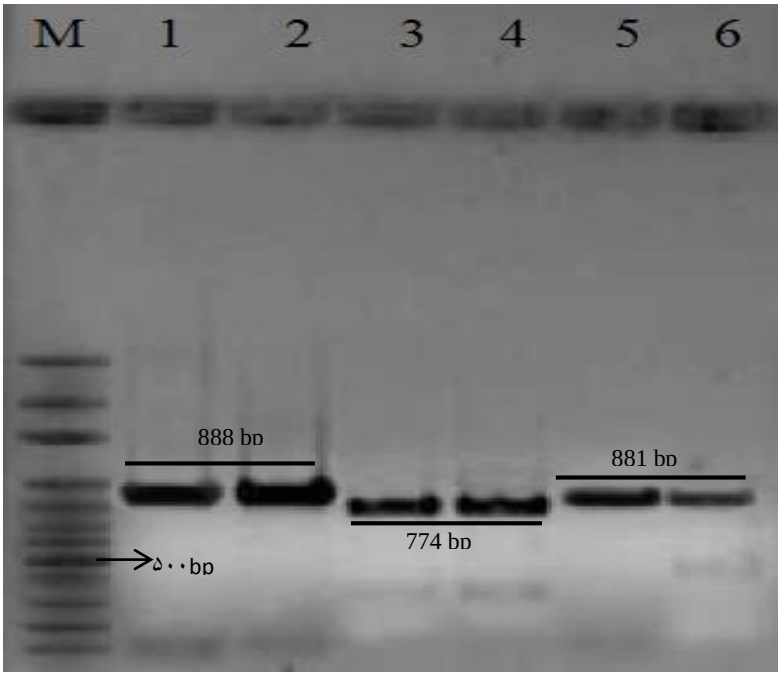
عفونت‌های مجاری ادراری در سراسر دنیا از اهمیت خاصی برخوردار بوده و در این موارد اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک به عنوان شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری به خصوص در کشورهای در حال توسعه شناخته شده است. امروزه یکی از مشکلات مهم سیستم درمانی کشور افزایش میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین جمیعت

باکتری‌های پاتوژن انسانی و حیوانی می‌باشد. مصرف بی رویه دارو، وجود مراکز غیر مجاز فروش دارو و مصرف خودسرانه دارو از عوامل اصلی افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جمعیت باکتری‌های پاتوژن است که منجر به پیدایش و شیوع باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ظهور ژن‌های مقاوم در آنها می‌شود. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در جمعیت‌های دامی کشور (به منظور درمان و یا فاکتور رشد) که نقش اساسی در تأمین فراورده‌های پروتئینی را دارند نیز باعث ایجاد سویه‌های مقاوم و انتشار آنها در جمعیت‌های انسانی شده است. در این مطالعه، از ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جداشده از بیماران، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین ۵۷ درصد، به سفتریاکسون و آزترونام ۴۴ درصد، به سفوتاکسیم ۴۰درصد و به سفتازیدیم ۳۴ درصد مشاهده شد. که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بود. همچنین در این پژوهش میزان فراوانی و شیوع ژن‌های تتراسایکلین، به ترتیب در*tetA* (۵۶/۱۴ درصد)، در *tetB* (۴۹/۱۲ درصد) و در*tetC* (۱۰/۵۲ درصد) بود. در یک بررسی Ochoa و همکاران در سال ۲۰۰۹، میزان مقاومت به تتراسایکلین را ۶۵ درصد گزارش کردند (۱۳). همچنین در مطالعه سرشار و همکاران که بر روی ۷۷ ایزوله اشریشیاکلی انجام شد میزان مقاومت به تتراسایکلین ۵۵/۸ درصد گزارش شده است. این محققین دریافتند که۳۳ ایزوله مقاوم به تتراسیکلین (۷۶/۷ درصد) ژن *tetA*، ۲۷ ایزوله (۶۲/۷ درصد) ژن *tetB* و ۶ ایزوله (۱۳/۹ درصد) ژن *tetC* را دارا بودند (۱۴) که مقایسه بین درصدهای به‌دست آمده در این مطالعه با درصدهای حاصل از مطالعه فوق اختلاف اندکی را نشان می‌دهد. درمطالعه‌ای که توسط Ruslan و همکاران بر روی الگوی مقاومت آنت بیوتیکی در ایزوله‌های شیگلا فلکسنری و شیگلاسونئی انجام شد. ۹۳ درصد ایزوله‌ها به تتراسایکلین مقاوم بودند (۱۵). درمطالعه کرمی و همکاران درسال ۱۳۹۱ در همدان میزان مقاومت ایزوله‌های اشریشیاکلی نسبت به تتراسایکلین ۵۸/۴ درصد گزارش شده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۶). نتایج حیدری و همکاران در سال ۲۰۱۴ شیوع ژن‌های *tetB* و *tetA* را به ترتیب ۸۴/۴۱ درصد و ۸۵ درصد گزارش کردند که خیلی بیشتر از نتایج مطالعه حاضر بود (۱۷). مشایخی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که میزان حضور ژن‌های القاکننده مقاومت در مقابل آنتی بیوتیک تتراسایکلین *tetA* و *tetB* ۷۱ درصد بود (۱۸). دورمنش و همکارانش در سال ۲۰۱۳ شیوع ژن‌های *tetA* و *tetB* علیه تتراسایکلین را ۸۲ درصد و ۶۵ درصد گزارش کردند که با مطالعه حاضر همخوانی ندارد (۱۹). در مطالعه Sandalli و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در تعدادی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه نشان داد که از ۵۲ ایزوله مقاوم ۱۵ درصد از آنها داری ژن *tetA* و ۱۹ درصد دارای ژن *tetB* بودند و تنها در یک مورد از آنها هر دو ژن مشاهده شد (۲۰). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که در ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین شیوع ژن‌های *tetB* و *tetA* متفاوت است که با سایر مطالعات مطابقت دارد (۲۱، ۲۲). این تفاوت در نتایج آنتی بیوگرام در مناطق مختلف جغرافیایی ناشی از تفاوت ژنتیکی سویه‌های باکتری، میزان مهاجرت و عوامل متعدد دیگری است که در انتخاب داروی مناسب در درمان در هر منطقه تأثیرگذار می‌باشد. نتایج حاصل از PCR در این مطالعه همسو با گزارش Tuckman و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خصوص ژن‌های tet نشان داد که بعضی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مقاومت داشته ولی حامل هیچ یک از ژن‌های tet

مورد بررسی نبودند (۲۳). جهش در ناحیه اتصال پرایمر و نیز وجود ژن‌های مقاومت دیگر می‌تواند از دلایل کم بودن فراوانی ژن‌های مقاوم به تتراسایکلین علی‌رغم وجود مقاومت فنوتیپی در این مطالعه باشد. همچنین در این مطالعه میزان فراوانی ژن *tetA* نسبت به ژن *tetB* در ایزوله‌های اشریشیاکلی مقاوم به تتراسایکلین بیشتر بود که با گزارش ارائه شده توسط Sianglum در سال ۲۰۰۹ تطابق دارد (۲۴). در آمریکا و بعضی از کشورها از تتراسایکلین در دوزهای کمتر از دوز درمانی به عنوان فاکتور رشد در غذای دام‌ها استفاده می‌گردد (۲۵) در حالی که از تتراسایکلین به عنوان داروی انتخابی در درمان انسان استفاده نمی‌شود که می‌تواند یکی از دلایل افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک باشد.

جدول۳- نتایج PCR ژن‌های tet در ۵۷ نمونه مقاوم به تتراسیکلین

نوع ژن	تعدادایزوله های مثبت
tetA	۱۳
tetB	۱۰
tetC	۲
tetB و *tetA*	۱۵
tetC و *tetA*	۱
tetC و *tetB*	۰
tetA, *tetB* و *tetC*	۳



شکل۱- نمونه‌ای از PCR ژن‌های tet را نشان می‌دهد. ردیف M مارکر ۱۰۰ جفت باز، ردیف‌های ۱و۲ ژن *tetA*، ردیف‌های ۳و۴ ژن *tetB* و ردیف‌های ۵ و۶ ژن *tetC*

در ایـــن مطالعـــه میـــزان بـــالای مقاومـــت بـــه تتراسـایکلین در ایزولـه‌های اشریشـیاکلی مولـد عفونـت ادراری، شـــرایط مســـاعدی بـــرای رشـــد و تکثیـــر باکتری‌هـای حامـل ژن‌هـای مقـاوم بـه تتراسـایکلین را در سـطح منطقـه فـراهم نمـوده کـه می‌توانـد بـه انتقـال ایـــن ژن‌هـــا از طریـــق پلاســـمیدها و ترانســـپوزون‌ها از سویه های حیوانی به انسانی مرتبط باشد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وســـیله از حمایـــت بخـــش میکروب‌شناســـی دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه زابـل و دوسـتانی کـه مـا را در اجـرای ایـــن تحقیـــق صـــمیمانه یـــاری داده انـــد، سپاسگزاری می شود.

References

1- Beheshti M, Talebi M, Ardebili A, Bahador A, Lari AR. Detection of AdeABC efflux pump genes in tetracycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from burn and ventilator-associated pneumonia patients. Journal of pharmacy & bioallied sciences. 2014 Oct;6(4):229-32.

2- Rezaei A, Fazeli H, Moghadampour M, Halaji M, Faghri J. Determination of antibiotic resistance pattern and prevalence of OXA-type carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from inpatients in Isfahan, central Iran. Leinfezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive. 2018;26(1):61-6.

3- Akers KS, Mende K, Yun HC, Hospenthal DR, Beckius ML, Yu X, *et al.* Tetracycline susceptibility testing and resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus* complex from a U.S. military hospital. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(6):2693-5.

4- Alexander TW, Jin X, Li Q, Cook S, McAllister TA. Characterization oftetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from feedlot cattle administered therapeutic or subtherapeutic levels of tetracycline. Canadian journal of microbiology. 2013;59(4):287-90.

5- Nawaz M, Khan AA, Khan S, Sung K, Kerdahi K, SteeleR. Molecular characterization of tetracycline-resistant genes and integrons from avirulent strains of *Escherichia coli* isolated from catfish. Foodborne pathogens and disease. 2009;6(5):553-9.

6- Seifi S, Khoshbakht R. Prevalence of tetracycline resistancedeterminants in broiler isolated *Escherichia coli* in Iran. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2016;57(6):729-33.

7- Abo-Amer AE, Shobrak MY, Altalhi AD. Isolation and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolated from farm chickens in Taif province, Saudi Arabia. Journal of global antimicrobial resistance. 2018.

8- Moawad AA, Hotzel H, Awad O, Tomaso H, Neubauer H, Hafez HM, *et al.* Occurrence of Salmonella enterica and *Escherichia coli* in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. Gut pathogens. 2017;9:57.

9- Yassin AK, Gong J, Kelly P, Lu G, Guardabassi L, Wei L, *et al.* Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. PloS one. 2017;12(9):e0185326.

10- Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, *et al.* Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(10):3214-21.

11- Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. CLSI; 2014. 2009.

12- Rashki A. Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Microbial pathogenesis. 2014;75:29-34.

13- Ochoa TJ ,Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, *et al.* High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2009;81(2):296-301.

14- Sarshar M, Toophani H, Ghorbani S. Antibiotic Resistance and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Humans Journal of colloid and interface science. 2011;17(57):433-43.

15- Ruslan SM, Amir MB, Gulnara A, K.A. G, Aybek VK, Ladaporn B, *et al.* Antimicrobial resistance patterns and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolated in Uzbekistan. Gut pathogens. 2018;2(18):1-6.

16- Karami P, Aslani MM, Najafi Mosleh M, Alikhani MY. Determine thepattern of antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains Entropathogen isolated from children with diarrhea. Korean journal for food science of animal resources. 2012;1(1):27-31.

17- Heidary M, Momtaz H, Madani M. Characterization of diarrheagenic antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. Iran Red Crescent Med J. 2014;16(4):e12329.

18- Mashayekhi F, Moghny M, Faramarzpoor M, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, Tarhriz V. Molecular characterization and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. Iran. Food and environmental virology. 2014;12(2):e16833.

19- Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi Dariyan E, Momtaz H, Yahaghi E. Characterization and study the antibiotic resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatrics with pyelonephritis and cystitis in Iran. Iran J Med Microbiol. 2013;7(2):27-39.

20- Sandalli C, Sevim A, Ozgumus OB. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. World J Microbiol Biotechnol. 1990;26:2099–103.

21- Bryan A, Shapir N, Sadowsky M. Frequency and distribution of tetracyclin resistanc genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strain isolated from diverse human and animal Sources. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2004;7o(1):2503–7.

22- Saenz Y, Brinas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, *et al.* Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(10):3996-4001.

23- Tuckman M, Petersen PJ, Howe AY, Orlowski M, Mullen S, Chan K, *et al.* Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(9):3205-11.

24- Sianglum W, Kittiniyom K, Srimanote P, Wonglumsom W. Development of Multiplex PCR assays for detection of antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* and enterococci. Journal Rapid Methods Autumn Microbiol. 2009;17:117–34.

25- Nelson ML, Levy SB. Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1999;43(7):1719-24.

Identification and Determination of Tetracycline Resistance Genes in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Sistan

Vahideh Kadaei[1], Zahra Rashki Ghalenoo[2*]

1- Graduated Student of genetic, Department of Biology, Faculty of Science, Univercity of Zabol, Zabol, Iran.
2- Assistant professor of Microbiology and Molecular Genetics, Department of Microbiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

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

Summary

Certain strains of extraintestinal pathogenic *E. coli* can cause urinary tract infection (UTI) in humans. Today, unnecessary consumption of antibiotics has led to resistance in bacterial populations. The aim of this study was to determine the tetracycline resistance genes and to evaluate the prevalence of antibiotic resistance among *E. coli* isolates collected from patients with UTI. In this descriptive cross-sectional study, 350 urine samples were collected from patients with UTI who were referred to the teaching hospital in Zabol during 6 months. *E. coli* was identified by conventional bacteriological test methods. Antibiotic susceptibility test was performed as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) using disk diffusion method. All tetracycline-resistant isolates were then examined for presence of the *tetA*, *tetB* and *tetC* genes. Of the 100 isolates of *E. coli*, the most antibiotic resistance was related to tetracycline (57%) and the least antibiotic resistance was related to ceftazidim (34%). Resistance to other antibiotics ceftriaxone, aztreonam and cefotaxime were 44%, 44% and 40%; respectively. Among tetracycline resistant isolates, 32 isolates (56.14%), had *tetA* gene and *tetB* and *tetC* genes were found in 28 (49.12%) and 6 (10.52%) isolates respectively. 16 (28.07%) and 3 (5.26%) isolates were positive for both genes (*tetA* and *tetB*) and three genes, and 14 (24.56%) isolates were negative for them. Resistance to tetracycline and other antibiotics, and the presence of *tetA* and *tetB* genes in UPEC strains are alarming signs in Sistan. The current study strongly recommends restricted consumption of antibiotics including tetracycline. Further studies are needed in other parts of the country to take more appropriate measures than common therapies.

Key words: *Uropathogenic E. coli, Tetracycline -resistance genes, Tetracycline-resistant*

بررسی آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* در بوقلمون‌های بومی شهرستان بابل

جعفر حسین زاده مرزناکی*[۱]، محمدرضا یوسفی[۲]

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

دریافت مقاله: ۱۷ آذر ۱۳۹۶ ، ۵ دی ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۹ بهمن ۱۳۹۶

چکیده

کریپتوسپوریدیوم از جمله بیماری‌های مهم در دام، طیور و انسان است که هم از نظر بهداشتی و هم از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. این بیماری توسط انگل‌های جنس *کریپتوسپوریدیوم* ایجاد می‌شود که یک تک‌یاخته انگلی از شاخه اپی‌کمپلکسا است. این انگل منجر به اختلال در دستگاه گوارش و بروز اسهال یا درگیری دستگاه تنفس می‌گردد. مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* در بوقلمون‌های بومی شهرستان بابل در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. در این بررسی، تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوعی از بوقلمون‌های بومی تهیه و با روش ذیل نلسون مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، در ۱۵ درصد نمونه‌ها آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* مشاهده شد. جنس نر و ماده از لحاظ میزان شیوع آلودگی اختلاف معنی‌داری نداشتند. میزان آلودگی در فصل پاییز بیشتر از دیگر فصل‌ها بود. نتایج حاصله از این بررسی نشان داد که آلودگی به *کریپتوسپوریدیوم* در بوقلمون‌های بومی شهرستان بابل نسبتاً زیاد می‌باشد، لذا لازم است مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گرفته و راهکارهای مناسبی در رابطه با پیشگیری و کنترل این بیماری ارائه گردد.

واژگان کلیدی: *اکریپتوسپوریدیوم، بوقلمون بومی، شهرستان بابل*

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

مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس از جمله بیماری‌های مهم در دام، طیور و انسان است که هم از نظر بهداشتی و هم از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. این بیماری توسط انگل‌های جنس *کریپتوسپوریدیوم* ایجاد شده و از طریق استقرار در سطح سلول‌های مخاطی دستگاه گوارش و تنفس سبب بیماری و اختلالات فیزیولوژیک می‌شود (۱۲). تکثیر و فعالیت انگل در قسمت‌های مخاطی دستگاه تنفس و گوارش علاوه بر عوارض مستقیم، زمینه‌ساز فعالیت سایر عوامل پاتوژن مانند مایکوپلاسماها در دستگاه تنفس می‌گردد.

کریپتوسپوریدیوم علاوه بر ایجاد بیماری در دستگاه تنفس طیور، با تخریب بافت روده موجب بروز اسهال و اختلال در هضم و جذب مواد غذایی شده و در طیور صنعتی اعم از تخم‌گذار و گوشتی سبب افت تولید و زیان‌های اقتصادی می‌گردد(۶). تک‌یاخته *کریپتوسپوریدیوم* با ایجاد اختلال در عملکرد و فیزیولوژی سلول‌های روده‌ای و همچنین آسیب‌هایی که از نظر پاتولوژی در سلول‌های روده‌ای موجب می‌شود، زمینه‌ساز بروز سایر بیماری‌های روده‌ای و دستگاه گوارش نیز می‌باشد.

اووسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* دارای مقاومت زیادی در طبیعت می‌باشند که به مواد ضد عفونی‌کننده متداول مقاوم بوده و به آسانی از بین نمی‌روند. بنابراین با توجه به این که انتقال انگل از طریق آب آلوده یکی از راه‌های عمده جابجایی آن در محیط محسوب می‌گردد، توجه به این مطلب می‌تواند نقش به‌سزایی در کنترل آن داشته باشد (۹). تحقیق حاضر در راستای اهمیت پرورش بوقلمون‌های بومی در شهرستان بابل و عدم آگاهی از شیوع انگل *کریپتوسپوریدیوم* در این شهرستان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه نمونه‌های مدفوع بوقلمون‌های بومی از مناطق مختلف شهرستان بابل به روش تصادفی طی چهار فصل مختلف سال از بهار ۱۳۹۵ تا زمستان همان سال جمع‌آوری گردید. حجم کلی نمونه‌ها در این بررسی، تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع بود که پس از انتقال سریع به آزمایشگاه انگل‌شناسی گسترش‌های تازه از نمونه‌های مدفوع تهیه گردید. ابتدا نمونه‌ها به روش فرمالین - اتر تغلیظ و از رسوب به‌دست آمده روی لام گسترش تهیه شد، سپس اجازه داده شد تا گسترش‌ها در محیط آزمایشگاه خشک شوند. بعد از این مرحله گسترش‌ها به مدت ۵ دقیقه توسط متانول خالص تثبیت و سپس با روش ذیل نلسون رنگ‌آمیزی شدند. در مرحله بعد برای تشخیص نهایی و تأئید اووسیست‌ها، نمونه‌های مثبت با عدسی ۱۰۰ و با استفاده از روغن ایمرسیون ملاحظه گردیدند. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار spss مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

با توجه به ویژگی رنگ‌آمیزی ذیل نلسون زمینه نمونه سبزرنگ شده و اووسیست‌ها به رنگ قرمز در آمدند. از کل ۲۰۰ نمونه مدفوع مورد بررسی، ۳۰ مورد واجد آلودگی به اووسیست تک‌یاخته *کریپتوسپوریدیوم* بود که ۱۵ درصد نمونه‌ها را شامل گردید. براساس نتایج به‌دست آمده میزان شیوع آلودگی در جنس‌های مختلف نر و ماده اختلاف معنی‌داری نداشته و درجنس نر میزان آلودگی نسبت به جنس ماده اندکی بیشتر بود. میزان شیوع آلودگی به اووسیست انگل *کریپتوسپوریدیوم* براساس جنس در جدول۲ نشان داده شده است.

جدول۱- درصد کلی آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* در نمونه‌های آزمایش شده

تعداد نمونه‌ها	تعداد مثبت	درصد آلودگی
۲۰۰	۳۰	۱۵

جدول۲- نتایج آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* بر اساس جنسیت

جنس	تعداد	موارد مثبت	درصد
نر	۱۲۰	۲۰	۱۶/۶
ماده	۸۰	۱۰	۱۲/۵

بر اساس نتایج به‌دست آمده میزان آلودگی در فصول مختلف سال در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مطالعه فصل پاییز با ۸ نمونه مثبت واجد بالاترین آلودگی بوده است. براساس نتایج آزمون مربع کای در میزان آلودگی فصول مختلف سال اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵)

جدول ۳- نتایج آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* در فصول مختلف سال

فصل	تعداد نمونه	موارد مثبت	درصد آلودگی
بهار	۴۰	۵	۱۲/۵
تابستان	۴۰	۳	۷/۵
پاییز	۶۰	۸	۱۳/۳
زمستان	۶۰	۴	۶/۶

بحث و نتیجه‌گیری

کریپتوسپوریدیوم یکی از انگل‌های مهم دستگاه گوارش به خصوص روده می‌باشد که در طیف وسیعی از میزبانان از جمله در طیور و انسان ایجاد عوارض می‌کند (۱۲). در ایران برای اولین بار قراگوزلو و خداشناس وجود این انگل را بدون شناسایی گونه از یک خروس بومی گزارش کردند (۳). دزفولیان و همکاران با مطالعه‌ای که بر روی بوقلمون‌های بومی ایران انجام دادند میزان آلودگی به *کریپتوسپوریدیوزیس* را ۲۶درصد گزارش کردند (۲). حق بین و همکاران نیز آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* را در مزارع پرورش طیور گوشتی شهرستان قائمشهر مطالعه کردند، که از ۳۰ مرکز بررسی شده تعداد ۷ مرکز واجد آلودگی بودند (۴). در بررسی‌های مشابه دیگری که در سایر نقاط کشور صورت گرفت، حیدری و همکاران با بررسی شیوع آلودگی در بوقلمون‌های شهرستان همدان میزان آلودگی به *کریپتوسپوریدیوم* را ۴ درصد اعلام نموده‌اند (۳). در بررسی نوری و همکاران نیز، میزان آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* در مدفوع مرغداری‌های اطراف تهران ۲/۲۵ درصد گزارش شد (۸).

در مروری به نتایج گزارشات مختلفی که در این رابطه وجود دارد، معلوم می‌گردد که بیماری *کریپتوسپوریدیوزیس* به‌طور جدی در مرغداری‌های صنعتی وجود داشته که این مسأله می‌تواند نشانگر وجود آلودگی در طیور بومی نیز باشد، زیرا که با توجه به روش پرورش طیور بومی در هوای آزاد و دسترسی این طیور به آب و غذاهای غیربهداشتی و احیاناً آلوده به مدفوع، انتقال اووسیست *کریپتوسپوریدیوم* که عمدتاً مدفوعی-دهانی می‌باشد، به سادگی امکان‌پذیر خواهد بود. بنابراین، لزوم بررسی‌های بیشتر در خصوص ابعاد اپیدمیولوژیکی و میزان خسارت اقتصادی این بیماری، موضوعی مهم می‌باشد. همچنین برخلاف

نظر رایج در مورد *کریپتوسپوریدیوزیس* طیور، مبنی بر این‌که این بیماری در طیور عمدتاً تنفسی می‌باشد تا گوارشی، نتایج بررسی‌های مختلف اهمیت *کریپتوسپوریدیوم* گوارشی در طیور را نیز بیشتر مطرح می‌کند (۱۲،۱۱،۸).

با مروری بر نتایج حاصله از این بررسی و مطالعات دیگر که به آنها اشاره گردید، مشخص می‌شود که بیماری ناشی از *کریپتوسپوریدیوم* به صورت تحت بالینی و بالینی در طیور بومی وجود داشته که در مواقع استرس و وجود سایر بیماری‌های عفونی و شرایط بد تغذیه‌ای و استرس شدت و عوارض این تک‌یاخته بیشتر می‌شود. بدین ترتیب، لازم است مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گرفته و راهکارهای مناسبی در رابطه با پیشگیری و کنترل این بیماری اتخاذ گردد.

نتایج حاصله از این بررسی نشان داد که آلودگی به *کریپتوسپوریدیوم* در بوقلمون‌های بومی شهرستان بابل نسبتاً زیاد می‌باشد، لذا لازم است مطالعات تکمیلی مولکولی به جهت شناسایی گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* در این زمینه انجام گرفته و راهکارهای مناسبی در رابطه با پیشگیری و کنترل این بیماری ارائه گردد.

سپاسگزاری

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

References

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; 89:2-4. [In Persian].

2. Dezfoliyan O, Gharagozlou M, Rahbari S, Bokaie, S. A Pathological Study of Cryptosporidiosis in Native Turkeys of lran. J Vet Res. 2006; 10:77-82. [In Persian].

3. Gharagozlou MY, Khodashenas M, Cryptosporidiosis in a native rooster with chronic proliferative enteritis. Arch Vet. 1985; 17:129-138. [In Persian].

4. Haghbin Nazarpak H, Mousavi SA, RanjbarBahadori Sh, Mohammadi Malayeri MR, Hoseini SM. Frequency of *Cryptosporidium* infection in broiler breeding flock of Ghaemshahr. J Vet Microbiol. 2011; 1:1-5. [In Persian].

5. Heidari H, Gharakhani J. Study of *Cryptosporidium* Infection in the Livestock (Cattle, Sheep, Dogs, Fowls) and Humans in Hamadan City and Its Suburbs during 2006-2011. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences. 2012; 19:67-74. [In Persian].

6. Jordan F. Poultry Disease. 6th ed. Sunders, 2008.

7. Lindsay DS, Blagburn BL, Hoerr FJ, Davis JF, Giambrone J. Pathobiology of cryptosporidiosis (C. baileyi) in broiler chickens. J Protozool. 1991; 38: 25-28.

8. Nouri M, Bozorgmehri M, Mansouri N. Respiratory and digestive cryptosporidiosis in industrial poultry in Tehran. J Vet Med. 1994; 49:93. [In Persian].

9. Ranjbar Bahadori S, Shamshadi, B. Veterinary Parasitology. Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar; 2011. [In Persian].

10. Stefanogiannis N, Mclean M, Van hill H. Outbreak of cryptosporidiosis linked with a farm event. N Z Med J. 2001; 23:519-521.

11. Snyder D, Current WL, Russek-Cohen E, Gorham S, Mallison E, Marquard W, *et al.* Serologic incidence of *Cryptosporidium* in Delmarva broiler flocks. Poult Dis.1988; 67:730-735.

12. Cacciò SM. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. Parassitologia. 2005; 47(2):185-92.

Survey of *Cryptosporidium* parasite infection of native Turkeys in Babol city

Jafar Hossienzadeh marzenaki[*1], Mohammad Reza Yousefi[2]

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

Receive: December 8, 2017; Revise: December 26, 2017; Accept: February 8, 2018

Summary

Cryptosporidium is one of the most important diseases in livestock, poultry and humans; which is important both in terms of health and economics. It is caused by parasites of the genus *Cryptosporidium*, which is a parasitic apicomplexa protozoa. These protozoa can cause enteric infections, diarrhea, or respiratory infections. The present study aimed at determining infection with *Cryptosporidium* in native turkeys of Babol region. In the present study, 200 fecal samples from native turkeys were prepared and examined in 2016. Based on our results, from 200 examined samples, *cryptosporidium* infection was seen in 15% of the cases. There was no significant difference in infection rate between males and females. Pollution rates were higher in autumn than in other seasons. According to our results, native turkeys' *cryptosporidium* infection rate in Babol is high. Therefore, more studies are needed in this field, and appropriate strategies for preventing and controlling this disease need to be presented.

Keywords: *Babol city, Cryptosporidium, Native Turkeys*

تعیین الگوی عوامل حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد نیمچه‌های گوشتی کشتارشده در استان چهارمحال و بختیاری

غلامرضا بنی شریف[۱]، سپیده کریمی[۱]، حسن ممتاز[۲*]

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

دریافت مقاله: ۱۴ اسفند ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۹ فروردین ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۰ خرداد ۱۳۹۸

چکیده

مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین فراوانی آلودگی کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده درکشتارگاه طیور استان چهارمحال و بختیاری به دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* و بررسی الگوی ویرولانس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده انجام شد. در این مطالعه، تعداد ۱۸۶ نمونه کبد از نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور سطح استان به طور تصادفی جمع‌آوری شد. پس از جداسازی کمپیلوباکتر به روش کشت میکروبی، برای تأیید قطعی *کمپیلوباکتر* در ایزوله‌های جدا شده و افتراق قطعی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* از ردیابی ژن‌های *16SrRNA*، *mapA* و *ceuE* به روش PCR استفاده شد و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویرولانس ایزوله‌ها ارزیابی گردید. از مجموع ۱۸۶ نمونه کبد أخذ شده، تعداد ۹۴ نمونه (۵۰/۵۳ درصد) آلوده به گونه‌های *کمپیلوباکتر* بودند که از این تعداد، ۶۲ نمونه آلوده به *کمپیلوباکترژژونی* (۶۵/۹۵ درصد)، ۲۶ نمونه آلوده به گونه *کمپیلوباکترکولی* (۲۷/۶ درصد) و ۱۱ نمونه آلوده به هر دو گونه فوق بودند (۶/۴۵ درصد). تمام ژن‌های حدت بجز ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* حضور داشتند و در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* تنها ۵ ژن *cdtA*، *cdtB*، *cdtC*، *ima* و *racR* ردیابی شد. تمام ۸۸ ایزوله مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه بوده و در ۲۶ ایزوله *کمپیلوباکترکولی*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به استرپتومایسین (۹۶/۱۵ درصد) و کمترین میزان مربوط به کلرامفینیکل (۷/۶۹ درصد) بود. در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعلق به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷۲/۵۸ درصد) و اریترومایسین (۴/۸۳ درصد) بود. آلودگی بالای کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های استان چهارمحال و بختیاری به *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای این ایزوله‌ها، نشانگر خطر بالقوه کبد در انتقال آلودگی به انسان می‌باشد.

واژگان کلیدی: *کمپیلوباکترژژونی، کمپیلوباکترکولی، گوشت مرغ، فاکتورهای حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

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

مقدمه

کمپیلوباکترها گروهی از باکتری‌های گرم منفی، میکروآئروفیلیک و مقاوم به حرارت هستند که سبب بروز بیماری دستگاه گوارش انسان شده و از طریق آب و غذای آلوده به انسان منتقل و جزء بیماری‌های زئونوز محسوب می‌گردند (۱)، به طوری که بین ۴۰ تا ۶۰ درصد کودکان کمتر از ۵ سال حداقل یکی از علائم عفونت به این عامل را در سال اول تولد نشان می دهند (۲).

بیماری ۲ تا ۳ روز پس از مصرف غذا یا آب آلوده بروز یافته و در اغلب موارد به مدت یک هفته بهبود می‌یابد مگر در مواردی که بیمار دچار بیماری‌های خودایمن مانند سندرم گیلن- باره و میلر- فیشر باشد (۳). عفونت دستگاه گوارش با *کمپیلوباکتر* می‌تواند سبب درد شکم، تب، لکوسیتوز و حضور گلبول‌های سفید در مدفوع گردد (۴).

اغلب عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر توسط دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* (حدود ۹۰ درصد موارد) و *کمپیلوباکترکولی* (حدود ۱۰ درصد موارد) بروز یافته و دیگر گونه‌ها مانند *کمپیلوباکترلاری* و *کمپیلوباکترآپسالینسیس* به صورت تک‌گیر به وقوع می پیوندند (۵).

کمپیلوباکترها پس از گونه‌های *سالمونلا* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده مسمومیت غذایی از طریق شیر خام، تخم‌مرغ و ترکیبات تخم‌مرغ خام، گوشت طیور و گوشت قرمز هستند (۶، ۷).

گونه‌های مختلف *کمپیلوباکتر* توانایی اتصال به سلول‌های اپیتلیال مخاط روده و نفوذ در آنها را دارند (۸).

اتصال، کلونیزه شدن و تهاجم به دیوارهٔ روده و در نهایت تولید توکسین توسط گونه‌های *کمپیلوباکتر* تحت کنترل برخی از ژن‌ها بوده که سویه‌های متفاوت از نظر بیماری‌زایی را به وجود می‌آورد. ژن‌های *cadF*، *racR*، *dnaJ* و *flaA* ژن‌های مهم در اتصال و کلونیزه شدن باکتری در روده محسوب می‌شوند (۹، ۱۰).

توکسین تولیدی توسط *کمپیلوباکترها* تحت کنترل ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* است که وجود هر سه تحت واحد برای فعالیت کامل توکسین لازم هستند (۱۰، ۱۱).

معمولاً مقاومت آنتی‌بیوتکی در *کمپیلوباکترها* به دلیل ایجاد موتاسیون در محل‌های اختصاصی اتصالی رخ می‌دهد به خصوص در مورد کوئینولون‌ها، اما مکانیسم‌های دیگر مثل efflux pumps نیز در بروز مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند ماکرولیدها، بتالاکتام‌ها، اریترومایسین و تتراسایکلین مؤثر هستند (۱۲، ۱۳).

مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین فراوانی آلودگی کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده درکشتارگاه طیور استان چهارمحال و بختیاری به دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* و بررسی الگوی ویرولانس ومقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی باکتری: در این مطالعه توصیفی- مقطعی که درطول ۶ ماه ابتدای سال ۱۳۹۷ در استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت، تعداد ۱۸۶ نمونه کبد از نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور سطح استان به طور تصادفی جمع‌آوری شد.

نمونه‌ها بعد از معاینه کامل لاشه و تأیید سلامت لاشه توسط بازرس فنی کشتارگاه در حجم ۱۰ گرم از کبد هر نیمچه گوشتی کشتار شده درکیسه‌های پلاستیکی استریل اخذ و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. نمونه‌های اخذ شده در ۹۰

میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده Preston Enrichment Broth (Himedia, India) واجد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآئروفیلیک (۵ درصد O_2، ۱۰ درصد Co_2، ۸۵ درصد N_2) گرمخانه گذاری شدند.

باکتری غنی شده در محیط انتخابی (CCDA) Campylobacter Blood-Free Selective Agar حاوی آنتی بیوتیک های آمفوتریپسین B و سفاپرازون کشت وپس از رشد تست های بیوشیمیایی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و تجزیه هیپورات سدیم روی پرگنه های رشد یافته انجام شد(۱۵و۱۴). ایزوله های جدا شده جهت مطالعات بعدی در محیط مایع TSB کشت داده شدند.

جهت استخراج DNA ازایزوله های جدا شده از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از کشت مایع یک شبه باکتری در محیط TSB در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفوژ نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA جدا گردید.

جدول۱ـ توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص گونه های *کمپیلوباکتر* و عوامل حدت در آنها

هدف	توالی پرایمر(۳ـ ۵)	دمای اتصال پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
جنس کمپیلوباکتر ***16SrRNA***	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T	۵۹	۸۵۷
کمپیلوباکترژژونی ***mapA***	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	۵۹	۵۸۹
کمپیلوباکترکولی ***ceuE***	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	۵۹	۴۶۲
flaA	AATAAAAATGCTGATAAAACAGGTG TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT	۵۳	۵۸۵
cadF	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	۴۵	۴۰۰
racR	GATGATCCTGACTTTG TCTCCTATTTTTACCC	۴۵	۵۸۴
dnaJ	AAGGCTTTGGCTCATC CTTTTTGTTCATCGTT	۴۶	۷۲۰
virB11	TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT CCTGCGTGTCCTGTGTTATTTACCC	۵۳	۴۹۴
ciaB	TTTTTATCAGTCCTTA TTTCGGTATCATTAGC	۴۲	۹۸۶
pldA	AAGCTTATGCGTTTTT TATAAGGCTTTCTCCA	۴۵	۹۱۳
cdtA	CCTTGTGATGCAAGCAATC ACACTCCATTTGCTTTCTG	۴۹	۳۷۰
cdtB	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT	۵۱	۶۲۰
cdtC	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA TTGGCATTATAGAAAATACAGTT	۴۷	۱۸۲
wlaN	TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG CCATTTGAATTGATATTTTTG	۴۶	۶۷۲
***tet*(O)**	GCGTTTTGTTTATGTGCG ATGGACAACCCGACAGAAG	۵۴	۵۵۹
***cme*B**	TCCTAGCAGCACAATATG AGCTTCGATAGCTGCATC	۵۴	۲۴۱
***bla*OXA-61**	AGAGTATAATACAAGCG TAGTGAGTTGTCAAGCC	۵۴	۳۷۲
aphA-3-1	TGCGTAAAAGATACGGAAG CAATCAGGCTTGATCCCC	۵۴	۷۰۱

ردیابی ژن‌های حدت: برای تائید قطعی *کمپیلوباکتر* در ایزوله‌های جدا شده از ردیابی ژن *16SrRNA* به روش PCR استفاده شد که این ناحیه ژنی در تمام گونه‌های کمپیلوباکتر وجود دارد (۱۶).

جهت افتراق قطعی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* از PCR ژن‌های *mapA* و *ceuE* با زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد.

واکنش PCR در دستگاه (Germany) FlexCycler^2 در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱/۵ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومول NTP Mix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای RوF (مربوط به سه ژن) ۰/۶ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط هر ایزوله تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از : یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

در آزمایش PCR از سویه‌های استاندارد *Campylobacter jejuni* ATCC29428 و *Campylobacter coli* ATCC43478 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد.

در ایزوله‌های جدا شده حضور شایع‌ترین عوامل حدت ارزیابی شد. برای این منظوراز زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد:

آزمایش PCR برای هر ژن به طور جداگانه در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR 10x buffer، ۱ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۱۵۰میکرومول dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و۴ میکرولیتراز DNA مربوط به هر نمونه تنظیم شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:

یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۴۵ تا ۵۳ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع ژن طبق جدول۱) ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از نمونه‌های کبد مورد مطالعه به دو روش فنوتیپی وژنوتیپی ارزیابی گردید. جهت ارزیابی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های *blaOXA-61*، *cmeB*، *aphA-3-1* و*tet(O)* به روش PCR در قالب یک واکنش PCR چندگانه‌ای ردیابی گردید که توالی پرایمرها مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است (۱۸):

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۴ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTPmix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای RوF مربوط به هرژن،۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله با برنامه دمایی شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه،۵۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه انجام شد.

در تمام مراحل فوق جهت ارزیابی محصول PCR، از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت انجام و بعد از مشاهده ژل در زیر نور UV از ژل حاصله تصویربرداری وثبت گردید.

به منظور ارزیابی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار دیسکی ساده طبق معیار CLS1

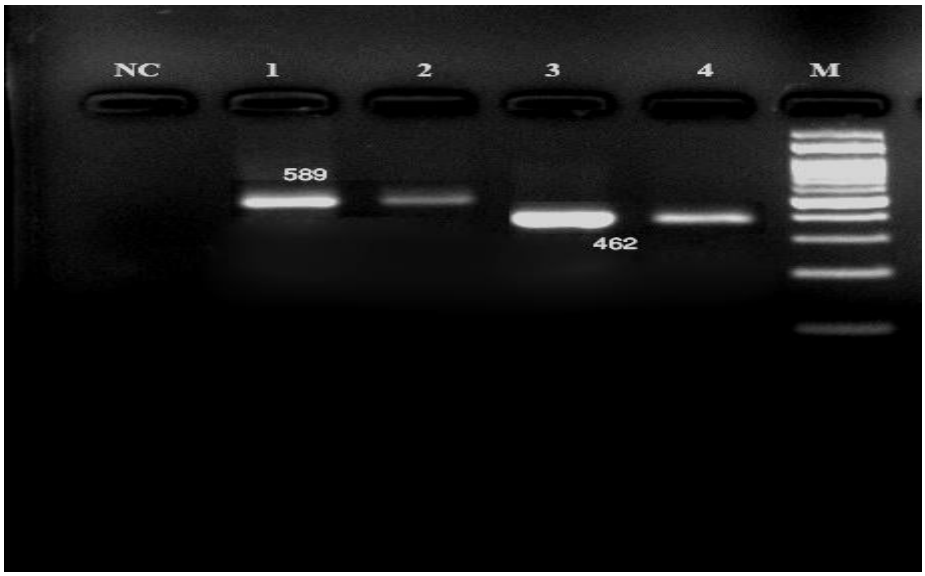
(2017) استفاده شد. ایزوله‌های جدا شده به روش متراکم در محیط مولرهینتون آگار واجد ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها در حضور دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل اریترومایسین (۱۵میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میلی‌گرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) ارزیابی گردید (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از نتایج با استفاده ازنرم افزار آماری SPSS ver20 و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر آنالیز و وجود ارتباط آماری معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<0.05$) بین داده‌ها تعیین گردید.

نتایج

از مجموع ۱۸۶ نمونه کبد أخذ شده از مرغ‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور سطح استان چهارمحال و بختیاری تعداد ۹۴ نمونه (۵۰/۵۳ درصد) آلوده به گونه‌های *کمپیلوباکتر* بودند که از این تعداد، ۶۲ نمونه آلوده به *کمپیلوباکترژژونی* (۶۵/۹۵ درصد)، ۲۶ نمونه آلوده به گونه *کمپیلوباکترکولی* (۲۷/۶ درصد) و ۱۱ نمونه آلوده به هر دو گونه فوق بودند (۶/۴۵ درصد) که در آزمایش PCR با ردیابی ژن‌های *mapA* ، *ceuE* وجود آلودگی قطعی در آنها تائید گردید. ژل حاصل از ردیابی این ژن‌ها در تصویر ۱ نشان داده شده است.

از ۹۴ ایزوله *کمپیلوباکتر* جدا شده تعداد ۶ ایزوله متعلق به گونه‌های غیر از ژژونی و کولی بودند که در این مطالعه شناسایی و تعیین هویت نشدند.



تصویر ۱ـ ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* در نمونه‌های کبد اخذ شده از مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال و بختیاری (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۱-۴= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۵۸۹ جفت بازی مربوط به گونه *کمپیلوباکترژژونی* و قطعه ۴۶۲ جفت بازی مربوط به گونه *کمپیلوباکترکولی*)

در تجزیه وتحلیل اطلاعات حاصل از تعیین فراوانی آلودگی نمونه‌های کبد به گونه‌های *کمپلوباکترژژونی* وکولی اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی آلودگی نمونه‌های کبد به گونه *کمپیلوباکترکولی* با میزان آلودگی به گونه *کمپیلوباکترژژونی* مشاهده شد ($P=0.031$).

حضور شایع‌ترین ژن های کدکننده عوامل حدت در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از نمونه‌های کبد مورد مطالعه به روش PCR ارزیابی گردید که نتایج در جدول ۲ آورده شده است :

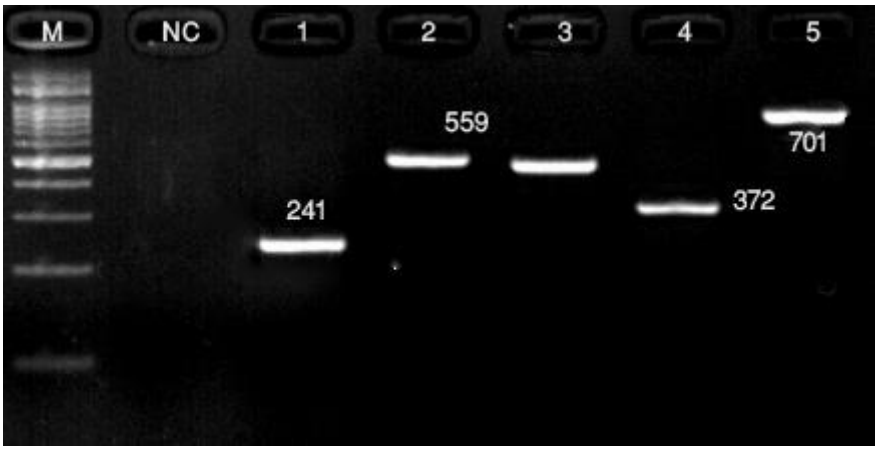
جدول۲ـ فراوانی حضور شایع‌ترین فاکتورهای حدت در گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال وبختیاری

گونه (تعداد ایزوله)	*cdtA*	*cdtB*	*cdtC*	*virbll*	*wlaN*	*ciaB*	*iam*	*dnaJ*	*racR*
C. jejuni (62)	۵۹	۶۲	۶۲	۶	۵	۴۱	—	۶۰	۵۸
C. coli (26)	۲	۳	۳	—	—	—	۲۳	—	۴

همان‌گونه که در جدول فوق مشهود است تمام ژن‌های حدت بجز ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* حضور داشتند و در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* تنها ۵ ژن *cdtA*، *cdtB*، *cdtC*، *ima* و *racR* ردیابی شد.

در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات مربوط به جدول فوق با مدل آماری دقیق فیشر،اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور ژن‌های *virbII* و *wlaN* با سایر ژن‌های حدت در ایزوله‌های کمپیلوباکترژژونی (P=0.028) و نیز بین حضور ژن *iam* با سایر ژن‌های مورد مطالعه در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* (P=0.019) مشاهده شد.

در ارزیابی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر*، حضور چهار ژن کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه به روش PCR چند گانه‌ای ارزیابی شد که ژل حاصل از ردیابی این ژن‌ها در تصویر۲ نشان داده شده و توزیع حضور این ژن‌ها در جدول ۳ آورده شده است:



تصویر ۲ـ ژل حاصل ازالکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال و بختیاری (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۱-۵= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۲۴۱ جفت بازی مربوط به ژن *cmeB*، قطعه ۵۵۹ جفت بازی مربوط به ژن *tet(O)*، قطعه ۳۷۲ جفت بازی مربوط به ژن *blaOXA-61* و قطعه ۷۰۱ جفت بازی مربوط به ژن *aphA-3-1*)

جدول ۳ـ فراوانی حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتارشده در استان چهارمحال و بختیاری

گونه (تعداد ایزوله)	*blaOXA-61*	*tet(O)*	*cmeB*	*aphA-3-1*
C. jejuni (62)	۴۹	۳۲	۳	۱
C. coli (26)	۱۹	۱۰	۱۸	–

طبق اطلاعات جدول فوق تمام ۴ ژن کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* ردیابی شدند و اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور دو ژن *tet(O)* و *blaOXA-61* با دو ژن *cmeB* و *aphA-3-1* در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=0.024) مشاهده شد.

در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* ژن *aphA-3-1* ردیابی نشد واختلاف آماری معنی‌داری بین حضور دیگر ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این ایزوله‌ها یافت نشد (P=0.126).

