نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ۲، شماره ۲

ناشر: دانشگاه زابل

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

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

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

هیات دبیران:

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

محمد بکائیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

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

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

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

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

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

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

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

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

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

کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

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

پیشگفتار

به نام خدا

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

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

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه

تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

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

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

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

شیوه نگارش مقاله:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

نحوه رفرنس نویسی:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می‌باشد:

گزارش موردی (CaseReport) باید شامل بخش‌های زیر باشد:

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

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

***بحث**

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

مقاله مروری (Review)

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

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

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

مقاله کوتاه (ShortCommunication)

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

نامه به سردبیر (Letter to Editor)

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

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

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

تعهد نامه

سردبیر محترم مجله تازه ها در میکروب شناسی دامپزشکی

با سلام؛

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

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

امضاء و تاریخ

عنوان مقاله: ----------

مشخصات کلیه نویسندگان مقاله به ترتیب مندرج در مقاله

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

آدرس پستی و الکترونیک نویسنده مسئول:

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

فرم تعارض منافع

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

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

.....

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

.....

عنوان مقاله: ----------

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

امضاء و تاریخ

بازسازی شبکه ژنی مقاومت به پنی‌سیلین در *E.coli* با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده

یعثوب شیری[۱*]، محمدعلی کریمیان[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: ۱۰ آذر ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۸ دی ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۱ دی ۱۳۹۸

چکیده

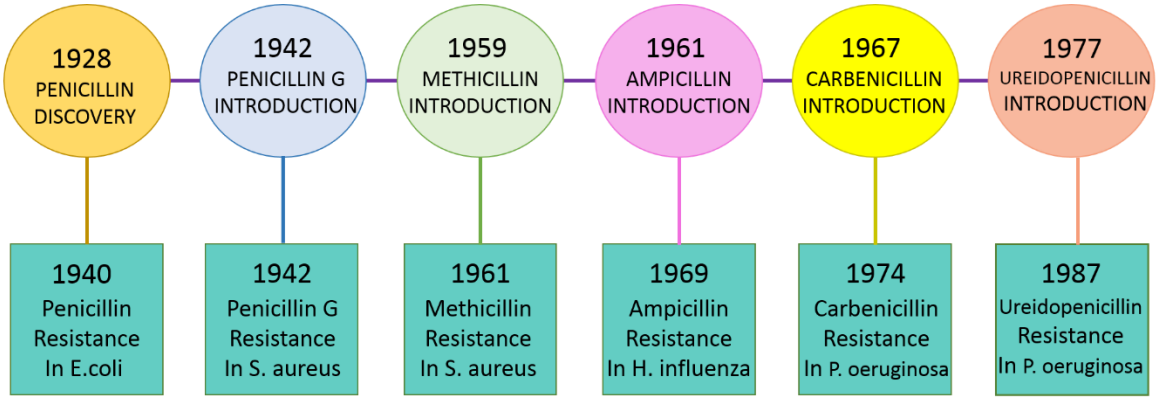
کشف پنی‌سیلین، انقلابی را در صنعت پزشکی ایجاد کرد و جان هزاران نفر را نجات داد. اما با گذشت زمان باکتری‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک یکی پس از دیگری شناسایی شدند. آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در ساختار مولکولی خود دارای یک حلقه‌ی بتا–لاکتام هستند. پنی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های دارای حلقه بتا-لاکتام با اتصال به آنزیم ترانس‌پپتیداز به صورت رقابتی فعالیت آن را مهار می‌کنند. مهار آنزیم ترانس‌پپتیداز از سنتز دیواره باکتریایی جلوگیری کرده و سبب مرگ باکتری می‌گردد. باکتری‌های مقاوم دارای آنزیم بتا-لاکتاماز هستند که توانایی شکستن پیوند C-N را در حلقه بتا-لاکتام دارند. در این مطالعه بازسازی شبکه ژن‌های شناخته شده بتا-لاکتاماز در باکتری *E.coli* صورت گرفت. نتایج نشان داد ژن *ampC* نقش محوری در القای مقاومت در *E.coli* دارد. بررسی عملکرد مولکولی سایر ژن‌های شبکه بتا-لاکتامازی نشان داد ویژگی بتا-لاکتامازی برای آنها، صرفاً یک قابلیت ثانویه بوده و وظیفه اصلی آنها مشارکت در سایر فرایندهای غیر مرتبط سلولی می‌باشد. بررسی ژن آنتولوژی نشان داد فرآیند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام همبستگی مثبت با زنجیره انتقال الکترون دارد. همچنین بررسی جایگاه سلولی ژن‌ها نشان داد غشای سلولی فعال‌ترین اندامک سلولی در زمان مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام در باکتری *E.coli* می‌باشد و مقاومت به آنتی‌بیوتیک وابسته به عملکرد بتالاکتامازی پروتئین‌های فعال در غشای سلولی است.

واژگان کلیدی: *آنتی‌بیوتیک، بتا-لاکتام، شبکه ژنی، باکتری*

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

مقدمه