در آزمایش آنتی بیوگرام که جهت ارزیابی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر* به روش انتشار دیسکی ساده انجام شد، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* در حضور ۸ دیسک آنتی‌بیوتیکی ارزیابی شد که نتایج در جدول ۴ آورده شده است:

جدول ۴ـ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال و بختیاری

گونه (تعداد ایزوله)	اریترومایسین	سیپروفلوکساسین	تتراسیکلین	استرپتومایسین	جنتامایسین	کلرامفنیکل	آمپی سیلین	نالیدیکسیک اسید
C. jejuni (62)	۳	۴۵	۲۶	۱۹	ـــ	۴	۳۲	۳۸
C. coli (26)	۴	۱۹	۲۱	۲۵	۶	۲	۱۴	۱۶

طبق اطلاعات جدول فوق تمام ۸۸ ایزوله مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بوده و در ۲۶ ایزوله *کمپیلوباکترکولی*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به استرپتومایسین (۹۶/۱۵ درصد) و کمترین میزان مربوط به کلرامفینیکل(۷/۶۹ درصد) بود. در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه به ترتیب بیشترین وکمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعلق به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷۲/۵۸ درصد) و اریترومایسین (۴/۸۳ درصد) بود. آنالیز آماری نتایج حاصل از جدول فوق نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* به اریترومایسین، کلرامفنیکل و استرپتومایسین با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (P=0.023) بود و در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* اختلاف آماری معنی‌داری بین مقاومت به کلرامفنیکل، اریترومایسین و جنتامایسین با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (P=0.034) مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه که بر روی ۱۸۶ نمونه کبد از نیمچه‌های گوشتی کشتار شده درکشتارگاه‌های طیور سطح استان چهارمحال و بختیاری انجام شد، نتایج نشان داد که بیش از نیمی از نمونه‌ها (۵۰/۵۳ درصد) آلوده به گونه‌ای از *کمپیلوباکتر* هستند.

آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در شمال غرب ایران ۳۷/۷ درصد، در اصفهان ۵۶/۱ درصد، در تهران ۶۳/۲ درصد، در مشهد ۷۶ درصد و در مطالعه دیگری در شهرکرد ۴۷ درصد گزارش شده است (۱۴). در اولین گزارش آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در گوشت خام بوقلمون، بلدرچین و شترمرغ در اصفهان میزان آلودگی ۴۷/۱ درصد گزارش گردید (۱۵).

در یک مطالعه آلودگی بال‌های بسته‌بندی و عرضه شده به بازار به گونه‌های *کمپیلوباکتر* ۴۱/۶۶ درصد تعیین شد که نشان دهندهٔ خطر بالایی برای سلامتی انسان‌ها بوده است (۲۰).

علت اختلاف در میزان آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* درمطالعه حاضر با مطالعات مشابه به سطح بهداشت کشتارگاه‌های نوع نمونه، مدیریت فارم‌های پرورش و نحوه انجام آزمایش مربوط است که در مطالعه حاضر همزمان از دو روش کشت میکروبی و PCR جهت شناسایی باکتری در یکی از اصلی‌ترین اندام‌های هدف باکتری یعنی کبد استفاده شد و شیوع نسبتاً بالایی از آلودگی گزارش گردید (۲۱).

اغلب کبدهای مورد آزمایش بیانگر آلودگی بیشتر به *کمپیلوباکترژژونی* (۶۵/۹۵ درصد) که در مقایسه با آلودگی به *کمپیلوباکترکولی* (۲۷/۶ درصد) اختلاف آماری معنی‌داری را نشان می‌دهد. این در حالی است که در مطالعه بر روی گوشت خام نیمچه گوشتی ۴۷ درصد میزان آلودگی بسیار بالایی را داشته است (۲۱).

همان طور که در جدول شماره ۴ دیده می‌شود، تمام ۸۸ ایزوله مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه هستند و در ۲۶ ایزوله *کمپیلوباکترکولی*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به استرپتومایسین (۹۶/۱۵ درصد) و کمترین میزان مربوط به کلرامفینیکل (۷/۶۹ درصد) بود. در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه به ترتیب بیشترین وکمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعلق به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷۲/۵۸ درصد) و اریترومایسین (۴/۸۳ درصد) بود. مطالعات دیگر در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کمپیلوباکترها* تأیید کننده برخی یافته‌های مطالعهٔ حاضر و برخی مغایر با نتایج این پژوهش است (۲۵-۲۲).

بیماری‌زایی گونه‌های *کمپیلوباکتر* وابسته به عوامل مختلفی است که در این مطالعه حضور شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت در دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت مرغ بررسی شد. از ۱۱ ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن‌ها بجز ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* وجود داشت اما در ایزوله های *کمپیلوباکترکولی* تنها ۵ ژن *cdtA, cdtB, cdtC, iam, recR* ردیابی گردید.

در مطالعه Bardoň و همکاران (۲۰۱۷)، در ۷۳ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از انسان، ژن‌های *iam* و *virBII* وجود نداشتند و سه ژن *cdtA, cdtB, cdtC*، به ترتیب با فراوانی، ۹۸/۶، ۹۵/۹ و ۹۴/۵ درصد شایع‌ترین عوامل حدت ردیابی شده بودند. در این مطالعه، در ۷۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت طیور، تنها ژن *iam* ردیابی نشد و در ۳۶ سویه *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت مرغ تنها ۴ ژن *cdtB, cdtC, iam, recR* ردیابی شدند (۹) که با مطالعه حاضر همراستا است.

Wieczorek و Osek (۲۰۰۸)، فراوانی حضور ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت مرغ را به ترتیب ۳۱ و ۲۷ درصد گزارش کردند (۲۶).

Wieczorek (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای دیگر، فراوانی حضور ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت مرغ را معادل ۱۰۰ درصد و در

سویه‌های *کمپیلوباکترکولی* معادل ۱۵ درصد گزارش کرد (۲۷).

آلودگی بالای کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های استان چهارمحال و بختیاری به *کمپیلوباکتر* و خصوصاً دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* نشانگر خطر بالقوه کبد در انتقال آلودگی به انسان می‌باشد، از طرفی شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های جدا شده، نشانگر مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های غیر مجاز نظیر کلرامفنیکل در صنعت پرورش طیور در کشور است لذا توصیه می‌گردد که اصول بهداشتی در طول خط کشتار مرغ و فروشگاه‌های عرضه گوشت مرغ رعایت گردد و مصرف آنتی‌بیوتیک فقط زیر نظر دامپزشک فارم و بر اساس نتیجه آنتی‌بیوگرام انجام شود.

References

1- Quetz JD, Lima IF, Havt A, Prata MM, Cavalcante PA, Medeiros PH, Cid DA, Moraes ML, Rey LC, Soares AM, Mota RM. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. J Med Microbiol. 2012;61(4):507-13.

2- Riddle MS, Guerry P. Status of vaccine research and development for *Campylobacter jejuni*. Vaccine. 2016;34(26):2903-6.

3- Salehi M, Shafaei E, Bameri Z, Bokaeian M, Mirzaee B, Mirfakhraee S, Rigi TB, Akbari M. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni*. Int J Infect. 2014;1(2).

4- Mazaheri M, Haji Rezaei M, Aalinezhad M, Sharif MR, Akhavan T. Clinical and laboratory characteristics of pediatric *Campylobacter* spp. Acute Gastroenteritis. Arch Pediat Infect Dis. 2016;6:1-6.

5- Rastyani S, Alikhani MY, Sedighi I, Kazemi S, Farhadi KH, Arabestani MR. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children with acute diarrhea in health centers of Hamadan, Iran. Avicenna J Clin Microbiol Infect. 2015;2(4): e29791.

6- Shams S, Bakhshi B, Moghadam TT. In Silico analysis of the *cadF* gene and development of a duplex polymerase chain reaction for species-specific identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(2): e29645.

7- Ghasemian Safaei H, Jalali M, Hosseini A, Narimani T, Sharifzadeh A, Raheimi E. The prevalence of bacterial contamination of table eggs from retails markets by *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in Shahrekord, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(4):249-53.

8- Lawson AJ. Campylobacteriosis. In: **Palmer SR, Soulsby L, Torgerson PR, Brown DWG, eds.** Oxford Textbook of Zoonoses. 2nd edition, New York, USA, Oxford University Press, Inc., 2011, pp. 136-145.

9- Bardoň J, Pudová V, Koláčková I, Karpíšková R, Röderová M, Kolář M. Virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter* spp. in the Czech Republic. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2017;66(2):59-66.

10- Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S, Nur-E-Kamal A, Nair GB, Cravioto A, Sack DA, Endtz HP. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1485-8.

11- Lara-Tejero M, Galán JE. *CdtA*, *CdtB*, and *CdtC* form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. Infect Immun. 2001;69(7):4358-65.

12- Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Mégraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. Microb Infect. 2006;8(7):1967-71.

13- Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(7):2124-31.

14- Banuo AS, Saeide AN. Isolation and survey for drug resistance of *Campylobacter jejuni* in poultry feces in Kerman. Iranian J Med Microbiol. 2016;9(4):95-8. [In Persian].

15- Rahimi E, Tajbakhsh E. Prevalence of *Campylobacter* species in poultry meat in the Esfahan city, Iran. Bulgarian J Vet Med. 2008;11(4):257-62.

16- Rahimi E, Momtaz H, Ameri M, Ghasemian-Safaei H, Ali-Kasemi M. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. Poult Sci. 2010;89(5):1015-20.

17- Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. J Med Microbiol.

2003;52(4):345-8.

18- Obeng AS, Rickard H, Sexton M, Pang Y, Peng H, Barton M. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. J Appl Microbiol. 2012;113(2):294-307.

19- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S26: Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

20- Hosseinzadeh S, Mardani K, Aliakbarlu J, Ghorbanzadehghan M. Occurrence of *Campylobacter* in chicken wings marketed in the northwest of Iran. Int Food Res J. 2015;22(1):41-5.

21- Rahimi E, Ameri M. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from raw chicken, turkey, quail, partridge, and ostrich meat in Iran. Food Control. 2011;22(8):1165-70.

22- Nahar N, Rashid RB. Genotypic analysis of the virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter* species in silico. J Bioanal Biomed. 2018;10(1):13-23.

23- Iglesias-Torrens Y, Miro E, Guirado P, Llovet T, Muñoz C, Cerdà-Cuéllar M, Madrid C, Balsalobre C, Navarro F. Population structure, antimicrobial resistance, and virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients, broilers, and wild birds. Front Microbiol. 2018;9.

24- Babaie Najad Basiri F, Haghighi Khoshkhoo P, Akbariazad G. Prevalence and antibacterial susceptibility of thermophilic Campylobacter spp. in broiler chickens. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;26(136):185-9. [In Persian].

25- Khoshbakht R, Tabatabaei M, Hoseinzadeh S, Raeisi M, Aski HS, Berizi E. Prevalence and antibiotic resistance profile of thermophilic Campylobacter spp. of slaughtered cattle and sheep in Shiraz, Iran. Vet Res Forum. 2016;7(3):241-6.

26- Wieczorek K, Osek J. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. Bull Vet Inst Pulawy. 2008;52(1):211-6.

27- Wieczorek K. Antimicrobial resistance and virulence markers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from retail poultry meat in Poland. Bull Vet Inst Pulawy. 2010;54:563-9.

Virulence and antimicrobial resistance pattern in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from the liver of slaughtered broiler chickens in Chaharmahal va Bakhtiari province

GholamReza Banisharif[1], Sepideh Karimi[1], Hasan Momtaz[2*]

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

Receive: March 5, 2019; Revise: April 18, 2019; Accept: June 10, 2019

Summary

The aim of this study was to determine the prevalence of liver contamination in broiler chickens slaughtered in Chaharmahal va Bakhtiari Province in two species of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and to investigate the virulence and antibiotic resistance of isolated strains. In this study, 186 liver samples from broiler chickens slaughtered in the slaughterhouses of the province were randomly collected. After the isolation of *Campylobacter* by microbial culture, for definitive confirmation of *Campylobacter* in isolated strains and definitive differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, the detection of *16SrRNA*, *mapA* and *ceuE* genes was performed by PCR method. Antibiotic resistance pattern and distribution of virulence factors were evaluated. Of the 186 liver samples collected, 94 samples (50.53%) were infected with *Campylobacter* species, of which 62 cases were infected with *Campylobacter jejuni* (65.95%), 26 infected samples were *Campylobacter coli* (27.6%) and 11 samples were contaminated with both species (6.45%). All virulence genes except the *iam* gene were present in *Campylobacter jejuni* isolates, and in *Campylobacter coli* strains only 5 *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *ima* and *racR* genes were detected. All of the 88 isolates studied had multiple antibiotic resistance and in 26 isolates of *Campylobacter coli*, the highest antibiotic resistance was observed for streptomycin (96.15%) and the lowest was chloramphenicol (7.69%). In *Campylobacter jejuni* strains, the highest and lowest antibiotic resistance levels belonged to the two antibiotics ciprofloxacin (72.58%) and erythromycin (4.83%), respectively. High prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chickens slaughtered in Chaharmahal va Bakhtiari slaughterhouses and high antibiotic resistance of these isolates indicate a potential risk of liver contamination in human transmission.

Keywords: Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Chicken meat, Virulence factors, Antibiotic resistanc

ویژگی‌های اپیدمیولوژیک موارد هاری انسانی ارجاع داده شده به مرکز بهداشت شهرستان ساری طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۶

سید محمد حسینی[۱]، محمد اسدی ایرایی[۲]، محمد مهدی یزدانی رستم[۳*]، محمد جواد مشایخ‌نیا[۳]، محمدرضا رودکی‌سروندانی[۳]، امین آقاجانی[۴]

۱- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران.
۲- دامپزشک عمومی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان.
۳- عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان و دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران.
۴- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، گرگان، ایران.

دریافت مقاله: ۲۳ فروردین ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۰۵ خرداد ۱۳۹۸

چکیده

بیماری هاری از جمله زئونوزهای بسیار کشنده‌ای است که به علت قابلیت انتقال از حیوانات به اکثر پستانداران دارای اهمیت فراوان می‌باشد. حیوان مبتلا می‌تواند بیماری را از راه گاز گرفتن به انسان و یا سایر حیوانات انتقال دهد. در این مطالعه‌ی گذشته نگر، تعداد ۶۵۶۰ مورد حیوان‌گزیدگی ارجاع داده شده به مرکز بهداشت شهرستان ساری از سال ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۶ به مدت ۵ سال مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، عواملی چون سن، جنس، شغل، محل زندگی افراد گزیده شده، نوع حیوان گزنده، زمان گزیدگی و محل گزش مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۶۵۶۰ مورد حیوان‌گزیدگی، به طور میانگین هر سال ۱۰۹۳ مورد حیوان‌گزیدگی اتفاق افتاد. از لحاظ حیوان گزنده، سگ‌ها با ۸۱/۱ درصد دارای بیشترین فراوانی بودند. گروه سنی ۲۰ تا ۲۹ سال با میانگین ۲۸۱/۱ گزش در سال، مردان با ۷۷ درصد گزش‌ها، ساکنان مناطق روستایی با ۶۴/۳ درصد گزش‌ها، افراد با مشاغل آزاد با ۳۱۹/۳ درصد گزیدگی در سال، ماه خرداد با میانگین ۱۱۱/۵ گزش در هر سال، فصل تابستان با ۲۸/۴ درصد از گزش‌ها دارای بالاترین فراوانی در بین حیوان‌گزیدگان را به خود اختصاص داده بودند. از نظر محل آناتومیک گزش، ۵۰/۴ درصد موارد گزش‌ها در ناحیه دست و ۴۲/۹ درصد هم در ناحیه پا بوده است. بر اساس نتایج این مطالعه نیاز به توجه ویژه جهت حذف مخازن بیماری و همچنین افزایش آگاهی بیشتر اقشار جامعه نسبت به این بیماری و نحوه انتقال آن می‌باشد.

واژگان کلیدی: *حیوان‌گزیدگی، اپیدمیولوژی، هاری، ساری*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mehdi.yazdani74@gmail.com

مقدمه

بیماری هاری یک التهاب مغزی[۱] کشنده است که به وسیلهٔ ویروس هاری (RABV)[۲] در سیستم عصبی مرکزی (CNS)[۳] ایجاد می‌شود. ویروس هاری یک ویروس نوروتروفیک[۴] است که از طریق تماس زخم یا خراش با بزاق یا مواجههٔ مستقیم با گاز گرفتن حیوان هار از جمله سگ، خفاش، راکن و گربه به انسان منتقل می‌گردد (۱).

عامل بیماری ویروسی عصب دوست از خانواده رابدوویریده و جنس لیساویروس می‌باشد. بیماری عمدتاً از طریق گازگرفتگی حیوانات (حیوان گزیدگی) و گاهی از طریق نسوج مخاطی، تنفس، جفت، وسایل آلوده و پیوند اعضا منتقل می‌شود (۲).

عفونت ویروس هاری باعث تغییر رفتار توأم با خشم در میزبان مبتلا به هاری می‌شود. این امر منجر به افزایش احتمال گازگرفتگی و در نتیجه انتقال ویروس می‌گردد (۳).

در خصوص میزان بروز حیوان‌گزیدگی، برآورد جهانی وجود ندارد ولی طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت بیش از ۲/۵ میلیارد نفر در خطر بیماری هاری بوده و هرساله حدود ۱۰ میلیون نفر (بدون محاسبه هندوستان) دریافت کننده درمان پیشگیری از هاری بعد از حیوان‌گزیدگی می‌باشند که ۳۱ هزار مورد آن در قاره آسیا می‌باشد (۴). آلودگی حیوانات اهلی در ایران نیز به طور مکرر اتفاق می‌افتد (۵). علاوه بر اهمیت بهداشتی در انسان، وقوع بیماری در دام‌ها باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی می‌شود. بیماری در ایران از نظر اپیدمیولوژی به دو شکل وحشی و شهری وجود دارد. طبق آخرین آمار تهیه شده توسط انستیتو پاستور ایران، در سال ۲۰۰۸ میلادی بیشترین موارد هاری حیوانی در استان‌های گلستان، گیلان، کرمان و فارس بوده و تعداد ۱۳۱۴۱۳ نفر در سراسر کشور به دنبال گازگرفتگی توسط حیوانات مختلف تحت درمان ضد هاری قرار گرفتند که ۷ نفر در اثر ابتلا به این بیماری فوت کردند (۶). بیشترین موارد هاری در نشخوارکنندگان و سگ مشاهده شده است. در شمال کشور، سگ، روباه و در غرب و شمال غرب کشور گرگ‌ها مهم‌ترین ناقل و مخزن بیماری هستند (۷).

علیرغم قابل پیشگیری بودن هاری با وجود واکسن‌های اثربخش و بی‌خطر، این بیماری همچنان یک معضل بهداشتی در بسیاری از کشورهای جهان به ویژه در آسیا و آفریقا می‌باشد. سالیانه ۵۵ هزار مرگ و میر ناشی از هاری در دنیا اتفاق می‌افتد که اکثر این تلفات در دو قاره مذکور بوده و کودکان زیر ۱۵ سال، ۵۰-۳۰ درصد از قربانیان را به خود اختصاص می‌دهند (۸).

علاوه بر هزینه‌های مالی پیشگیری و درمان موارد حیوان‌گزیده، پیامدهای روانی، اجتماعی ناشی از گزش حیوان و اسکار باقی‌مانده می‌تواند به میزان زیادی زندگی فرد حیوان‌گزیده و خانواده‌اش را تحت تأثیر قرار دهد (۹).

با توجه به شیوع قابل توجه بیماری هاری، مرگ و میر بالا و قابلیت پیشگیری آن، این مطالعه با هدف بررسی اپیدمیولوژیکی موارد حیوان‌گزیدگی طراحی، تا با کمک آن بتوان افراد در معرض خطر و الگوی فصلی و زمانی هاری را در منطقه مورد مطالعه شناسایی نموده و در برنامه‌ریزی جهت تدارک واکسن و سرم مورد نیاز، پیش‌بینی و اجرای برنامه‌های مداخله‌ای پیشگیری و کاهش شیوع بیماری و بار اقتصادی ناشی از آن در سیستم بهداشت و درمان به مسئولان مربوطه کمک نماید.

۱- Encephalitis

۲- Rabies virus

3- Central nervous system

4- Neurotrophic

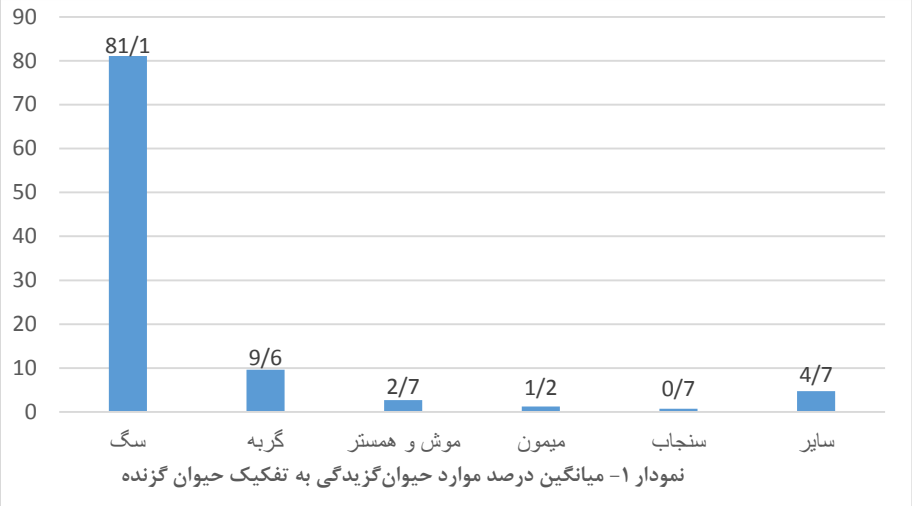
مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر که یک مطالعه گذشته‌نگر می‌باشد تعداد ۶۵۶۰ مورد حیوان‌گزیدگی ارجاع داده شده به مرکز بهداشت شهرستان ساری مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد پژوهش شامل کلیه مراجعین حیوان‌گزیده‌ای بود که در یک دوره‌ی زمانی ۶ ساله از ماه فروردین سال ۱۳۹۱ تا اسفند ماه سال ۱۳۹۶ به مرکز بهداشت شهرستان ساری مراجعه کرده و تحت اقدامات پیشگیرانه و درمانی قرار گرفتند. متغیرهای اصلی مطالعه شامل: فاکتورهای دموگرافیک مربوط به مراجعین (سن، جنس، شغل)، مکان زندگی(شهر، روستا)، زمان گزیده‌شدن (ماه، فصل، سال)، حیوان گزنده (سگ، گربه و ...) و محل گزش (دست، پا، اندام فوقانی، تنه) بود. جمع‌آوری داده‌ها توسط پژوهشگر با استفاده از فرم اطلاعاتی که شامل اطلاعات فوق‌الذکر است و قبلاً آماده شده بود، با مراجعه به مرکز بهداشت شهرستان ساری و با استفاده از دفاتر ثبت واحد پیشگیری و مبارزه با بیماری هاری صورت گرفت. اطلاعات مربوط به حیوان‌گزیدگی از پرونده‌های موجود در مرکز بهداشت شهرستان که توسط پرسنل آن مرکز تکمیل شده بود، جمع‌آوری شد. داده‌ها پس از استخراج از بانک اطلاعاتی مرکز بهداشت شهرستان ساری، با استفاده از نرم افزار Excel 2010 ، SPSS 22 در دو بخش توصیفی(میانگین و نسبت) واستنباطی(تی تست و مربع کای) و سطح آماری مورد اطمینان ۹۵ درصد($p<0/05$) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

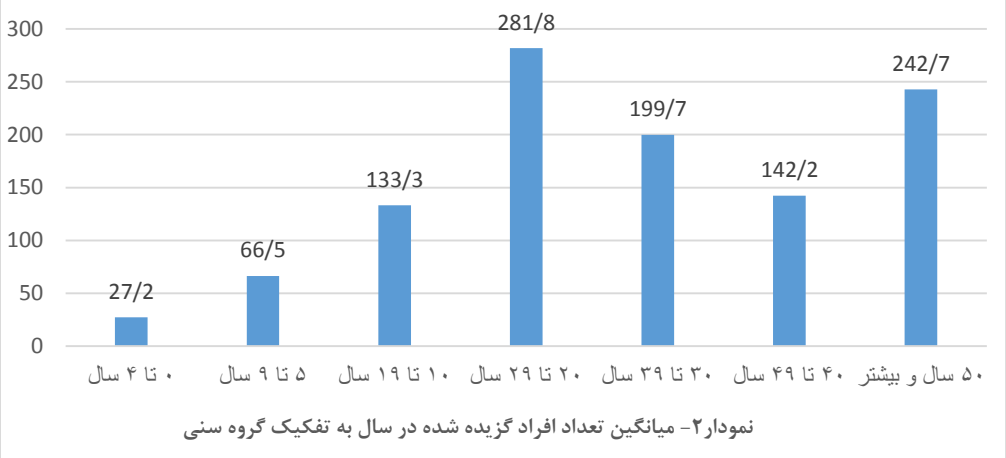
نتایج و بحث

در مجموع از سال ۱۳۹۱ تا سال ۱۳۹۶، ۶۵۶۰ مورد حیوان‌گزیدگی مشکوک به بیماری هاری به مرکز بهداشت شهرستان ساری مراجعه کردند. به طور میانگین ۸۷/۵۲+۱۰۹۳ مورد حیوان‌گزیدگی در سال در این شهرستان طی این پنج سال رخ داده است. استان مازندران به دلیل تنوع اقلیمی فراوان و حیات وحش غنی و گونه‌های جانوری متنوع، به لحاظ گستردگی موجوداتی که می‌توانند میزبان، حامل و یا ناقل ویروس هاری واقع شوند حائز اهمیت می‌باشد. با در نظر گرفتن وسعت استان مازندران در قیاس با سایر استان‌های کشور، موارد متعدد حیوان‌گزیدگی در هر سال نشان دهنده اهمیت پیشگیری و کنترل بیماری هاری در این استان و شهرستان‌های آن می‌باشد. نتایج مطالعه‌ای دیگر نشان داد مازندران دومین استان آلوده کشور از حیث حیوان‌گزیدگی می‌باشد (۱۰). به دلیل ارتباط مستقیم شیوع هاری حیوانی با هاری انسانی و از طرفی روند رو به رشد نگهداری حیوانات خانگی مانند سگ و گربه، نیاز به ارتقاء سطح آگاهی جامعه در مورد این بیماری نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

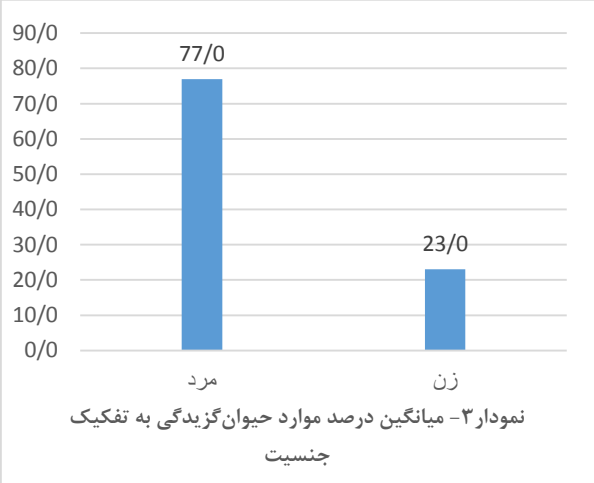
در مطالعه‌ای که سال ۲۰۰۰ در پنسیلوانیا انجام شد میزان شیوع گازگرفتگی ۳۲۴ در صدهزار نفر گزارش گردید (۱۱). مطالعه‌ی سال ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۴ در اسپانیا گازگرفتگی را ۸۳۰ در صدهزار نفر جمعیت گزارش داد که با نتیجه‌ی مطالعه‌ی قبلی متفاوت بود (۱۲).



نمودار ۱- میانگین درصد موارد حیوان‌گزیدگی به تفکیک حیوان گزنده



نمودار۲- میانگین تعداد افراد گزیده شده در سال به تفکیک گروه سنی



نمودار۳- میانگین درصد موارد حیوان‌گزیدگی به تفکیک جنسیت

در مطالعه حاضر، بیشتر موارد حیوان‌گزیدگی توسط سگ‌ها رخ داده است (نمودار ۱) و سایر موارد آن به ترتیب توسط گربه‌ها، موش و همستر، میمون، سنجاب، انسان و سایر حیوانات ایجاد شده است، که این نتایج هم‌جهت با مطالعات دیگر می‌باشد (۱۳، ۱۴). در مطالعه مشابه که در جنوب ایران انجام شد

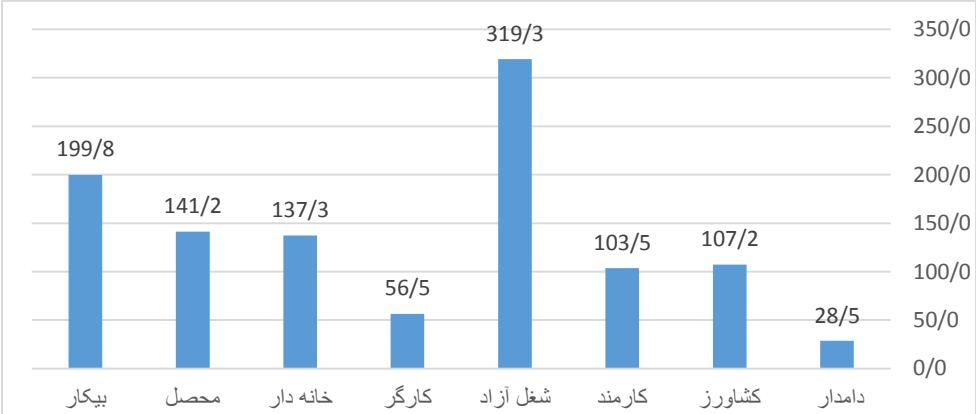
بیشتر موارد حیوان‌گزیدگی توسط سگ‌ها (۷۴ درصد) ، گربه‌ها (۲۳ درصد) و تنها ۳ درصد توسط سایرحیوانات (میمون، موش، روباه و الاغ) رخ داده است (۱۵). همچنین در مطالعه‌ای که در غرب کشور انجام شد، عامل بیشتر موارد حیوان‌گزیدگی (۳۹۴۲) مورد سگ‌ها (۸۲/۲ درصد) بود و پس از آن گربه‌ها (۵ درصد)، گرگ‌ها (۰/۷ درصد)، شغال‌ها (۰/۶ درصد)، روباه‌ها (۰/۳ درصد) و سایر حیوانات مسئول ایجاد ۴/۲ درصد موارد حیوان‌گزیدگی بودند (۱۳). در مطالعه انجام شده در Bali در کشور اندونزی از ۱۰۴ فرد مبتلا به هاری ۹۲ درصد سابقه گزیدگی توسط سگ را ذکر کردند (۱۴). شیوع بالای حیوان گزیدگی توسط سگ‌ها شاید به این دلیل باشد که از قدیم‌الایام سگ‌ها جهت حفظ امنیت بیشتر زندگی انسان، نزدیک افراد بوده‌اند و علاوه بر آن امروزه نیز زندگی انسان‌ها به نحوی در ارتباط با این حیوان بوده و این وابستگی زندگی انسان با این حیوان شاید دلیل مهمی باشد که بیشتر در معرض گزش این حیوان قرار گیرد. نتایج تحقیق حاضر، دلالت بر نیاز بیشتر وجود سیاست‌گذاری دقیق، در ارتباط با انجام درست و مرتب برنامه‌های واکسیناسیون در منطقه مورد مطالعه، به ویژه سگ‌ها، دارد.

در بین گروه‌های سنی، گروه سنی ۲۰ تا ۲۹ سال بیش از سایر گروه‌های سنی در معرض خطر حیوان‌گزیدگی بوده‌اند. گروه سنی زیر ۴ سال کمترین فراوانی را در بین گروه‌های سنی نشان می‌دهد (نمودار ۲). بین تعداد موارد حیوان‌گزیدگی و گروه‌های سنی از نظر آماری تفاوت معناداری وجود داشت ($p<0,001$). به نظر می‌رسد عدم فعالیت افراد پیر و کودکان زیر ۵ سال و حضور بیشتر آنها در منزل و توجه بیشتر و مراقبت از کودکان و سالمندان دلیل فراوانی کم این افراد باشد. همچنین گروه سنی ۲۰ تا ۲۹ سال به دلیل حضور فعال‌تر در محیط بیرون و بروز رفتارهایی مانند حیوان آزاری و بازی با آنها که منجر به تحریک عمدی و متعاقب آن گازگرفتگی می‌شود بیشتر در معرض خطر گزیده شدن قرار داشته‌اند و در نتیجه تعریف و اجرای برنامه های آموزشی برای این گروه سنی، در منطقه مورد مطالعه یکی از الزامات، جهت کاهش خطر این بیماری، ضروری است.

در این مطالعه، مردان ۷۷ درصد و زنان ۲۳ درصد مورد حیوان‌گزیدگی قرار گرفتند که تقریباً با تمام مطالعات دیگر انجام شده که به تفاوت فراوانی موارد حیوان‌گزیدگی در جنس مذکر و مونث پرداخته‌اند، همسو باشد. در مطالعه‌ای که در Bali بر روی ۱۰۴ مورد هاری انسان که در طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ صورت گرفت، ۵۶/۷ درصد این افراد مرد بودند (۱۴). طبق گزارش مرکز مدیریت بیماری‌ها در طی سال‌های ۷۴ تا ۸۹ بیشترین موارد هاری انسانی در جنس مذکر (۸۳ درصد) بوده است (۱۶). مطالعه Rosado در اسپانیا، بروز سگ‌گزیدگی در مردان را ۵۲ درصد و در زنان ۴۸ درصد گزارش کرده است (۱۲). بالاتر بودن بیماری در جنس مذکر را می‌توان با حضور بیشتر در محیط به علت فعالیت‌های شغلی و غیر شغلی و جسارت بیشتر در تماس با حیوانات مرتبط دانست. مردان به دلیل اشتغال به مشاغلی که با حیوانات اهلی و وحشی ارتباط بیشتری دارد و همچنین علاقه‌مندی پسران به بازی و تحریک حیوانات، بیشتر در معرض گزش توسط حیوانات اهلی و وحشی هستند در مطالعه‌ی انجام شده در ایالات متحده امریکا، گزارش موارد حیوان‌گزیدگی در زنان نسبت به مردان بیشتر بود (۱۷). که متفاوت با نتایج مطالعاتی که در ایران انجام شده است، می‌باشد. این مسئله می‌تواند به دلیل تفاوت‌های فرهنگی موجود بین کشورهای مختلف باشد.

از کل موارد حیوان‌گزیدگی در این مطالعه، ۶۴/۳ درصد مربوط به مناطق روستایی و ۳۵/۷ درصد آن مربوط به مناطق شهری بود (نمودار ۳). از نظر آماری بین تعداد موارد حیوان‌گزیدگی و جنسیت تفاوت معنادار وجود داشت (p<۰,۰۰۱). این نتایج با پژوهش بیجاری و همکاران که در بیرجند انجام شد هم‌خوانی دارد. بیجاری و همکاران بیان کردند که ۶۴/۲ درصد موارد حیوان‌گزیدگی ساکن مناطق روستایی و ۳۵/۸ درصد ساکن مناطق شهری می‌باشند (۱۸). در پژوهش انجام شده در Bali نیز اکثریت حیوان‌گزیدگان ساکن مناطق روستایی بودند (۱۴). این یافته با در نظر داشتن تماس بیشتر بین انسان و حیوانات و شرایط اقلیمی، وجود دام و دامداری‌های فراوان و همچنین زمین‌های کشاورزی در مناطق روستایی قابل توجیه می‌باشد.

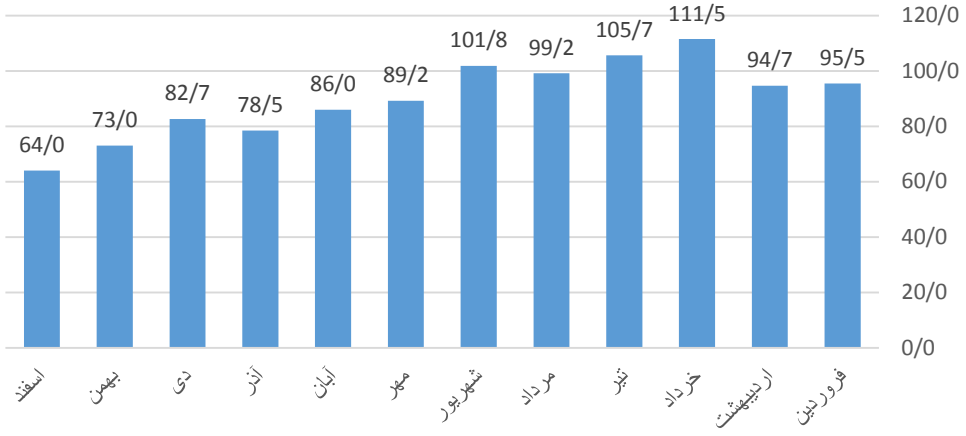
بر اساس نمودار ۴، از نظر شغلی افراد با مشاغل آزاد بیشتر در معرض حیوان‌گزیدگی بوده‌اند و به طور میانگین هر سال ۳۱۹/۳ بار مورد گزش قرار گرفته و بیشترین موارد حیوان‌گزیدگی در بین گروه‌های شغلی را به خود اختصاص داده‌اند. در مطالعه‌ی انجام گرفته توسط عباسی و همکاران در اهر نیز در مناطق شهری، افراد دارای مشاغل آزاد با ۴۰ درصد بیشترین فراوانی را از نظر موارد حیوان‌گزیدگی به خود اختصاص داده بودند (۱۹). تقریباً در تمام مطالعات انجام شده، حیوان‌گزیدگی در طبقه‌های شغلی آزاد و محصل بیشتر از سایر مشاغل بوده است (۲۰، ۲۱). به نظر می‌رسد علت این امر را می‌توان در فعالیت بیشتر افراد دارای مشاغل آزاد در محیط‌هایی با خطر بالای گزیده شدن دانست. این افراد که دارای تجربه‌ی قبلی چگونگی رفتار با حیوانات نیستند، در مقابله با حیوان به آن حمله کرده، یا رفتاری نشان می‌دهند که باعث تحریک و عصبی شدن حیوان می‌گردند که معمولاً به گاز گرفته شدن توسط حیوان ناقل بیماری می‌انجامد.



نمودار۴- میانگین تعداد موارد حیوان‌گزیدگی به تفکیک شغل

بالاترین تعداد گزارش وقوع حیوان‌گزیدگی مربوط به ماه خرداد با ۱۱۱/۵ مورد گزیدگی در سال بوده و فصل تابستان نیز با میانگین ۲۸/۴ درصد بالاترین موارد حیوان‌گزیدگی در بین فصول را دارا بوده است. (نمودار ۵) به نظر می‌رسد که فعالیت مردم در فصول گرم سال در محیط بیرون از خانه و همچنین حضور حیوانات به دلیل استفاده از چراگاه‌ها در فصول گرم سال در بالا بودن حیوان‌گزیدگی در این فصول نقش داشته باشد. همچنین با افزایش گردشگری و مسافرت در

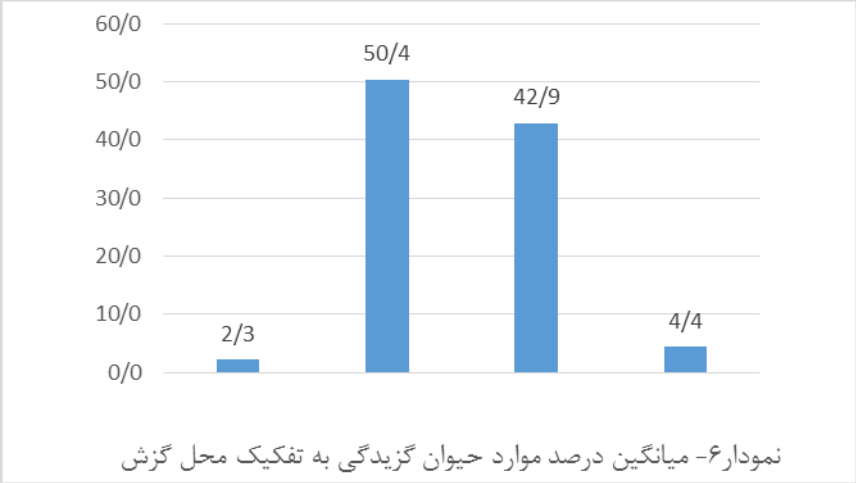
تعطیلات تابستان، علت افزایش حیوان‌گزیدگی در این فصل قابل توجیه است. اسریارون (Sriaroon) و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که حیوان‌گزیدگی دو موج افزایش منطبق با زمان تعطیلات مدارس دارد، که دلیل آن را به بازی‌گوشی و تحریک حیوانات به خصوص سگ در این گروه نسبت داده‌اند که بالا بودن فراوانی موارد حیوان‌گزیدگی در خرداد ماه را توجیه می‌کند (۲۲).



نمودار۵- میانگین تعداد موارد حیوان‌گزیدگی به تفکیک ماه

در مجموع ۵۰/۴ درصد (۶۳۴/۵ مورد) از موارد گزش‌ها در ناحیه دست و ۴۲/۹ درصد (۵۴۰/۳ مورد) هم در ناحیه پا بوده است. تنه ۴/۴ درصد و سر و صورت وگردن نیز ۲/۳ درصد موارد گزش‌ها را شامل می‌شدند.(نمودار ۶). باهنر و همکاران درصد گزش در پا و دست را به ترتیب ۶۹/۷ و ۱۸ درصد گزارش کردند (۲۰). گزش در اندام تحتانی می‌تواند بیشتر به دلیل فرار از حیوان مهاجم باشد اما گزش در اندام فوقانی شاید بیشتر ناشی از تحریک حیوانات و بازی با آنها باشد.

پیشگیری منسجم و کارآمد هاری نیاز به آموزش‌های وسیع توسط سیستم‌های بهداشتی و رسانه‌ها به عموم مردم دارد.. برای کنترل حیوان‌گزیدگی پیشنهاد می‌گردد شبکه‌های دامپزشکی و بهداشت و درمان شهرستان‌ها با انجام اقدامات عملیاتی از قبیل شناسایی مخازن و ناقلین عمده ویروس هاری در هر منطقه، واکسیناسیون دام‌های در معرض خطر، واکسیناسیون سگ‌های گله و صاحبدار و ایمن‌سازی جانوران گوشتخوار وحشی و دیگر حیوانات حیات وحشی با واکسن‌های خوراکی در راستای ریشه‌کنی بیماری هاری اقدام کنند. کنترل جمعیت سگ‌های ولگرد این امر در گام اول باید از طریق دفع بهداشتی زباله‌ها صورت پذیرد. همزمان با اقدامات فوق از واکسن خوراکی به ویژه در نواحی‌ای که تراکم سگ‌های ولگرد وجود دارد، همچون حاشیه شهرها، اطراف کشتارگاه‌ها و اماکن دفع بهداشتی زباله شهر استفاده گردد. همچنین با استفاده از سیاست‌های پیشگیرانه دیگر مانند واکسیناسیون افراد در معرض خطر، واکسیناسیون حیوانات خانگی، امحاء سگ‌های ولگرد، کنترل کانون‌های پرخطر، جلب مشارکت عمومی و مسئولین اداری و سیاسی شهرستان‌ها نه تنها می‌توان از مرگ و میر ناشی از بیماری هاری جلوگیری نمود، بلکه باعث کاهش موارد حیوان گزیدگی و به تبع آن کاهش بار اقتصادی و مالی ناشی از تهیه واکسن و سرم گردید.



نمودار۶- میانگین درصد موارد حیوان گزیدگی به تفکیک محل گزش

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولین و کارکنان محترم مرکز بهداشت شهرستان ساری و واحد پیشگیری و مبارزه با هاری به خاطر همکاری در این مطالعه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1- Keivanfar H, Karimi N. Virology of Veterinary Medicine. Tehran: Tehran University Publication; 1997. p.239-48. [In Persian]

2- Zoghi E. Zoonosis and Common Diseases Seen in Humans and Animals. Tehran: Central Publication of Jahad Daneshgahi; 2004. P.517-44. [In Persian]

3- Sugiyama M, Ito N. Control of Rabies: Epidemiology of Rabies in Asia and Development of New Generation Vaccines for Rabies. Comparat Immunol Microbiol Infect Dis 2007; 30: 273-86.

4- WHO in the Eastern Mediterranean Region, Annual Reports of Regional Director (1950-2000), Alexandria World Health Organization Regional Office for Eastern Mediterranean Region. 2000; pp: 2-3.

5- Tadjbakhsh H, Editors. History of Veterinary Medicine and Medicine of Iran. 1st ed. Lyon: Foundation Merieux; 2003. P.476-94.

6- Fayaz A. Report to WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies 2008.

7- Bahonar AR, Rashidi H, Simani S, Fayaz A, Haghdoost AA, Rezaie Nasab M, *et al.* Relative Frequency of Animal Rabies and Factors affecting it in Kerman Province(1993-2003), Scientific Journal of Public Health and Institute of Public Health Research. 2007; 1: 69-76.

8- Mandell G.L, Bennett J.E, Dolin R. Principales and practice of infectious disease Cherchill Livingstone; 2009: chap 163.

9- Kahn A, Bauche P, Lamoureux J. Child victims of dog bites treated in emergency departments: a prospective survey. European Journal of Pediatrics. 2003; 162(4): 8-254.

10- Gol MR. The epidemiological survey of Rabies in Mazandaran Province in 1993, Thesis of Faculty of Pharmacy, Azad Islamic University 1994. [In Persian]

11- Sentinella Arbeitsg Emeinschaft: The Epidemiology of Bite and Scratch injuries by Vertebrate animals in Switzerland.Eur J Epidemiol 1998 Hul: 14(5):483-490.

12- Rosado B, Garcıa-Belenguer S, Leon M, Palacio J. A Comprehensive Study of dog Bites in Spain, 1995–2004. The Veterinary Journal. 2009; 179: 383–391.

13- Sabouri Ghannad M, Roshanaei G, Rostampour F, Fallahi A. An Epidemiologic Study of Animal Bites in Ilam Province, Iran, Arch Iran Med. 2012; 15(6): 356 - 360[Persian]

14- Susilawathi NM, Darwinata AE, Dwija IB, Budayanti NS, Wirasandhi GA, *et al.* Epidemiological and Clinical Features of Human Rabies Cases in Bali 2008-10, BMC Infectious Diseases, 2012; 12: 81.

15- Sheikholeslami NZ, Rezaeian M, Salem Z. Epidemiology of animal bites in Rafsanjan, Southeast of Islamic Republic of Iran, 2003 –2005, East Mediter Health J, 2009; 15: 455 - 457.

16- Bahonar AR, Rashidi H, Simani S, Fayaz A, Haghdoost AA, Rezaie Nasab M, *et al.* Rabies Prevalence and Frequency of Animal Bites in Kerman Province, 1993-2003. Payesh 2006; 5: 21-27. [In Persian]

17- Freeman AJ, Senn DR, Arendt DM. Seven

hundred seventy- eight bitemarks: analysis by anatomic location, Victim and biter demographics, Type of crime, and Legal Disposition, J Forensic Sci.2005; 50: 1436 – 1443.

18- Bijari B, Sharifzade GR, Abbasi A, Salehi S. Epidemiological Survey of Animal bites in East of Iran .Iran J Clin Infect, 2011; 6(2): 90 - 92.

19- Abbasi M, Batebi A, Garmaroodi MR, Hasnpoor A, Abbasi R. Epidemiological Investigation of Rabies Suspected Animal Bites In Ahar Town, 2009-2010. Taṣvīr-i salāmat. 2015 Jan 1; 3(4):35-43.

20- Bahonar A, Bokaie S, Khodaveirdi K, Nikbakht G, Rad M. A Study of Rabies and the Frequency of Animal Bites in the Province of Ilam, 1994-2004. Iranian Journal of Epidemiology. 2008; 4(1): 47-51.

21- Behnampour N, Charkazi A, Fathi M, Esmaeili A, Shahnazi H, Heshmati H. Epidemiology of animal bite in Aq Qala city. Health System Research Winter. 2011; 6(4):770-777. [Persian]

22- Sriaroon C, Sriaroon P, Daviratanasilpa S, Khawplod P, Wilde H. Retrospective: Animal attacks and rabies exposures in Thai children. Travel Medicine and Infectious Disease. 2006; 4: 270-274.

23- Fayaz, A, Simani, S, Janani, A, Farahtaj F, Esfandyari, B, Eslami, N, *et al.* Epidemiological Survey of Rabies in Mazandaran Province during 1996-2006. JBUMS. 2009; 11 (5):70-75.

Some epidemiological features of human rabies referred to the health public centers of Sari, Iran, during 2012-2017

Seyed Mohammad Hoseini[1], Mohammad Asadi Iraee[2], Mohammad Mehdi Yazdani Rostam[3*], Mohammad Javad Mashayekhnia[3], Mohammad Reza Roodaki Sarvandani[3], Amin Aghajani[4]

1- Assistant Professor of Pathological Department, Islamic Azad University of Babol, Babol, Iran.
2- Doctor of Veterinary Medicine and Member of the Young Researchers and Elite Club.
3- Member of the Young Researchers and Elite Club and DVM Student, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.
4- Medical Student, Gorgan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Receive: April 12, 2019; Revise: May 6, 2019; Accept: May 26, 2019

Summary

Rabies is one of the most endemic zoonotic diseases which is very important due to its ability to be transmitted from animals to the mammals. The infected animal can transmit the disease to human beings or other animals through biting . This is a retrospective study intended to survey the document of 6560 animal bites referred to the health center of Sari city during 5 years from 2012 to 2017, for factors such as age, sex, occupation, place of residence of selected individuals, type of the biting animal, time of bite and type of bitten organ were studied. Collected data was analyzed by Excel 2010 and SPSS 22 software, using descriptive and inferential statistics. *P-value was considered < 0.05 for statistical significant.* From a total of 6560 cases of animal bites, an average of 1093±87/52 animal bites happened annually in study area. Dogs, with a rate of 81.1%, were the most biting animals. Men with a rate of 77%, the age group of 20 to 29 with the average of 281.1 bites per year, self-employed individuals with 319.3 bites per year were the most referred cases. Rural areas with 64.3%, summer with 28.4% and the month of June with an average of 111.5 bites per year had the highest incidence of bites. Hands and feet were the most bitten body parts with 50.4% and 42.9% of bites, respectively. Special attention should be paid to eliminating the reservoirs of the disease, as well as increasing the awareness of the general population about the disease and its types of transmission.

Key words: *Animal bite, Epidemiology, Rabies, Sari*

بررسی تأثیر مدت زمان نگهداری و برخی خصوصیات شیمیایی ماست بر ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک

کوشا علی‌محمدی[۱]، ولی‌اله 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: ۱۱ اسفند ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۸ فروردین ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۱۳ شهریور ۱۳۹۸

چکیده

عوامل مختلفی بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک مؤثر می‌باشند. در این تحقیق، تأثیر برخی از ویژگی‌های شیمیایی ماست و مدت زمان نگهداری بر ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک در ۳۰ نمونه ماست پروبیوتیکی نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌ها در فواصل زمانی ۷ روز، از نظر باکتری‌های پروبیوتیک زنده، کلی‌فرم‌ها، میزان pH و اسیدیته مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای شمارش باکتری‌های پروبیوتیک از محیط کشت MRS بایل آگار و با روش کشت مخلوط استفاده گردید. شمارش کلی‌فرم‌ها با استفاده از محیط‌های کشت VRBA و BGB انجام شد. برای اندازه‌گیری اسیدیته از روش تیتراسیون با سود و اندازه‌گیری pH از pH متر دیجیتال استفاده شد. نتایج نشان داد که در همه نمونه‌ها، شمارش باکتری‌های پروبیوتیک و میزان اسیدیته به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری داشت. میزان pH نیز در مدت نگهداری ماست کاهش نشان داد. ارتباط معنی‌داری بین شمارش باکتری‌های پروبیوتیک و میزان اسیدیته و pH مشاهده گردید. افزایش مختصری در تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در روزهای اول اتفاق افتاد، اما در روزهای آخر، کاهش شدید این میزان اتفاق افتاد. تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در ۴۶/۶۷ درصد از نمونه‌ها کمتر از حداقل مورد نیاز (10^6 cfu/g) در روز ۲۸ نگهداری بود. این مطالعه نشان داد زمان مناسب برای مصرف ماست پروبیوتیک تا ۲۱ روز پس از تولید می‌باشد. به علاوه کاهش بقای باکتری‌های پروبیوتیک به میزان کاهش pH و افزایش اسیدیته وابسته می‌باشد.

واژگان کلیدی: *اسیدیته، باکتری‌های پروبیوتیک، ماست، PH*

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

مقدمه

در دنیای کنونی، تهیه غذاهایی با ارزش تغذیه‌ای بالا و خواص مفید برای سلامتی بدن، مخصوصاً غذاهایی که از ابتلاء به بیماری‌ها جلوگیری کنند و یا سلامتی را حفظ نمایند، از اهمیت ویژه‌ای برای مصرف‌کنندگان برخوردار است. لذا تهیه و تولید غذاهایی با این ویژگی‌ها، یکی از دلایل تحقیقات وسیع محققین صنایع مواد غذایی در این خصوص می‌باشد (۱). در این میان، فرآورده‌های لبنی تخمیری به دلیل دارا بودن باکتری‌های پروبیوتیک و تأثیرات سودمندی که بر سلامت مردم دارند حائز اهمیت می‌باشند و در بین فرآورده‌های لبنی تخمیری نیز ماست یکی از مهم‌ترین غذاها از این منظر بوده و در اروپا، بیشترین میزان مصرف فراورده‌های پروبیوتیکی را ماست پروبیوتیک به خود اختصاص داده است (۲). ماست به عنوان یک فراورده لبنی تخمیری به دلیل اسیدیته بالا و PH پایین، محیط مناسبی برای حفظ و انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن نمی‌باشد، ولی همه‌گیر بودن مصرف آن، این فراورده را به مهم‌ترین و مرسوم‌ترین فراورده لبنی پروبیوتیکی تبدیل نموده است. این فراورده با داشتن ارزش غذایی بالا، میکروارگانیسم‌های مفید و پروبیوتیک‌ها و ترکیبات فعال زیستی به‌طور وسیعی در جهان مصرف می‌شود (۳).

پروبیوتیک‌ها گروه ویژه‌ای از باکتری‌ها و مخمرهای زنده و مفید می‌باشند و نقش بسیار مهمی در کاهش بیماری‌های انسانی مخصوصاً بیماری‌های دستگاه گوارش که ناشی از عدم کفایت فلور میکروبی روده می‌باشد، دارند (۴). میکروارگانیسم‌هایی که اغلب به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند متعلق به گروه هتروژن باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک می‌باشند. این باکتری‌ها به صورت وسیع در فراورده‌های لبنی و غیر لبنی استفاده می‌شوند و البته فراورده‌های لبنی، بستر و حامل خوبی برای تکثیر و رساندن میکرواگانیسم‌های پروبیوتیک به مصرف‌کنندگان می‌باشند. از میان باکتری‌های پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس‌ها* و *بیفیدوباکترها* به شکل وسیعی در تولید فراورده‌های غذایی پروبیوتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. باکتری‌های پروبیوتیک با تأثیر مثبتی که بر روی فلور میکروبی مفید روده دارند، باعث جلوگیری از رشد باکتری‌های مضر شده و باعث افزایش پایداری و مقاومت در برابر عفونت‌ها و سرایت بیماری‌ها می‌شوند. همچنین در افزایش هضم و جذب غذاها، در کاهش کلسترول، در درمان بیماری عدم تحمل لاکتوز، تقویت سیستم ایمنی بدن و خاصیت ضد سرطان و جهش‌زایی نقش مهمی دارند (۵). گزارش‌هایی نیز در خصوص تأثیرات مفید پروبیوتیک‌ها بر پوست انسان (۶) و علیه سرماخوردگی و آنفلوانزا وجود دارد (۷).

میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول مدت نگهداری محصول برای ایجاد این اثرات مثبت، مهم‌ترین چالش در این دسته از فرآورده‌ها است (۸). اگر چه هنوز توافق کلی درخصوص میزان حضور باکتری‌های پروبیوتیک در ماده غذایی وجود ندارد، ولی به طور کلی پیشنهاد می‌شود که حداقل 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر از محصول باید حضور داشته باشد (۱۰،۹). پارامترهای مختلف فیزیکوشیمیایی ماست و عوامل رشد بیرونی می‌توانند در طی نگهداری بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک تأثیرگذار باشند از جمله این پارامترها می‌توان اسیدیته بالا، pH پایین، میزان باکتری‌های ماست، مدت زمان و دمای نگهداری، وجود اکسیژن، زمان گرمخانه‌گذاری و میزان آغازگر اولیه را نام برد (۱۲-۱۰)

با توجه به این که هدف از مصرف ماست پروبیوتیکی در کنار ارزش تغذیه‌ای آن، رساندن

باکتری‌های پروبیوتیک به دستگاه گوارش می‌باشد، حضور حداقل تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در فراورده لازم می‌باشد. به منظور بررسی این ویژگی، تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* که به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک غالب در تهیه و تولید ماست پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین میزان تأثیر مدت زمان نگهداری و برخی از عوامل داخلی رشد (اسیدیته و pH) بر میزان این جمعیت میکروبی مورد تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: برای انجام این تحقیق مقطعی، ۳۰ نمونه ماست پروبیوتیک مربوط به پنج شرکت به صورت تصادفی در بهار ۱۳۹۷ و در روز توزیع در بازار که اولین زمان دسترسی مصرف‌کننده به فراورده می‌باشد، خریداری و بلافاصله در کنار یخ به آزماشگاه منتقل گردید. نمونه‌های مورد آزمون نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ از نظر شمارش باکتری‌های پروبیوتیک زنده، شمارش *کلی‌فرم‌ها*، میزان pH و اسیدیته مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ابتدا ۱۰ گرم نمونهٔ یکنواخت و همگن شده از هر کدام از نمونه‌های تهیه شده، در ۹۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده رینگر حل شده و رقت 10^{-1} ایجاد شد. سپس رقت‌های بعدی تا رقت 10^{-8} تهیه گردید.

آزمون های میکروبی: به منظور شمارش باکتری‌های پروبیوتیک در حضور باکتری‌های سنتی ماست از محیط کشت MRS بایل آگار (Man Rogosa and Sharpe agar) (MRS agar: Merck, and Bile: Sigma) و با روش کشت مخلوط و به صورت دوبل از ۴ رقت انتهایی استفاده گردید. بایل (صفرا) از رشد باکتری‌های سنتی ماست جلوگیری کرده و کلنی‌های رشد یافته نمایانگر گونه مورد نظر است. پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه قرار گرفتند (۱۳). شمارش *کلی‌فرم‌ها* با استفاده از محیط‌های کشت Violet Red Bile (VRBA) Dextrose Agar و Brilliant Green Broth (BGB) (Merck) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (۱۴).

آزمون های شیمیایی: برای اندازه‌گیری اسیدیته از روش تیتراسیون با سود استفاده شد که بر پایه میزان حضور اسیدلاکتیک می‌باشد. برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر نمونه در حضور فنل فتالئین با سود یک دهم نرمال تیتر شد. برای اندازه‌گیری pH از pH متر دیجیتال (مدل Mettler Toledo، ساخت سوئیس) استفاده شد. کالیبراسیون pH متر دیجیتال با استفاده از محلول‌های بافر ساخت شرکت مرک در pH ۴/۰ و ۷/۰ انجام شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ برای آنالیز یافته‌ها استفاده شد. از آزمون آماری آنوای یک طرفه برای تعیین اختلاف میان میانگین‌های به دست آمده از ۵ گروه آزمون استفاده و آزمون همبستگی پیرسون به منظور بررسی وجود ارتباط بین متغیرها به کار رفت.

نتایج

در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی آلودگی به *کلی‌فرم‌ها* در روز اول بررسی، مشاهده نگردید، لذا در روزهای بعدی آزمون، شمارش *کلی‌فرم‌ها* از دستور کار خارج گردید. روند تغییرات pH در نمونه‌های مختلف ماست پروبیوتیک شرکت‌های مورد بررسی طی دوره نگهداری در جدول شماره ۱ آمده است. با توجه به نتایج به دست آمده، کمترین مقدار pH در روز اول در میان نمونه‌های مورد آزمون، میزان ۴/۳۶ و بیشترین میزان آن ۴/۵۹ واحد بود. در روز اول، مقادیر pH در بین نمونه‌های برخی از شرکت‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری داشت

(p <۰/۰۵). میزان pH در همه نمونه‌ها طی ۲۸ روز نگهداری ماست کاهش بسیار معنی‌داری نشان داد (p <۰/۰۱). میانگین دامنه کاهش pH در مدت زمان نگهداری ماست شرکت‌های مختلف، از ۰/۲۷ تا ۰/۳۵ واحد مشاهده شد و در مجموع ۰/۳۱ واحد، میانگین کاهش pH در مدت ۲۸ روز، ثبت گردید.

جدول شماره ۱- مقادیر pH در نمونه‌های ماست پروبیوتیک مربوط به پنج شرکت نگهداری شده به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس

نمونه ها	روزهای نگهداری				
	۱	۷	۱۴	۲۱	۲۸
شرکت شماره۱	۴/۴۲± ۰/۰۱۲^{b}	۴/۳۷± ۰/۰۱۳^{c}	۴/۳۲± ۰/۰۱۳^{d}	۴/۲۴± ۰/۰۱۲^{e}	۴/۱۴± ۰/۰۱۱^{f}
شرکت شماره۲	۴/۵۲± ۰/۰۳۷^{a}	۴/۴۶± ۰/۰۳۸^{b}	۴/۳۸± ۰/۰۳۶^{c}	۴/۳۰± ۰/۰۳۲^{d}	۴/۱۷± ۰/۰۲۹^{f}
شرکت شماره۳	۴/۴۵± ۰/۰۳۶^{b}	۴/۴۰± ۰/۰۳۵^{c}	۴/۳۵± ۰/۰۲۸^{d}	۴/۲۹± ۰/۰۲۶^{d}	۴/۱۷± ۰/۰۲۸^{f}
شرکت شماره۴	۴/۴۲± ۰/۰۲۲^{b}	۴/۳۷± ۰/۰۲۵^{c}	۴/۳۲± ۰/۰۲۳^{d}	۴/۲۶± ۰/۰۲۶^{e}	۴/۱۴± ۰/۰۲۷^{f}
شرکت شماره۵	۴/۵۰± ۰/۰۳۰^{a}	۴/۴۳± ۰/۰۲۹^{b}	۴/۳۶± ۰/۰۲۴^{c}	۴/۳۱± ۰/۰۲۲^{d}	۴/۱۵± ۰/۰۱۱^{f}
مجموع	۴/۴۶± ۰/۰۱۵^{a}	۴/۴۰± ۰/۰۱۴^{b}	۴/۳۵± ۰/۰۱۱^{c}	۴/۲۸± ۰/۰۱۱^{d}	۴/۱۵± ۰/۰۱۰^{e}

*حروف لاتین متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها می‌باشد (p <۰/۰۵)

همان‌گونه که جدول شماره دو نشان می‌دهد، میزان اسیدیته با گذشت زمان و در طی نگهداری نمونه‌ها افزایش یافت و از نظر آماری نیز این افزایش بسیار معنی‌دار بود (p=۰/۰۰). در روز اول همانند pH، مقادیر اسیدیته در بین نمونه‌های برخی از شرکت‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری داشت (p <۰/۰۵). میانگین دامنه افزایش اسیدیته در شرکت‌های مختلف و در مدت زمان نگهداری ماست از ۰/۲۶ تا ۰/۳۱ درصد برحسب اسیدلاکتیک مشاهده شد و در مجموع ۰/۲۷ درصد برحسب اسیدلاکتیک ، میانگین افزایش اسیدیته در مدت ۲۸ روز، ثبت گردید. بنابراین مدت زمان نگهداری ماست هم بر تغییرات pH و هم اسیدیته تأثیر بسیار معنی‌داری دارد (p=۰/۰۰).

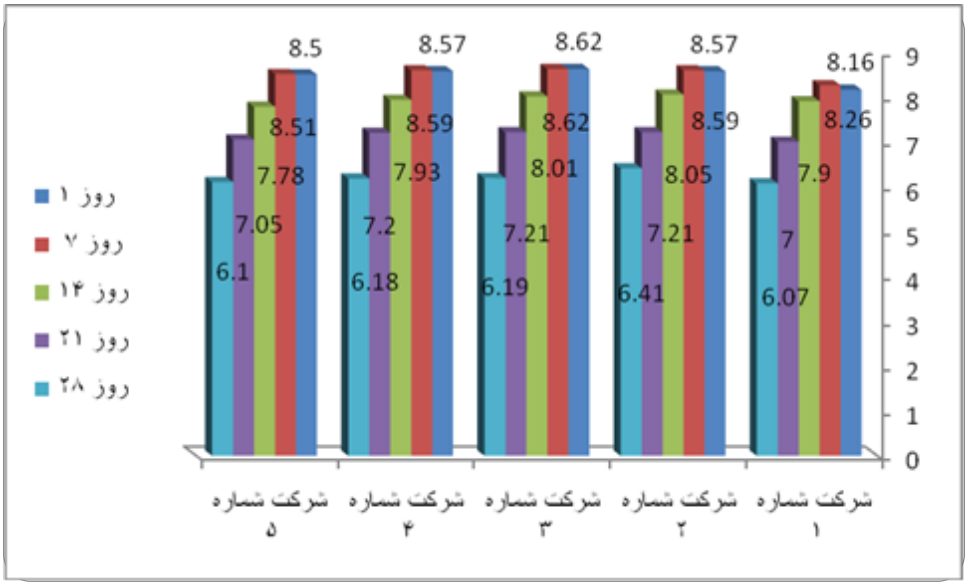
جدول شماره ۲- مقادیر اسیدیته (درصد برحسب اسیدلاکتیک) در نمونه‌های ماست پروبیوتیک مربوط به ۵ شرکت، نگهداری شده به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس

نمونه ها	روزهای نگهداری				
	۱	۷	۱۴	۲۱	۲۸
شرکت شماره۱	۰/۹۹± ۰/۰۲۸^{b}	۱/۰۷± ۰/۰۱۸^{c}	۱/۱۳± ۰/۰۱۳^{d}	۱/۱۹± ۰/۰۱۴^{e}	۱/۲۶± ۰/۰۱۶^{f}
شرکت شماره۲	۰/۸۶± ۰/۰۴۶^{a}	۰/۹۶± ۰/۰۴۸^{b}	۱/۰۳± ۰/۰۳۶^{c}	۱/۰۷± ۰/۰۴۹^{c}	۱/۱۴± ۰/۰۳۶^{d}
شرکت شماره۳	۰/۹۱± ۰/۰۵۹ ^{a}	۰/۹۷± ۰/۰۵۸^{b}	۱/۰۱± ۰/۰۶۵^{b}	۱/۰۷± ۰/۰۷۲^{c}	۱/۱۷± ۰/۰۵۵^{e}
شرکت شماره۴	۰/۹۸± ۰/۰۳۸^{b}	۱/۰۴± ۰/۰۳۰^{c}	۱/۱۱± ۰/۰۳۴^{d}	۱/۱۷± ۰/۰۲۶^{e}	۱/۲۵± ۰/۰۳۲^{f}
شرکت شماره۵	۰/۹۴± ۰/۰۳۸^{a}	۱/۰۵± ۰/ ۰۱۶ ^{c}	۱/۱۱± ۰/۰۰۵^{d}	۱/۱۵± ۰/۰۱۳^{d}	۱/۲۵± ۰/۰۱۱^{f}
مجموع	۰/۹۴± ۰/۰۱۹^{a}	۱/۰۲± ۰/۰۱۸^{b}	۱/۰۸± ۰/۰۱۷^{c}	۱/۱۳± ۰/۰۱۹^{d}	۱/۲۱± ۰/۰۱۶^{e}

*حروف لاتین متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها می‌باشد (p <۰/۰۵)

حداقل تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه‌های مورد آزمون در روز اول ۸/۰۴ logcfu/g

شمارش شد. براساس نتایج آماری ارائه شده در نمودارهای شماره ۳ و ۴ ، اختلاف آماری معنی‌داری (p=۰/۰۰) در میزان شمارش باکتری‌های پروبیوتیک موجود در نمونه‌های برخی از شرکت‌ها در روز اول مشاهده گردید. نه تنها کاهشی در میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک در روز هفتم نسبت به روز اول اتفاق نیفتاد، بلکه میانگین این شاخص از ۸/۴۸ به ۸/۵۱ افزایش یافت ولی این میزان افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۰۷). اما از روز هفتم نگهداری نمونه‌های ماست، کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک اتفاق افتاد و این میزان به logcfu/g ۷/۹۳ در روز چهاردهم و logcfu/g ۷/۱۳ در روز بیست و یکم کاهش یافت. در روز بیست و هشتم ۴۶/۶۷ درصد از نمونه‌ها، حاوی باکتری‌های پروبیوتیک کمتر از cfu/g ۱۰^۶ بودند. فاکتور زمان نگهداری ماست، همانند pH و اسیدیته، بر روی میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک از نظر آماری اثر معنی‌دار داشت (p=۰/۰۰)

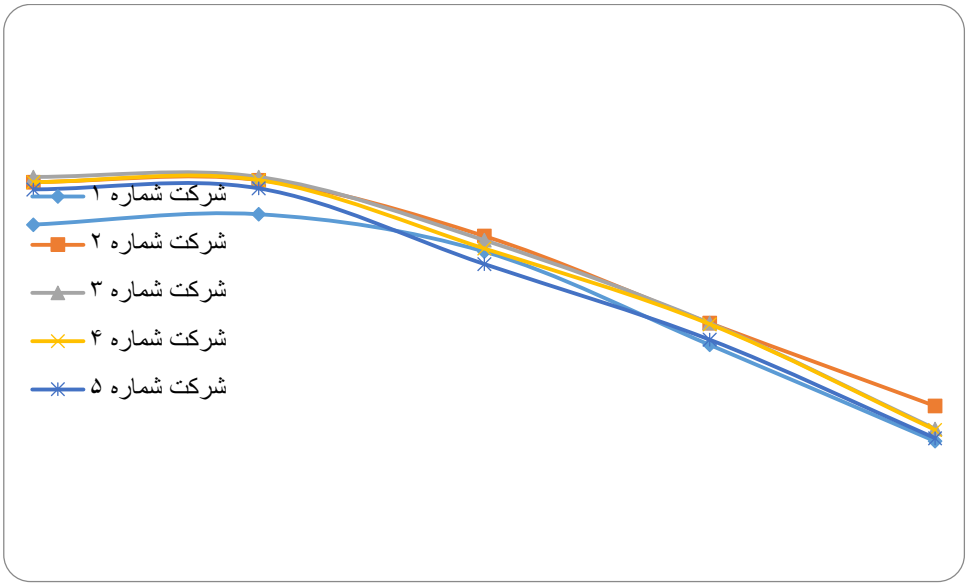


شکل شماره ۱- تعداد باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu.ml^{-1}) شمارش‌شده در نمونه‌های ماست پروبیوتیک ۵ شرکت مورد بررسی در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس

بحث و نتیجه‌گیری

براساس استاندارد ملی ایران ، میزان pH ماست نباید از ۴/۶ بالاتر و مقدار اسیدلاکتیک آزاد موجود در ماست نباید از ۰/۷ درصد کمتر باشد (۱۶). البته PH مناسب و بهینه رشد باکتری‌های پروبیوتیک مورد آزمون ۶/۵ تا ۷ می‌باشد و در برابر اسید و اکسیژن مولکولی حساس می باشند (۳). هر دو ویژگی یاد شده (اسیدیته و pH) در مغایرت با شرایط بهینه رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد؛ ولی در این میزان از pH و اسیدیته، از فساد فرآورده جلوگیری می‌شود. اندازه‌گیری این متغیرها در روز اول آزمون، نشان داد در همه نمونه‌های تحقیق حاضر، مقادیر pH از میزان یاد شده پایین‌تر بوده و میزان اسیدیته نیز براساس استاندارد موجود می‌باشد و لذا احتمال بروز فساد در آنها وجود ندارد. در تمامی نمونه‌های مورد آزمون هیچ *کلی‌فرمی* یافت نشد که دلالت بر همین موضوع دارد. به طور طبیعی فعالیت *کلی فرم ها* درpH کمتر از ۵/۲ متوقف می‌شود و لذا فعالیت این باکتری‌ها، فقط در مراحل آغازی تخمیر و قبل از اسیدی شدن محیط

امکان‌پذیر است (۱۷).



شکل شماره ۲- تغییرات تعداد باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu.ml^{-1}) شمارش‌شده در نمونه‌های ماست پروبیوتیک ۵ شرکت مورد بررسی در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس

معمولاً پس از کاهش و رسیدن pH ماست به حدود ۴/۵ واحد (pH نهایی) گرم‌خانه‌گذاری ماست متوقف شده و محصول وارد سردخانه می‌شود. در روز اول آزمون در برخی نمونه‌های مورد بررسی (نمونه‌های مربوط به شرکت‌های A و D) میزان pH پایین‌تر از سایر نمونه‌ها و به میزان ۴/۴۲ واحد بود که برای روز اول، pH مطلوبی به حساب نمی‌آید و می‌تواند ناشی از عدم حفظ زنجیره سرما در نگهداری و پخش فراورده باشد. مشخص شده که نگهداری ماست تازه تولید شده در دمای یخچالی (۵ درجه سلسیوس) به مدت ۲۴ ساعت تغییر معنی‌داری در میزان pH و اسیدیته ایجاد نمی‌کند و این مقادیر به ترتیب در حدود ۴/۴۷ واحد و ۱۱۰ درجه دورنیک اندازه‌گیری شده است، ولی استفاده از دمای ۲۰ درجه سلسیوس در مدت ۲۴ ساعت نگهداری، باعث کاهش چشمگیر pH و افت آن به ۴/۲۵ و افزایش اسیدیته به عدد ۱۲۰/۲ درجه دورنیک می‌شود (۱۸).

از طرف مقابل، پایین بودن بیش از حد pH و بالا بودن اسیدیته اثر سوء بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک دارد. در طول مدت نگهداری نمونه‌های ماست، کاهش و افزایش معنی‌داری ($p = ۰/۰۰$) به ترتیب در میزان pH و اسیدیته اتفاق افتاد. عنوان گردیده باکتری‌های استارتر و پروبیوتیک ماست قادر به فعالیت بطئی در شرایط یخچالی بوده و با تولید اسید از لاکتوز موجود در ماست، باعث کاهش pH درحین نگهداری ماست می‌شوند. تولید اسیداستیک و اسیدلاکتیک به ترتیب توسط *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست‌های پروبیوتیکی موجب کاهش pH فراورده می‌شود که نوع و میزان اسید تولید شده، بر رشد گونه‌های مختلف باکتری‌های پروبیوتیک اثر می‌گذارد (۱۲). افزایش میزان اسید در طول مدت زمان ذخیره‌سازی و نگهداری فراورده به دلیل بیش اسیدی‌سازی (post acidification) در اثر فعالیت آنزیم *بتا گالاکتوزیداز* در دماهای یخچالی می‌باشد. در چنین شرایطی احتمال افت pH به مقادیر کمتر از ۴/۲ وجود دارد که منجر به جدا شدن سرم ماست

و آب اندازی می‌شود. آب اندازی در ماست به دلیل تغییر ساختار شبکه پروتئینی رخ می‌دهد که باعث کاهش قدرت اتصال پروتئین‌ها با آب می‌شود (۸).

در تمامی نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق میزان PH بیش از ۴ واحد در روز ۲۸ مشاهده گردید. پایین‌ترین میانگین میزان pH با ۴/۱۵ واحد مربوط به روز ۲۸ نگهداری نمونه‌ها بود. همگام با کاهش pH، افزایش اسیدیته نیز در طول مدت نگهداری اتفاق افتاد به نحوی که تا روزهای ۲۱ و ۲۸ ، این متغیر به ترتیب به میزان ۰/۱۹ و ۰/۲۷ درصد برحسب اسیدلاکتیک افزایش یافت. در تحقیق مشابهی میزان کاهش pH در روز ۲۱ نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نسبت به روز اول به طور میانگین در تیمارهای مختلف ۰/۳۵ واحد (۱۹) و در تحقیق دیگری این میزان و اسیدیته به ترتیب ۰/۱۷ تا ۰/۵۰ واحد و ۰/۰۹ تا ۰/۲۹ درصد در ۳۵ روز نگهداری در دمای ۵ درجه سلسیوس ثبت گردید (۲۰). لرنس و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند میزان pH در طی نگهداری شیر تخمیر شده در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس طی یک مطالعه ۲۱ روزه از ۴/۳ -۳/۴۵به ۴/۱-۳/۲ کاهش می‌یابد و به همراه این کاهش، میزان بقای باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* نیز کاهش می یابد (۲۱). افت pH و همچنین سرعت کاهش آن، بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک مؤثر می‌باشند. سرعت بالای تشکیل اسید در فراورده تخمیری، می‌تواند منجر به کاهش pH در داخل سلول باکتری پروبیوتیکی شده و به طور معنی‌داری بقای آن را کاهش دهد (۲۲). کاهش pH و افزایش اسیدیته موجب اکسیداسیون ترکیبات سلولی شده و در نهایت مرگ سلول باکتری را سبب می‌شود (۲۳). اثرات ضد میکروبی پراکسید هیدروژن تولید شده توسط برخی از *لاکتوباسیل‌ها* و تأثیر آن بر بقای پروبیوتیک‌ها به خوبی شناسایی شده است (۲۴).

با کاهش میزان pH و افزایش اسیدیته، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک کاهش یافت. اگر چه در هفت روز اول نگهداری نمونه‌ها، علیرغم کاهش میزان pH از میانگین ۴/۴۶ واحد در روز اول به میانگین ۴/۴۰ واحد در روز هفتم، افزایش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک با میانگین ۰/۰۳ logcfu/g اتفاق افتاد که می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که شرایط برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک تا pH حدود ۴/۴ مناسب می‌باشد، ولی در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ که میزان pH به ترتیب و به طور میانگین۰/۱۱، ۰/۱۸ و ۰/۳۱ واحد نسبت به روز اول کاهش داشت، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک به ترتیب ۰/۵۵، ۱/۳۵ و ۲/۲۹ logcfu/g کاهش داشتند. نتایج این مطالعه با یافته‌های ساهادوا و همکارانش (۲۰۱۱) مطابقت دارد (۱۰). در تحقیق شریفی و همکاران (۱۳۹۵) مشخص گردید بیشترین و کمترین قابلیت زیستی به ترتیب در روزهای هفت و بیست و یک می‌باشد و با افزایش زمان انبارداری، ضمن کاهش pH و افزایش اسیدیته، قابلیت زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* کمتر می‌شود. با این وجود میزان این باکتری پروبیوتیک در همه نمونه‌ها در محدوده استاندارد بوده و هیچ‌گاه از ۲۰ میلیون در هر گرم پایین‌تر نیامد (۲۵) .آلبرت و همکاران (۱۹۹۲) نیز گزارش نمودند تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در ماست تازه بین ۷ تا ۹ logcfu/g بوده و در اثر نگهداری در یخچال، این میزان ابتدا افزایش مختصری داشته و سپس کاهش می‌یابد (۲۶). در مطالعه مشابه دیگری تعداد باکتری‌های پروبیوتیک ماست به میزان ۳ لوگ در هر گرم در مدت ۳۵ روز نگهداری کاهش یافت (۲۷). در گزارش مؤیدنیا و همکاران (۲۰۰۹) آمده است که تنها ۵۰ درصد از نمونه‌های ماست مورد بررسی بعد از ۳۱ روز

نگهداری، حاوی حداقل 10^6 cfu/g باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد (۲۸). در مطالعه‌ای حداکثر میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک در دماهای یخچالی ۲۰ روز اعلام گردیده است (۲۹).

نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش باکتری‌های پروبیوتیک تا روز ۱۴ نگهداری فقط ۰/۵۵ logcfu/g می‌باشد؛ درحالی‌که این کاهش در روز ۲۱ نگهداری ۱/۳۵ logcfu/g می‌باشد. علیرغم این میزان کاهش، در هیچ یک از نمونه‌ها این میزان به کمتر از 10^6 در هر گرم (حداقل حضور باکتری‌های پروبیوتیک مطابق استاندارد) نرسید. اما در روز ۲۸ نگهداری، ۴۶/۶۷ درصد از نمونه‌ها، حاوی باکتری‌های پروبیوتیک کمتر از 10^6 cfu/g بودند. با توجه به تعداد باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین میزان اسیدیته و pH، زمان مناسب برای مصرف ماست با تعداد باکتری پروبیوتیک بیشتر، تا بیست و یک روز پس از تولید و نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس می‌باشد.

سپاسگزاری

ضمن تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی با شماره ثبت ۱۷۱۸ می‌باشد.

References

1- Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. J Microbiol. 2004; 42(4): 315-318.

2- Lourens-Hattingh A, Viljoen CB. Yoghurt as a probiotic carrier food. Int Dairy J. 2001; 11: 1–17.

3- Wysong RL. Beneficial lactobacilli in food and feed. J food Prot. 2001; **4**: 487–51.

4- Tamime AY, Saarela M, Korslund AV, Shah NP. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: Tamime, A.Y., editor. Probiotic Dairy Products. UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005; pp: 39–72.

5- Agrawal R. Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. Food Biotechnol. 2009; 19: 227–246.

6- Krutman J. Pre- and probiotics for human skin. J Dermatol Sci. 2009; 54: 1–5

7- Leyer GJ, Li S, Mubshaer ME, Reifer C, Ouwehan AC. Probiotics effects on cold and influenza-like incidence and duration in children. Pediatrics. 2009; 124: 172–178.

8- Kailasapathy K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT Food SciTechnol. 2006; 39(10): 1221-1227.

9- Haris A, Ramasamy K, Tommy J, Chin S, Yin W. Effect of heat, pH and coating process with stearicacid using a fluidized bed granulator on viability of probiotic *Lactobacillus reuteri* C 10. Afric J Biotech. 2012; 11(26): 6857-65.

10- Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. Int Food Res J. 2011; 18(4): 1515-22.

11- Bari M, Ashrafi R, Alizadeh M, Rofehgarineghad L. Effects of different of yogurt starter or probiotic bacteria, storage time & different concentration of cysteine on the microflora characteristics of Bio–Yogurt. Res J Biol Sci. 2009; **4** (2): 137-142.

12- Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic P, VasilgevicT, Shah NP. Survival & activity of selected probiotic organism in set-type yoghurt during cold storage. Int Dairy J. 2007; 17(6): 577-665.

13- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 11325. Probiotic yogurt-Specifications and test methods. 1st. Edition.

14-Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 9263. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms –Colony-count technique. 1st. Edition.

15- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 2852. Milk and milk products- Determination of titrable acidity and value pH- test method.1st. Edition.

16- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 695. Yogurt – Specifications and test methods. 4th. Revision.

17- Gardini F, Martuscelli M, CarmelaCaruso F, Crudele MA, Favati F, Guerzoni ME, Suzzi G. Effects of PH and NaCl concentration on the growth kinetic,proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. Int J food Microbiol. 2001; 64: 105-117.

18- Ferdousi R, Rouhi M, Mohammadi R, Mortazavian AM, Khosravi-Darani K., Homayouni Rad A. Evaluation of Probiotic Survivability in Yogurt Exposed to Cold Chain Interruption. Iran J Pharm Res. 2013; 12: 139–144.

19- Nikbakhet HR, Fadaei Noghani V, Khosravi-darani K. Investigation on the viability of selected probiotics in low fat set yogurt by homogenized milk at various temperatures. Innov Food Technol. 2014; 1: 4.3-11.

20- Mani_lopez E, Palou E, López-Malo A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. J Dairy Sci. 2014; 97(5): 2578-90.

21- Lourens-Hattngh A, Viljoen BC. Survival of probiotic bacteria in South African commercial bio-yogurt. South Afr J Sci. 2002; 98(5-6): 298-300.

22- Mortazavian AM, Khosrokhavar R, Rastgar H, Mortazaei GR. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of Doogh (Iranian fermented milk drink). Ital J Food Sci. 2010; 1: 98-104.

23- Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food Cont. 2009; 20(6): 598-602.

24- Martin F, Cachon R, Pernin K, Gervais P, Guichard E, Cayot N. Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. J Dairy Sci. 2011; 94(2): 614-622.

25- Sharifi Soltani M, Karim G, Pourahmad A. Possibility of the production of probiotic chocolate yogurt. J Food Hygi. 2016; 6(22): 51-63. [In Persian].

26- Ulberth F, Kneifel W. Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. II:Classification of starter cultures by means of cluster analysis. Milchwissenschaft. 1992; 47(7): 432-4.

27- Shin HS, Lee JH, Pestka JJ, Ustunol Z. Growth and Viability of Commercial *Bifidobacterium spp* in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. J Food Sci. 2000; 65(5): 884–7.

28- Moayednia N, Ehsani MR, Emamdjomeh Z, Mazhari AF. Effect of refrigerated storage time on the viability of probiotic bacteria in fermented probiotic milk drinks. Int J Dairy Technol. 2009; 62(2): 204-8.

29- Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Combined effects of temperature-related variables on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. Aust J Dairy Technol. 2006; 61(3): 248-52.

Effect of storage time and some chemical properties of probiotic yogurts on probiotic viability

Koosha Alimohammadi[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: March 2, 2019; Revise: April 17, 2019; Accept: September 4, 2019

Summary

Various factors affect viability of probiotic bacteria. In this investigation, the effect of some chemical specifications and the storage time on probiotic bacterial count in 30 samples of probiotic yogurts stored at 4ºC was studied. The samples were evaluated in 7 days interval for viable cell count, *coli* count, pH and acidity during refrigerated storage. The pour plate method of Culture with MRS-bile agar was used for enumeration of probiotic bacteria. Total *coliform* was enumerated in VRBA and BGB culture. Acidity of samples was determined with titration method and the values of pH were measured by a digital pH meter. The obtained results showed that the number of probiotic bacteria and titrable acidity in all of the samples were significantly decreased and increased, respectively. Also, the level of pH was decreased during the storage time. There were significant relationship between probiotic bacterial count and the amount of pH and acidity. A brief increase of probiotic bacterial counts was measured during the initial days, but there was sever declining during the final days of storage. 46.67% of examined samples had probiotic bacterial counts less than the minimum dose of 10^6 cfu per gram of yogurt in day 28. This study indicated that the deadline for storage and consumption of probiotic yogurts is 21 days after production. In addition, the decline in viability was dependent on the amount of pH and acidity.

Keywords: *Acidity, probiotic bacteria, Yogurt, pH*

بررسی بروز فصلی برخی از بیماری‌های دارای اهمیت اقتصادی در زنبورستان‌های شهرستان خاش و حاشیه تفتان

ملیحه بخشی راویزی[۱]، مریم گنجعلی*[۱]، داریوش سعادتی[۲]، فریبرز شریعتی شریفی[۱]

۱- گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۸ خرداد ۱۳۹۸، بازنگری: ۲۵ شهریور ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۰۳ مهر ۱۳۹۸

چکیده

به منظور بررسی پراکنش آلودگی انگلی در زنبورستان‌های شهرستان خاش و حاشیه تفتان و همچنین اتخاذ روش‌های مدیریتی جدید جهت پی‌ریزی طرح‌های مطالعاتی آینده صنعت زنبورداری در استان سیستان و بلوچستان تحقیقی در سال ۱۳۹۵ انجام پذیرفت. در این مطالعه از ۳۰ زنبورستان و از ۳۷۵ کندو در شهرستان خاش و حاشیه تفتان در سه فصل پاییز، زمستان و بهار نمونه‌برداری انجام شد (پاییز و زمستان ۱۳۹۴ و بهار ۱۳۹۵). میزان آلودگی به تک‌یاخته نوزما در فصول بهار، زمستان و پاییز به ترتیب ۴۷ ، ۸۰ و ۰ درصد بوده است. بیشترین میزان آلودگی به نوزما در فصل زمستان و ۸۰ درصد تعیین شده است. میزان آلودگی به واروا در فصول بهار، زمستان و پا ییز به ترتیب ۸۰، ۸۷ و ۸۰ درصد بوده است. بیشترین میزان آلودگی به واروا نیز در فصل زمستان با میزان ۸۷ درصد تعیین شده است. در نمونه‌های مورد آزمایش از ۳۰ زنبورستان فوق، تنها آلودگی به جرب‌های واروآ و نوزما مشاهده گردید. همچنین تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نشان داد که خرید گرده، موم و وسایل از سایر مراکز پرورش و همچنین عدم استفاده از دیوار محافظ و عدم پیشگیری و درمان باعث افزایش میزان آلودگی به انگل‌ها می‌شود که البته نتایج آزمون‌های آماری مربع کای و آزمون دقیق فیشر نیز حاکی از ارتباط معنادار این متغیرها و آلودگی به انگل‌ها می‌باشد ($p<0.01$).

واژگان کلیدی: *آلودگی انگلی، زنبور عسل، خاش و حاشیه تفتان*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: m_g2507@yahoo.com

مقدمه

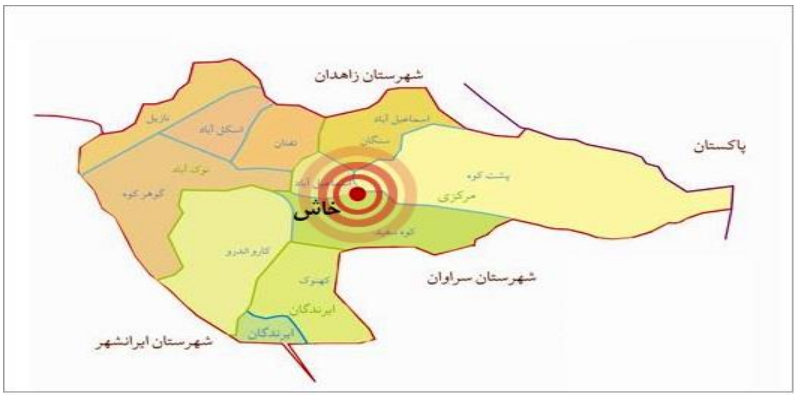
زنبورداری در ایران سابقه دیرینه داشته و یکی از حرفه‌های اصیل و قدیمی است. در ایران حدود چهار میلیون کندو وجود دارد که سالانه بالغ بر شصت هزار تن عسل تولید می‌کنند (۸). فرآورده‌های زنبور عسل از جمله عسل و ژله‌ی رویال از نظر غذایی و دارویی و اقتصادی دارای اهمیت بوده و باید تأکید نمود که یقیناً این حشره کوچک منشأ خدمات و اثرات مثبت برای خود انسان، محصولات کشاورزی، محیط زیست و به طور کلی بسیاری از موجودات زنده دیگر است (۱). محیط زندگی زنبور عسل، محیط مناسبی جهت زیست انواع انگل‌ها بوده و وجود عسل، موم ، لارو و دیگر مواد در کندو سبب جلب برخی از موجودات انگلی می‌گردند. تاکنون بیش از یکصد و پنجاه گونه انگل در ارتباط با زنبورهای عسل گزارش گردیده و آنهایی که دارای اهمیت بیماری‌زایی هستند شامل: تک‌یاخته‌های *نوزوما* و *گرگارین*، همچنین آمیب *مالپیگامونبا ملیفیگه* و جرب‌ها از جمله *واروا*، *آکاراپیس*، *تروپیله لپیس کلاره* می‌باشند (۱۸). کاهش کلنی و شیوع بیماری در زنبورداری غیر معمول نبوده و یکی از نگرانی‌های بزرگ زنبورداران است در سال‌های اخیر ضرر و زیان‌های جدی ناشی از کاهش جمعیت زنبور عسل در سراسر جهان گزارش شده است از این رو تمرکز بر روی سلامت زنبور عسل افزایش یافته است.

نوزما یک تک‌سلولی کوچک از خانواده میکروسپورید می‌باشد و دارای دو گونه نوزما آپیس و نوزما سرانا است. این انگل داخل سلولی بوده و بیشتر به حشرات به خصوص زنبور عسل حمله می‌کند، علاوه بر حشرات برخی از مهره‌داران مانند ماهی‌ها، دوزیستان، خزندگان و برخی از پستانداران را نیز آلوده می‌کند (۵). این تک‌یاخته‌ها سبب عفونت سلول‌های اپیتلیال روده میانی حشرات می‌گردند (۱۷). یکی دیگر از عوامل مهم تهدیدکننده سلامت زنبور عسل در صنعت زنبورداری جرب واروا می‌باشد که این انگل اجباری کلنی زنبوران عسل، در حجره‌های دربسته زاد و ولد نموده و با تغذیه از همولنف بالغین و نابالغین باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی در این حشره می‌گردد و از طرفی انتقال عوامل مختلف بیماری‌زا را در کلنی تسریع می‌نماید (۴). سطوح بالای آلودگی به جرب واروا منجر به کاهش بیش از ۱۰ درصد وزن زنبور عسل در مرحله شفیرگی و بالغ می‌گردد در مقایسه با زنبورهای کارگر سالم، زنبورانی که در مرحله شفیرگی آلوده هستند از خصوصیات فیزیولوژیکی مطلوبی جهت زمستان گذرانی برخوردار نمی باشند و قادر به حفظ بقای خود تا بهار آینده نخواهند بود (۶). با توجه به اینکه تغییرات شرایط آب و هوایی در مناطق مختلف می‌تواند سبب تغییر در فون انگلی گردد، لذا لازم است به طور مرتب زنبورستانهای نواحی مختلف از نظر حضور بیماری‌ها از جمله بیماری‌های انگلی مورد پایش قرار گیرد. در این تحقیق، تلاش شده است تا وضعیت آلودگی انگل‌های مهم نوزما، واروا و آکاراپیس در شهرستان خاش و حاشیه تفتان به دلیل داشتن پوشش گیاهی مناسب و کشاورزی پر رونق که منطقه‌ای مناسب جهت گسترش صنعت زنبورداری و افزایش سالیانه تولید عسل در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد برای اولین بار بررسی شود.

مواد و روش‌کار

در استان سیستان و بلوچستان بیش از ۵۸۰۰ کلنی زنبور وجود دارد و سالانه بیش از ۴۸ تن عسل در این استان تولید می‌شود. در حدود ۳۲۰ نفر به کار زنبورداری و تولید عسل مشغول هستند و شهرستان‌های خاش، نیکشهر، ایرانشهر، زابل و زهک مهم‌ترین مراکز تولید عسل در سیستان و بلوچستان

هستند. شهرستان خاش با مساحت ۲۳۱۰۵ کیلومتر مربع در مرکز استان سیستان و بلوچستان قرار گرفته و فاصله مرکز شهرستان تا مرکز استان ۱۸۰ کیلومتر است. شهرستان خاش دارای آب و هوای گرم و خشک می‌باشد. میانگین بارش سالانه در این شهرستان ۱۷۴/۹ میلی‌متر و متوسط دمای آن از ۷ درجه سانتی‌گراد الی ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تغییر است. خوش آب و هواترین منطقه این شهر دامنه‌های کوه تفتان می‌باشد (۲).



شکل۱- موقعیت جغرافیایی منطقه مورد مطالعه

جهت انجام این پژوهش در ابتدا با مراجعه به اداره کل دامپزشکی استان، اقدام به جمع‌آوری اطلاعات کلی در زمینه آمار زنبورستان‌های منطقه گردید. ۳۰ زنبورستان جهت نمونه‌برداری از پنج منطقه شامل: بخش گوهرکوه، بخش مرکزی، حاشیه جنوبی کوه تفتان، حاشیه شمالی کوه تفتان و بخش پشت کوه انتخاب شد. سپس در سه فصل پاییز، زمستان و بهار نمونه‌برداری انجام شد (پاییز و زمستان ۱۳۹۴ و بهار ۱۳۹۵) که در هر فصل از هر زنبورستان ۵ کندو به صورت تصادفی انتخاب شد و در مجموع در هر فصل از ۱۵۰ کندو نمونه‌گیری انجام شد. همچنین قبل از شروع نمونه‌برداری از کندوهای هر زنبورستان در ابتدا، اقدام به تکمیل پرسشنامه با کمک زنبوردار گردید. در این پرسشنامه سوالاتی در زمینه تعداد کندوها ، تعداد متوسط شان‌ها در هر کندو، وضعیت بهداشتی زنبورستان‌ها، میزان تلفات جمعیت‌ها، سابقه بیماری و داروهای مصرفی مطرح گردید. همچنین مشخصاتی از جمله ارتفاع منطقه، خرید گرده ، موم و وسایل از سایر مراکز پرورش، نوع منبع آب، فاصله کندو از سطح زمین، وجود و عدم وجود کوچ در زمستان ثبت شد. نمونه‌ها به تدریج در آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل مورد آزمایشات انگل‌شناسی قرار گرفتند. به منظور تشخیص نوزما از روش مشروحه توسط Mussen (۱۰) و جهت تشخیص آکاراپیس و واروآ از روش OIE (۱۲) استفاده گردید. آنالیزهای آماری با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. از آزمون دقیق فیشر و آزمون مربع کای برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد، سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

جهت انجام این پژوهش از ۳۰ زنبورستان و از هر زنبورستان ۵ کندو در ۳ فصل نمونه‌گیری شد که به علت کوچ به مناطق گرمسیری تعداد ۱۵ زنبورستان در فصل زمستان و عدم نمونه‌گیری از

آنها، تعداد ۳۷۵ نمونه کندو در سه فصل سال مورد بررسی قرار گرفت و انگل‌های *واروا* و *نوزوما* از آنها جدا شد و در هیچ موردی آلودگی با *آکاراپیس وودی* مشاهده نگردید.در فصل پاییز از ۱۵۰ کندو از مناطق مختلف شهرستان خاش و حاشیه تفتان نمونه‌گیری انجام شد. همان‌گونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌گردد در این فصل تنها آلودگی با جرب *واروا* و با سطح آلودگی ۸۰ درصد در سطح زنبورستان‌ها مشاهده شد که میانگین شدت آلودگی این انگل ۹/۴ مورد در میان صد زنبور عسل مشاهده گردید (نمودار ۲) و در بررسی‌های انجام شده در هیچ یک از موارد انگل *نوزوما* یافت نشد. در فصل زمستان به علت مهاجرت ۱۵ زنبورستان به مناطق گرمسیری از ۷۵ نمونه مربوط به این زنبورستان‌ها نمونه‌گیری انجام گرفت. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد در فصل زمستان شیوع *واروا* و *نوزما* در سطح زنبورستان‌ها به ترتیب برابر با ۸۶/۶۶ درصد و ۸۰ درصد بود، همچنین در این فصل میانگین شدت آلودگی با *واروا* و *نوزوما* به ترتیب ۶/۶ و ۱۵/۷ مورد در میان صد زنبور عسل مشاهده گردید (نمودار ۲). *نوزوما* در تمامی موارد به جز در یک کندو در حاشیه شمالی کوه تفتان همراه با *واروا* مشاهده گردید و این تک‌یاخته فقط در مورد اشاره شده به تنهایی گزارش شد. همچنین شیوع آلودگی با *واروا* و *نوزوما* در این فصل نسبت به فصول دیگر بیشتر بود و شدت آلودگی با *نوزوما* نیز در این فصل نسبت به سایر فصول بالاتر بود.

در فصل بهار از ۱۵۰ کندو از مناطق مختلف شهرستان خاش و حاشیه تفتان نمونه‌گیری انجام شد. همان‌گونه که در جدول شماره ۱مشاهده می‌گردد در فصل بهار شیوع *واروا* و *نوزما* در سطح زنبورستان‌ها به ترتیب برابر با ۸۰ درصد و ۴۶/۶۶ درصد بود، همچنین در این فصل میانگین شدت آلودگی با *واروا* و *نوزوما* به ترتیب ۱۰/۰ و ۱۰/۴ مورد در میان صد زنبور عسل مشاهده گردید (نمودار ۲). *نوزوما* در تمامی موارد همراه با *واروا* مشاهده گردید و این تک‌یاخته به تنهایی گزارش نشد.

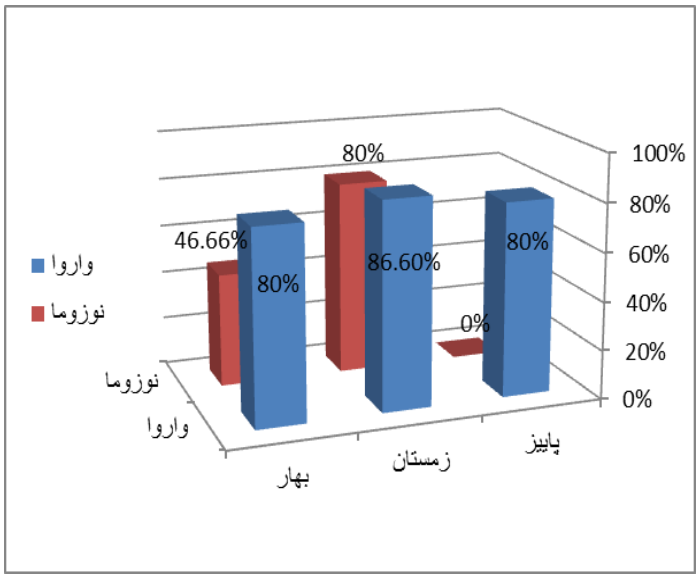
جدول ۱- نتایج آلودگی زنبورستان‌های شهرستان خاش و حاشیه تفتان در سه فصل پاییز، زمستان و بهار

انگل	تعداد زنبورستان‌های مورد بررسی	تعداد زنبورستان‌های آلوده	شیوع آلودگی در زنبورستان‌ها	تعدادکندوهای مورد بررسی	تعداد کندوهای آلوده	شیوع آلودگی در کندوها
فصل پاییز						
واروا	۳۰	۲۴	٪۸۰	۱۵۰	۱۲۰	٪۸۰
نوزوما	۳۰	۰	٪۰	۱۵۰	۰	٪۰
جمع کل	۳۰	۲۴	٪۸۰	۱۵۰	۱۲۰	٪۸۰
فصل زمستان						
واروا	۱۵	۱۳	٪۸۷	۷۵	۶۴	٪۸۵
نوزوما	۱۵	۱۲	٪۸۰	۷۵	۶۰	٪۸۰
جمع کل	۱۵	۱۳	٪۸۷	۷۵	۶۴	٪۸۵
فصل بهار						
واروا	۳۰	۲۴	٪۸۰	۱۵۰	۱۱۹	٪۷۹
نوزوما	۳۰	۱۴	٪۴۷	۱۵۰	۷۰	٪۴۷
جمع کل	۳۰	۲۴	٪۸۰	۱۵۰	۱۱۹	٪۷۹

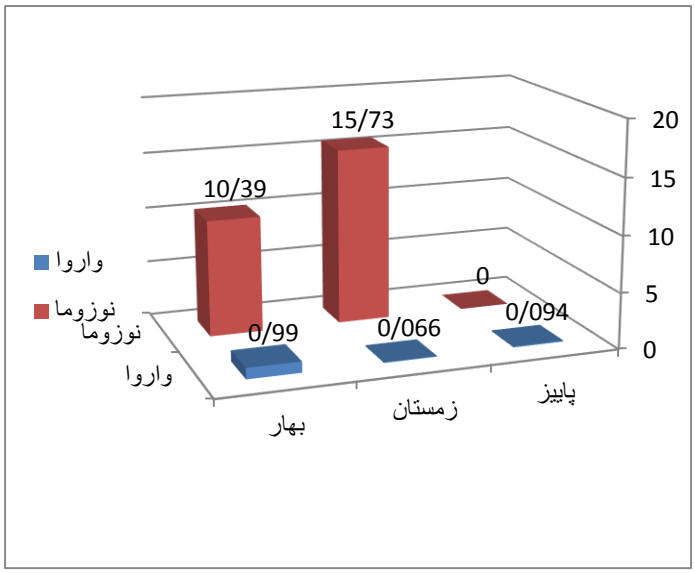
میـزان آلـودگی بـه واروا در فصـول بهـار، زمسـتان و پـا ییـز بـه ترتیـب ۸۰ ، ۸۷ و ۸۰ درصـد بـوده اسـت. بیشـترین میـزان آلـودگی بـه واروا در فصـل زمسـتان بـا میزان ۸۶/۶۰ ٪ تعیین شده است (نمودار ۱).

میزان آلـودگی بـه نوزمـا در فصـول بهـار، زمسـتان و پـا ییـز بـه ترتیـب ۴۷، ۸۰ و ۰ درصـد بـوده اسـت. بیشترین میـزان آلـودگی بـه نوزمـا در فصـل زمسـتان بـا میزان ۸۰ درصد تعیین شده است (نمودار ۱).

نتـایج ایـن تحقیـق بیـانگر حضـور فعـال آلـودگی جـرب واروآ در اغلـب کنـدوهای زنبورسـتان‌هـا بـود کـه از نظـر اقتصـادی حـائز اهمیـت اسـت. بـا توجـه بـه اهمیـت دو انگـل نوزمـا و واروا و خسـارات اقتصـادی شـدید آنهـا مبـارزه مـداوم سـالیانه علیـه ایـن انگـل‌هـا توصیه می‌شود.



نمودار ۱- درصد آلودگی کندوها به انگلهای *واروا و نوزوما* در سه فصل پاییز، زمستان و بهار



نمودار ۲- متوسط درصد آلودگی زنبورهای هر کندو به انگلهای *واروا و نوزوما* در سه فصل پاییز، زمستان و بهار

همچنین با اخذ مشخصاتی از جمله ارتفاع منطقه، خرید موم، گرده و وسایل از سایر مراکز پرورش، نوع منبع آب، فاصله کندو از سطح زمین، وجود و عدم وجود کوچ در زمستان، استفاده از گرده اضافی، خرید ملکه از سایر مراکز پرورش و وضعیت پیشگیری و درمان ثبت شد. طبق نتایج به دست آمده چنین به نظر می‌رسد که خرید گرده ، خرید موم و وسایل از سایر مراکز پرورش و همچنین عدم استفاده از دیوار محافظ، عدم کوچ در زمستان و عدم پیشگیری و درمان باعث افزایش میزان آلودگی به انگل‌ها می‌شود (جدول۲) که البته نتایج آزمون‌های آماری مربع کای و آزمون دقیق فیشر نیز حاکی از ارتباط معنادار این متغیرها و آلودگی به انگل‌ها می‌باشد ($p<0.01$).

متغیرهای مورد بررسی	سطوح متغیر	تعدادکندوهای مورد بررسی	آلودگی به *واروا*			آلودگی به *نوزما*		
			تعداد کندوهای آلوده به *واروا*	شیوع کندوهای آلوده به *واروا*	معنی داری آماری	تعداد کندو های آلوده به *نوزوما*	شیوع کندوهای آلوده به *نوزوما*	معنی داری آماری
خرید گرده از سایر مراکز پرورش	داشته است	۱۶۵	۱۶۵	٪۱۰۰	<۰/۰۰۱	۸۰	٪۴۸	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۲۱۰	۱۳۸	٪۶۶		۵۰	٪۲۴	
استفاده از گرد اضافی	داشته است	۱۶۵	۱۵۰	٪۹۰	<۰/۰۰۱	۸۵	٪۵۲	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۲۱۰	۱۵۳	٪۷۳		۴۵	٪۲۱	
خرید موم از سایر مراکز پرورش	داشته است	۱۹۰	۱۸۹	٪۹۹	<۰/۰۰۱	۹۰	٪۴۷	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۱۸۵	۱۱۴	٪۶۲		۴۰	٪۲۲	
خرید وسایل دست دوم از سایر مراکز پرورش	داشته است	۲۶۰	۲۵۹	٪۹۹	<۰/۰۰۱	۱۱۰	٪۴۲	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۱۱۵	۴۴	٪۳۸		۲۰	٪۱۷	
استفاده از دیوار محافظ	داشته است	۱۰۰	۶۵	٪۶۵	<۰/۰۰۱	۲۰	٪۲۰	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۲۷۵	۲۳۸	٪۸۷		۱۱۰	٪۴۰	
خرید ملکه سایر مراکز پرورش	داشته است	۰	۰	۰	<۰/۰۰۱	۰	۰	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۳۷۵	۳۰۳	٪۸۰		۱۳۰	٪۳۵	
کوچ در زمستان	داشته است	۱۵۰	۱۰۹	٪۷۳	<۰/۰۰۱	۱۰	٪۷	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۲۲۵	۱۹۴	٪۸۶		۱۲۰	٪۵۳	
پیشگیری و درمان	داشته است	۱۰۰	۲۹	٪۲۹	<۰/۰۰۱	۰	۰	<۰/۰۰۱
	نداشته است	۲۷۵	۲۷۴	٪۹۹		۱۳۰	٪۴۷	

جدول ۲- درصد آلودگی کندوها به انگل‌های *واروا* و *نوزما* در متغیرهای مختلف

جهت نمونه‌برداری پنج منطقه شامل: بخش گوهرکوه، بخش مرکزی، حاشیه جنوبی کوه تفتان، حاشیه شمالی کوه تفتان و بخش پشت کوه انتخاب شد. بیشترین و کمترین درصد آلودگی با متغیر منطقه به ترتیب در بخش گوهرکوه (۱۰۰ درصد) و بخش مرکزی (۲۸ درصد) دیده شد. همچنین بیشترین درصد آلودگی با متغیر نوع منبع آب چاه دیده شد. از سوی دیگر در متغیر فاصله کندوها از زمین کمترین آلودگی در فاصله ۳۰ سانتی‌متر از سطح زمین دیده شد (جدول۳). نتایج آماری آزمون‌های ذکر شده نشان داد که بین تمامی متغیرهای ذکر شده و آلودگی به *نوزوما و واروا* ارتباط معناداری وجود دارد ($p<0.001$).

متغیرهای مورد بررسی	سطوح متغیر	تعدادکندوهای مورد بررسی	آلودگی به *واروا*			آلودگی به *نوزما*		
			تعداد کندوهای آلوده به *واروا*	شیوع کندوهای آلوده به *واروا*	معنی‌داری آماری	تعداد کندوهای آلوده به *نوزوما*	شیوع کندوهای آلوده به *نوزوما*	معنی‌داری آماری
منطقه	گوهر کوه	۱۵	۱۵	٪۱۰۰	<۰/۰۰۱	۱۰	٪۶۷	<۰/۰۰۱
	بخش مرکزی	۳۵	۱۰	٪۲۸		۰	۰	
	پشت کوه	۲۰	۲۰	٪۱۰۰		۰	۰	
	حاشیه شمالی تفتان	۲۸۵	۲۳۸	٪۸۳		۱۲۰	٪۴۲	
	حاشیه جنوبی تفتان	۲۰	۲۰	٪۱۰۰		۰	۰	
نوع منبع آب	لوله کشی	۴۵	۲۰	٪۴۴	<۰/۰۰۱	۰	۰	<۰/۰۰۱
	چاه	۲۵	۲۵	٪۱۰۰		۱۰	٪۴۰	
	چشمه	۳۰۵	۲۵۸	٪۸۴		۱۲۰	٪۳۹	
فاصله کندو از سطح زمین	۰	۶۰	۵۸	٪۹۷	<۰/۰۰۱	۱۵	٪۲۵	<۰/۰۰۱
	۱۰	۴۵	۴۵	٪۱۰۰		۱۰	٪۲۲	
	۱۵	۶۵	۶۵	٪۱۰۰		۳۵	٪۵۴	
	۲۰	۴۰	۴۰	٪۱۰۰		۲۰	٪۵۰	
	۲۵	۱۵	۱۵	٪۱۰۰		۱۰	٪۶۷	
	۳۰	۱۵۰	۸۰	٪۵۳		۴۰	٪۲۷	
ارتفاع منطقه	۱۵۰۰-۱۳۰۰	۷۰	۲۴	٪۳۴	<۰/۰۰۱	۱۰	٪۱۴	<۰/۰۰۱
	۲۱۰۰-۱۹۰۰	۳۰۵	۲۵۸	٪۸۵		۱۲۰	٪۳۹	

جدول ۳- درصد آلودگی کندوها به انگل‌های *واروا و نوزوما* در متغییرهای مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

وجود مراتع، مزارع، کوه‌های فراوان و گونه‌های منحصر به فرد گیاهی به ویژه در حاشیه قله تفتان باعث شده است که شرایط برای توسعه صنعت زنبورداری در این منطقه از سیستان و بلوچستان مهیا باشد. با توجه به گسترش و پیشرفت پرورش زنبور عسل طی چند سال اخیر در استان سیستان و بلوچستان، داشتن اطلاعات کافی و لازم در زمینه

پرورش زنبور عسل و خصوصاً بیماری‌های آن امری ضروری است. از آنجا که محیط زندگی زنبور عسل و وجود عسل، موم، لارو و دیگر مواد در کندو، محیط مناسبی جهت زیست انواع انگل‌ها است ، تاکنون بیش از یکصد و پنجاه گونه انگل در ارتباط با زنبورهای عسل گزارش گردیده و آنهایی که دارای اهمیت بیماری‌زایی هستند شامل: جرب‌ها از جمله *واروا*، *آکارپیس*، *تروپیله لپیس کلاره* و تک‌یاخته‌های *نوزوما* و *گرگارین* همچنین آمیب *مالپیگامونبا ملیفیگه* می‌باشند از این رو می‌توانند زیان‌های اقتصادی بسیار شدیدی را به کندوهای زنبور عسل وارد نمایند (۱۸). در جستجوی آلودگی‌های انگلی زنبور عسل در شهرستان خاش و حاشیه تفتان، تنها آلودگی با انگل‌های *واروا* و *نوزوما* مشاهده شد که هر دو نیز از لحاظ اهمیت جزء عوامل بیماری‌زای بسیار مهم زنبور عسل است و سالانه خسارات فراوانی را در دنیا به زنبورداران تحمیل می‌کند. کسب اطلاعات ذکر شده به منظور اتخاذ تدابیر و استراتژی‌های مدیریتی و درمانی در آینده حائز اهمیت است. در مطالعه کنونی با بررسی ۳۷۵ کندو از ۳۰ زنبورستان در سه فصل پاییز، زمستان و بهار درصد آلودگی کندوها با *واروا* به طور کلی ۸۰/۸ درصد مشاهده گردید که میزان آلودگی کندوها در فصل زمستان نسبت به دو فصل پاییز و بهار بیشتر بود. در مطالعه تعیین میزان آلودگی فصلی کلنی‌های زنبور استان فارس به جرب *واروا* ،کمترین درصد آلودگی (۳۰ درصد) مربوط به فصل بهار و بیشترین درصد آلودگی (۵۰ درصد) در فصل زمستان مشاهده شد (۹). در آذربایجان شرقی آلودگی به جرب *واروا* را ۴۴ درصد در کندوهای مورد مطالعه گزارش کردند و آلودگی به جرب *آکارایپس* را منفی گزارش نمودند (۱۴). در بررسی وارواز‌یس در زنبورستان‌های کشور از ۵ استان مازندران، گیلان، آذربایجان غربی، اصفهان و تهران، توسط رهبری و نبیان، بالاترین در صد آلودگی در زنبورهای بالغ و شفیره از استان گیلان به میزان ۹۵ درصد گزارش شد (۱۵). یخچالی در اردبیل آلودگی به *واروا* را ۳۰/۹ درصد گزارش نمود (۱۹).

نوزموزیس در اغلب نقاط جهان انتشار دارد و در این میان *نوزما آپیس* شیوع و پراکندگی بسیار وسیعی دارد، لذا در مناطق با آب و هوای گرم و خشک و استوایی به عنوان یک مشکل اساسی در پرورش زنبور عسل به شمار می‌رود (۲۰) و به میزان زیادی بر تولیدات اثر می‌گذارد و زندگی زنبور را در طول زمستان تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. شدت این بیماری بیشتر در اواخر زمستان و اوایل بهار می‌باشد (۱۶). در مطالعه حاضر با بررسی ۳۷۵ کندو از ۳۰ زنبورستان در سه فصل پاییز، زمستان و بهار درصد آلودگی کندوها با *نوزوما* به طور کلی ۳۴/۷ درصد مشاهده گردید که میزان آلودگی کندوها در فصل زمستان نسبت به دو فصل پاییز و بهار بیشتر بود و در فصل بهار هیچ موردی از آلودگی با *نوزوما* دیده نشد. همچنین متوسط درصد آلودگی در بین زنبورها در فصل زمستان با میزان ۱۵/۷۳ درصد بیشتر از سایر فصول مشاهده گردید. از سوی دیگر تمامی موارد آلودگی با *نوزوما* به جز در یک مورد همراه با جرب *واروا* دیده شد. قدس در زنبورستان‌های استان گیلان میزان آلودگی کندوها به *نوزوما* را ۳۰ تا ۷۰ درصد گزارش نموده است (۱۳).

در بررسی انجام گرفته در شهرستان میانه از ۱۵۰ کلنی نمونه‌گیری شد، درصد آلودگی با جرب *واروا* ۴۳/۴ بود و همچنین جرب *آکارایپس* مشاهده نگردید و آلودگی به تک‌یاخته *نوزوما* ۸۱ درصد گزارش گردیده است (۳). در شهرستان ایلام در بررسی نقش احتمالی انگل‌ها در بروز پدیده ریزش زنبورها میزان آلودگی به جرب *واروا* در بهار ، تابستان و پاییز به ترتیب ۱۶/۶ درصد، ۳۰ درصد،

۲۶/۶ درصد و آلودگی به جرب *آکاراپیس* منفی گزارش شد. آلودگی به تک‌یاخته *نوزوما* نیز در بهار ، تابستان و پاییز به ترتیب ۲۶/۶ درصد،۱۳/۳ درصد و ۳/۳ درصد گزارش گردید (۷). در مطالعه حاضر جهت نمونه‌برداری پنج منطقه شامل: بخش گوهرکوه، بخش مرکزی، حاشیه جنوبی کوه تفتان، حاشیه شمالی کوه تفتان و بخش پشت کوه انتخاب شد. بیشترین و کمترین درصد آلودگی با متغیر منطقه به ترتیب در بخش گوهرکوه (۱۰۰درصد) و بخش مرکزی (۲۸درصد)دیده شد. در بررسی صورت گرفته بر روی شیوع تک‌یاخته *نوزوما* در ۴ منطقه جغرافیایی ایران که ۴ ناحیه آب و هوایی ، کوهستانی ، گرم و خشک، حاشیه دریای خزر، گرم و مرطوب در نظر گرفته شد و از ۲۲۷۳ کلنی نمونه‌گیری شد میزان آلودگی به تک‌یاخته *نوزوما* در ۱۶۳ کلنی (۷/۲ درصد) مثبت و ۱۹۳۳ کلنی منفی اعلام شد که بیشترین آلودگی مربوط به ناحیه آب و هوایی کوهستانی بود (۱۱).

سایر نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد بیشترین درصد آلودگی با متغیر نوع منبع آب چاه دیده شد. از سوی دیگر در متغیر فاصله کندوها از زمین کمترین آلودگی در فاصله ۳۰ سانتی‌متر از سطح زمین دیده می‌شود. افزایش فاصله کندوها از سطح زمین و استفاده از آب لوله‌کشی و تمیز باعث کاهش آلودگی در زنبورستان‌ها می‌شود .از سوی دیگر خرید گرده و موم و وسایل از سایر مراکز پرورش، همچنین عدم استفاده از دیوار محافظ، عدم کوچ در زمستان و عدم پیشگیری و درمان باعث افزایش میزان آلودگی به انگل‌ها می‌شود به طور کلی می‌توان گفت که بررسی و آنالیزهای آماری متغییرهای در نظر گرفته شده در این تحقیق نشان می‌دهد که بین تمامی متغیرهای ذکر شده و آلودگی به *نوزوما* و *واروا* ارتباط معناداری وجود دارد ($p<0.01$) و نتایج آماری نیز مؤید این مسأله است.

References

1- Ahmadi A, Ebadi, R. Beekeeping Basics. 1nd Ed. Iran: Arkan Press. 2006; P: 450-45 [In Persian].

2- Census of the Islamic Republic of Iran. *Archived from the original (Excel) on* 2011-11-11[Internet]

3- Davoudi J, Mohammad Pour v. Study of infection rate of Nosma, Varroa spp and Acarapis woodi in honey bee colonies in Miyaneh suburb, Iran. Journal of veterinary pathobiology. 2008;13: 22-26 [In Persian].

4- Donzé G, Schnyder-Candrian S, Bogdanov S, Diehl PA, Guerin PM, Kilchenman V, Monachon F. Aliphatic alcohols and aldehydes of the honey bee cocoon induce arrestment behavior in Varroa jacobsoni (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of Apis mellifera. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 1998: 37(2): 129-145.

5- Fries I. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* in the ventriculus honey bee. *Apidologier*. 1988:19(3):319-328.

6- Gueler A and Kaftanoglu O. Determination of performances of some important races and ecotypes of Turkish honey bees (*Apis mellifera*) under migratory beekeeping conditions. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 1999: 23: 577-581.

7- Mahmoudi M, Nabian S. Study On Some Possible Factors In Occurrence Of Colony Collaps Disorder In Ilam, Journal of Iranian bee science and technology. 2011; 2 (5): 4-9[In Persian].

8- Mahmoudi M, Nabian S, Ahmadi v. Common diseases and pests of honey bee in Iran and laboratory diagnostic methods. 1nd Ed. Iran: Binahaiat Press. 2011; Pages 25-56 [In Persian].

9- Mirzaei M, Malekpour H. Seasonal prevalence the *Varroa* mite in honey bee colonies in Fars province in 2012-2013. Animal Production Research, 2014: 3(1) [In Persian].

10- Mussen A. Diagnosing and treating Nosema, Disease Extension Apiculturist, 2002: UC Davis. 2.

11- Nabian S, Ahmadi K, Naznin-Shirazi MH. And Gerami-Sadeghian A. First Detection of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Protozoa of European Honey bee (Apis mellifera) In Iran. Iran. J. Parasitol. 2011: 6(3): 32-38

12- OIE. Manual for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter, 2,2,4. Nosemosis of honey bees. Office International des Epizooties, Paris, France: 2008.

13- Quds F.Investigation of Nosma and Acarapis in Gilan Apiary. Animal science Journal (pajouhesh and sazandegi). 1997: 5 (8): 32-36 [In Persian].

14- Rahbari s, Nabiyan s, Hassani, M. Investigation of Varroasis in Iranian Apiary,10th Veterinary Congress. 1991: Pages 345-350 [In Persian].

15- Rahbari S, Nabian S, Akbari M. Study of Acarbosis in Honeybees in Golestan, Mazandaran and Isfahan provinces. 13th Veterinary Congress . 2003; page 151.

16- Shahrastani, N. Honeybee and its breeding, 10nd Ed. Sepehr Press. 2008, P: 26-242.

17- Shimanukihand-Knox D. Diagnosis of honey bee Disease. Apidologie. 2000: 17: 16-19.

18- Vosoughi Gh, Nabian S. Honey Bees - Pests - Predators and Diseases. 1nd Ed. Iran: Academic Publication Center. 1995; Pages 55-61 [In Persian].

19- Yakhchali M. Investigation of the Incidence of Varroa spp and Acarapis woodi in honey bee colonies in Ardabil , 15th Iranian Veterinary Congress. 2008: page 12-13[In Persian].

20- Zander, E. Animal parasites as disease – preoducers in bees. Lepiziger Bienenzeitung. 1909: 24: 147-150 and 164-166.

Seasonal incidence of some economical bee disease in honey bee colonies of Khash and Taftan border

Bakhshi Ravizi Maliheh[1], Ganjali Maryam [1*], Saadati Dariush [2], Shariati Sharifi Fariborz [1]

1- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: June 18, 2019; Revise: September 16, 2019; Accept: September 25, 2019

Summary

This study aimed to investigate the parasitic infection in the apiary in Khash and Taftan border. This research was carried out to adopt new management method, and design future studies in beekeeping industry in Sistan-Baluchistan Province. Samples were taken from 30 apiaries and 375 honey bee colonies, in autumn, winter, and spring (autumn and winter 2015 and spring 2016). The results showed that the infections rate with *Varroa* was 80%, 86/6%, 80% in autumn, winter and spring; respectively. The highest infection rate in the study area was recorded in winter with 86/6%. Also, the infections rate with *Nosema* was 0%, 80%, 46/6% in autumn, winter and spring; respectively. Both diseases are major parasitic infections, causing annual damage to beekeepers. Also, statistical analysis using SPSS software showed that the purchase of pollen, wax and equipment from other farms, as well as non-use of protective wall, lack of migration in the winter and the lack of prevention and treatment, increases the infection rate with the parasites. The results of chi-square and Fisher's exact test revealed significant relationship between these variables and parasites infection ($p < 0.01$).

Keywords: *parasitic infection, honey bee, Khash and Taftan, Iran*

بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی علف مار(*Capparis spinosa*)، علف مورچه(*cretica Cressa*) و اشورک(*Rhazya stricta*)

سعیده سعیدی[۱]. بهمن فاضلی نسب[۲*]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۰۶ اردیبهشت ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۳ مهر ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۷ مهر ۱۳۹۸

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی علف مار (*Capparis spinosa*)، علف مورچه (*Cretica Cressa*) و اشورک (*Rhazya stricta*) است. گیاهان دارویی اشورک، علف مار و علف مورچه از استان سیستان و بلوچستان شهرستان سراوان جمع‌آوری گردید. عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف با دستگاه روتاری انجام شد. باکتری‌های استاندارد از کلکسیون قارچ و باکتری ایران خریداری شد. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی با روش میکرودایلوشن تعیین شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برابر با ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسنتری* مهار شده‌اند. ضمناً کمترین غلظت مهارکنندگی مربوط به عصاره متانولی علف مورچه و برابر با ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری *باسیلوس سرئوس* در این غلظت از بین رفته است. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره‌های علف مار مربوط به عصاره اتانولی و برابر با ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری اشریشیاکلی و *باسیلوس سرئوس* مهار شده و در همین غلظت عصاره هیدروالکلی و متانولی مهارکننده باکتری‌های *شیگلا دیسنتری* و *سودوموناس آئروژینوزا* بوده‌اند. نتایج این مطالعه بیانگر اثرات ضد میکروبی خوب عصاره گیاه دارویی علف مورچه و علف مار بر روی باکتری‌های بیماری‌زا است.

واژگان کلیدی: *اشورک، علف مار، علف مورچه، حلال‌های مختلف، باکتری بیماری‌زا*

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

مقدمه

مطالعه گیاهان دارویی به‌منظور کشف روش‌های درمانی جدید که دارای عوارض جانبی کمتر و ارزش اقتصادی بالاتری باشند در سطح جهان اهمیت خاصی پیدا کرده است (۱). بر اساس گزارش‌های منتشرشده در حال حاضر بیش از ۳۰ درصد داروهای گیاهی، در بیمارستان‌ها و کلینیک‌ها مورد استفاده قرار می گیرند (۲). آنتی‌بیوتیک‌ها داروهای ارزشمندی برای درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی می‌باشند، با این‌حال استفاده بیش از حد این داروها مقاومت‌های میکروبی را در پی خواهد داشت. بنابراین دانشمندان تحقیقات بر روی قسمت‌های مختلف گیاهان دارویی، برای کشف داروهای جدید با منشأ گیاهی را در اولویت قرار داده‌اند (۳).

گیاه اشورک از خانواده *Apoynaceae* (۴) و زیر خانواده *Rauwolfioideae* است (۵) اشورک در عربستان سعودی به‌عنوان اسفند شناخته شده است. اشورک یک بوته همیشه‌سبز و کوچک است. این گیاه به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌ها در کشورهای افغانستان، هند، ایران، عراق، پاکستان، قطر و عربستان سعودی استفاده می‌شده است (۶).

عصاره اتانولی خام میوه اشورک دارای فعالیت ضد میکروبی است (۷). عصاره متانولی و کلروفرمی ریشه این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی بر علیه اشریشیاکلی، *باسیلوس سابتیلیس*، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا البیکنس می‌باشد (۸) و همچنین عصاره آبی اشورک فعالیت ضد میکروبی در برابر *Neisseria meningitides* از خود نشان داده است (۸).

اشورک و متابولیت‌های آن برای درمان بیماری‌هایی از جمله سرطان، بیماری‌های پوستی، فشار خون بالا، روماتیسم، گلو درد، سفلیس و تب استفاده می‌شود (۷). مطالعات مختلف نشان داده است که قسمت‌های مختلف اشورک حاوی عناصر فیتوشیمیایی زیادی مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترپن‌ها هستند (۹).

گیاه علف مار (*Capparis spinosa*) از راسته میخک سانان (*Caryophyllales*) و تیره *Capparidaceae* است. این تیره شامل گیاهان علفی یک‌ساله، پایا یا به صورت درختچه و غالباً با پوشش غده‌ای هستند .در مناطق مختلف کشور ایران و در گویش‌های مختلف اسامی دیگر این گیاه کَبَر یا کِیپِر لگجی، لیجین و خارو می‌باشد .هرچند نخستین زیستگاه علف مار به درستی مشخص نیست، اما امروزه دامنه رویش این گیاه در شرایط جغرافیایی متنوعی از اقلیم مدیترانه‌ای و گرمسیر تا هیمالیا گسترش‌یافته است .در ایران نیز علف مار در نیمه جنوبی کشور در اغلب مناطق یافت می‌شود. از گلبرگ این گیاه به‌عنوان چاشنی استفاده می‌شود و میوه آن در فرهنگ‌های مختلف مصارف غذایی و دارویی متعددی دارد که از جمله مهم‌ترین مصارف آن در تهیه ترشی است .البته ممکن است محصولات این گیاه در برخی افراد ایجاد حساسیت نمایند (۱۰).

علف مورچه (*Cretica cressa*) گیاهی هالوفیت، چند ساله و مهاجم متعلق به تیره *Convolvuleae* است. ساقه‌های آن در ابتدا ایستاده و بعداً حالت خوابیده می‌گیرند .برگ‌ها کوتاه و سبز و در مواقعی خاکستری رنگ و پوشیده از کرک و مخمل گون، گل‌ها بدون دمگل و در رأس شاخه‌ها به‌صورت خوشه‌هایی قرار دارند. میوه از نوع کپسول و شکوفایی آن بی‌قاعده است. بذر این گیاه گرد یا تخم‌مرغی شکل صاف و همواره کمی براق و به رنگ قهوه‌ای است.

با توجه به این‌که استفاده طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ظهور باکتری‌های مقاوم شده و مشکلات بالینی مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی

عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی علف مار (*Capparis spinosa*)، علف مورچه (*Cressa cretica*) و اشورک (*Rhazya stricta*) بوده است.

مواد و روش‌ها

برگ‌های گیاه اشورک، علف مار و علف مورچه از مزرعه دشت‌های استان سیستان و بلوچستان، شهرستان سراوان جمع‌آوری و در آزمایشگاه گیاهشناسی دانشگاه زابل شناسایی گونه شدند. نمونه‌ی برگ گیاهان مورد نظر بعد از خشک کردن، آسیاب شدند. در ادامه ۲۰ گرم از برگ گیاه پودر شده به‌طور جداگانه در ۱۰۰ سی سی از حلال‌های آب، اتانول (۱۰۰ درصد)(شرکت رازی، ایران)، متانول (۱۰۰ درصد)(شرکت پتروشیمی زاگرس، ایران)، هیدرو الکل (۷۰۰ درصد الکل و ۳۰ درصد آب) و اتیل استات (۱۰۰ درصد)(شرکت مرک، آلمان) خیسانده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر نگهداری شدند. بعد از یک روز، این مواد از کاغذ صافی شماره ۲ (شرکت واتمن، نمایندگی سپاهان طب ایران) عبور داده شدند. سپس حلال‌ها توسط دستگاه روتاری خلأ (شرکت پارس آزما، ایران) از مواد فیلتر شده خارج شدند. عصاره‌های غلیظ شده تا حاصل شدن عصاره خالص و زدوده شدن کامل حلال، به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درنهایت عصاره‌های به دست آمده خشک شده و پس از توزین تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

تهیه باکتری و ذخیره‌سازی: باکتری‌های استاندارد ویبریو کلرا ATCC1611، اشریشیاکلی ATCC25922، سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853، باسیلوس سرئوس ATCC1015، شیگلا دیسنتری ATCC 1188 از کلکسیون قارچ و باکتری ایران (تهران- ایران) تهیه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مایع نوترینت براث (شرکت مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱۰ درصد گلیسرول استریل، در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی ذخیره‌سازی شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: باکتری‌های *ویبریو کلرا، اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سرئوس، شیگلا دیسنتری* پس از یخزدایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در محیط نوترینت براث کشت داده شدند. همچنین به‌منظور بررسی پرگنه‌های خالص از نمونه‌های باکتریایی روی محیط جامد نوترینت آگار به صورت خطی کشت داده شده و برای این منظور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت از کلونی‌های خالص هر باکتری برداشته و در آب مقطر استریل کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند ساخته شد. برای اطمینان از غلظت باکتری‌ها با اسپکتروفتومتر جذب آنها در طول‌موج ۶۰۰ nm قرائت شد. تراکم باکتری‌ها با غلظت 10^8 CFU /ml × ۱/۵ جذبی معادل ۰/۱- ۰/۰۸ دارد.

جداسازی قارچ کاندیدا آلبیکنس: نمونه‌برداری توسط دو عدد سواب استریل از ترشحات واژن انجام و سپس نمونه‌های گرفته شده در لوله‌های درپیچدار حاوی دو میلی‌لیتر آب مقطر استریل، جهت انتقال به آزمایشگاه قرار داده شدند. از سواب‌های گرفته شده برای آزمایش مستقیم با پتاس ۱۵ درصد، کشت روی محیط‌های سابورو دکستروز آگار (شرکت مرک، آلمان) و کروم آگار (شرکت فرانس، فرانسه) استفاده گردید. محیط‌های کشت به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. برای تأیید تشخیص گونه آلبیکنس از سایر گونه‌های کاندیدا از کلنی‌های مزبور روی محیط کورن میل آگار + توئین ۸۰ کشت خطی داده شد. همچنین از آزمون‌های جرم تیوب و

بتاگلوکوزیداز برای تفریق کاندیدا آلبیکنس از سایر گونه‌ها استفاده شدند. پلیت‌های مزبور به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از کشت تازه، تک کلنی هر مخمر به محلول آب- گلیسرول ۲۰ درصد انتقال یافت و نمونه‌ها در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در صورت نیاز به هر نمونه یا به‌منظور تکرار هر مرحله از آزمایش، از نمونه‌های ذخیره شده در محلول آب- گلیسرول ۲۰ درصد استفاده شد.

در مرحله بعدی قارچ کاندیدا آلبیکنس جداسازی شده توسط عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی علف مار، علف مورچه و اشورک مورد هدف قرار گرفت.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و تعیین حداقل غلظت کشندگی: برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration, MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal concentration, MBC) عصاره‌های گیاهان اشورک، علف مار و علف مورچه از روش رقت سازی در چاهک استفاده شد. برای این منظور ابتدا به هر چاهک میکرو پلیت مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط مایع مغذی مولر هیلتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده هر یک از عصاره‌های آب، اتانول، متانول، هیدروالکل و اتیل استات رازیانه، علف مار و علف مورچه اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه شد و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام شد. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مخلوط شده با عصاره خارج گردید. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^8 واحد در میلی‌لیتر (معادل ۰/۵ مک فارلند) از هر یک از باکتری‌های *ویبریو کلرا*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* به طور جداگانه اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده باشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده در نظر گرفته شد. برای اطمینان از چاهک‌های شفاف ۱۰ میکرو لیتر برداشته به محیط مولر هیلتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته بود ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشنده تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برابر با ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری‌های اشریشیاکلی، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسنتری* مهار شده‌اند. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی در برابر باکتری‌های ویبریو کلرا، اشریشیاکلی، *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* برابر با ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است، کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی اشورک برابر با ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری *باسیلوس سرئوس* در این غلظت از بین رفته است (جدول ۱).

بیشترین غلظت مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که باکتری ویبریوکلرا در این غلظت از بین رفته است و بیشترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری‌های ویبریو کلرا، اشریشیاکلی و *سودوموناس آئروژینوزا* در این غلظت مهار شده‌اند (جدول ۱).

نتایج مطالعه نشان داد که بیشترین غلظت کشندگی عصاره آبی اشورک برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که باکتری‌های ویبریو کلرا و *سودوموناس آئروژینوزا* در این غلظت از بین رفته‌اند. بیشترین

غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که باکتری ویبریوکلرا در این غلظت از بین رفته است. بیشترین غلظت کشندگی عصاره متانولی برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در این غلظت مهارشده است (جدول۲). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی علف مورچه برابر با ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری *باسیلوس سرئوس* در این غلظت از بین رفته است (جدول۳).

بیشترین غلظت کشندگی علف مورچه مربوط به عصاره اتیل استات و هیدروالکلی بوده که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باکتری *ویبریوکلرا* از بین رفته است (جدول۴). کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانلی علف مار برابر با ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری اشریشیاکلی و *باسیلوس سرئوس* را مهار کرده است و در همین غلظت عصاره‌های هیدروالکلی و متانولی به ترتیب مهارکننده باکتری‌های *شیگلا دیسنتری* و *سودوموناس آئروژینوزا* بوده‌اند (جدول۵).

بیشترین غلظت کشندگی مربوط به عصاره هیدروالکلی علف مار در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری‌های *ویبریوکلرا* و *باسیلوس سرئوس* در این غلظت از بین رفته است (جدول۶). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی علف مار در برابر قارچ کاندیدا آلبیکنس برابر با ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که ۲ سویه در این غلظت از بین رفته است. کمترین غلظت مهارکنندگی علف مورچه در برابر قارچ کاندیدا آلبیکنس برابر با ۳/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که یک سویه در این غلظت از بین رفته است درحالی‌که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اشورک در برابر این قارچ برابر با ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که ۳ سویه در این غلظت از بین رفته است (جدول۷).

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های مختلف اشورک بر روی باکتری‌های استاندارد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

نام باکتری	نوع عصاره				
	آبی	اتانولی	هیدروالکلی	اتیل استات	متانولی
ویبریو کلرا	۵	۵	۱۰	۱۰	۲/۵
اشریشیاکلی	۲/۵	۵	۵	۱۰	۲/۵
سودوموناس	۵	۵	۵	۱۰	۵
باسیلوس سرئوس	۲/۵	۵	۵	۵	۱/۲۵
شیگلا دیسنتری	۲/۵	۵	۵	۵	۲/۵

جدول ۲- حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مختلف اشورک بر روی باکتری‌های استاندارد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

نام باکتری	نوع عصاره				
	آبی	اتانولی	هیدروالکلی	اتیل استات	متانولی
ویبریو کلرا	۱۰	۱۰	۲۰	۲۰	۵
اشریشیاکلی	۵	۱۰	۱۰	۲۰	۵
سودوموناس	۱۰	۱۰	۱۰	۲۰	۱۰
باسیلوس سرئوس	۵	۱۰	۱۰	۱۰	۲/۵
شیگلا دیسنتری	۵	۱۰	۱۰	۱۰	۵

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های مختلف علف مورچه بر روی باکتری‌های استاندارد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

نام باکتری	نوع عصاره				
	آبی	اتانولی	هیدروالکلی	اتیل استات	متانولی
ویبریو کلرا	۱/۲۵	۲/۵	۵	۵	۱/۲۵
اشریشیاکلی	۲/۵	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵	۱/۲۵
سودوموناس	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵
باسیلوس سرئوس	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۰/۶۲
شیگلا دیسنتری	۲/۵	۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵

جدول ۴- حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مختلف علف مورچه بر روی باکتری‌های استاندارد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

نام باکتری	نوع عصاره				
	آبی	اتانولی	هیدروالکلی	اتیل استات	متانولی
ویبریو کلرا	۲/۵	۵	۱۰	۱۰	۲/۵
اشریشیاکلی	۵	۵	۲/۵	۵	۲/۵
سودوموناس	۵	۲/۵	۵	۲/۵	۵
باسیلوس سرئوس	۵	۵	۵	۵	۱/۲۵
شیگلا دیسنتری	۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵

جدول ۵- حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های مختلف علف مار بر روی باکتری‌های استاندارد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

نام باکتری	نوع عصاره				
	آبی	اتانولی	هیدروالکلی	اتیل استات	متانولی
ویبریو کلرا	۲/۵	۱/۲۵	۵	۲/۵	۱/۲۵
اشریشیاکلی	۱/۲۵	۰/۶۲	۱/۲۵	۱/۲۵	۲/۵
سودوموناس	۲/۵	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵	۰/۶۲
باسیلوس سرئوس	۱/۲۵	۰/۶۲	۵	۱/۲۵	۲/۵
شیگلا دیسنتری	۱/۲۵	۲/۵	۰/۶۲	۲/۵	۱/۲۵

جدول ۶- حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مختلف علف مار بر روی باکتری‌های استاندارد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

نام باکتری	نوع عصاره				
	آبی	اتانولی	هیدروالکلی	اتیل استات	متانولی
ویبریو کلرا	۵	۲/۵	۱۰	۵	۲/۵
اشریشیاکلی	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵	۲/۵	۵
سودوموناس	۵	۵	۲/۵	۵	۱/۲۵
باسیلوس سرئوس	۲/۵	۱/۲۵	۱۰	۲/۵	۵
شیگلا دیسنتری	۲/۵	۵	۱/۲۵	۵	۲/۵

جدول ۷- حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های اتانولی گیاهان علف مار، علف مورچه و اشورک بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

کد قارچ	حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره علف مار	حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره علف مورچه	حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اشورک
۱	۲۵	۱۲/۵	۵۰
۲	۲۵	۳/۱	۲۵
۳	۲۵	۲۵	۱۲/۵
۴	۱۲/۵	۱۲/۵	۲۵
۵	۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵
۶	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰
۷	۵۰	۲۵	۱۲/۵
۸	۲۵	۱۲/۵	۵۰
۹	۵۰	۲۵	۲۵

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برابر با ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسنتری* را مهار کرده است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی در برابر باکتری‌های *ویبریو کلرا*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* برابر با ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است، کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی اشورک برابر با ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری *باسیلوس سرئوس* در این غلظت از بین رفته است.

در مطالعه Khan و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی، آلکالوئید اشورک را بررسی کردند نتایج نشان داد که عصاره آلکالوئیدی تأثیر خوبی در برابر باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین دارد (۱۱).

در مطالعه Shehzad و همکاران سنتز نانو ذرات در عصاره ریشه اشورک انجام دادن فعالیت ضد میکروبی نشان داد نانو ذرات سنتزی باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی در برابر *اشریشیاکلی* به نسبت *باسیلوس سابتیلیس* شده است (۱۲).

در مطالعه Khan و همکاران که فعالیت ضد قارچی عصاره متانولی اشورک را بررسی کردند نتایج نشان داده که قطر هاله مهاری در برابر قارچهای *T. longifusis*، *C. albicans*، *F. solani* برابر با ۰/۵±۲۵، ۱±۲۳ و ۱/۵±۱۸ میلی‌متر بوده است درحالی‌که قطر هاله مهاری عصاره کلروفرمی در برابر *T. longifusis*، *A. flavus* و *M. canis* برابر با ۰/۵±۱۰، ۱±۷ و ۱/۵±۱۱ میلی‌متر بوده است (۱۳).

در مطالعه Kabi و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی اشورک بر روی باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف را بررسی کردند نتایج نشان داد که بیشترین نرخ مهار باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز (۴۹/۲ درصد) در مقایسه باکتری‌های غیر تولیدکننده بتالاکتاماز (۵۰/۸ درصد) بوده است (۱۴). در حالی که در تحقیق حاضر کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره‌های علف مار مربوط به عصاره اتانولی بوده که برابر با ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* مهارشده و در همین غلظت عصاره هیدروالکلی و متانولی مهارکننده باکتری‌های *شیگلا دیسنتری* و *سودوموناس آئروژینوزا* بوده‌اند.

علف مار خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال دارد (۱۵)، به طوری‌که آثار ضد باکتریایی پلی‌ساکاریدهای برگ این گیاه بر باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی*، *شیگلا* و *سالمونلا*) مؤثرتر از باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس پانیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) بود (۱۵). همچنین خواص ضد میکروبی ریشه گیاه علف مار نیز بررسی شده است (۱۶)، که به وفور در طب سنتی جنوب کشور ایتالیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. خواص ضد باکتریایی ریشه علف مار به ترکیبات هتروسیلیک آن منسوب شده است. Boqa و همکاران فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه علف مار را بر علیه رشد *Deinococcus radiophilus* نشان داده‌اند (۱۶).

در مطالعه Kalpana و Prakash که فعالیت ضد میکروبی برگ و میوه علف مار را بررسی و نشان دادند که قطر هاله مهاری عصاره اتانولی برگ علف مار با غلظت ۱۰۰۰ppm در برابر باکتری‌های *B. subtilis*، *E. faecalis*، *E. coli*، *Klebsiella*، *P. aeruginosa* و *S. aureus* برابر با ۲/۱، ۱/۵، ۲، ۰/۹، ۱/۶ و ۱ سانتی‌متر بوده است درحالی‌که قطر هاله مهاری عصاره اتانولی میوه علف مار در برابر همین باکتری‌ها برابر با ۱/۷، ۲/۳، ۲/۱، ۱/۵، ۲/۴ و ۱/۶ سانتی‌متر بوده است (۱۷).

در مطالعه مقصودی و سعیدی که اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه علف مار را بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* بررسی کردند نتایج نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است که ۳ سویه در این غلظت از بین رفته است درحالی‌که بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۱۸). در حالی که در تحقیق حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی علف مار در عصاره‌های اتانولی، هیدروالکلی و متانولی بر علیه باکتری‌های سودوموناس، باسیلوس سرئوس و شیگلا دیسنتری برابر با ۰/۶۲ بوده که نشان‌دهنده تأثیر بیشتر این عصاره بر این باکتری‌های نامبرده می‌باشد.

در مطالعه Mahboubi که فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی، اتانولی، اتیل استات و متانولی عصاره برگ و ریشه علف مار را بررسی کردند نتایج نشان داد که عصاره آبی ریشه علف مار خاصیت مهارکنندگی بیشتری در برابر باکتری‌ها نسبت به عصاره الکلی علف مار نشان داده است (۱۹). در تحقیق حاضر مشخص شد که بسته به نوع باکتری حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای عصاره‌های مختلف متفاوت می‌باشد.

عصاره متانولی ساقه و شاخه علف مار که در برابر *باسیلوس سابتیلیس* بررسی شد نتایج نشان داد که قطر هاله مهاری به ترتیب برابر با ۲۶/۸ و ۲۴/۶ میلی‌متر بوده است (۲۰). Mazarei و همکاران نشان دادند که پلی‌ساکاریدهای برگ علف مار بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در برابر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *سالمونلا تیفی* و *سالمونلا دیسنتری* دارد (۱۵). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی مربوط به عصاره متانولی علف مورچه بوده و برابر با ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که باکتری *باسیلوس سرئوس* در این غلظت از بین رفته است.

در مطالعه Thirunavukkarasu و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عصاره علف مورچه را بررسی کردند نتایج نشان داد که قطر هاله مهاری عصاره آبی علف مورچه در برابر باکتری‌های *S. aureus*، *B. pumilus*، *B. subtilis*، *P. aeruginosa*، *K. pneumoniae* و *E. coli* برابر با ۵، ۹، ۷، ۶، ۴ و ۱ میلی‌متر بوده است (۲۱). در مطالعه Suganthi و همکاران قطر هاله مهاری عصاره اتیل استات علف مورچه در برابر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *پروتئوس* و *سودوموناس* برابر با ۴، ۴، ۲ و ۳ میلی‌متر، قطر هاله مهاری عصاره متانولی در برابر همین باکتری‌ها برابر با ۵، ۵، ۷ و ۴ میلی‌متر بوده است (۲۲).

در مطالعه Balasubramanian و همکاران که فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات سنتز شده در علف مورچه را بررسی کردند نتایج نشان داد که قطر هاله مهاری با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۴-۱۰-۱۱ و ۱۴ میلی‌متر در برابر باکتری‌های *P. aeruginosa*، *S. aureus*، *E. coli*، *E. faecalis* ایجاد کرده است (۲۳). در مطالعه شهرکی و همکاران حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه علف مورچه در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* برابر با ۹۸ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و حداقل غلظت کشندگی در برابر همین باکتری‌ها برابر با ۳۲۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت عصاره اشورک، علف مورچه و علف مار با حلال‌های مختلف مهارکننده رشد باکتری‌های بیماری‌زا است که می‌توان از این گیاهان برای درمان بیماری‌های عفونی استفاده کرد.

References

1- Davari A, Solouki M, Fazeli-Nasab B. Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of *Satureja hortensis* L. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants 2018;5(4):1-20.

2- Yang Y, Xi-Qiang L, Chun-Ping T. Natural products chemistry research 2006's progress in China. Chin J Nat Med 2008;6(1):70-78. https://doi.org/10.1016/S1875-5364(09)60008-X

3- Islam S, Rahman A, Sheikh MI, *et al.* In vitro antibacterial activity of methanol seed extract of elettaria cardamomum (L.) maton. Agriculturae Conspectus Scientificus 2010;75(3):113-117.

4- Baeshen NA, Elkady AI, Abuzinadah OA, Mutwakil MH. Potential anticancer activity of the medicinal herb, Rhazya stricta, against human breast cancer. African journal of biotechnology 2012;11(37):8960-8972. https://doi.org/10.5897/AJB12.570.

5- Akhgari A. Alkaloids of in vitro cultures of Rhazya stricta. VTT Science, Dissertation 93 2015.

6- Gilani SA, Kikuchi A, Shinwari ZK, *et al.* Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies of *Rhazya stricta* Decne. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 2007;21(4):301-307. https://doi.org/10.1002/ptr.2064

7- Baeshin NA, Twaty N, Al-Hebshi A. Evaluating the genotoxicity of Rhazya stricta leaves extract by the Saccharomyces cerevisiae auxotrophic mutants test. Egyp. J. Nat. Toxi 2005;2(87-100.

8- Abadi F, Abdulaziz A, Hadhoud A, *et al.* An epidemiological survey and evaluation of the antimicrobial growth effect of Rhazya stricta (Decne) leaves extract on different genotypes of Neisseria meningitides. Egypt J Med Microbiol 2011;20(2):77À86.

9- Baeshin N, Sabir J, Qari S. Cytogenetic and molecular evaluations of genetic effects of leaf extract of Rhazya stricta (Decne) on Allium cepa root tip meristems. Egyptian Journal of Genetics and Cytology 2016;38(1).

10- Alcántara M, Morales M, Carnés J. Food allergy to caper (Capparis spinosa). Journal of investigational allergology & clinical immunology 2013;23(1):67-69. PMID:23653983

11- Khan R, Baeshen MN, Saini KS, *et al.* Antibacterial activities of Rhazya stricta leaf extracts against multidrug-resistant human pathogens. Biotechnology & Biotechnological Equipment 2016;30(5):1016-1025. https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1209087

12- Shehzad A, Qureshi M, Jabeen S, *et al.* Synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using Rhazya stricta. PeerJ 2018;6(e6086. PubMed 30588401

13- Khan S, Khan GM. In vitro antifungal activity of Rhazya stricta. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 2007;20(4):279-284. PMID:17604249

14- Kabli SAA, Hadhoud AEDA, Baeshen MN. An epidemiological survey of extended-spectrum β-lactamases producing bacteria genotypes and the evaluation of the antimicrobial effect of Rhazya stricta leaf extract. Microbiology Research 2012;3(2):e16-e16. https://doi.org/10.4081/mr.2012.e16

15- Mazarei F, Jooyandeh H, Noshad M, Hojjati M. Polysaccharide of caper (Capparis spinosa L.) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. Int J Biol Macromol 2017;95(224-231. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.049

16- Boga C, Forlani L, Calienni R, *et al.* On the antibacterial activity of roots of Capparis spinosa L. Nat Prod Res 2011;25(4):417-421. https://doi.org/10.1080/14786419.2010.487189

17- Kalpana B, Prakash M. Antibacterial activity of Capparis sepiaria L.(Capparidaceae) leaves and fruits. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci 2015;4(1):1007-1012.

18- Maghsoudi A, Saeedi S. Study of antimicrobial effects of ethanol extract of caper plant from Sistan on antibiotic resistant Salmonella typhimurium. New Findings in Veterinary Microbiology 2018;1(1):66-73.

19- Mahboubi M, Mahboubi A. Antimicrobial activity of Capparis spinosa as its usages in traditional medicine. Herba Polonica 2014;60(1):39-48. https://doi.org/10.2478/hepo-2014-0004

20- Gull T, Sultana B, Bhatti IA, Jamil A. Antibacterial potential of Capparis spinosa and Capparis decidua extracts. International Journal of Agriculture and Biology 2015;17(4):727–733 https://doi.org/10.17957/IJAB/14.0007

21- Thirunavukkarasu P, Ramanathan T, Manigandan V, *et al.* Antimicrobial Effect of Costal Sand Dune Plant of Cressa cretica. Diamond 2000;9(4):355-363.

22- Suganthi G, Sripathy SK, Manian K. HPTLC and antibacterial analysis of extracts of Cressa cretica Linn. Anc Sci Life 2008;27(3):1-14. PMCID: PMC3330855; PMID: 22557271

23- Balasubramanian S, Eyapaul U, Bosco AJ, Kala S. Green Synthesisof Silver Nanoparticles Using Cressa Cretica Leaf Extract and its Antibacterial Efficacy. International Journal of Advanced Chemical Science and Applications (IJACSA) 2015;3(1):65-71.

24- Shahraki S, Shahraki T. Investigation of antioxidant, anti-bacterial properties and binding to human serum albumin in the Cressa cretica L. grown in the Sistan region. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants 2018;6(1):11-20.

Evaluation of antibacterial and antifungal activity of various extracts of the *Rhazya stricta* , *Capparis spinosa* , *cretica Cressa*

Saeede Saeidi[1], Bahman Fazeli-Nasab[*2]

1- Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Lecturer, Research Dept. Of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: April 26, 2019; Revise: October 5, 2019; Accept: October 19, 2019

Summary

This study aimed to evaluate the antibacterial and antifungal activity of various extracts of the *Rhazya stricta*, *Capparis spinosa*, *cretica Cressa*. *Rhazya stricta*, *Capparis spinosa*, *cretica Cressa* plant collected from Saravan city, Sistan and Balouchestan Province. Extraction with different solvents was performed with a rotary machine. Standard bacteria were purchased from Persian Type Culture Collection (PTCC). Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were determined by the micro-dilution method. The results of this study showed that the lowest inhibitory concentration of the aqueous extract against *E. coli*, *Bacillus cereus*, and *Shigella dysenteriae* was 2.5 mg/ml. The results of this study also showed that the lowest inhibitory concentration was related to methanolic extracts of *Cressa*, which is equal to 0.62 mg/ml and *Bacillus cereus* bacterium is inhibited in this concentration. The lowest inhibitory concentration of the *Caper* extract (0.62 mg/ml) that inhibited *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*, belonged to ethanolic extract. Also in the same concentration, the hydroalcoholic and methanolic extracts inhibited *Shigella disneraceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The results of this study indicate that the extract of the *Cressa* and *Caper* herb has good antimicrobial effects on fungal and bacteria pathogenesis.

Keywords: *Rhazya stricta, Capparis spinosa, cretica Cressa, Different solvents, Pathogenic bacteria*

بررسی ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی پنیر سنتی کوزه‌ای (کوپه) استان کردستان

زهره مشاک [۱*]، جواد روشنی [۲]

۱ - گروه بهداشت مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی، واحد کرج،دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲ - گروه بهداشت مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی، واحد کرج،دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

دریافت مقاله : ۲۷ اردیبهشت ۱۳۹۸، بازنگری: ۹ تیر ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۱۱ شهریور ۱۳۹۸

چکیده

پنیر کوزه‌ای نوعی پنیر با بافت نیمه سخت و کرم رنگ است که دارای مقدار زیادی چربی و عطر و طعم تند بوده و در نواحی غرب و شمال غربی ایران به صورت سنتی تولید می‌شود. هدف این مطالعه بررسی شاخص‌های شیمیایی و میکروبی در نمونه‌های پنیر کوزه‌ای استان کردستان بود. تعداد ۸۴ نمونه پنیر سنتی کوزه‌ای در فصل زمستان ۱۳۹۷، از شهرهای سقز، بانه و سنندج به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. آزمون‌های شیمیایی شامل اندازه‌گیری ماده خشک، اسیدیته، pH، چربی، پروتئین، خاکستر، نمک، کلسیم و فسفر و آزمون‌های میکروبی شامل شمارش کلی‌فرم‌ها و کپک و مخمر و شناسایی میکروارگانیسم‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، سالمونلا و *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های پنیر کوزه‌ای بود. میانگین ماده خشک ۵۷/۲۵ درصد، pH ۵/۵۹، اسیدیته ۸۳/۶۹ درجه دورنیک، پروتئین ۴۳/۰۱ درصد، چربی ۲۲/۵۲ درصد، خاکستر ۱۰/۵۸ درصد، نمک ۶/۷۹ درصد، کلسیم ۱/۰۲ گرم در ۱۰۰ گرم و فسفر ۰/۶۷ گرم در ۱۰۰ گرم بود. آلودگی به سالمونلا و *لیستریا مونوسیتوژنز* در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد و آلودگی به کلی‌فرم ۴۵/۲ درصد، *اشریشیا کلی* ۳۱/۰ درصد، کپک و مخمر ۲۳/۸ درصد و *استافیلوکوکوس ارئوس* ۱۱/۹ درصد بود. پنیر کوزه‌ای استان کردستان سرشار از منابع پروتئین، کلسیم و فسفر بوده و ارزش غذایی بالایی دارد. اما از نظر میکروبی (*استافیلوکوکوس ارئوس*، کلی‌فرم، *اشریشیا کلی* وکپک و مخمر) غیرقابل قبول بوده و فرایند تولید و عرضه آن نیازمند نظارت‌های بهداشتی است. تولید صنعتی پنیر کوزه‌ای می‌تواند به بهبود کیفیت بهداشتی آن کمک کند، و در ضمن می‌تواند منجر به گسترش عرضه این فراورده سودمند در ایران و سایر کشورها شود.

واژگان کلیدی: *پنیر کوزه‌ای، استان کردستان، ویژگی‌های شیمیایی، ویژگی‌های میکروبی*

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

مقدمه

در سال‌های اخیر علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر صنایع لبنی و صنعتی شدن تولید لبنیات، بسیاری از مصرف‌کنندگان تمایل به مصرف محصولات لبنی سنتی دارند که از عوامل مؤثر در این مسأله می‌توان به بهتر بودن ویژگی‌های ارگانولپتیک و دارا بودن خصوصیات سلامتی‌بخش این محصولات اشاره نمود. همچنین فراورده‌های سنتی لبنی با ذائقه مصرف‌کنندگان و عادات مصرف بومی- منطقه‌ای سازگار است (۴-۱). در ایران تولید پنیر از گذشته معمول بوده است و هنوز گرایش زیادی به استفاده از پنیرهای غیر پاستوریزه و محلی وجود دارد. به عنوان مثال در نواحی شمال غرب و غرب کشور پنیر لیقوان و پنیر کوزه‌ای و در نواحی شمال و شمال شرقی کشور پنیر خیکی به دلیل عطر و طعم مطلوب، از معروف‌ترین و پرطرفدارترین محصولات می‌باشند (۵-۳). پنیر کوزه‌ای نوعی پنیر با بافت نیمه‌سخت و کرم رنگ است که دارای مقدار زیادی چربی و عطر و طعم تند بوده و در کشورهای مختلف از جمله یونان، ترکیه و ایران به صورت سنتی تولید می‌شود (شکل ۱). این فراورده می‌تواند با شیر تازه بز، گاو یا گوسفند تهیه شود. در بعضی از مناطق آذربایجان و کردستان، مخصوصاً مناطق روستایی، به شیوه سنتی معده گوساله را به قطعاتی بریده و پس از خشک کردن به مدت ۲ هفته در مقداری آب قرار می‌دهند و در نهایت عصاره به‌دست آمده را با نام محلی هون (Haven) به مایه پنیر اضافه می‌کنند (۶، ۷). مراحل تولید پنیر کوزه‌ای شامل مایه زدن به شیر خام، دلمه بستن، جداسازی آب‌پنیر، آب‌نمک‌گذاری، خرد کردن، نمک زدن، آب‌گیری و انبار کردن است. پس از رسیدن پنیر می‌توان آن را در کوزه سفالی، پوست دباغی شده گوسفند یا بز، دبه پلاستیکی یا قوطی حلبی و در انبار، کاهدان و یا زیر خاک نگهداری کرد. انواع پنیر کوزه‌ای در ایران به نام‌های مختلفی از جمله پنیر کوزه گاوی و یا گوسفندی، پنیر مهاباد، پنیر ماکو، پنیر کنگر، پنیر زیره، پنیر کرفس، پنیر سیرک و پنیر دری نامیده می‌شود (۸-۶).

ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی پنیر کوزه‌ای و مطابقت این شاخص‌ها با معیارهای تعیین شده، از نظر تضمین صحت و سلامت محصول دارای اهمیت بوده و می‌تواند راهی برای عرضه مطمئن و گسترش تولید آن باشد. همچنین ارزیابی میکروبی از نظر تعیین وضعیت بهداشتی محصول و پاتوژن‌های موجود در آن مهم است، که به دلیل استفاده از شیر خام آلوده در تهیه پنیر، عدم پاستوریزاسیون، و همچنین نگهداری در زیر خاک و آلودگی به میکروارگانیزم‌های پاتوژن، می‌تواند خطر فساد و یا آلودگی به پاتوژن‌های بیماری‌زا را افزایش دهد (۱۰-۸).

تا کنون ویژگی‌های فراورده‌های لبنی متعددی مشابه با پنیر کوزه‌ای موجود در ایران، در نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار گرفته است. هایال اوغلو و همکاران (۲۰۰۷) تفاوت نگهداری پنیر سنتی ترکیه را در ظروف پلاستیکی یا پوست بز بر ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی و میکروبی آن بررسی نمودند (۱۰). تنوع میکروبی پنیر فوسا (با استفاده از روش PCR) که به‌طور سنتی در کشور ایتالیا تولید می‌شود، توسط باربیری و همکاران (۲۰۱۲) مورد بررسی قرار گرفته و ارتباط بین میکروارگانیسم‌های نمونه‌های پنیر و محیط رسیدن آنها به اثبات رسید (۱۱). در ایران نیز حسامی‌راد و همکاران (۲۰۰۶) ویژگی‌های شیمیایی انواع پنیر کوزه‌ای آذربایجان غربی را بررسی نموده و میزان ماده خشک (۵۳ الی ۵۵)، پروتئین (۲۲/۴ الی ۲۲/۶) و چربی (۲۴ الی ۲۶)درصد ، را گزارش نمودند (۳). ویژگی‌های میکروبی پنیر کوزه‌ای آذربایجان غربی توسط آقازاده مشکی (۲۰۰۷) بررسی شد و نتایج نشان دهنده

وجود میکروارگانیسم‌هایی نظیر *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس ارئوس* در نمونه‌های پنیر پیش از رسیدن در آب نمک بود. در حالی که در پنیرهای رسیده این دو باکتری بیماری‌زا یافت نشد (۱۲). پاکبین و همکاران (۲۰۱۵) خصوصیات فیزیکو شیمیایی و میکروبی پنیر کوزه‌ای شهر قزوین را بررسی نموده با توجه به آلودگی‌های مشاهده شده، بهداشت این فراورده را در حد ضعیف گزارش نمودند (۱۳).

شکل ۱- پنیر سنتی کوزه‌ای تولید شده در استان کردستان

در شهرهای مختلف استان کردستان به خصوص شهر سقز، این فراورده به صورت سنتی با نام محلی کوپه تولید می‌شود. به این صورت که پنیر از شیر پاستوریزه نشده گوسفند و با افزودن عصاره هون تهیه شده ، سپس خرد شده و پس از نمک‌زنی، به صورت فشرده درون کوزه سفالی قرار داده می‌شود. سپس در کوزه‌ها با گل مسدود شده و کوزه بیش از ۳ ماه، به صورت وارونه در عمق حدود ۱ متر زیر خاک انبار می‌شود (۳، ۱۴، ۱۵). با توجه به نحوه تولید بومی این فراورده در استان کردستان و تفاوت آن با پنیر کوزه‌ای سایر استان‌های کشور، تا کنون تحقیقی جهت بررسی ویژگی‌های آن انجام نشده است. با توجه به تولید و مصرف بالای این فراورده در منطقه کردستان، هدف این مطالعه بررسی شاخص‌های شیمیایی و میکروبی در نمونه‌های پنیر کوزه‌ای منطقه مزبور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه تحلیلی مشاهده‌ای و جامعه آماری شامل نمونه‌های پنیر سنتی کوزه‌ای استان کردستان بود. تعداد ۸۴ نمونه پنیر کوزه‌ای در فصل زمستان، از شهرهای سقز (۴۴ نمونه)، بانه (۱۶ نمونه) و سنندج (۲۴ نمونه) به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. به کمک چاقوی استریل از هر نمونه پنیر کوزه‌ای ۲۵۰ گرم، از قسمت‌های سطحی و عمقی برداشت شده و درون ظرف شیشه‌ای استریل قرار داده شده و در کنار یخ خشک به آزمایشگاه ارسال گردید.

آزمون‌های شیمیایی: آزمون‌های شیمیایی شامل اندازه‌گیری ماده خشک، اسیدیته، pH، چربی، پروتئین، خاکستر، نمک، کلسیم و فسفر برای هر یک از نمونه‌های پنیر بود. کلیه مواد و شناساگرهای مورد استفاده مربوط به شرکت مرک آلمان بود.

تعیین ماده خشک نمونه‌ها به کمک توزین قبل و بعد از تبخیر آب موجود در آزمونه مخلوط شده با شن، به وسیله آون در دمای ۲±۱۰۲ درجه سلسیوس انجام گرفت (استاندارد ملی ایران ۱۷۵۳). اندازه‌گیری اسیدیته هر یک از نمونه‌ها به روش عیارسنجی با هیدروکسید سدیم با شناساگر فنل فتالئین و تعیین pH به کمک دستگاه pH متر (متروم مدل ۶۳۲، سوئیس) انجام شد (استاندارد ملی ایران ۲۸۵۲). مقدار پروتئین به روش کلدال و به کمک دستگاه تکاتور انجام شد. مراحل آزمایش شامل هضم مواد آلی توسط اسید سولفوریک و سپس عیارسنجی محتوی آمونیاک آزاد تقطیر شده به عنوان فاکتوری قراردادی جهت محاسبه پروتئین خام بود (استاندارد ملی ایران ۱-۱۰۷۰۳). مقدار چربی پنیر به طریقه وزنی با هضم پنیر در مجاورت اسید کلریدریک و حرارت، استخراج ماده چرب با محلول اتانول، اکسید دی اتیلیک و اتر دوپترول، تبخیر حلال‌ها و توزین باقی‌مانده انجام شد (استاندارد ملی ایران ۷۶۰). میزان خاکستر کل به کمک خشک کردن، کربونیزه کردن و سپس سوزاندن نمونه‌های پنیر در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس در کوره، سپس سرد کردن و نهایتاً توزین باقی مانده حاصله محاسبه شد (استاندارد ملی ایران ۱۱۱۴۳). اندازه‌گیری درصد نمک با از بین بردن مواد آلی پنیر توسط پرمنگنات پتاسیم و نیتریک اسید و سپس تعیین کلرور محتوی نمونه، توسط عیارسنجی با املاح نیترات نقره در حضور محلول نیتریک اسید و در مجاورت سولفات آمونیاکی آهن سه ظرفیتی، با شناساگر تیوسیانات آمونیوم انجام شد (استاندارد ملی ایران ۱۸۰۹). جهت اندازه‌گیری کلسیم نمونه‌های پنیر، ابتدا مواد آلی با روش هضم مرطوب به کمک ماکروویو باز تجزیه شد و سپس محلول هضم شده در محلول اسید نیتریک رقیق شد. سپس با دستگاه طیف سنج جذب اتمی (GBC مدل ۹۰۲، استرالیا) اتمیزه شده و جذب در طول موج ۶۹۹/۹ نانومتر اندازه‌گیری شد (استاندارد ملی ایران ۱۰۷۸۰). جهت اندازه‌گیری مقدار فسفر کل در نمونه‌ها، ابتدا پنیر به وسیله اسید سولفوریک غلیظ و پراکسید هیدروژن هضم شد. سپس با اضافه کردن محلول سدیم مولیبدات - اسکوربیک اسید و تشکیل مولیبدن، جذب مولکولی رنگ آبی تشکیل شده با استفاده از طیف‌سنج (پرکین- المر کلمن ۶۱۲۰، ایالات متحده) در طول موج ۸۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (طبق استاندارد ملی ایران - ۱۸۰۸). با توجه به کیفیت و فرایند متفاوت تولید پنیر کوزه‌ای نسبت به سایر پنیرها، استانداردی جهت مقایسه نتایج وجود نداشت (۱۶).

جدول ۱- حدود استاندارد برای ویژگی‌های میکروبی پنیر بر اساس استاندارد ملی ایران ۱-۲۳۴۴ (۱۸)

آزمون	حد استاندارد
استافیلوکوکوس ارئوس	منفی در ۱ گرم
اشریشیا کلی	منفی در ۱ گرم
شمارش میکروارگانیسم‌های کلی‌فرم	کمتر از Log_{10} CFU ۱ در گرم
کپک و مخمر	کمتر از Log_{10} CFU ۲ در گرم
سالمونلا	منفی در ۲۵ گرم
لیستریا مونوسیتوژنز	حد مجاز برای آن تعیین نشده است

آزمون‌های میکروبی: آزمون‌های میکروبی شامل شمارش کلی‌فرم‌ها و کپک و مخمر و همچنین شناسایی میکروارگانیسم‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، سالمونلا و *لیستریا مونوسیتوژنز* بود. کلیه مواد و محیط‌های کشت مورد استفاده مربوط به شرکت مرک آلمان بود. جهت تهیه رقت اولیه از نمونه‌های پنیر کوزه، مقداری از هر نمونه تحت شرایط سترون به مدت ۱ دقیقه خرد شده و سپس ۱۰ گرم از هر نمونه در یک ظرف استریل وزن شده به همراه ۹۰ میلی‌لیتر سیترات سدیم درون کیسه پلاستیکی استریل انتقال داده شد و به کمک دستگاه مخلوط‌کن ضربه‌ای (استومیکر اینترسایسنس، فرانسه) به مدت ۲/۵ دقیقه همگن گردید. سپس از رقت اولیه (رقت 10^{-1}) ساخته شده، در لوله‌های محتوی ۹ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم استریل، رقت‌های متوالی ده برابر تا 10^{-3} تهیه شد. رقت‌های آماده شده جهت کشت شمارش کلی‌فرم و کشت کپک و مخمر استفاده شد (استاندارد ملی ایران ۵-۸۹۲۳). جهت شمارش کلی‌فرم‌ها از محیط کشت غنی‌کننده انتخابی لوریل سولفات تریپتوز به روش MPN ۳ لوله‌ای در h ۴۸/ ۳۰ درجه سلسیوس و سپس کشت در محیط تاییدی بریلیانت گرین لاکتوز بایل براث (مرک، آلمان) در h ۴۸/ ۳۰ درجه سلسیوس استفاده شد (استاندارد ملی ایران ۱۱۱۶۶). شمارش کپک و مخمر با کشت رقت‌های تهیه شده از هر نمونه به روش سطحی در محیط کشت عصاره مخمر- دکستروز حاوی اکسی تتراسایکلین آگار، به صورت دوتایی h ۲۵/۱۲۵ درجه سلسیوس و سپس تأیید به روش بررسی میکروسکپی انجام شد (استاندارد ملی ایران ۱۰۱۵۴) (۱۶).

جهت شناسایی *اشریشیا کلی* از غنی‌کننده انتخابی لوریل سولفات تریپتوز به روش MPN ۳ لوله‌ای در h ۴۸/ ۳۷ درجه سلسیوس، کشت در محیط اختصاصی *اشریشیا کلی* براث در h ۴۸/ ۴۴ درجه سلسیوس و سپس کشت در محیط پپتون واتر در h ۴۸/ ۴۴ درجه سلسیوس و آزمون اندول استفاده شد (استاندارد ملی ایران ۵۲۳۴). برای شناسایی *استافیلوکوکوس ارئوس* از غنی‌سازی در محیط کشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی براث و انکوباسیون در h ۴۸/ ۳۷ درجه سلسیوس، سپس کشت سطحی در محیط انتخابی برد پارکر آگار و انکوباسیون در h ۴۸/ ۳۷ درجه سلسیوس و در نهایت تأیید به کمک آزمون کواگولاز استفاده شد (استاندارد ملی ایران ۳-۶۸۰۶). شناسایی سالمونلا نیز طی مراحل پیش‌غنی‌سازی به کمک رقت ۲۲۵ml/ ۲۵g در بافر پپتون واتر و مخلوط کردن به مدت ۳ دقیقه و انکوباسیون در h ۱۸/ ۳۷ درجه سلسیوس، غنی‌سازی در محیط راپاپورت واسیلیادیس منیزیم کلراید- سبز مالاشیت در h ۴۱/۵/۴۸ درجه سلسیوس و در محیط سلنیت- سیستین در h ۳۷/۴۸ درجه سلسیوس، کشت افتراقی و تکمیلی به صورت کشت سطحی دوتایی بر روی محیط کشت برلیانت گرین فنل رد آگار و محیط سالمونلا- شیگلا آگار در h ۳۷/۴۸ درجه سلسیوس و سپس آزمون‌های بیوشیمیایی در محیط‌های کشت سه قندی آهن دار، لیزین آگار حاوی آهن و محیط کشت اوره و آزمون‌های سرولوژیکی صورت گرفت (استاندارد ملی ایران ۴۴۱۳). شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* طی مراحل غنی‌سازی به کمک رقت ۲۲۵ml/ ۲۵g در محیط لیستریا براث و انکوباسیون در h ۲۴/ ۳۰ درجه سلسیوس، کشت سطحی بر روی محیط کشت انتخابی لیستریا آگار (پالکام) h ۳۵/۲۴ درجه سلسیوس و سپس تأیید کلنی‌های رشد یافته به کمک مشاهده میکروسکوپی، تست حرکت در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس و تست عدم تخمیر قندهای رامنوز، گزیلوز و مانیتول انجام گرفت (۱۷).

در نهایت نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های میکروبی با مقادیر مجاز مربوطه مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۱) (۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تحلیل آماری از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۵ استفاده شد. پس از بررسی میانگین و انحراف معیار شاخص‌های مطالعه نمودارهای مربوطه رسم شد. اختلاف بین نتایج شهرهای مختلف به کمک آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه ANOVA و همبستگی بین شاخص‌های مورد بررسی به کمک آزمون پیرسون و اسپیرمن با حد احتمال $p<۰/۰۵$ بررسی شد.

نتایج

میانگین و انحراف معیار هر یک از شاخص‌های شیمیایی و میکروبی مورد بررسی به تفکیک شهرهای مورد بررسی به ترتیب در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

در نمونه‌های پنیر کوزه‌ای مورد بررسی میانگین ماده خشک ۵۷/۲۵ درصد، pH ۵/۵۹، اسیدیته ۸۳/۶۹ درجه دورنیک، پروتئین ۴۳/۰۱ درصد، چربی ۲۲/۵۲ درصد، خاکستر ۱۰/۵۸ درصد، نمک ۶/۷۹ درصد، کلسیم ۱/۰۲ میلی‌گرم در گرم و فسفر ۰/۶۷ میلی‌گرم در گرم بود. با توجه به آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA، تفاوت قابل توجهی بین نتایج آزمون‌های شیمیایی نمونه‌های پنیر شهرهای مختلف مورد مطالعه مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

با توجه به نتایج آزمون‌های میکروبی، آلودگی به سالمونلا و *لیستریا مونوسیتوژنز* در هیچ کدام از نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. در نمونه‌های پنیر به دست آمده از شهر بانه آلودگی به کپک و مخمر مشاهده نشد. اما ویژگی‌های میکروبی مورد بررسی در نمونه‌های پنیر کوزه‌ای شهرهای مختلف از نظر آماری با هم تفاوت قابل توجهی نداشت ($p>۰/۰۵$).

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های شیمیایی در پنیر کوزه‌ای استان کردستان

	نوع نمونه‌ها			
	سقز	بانه	سنندج	میانگین کل
ماده خشک (درصد)	۵۶/۲۳±۳/۷۵ a	۵۷/۵۶±۶/۶۶ a	۵۸/۸۴±۴/۱۱ a	۵۷/۲۵±۴/۵۴
pH	۵/۷۶±۰/۴۳ a	۵/۳۶±۰/۵۴ a	۵/۴۴±۰/۶۸ a	۵/۵۹±۰/۵۵
اسیدیته (درجه دورنیک)	۷۸/۴۱±۳۳/۰۷ a	۸۹/۷۵±۲۹/۵۲ a	۸۹/۳۳±۳۲/۰۷ a	۸۳/۶۹±۳۱/۸۹
پروتئین (درصد)	۴۴/۶۲±۶/۵۰ a	۴۲/۳۹±۳/۷۱ a	۴۰/۴۷±۳/۹۶ a	۴۳/۰۱±۵/۶۲
چربی (درصد)	۲۳/۱۸±۳/۰۶ a	۲۱/۸۸±۴/۰۶ a	۲۱/۷۵±۵/۱۵ a	۲۲/۵۲±۳/۹۰
خاکستر (درصد)	۱۰/۰۵±۱/۲۷ a	۱۲/۲۰±۲/۷۶ a	۱۰/۴۷±۱/۴۲ a	۱۰/۵۸±۱/۸۳
نمک (درصد)	۶/۱۹±۱/۹۷ a	۷/۵۷±۱/۶۲ a	۷/۳۴±۱/۱۸ a	۶/۷۸±۱/۷۹
کلسیم (گرم در ۱۰۰ گرم پنیر)	۰/۹۷±۰/۶۸ a	۱/۰۹±۰/۲۴ a	۱/۰۵±۰/۱۹ a	۱/۰۲±۰/۵۱
فسفر (گرم در ۱۰۰ گرم پنیر)	۰/۶۵±۰/۲۹ a	۰/۷۸±۰/۱۶ a	۰/۵±۰/۲۱ a	۰/۶۷±۰/۲۴

* حروف کوچک انگلیسی مشابه، نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری بین نتایج نمونه‌های شهرهای مختلف است ($p>۰/۰۵$).

بیشترین آلودگی مشاهده شده در نمونه‌ها مربوط به کلی‌فرم (۴۵/۲ درصد) و سپس *اشریشیا کلی* (۳۱/۰ درصد)، کپک و مخمر (۲۳/۸ درصد) و *استافیلوکوکوس ارئوس* (۱۱/۹ درصد) بود.

هر نمونه پنیر کوزه‌ای در صورت داشتن یک یا چند میکروارگانیسم بیش از حد مجاز، به عنوان نمونه غیرقابل قبول در نظر گرفته شد و به این ترتیب تعداد کل نمونه‌های پنیر کوزه‌ای قابل قبول و غیرقابل قبول از نظر میکروبی محاسبه شد (نمودار ۱). بیشترین درصد نمونه‌های غیرقابل قبول مربوط به شهر سقز (۶۳/۶ درصد) بوده و شهر سنندج (۵۸/۳ درصد) و بانه (۵۰/۰ درصد) رتبه‌های بعدی را داشتند.

بین نتایج به دست آمده از آزمون‌های شیمیایی و نتایج آزمون‌های میکروبی، تست آماری همبستگی پیرسون و اسپیرمن انجام شد که هیچ گونه ارتباط آماری بین شاخص‌های شیمیایی و شاخص‌های میکروبی مشاهده نشد ($p>0.05$).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های میکروبی در پنیر کوزه استان کردستان

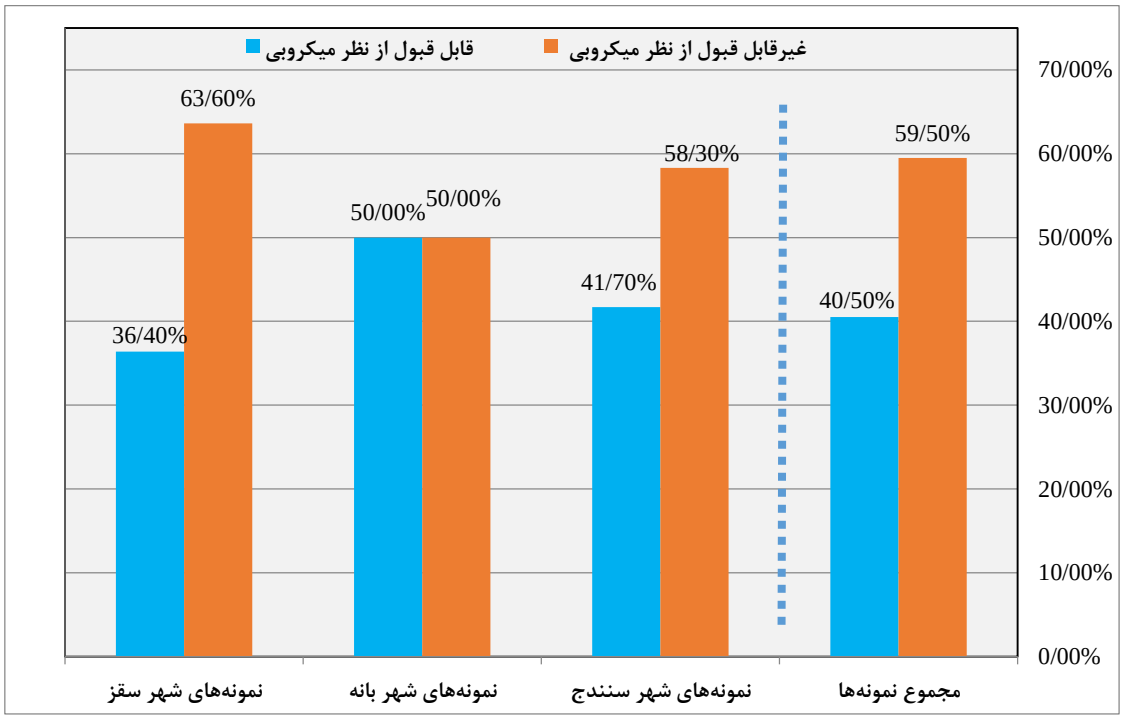
میکروارگانیسم مورد بررسی		نوع نمونه‌ها			
		سقز	بانه	سنندج	میانگین کل
استافیلوکوکوس ارئوس	درصد نمونه‌های آلوده	٪۹/۱ [a]	٪۱۲/۵ [a]	٪۱۶/۷ [a]	٪۱۱/۹
اشریشیا کلی	درصد نمونه‌های آلوده	٪۳۶/۴ [a]	٪۲۵/۰ [a]	٪۲۵/۰ [a]	٪۳۱/۰
کلی‌فرم	شمارش میکروبی (Log_{10} MPN/g)	۴/۴۰±۴/۷۲ [a]	۳/۸۹±۴/۰۴ [a]	۴/۱۶±۴/۴۸ [a]	۴/۲۷±۴/۶۲
	درصد نمونه‌های دارای آلودگی بیش از حد مجاز	٪۵۰/۰	٪۳۷/۵	٪۴۱/۷	٪۴۵/۲
کپک و مخمر	شمارش میکروبی (Log_{10} CFU/g)	۲/۲۴±۲/۷۰ [a]	۱/۰۰±۱/۴۵ [a]	۲/۸۸±۳/۱۲ [a]	۲/۴۹±۲/۹۲
	درصد نمونه‌های دارای آلودگی بیش از حد مجاز	٪۲۲/۷	٪۰	٪۴۱/۷	٪۲۳/۸
سالمونلا	درصد نمونه‌های آلوده	٪۰ [a]	٪۰ [a]	٪۰ [a]	٪۰
لیستریا مونوسیتوژنز	درصد نمونه‌های آلوده	٪۰ [a]	٪۰ [a]	٪۰ [a]	٪۰

* حروف کوچک انگلیسی مشابه، نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری بین نتایج نمونه‌های شهرهای مختلف است ($p>0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

پنیر کوزه‌ای در استان کردستان مصرف‌کنندگان زیادی داشته و به دلیل این که دوره رسیدن ۴ تا ۶ ماهه را در کوزه‌های سفالی و زیر خاک طی می‌کند، از نظر کیفیت ظاهری و فیزیکی با پنیر سفید رسیده در آب نمک متفاوت است (۶، ۸، ۱۲، ۱۳، ۱۵). در این مطالعه ترکیبات شیمیایی و میکروبی پنیر کوزه‌ای استان کردستان بررسی شد تا با مقایسه نتایج به دست آمده، مشکلات و نواقص احتمالی آن را شناخته و در جهت بهبود وضعیت تولید آن اقدام گردد. در جدول ۴ نتایج آزمون‌های شیمیایی انجام شده بر روی نمونه‌های پنیر کوزه‌ای

استان کردستان همراه با نتایج آزمون‌های شیمیایی انجام شده سایر مطالعات در مورد انواع مختلف پنیر ذکر شده است.



نمودار ۱- درصد نمونه‌های پنیر کوزه قابل قبول و غیرقابل قبول از نظر میکروبی

خصوصیات شیمیایی پنیر به عوامل مختلفی از جمله نوع شیر مورد استفاده، نوع استارتر، روش تهیه و آلودگی‌های میکروبی بستگی دارد. به عنوان مثال هر چه درصد نمک و دوره رسیدن پنیر بیشتر باشد، پنیر به دست آمده رطوبت کمتری داشته و ماده خشک آن بیشتر است. در مطالعه حاضر برخی از خصوصیات شیمیایی پنیر کوزه استان کردستان با نتایج به دست آمده از سایر مطالعات قابل مقایسه می‌باشد. این نوع پنیر مانند پنیر چدار و پنیر امنتال با توجه به دوره رسیدن بیش از ۲ ماه، رطوبت کمتری داشته و در دسته پنیرهای نیمه‌سخت طبقه‌بندی می‌شود (۲۰). همچنین به نظر می‌رسد نگهداری پنیر در ظروف سفالی در افزایش میزان ماده خشک پنیر موثر باشد. با توجه به این که در شهر قزوین پنیر کوزه‌ای هم در ظروف سفالی و هم در ظروف پلاستیکی تولید می‌شود، پاکبین و همکاران (۲۰۱۵) پس از مقایسه ۱۰ نمونه با ظرف سفالی و ۱۰ نمونه با ظرف پلاستیکی، عنوان نمودند که ظروف سفالی موجب کاهش رطوبت در نمونه‌های پنیر کوزه و بروز خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی متفاوتی در این نوع پنیر می‌شود (۱۳). میزان ماده خشک نمونه‌های پنیر در مطالعه حاضر ۵۷/۳ درصد بود. آیگون و همکاران (۲۰۰۵) خصوصیات شیمیایی و میکربی پنیر کارا (Carra) را به عنوان نوعی پنیر سنتی کشور ترکیه که مشابه با پنیر کوزه‌ای ایرانی، مرحله نهایی رسیدن را در ظروف سفالی و در زیر زمین طی می‌کند، در منطقه آناتاکیا مورد بررسی قرار داده و این پنیر را (مشابه با پنیر کوزه‌ای کردستان) در دسته پنیرهای نیمه‌سخت دسته‌بندی نمودند (۲۲). در مطالعه دهنوی و همکاران (۲۰۱۳) نمونه‌های مشابه با پنیر کوزه‌ای، در ظروف پلاستیکی تهیه شد

که موجب کاهش ماده خشک در این نمونه‌ها شد و نتایج نشان دهنده تاثیر نوع ظرف نگهداری پنیر بر میزان رطوبت و خصوصیات شیمیایی آن بود (۲۵). در مطالعه دیگر حسن‌زاده و همکاران (۲۰۱۷) جهت بررسی تغییرات شیمیایی پنیر کوزه‌ای طی مراحل مختلف تولید، اقدام به تهیه آزمایشگاهی آن کردند. بررسی تغییرات شیمیایی پنیر کوزه‌ای، نشان دهنده کاهش رطوبت و pH و افزایش ماده خشک و چربی طی دوره رسیدن نمونه‌ها بود (۲۷).

میزان چربی پنیر در مطالعه حاضر ۲۲/۵۲ درصد بود که با نتایج سایر مطالعات بر انواع پنیر کوزه‌ای مطابقت دارد. مقادیر pH، اسیدیته و نمک (به ترتیب ۵/۵۹، ۸۳/۶۹ درجه دورنیک و ۶/۷۸ درصد) نسبت به سایر نمونه‌های پنیر کوزه‌ای متفاوت بود (جدول ۴). در حالی که نتایج به دست آمده از آزمون‌های شیمیایی و میکروبی پنیر کوزه‌ای بین شهرهای مختلف استان کردستان، با هم تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). به نظر می‌رسد که نوع استارتر مورد استفاده، روش ساخت، دوره رسیدن و در نهایت کیفیت پنیر کوزه‌ای شهرهای مختلف استان کردستان، با نمونه‌های پنیر کوزه‌ای سایر شهرها متفاوت است.

نکته قابل توجه در نتایج آزمون‌های شیمیایی بالا بودن مقادیر پروتئین، خاکستر، کلسیم و فسفر (به ترتیب ۴۳/۰۱ درصد، ۱۰/۵۸، ۱/۰۲ گرم در صد گرم و ۰/۶۷ گرم در صد گرم) نمونه‌های این نوع پنیر در استان کردستان نسبت به سایر انواع پنیر است. به طوری که میزان پروتئین آن از سایر نمونه‌های پنیر اعم از انواع پنیر کوزه‌ای و همچنین انواع پنیرهای غنی از پروتئین مانند پنیر امنتال یا پارمزان بیشتر است. همچنین میزان کلسیم و فسفر آن نسبت به پنیرهای با کیفیت و مرغوبی مانند چدار، امنتال نیز بالاتر می‌باشد (جدول ۴). این مقایسه نشان‌دهنده ارزش غذایی بالای این نوع پنیر و همچنین ویژگی‌های مفید تغذیه‌ای آن بوده، به دلیل مراحل رسیدن و نتیجتاً قابلیت هضم بالای آن جهت مصرف کودکان، خانم‌های باردار و کهنسالان توصیه می‌شود. همچنین با توجه به روند متفاوت رسیدن پنیر کوزه‌ای نسبت به پنیرهای رسیده در آب‌نمک، تدوین یک استاندارد ملی جهت ویژگی‌های شیمیایی این نوع پنیر امری ضروری به نظر می‌رسد.

در مطالعه حاضر بین نتایج به دست آمده از آزمون‌های شیمیایی (ماده خشک، اسیدیته، pH، چربی، پروتئین، خاکستر، نمک، کلسیم و فسفر) و آزمون‌های میکروبی (تعداد کلی‌فرم‌ها و کپک و مخمر و آلودگی به میکروارگانیسم‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، سالمونلا و *لیستریا مونوسیتوژنز*) آزمون همبستگی پیرسون و اسپیرمن انجام شد. چنانچه آلودگی میکروبی موجب بروز تغییرات شیمیایی در نمونه‌ها شده باشد (به عنوان مثال کاهش pH)، به کمک این آزمون می‌توان آن را مورد بررسی قرار داد. اما تحلیل آماری ارتباطی میان هیچ یک از شاخص‌های شیمیایی و میکروبی را نشان نداد ($p>0/05$).

در این مطالعه در نمونه‌های مورد بررسی آلودگی به *اشریشیا کلی*، کلی‌فرم و کپک و مخمر بالا بوده و تنها ۴۰/۵ درصد نمونه‌ها از نظر میکروبی قابل قبول است. در مطالعه آیگون و همکاران (۲۰۰۵) ضمن گزارش وضعیت نامناسب بهداشتی پنیر سنتی کارا در منطقه آنتاکیا، مشاهده شد که در ۲۰ درصد نمونه‌ها *استافیلوکوکوس ارئوس*، در ۳۴ درصد کلی‌فرم و در ۱۸ درصد *اشریشیا کلی*، دارای شمارش بیش از Log_{10} CFU/g ۲ بودند.

جدول ۴- مقایسه نتایج آزمون‌های شیمیایی انواع پنیر در مطالعات مختلف

نام محقق	شماره منبع	سال تحقیق (میلادی)	نوع پنیر مورد بررسی	ماده خشک	pH	اسیدیته (درجه دورنیک)	پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	خاکستر (درصد)	نمک (درصد)	کلسیم (گرم در ۱۰۰ گرم پنیر)	فسفر (گرم در ۱۰۰ گرم پنیر)
مطالعه کنونی	-	۲۰۱۹	پنیر کوزه استان کردستان	۵۷/۳	۵/۵۹	۸۳/۶۹	۴۳/۰۱	۲۲/۵۲	۱۰/۵۸	۶/۷۸	۱/۰۲	۰/۶۷
چن و همکاران	۱۹	۱۹۷۳	پنیر پارمزان	۷۰/۰	۵/۳	-	۳۶/۰	۲۶/۰	-	۱/۸	-	-
لوسی و فاکس	۲۰	۱۹۹۳	پنیر چدار	۶۲/۰	۵/۱۲	-	۲۵/۴	-	-	-	۰/۶۳	۰/۵۲
لوسی و فاکس	۲۰	۱۹۹۳	پنیر امنتال	۶۴/۰	۵/۶۳	-	۲۷/۹	-	-	-	۰/۹۲	۰/۶۳
ایلیسیچ و همکاران	۲۱	۲۰۱۶	پنیر لاکتیکی با استارتر سنتی پنیر کوارگ	۲۷/۰	۴/۵۰	-	۱۲/۵	-	-	-	۰/۵۸	۱/۳۸
آیگون و همکاران	۲۲	۲۰۰۵	کارا (Carra)، پنیر کوزه سنتی کشور ترکیه	۵۸/۷	۵/۲۰	-	-	۲۶/۸	-	۷/۸۰	-	-
ترکچی و آکیوز	۲۳	۲۰۰۹	اتلو (Otlu)، پنیر کوزه معطر کشور ترکیه	۴۹/۱۳	۴/۸۰	۱۵۶/۰	۱۹/۳۳	۲۳/۵۷	۴/۹۶	۳/۷۴	-	-
پاکبین و همکاران	۱۳	۲۰۱۵	پنیر کوزه سفالی شهر قزوین	۵۶/۱۹	۴/۱۰	۱۲۴/۰	۲۶/۶۱	۲۰/۱۷	۲/۶۹	۳/۰۸	-	-
حسن‌زاده و همکاران	۲۵	۲۰۱۸	پنیر کوزه تهیه شده با شیر پاستوریزه گاو به روش آزمایشگاهی	۵۰/۰۵	۵/۲۵	۱۴۰/۰	-	۲۳/۱۲	-	-	-	-
دهنوی و همکاران	۲۶	۲۰۱۳	پنیر کوزه تهیه شده با شیر پاستوریزه گاو به روش آزمایشگاهی در دبه پلاستیکی	۳۱/۱۲	۵/۰۶	۶۶	۱۲/۷۱	۴۲/۷۳	-	۳/۷۴	-	-
حسامی راد	۳	۲۰۰۶	کوزه مناطق کوهستانی استان آذربایجان غربی	۵۳/۷	-	-	۲۲/۶	۲۴/۸	-	-	-	-
مهدی‌زاده و همکاران	۲۶	۲۰۱۸	پنیر کوزه تهیه شده با شیر غیرپاستوریزه گوسفند به روش آزمایشگاهی	۶۴/۸۳	۴/۸۰	-	۲۸/۰	۲۳/۱۷	-	۶/۱۱	-	-

همچنین تمامی نمونه‌های مورد بررسی دارای کپک و مخمر با شمارش بیش از ۳ Log_{10} CFU/g بودند (۲۲). در مطالعه پاکبین و همکاران (۲۰۱۵) در نمونه‌های پنیر رسیده در کوزه‌های سفالی شهر قزوین، میانگین شمارش کلی‌فرم ۲/۰۶، *استافیلوکوکوس ارئوس* ۲/۹۰ و کپک و مخمر ۴/۸۲ Log_{10} CFU/g بود (۱۳). براتی و همکاران (۲۰۱۱) آلودگی میکروبی پنیر کوزه‌ای را در استان آذربایجان غربی بررسی کرده و نتایج نزدیک به مطالعه حاضر را گزارش نمودند. وی آلودگی به *استافیلوکوکوس ارئوس* را ۹/۵ درصد، *اشریشیا کلی* ۳۸/۱ درصد، کلی‌فرم ۵۰/۰ درصد و کپک و مخمر را ۴۰/۵ درصد در نمونه‌ها گزارش نمودند که نشان دهنده خطر بالای آلودگی این فراورده غذایی

می‌باشد (۴).

در مطالعه حاضر آلودگی به *استافیلوکوکوس ارئوس* در نمونه‌های پنیر کوزه‌ای استان کردستان کمتر از ۱۲ درصد بود. میرزایی و همکاران (۲۰۱۲) شیوع *استافیلوکوکوس ارئوس* را در پنیرهای محلی شهر تبریز ۲۴ درصد عنوان نمودند (۲۸). تکینسن و اوزدمیر (۲۰۰۶) خصوصیات میکروبی نوعی پنیر کوزه‌ای ترکیه به نام اوتلو (Otlu) را مورد بررسی قرار داده و آلودگی به استافیلوکوکوس ارئوس را ۱۰۰ درصد گزارش نمودند (۲۹). خلیفه‌زاده و همکاران (۲۰۱۵) شیوع *استافیلوکوکوس ارئوس* را در نمونه‌های پنیر کوزه‌ای شهرستان سقز ۴۱ درصد عنوان کردند (۱۴). از عوامل مشاهده اختلاف با سایر مطالعات، می‌توان شرایط مختلف نگهداری و احتمال آلودگی‌های ثانویه پس از تولید محصول را ذکر کرد.

در مطالعه حاضر هیچ مورد آلودگی به سالمونلا و *لیستریا مونوسیتوژنز* مشاهده نشد. در سایر مطالعات گزارش‌هایی از شیوع این باکتری‌ها در انواع پنیر سنتی گزارش شده است. به عنوان مثال شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیرهای سنتی کشورهای پرتقال، ایتالیا، ترکیه و ایران به ترتیب ۴۶، ۴۴/۸، ۹/۲ و ۱۳/۰۸ درصد گزارش شده است (۳۳-۳۰). تکینسن و اوزدمیر (۲۰۰۶) آلودگی به کلی‌فرم را ۶۲ درصد و سالمونلا را ۶ درصد در نمونه‌های پنیر اتلو گزارش نمودند (۲۹). عباسی‌نژاد و همکاران (۱۳۹۴) ۱۰۰ نمونه پنیر کوزه شهر ارومیه را از نظر شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار دادند. وی میزان آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* را ۳ درصد گزارش کرده و رطوبت پایین، اسیدیته بالا و باکتریوسین‌های موجود در این نوع پنیر را دلیلی بر پایین بودن میزان شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* در آن عنوان کردند (۱۵). حسن‌زاد آذر و همکاران (۲۰۱۴) نمونه‌های پنیر کوزه‌ای استان آذربایجان غربی را مورد بررسی قرار داده و میکروارگانیسم پروبیوتیک *انتروکوکوس فیسیوم* را از آن جداسازی نمودند. آنها نشان دادند که در پنیر فراپالایش تولید شده با این میکروارگانیسم، تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از CFU/g ۵ در ابتدای تولید، پس از ۴۵ روز به صفر رسید (۳۴). با توجه به نتایج شیمیایی و میکروبی مطالعه حاضر نیز به نظر می‌رسد نوع تولید این نوع پنیر و همچنین باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک بومی در این فراورده، می‌توانند مانع از رشد بعضی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در آن گردد.

پنیر سنتی کوزه‌ای استان کردستان ضمن سرشار بودن از منابع پروتئین، کلسیم و فسفر و داشتن ارزش غذایی بالا، مشابه با مطالعات مربوط به نمونه‌های سایر شهرها از نظر میکروبی غیرقابل قبول بوده (۵۹/۵۰ درصد نمونه‌ها) و فرایند تولید و عرضه آن نیازمند نظارت‌های بهداشتی است. فرایند تهیه پنیر کوزه‌ای نیازمند بازنگری بوده و توصیه می‌شود که با استفاده از ظروف و تجهیزات تمیز و شیر پاستوریزه انجام شود. تولید صنعتی این پنیر می‌تواند به بهبود کیفیت بهداشتی آن و در نتیجه گسترش عرضه این فراورده سودمند در عرصه ملی و حتی بین‌المللی کمک شایانی بنماید.

References

1- Mashak Z Halal Food Safety. 1st ed. Tehran: Azarfar Press; 2018, P: 15 [In Persian].

2- Mashak Z, Moradi B, Akhondzadeh Basti A, Abbasifar A, Gandami H. Study of the behavior of *Listeria monocytogenes* in the process of producing Iranian white cheese under the influence of *Zataria essential* oil. J Med Plants. 2009; 29(8):114-22 [In Persian].

3- Hesaami-Rad R. Determination of chemical ingredients in Pot cheeses. Research Report. Tabriz: West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center publishing; 2006, P: 85 [In Persian].

4- Barati E, Moghaddam MD, Ghobadi N, Shafieian HR, Barin A. The survey of microbiological contamination of Pitcher Cheese in West Azarbayjan Province, Iran. Life Sci. 2012; 6(3): 248-52.

5- Najafi A, Ziabakhsh Dm, Karimian H, Abedinia AR, Hosseininezhad M. Microbiological changes of pousti cheese during ripening. J Food Thechnol Nutr. 2011; 30(2): 85-91 [In Persian].

6- Bahrami B, Alizadeh M, Hassanzadeh OH. Kinetic analysis of antioxidant changes in domestic cheese with Haven extract made in clay jugs during the proteolysis progress. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2017; 12(2): 87-95 [In Persian].

7- Dervisoglu M, Yazici F. Ripening changes of Kulek cheese in wooden and plastic containers. J Food Eng. 2001; 48(3): 243-9.

8- Sarbazi M, Hesari J, Azadmard Ds, Rafat S. Effect of pasteurization and packaging on the physicochemical and sensory properties of pot (kope) cheese. J Tabriz Univ Food Res. 2015; 24(4): 507-17 [In Persian].

9- Öner Z, Karahan AG, Aloğlu H. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. LWT-Food Sci Technol. 2006; 39(5): 449-54.

10- Hayaloglu AA, Cakmakci S, Brechany EY, Deegan KC, McSweeney PL. Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. J Dairy Sci. 2007; 90(3): 1102-21.

11- Barbieri E, Schiavano GF, De Santi M, Vallorani L, Casadei L, Guescini M, et al. Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. Int Dairy J. 2012; 23(1): 62-7.

12- Aghazadeh Meshgi M. Evolution of some microbial and chemical properties of West Azerbaijan's jug cheese. J Food Sci Nutr. 2007; 3: 80-7.

13- Pakbin B, Razavi SH, Mahmoudi R. Physico-chemical and microbiological characteristics of traditional koozeh cheese, ripened in clay jug and plastic container. Carpathian J Food Sci Technol. 2015; 7(4): 111-8.

14- Khalifezadeh S, Sadeghi ZM, Nahaee M. Prevalence and antibiotics susceptibility of *Staphylococcus aureus* in traditional Kouzeh cheese at Saqqez retails. J Food Hyg. 2015; 16(4): 1-9 [In Persian].

15- Abbasinejad B, Neyriz NM, Taher TN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Koozeh cheeses of Urmia retails. J Food Hyg. 2015; 17(5): 27-34 [In Persian].

16- Iranian National Standardization Organization. Brined Cheese-Specifications and Test Methods. INSO. 2344-1. 1st ed. Tehran; 2016, P: 2-8 [In Persian].

17- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 9th ed, St. Louis: Mosby; 1994, P: 458-60.

18- Iranian National Standardization Organization. Microbiology of milk and milk products–Specifications and test methods. INSO. 2406. 3rd ed. Tehran; 2017, P: 1-9 [In Persian].

19- Chen AH, Larkin JW, Clark CJ, Irwin WE. Textural analysis of cheese. J Dairy Sci. 1979; 62(6): 901-7.

20- Lucey JA, Fox PF. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. J Dairy Sci. 1993; 76(6): 1714-24.

21- Iličić M, Milanović S, Carić M, Lazić V, Lončar E, Malbaša R, *et al*. Application of common packaging materials in the probiotic fresh cheese production. Mljekarstvo Dairy. 2016; 66(2): 91-8.

22- Aygun O, Aslantas O, Oner S. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. J Food Eng. 2005; 66(3): 401-4.

23- Tarakci Z, Akyuz N. Effects of packaging materials and filling methods on selected characteristics of Otlu (Herby) cheese. Int J Food Prop. 2009; 12(3): 496-511.

24- Hasanzadeh A, Raftani Amiri Z, Aminifar M. Changes in the physicochemical, microstructural and rheological properties of traditional Kope cheese during ripening. Int J Dairy Technol. 2018; 71(2): 347-55.

25- Dehnavi F, Khosrowshahi AA, Zomorodi SH. Viability of *Lactobacillus Acidophilus* and its effect on characteristics of Jug cheese. (Technical Note). J Agr Eng Res. 2013; 14(3): 113-20 [In Persian].

26- Mehdizadeh T, Sheikhkanloui Milan H, Mojaddar Langroodi A. Viability of *Bifidobacterium bifidum* and its effect on the microbial, chemical and sensorial characteristics of traditional Koozeh Cheese. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2018;13(4): 51-60 [In Persian].

27- Hasanzadeh A, Raftani AZ, Aminifar M. Influence of inulin, sodium caseinate and ripening time on the quality characteristics of Kope cheese produced from bovine milk. Iran J Food Sci Technol. 2018; 72(14): 187-201 [In Persian].

28- Mirzaei H, Javadi A, Farajli M, Shah-Mohammadi AR, Monadi AR, Barzegar A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. J Vet Res. 2012; 67(1): 65-70 [In Persian].

29- Tekinşen KK, Özdemir Z. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van Otlu (Herb) cheese. Food Control. 2006; 17(9): 707-11.

30- Pintado CM, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira MA. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese.

Food Microbiol. 2005; 22(1): 79-85.

31- Carminati D, Perrone A, Giraffa G, Neviani E, Mucchetti G. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola cheese rinds. Food Microbiol. 2004; 21(6): 801-7.

32- Arslan S, Özdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria spp.* in homemade white cheese. Food Control. 2008; 19(4): 360-3.

33- Kargar M, Ghasemi A. A survey on prevalence rate & antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese of Marvdasht, (2007). J Food Technol Nutr. 2011, 31(8): 72-7 [In Persian].

34- Hassanzadazar H, Ehsani A, Mardani K. Antibacterial activity of *Enterococcus faecium* derived from Koopeh cheese against *Listeria monocytogenes* in probiotic ultra-filtrated cheese. Vet Res Forum. 2014; 5(3): 169-75.

The survey of chemical and microbial characteristics of traditional Koozeh Cheese (Koopeh) in Kurdistan province

Zohreh Mashak[1*] , Javad Roshani [2]

1 - Department of food hygiene,faculty of veterinary medicine,Karaj Branch,Islamic Azad University,Karaj,Iran.
2 - D.V.M graduated,faculty of veterinary medicine,Karaj Branch,Islamic Azad University,Karaj,Iran.

Receive; May 17, 2019; Revise: June 30, 2019; Accept: September 2, 2019

Summary

Koozehee Cheese is a cheese with a semi-hard and creamy color that is rich in fat and spicy flavors and is produced traditionally in west and north-west of Iran. The aim of this study was to evaluate the chemical and microbial characteristics in Koozeh Cheese samples of Kurdistan Province. A total of 84 samples of traditional Koozehee Cheese were collected from the Saqez, Baneh and Sanandaj Cities, randomly in winter. Chemical tests included dry matter, acidity, pH, fat, protein, ash, salt, calcium and phosphorus measurement, and microbial tests included coliform counting and yeast and mold counting, and identification of *E. coli*, *S. aureus*, Salmonella and *L. monocytogenes* in Koozeh Cheese samples. Mean of dry matter was 57.25%, pH was 5.59, acidity was 83.69 Dornic degrees, protein level was 43.01%, fat level was 22.52%, ash level was 10.58%, salt level was 6.79%, calcium level was 1.02 g/100g and phosphorus level was 0.67 g/100g. Contamination of Salmonella and *L. monocytogenes* were not observed in any of the samples, and the infection with coliform was 45.2%, *E. coli* was 31.0%, yeast and mold was 23.8%, and *S. aureus* was 11.9%. Koozeh cheese of Kurdistan province is rich in protein, calcium and phosphorus sources, and has a high nutritional value. But it is unaccepted for microbial characteristics (*S. aureus*, coliform, *E. coli*, yeast and mold) and its production and supply process requires a health monitoring. The industrial production of Koozeh Cheese can improve its health; also, it can lead to expansion of the supply of this beneficial product in Iran and the other countries.

Keywords: *Koozehee cheese, Kurdistan province, chemical characteristics, microbial characteristics*

بهینه‌سازی استخراج لیپوپلی‌ساکارید سویه خشن بروسلاآبورتوس به روش فنل-کلروفورم-پترولیوم اتر

سعید عالمیان[1*]، آرمین کلانتری[1]

۱- بخش تحقیق و تولید واکسن و آنتی ژن‌های بروسلوز، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۵ مهر ۱۳۹۸، بازنگری:۲۴ مهر ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۳۰ مهر ۱۳۹۸

چکیده

بیماری بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده که یک تهدید برای بهداشت عمومی و همچنین صنعت پرورش دام محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی روش استخراج لیپو پلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس سویه خشن که می‌توان از آن به عنوان آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص گاوهای واکسینه با این واکسن استفاده نمود. این مطالعه کاربردی در آزمایشگاه تحقیق و تولید بخش بروسلوز انجام شد. به این منظور ابتدا سویه خشن با روش کشت در محیط اختصاصی بروسلا آگار تکثیر و با روش PCR مورد تأیید نهایی قرار گرفت و لیپو پلی‌ساکارید خشن باکتری بروسلا آبورتوس به روش فنل - کلروفورم - پترولیوم اتر استخراج گردید و نتایج حاصل از استخراج LPS خشن به کمک روش‌های LAL و PAGE – SDS مورد تائید قرار گرفت. در روش فنل - کلروفورم - پترولیوم اتر لیپو پلی‌ساکارید خشن پس از استخراج و ترسیب با محلول متانول تست LAL صورت گرفت که ایجاد لخته، نشانگر وجود LPS بود. همچنین الکتروفورز در ژل (پلی آکریلامید ۱۴ درصد) با رنگ‌آمیزی نیترات نقره باندی کمتر از ۱۴ کیلو دالتون مشاهده گردید. بر اساس این مطالعه روش فنل - کلروفورم - پترولیوم اتر یک روش ایده آل جهت استخراج لیپو پلی‌ساکارید خشن (R-LPS) سویه خشن بوده و برای تهیه آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژیک و همچنین کیت الایزا جهت تشخیص گاوهای واکسینه با این واکسن استفاده می‌شود.

واژگان کلیدی: *بروسلا آبورتوس، سویه خشن، لیپو پلی‌ساکارید خشن ، LAL، SDS – PAGE*

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

مقدمه

بروسلاها باکتری‌های گرم منفی، کوکوباسیل، داخل سلولی اختیاری، هوازی و سخت رشدی هستند که در گاو، گوسفند، بز و انسان ایجاد بروسلوزیس (بیماری مشترک بین انسان و دام) می‌کنند. دیوید بروس در ۲۶ دسامبر ۱۸۸۷ میلادی عامل بیماری را کشف نمود و میکروکوکوس ملیتنسیس (در ارتباط با نام یونانی جزیره مالت) نام‌گذاری کرد. بروسلاها در حال حاضر بر اساس خواص فنوتیپی و ژنتیکی به ۱۰ جنس طبقه‌بندی می‌شوند.

بروسلا آبورتوس عامل تب مالت گاوی می‌باشدکه در انسان ایجاد تب مواج می‌نماید، بروسلوز گاوی یکی از بیماری‌های بومی در ایران بوده که هم از نظر اقتصادی و هم از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت است. البته این بیماری توسط گونه‌های بروسلا ملی تنسیس، بروسلا سویس و بروسلا کنیس هم ایجاد می‌شود (۱۲).

پیشگیری از بیماری در انسان وابسته به کنترل بیماری در مخازن دامی است. این بیماری در گاو بیشتر توسط بروسلا آبورتوس به وجود می‌آید که علاوه بر اهمیت فراوان از نظر بهداشت و سلامت جامعه، به دلیل القای سقط جنین و کاهش تولید شیر باعث ایجاد خسارات اقتصادی قابل توجه به صنعت پرورش گاو می‌گردد. جهت کنترل بیماری بروسلوز در دام‌ها از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته استفاده می‌گردد. از جمله واکسن‌ها می‌توان به واکسن Rev.1 برای نشخوارکنندگان کوچک مانند گوسفند و بز و واکسن S19 در گاو و گوساله اشاره نمود (۱). از معایب این واکسن‌ها آن است که به دلیل فنوتیپ Smooth موجب تحریک تولید آنتی‌بادی‌های مداخله کننده در تست‌های سرولوژیک معمول شده و در نتیجه امکان تفریق تشخیص سرولوژیک دام‌های آلوده از واکسینه وجود ندارد. واکسن ایریبا (RB51) یک سویه خشن (Rough) بروسلا آبورتوس جهت واکسیناسیون گاوها می‌باشد که به علت مزایای قابل توجه- از جمله عدم تحریک تولید آنتی‌بادی‌های مداخله کننده در آزمایش‌های سرولوژی معمول تشخیص بروسلوز و در نتیجه امکان انجام همزمان برنامه‌های تست و کشتار و واکسیناسیون- در سال‌های اخیر جایگزین واکسن قدیمی S19 در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران شده است (۱۸). با این وجود، با توجه به این‌که در آزمایش‌های سرولوژی رایج از سویه‌های صاف (Smooth) به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده و آنتی‌بادی‌های ضد LPS صاف بروسلاها تشخیص داده می‌شوند، امکان شناسایی دام‌های واکسینه با سویه ایریبا که دارای LPS خشن می‌باشد، توسط این آزمایش‌ها وجود ندارد (۸، ۱۰).

لیپو پلی‌ساکارید ترکیب عمده دیوارهٔ سلولی همه باکتری‌های گرم منفی می‌باشد و حدود ۴۰ درصد از وزن غشاء خارجی را تشکیل داده و در استحکام آن نقش دارد. لیپو پلی‌ساکارید از سه بخش لیپید A بخش مرکزی و زنجیره O تشکیل شده است. خصوصیات اصلی لیپو پلی‌ساکارید، یعنی فعالیت اندوتوکسیک، تنظیم‌کنندگی ایمنی و تب‌زایی کاملاً شناخته شده می‌باشد (۴، ۵). در این راستا، به دلیل این‌که LPS بروسلاها مهم‌ترین جزء تحریک‌کننده پاسخ‌های هومورال بوده و عمده آنتی‌بادی‌های تولیدی در بدن میزبان علیه آن است، LPS خشن بروسلا آبوتوس سویه RB51 می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن در آزمایش‌های سرولوژی تشخیص دام‌های واکسینه با آن به کار گرفته شود (۲، ۴، ۶). استفاده از آنتی‌ژن خشن سویه RB51 در تست‌های سرولوژی می‌تواند راهی دقیق برای شناسایی گاوهای واکسینه با این سویه باشد. همچنین از این

آنتی‌ژن می‌توان جهت شناسایی سرولوژیک آلودگی با عوامل بروسلایی خشن از قبیل بروسلا اوویس (عامل التهاب بیضه در قوچ‌ها) و بروسلا کنیس (عامل بروسلوز در سگ که زئونوتیک نیز می‌باشد) استفاده نمود. در سال‌های اخیر روش‌های متفاوتی به منظور تشخیص پاسخ آنتی‌بادی علیه بروسلاها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این روش‌ها، به‌کارگیری آزمایش الیزای غیر مستقیم است که در مطالعات متعدد، مناسب بودن آن برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد LPS بروسلایی مورد تأیید مراکز تحقیقاتی معتبر قرار گرفته است (۷). استفاده از روش الیزای غیرمستقیم می‌تواند صحتی برای واکسیناسیون دام‌ها با سویه RB51 باشد که گامی اساسی جهت کنترل و مبارزه با بیماری بروسلوز باشد.

هدف از این مطالعه استخراج LPS خشن سویه واکسینال RB51 با روش روش فنل – کلروفورم - پترولیوم اترکه توسط تست Limulus Amebocyte Lysate (LAL) و SDS–PAGE مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی کاربردی در آزمایشگاه تحقیق و توسعه بخش واکسن و آنتی‌ژن‌های بروسلوز مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام شد.

سویه واکسینال باکتری بروسلا آبورتوس RB51 در محیط اختصاصی بروسلا آگار روی بوآت‌های شیشه‌ای پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت انبوه کشت گردید. سپس اجرام توسط آب مقطر استریل همراه ساچمه شیک شدند تا جرم از سطح محیط جدا گردد. سپس سوسپانسیون در دور ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد و با استن سرد سه بار شستشو انجام گرفت و در آخر جرم همراه استن باقی‌مانده در پلیت استریل ریخته شده و به مدت ۴۸ ساعت زیر هود بیولوژیک قرار داده شد تا جرم کاملاً خشک گردد (۳).

PCR سویه RB51: سویه واکسینال باکتری بروسلا آبورتوس RB51 از کمپانی CZV اسپانیا تهیه گردید. تست PCR جهت تائید سویه واکسینال RB51 با پرایمرهای اختصاصی مورد تأیید قرار گرفت (۹).

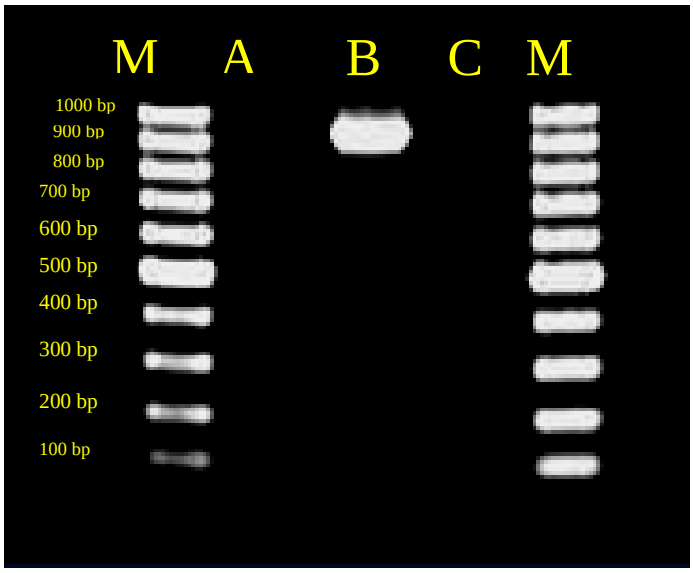
استخراج LPS خشن بروسلا آبورتوس سویه RB51 و ارزیابی آن: جهت استخراج از روش فنل – کلروفوم - پترولیوم اتر استفاده شد. در این مرحله برای بهینه‌سازی استخراج LPS از روش ترسیب استفاده شد به این صورت که ۵ برابر حجم به‌دست آمده، متانول سرد به همراه استات سدیم که در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود به سوسپانسیون اضافه شد و به مدت یک روز در فریزر مستقر گردید (۶). بعد از استخراج برای ارزیابی LPS، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استخراج شده و ۰/۲ از کنترل مثبت کیت و ۰/۲ آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی به هر ویال جداگانه اضافه و کاملاً مخلوط گردیدند و محتویات ویال به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

SDS-PAGE : الکتروفورزیس لیپو پلی‌ساکارید در ژل ۱۴ درصد SDS-PAGE انجام گرفت به این صورت که مایع رویی و محتویات ترسیب داده شده به صورت جداگانه به مدت ۲ ساعت در ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. سپس با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید (۱۱).

نتایج

در روش PCR که برای شناسایی ژن WboA با پرایمرهای اختصاصی Primers1: 5′ T T T A G T T T G C C G T A A T A TA G G T C T A G و Primers 2 : 5′ G C C A A A A CC T G T C3′ C C A A C C C A A A T G C T انجام گردید که

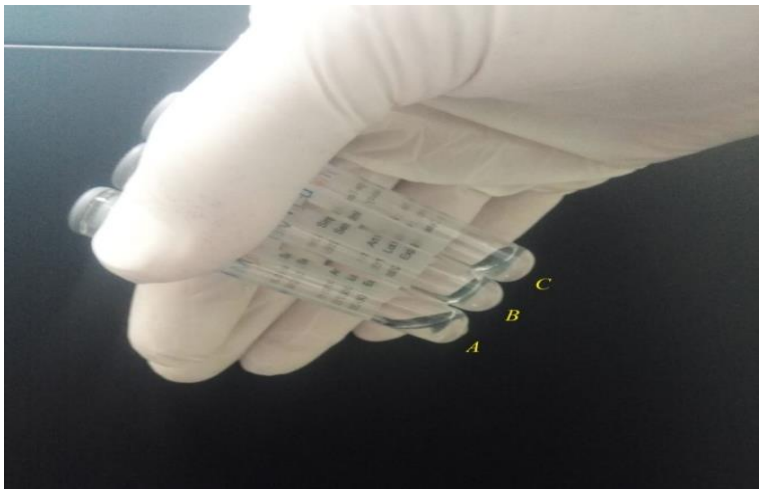
Anealling در ایـــن پروســـه بـــا دمـــای ۵۹/۵ درجـــه سـانتی‌گراد بهینه‌سـازی شـد و بـر روی آگـارز بـا غلظـت ۱ درصـد بانـدی بـه انـدازه ۹۰۰ bp کـه مؤیـد بـاکتری بروسلا آبورتـوس سـویهRB51 مـی‌باشـد. (شـکل شـماره ۱)



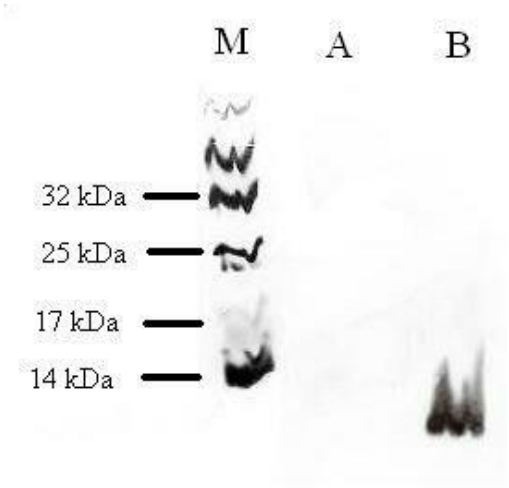
شکل ۱- نتایج الکتروفورز بروسلا آبورتوس سویه RB51. به ترتیب چاهک‌ها; M: مارکر 1000 bp (شرکت سیناژن). A : بروسلا آبورتوس سویه ۹۹ (کنترل مثبت). C : کنترل منفی. B : ژن WboA بروسلا آبورتوس سویه RB51 با وزن مولکولی 900 bp

LPS اســـتخراج شـــده بـــا روش فنـــل - کلروفـــوم - پترولیـــوم اتـــر بـــا تســـت (Limulus Amebocyte Lysate) LAL مـورد ارزیـابی قـرار گرفـت و نتـایج بـه شـکل ایجـاد لختـه در لولـه‌های حـاوی LPS اسـتخراج شده مشاهده گردید (شکل ۲).

تائیـد نهـایی LPS اسـتخراج شـده بـا روش – SDS PAGE در ژل ۱۴ درصـد صـورت پـذیرفت بـه ایـن صـورت کـه بانـدی کمتـر از ۱۴ کیلـو دالتـون مؤیـد حضور لیپو پلی‌سـاکارید خشـن بروسـلا آبورتـوس سـویه RB51 بود (شکل ۳).



شکل ۲- ژلاتینه شدن توسط اندوتوکسین لیپو پلی‌ساکارید خشن (R – LPS) بروسلا آبورتوس سویه A.RB51 : کنترل منفی. B : کنترل مثبت کیت.C : LPS بروسلا آبورتوس سویه RB51



شکل ۳- ژل ۱۴ درصد SDS-PAGE با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده است A : استخراج لیپو پلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس سویه RB51 شده بدون ترسیب. B : استخراج لیپو پلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس سویه RB51 با ترسیب استات سدیم و متانول وزن مولکولی کمتر از ۱۴ کیلو دالتون . M: مارکر پروتئین

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام می‌باشد که دارای چرخه انتقال بین حیوانات در حیات وحش و دام‌های اهلی می‌باشد. این بیماری در دام‌های اهلی باعث عوارضی از جمله سقط جنین، از دست دادن قدرت تولید مثل، کاهش شیر و کاهش وزن می‌گردد به همین جهت بهترین راه پیشگیری واکسیناسیون در دام است. سویه واکسینال بروسلا آبورتوس RB51 (ایریبا) با دارا بودن فنوتیپ خشن (Rough) که از مزایای قابل توجه آن می‌توان به عدم تحریک تولید آنتی‌بادی‌های مداخله کننده در آزمایش‌های سرولوژی معمول تشخیص بروسلوز و در نتیجه امکان انجام همزمان برنامه‌های تست و کشتار و واکسیناسیون، ثبات فنوتیپی، قابلیت استفاده از آن در دام بالغ و آبستن و بیماری‌زائی کم آن در انسان اشاره نمود. در این راستا، به دلیل این‌که LPS بروسلاها مهم‌ترین جزء تحریک کننده پاسخ‌های هومورال بوده و عمده آنتی‌بادی‌های تولیدی در بدن میزبان علیه آن است، LPS خشن بروسلا آبورتوس سویه RB51 می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن در آزمایش‌های سرولوژی تشخیص دام‌های واکسینه به کار گرفته شود.

در این مطالعه از سویه واکسینال RB51 کلکسیون میکروبی بخش بروسلوز مؤسسه رازی، استفاده گردید. برای استخراج لیپو پلی‌ساکارید خشن بروسلا آبورتوس سویه RB51 از روش فنل- کلروفورم- پترولیوم اتر استخراج گردید. نتایج به‌دست آمده از این مرحله با نتایج Nielsen و همکاران که از روش galanos برای استخراج LPS سویه RB51 استفاده کردند، مطابقت داشت. به منظور بالا بردن میزان کیفیت LPS تخلیص شده، بر طبق روش Moreno و همکاران عمل ترسیب توسط متانول سرد و استات سدیم صورت گرفت تا کیفیت LPS به‌دست آمده نسبت به روش‌های دیگر افزایش چشمگیری داشته باشد. LPS به‌دست آمده همچنین با تست LAL مورد ارزیابی قرار گرفت که باعث ایجاد لخته و دال بر وجود LPS– R (لیپو پلی‌ساکارید خشن) بروسلا آبورتوس سویه RB51 می‌باشد. همچنین از هر دو فاز، مایع رویی و مایع رسوب داده شده PAGE – SDS انجام گرفت که نشان داد مایع رویی فاقد LPS –R و مایع ترسیب داده شده حاوی LPS – R بروسلا آبورتوس سویه RB51 می‌باشد که در شکل ۳ نشان داده شده است.

بر اساس یافته‌های این پژوهش، دیواره خشن سویه واکسینال RB51 استخراج و تخلیص گردید که با به‌کارگیری روش‌های مختلف سایر محققین بهینه‌سازی آن صورت پذیرفت. به این صورت که مرحله ترسیب به منظور افزایش خلوص LPS به‌دست آمده به عنوان یک فرآیند تکمیلی به روش‌های ارایه شده توسط سایر محققین، به سایر مراحل تخلیص اضافه گردید. بنابراین می‌توان گفت از این آنتی‌ژن استخراج شده در تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص گاوهای واکسینه با این سویه واکسن استفاده نمود.

سپاسگزاری

از همکاری مدیران ارشد مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و همکاران بخش بروسلوز تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1- Avila-Calderon E D, Merino A L, Sriranganathan N, Boyle S M, Rodriguez C. A History of the Development of Brucella Vaccines. BioMed Research International. 2013; 8.

2- Diaz-Aparicio E, Arellano-Reynoso B, Herrera E, Hernandez M, Suarez-Games F. Characterization of the Transitory Immune Response in Cows Immunized with RB51 and its Implication on Diagnosis within Brucellosis EndemicZones. International Journal of Dairy Science. 2007; 2(4): 364-371.

3- Galanos C, Luderitz O, Westphal O. A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides. European Journal Biochem. 1969; 245-249.

4- Kreutzer D, Buller C S, Robertson D C. Chemical Characterization and Biological Properties of Lipopolysaccharides Isolated from Smooth and Rough Strains of Brucella abortus. Infection and Immunity. 1979; 23(3): 811-8.

5- Moreno E, Sherry S L, Jones L, Berman D. Immunochemical Characterization of Brucella Lipopolysaccharides and Polysacharides. Infection and Immunity. 1981; 222-241.

6- Moreno E, Pitt M, Jones L, Schurig G, Berman D. Purification and Characterization of Smooth and Rough Lipopolysaccharides from Brucella abortus. Journal of Bacteriology. 1979; 361-369.

7- Nielsen K, Smith P, Conde S, Draghi de Benitez G, Gall D, Halbert G. and *et. al.* Rogh Lipopolysaccharide of Brucella abortus SRB51 as a common Antigen for Serologicsl Detection of B. ovis, B. canis, and B. abortus SRB51 Expoure Using Indirect Enzyme Immunoassay and Flurescence Polarization. Journal of Immunoassay. 2004; 25(2):171-182.

8- Robles C A, Nielsen K, Willems P. Evaluation of three different antigens in an indirect enzyme- linked immunoassay for the detection of antibodies, against, Brucella, abortus SRB51 in vaccinated heifers. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2009; 127(1-2): 153-155.

9- Ramesh V, Yongqun H, Larissa S B, Schuring G G. Complementation of Brucella abortus Strain RB51 with a functional WboA Gene Results in O – Antigen Synthesis and Enhanced Vaccine Efficacy but No Change in Rough Phenotype and Attenuation. Infect Immun. 2000; 68(7): 3927-3932.

10- Wang Z, Wu Q. Research progress in live attenuated Brucella vaccine development. Curr Pharm Biotechnol. 2013; 14(10): 87-96.

11- Xinghang Y. and *et al.* Progress in Brucella Vaccine Development. Front . Biol. 2013; 8: 60-77.

12- Zowghi E. Proceeding of Second Iranian National congress of Brucellosis,Shahid Beheshti. University of Medical Sciences, 2007 [in Persian].

Optimization of Rough Lipopolysaccharide Extraction from *Brucella abortus* by Phenol – Chloroform - Petroleum ether

Saeed Alamian [1*], Armin Kalantari [1]

1- Brucellosis Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI); Agricultural Research, Educationand Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Receive: September 27, 2019; Revise: October 16, 2019; Accept: October 22, 2019

Summary

Brucellosis is an important zoonotic disease which threatens public health and livestock industry. The aim of this study was to optimize extraction of rough lipopolysaccharide from *Brucella abortus* which can be used as the antigen for the development of serological tests to diagnose vaccinated animals. This applied study was performed in the Brucellosis Research and Production Laboratory. For this purpose, the rough strain was cultured in Brucella agar specific medium and final diagnosis was performed by PCR method. The rough lipopolysaccharide of Brucella abortus was extracted by phenol-chloroform-petroleum ether method and the results of rough LPS extraction were approved by LAL and SDS - PAGE methods. Extraction and precipitation of Lipopolysaccharide with cold methanol and sodium acetate was performed by using Phenol – Chloroform - Petroleum ether method. Then Lipopolysaccharide was identified by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test and formation of clots indicated presence of Lipopolysaccharide. Also SDS – PAGE (14 % Polyacrylamide gel) followed by silver nitrate staining showed a 12 KDa band which indicates Rough Lipopolysaccharide. According to the results of this study, it seems that Phenol – Chloroform - Petroleum ether method is an excellent method for extraction of rough LPS of antigen for the development of serological tests and ELISA Kit to diagnose vaccinated animals.

Keywords: *Brucella abortus, Rough Lipopolysaccharide, LAL, SDS-PAGE*

بررسی شبکه ژنی مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین تحت کنترل ژن‌های *tetA* و *tetB* با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده

یعثوب شیری[۱*]، بهمن فاضلی نسب[۲]

۱- استادیار گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- مربی گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۸ مهر ۱۳۹۸، بازنگری: ۸ آبان ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۸ آبان ۱۳۹۸

چکیده

فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک به دو دسته مقاومت ذاتی و مقاومت اکتسابی تقسیم می‌شوند. در مقاومت ذاتی باکتری به دلیل ویژگی‌های خاص خود به یک یا تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد. اما مقاومت اکتسابی در اثر تغییرات مولکولی در باکتری‌های حساس به یک آنتی‌بیوتیک ایجاد شده و نهایتاً سبب به‌وجود آمدن باکتری‌های مقاوم به آن آنتی‌بیوتیک می‌شود که دلیل آن می‌تواند جهش‌های کروموزومی، ترانسپوزون‌ها و یا پلاسمیدهای قابل انتقال باشند. ژن‌های متعددی مکانیسم‌های متنوع مقاومت باکتریایی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها کنترل می‌کنند. ژن‌های *tetA* و *tetB* اصلی‌ترین ژن‌های فعال‌کننده مکانیسم پمپ یونی افلاکس تتراسایکلین بوده و سبب کاهش غلظت تتراسایلکین در داخل باکتری می‌شوند. در این مطالعه شبکه ژن‌های *tetA* و *tetB* با استفاده از داده‌ها و اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده‌های مولکولی بازسازی شد. شبکه‌ی بازسازی شده به روشنی تأیید می‌کند که ژن‌های *tetA* و *tetB* در افلاکس تتراسایکلین به خارج از سلول نقش مستقیم دارند. ژن *tetB* با همکاری سایر پروتئین‌ها، علاوه بر افلاکس تتراسایکلین، نقش کلیدی در سمیت‌زدایی و آنتی‌پورت طیف گسترده‌ای از سموم مثل استرپتوترسین و اسیدهای فنولیک دارد. همچنین آنالیزهای ژن آنتولوژی نشان داد. اغلب ژن‌های درگیر در فرایند افلاکس تتراسایکلین پروتئین غشایی هستند و عملکرد مولکولی آنها ترانسپورتر می‌باشد.

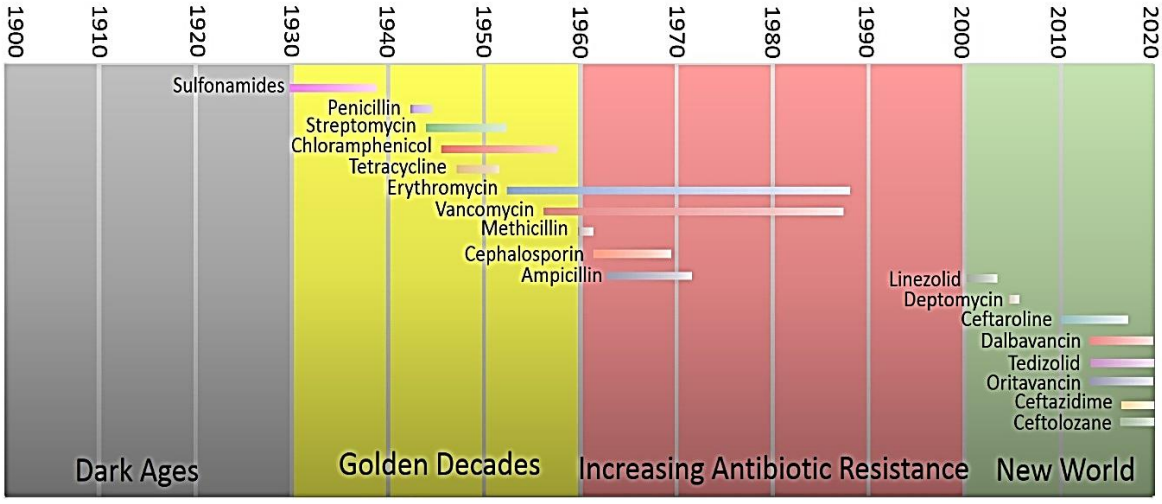
واژگان کلیدی: *آنتی‌بیوتیک، باکتری، تتراسایکلین، شبکه ژنی*

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

مقدمه

تتراسایکلین آنتی‌بیوتیکی است که نخستین بار در سال ۱۹۴۸ وارد طب پزشکی شد و در سال ۱۹۵۳ مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در میان باکتری‌ها گزارش شده است. این آنتی‌بیوتیک یک آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک بوده و برخلاف باکتریسیدها که سبب کشته شدن باکتری می‌شوند، باعث توقف رشد باکتری می‌گردد. عملکرد تتراسایکلین بدین صورت است که با اتصال به ریبوزوم از فرایند ترجمه سلولی ممانعت به عمل می‌آورد و از طویل شدن رشته‌های آمینو اسید جلوگیری می‌کند.

در شکل (۱) تاریخچه معرفی و گزارش مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود. چهار دوره تاریخی برای تاریخچه آنتی‌بیوتیک‌ها متصور می‌باشد که دوره قبل از کشف آنها را می‌توان عصر تاریکی نامید که اغلب بیماران با عفونت‌های باکتریایی جان خود را از دست می‌دادند. در دوران طلایی کشف آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین در عرض سه دهه ده‌ها آنتی‌بیوتیک را معرفی کردند. در دوره سوم به دلایل متعدد کشف و توسعه آنتی‌بیوتیک جدید به کلی فراموش شد و شاهد گزارش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بودیم. همچنین در این دوره دانشمندان راهکارهای متنوع باکتریایی در جهت فعال‌سازی مکانیسم مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها را یکی پس از دیگری شناسایی کردند. با آغاز قرن ۲۱ عصر جدیدی در اکتشاف آنتی‌بیوتیک‌ها آغاز شده است. همچنین مطالعه برروی فرایندهای متنوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی امیدها برای امکان افزایش اثرگذاری آنتی‌بیوتیک‌های عصر طلایی را میسر ساخته است.



شکل ۱- تاریخچه کشف آنتی‌بیوتیک‌ها و گزارش مقاومت مربوط به هر آنتی‌بیوتیک. طول ستون مشاهده شده در مقابل هر آنتی‌بیوتیک نشان دهنده مدت زمان سپری شده از معرفی آنتی‌بیوتیک تا گزارش مقاومت به آن می‌باشد.

به طور کلی فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک به دو دسته مقاومت ذاتی و مقاومت اکتسابی تقسیم می‌شود. در مقاومت ذاتی باکتری به دلیل ویژگی‌های خاص خود به یک یا تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد. مثلاً باکتری *سودوموناس ائوروژینوزا* به دلیل نفوذپذیری پایین غشاء، در مقابل اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت کامل یا نسبی دارد. اما در مقاومت اکتسابی همان‌طور که از عنوان

آن پیداست در اثر تغییرات مولکولی در باکتری‌های حساس به یک آنتی‌بیوتیک ایجاد شده و نهایتاً سبب به وجود آمدن باکتری‌های مقاوم به آن آنتی‌بیوتیک می‌شود که دلیل آن می‌تواند جهش‌های کروموزومی، ترانسپوزون‌ها و یا پلاسمیدهای قابل انتقال باشند. فرایند مقاومت به تتراسایکلین با یکی از مکانیسم‌های پروتئین‌های محافظت‌کننده ریبوزومی، کاهش نفوذپذیری غشاء، جهش در ژن rRNA ۱۶S، افلاکس تتراسایکلین، و غیر فعال‌سازی آنزیمی ایجاد می‌گردد (۱). در کنار مکانیسم‌های قدیمی مکانیسم‌های جدیدی توسط محققین شناسایی شده‌اند که نشان‌دهنده قابلیت باکتری‌ها در توسعه راه‌های جدید برای مقابله با عوامل مهارکننده از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند (۲). ژن‌های متعددی مکانیسم‌های متنوع مقاومت باکتریایی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها کنترل می‌کنند. این ژن‌ها که اغلب بر روی پلاسمیدهای با قابلیت انتقال و ترانسپوزون‌ها قرار دارند پمپ‌های یونی افلاکس تتراسایکلین و یا پروتئین‌های محافظت‌کننده از ساختار ریبوزوم را فعال می‌کنند.

قرار گرفتن این ژن‌ها بر روی پلاسمیدهای انتقال‌شونده و ترانسپوزون‌ها سبب گسترش ویژگی مقاومت به آنتی‌بیوتیک در میان سویه‌های باکتری می‌گردد. ژن‌های *tetA* و *tetB* اصلی‌ترین ژن‌های فعال‌کننده مکانیسم پمپ یونی افلاکس تتراسایکلین بوده و در نتیجه کاهش غلظت تتراسایلکین در داخل باکتری را سبب می‌شوند. پروتئین‌های افلاکس تتراسایکلین، پروتئین‌های غشایی هستند که تتراسایکلین را شناسایی کرده و به خارج از سلول هدایت می‌کنند. حداقل ۲۲ پروتئین مقاومت به تتراسایکلین با مکانیسم افلاکس تتراسایکلین شناسایی شده‌اند که بر اساس تشابه توالی طبقه‌بندی می‌شوند: گروه اول شامل *tetA*، *tetB*، *tetC*، *tetD*، *tetE*، *tetG*، *tetH*، *tetJ*، *tetZ* و *tet30* می‌باشد. در گروه دوم ژن‌های *tetK* و *tetL* قرار دارند. این دو گروه اول شناخته شده‌تر از سایر ژن‌های افلاکس تتراسایکلین می‌باشند (۱). جدول (۱) ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین و مکانیسم مقاومت را به ترتیب آورده است.

جدول ۱- طبقه‌بندی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین بر اساس مکانیسم مقاومت

مکانیسم مقاومت	ژن مقاومت به تتراسایکلین
افلاکس تتراسایکلین	*tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetH, tetJ, tetZ, tet30, tetK, tetL, otrB, tcr3, tetA(P), tetV, tet31, tet33, tetY, tet34, tet35*
محافظت از ساختار ریبوزوم	*tetM, tetO, tetS, tetW, tet32, tet36, tetQ, tetT, otrA, tetB(P)*
تغییر شیمیایی در تتراسایکلین	*tet37, tetX, tetU, OtrC*

پمپ افلاکس طی یک فرایند وابسته به انرژی تتراسایکلین را به خارج از سلول پمپ کرده و یون هیدروژن را به داخل سلول هدایت می‌کند. شناسایی شبکه ژنی درگیر در فرایند بیولوژیکی این مکانیسم دفاعی در باکتری‌ها، می‌تواند راهکار مناسب برای عبور از این سیستم دفاعی را جهت افزایش اثرگذاری آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مشخص نماید. تحقیق حاضر با هدف بازسازی شبکه ژن‌های *tetA* و *tetB* درگیر در فرایند مقاومت افلاکس تتراسایکلین با استفاده از داده‌ها و اطلاعات موجود در پایگاه‌های شناخته شده داده‌های مولکولی طراحی شده است.

مواد و روش

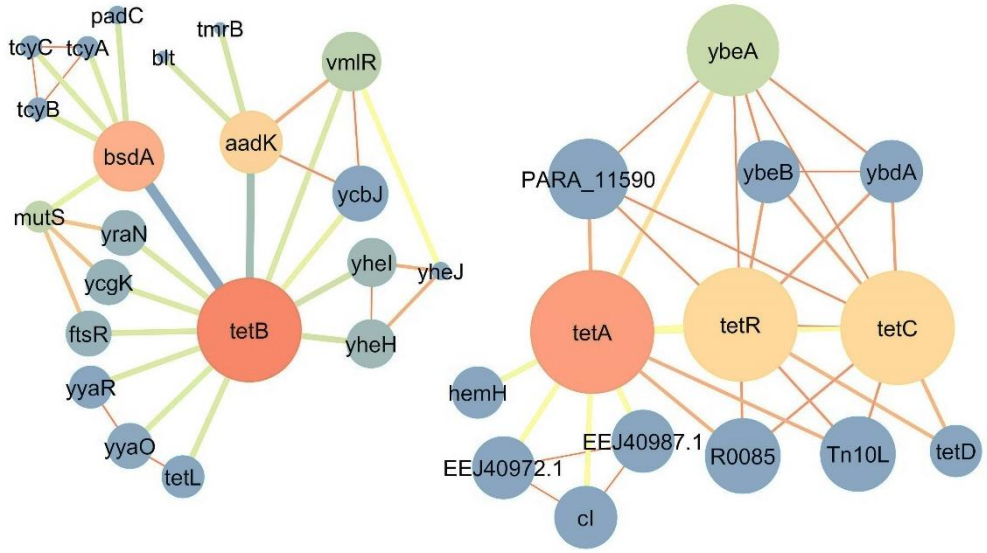
در این مطالعه از اطلاعات مولکولی باکتری *Bacillus subtilis* دارای مکانیسم افلاکس تتراسایکلین استفاده شد. با استفاده از پایگاه داده

STRING-db و بر اساس پارامترهای Text mining، Experiments، Databases، Co-occurrence، Neighborhood، Gene fusion و Co-Expression سایر ژن‌های مرتبط با ژن‌های *tetA* و *tetB* شناسایی شدند (۳). میزان همبستگی ژن‌ها بر اساس پارامترهای اشاره شده استخراج و به عنوان داده‌های خام در نرم افزار Cytoscape برای بازسازی شبکه ژنی *tetA* و *tetB* استفاده شدند (۴). از پلاگین NetworkAnalyzer برای تنظیم و بررسی توپولوژی شبکه استفاده شد (۵). در بررسی توپولوژی شبکه دو مؤلفه Betweenness Centrality و Closeness Centrality اهمیت کلیدی دارند. مؤلفه Betweenness Centrality عبارت است از میزان مرکزیت یک node در یک شبکه پیچیده و بر اساس تعداد خطوط ارتباطی هر node محاسبه می‌گردد. در مقابل Closeness Centrality عبارت است از کوتاه‌ترین فاصله از یک node به سایر nodeها. به عبارت ساده‌تر میزان بالای Betweenness Centrality و Closeness Centrality برای یک node نشان‌دهنده اهمیت بالای آن node در شبکه می‌باشد (۵). در نهایت با استفاده از پایگاه داده DAVID آنالیزهای آنتولوژی ژن‌های موجود در شبکه انجام شد (۶). آنالیزهای آماری مربوط به آنتولوژی بر اساس P-value Benjamine محاسبه شد (۷). جهت استخراج اطلاعات مولکولی مورد نیاز برای تکمیل پروژه از پایگاه‌ها اطلاعات پروتئینی UniProt استفاده شد (۸).

نتایج و بحث

شکل (۲) شبکه ژن‌های مرتبط با ژن *tetA* و *tetB* را به صورت دو زیرشبکه مستقل نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است در زیرشبکه ژن *tetA* بالاترین میزان Betweenness Centrality به ترتیب برای ژن‌های *tetA* (۰/۵۲۱)، *tetC* (۰/۱۶۸) و *tetR* (۰/۱۶۸) مشاهده شد. بالاترین میزان Closeness Centrality برای ژن‌های *tetA*، *tetC* و *tetR* به ترتیب با مقادیر (۰/۸۱۲)، (۰/۷۶۴) و (۰/۷۶۴)، همچنین بیشترین تعداد خطوط ارتباطی مستقیم با مقادیر (۱۱، ۹، ۹) به همین سه ژن متعلق می‌باشد. *Heme*ها بیوملکول‌های عضو خانواده تتراپیرول هستند که نقش مهمی در متابولیسم انرژی و کاتالیز اکسیداتیو بازی می‌کنند (۹). محصول ژن *hemH* با کاتالیز اتصال آهن به پروتوپورفیرین، آخرین گام در سنتز *heme* را کنترل می‌کند. مطالعات نشان داده جهش یافته‌های *hemA* بر روی صفحه LB رشد کندی دارند و کلنی‌های ضعیف پراکنده‌ای درست می‌کنند. اما در حضور تتراسایکلین تعداد کلنی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱۰). این یافته ضمن تأیید شبکه ژنی *tetA* و ارتباط آن با ژن *hemH*، نشان می‌دهد *tetA* در افزایش فعالیت کاتالیز اکسیداتیو نیز ایفای نقش می‌کند. کاردیولیپین (*cl*) دیگر ژن دارای برهمکنش با ژن *tetA* در غشاهای انتقال دهنده انرژی اکثر باکتری‌ها و غشای میتوکندی یوکاریوت‌ها ایفای نقش می‌کند (۱۱). مطالعات نشان داده تتراسایکلین نقش مثبتی در افزایش فعالیت کاردیولیپین در غشاء و در نتیجه بهبود فرایند بیولوژیکی غشاء دارد (۱۲). با توجه به نقش ژن *tetA* در افلاکس تتراسایکلین به خارج از سلول و کاهش اثر سمیت آن برای سلول باکتری، می‌توان نتیجه گرفت این ژن با افزایش سنتز *hemH* و *cl*، میزان انرژی مورد نیاز برای آنتی‌پورت تتراسایکلین از طریق غشاء را تأمین می‌کند. ژن‌های *ybeA*، *ybeB* و *ybdA* خاموش کننده‌های ریبوزومی بوده و فعالیت ترجمه‌ای سلول را مختل می‌کنند. این پروتئین‌ها به زیرواحدهای ۳۰S و ۵۰S ریبوزوم متصل شده و از اتصال این دو زیرواحد و تشکیل ساختار عملکردی ریبوزوم جلوگیری می‌کنند (۱۳). به نظر می‌رسد ژن *tetA* با ممانعت از تشکیل ساختار عملکردی ریبوزوم از اثرگذاری آنتی‌بیوتیک

تتراسایکلین بر روی ریبوزوم ممانعت کرده و بدین صورت زیرواحدهای ریبوزوم را تا زمان رفع مسمومیت تتراسایکلین جدا از هم نگه می‌دارد. هرچند اتصال تتراسایکلین قابل برگشت است و با رفع مسمومیت تتراسایکلین ساختار ریبوزوم به فعالیت خود ادامه می‌دهد.



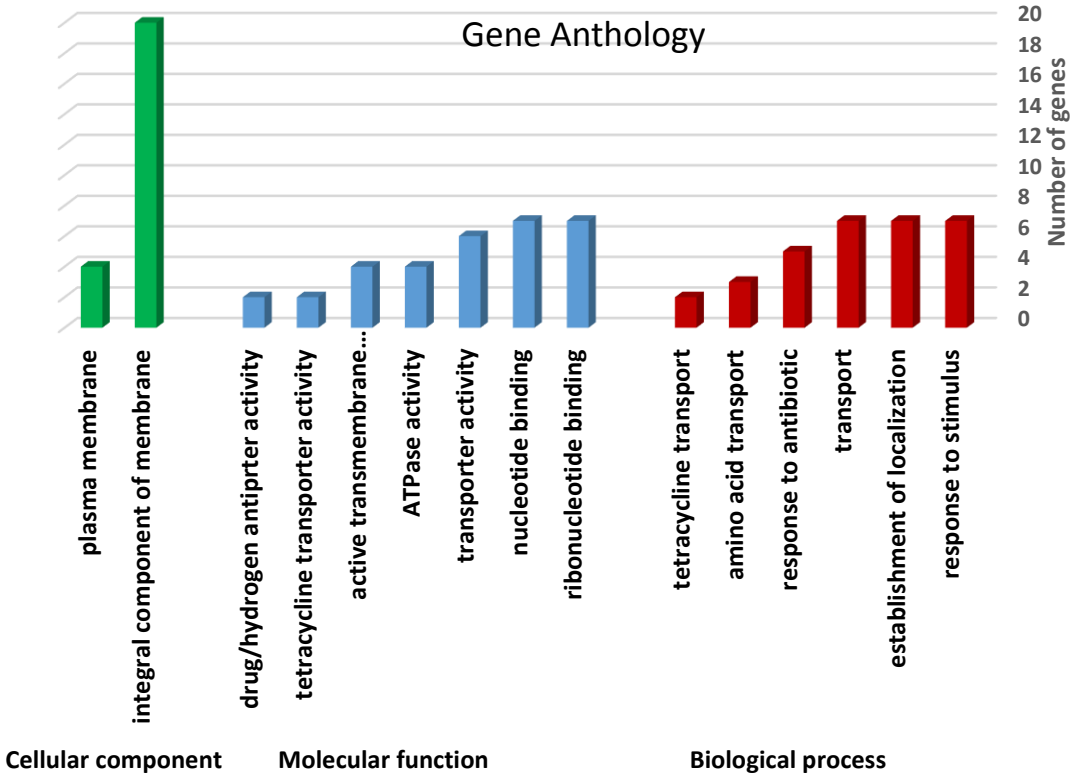
شکل ۲- شبکه ژنی جامع ژن‌های *tetA* و *tetB* در باکتری *Bacillus subtilis*. اندازه node بر اساس میزان Betweenness Centrality (اندازه کوچک برای مقادیر کمتر)، و رنگ node از آبی (Closeness Centrality پایین) تا قرمز (Closeness Centrality بالا) متغیر می‌باشد. رنگ و ضخامت خطوط ارتباطی بر مبنای Edge Betweenness از قرمز و ضخیم برای مقادیر زیاد تا آبی و نازک برای مقادیر کم متغیر است.

در زیر شبکه بازسازی شده برای ژن *tetB*، بالاترین مقادیر Closeness Centrality (۰/۷۱۴)، (۰/۵۴۰) و (۰/۴۸۷)، بالاترین مقادیر Betweenness Centrality (۰/۷۴۴)، (۰/۳۶۸) و (۰/۱۹۴) و بیشترین تعداد خطوط ارتباطی (۱۲)، (۶) و (۵) به ترتیب متعلق به ژن‌های *tetB*، *bsdA* و *aadK* می‌باشد. اسیدهای فنولیک موجود در اکوسیستم‌های گیاهی خاک می‌توانند به عنوان سموم در نظر گرفته شوند، چرا که بسیاری از میکرواگانیسم‌های خاکزی را تحت تنش قرار می‌دهند. ژن *psdA* نقش کلیدی در القای مقاومت باکتری *Bacillus subtilis* و دکربوکسیلاسیون و سم‌زدایی اسیدهای فنولیک مختلف دارد (۱۴). ژن‌های *TcyABC* بخشی از مجموعه حمل و نقل ABC بوده و در جذب L- سیستین به داخل سلول دخیل هستند (۱۵). انتقال دهنده‌های ABC (کاست اتصال به ATP) بزرگ‌ترین خانواده پروتئین‌های غشایی را در میکروارگانیسم‌ها تشکیل می‌دهند و می‌توانند در یک فرایند وابسته به ATP، طیف گسترده‌ای از سوبستراها را علیه گرادیان غلظت حمل و نقل کنند. محصول ژن *yheH* نیز یک انتقال‌دهنده ABC می‌باشد و احتمالاً در انتقال طیف متنوعی از سموم به خارج از سلول ایفای نقش می‌کند (۱۶). آمینوگلیکوزیدها عوامل ضد میکروبی با طیف گسترده‌ای هستند. محصول ژن *aadK* آنزیم مسئول مقاومت در برابر این عوامل آنتی‌باکتریال می‌باشد به طوری که از اتصال آنها به ریبوزوم و ممانعت از فعالیت ترجمه‌ای سلول جلوگیری می‌کند (۱۷). محصول ژن *ycgK* در اخراج پروتئین‌های مضر که وارد سلول شده‌اند ایفای نقش می‌کند

(۱۸). ژن *ysbJ* بخشی از خانواده بزرگ *ycb* هست که در شرایط تنش محیطی از اسپورزایی باکتریی ممانعت می‌کند (۱۹). ممانعت از اسپورزایی در شرایط تنش محیطی امکان ذخیره انرژی باکتری برای بقاء و عبور از شرایط تنش را میسر می‌سازد. ژن‌های *yraN* و *ftsR* از تنظیم کننده‌های رونویسی HTH هستند اما عملکرد دقیق آنها ناشناخته می‌باشد، احتمالاً با افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز متیونین و سیستئین میزان اکسیژن فعال درون سلولی را کاهش می‌دهند (۲۰). استرپتوترسین یک آنتی‌بیوتیک با طیف گسترده است که توسط استرپتومایست‌ها تولید می‌شود و به طور یکسان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ژن‌های *yyaO*، *yyaR* باکتری *Bacillus subtilis* را در مقابل استرپتوترسین مقاوم می‌کند (۲۱). با مشخص شدن عملکرد ژن‌های شبکه ژن *tetB* می‌توان این نتیجه را استنباط کرد که ژن *tetB* تنها مقاومت به تتراسایکلین را القاء نمی‌کند، بلکه مسیرهای متعددی از مقاومت به داروها و سموم را در باکتری‌ها القاء می‌کند.

بیان ژن‌های *tet* توسط خانواده‌ای از تنظیم کننده‌های رونویسی تتراسایکلین معروف به *tetR* کنترل می‌شود. تنظیم کننده‌های خانواده *tetR* در کنترل رونویسی پمپ های افلاکس چند دارو، مسیرهای بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها ، پاسخ به استرس اسمزی و مواد شیمیایی سمی، کنترل مسیرهای کاتابولیک، فرایندهای تمایز و بیماری‌زایی نقش دارند. پروتئین‌های *tetR* که در بیش از ۱۱۵ جنس باکتری و آرکئی‌ها وجود دارد یک ساختار مشترک مارپیچ-مارپیچ (HTH) را در دامنه اتصال به DNA خود به اشتراک می‌گذارند (۲۲). با این حال، پروتئین‌های *tetR* می‌توانند به روش‌های مختلفی عمل کنند. آنها می‌توانند مستقیماً به محصول هدف متصل شوند تا اثر خود را اعمال کنند (مثلاً *tetR* مستقیما به پروموتور ژن *tetA* متصل می‌شود تا در شرایط عدم وجود تتراسایکلین بیان آن را سرکوب کند)، یا می‌توانند در آبشارهای نظارتی پیچیده درگیر شوند به طوری که پروتئین *tetR* توسط تنظیم‌کننده دیگری تعدیل شود یا محرک پاسخ سلولی باشد (۲۲). *tetL* یک پروتئین تراغشایی است که آنتی‌پورت metal- tetracycline/H+ را به عهده دارد و بیان آن در حضور تتراسایکلین تحریک می‌شود (۲۳).

شکل (۳) نتایج آنالیزهای ژن آنتولوژی را نشان می‌دهد. سه دسته نمودار مشاهده شده در تصویر به ترتیب مربوط به مسیر بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و جایگاه سلولی ژن‌های مشارکت‌کننده در شبکه می‌باشد. پاسخ به محرک خارجی، اختصاصی‌سازی نواحی سلولی و انتقال مواد به ترتیب با ۷ ژن و p-value (6.0E-1)، (4.9E-1) و (4.9E-1) فعال‌ترین مسیرهای بیولوژیکی در فرایند مقاومت به تتراسایکلین هستند. اتصال به ریبونوکلئوتیدها (p-value:6.5E-1)، اتصال به نوکلئوتیدها (p-value:3.9E-1) و عملکرد ترانسپورتری (p-value:4.5E-1) به ترتیب با ۷، ۷ و ۶ ژن بالاترین عملکرد مولکولی مشاهده شده در میان ژن‌های مورد مطالعه بود. همان‌طور که در نمودار شکل (۳) مشخص است جایگاه سلولی ژن‌ها اغلب بر روی غشای سلولی قرار داشت. نتایج آنالیزهای ژن آنتولوژی تأکید بر این نکته دارد که ژن‌های *tetA* و *tetB* به صورت فعال در افلاکس تتراسایکلین نقش دارند و این کار با هماهنگی مجموعه‌ای از پروتئین‌های فعال بر روی غشاء سلولی و دارای عملکرد مولکولی ترانسپورتر صورت می‌گیرد.



شکل ۳- نمودار آنالیزهای ژن آنتولوژی ژن‌های دارای برهمکنش در شبکه ژنی *tetA* و *tetB*

نتیجه‌گیری

شبکه بازسازی‌شده به روشنی تأیید می‌کند که ژن‌های *tetA* و *tetB* در افلاکس تتراسایکلین به خارج از سلول نقش مستقیم دارند. همچنین ژن *tetA* با اثرگذاری بر بیان ژن *yebA* در کنار ژن‌های *tetC* و *tetR*، از اتصال زیرواحدهای ریبوزوم جلوگیری می‌کند. این موضوع می‌تواند گواهی بر نقش محافظتی ساختار ریبوزوم در کنار نقش افلاکس تتراسایکلین باشد. همچنین بررسی شبکه ژنی *tetB* مشخص کرد این ژن با فعال کردن و برهمکنش فعالیت با سایر ژن‌های موجود در شبکه نظیر *psdA*، *yheH*، *yyaO* و *yyaR* علاوه بر افلاکس تتراسایکلین، نقش کلیدی در سمیت‌زدایی و آنتی‌پورت طیف گسترده‌ای از سموم مثل استرپتوترسین و اسیدهای فنولیک دارد. نتایج آنالیزهای ژن آنتولوژی نشان داد ژن‌های *tetA* و *tetB* افلاکس تتراسایکلین را با هماهنگی مجموعه‌ای از پروتئین‌های فعال بر روی غشاء سلولی و دارای عملکرد مولکولی ترانسپورتر انجام می‌دهند.

References

1- Kamrani Hemat N, Mirzaee M, Najar-peerayeh S. Prevalence of tetracycline resistance genes (tetA, tetB) and antibiotic resistance pattern in uropathogenic Escherichia coli isolates. NCMBJ. 2017; 7(25):9-18 [In Persian].

2- Shokri D, Rabbani-Khorasgani M. New Molecular Resistance Mechanisms again Antibiotics in Bacteria. J Isfahan Med Sch 2015; 33(328): 410-28 [In Persian].

3- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. Nucleic acids research. 2017; 45(Database issue):D362-D8.

4- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS,

Wang JT, Ramage D, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome research. 2003; 13(11):2498-504.

5- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. Bioinformatics. 2008; 24(2):282-4.

6- Jiao X, Sherman BT, Huang DW, Stephens R ,Baseler MW, Lane HC, *et al.* DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. Bioinformatics (Oxford, England). 2012; 28(13):1805-6.

7- Benjamini Y, Hochberg A. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J Royal Stat Soc Ser. 1995; 57.

8- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, *et al.* UniProt: the Universal Protein knowledgebase. Nucleic acids research. 2004; 32(Database issue):D115-D9.

9- Beale S. Biosynthesis of Hemes. EcoSal Plus. 2007.

10- Elgrably-Weiss M, Park S, Schlosser-Silverman E, Rosenshine I, Imlay J, Altuvia S. A Salmonella enterica serovar typhimurium hemA mutant is highly susceptible to oxidative DNA damage. J Bacteriol. 2002; 184(14):3774-84.

11- Tan BK, Bogdanov M, Zhao J, Dowhan W, Raetz CR, Guan Z. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012; 109(41)16504-9.

12- Serricchio M, Bütikofer P. An essential bacterial-type cardiolipin synthase mediates cardiolipin formation in a eukaryote. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012; 109(16):E954-E61.

13- Hauser R, Pech M, Kijek J, Yamamoto H, Titz B, Naeve F, *et al.* RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. PLoS genetics. 2012; 8(7):e1002815.

14- Duy NV, Mader U, Tran NP, Cavin JF, Tam le T, Albrecht D, *et al.* The proteome and transcriptome analysis of Bacillus subtilis in response to salicylic acid. Proteomics. 2007; 7(5):698-710.

15- Burguiere P, Auger S, Hullo MF, Danchin A, Martin-Verstraete I. Three different systems participate in L-cystine uptake in Bacillus subtilis. J Bacteriol. 2004; 186(15):4875-84.

16- Torres C, Galian C, Freiberg C, Fantino JR, Jault JM. The YheI/YheH heterodimer from Bacillus subtilis is a multidrug ABC transporter. Biochimica et biophysica acta. 2009; 1788(3):615-22.

17- Cox G, Stogios PJ, Savchenko A, Wright GD. Structural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenylyltransferase ANT(2″)-Ia. MBio. 2015; 6(1):e02180-14.

18- Baars L, Ytterberg AJ, Drew D, Wagner S, Thilo C, van Wijk KJ, *et al.* Defining the role of the Escherichia coli chaperone SecB using comparative proteomics. J Biol Chem. 2006; 281(15):10024-34.

19- Hosoya S, Yamane K, Takeuchi M, Sato T. Identification and characterization of the Bacillus subtilis D-glucarate/galactarate utilization operon ycbCDEFGHJ. FEMS microbiology letters. 2002; 210(2):193-9.

20- Gebendorfer KM, Drazic A, Le Y, Gundlach J, Bepperling A, Kastenmuller A, *et al.* Identification of a hypochlorite-specific transcription factor from Escherichia coli. J Biol Chem. 2012; 287(9):6892-903.

21- Burckhardt RM, Escalante-Semerena JC. In Bacillus subtilis, the SatA (Formerly YyaR) Acetyltransferase Detoxifies Streptothricin via Lysine Acetylation. Appl Environ Microbiol. 2017; 83(21):e01590-17.

22- Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W ,Watanabe K, Zhang X, *et al.* The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol Mol Biol Rev. 2005; 69(2):326-56.

23- Stasinopoulos SJ, Farr GA, Bechhofer DH. Bacillus subtilis tetA(L) gene expression: evidence for regulation by translational reinitiation. Mol Microbiol. 1998; 30(5):923-32.

Evaluation of gene network on tetracycline antibiotic resistance controlled by *tetA* and *tetB* genes using databases information

Yasoub Shiri[1*], Bahman Fazeli-Nasab[2]

1- Assistant professor of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Lecturer, Research Dept. Of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: September 30, 2019; Revise: October 30, 2019; Accept: October 30, 2019

Summary

The process of antibiotic resistance is divided into two categories: intrinsic and acquired resistance. In intrinsic resistance, the bacteria show resistance due to their specific properties to one or all of the antibiotics. But acquired resistance is caused by molecular changes in susceptible bacteria and, eventually, it causes antibiotic-resistant bacteria to emerge. That could be due to chromosomal mutations, transposons, or transmissible plasmids. Numerous genes control the different mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. The *tetA* and *tetB* genes are the major activating genes for tetracycline efflux mechanism, which decrease the concentration of tetracycline in bacterium. This study was performed to reconstruct the network of *tetA* and *tetB* genes using data and information in molecular databases. The reconstructed network clearly confirms that *tetA* and *tetB* genes have a direct role in tetracycline efflux. In association with other proteins, *tetB*, in addition to tetracycline efflux, plays a key role in the detoxification and antiport of a wide range of toxins, such as streptocycline and phenolic acids. Gene Anthology analysis showed that most of the genes involved in the tetracycline resistance process are membrane proteins and their molecular function is transporter.

Keywords: *Antibiotics, Bacteria, Gene Network, Tetracycline*

بررسی میزان آلودگی گوشت گاو تولیدی در شهرستان زاهدان به اشریشیاکلی با روش MPN وتشخیص سویه O۱۵۷:H۷ در نمونه‌های جدا شده به روش PCR

بهزاد نیکبخت[۱]، محسن نجیمی[۱*]، سعید سالاری[۱]

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

دریافت مقاله: ۲۰ اسفند ۱۳۹۷، بازنگری: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۰ اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

آلودگی گوشت گاو معمولاً در فرایند کشتار اتفاق می‌افتد، یکی از باکتری‌های روده‌ای که آلودگی ناشی از آن در بین انسان و حیوانات در همه جا پراکنده است، باکتری اشریشیاکلی است. یکی از سروتیپ‌های مهم این باکتری H۷: O۱۵۷ Ecoli است که عامل ایجاد عفونت و بیماری در انسان می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی گوشت گاو تولیدی در شهرستان زاهدان به اشرشیاکلی با روش MPN و تشخیص سویه O۱۵۷:H۷ در نمونه‌های جدا شده به روش PCR است. در طی این مطالعه از بهمن ماه ۱۳۹۶ لغایت تیرماه ۱۳۹۷ در طی شش ماه تعداد ۳۶۰ نمونه گوشت گاو از بسته‌بندی‌های گوشت قرمز شهرستان زاهدان، از قسمت‌های مختلف لاشه جمع‌آوری شد و در آزمایشگاه به روش MPN، جداسازی باکتری اشریشیاکلی مقاوم به حرارت انجام شد. تعداد ۷ ایزوله در نهایت جداسازی شد .تأیید نهایی با استفاده از آغازگر اختصاصیrfb برای تشخیصH۷: O۱۵۷ Ecoli با استفاده از واکنش PCR بود . تنها یک ایزوله از نظر این سروتیپ تأیید شد که نشان‌دهنده وضعیت مناسب بهداشتی گوشت‌های تولید شده در شهرستان زاهدان می‌باشد. در مطالعه حاضر با بررسی مولکولی تعداد ۲ ایزوله از باکتری *اشریشیاکلی* مقاوم به حرارت به دست آمد که در بررسی ژن *rfb* تنها یک جدایه از نظر *اشریشیاکلی* سروتیپ *O۱۵۷H۷* تأیید شد. با این مطالعه حضور این باکتری در نمونه‌های گوشت گاو تأیید می‌شود که بیانگر این می‌تواند باشد که حضور این باکتری در سایر فراورده‌های خام دامی در این استان نیز باید بررسی و ردیابی شود.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی، O۱۵۷ :H۷ ، MPN ، روش PCR ، زاهدان*

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

مقدمه

آلودگی‌های باکتریایی در مواد غذایی از مهم‌ترین مسائل مورد بحث در حوزه سلامت عمومی است. بر خلاف افزایش سطح ایمنی در حوزه مواد غذایی، مسمومیت ایجاد شده از مواد غذایی و فراورده‌های خام دامی پیوسته در حال افزایش است (۳).

تشخیص و شناسایی باکتری‌های ایجادکننده بیماری به منظور ارتقا سلامت و ایمنی غذا اهمیت ویژه‌ای دارد. یکی از باکتری‌های بیماری‌زای مهم در انسان *اشریشیاکلی* است. چندین سویه از این باکتری به عنوان پاتوژن‌های بالقوه در فراورده‌های غذایی معرفی شده است. یکی از سویه‌های بیماری‌زای مهم *اشریشیاکلی O۱۵۷:H۷** است که به عنوان یکی از عمده‌ترین عوامل ایجاد بیماری در انسان مورد توجه است. سویه *اشریشیاکلی O۱۵۷:H۷* سالیانه باعث بروز مواردی از مرگ می‌شود که از طریق مواد غذایی مختلف به ویژه فراورده‌های خام دامی به انسان انتقال می‌یابد. این باکتری قادر به تولید سمی است که شبیه به سم باکتری *شیگلا* است. *اشریشیاکلی* تولیدکننده شیگا توکسین در دو گروه باکتری‌های مولد کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک قرار می‌گیرد (۵).

باکتری *اشریشیاکلی* جز فلور طبیعی در روده تمام حیوانات خون‌گرم است به‌طوری که تعداد این باکتری در روده انسان وگوشت‌خواران از روده علف خواران بیشتر است. حضور این باکتری در آب و غذا می‌تواند به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و احتمال حضور پاتوژن‌های بیماری‌زا باشد. این باکتری عمدتاً مسئول سه نوع عفونت بالینی در انسان، اسهال و بیماری‌های روده‌ای، عفونت مجرای ادراری و سپتی‌سمی و مننژیت است. این پاتوژن‌ها عمدتاً از مواد غذایی مانند گوشت و فراورده‌های گوشتی نپخته، شیر و فراورده‌های غیرپاستوریزه آن منتقل می‌شود (۵).

گوشت لاشه گاو پس از کشتار عاری از میکروارگانیسم است. معمولاًدر طی انجام فرآیندهای کشتاری، اثر تماس گوشت با پوست، چاقو، دست و لباس کارگران، وسایل و تجهیزات کشتار و آب استفاده شده برای شستشوی لاشه‌ها آلودگی لاشه با باکتری‌ها اتفاق می‌افتد. بررسی بار میکربی گوشت قبل از رسیدن به دست مصرف‌کننده امری ضروری است که از این بین باکتری‌هایی که در سلامت و بهداشت عمومی مهم هستند در اولویت می‌باشند (۴).

استفاده از روش‌های مولکولی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، می‌تواند جایگزین مطمئنی برای روش‌های فنوتیپی در جهت شناسایی میکروارگانسیم‌های مورد نظر باشد. به دلیل بیماری‌زایی و دوز عفونی اندک، سازمان بهداشت جهانی، تأکید زیادی را بر پایش مستمر سویه‌های *EColiO157:H7* دارد (کارگر و همکاران ، ۱۳۸۸). اما متأسفانه تاکنون در کشور ما به ویژه در مورد ارزیابی این باکتری باهدف تشخیص سویه *O۱۵۷:H۷* در فراورده‌های خام دامی به ویژه گوشت قرمز، برنامه غربالگری خاصی اجرا نشده است. با توجه به اهمیت این موضوع، هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آلودگی گوشت گاو تولیدی در شهرستان زاهدان به باکتری *اشرشیا کلی* با روش *MPN* و تشخیص سویه *O۱۵۷:H۷* درنمونه‌های جدا شده به روش PCR است.

مواد و روش کار

از بهمن ماه سال ۱۳۹۶ لغایت تیر ماه سال

Escherichia coli O157:H7

۱۳۹۷ در یک دوره زمانی ۶ ماهه، تعداد ۳۶۰ نمونه گوشت گاو از بسته‌بندی‌های گوشت قرمز شهرستان زاهدان (شامل ۶ بسته‌بندی) هر ماه ۱۰ نمونه اخذ گردید. نمونه‌ها شامل سردست، ران، راسته، گردن و قلوه‌گاه بود. مورد آزمایش برای جدا سازی باکتری اشریشیاکلی قرار گرفت. تعیین هویت توسط روش‌های بیوشیمیایی در آزمایشگاه انجام گرفت. برای جدا سازی باکتری به روش بیوشیمیایی از روشMPN استفاده شد.

میزان ۲۵ گرم گوشت با ترازو با دقت یک دهم گرم وزن شد و در داخل پاکت استوماکر ریخته شد و به آن تحت شرایط استریل در کنار شعله ۲۲۵میلی‌لیتر محیط آب پپتونه استریل اضافه شد. سپس در داخل دستگاه استوماکربه مدت ۳۰ ثانیه همگن و یک دست شد. از محلول همگن شده در کنار شعله و زیر هود رقت‌سازی انجام شد سپس برای کشت به صورت MPN سه سری لوله سه‌تایی که هر کدام حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریل سولفات براث * استریل حاوی لوله دورهام است برای کشت آماده شد.

در ۳ لوله اول میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت یک دهم اضافه شد. در ۳ لوله دوم میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت یک صدم اضافه شد و در ۳ لوله سوم میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت یک هزارم اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و از زمان ۲۴ ساعت برای رشد و تولید گاز مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت تعداد لوله‌های مثبت از نظر کدورت و تولید گاز به ترتیب رقت برای رشد احتمالی کلی‌فرم ثبت شد. برای تأیید این مرحله به تعداد لوله‌های مثبت دو لوله حاوی ده سی‌سی محیط کشت بریلا براث به همراه لوله دورهام و یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت تریپتون واتر برداشته شد و میزان ۱ میلی‌لیتر از لوله‌های مثبت لوریل سولفات براث به هر لوله تحت شرایط استریل در کنار شعله اضافه شد. یک لوله حاوی بریلا براث و یک لوله تریپتون واتر در انکوباتور با دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و یک لوله بریلا براث برای تأیید کلی‌فرم مرحله اول در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

بعد از این زمان لوله‌های بریلا براث مثبت از نظر کدورت و تشکیل گاز در دورهام در ۳۷ درجه با نتایج اول به‌دست آمده از لوله‌های لوریل سولفات براث مطابقت داده شد و در صورت مثبت بودن مشابه نمونه‌ها وجود کلی‌فرم از مرحله احتمالی تأیید شد. لوله‌های تریپتون واتر گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۴ درجه بعد از ۲۴ ساعت از انکوباتور خارج شد و به آن چند قطره معرف ایندول اضافه شد. ایجاد حلقه ارغوانی ایندول نشانه حضور باکتری اشرشیاکلی مقاوم به حرارت است. همچنین لوله‌های بریلا براث گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد نیز از زمان ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار می‌گیرد ولوله‌های مثبت از نظر تولید گاز و کدورت ثبت شدند.

برای تأیید نهایی اشریشیاکلی از محیط کشت حاوی بریلا براث بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار** کشت خطی داده شد. در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شد. وجود جلای فلزی در محیط کشت EMB آگار وجود

*Lauryl sulfate Broth

Brila Broth

Trypton Water

Keuvax

** (Eosin Methylen Blue) EMB

اشریشیاکلی را تأیید نمود.

برای استخراج DNA از باکتری‌های تأیید شده اشرشیاکلی در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده می‌شود و از یک پرگنه تکی از هر محیط برای استخراج DNA استفاده می‌شود. در مرحله بعد، استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد و سپس با استفاده از آغازگرهای rfb (پیشگام، ایران) با روش واکنش پلیمر از باکتری‌های اشریشیاکلی سروتیپ O157:H7 شناسایی و ارزیابی شد. جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن rfb

توالی آغازگر Sequence 5'–3'	ژن هدف
CGTGATGATGTTGAGTTG	*rfb*
AGATTGGTTGGCATTACTG	

غلظت DNA استخراجی با دستگاه بیوفوتومتر (اپندورف ،آلمان) اندازه‌گیری شد. DNA استخراجی با غلظت میانگین ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ برابر ۱/۸، به‌دست آمد.

جهت انجام واکنش PCR از مخلوط آماده Taq DNA 2x master (پیشگام، ایران) استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه نیز برای ردیابی ژن rfb از شرکت پیشگام تهیه شد. در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- مواد مورد استفاده در واکنش PCR

نام معرف	غلظت	حجم به میکرولیتر
Taq DNA 2x master	۱۰ برابر	۲۵
آغازگر پیش رو	۱۰۰ پیکومول	۱
آغازگر پس رو	۱۰۰ پیکو مول	۱
آب عاری از ژنوم	-	۲۲
استخراجیDNA	۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر	۱
حجم نهایی		۵۰

حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر شامل Taq DNA 2x master به میزان ۲۵ میکرولیتر، آغازگر پیش رو و پس‌رو هرکدام یک میکرولیتر با غلظت ۱۰ پیکومول ، DNA نمونه با غلظت ۱۰۰ نانوگرم ۱ میکرولیتر و ۲۲ میکرولیتر آب عاری از ژنوم بود .

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر (MWG AG BIOTECH primus96 plus) در ۳۵ سیکل و با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ثانیه صورت گرفت. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR به‌دست آمده روی ژل آگارز یک و نیم درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای اندازه‌گیری سایز قطعه از DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران) استفاده شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مدل (M02 2661 made in EEC) مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفت.

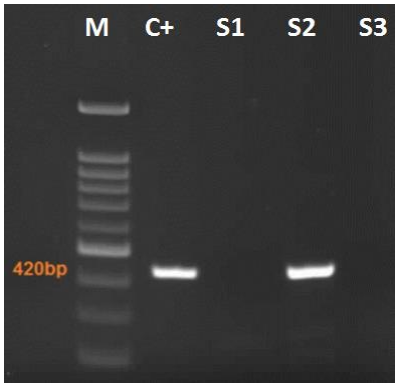
نتایج

در این مطالعه از تعداد ۳۶۰ نمونه اخذ شده از واحدهای بسته‌بندی که به صورت منجمد بودند بعد از انجام آزمایش کلی‌فرم کانت تعداد ۱۱۸ نمونه در مرحله احتمالی در لوله‌های لوریل سولفات براث گاز وکدورت مثبت نشان دادند.

لوله‌های کدورت مثبت و دارای گاز در لوله‌های دورهام وارد مرحله تأییدی شدند در این مرحله هر ۱۱۸ مورد در لوله‌های بریلا براث ،کدورت و گاز مثبت شدند ولی تنها ۷ مورد از نظر *اشریشیاکلی* مقاوم به حرارت دارای واکنش ایندول مثبت در دمای ۴۴ درجه بودند. کشت از لوله‌های تریپتون واتر و قرار دادن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جلای سبز فلزی مربوط به باکتری *اشریشیاکلی* را نشان دادند (شکل ۱).

شکل ۱- کلنی اشریشیاکلی بر روی محیط EMBآگار

از تعداد ۱۱۸ مورد مثبت در مرحله احتمالی تنها ۷ مورد دارای واکنش ایندول مثبت در محیط کشت تریپتون واتر بودند. از این باکتری‌ها برای تشخیص وجود سویه *O157 : H7* ژنوم به روش جوشاندن (۱۰) استخراج شد و با استفاده از ژن *rfb* وارد واکنش PCR شد.



شکل۲- تصویر باندهای مربوط به جدایه اشریشیاکلی O157:H7، C+ کنترل مثبت ،S1 ، S2 و S3 نمونه‌های مورد آزمایش است. مارکر ۱۰۰ جفت بازی است.

در این باکتری‌ها ، با استفاده از روش PCR بر روی DNA استخراج شده از باکتری‌های *اشریشیاکلی* تأیید شده و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، باند جدایه‌های مثبت *اشریشیاکلی* با استفاده از ژن *rfb* در محدوده ۴۲۰bp قرار گرفت و این ایزوله‌ها از نظر *اشریشیاکلی O157 : H7* مورد تأیید قطعی قرار گرفت. این باند تنها در ۱ جدایه از ۱۱۸ باکتری دیده شد. درحالی‌که در ارزیابی فنوتیپی تعداد ۱۱۸ جدایه مورد تأیید *اشریشیاکلی* بودن قرار گرفت. نتایج تکثیر DNA با ژن *rfb* تنها یک باکتری از ۷ باکتری *اشریشیاکلی O157 : H7* را تأیید نمود (شکل۲).

باکتری‌های *اشریشیاکلی* باسیل‌های گرم منفی، اکسیداز منفی و لاکتوز مثبت هستند که در محیط TSI، سطح و عمق محیط را اسیدی و زرد می‌کنند و همراه با تولید گاز است. از نظر آزمون سیترات و آزمون VPمنفی است و واکنش MR و آزمون ایندول آن مثبت است. این ارگانیسم‌ها از نظر آزمون لیزین دکربوکسیلاز*مثبت بوده و در مجموع متحرک هستند و تست هیدرولیز اوره آنها نیز منفی است (۶).

بحث و نتیجه‌گیری

اکثر گزارش‌های موجود درباره جستجوی *اشریشیاکلی O۱۵۷:H۷* نشان می‌دهد که گوشت گاو به عنوان مهم‌ترین محصول دامی در انتقال این باکتری بیماری‌زا به انسان است .این مطالعات نشان می‌دهد که آلودگی گوشت گاو به این باکتری در کشورهای مختلف بسیار متفاوت و از صفر تا ۴۲ درصد در نمونه‌ها متغیر است (۵). از عمده‌ترین چالش‌های شناسایی این باکتری در آزمایشگاه این است که با روش‌های متداول آزمایشگاهی بیوشیمیایی تشخیص آن زمان‌بر و مشکل است بنابراین روش PCR ابزاری قدرتمند برای شناسایی دقیق این باکتری از بین سویه‌های اشریشیاکلی است.

در این مطالعه پس از انجام آزمون‌های میکروب‌شناسی و نیز آزمون‌های اولیه بیوشیمیایی، از میان سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا سازی شده با استفاده از روش PCR ردیابی باکتری مورد نظر انجام شد. درروش PCR به دلیل استفاده از آغازگرهای اختصاصی، توانایی ازدیاد و شناسایی ژن خاص شناسایی‌کننده باکتری وجود دارد.

اشریشیاکلی سروتیپ *O ۱۵۷:H۷* باکتری بیماری‌زای مضر مرتبط با بیماری‌های منتقله از غذا است که باعث سندروم اورمیک هولیتیک می‌شود. جدا سازی *اشریشیاکلی O ۱۵۷:H۷* از نمونه مواد غذایی نیاز به غنی‌سازی وجدا سازی با محیط‌های کشت اختصاصی و تفریقی دارد اما این محیط‌ها اختصاصی و افتراقی برای سویه‌های خاص اشریشیاکلی نیستند. برای همین شناسایی سروتیپ‌ها از غذا و محیط نیاز به استفاده از روش‌های حساس‌تر و دقیقتر دارد. در کنار روش‌های کشت سنتی و بیوشیمیایی، روش‌های مولکولی برای شناسایی اختصاصی سویه‌ها به کمک آمده است که برای شناسایی باکتری‌ها بسیار کاربردی می‌باشند (۸).

Marshall و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای برای بررسی محصولات گوشت تازه در طی فرایند کشتار با اشرشیاکلی جدایه *O ۱۵۷:H۷* انجام دادند، نمونه هایی از ۲۰ گاو گوشتی نمونه‌برداری شدند و ۱۱۳ جدایه باکتریایی به دست

*Lysine Decarboxylase

آمد. ۱۳ مورد از این جدایه‌ها نشان‌دهنده چهار جنس، Escherichia، Enterobacter، Providencia وSerratia شناسایی شد. اشرشیاکلی جدا شده بر اساس ویژگی‌های رشد و بیوشیمیایی شبیه به جدایه *E. coli O ۱۵۷:H۷* بود. حساسیت درجه حرارت برای جدایه‌های جدایه *E. coli O ۱۵۷:H۷* در ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. آنها شاخص *E. coli O۱۵۷:H۷* برای تأیید اثربخشی کنترل‌های فرآیند در مؤسسات کشتار جمعی را مفید دانستند (۹).

Beneduce و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای بر روی *E. coli O۱۵۷:H۷* به خصوصیات کلی این باکتری، جدا سازی و روش‌های شناسایی آن پرداختند. از آن‌جایی‌که این باکتری یکی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی منتقل شده از مواد غذایی است و به علت انتشار وسیع آن، عفونت با دوز کم همراه با علائم شدید را به همراه دارد. آنها در نظر گرفتند که جدا سازی باکتری را بر مبنای عواملی مانند دما، PH وAW قرار دهند که ممکن است رشد و بقای *E. coli O۱۵۷:H۷* را در مواد غذایی و در محیط از سال‌های قبل تحت تأثیر قرار دهد. آنها روش‌های تشخیصی با مبنای مولکولی را مناسب دانستند. تکنیک‌های PCR، امکان دستیابی به ویژگی و حساسیت جدا سازی حتی در نمونه‌های پیچیده مانند غذا و مدفوع در میزان کم را فراهم می‌کند. همچنین پیشنهاد کردند که مطالعات بیشتری باید در مورد بررسی اثر aw بر روی بقا و رشد باکتری *E. coli O ۱۵۷:H۷* لازم است (۷).

جهت شناسایی این بیماری نیز فاکتورهای زیادی مثل حضور بازدارنده‌های PCR در نمونه، شناسایی سلول‌های زنده و غیره زنده، اختصاصیت آغازگر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی‌کننده می‌توانند حساسیت یک روش شناسایی PCR را تحت تأثیر قرار دهند. هدف اصلی در تمام موارد، بهبود حساسیت PCR در شناسایی باکتری بیماری‌زا است، اما بیشترین اطلاعات گزارش شده به اختصاصیت و حساسیت آغازگر برمی‌گردد. بسیاری از تحقیقات بر مبنای PCR که روی سودوموناس آئروژینوزا انجام‌گرفته است بر اساس ردیابی ژن‌های ویرولانس (Virulence)و ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سطحی که عامل تهاجم است، بوده است. مقایسه بین نتایج کشت و PCR نشان می‌دهد که حساسیت، دقت و اختصاصیت روش PCR بسیار بیشتر از روش کشت است .در روش PCR ژنوم میکروارگانیسم مورد نظر ردیابی و احتمال ردیابی ارگانیسم غیر فعال یا مرده نیز وجود دارد که از تفاوت جدا سازی فنوتیپی و ژنوتیپی به شمار می‌رود.

سیاحی و همکاران در سال ۱۳۹۵ با احتمال آلودگی گوشت به مدفوع حیوانی که منبع اصلی عفونت اشریشیاکلی *O۱۵۷:H۷* در نمونه‌های گوشت است، مطالعه‌ای باهدف بررسی میزان شیوع اشریشیاکلی سروتیپ *O۱۵۷:H۷* در نمونه‌های گوشت گاو کشتار شده در کشتارگاه شهرستان کازرون انجام دادند. این مطالعه به‌صورت توصیفی-تحلیلی انجام پذیرفت. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ لاشه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها از برش سطحی عضله گردن گرفته شد و پس از نمونه‌برداری سریعاً کشت و آنالیز میکروبی بر روی نمونه‌ها صورت گرفته و کلنی‌های مشکوک به اشریشیاکلی *O۱۵۷: H۷* توسط روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان آلودگی نمونه‌ها به اشریشیاکلی بر اساس آزمون کشت ۲۰ ٪ مثبت بود (۱۲).

از این تعداد ۱ نمونه (۱ ٪) در آزمون PCR به اشریشیاکلی *O۱۵۷:H۷* تشخیص داده شد. شیوع فصلی اشریشیاکلی *O۱۵۷: H۷* نشان داد که بیشترین شیوع آلودگی نمونه‌های اخذ شده در فصل

تابستان است. نتایج این مطالعه نشان داد که گوشت گاو می‌تواند به‌عنوان یک مخزن بالقوه برای اشریشیاکلی *O157:H7* مطرح باشد و گوشت گاو ممکن است به‌عنوان یک حامل در انتقال این باکتری به انسان عمل کند. که نتیجه جدا سازی باکتری مشابه این تحقیق است.

Ashgan و همکاران در سال ۲۰۱۵ به‌منظور تعیین شیوع و شناسایی مولکولی باکتری اشریشیاکلی سروتیپ O157: H7 از گوشت خام و محصولات گوشتی جمع‌آوری شده از عربستان سعودی مطالعه‌ای انجام دادند. طی دوره از ۲۵ ژانویه ۲۰۱۳ تا ۲۵ مارس ۲۰۱۴، ۳۷۰ نمونه گوشت از کشتارگاه‌ها و بازارهای واقع در ریاض، عربستان سعودی شامل ۲۰۰ نمونه گوشت خام و ۱۷۰ نمونه محصولات گوشتی جمع‌آوری شد. تجزیه باکتریولوژیکی نمونه‌های گوشتی و سروتیپ‌های E.coli جدا شده، جداسازی جدایه‌های ۱۱ (۲/۹۷ ٪) سویه ۷ H:157O را نشان داد. جدا سازی۷ H:157O در گوشت گاو، گوشت مرغ و گوشت خام به ترتیب ۲، ۲/۵و ۲/۵ ٪ بود، اما در بوقلمون خام جدا سازی نشد (۱۱).

جمشیدی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در مطالعه‌ای جدا سازی و تشخیص باکتری اشریشیاکلی سروتیپ *O157: H7* از نمونه‌های چرخ گوشت چرخ‌کرده، جمع‌آوری شده از فروشگاه‌های عرضه گوشت در شهرستان مشهد، به دو روش کشت مرسوم و PCR انجام دادند. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت چرخ کرده به صورت تصادفی در فصل تابستان از فروشگاه‌های عرضه گوشت در سطح شهرستان جمع‌آوری کردند و بعد از کشت در محیط‌های غنی‌کننده، ابتدا آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت تأیید باکتری اشریشیاکلی صورت گرفت، سپس تست PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن‌های O157: H7 انجام گردید. در این مطالعه از تعداد ۷ نمونه، باکتری اشریشیاکلی غیر تخمیرکننده سوربیتول جداسازی گردیدکه در تست PCR فقط یک نمونه به عنوان سروتیپ *O157H7* مورد تأیید قرار گرفت. آنها نتیجه گرفتند روش PCR ممکن است به عنوان جایگزینی برای تست‌های ایمونولوژیک که حضور آنتی‌ژن‌های پیکری و تاژکی را مشخص می‌کنند مورد استفاده قرار بگیرد.

در مجموع با مقایسه مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام شده در داخل وخارج می‌توان نتیجه گرفت که حضور باکتری اشریشیاکلی سروتیپ ۷ O۱۵۷:H تقریباً در بسیاری از فراورده‌های خام دامی از جمله گوشت گاو، گوسفند و سایر حیوانات تولیدکننده گوشت قرمز و همچنین در گوشت طیور و ماهی جدا سازی شده است که درصد شیوع این باکتری در فراورده‌های خام و پخته هم متفاوت است به‌طوری که در نمونه‌های خام بیشتر بوده است. همچنین ثابت شده است که استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند بسیار کارآمد در ردیابی و جستجوی باکتری اشریشیاکلی O۱۵۷: H۷ حتی به میزان کم در نمونه‌های مختلف باشد.

در مطالعه حاضر با بررسی مولکولی تعداد ۲ ایزوله از باکتری *اشریشیاکلی* مقاوم به حرارت به‌دست آمد که در بررسی ژن *rfb* تنها یک جدایه از نظر *اشریشیاکلی* سروتیپ O۱۵۷: H۷ تأیید شد. با این مطالعه حضور این باکتری در نمونه‌های گوشت گاو تأیید می‌شود که بیانگر این می‌تواند باشد که حضور این باکتری در سایر فراورده‌های خام دامی در این استان نیز باید بررسی و ردیابی شود.

با استفاده از این مطالعه مشخص شد که استفاده از روش PCR می‌تواند به‌عنوان یک روش اختصاصی برای شناسایی باکتری اشریشیاکلی O۱۵۷:H۷ معرفی شود، زیرا استفاده از روش‌هایی

مانند MPN و کشت‌های تفریقی شناسایی باکتری تنها به جداسازی باکتری اشریشیاکلی مقاوم به حرارت منتهی می‌شود و تشخیص سروتیپ‌های خاص با روش PCR سریع‌تر نتیجه را حاصل می‌کند و این نتایج نشان‌دهنده کیفیت نسبتاً مطلوب این نوع بسته‌بندی در شهر زاهدان را نشان می‌دهد.

پیشنهادها

این مطالعه اقدامی اولیه برای بررسی حضور باکتری *اشریشیا کلی* O۱۵۷: H۷ در گوشت‌های تولیدی به دو روش MPN و مولکولی است. ازآنجایی‌که تشخیص خاص این باکتری در آزمایشگاه‌ها انجام نمی‌شود پیشنهاد می‌شود که پایش این باکتری در مراحل مختلف کشتار دام در خط تولید انجام پذیرد تا نقطه بحرانی حضور این باکتری در خط کشتار مشخص گردد و اقدامات پیشگیرانه برای جلوگیری از انتقال این باکتری به سایر محصولات صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از مدیر کل و معاونین محترم و پرسنل خدوم آزمایشگاه مرکزی اداره کل دامپزشکی استان سیستان و بلوچستان که موجبات انجام این تحقیق را فراهم نموده و کمال همکاری را مبذول داشتند.

References

1- Jafareyan-Sedigh M, Rahimi E, Doosti A. Isolation of Escherichia coli O157: H7 in sheep meats using cultural and PCR method, Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 13(2): 61-68. [In Persian]

2- Jamshidi A, Bassami M.R, Rasooli M. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from ground beef samples collected from beef markets, using conventional culture and polymerase chain reaction in Mashhad, northeastern Iran, IRANIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH (IJVR). 2008; 9(22): 72-76.

3- RAJABZADEH S, BAHREINI M, SHARIFMOGHADAM M.R. Simultaneous detection of foodborn pathogenes Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. By Multiplex PCR in ready–to–eat vegetables, Iranian Food Science and Technology Research Journal;2017 ; 13(1): 105- 111. [In Persian]

4- Koohdar V.A. Study of Beef Carcass Bacterial Contamination in Karajrak Slaughterhouse , Journal of Food Hygiene. 2013; 3(10): 43-51. [In Persian]

5- Safarpoor F, Rahimi A, ghobadi M, Yahaghi, A. Escherichia coli producing shigatoxin in sheep cheese, IRANIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES AND TROPICAL MEDICINE. 2013; 19(66): 25-29. [In Persian]

6- Noroozi J. Practical Methods for Identifying Bacteria , 1nd ed. Tehran: Hayan Publications; 2010.

7- Beneduce L, Spano G, Massa S. Escherichia coli O157:H7 general characteristics, isolation and identification techniques. Annals of Microbiology. 2003; 53(4): 511-527.

8- Kim J, Kim S, Kwon N, Bae W, Lim J, Koo H. and *et. al.* Isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. J. Vet. Sci. 2005; 6(1): 6-19.

9- Marshall K.M. Identification of Escherichia coli O157: H7 meat processing indicators for fresh meat through comparison of the effects of selected antimicrobial interventions. Journal of food protection.2005; 68(12): 2580-2586.

10- Nikbakht B, Sani A. Identification Of Salmonella sp. From Contaminated Meat Samples by MultiplexnPCR-BASED Assay. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 2016; 4(5): 513-518

11- Ashgan M, Abdullah A. A, Adel M, Jakeen K. J, Onizan G. Z, Hassan A. and *et al.* Molecular characterization of Escherichia coli O157:H7 recovered from meat and meat products relevant to human health in Riyadh, Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 2015; 22(6): 725–729.

12- Korbandeh M, Emadi M, Hoseinizadeh ghasemi A, saiahi A. Isolation of Escherichia coli O157: H7 from cattle meat in slaughter house of Kazeroon By PCR. 12th Iranian Veterinary students Congress 04-05 September 2018, Semnan University-Iran. [In Persian]

Investigating the rate of pouring of beef produced in Zahedan to Escherichia Coli using MPN and detection of O157:H7 by PCR

Behzad Nikbakht[1], Mohsen Najim*[1] ,Saeed Salari[1]

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

Receive: March 11, 2019; Revise: April 22, 2019; Accept: May 10, 2019

Summary

Beef contamination usually occurs in the killing process. One of the intestinal bacterial pathogen that causes disease in human and animals everywhere is bacterial pathogen *E. coli*. One of the important serotypes of this bacterium is *E. coli* O157: H7. The aim of this study was to determine the rate of contamination of beef produced in Zahedan to *E. coli* by MPN Method and also *O157:H7* strains isolated by PCR. During this study, conducted within six months from July 1396 to July 1397, 360 beef samples from cattle meat packages of Zahedan City, from different parts of the carcasses isolates of the heat-resistant *E. coli* in the laboratory was carried out using the MPN method. Seventy isolates were finally detected. The final test was performed using a specific primer as *rfb* to detect *E. coli O157:H7* using a PCR reaction. Only one isolate was confirmed based on this serotype, which indicates the proper health status of the meat produced in Zahedan. In the present study, a molecular study of 2 isolates of heat-resistant Escherichia coli bacteria was done. In the study of rfb gene, only one isolate in terms of Escherichia coli serotype 7H: 157O was confirmed. With this study, the presence of this bacterium in beef samples is confirmed, which can indicate that the presence of this bacterium in other raw animal products in this province should also be investigated and tracked.

Keywords: *Escherichia coli, O157:H7,MPN, PCR, Zahedan*

ارزیابی اثرات ضد باکتریایی اسانس بومادران در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی

آسیه احمدی دستگردی*[۱]، پانیذ زین‌ساز[۲]، ندا ظهوریان[۲]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ خرداد ۱۳۹۸ ، بازنگری: ۲۵ شهریور ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۵ مهر ۱۳۹۸

چکیده

اهمیت بیماری‌های ناشی از مواد غذایی از یک طرف و تقاضای مصرف‌کنندگان برای کاهش استفاده از افزودنی‌های سنتزی از طرف دیگر، توجه محققین را به استفاده از افزودنی‌های طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی جلب نموده است. هدف از انجام این مطالعه استخراج و شناسایی ترکیبات اصلی اسانس بومادران، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و سس مایونز می‌باشد. بررسی ترکیبات اسانس با روش گاز کروماتوگرافی وجود بورنئول، سینئول، کامفور و پینن را به عنوان مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس بومادران تعیین کرد. حساس‌ترین پاتوژن به اسانس در شرایط آزمایشگاهی، باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین پاتوژن‌ها، باکتری‌های گرم منفی تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های میکروبی سس مایونز نشان داد که اسانس بومادران همانند نگهدارنده سنتزی بنزوات- سوربات از رشد تمام میکروارگانیسم‌های پاتوژن جلوگیری کرد، در حالی که در نمونه کنترل، پاتوژن‌ها مشاهده شدند. همچنین مایونز کم‌چرب در مقایسه با نمونه پرچرب، بار میکروبی کمتری نشان داد. بنابراین می‌توان استفاده از اسانس بومادران را به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سس مایونز پیشنهاد نمود.

واژگان کلیدی: *اسانس، بومادران، فعالیت ضد میکروبی، مایونز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: As.ahmadi17@gmail.com

مقدمه

از آنجا که بسیاری از مواد غذایی حاوی نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشند که با معیارهای سلامتی مطابقت ندارد هر نوع اقدامی در جهت کاهش استفاده از این ترکیبات ضروری به نظر می‌رسد. امروزه در راستای حذف و یا کاهش افزودنی‌های شیمیایی در مواد غذایی، تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با مواد طبیعی انجام شده است. ترکیبات استخراج شده از گیاهان مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد هستند. در حقیقت اسانس‌های گیاهی به علت داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فرار آروماتیک که برخی از آنها از عوامل مهم ایجادکننده طعم در غذا نیز به شمار می‌روند مورد توجه می‌باشند (۱). این ترکیبات فرار دارای خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی بوده و می‌توانند به عنوان طعم‌دهنده و نگهدارنده در مواد غذایی به‌کار روند (۲).

در بین گیاهان دارویی، بومادران از مشهورترین و قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است که به فراوانی در طب برای درمان بیماری‌ها زخم‌ها و سوختگی‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین خواص دارویی بومادران، تأثیرات ضد میکروبی آن بر طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا در انسان و حیوان است (۳).

مایونز یکی از مهم‌ترین مواد غذایی حساس به فساد میکروبی است و به دلیل میزان چربی بالا، ماهیت مواد خام مانند تخم‌مرغ و فقدان تیمار حرارتی، مستعد آلودگی میکروبی با *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* می‌باشد (۴-۶). مایونز متداول‌ترین عامل شیوع بیماری‌های سالمونلوزیس در سراسر دنیا می‌باشد. شیوع مسمومیت غذایی توسط *سالمونلا* از طریق مصرف مایونز خانگی توسط رادرف رد و بورد (۱۹۹۳) گزارش شده است (۷). *سالمونلا اینتریتیدیس* یک باکتری انتروپاتوژنیک است که به وسیله مواد غذایی مثل مایونز که طی تولید آن فرآیند حرارتی نمی‌بینند شیوع پیدا می‌کند. این باکتری می‌تواند توسط تیمار حرارتی نابود شود. ولی معمولا مایونز، تیمار حرارتی ندارد. این شرایط نیاز به روش‌هایی برای حذف پاتوژن‌ها را ایجاد می‌کند (۸-۹). *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* از باکتری‌های پاتوژن در مواد غذایی بدون تیمار حرارتی می‌باشند (۷). با توجه به تاثیرات نامطلوب افزودنی‌های سنتزی در مایونز، استفاده از افزودنی‌های طبیعی یک ضرورت جدی به حساب می‌آید. در تحقیقات قبلی کاربرد اسانس پونه کوهی، اسانس *Ziziphora clinopodioides* و اسانس آویشن شیرازی در مایونز بر ضد *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ساکارومایسس سرویزیه* بررسی شده است (۹،۱۰،۱۱). هدف از این پژوهش، رشد و بقاء *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا اینتریتیدیس* و *اشریشیاکلی* در مایونز حاوی اسانس گیاه بومادران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

سویه‌های میکروبی استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *سالمونلا اینتریتیدیس* (ATCC 4933) و *اشریشیاکلی* (ATCC 25922) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. کلیه محیط‌های کشت (بردپارکر آگار، EC براث و سالمونلا شیگلا آگار)، همچنین بنزوات و سوربات از مرک آلمان تهیه شد. مواد تشکیل‌دهنده سس مایونز از جمله تخم‌مرغ، نمک و شکر از سوپرمارکت خریداری شد.

روش‌ها

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس: اسانس گل گیاه با روش کلونجر استخراج و به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent 7890 A مجهز به ستون HP-5-MS به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت لایه ۲۵ میکرومتر متصل به طیف نگار جرمی مدل Agilent 5975 C تزریق شد. شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری (R_t)، شاخص کواتز (RI) و مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه دستگاه GC/MS صورت گرفت (۱۲).

بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی اسانس: جهت بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس (۷/۲۰-۰/۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از دو روش چاهک و ریز رقت استفاده شد. شاهد منفی ۵٪ DMSO و شاهد مثبت آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. هاله‌های عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. جهت تعیین MIC از اسانس، سریال‌های رقتی در محیط MHB به‌دست آمد. آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. پس از تعیین MIC از تمامی لوله‌هایی که در آنها عدم رشد باکتری و قارچ مشاهده شد نمونه‌برداری شد و پس از کشت در پلیت حاوی مولر هینتون آگار پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شده، پلیت حاوی کمترین غلظت اسانس که در آن عدم رشد باکتری و قارچ قابل مشاهده است به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۳-۱۴).

تهیه تیمارهای مایونز: بر اساس مقادیر محاسبه شده از فعالیت ضد میکروبی اسانس در آزمون MIC و MBC، اسانس بومادران (۴/۵ و ۷/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برای بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی به مایونز اضافه شد. یک نمونه مایونز با نگهدارنده سنتزی بنزوات- سوربات (۰/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد (۱۵). یک نمونه سس مایونز نیز بدون هیچ‌گونه افزودنی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. دو نوع سس مایونز پرچرب (۶۵٪) و کم چرب (۳۰٪) در پایلوت تولید شد (۱۶). نمونه‌های مایونز به چهار گروه تقسیم شدند: EO (حاوی اسانس)، BS (بنزوات-سوربات)، C (کنترل بدون افزودن اسانس و میکروارگانیسم) و C_{mo} (کنترل بدون افزودن اسانس و حاوی میکروارگانیسم تلقیح شده). نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای بسته‌بندی شده و با فویل آلومونیوم پوشانده شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای یخچال نگهداری شدند.

اندازه گیری pH: برای اندازه‌گیری pH مایونز پرچرب و کم چرب pH متر (Metrohm, Switzerland) در دمای محیط استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از محیط کشت نوترینت آگار شیب‌دار استفاده شد. بعد از کشت و ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد (۱۳-۱۴).

تلقیح میکروارگانیسم‌ها به مایونز: سوسپانسیون میکروبی *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* به نمونه‌های مایونز تلقیح شد، به‌طوری که غلظت نهایی 10^3 CFU/g باشد. برای اطمینان از صحت تلقیح، کشت میکروبی انجام گرفت. میزان رشد میکروارگانیسم‌ها پس از زمان‌های ۷۲ ساعت، ماه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ تعیین گردید. نتایج به‌صورت log 10 CFU/g گزارش شد.

جستجوی میکروارگانیسم‌ها : برای جستجوی *استافیلوکوکوس آرئوس* از محیط بردپارکر آگار، برای جستجوی *اشریشیاکلی* از محیط EC براث و برای جستجوی *سالمونلا اینتریتیدیس* از محیط سالمونلا شیگلا آگار و کشت سطحی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (۱۷).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تحلیل و ارزیابی آماری داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه داده‌ها (ANOVA) توسط نرم افزار (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA Expert Design 8.0 برای تأیید وجود اختلاف بین داده‌ها انجام شد. نوع مطالعه response surface optimal، نوع طراحی D-optimal و مدل طراحی Quadratic بود ($P < 0.05$).

نتایج

بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس: نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس بومادران بر روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ آورده شده است. جدول ۲ نشان می دهد قوی‌ترین اثر و بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد، مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۷/۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در برخی غلظت‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک شیمیایی کلرامفنیکل (30µg/ml) بیشتر بود. همچنین با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله عدم رشد افزایش یافته است.

جدول ۱- نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس بومادران

باکتری	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	۴/۵	۷/۲
سالمونلا اینتریتیدیس	۷/۲	–
اشریشیاکلی	۷/۲	–

نتایج برحسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است

جدول ۲- نتایج قطر هاله عدم رشد مربوط به اسانس بومادران در غلظت‌های مختلف و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل

	غلظت (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)											
باکتری	۰/۴۵	۱/۰۲	۱/۶۷	۲/۴۱	۳/۱۲	۳/۸۳	۴/۵	۵/۱۸	۵/۸۵	۶/۵۳	۷/۲۰	کلرامفنیکل
استافیلوکوکوس اورئوس	-	-	-	-	۵	۶	۷/۵	۸/۵	۹/۵	۱۰/۵	۱۷/۵	۹/۵
سالمونلا اینتریتیدیس	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۱/۵
اشریشیاکلی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۵/۵

نتایج برحسب میلی‌متر گزارش شده است؛ کلرامفنیکل (۳۰ µg/ml)

بررسی ویژگی‌های میکروبی سس مایونز: از آن‌جایی که سیستم‌های طبیعی معمولاً دارای پیچیدگی بیشتری نسبت به شرایط آزمایشگاهی هستند، لذا علاوه بر مطالعه خواص ضد میکروبی اسانس بومادران در محیط آزمایشگاهی، این ویژگی در سس مایونز و بر روی باکتری‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۳ جمعیت باکتریایی در انواع مایونزهای پرچرب و کم‌چرب در طول مدت ۶ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است در هر دو نوع مایونز

حـــاوی نگهدارنـــده طبیعـــی (اســـانس) و شـــیمیایی (بنـزوات-سـوربات)، سـلول‌های زنـده میکروبـی در طـول دوره نگهداری مشاهده نشدند.

جدول ۳- جمعیت باکتریایی (log10 CFU/g) در تیمارهای مختلف مایونز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

زمان نگهداری	تیمارها	*استافیلوکوکوس اورئوس*		*اشریشیاکلی*		*سالمونلا اینتریتیدیس*	
		مایونز پرچرب	مایونز کم‌چرب	مایونز پرچرب	مایونز کم‌چرب	مایونز پرچرب	مایونز کم‌چرب
۰	EO 4.5	–	-	–	-	–	-
	EO 7.2	–	-	–	-	–	-
	B+S 0.75	–	-	–	-	–	-
	C mo	$۲/۱۳\times۱۰^{۲}\pm ۰/۱۵^{a}$	$۹/۳\times۱۰^{۱}\pm ۰/۳۰^{b}$	$۷/۲\times۱۰^{۲}\pm ۰/۲^{c}$	$۴/۳۶\times۱۰^{۲}\pm ۰/۳۷^{d}$	$۶/۱\times۱۰^{۱}\pm ۰/۱۵^{e}$	$۵/۱\times۱۰^{۲}\pm ۰/۱۰^{f}$
	C	$۴/۲۶\times۱۰^{۱}\pm ۰/۱۵^{g}$	-	–	-	–	-
۱	EO 4.5	-	–	-	–	-	-
	EO 7.2	-	–	-	–	-	-
	B+S 0.75	-	–	-	–	-	-
	C mo	$۲/۴۳\times۱۰^{۲}\pm ۰/۱۵^{a}$	$۱/۲\times۱۰^{۲}\pm ۰/۲۶^{b}$	$۵/۵۶\times۱۰^{۲}\pm ۰/۲۵^{h}$	$۳/۳۶\times۱۰^{۲}\pm ۰/۳۵^{k}$	-	–
	C	$۲/۵۳\times۱۰^{۱}\pm ۰/۳۰^{m}$	-	–	-	-	–
۲	EO 4.5	-	-	–	-	-	–
	EO 7.2	-	-	–	-	-	–
	B+S 0.75	-	-	–	-	-	–
	C mo	$۳/۳۳\times۱۰^{۱}\pm ۰/۱۵^{n}$	-	–	-	-	–
	C	–	-	–	-	-	–

EO 4.5: اسانس در غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

EO 7.2: اسانس در غلظت ۷/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

B+S 0.75: بنزوات-سوربات در غلظت ۰/۷۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر

C mo: نمونه کنترل بدون افزودن اسانس و حاوی میکروارگانیسم تلقیح شده

C: نمونه کنترل بدون افزودن اسانس و میکروارگانیسم

در ماه سوم تا انتهای دوره نگهداری در هیچ کدام از نمونه‌ها رشد میکروبی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

حساس‌ترین میکروارگانیسم به اسانس بومادران (کمترین MIC) در بین میکروارگانیسم‌های مورد بررسی *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین آنها *سالمونلا اینتریتیدیس* و *اشریشیاکلی* بودند. اسانس‌ها اثرات ضد میکروبی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. این ترکیبات نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهند و با نفوذ در غشا منجر به متورم شدن غشا گردیده و فعالیت آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (۱۸). فعالیت ضد میکروبی اسانس بومادران می‌تواند ناشی از حضور مقادیر زیاد کامفور، بورنئول، سینئول و آلفا کادینول در اسانس باشد (۱۹).

جدول ۱ و ۲ نشان می‌دهد که به‌طور معمول باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به اسانس حساس‌تر از باکتری‌های گرم‌منفی هستند. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق (بالاتر بودن MIC اسانس علیه باکتری‌های گرم‌منفی نسبت به باکتری‌های گرم‌مثبت) نیز حاکی از حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی بود. به دلیل وجود غشاهای خارجی نسبتاً نفوذ ناپذیر احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم‌منفی (لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی) منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند (۱، ۲۰).

در تیمارهای مختلف مایونز، کلونی‌های *اشریشیاکلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* در نمونه‌های شاهد (C) مشاهده نشد. در مقابل، تعداد کلونی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۷۲ ساعت از تولید از CFU/g $۴/۲۶\times۱۰^{۱}$ به CFU/g $۲/۵۳\times۱۰^{۱}$ در ماه اول کاهش یافت. علت این امر، احتمالاً آلودگی عرضی با مواد اولیه به ویژه وجود تخم‌مرغ غیر

پاستوریزه، ظروف و وسایل آلوده و وسایل حمل و نقل آلوده است که باعث شده این باکتری پاتوژن برای روزها بقا پیدا کند. در نمونه‌های شاهد پرچرب تلقیح شده با *استافیلوکوکوس اورئوس*، تا دومین ماه نگهداری بقاء میکروارگانیسم مشاهده شد. تعداد کلونی‌ها پس از ۷۲ ساعت یک سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کرد. احتمالاً شوک وارده بر باکتری هنگام ورود به محیط اسیدی، دلیل کاهش تعداد کلونی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. علاوه بر این در اولین ماه نگهداری اختلاف معنی‌داری با ماه صفر، مشاهده نشد. احتمالا دلیل آن این است که مرگ باکتری با تزاید آن برابری کرده است. به عبارت دیگر، بقاء باکتری با رشد و تزایدشان قابل مقایسه است. فاکتورهای بسیاری از جمله a_w پایین، pH، درجه حرارت، ویسکوزیته و غیره در این مسأله دخالت دارند. در مایونز کم‌چرب احتمالاً به دلیل عدم وجود تخم‌مرغ کامل، کلونی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد. مطالعات نشان داده است *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به رشد در مقادیر پایین pH و a_w می‌باشد. با این وجود در مایونز فاکتورهای دیگری را بجز pH در زمان بررسی ریسک خطر فرآورده باید مد نظر قرار داد. یکی از این فاکتورها تخم‌مرغ است. گزارش شده است تخم‌مرغ غیرپاستوریزه رشد *استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا اینتریتیدیس* را افزایش می‌دهد (۲۱-۲۳). اگرچه به کار بردن تخم‌مرغ غیرپاستوریزه از سال ۱۹۷۰ ممنوع شده است، با این وجود پاتوژن‌هایی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا اینتریتیدیس* در مقادیر کم در تخم‌مرغ پاستوریزه می‌توانند وجود داشته باشند. استفاده از تخم‌مرغ پاستوریزه احتمال خطر با *استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا اینتریتیدیس* را به حداقل می‌رساند.

همان‌گونه که از جدول ۴ مشخص است در انتهای دوره نگهداری هیچ‌گونه رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* مشاهده نشد. بنابراین مایونزی که تحت شرایط خوب تولید شده باشد ریسک خطر پاتوژن‌ها را ندارد (۲۴). برخی فاکتورها از جمله pH، مواد مغذی مانند چربی، پروتئین و کربوهیدرات‌ها، مقدار آب، درجه حرارت و حضور لیزوزیم در تخم‌مرغ کامل مسئول غیر فعال شدن سریع باکتری‌ها در مایونز است (۲۲، ۲۵). اولین فاکتور بازدارنده pH است. در این بررسی، pH حدود ۴ نمونه‌های مایونز، نزدیک حد تحمل بیشتر پاتوژن‌ها می‌باشد. اثر اسید استیک، با کاهش pH افزایش می‌یابد (۲۲). اثرات سینرژیستی اسید استیک و pH پایین در جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها نقش دارد. اثر این شرایط در غیر فعال‌سازی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا اینتریتیدیس* در مایونز قبلاً گزارش شده است (۲۱، ۲۶). حضور لیزوزیم در تخم‌مرغ به‌کار رفته در مایونز اثرات ضد میکروبی به ویژه علیه باکتری‌های گرم‌منفی دارد. نتایج مشابهی نیز از اثرات لیزوزیم علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شده است (۲۲). اثرات سینرژیستی اسید استیک با لیزوزیم و دیگر مواد ضد میکروبی موجود در سفیده تخم‌مرغ در غیر فعال‌سازی *سالمونلا* در مایونز تأیید شد. نتایج مشابهی در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق گزارش شده است. این نتایج بیان می‌کنند فاکتورهای متعددی در بقاء باکتری‌ها مؤثر هستند که به‌طور مستقل یا سینرژیستی با ترکیبات دیگر فرآورده عمل می‌کنند (۲۲).

در مورد *اشریشیاکلی* بقا میکروبی تا پایان ماه اول در مایونزهای پرچرب و کم‌چرب مشاهده شد و بعد از ۱ ماه به سطوح غیرقابل تشخیص رسید، در حالی که *سالمونلا اینتریتیدیس* حساس‌ترین پاتوژن بود و کلونی‌های آن فقط ۷۲ ساعت پس از تولید

مایونز مشاهده شدند و پس از آن از بین رفتند. به عبارت دیگر، زمانی که *اشریشیاکلی* تلقیح شد، بقاء آن طولانی‌تر از زمان تلقیح *سالمونلا اینتریتیدیس* بود. بیشترین زمان بقاء، زمان تلقیح *استافیلوکوکوس اورئوس* به مایونزها مشاهده شد (۴/۵ و ۷/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). ترتیب مقاومت باکتریایی در نمونه کنترل به شرح زیر است: *استافیلوکوکوس اورئوس*> *اشریشیاکلی* > *سالمونلا اینتریتیدیس*

بنابراین *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سایر پاتوژن‌ها مقاوم‌تر بود. از طرف دیگر *اشریشیاکلی* مقاوم‌تر از *سالمونلا اینتریتیدیس* بود. نتایج مشابهی در مورد بقاء *اشریشیاکلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* در مایونز گزارش شده است (۲۵، ۲۷). لاک و بورد در سال ۱۹۹۴ نتایج مشابهی در مورد بقاء *سالمونلا اینتریتیدیس* در مایونز بدست آوردند (۲۸-۲۹). بقاء بیشتر *اشریشیاکلی* در مایونز در دمای یخچال قبلاً گزارش شده است. دلیل این اختلافات می‌تواند شرایط تولید، نوع ترکیبات به‌کار رفته از جمله تخم‌مرغ پاستوریزه و غیر پاستوریزه، میزان تلقیح، نوع میکروارگانیسم‌ها، a_w، pH و غیره باشد (۲۳، ۲۵).

pH و اسیدیته اثر مهمی در کاهش این ارگانیسم‌ها دارند. برخی مطالعات تأیید می‌کند که فعالیت ضد باکتریایی اسید استیک بر روی *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس* در مایونز بیشتر از اسید سیتریک (لیمو) است (۲۴، ۲۵). نمک و شکر نقش کمتری دارند اما یک اثر تعاملی با اسید استیک یا سرکه در جلوگیری از رشد پاتوژن‌های بیماری‌زا دارند. لشنر و زامپارینی مایونزهای تجاری را با *سالمونلا اینتریتیدیس* آلوده کردند و در معرض pH پایین قرار دادند و مرگ سلولی را مشاهده کردند (۸). بنابراین جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم‌منفی در مایونز در ترکیب با فاکتورهای نامبرده از جمله میزان pH ، اسیدیته و غلظت نمک می‌باشد (۲۵، ۳۰). اثرات pH، درجه حرارت، عوامل ضد میکروبی، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ماده غذایی، موقعیت فیزیکی اجزا و میکروارگانیسم‌ها در مایونز در این امر دخالت دارند (۳۰). همچنین تحقیقات نشان داده است که پودر خردل دارای اثرات باکتری‌کش علیه باکتری‌های پاتوژن است. آلیل ایزو تیوسیانات، ترکیب اصلی پودر خردل دارای پتانسیل ضد میکروبی است. برای مثال زمانی که خردل با اسید استیک ترکیب می‌شود اثرات آنها در کشتن یا جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن بیماری‌زا در محیط‌های مختلف افزایش می‌یابد (۲۵، ۲۷، ۳۱).

گزارشات بسیاری درباره تحمل مقاومت اسیدی *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* بیان شده است. برخی محققین نیز گزارش کردند که به طور معمول گونه‌های *اشریشیاکلی* در مقایسه با *سالمونلا* در شرایط اسیدی زمان طولانی‌تری بقا می‌یابند و بنابراین می‌توانند در مواد غذایی اسیدی شامل مایونز هفته‌ها زنده باقی بمانند (۲۲، ۲۴، ۲۷). مکانیسم دقیق تحمل محیط اسیدی در مورد *اشریشیاکلی* به درستی شناخته نشده است. بسیاری از گونه‌های *اشریشیاکلی* کلونی‌های موکوئید مرئی با لایه لزج پلی‌ساکارید متشکل از اسیدهای کلونیک تشکیل می‌دهند. این مسأله دلیل تحمل محیط اسیدی را توسط *اشریشیاکلی* روشن می‌کند. لایه لزج یک مرز فیزیکی محافظ در شرایط محیطی ایجاد می‌کند که نفوذ عوامل ضد میکروبی را به داخل سلول به تعویق می‌اندازد. از آنجا که بسیاری از پاتوژن‌های بیماری‌زا پلی ساکاریدهای خارجی تولید می‌کنند، لایه لزج *اشریشیاکلی* احتمالاً دارای امکانات شیمیایی یا ساختاری ویژه است که مقاومت به اسید را افزایش می‌دهد (۳۲).

از نقطه نظر پایداری میکروبی دو نوع مایونز تولید شده در این مطالعه، مایونزهای پرچرب در مقایسه با مایونزهای کم چرب، پایداری کمتری

نشان دادند که اشاره به حمایت چربی از رشد میکروارگانیسم‌ها دارد. مقاومت به غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها در مایونز پرچرب نسبت به مایونز کم‌چرب، بیشتر به نظر می‌رسد. دلیل این امر در ترکیبات و فرمولاسیون هر دو نوع مایونز می‌باشد. pH کمتر مایونز کم‌چرب یک اثر کشنده در میکروارگانیسم‌های حساس به اسید مانند *اشریشیاکلی* دارد (۲۵). ژاو و دویل نشان دادند که *اشریشیاکلی*در مایونزهای پرچرب بیشتر از مایونز کم‌چرب بقا پیدا می‌کند. آنها نتیجه گرفتند که مایونز کم‌چرب حاوی ترکیبی با خاصیت ضد *E. Coli* است که در مایونز پرچرب موجود نمی‌باشد (۲۳).

سوربات پتاسیم اثر چندانی بر باکتری‌ها ندارد، اما بنزوات سدیم سرعت نابودی باکتری را تسریع می‌کند. سرعت بالای غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها ناشی از واکنش‌های ضد میکروبی سینرژیستی بین ترکیبات سفیده تخم‌مرغ (لیزوزیم)، pH اسیدی، اسید استیک، بنزوات و سوربات است. (۳۲). هاتکاکس و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که افزودن بنزوات سدیم سرعت غیر فعال‌سازی *اشریشیاکلی* را در مایونزهای پرچرب و کم‌چرب افزایش داد (۲۵). ژاو و دویل در سال ۱۹۹۴ گزارش کردند اگرچه سوربات پتاسیم به تنهایی اثر کمی بر روی *اشریشیاکلی* در آب سیب دارند، حضور همزمان سوربات و بنزوات در کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها مؤثر است (۲۳). اثر ضد میکروبی اسید بنزوئیک روی دیواره سلولی و آنزیم‌های سیکل کربس ظاهر می‌شود. اسید پس از ورود به سلول یونیزه می‌شود و پروتون آزاد می‌کند و سبب ایجاد اختلال در تبادل مواد از دیواره سلولی می‌شود.

همان‌طور که قبلاً مشاهده شد فعالیت ضد میکروبی اسانس بومادران با کمترین MIC علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد. در این مطالعه، حساسیت میکروارگانیسم‌ها به اسانس در شرایط آزمایشگاهی با مایونز متفاوت بود. برای مثال در شرایط آزمایشگاهی، باکتری‌های گرم‌مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم‌منفی به اسانس حساس‌تر بودند، ولی در مایونز از رشد هر دو گروه میکروبی جلوگیری شد. اثرات ضد میکروبی اسانس در مایونز، به ویژه علیه باکتری‌های گرم‌منفی بستگی به pH دارد. درصد چربی نسبت به pH تأثیر بیشتری بر اثر ضد باکتریایی اسانس می‌گذارد (۲۰). میزان پروتئین ماده غذایی نیز یک فاکتور مؤثر در اثرگذاری اسانس‌ها می‌باشد. برخی واکنش‌ها بین ترکیبات فنولیک و پروتئین‌ها و یا دیگر ترکیبات سلولی احاطه‌کننده غشای سلولی رخ می‌دهد که به عنوان مکان هدف اولیه برای اسانس هستند (۳۳). به نظر می‌رسد کربوهیدرات همانند چربی و پروتئین، باکتری‌ها را از عملکرد اسانس حفاظت نمی‌کند (۲۰)، ولی گوتیرز و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند کارایی اسانس در غلظت‌های بالای نشاسته کاهش می‌یابد. نشاسته موجود در مایونز مواد مغذی کافی برای رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم نمی‌کند. سطح آب و یا نمک بالا عملکرد اسانس در مواد غذایی را تسهیل می‌کند. نمک، در شرایط مختلف به عنوان سینرژیسم یا آنتاگونیسم با اسانس یا ترکیبات آنها عمل می‌کند. ساختار فیزیکی ماده غذایی فعالیت ضد باکتریایی اسانس را محدود می‌کند. در امولسیون‌های روغن در آب بسته به اندازه ذرات امولسیون، باکتری می‌تواند در فیلم‌ها، کلونی‌ها یا به عنوان سلول‌های پلانکتونیک رشد کند (۲۰).

نتایج این پژوهش بیانگر اثرات مثبت اسانس بومادران بر سویه‌های میکروبی بوده و با توجه به این نتایج می‌توان به ساخت نگهدارنده‌هایی مناسب جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌ها با استفاده از اسانس مذکور امیدوار بود.

References

1- Fisher K., Phillips K. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. Trends Food Sci Technol. 2008; 19 (3): 156-164.

2- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiol. 2009; 26: 142–150.

3- Applequist W., Moerman D. Yarrow (Achillea millefolium L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity and Biomedical Research. Econ Botan. 2011; 65 (2): 209–225.

4- Manios S., Lambert R., Skandamis P.A. Generic model for spoilage of acidic emulsified foods: Combining physicochemical data, diversity and levels of specific spoilage organisms. Int J Food Microbiol. 2014; 170: 1–11.

5- Tayfur M., Cakır S., Orkun T., Ercan A., Yabanc N. Microbial quality of retail mayonnaise-base salads. African. J Microbiol Res. 2013; 20: 2269-2273.

6- Xiong R., Xie G., Edmondson A.S. The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in home-made mayonnaise papered with citric acid. Letter appl microbial. 1999; 28: 36-40.

7- Radford S.A., Board R.G. Review: fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. Food Microbiol. 1993; 10: 269–278.

8- Leuschner R.G.K., Zamparini J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli 0157* and *Salmonella enterica serovar Enteritidis* in broth model systems and mayonnaise. Food Control. 2002; 13: 399–404.

9- Silva L., MeloFranco B.D.G. Application of oregano essential oil against *salmonella enteritidis* in mayonnaise salad. Int J Food Sci Nutr Eng. 2012; 2 (5): 70-75.

10- Sinaeyan S., Sani A.M. Antimicrobial activity of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and extract on *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae* in low fat mayonnaise. BTAIJ. 2014; 10 (24).

11- Hajmohammadi B., Ahmadi-Dastgerdi A. The Effect of Thyme *(Zataria multiflora* boiss*)* Essential Oil against Bacterial and Fungal strains in Vitro and in Mayonnaise. J Food Microbiol. 2020; In Press. [In Persian].

12- Adams R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA, 2007.

13- Bozin B., Mimica-Dukic N, Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I., Couladis M. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerls.l. and *A. pannonica* Scheele Essential oils. Molecules. 2008; 13: 2058-2068.

14- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A., Akpulat H.A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium subsp. millefolium Afan.* (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 2003; 87: 215–220.

15- Iran National Organization of Standardization. Mayonnaise & Salad dressings – Specifications and test methods. INSO 2454. 2nd Revision. 2014. [In Persian].

16- Ahmadi-Dastgerdi A, Ezzatpanah H, Asgary S, Dokhani S, Rahimi E, Gholami-Ahangaran M. Oxidative Stability Of Mayonnaise Supplemented With Essential Oil of *Achillea millefolium* Ssp *Millefolium* During Storage. Food Sci Technol. 2019; 13, 1: 34-41

17- Iran National Organization of Standardization. Microbiology of mayonnaise and salad sauce- Specifications and test methods. INSO 2965. 3rd. Revision. 2017. [In Persian].

18- Holley R.A., Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 2005; 22 (4): 273–292.

19- Ahmadi-Dastgerdi A., Ezzatpanah H., Asgary S., Dokhani S., Rahimi, E. Phytochemical, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil from flowers and leaves of *Achillea millefolium* subsp. millefolium. J Essent Oil Bear Pla. 2017; 20 (2): 395-409.

20- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. J Food Microbiol. 2004; 94: 223–253.

21- Gomez-Lucia E., Goyache J., Orden J., Domenech A., Javier Hernandez F., Ruiz-Santa-Quiteria J., Suarez G. Influence of temperature of incubation on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in home made mayonnaise. J Food Protect. 1990; 53(5): 386-390.

22- Raghubeer E., Ke J., Campbell M., Meyer R. Fate of Escherichia coli 0157:H7 and Other Coliforms in Commercial Mayonnaise and Refrigerated Salad Dressing. J Food Protect. 1994; 58(1): 13-18.

23- Zhao T., Doyle M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli O157:H7* in commercial mayonnaise. J Food Protect. 1994; 57: 780–783.

24- Smittle R.B. Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the United States: A Review. J Food Protect. 2000; 63(8):1144–1153.

25- Hathcox A., Beuchat L., Doyle M. Death of enterohemorrhagic *Escherichia coli O157:H7* in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. Appl Environ Microbiol. 1995; 4172–4177.

26- Perales I., Garcia S.M. The influence of pH and temperature on the behaviour of Salmonella enteritidis phage type 4 in home-made mayonnaise.

Lett Appl Microbiol. 1990; 10: 19-22.

27- Rhee M.S., Lee S.Y., Dougherty R.H., Kang, D.H. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. Appl Environ Microbiol. 2003; 2959–2963.

28- Lock J.L., Board R.G. The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in deliberately infected commercial mayonnaise. Food Microbiol. 1994; 11, 499–504.

29- Lock J.L., Board R.G. The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in home-made mayonnaise prepared from artificially inoculated eggs. Food Microbiol. 1995; 12, 181–186.

30- Hwang C., Marmer, B. Growth of *Listeria monocytogenes* in egg salad and pasta salad formulated with mayonnaise of various pH and stored at refrigerated and abuse temperatures. Food Microbiol. 2007; 24: 211–218.

31- Adeli Milani M., Mizani M., Ghavami M., Eshratabadi P. Comparative analysis of antimicrobial characteristics of mustard paste and powder in mayonnaise. Europ J Exper Biol. 2014; 4 (2): 412-418.

32- Erickson J., Stamer J., Hayes M., Mckenna D., Van Alstine L. An assessment of *Escherichia coli 0157:H7* contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings. J Food Protect. 1995; 58 (10):1059-1064.

33- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 2001; 18, 463-470.

34- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. Int J Food Microbiol. 2008; 124: 91–97.

The Evaluation of Antibacterial Effects of Essential Oil of Achillea *in vitro* and Food Model

Asiye Ahmadi-Dastgerdi[*1], Paniz Zinsaz[2], Neda Zohoorian[2]

1 - Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.Department of Bioinformatics, University of Zabol, Zabol.
2. Department of Food Science and Technology, Mamaghan Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Receive: June 10, 2019; Revise: September 16, 2019; Accept: September 27, 2019

Summary

The importance of food-borne disease and consumer demands for avoiding synthetic food preservatives shifted the research interest to natural food preservatives such as essential oils isolated from medicinal plants which have antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the efficiency of *Achillea millefolium* essential oil as natural food preservative against foodborn pathogens such as *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Salmonella enteritidis* which were inoculated into high fat mayonnaise (65%) and low fat mayonnaise (30%) and kept during storage at 4 ºC for 6 months. The results showed that essential oils of *Achillea millefolium* had influence against all of the tested microorganisms *in vitro*, while Gram-positive bacteria was more sensitive to essential oil than Gram-negative bacteria. All of the pathogens did not grow in mayonnaise, whereas in the control sample, all of the microorganisms grew. The maximum cell counts of bacteria in low fat mayonnaise were approximately lower than the high fat mayonnaise and resistance to inactivation of microorganisms appeared to be greater in high fat mayonnaise than in low fat mayonnaise. Also low fat and high fat mayonnaise in BS samples exhibited antimicrobial properties against tested species during storage. By way of conclusion, the essential oil of *Achillea millefolium* would lead to control food pathogen organisms as a natural food preservative and therefore, it can be used as natural preservative in food industry.

Keywords: *Achillea, Antimicrobial properties, Essential oil, Mayonnaise*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 2, No. 1, Spring & Summer 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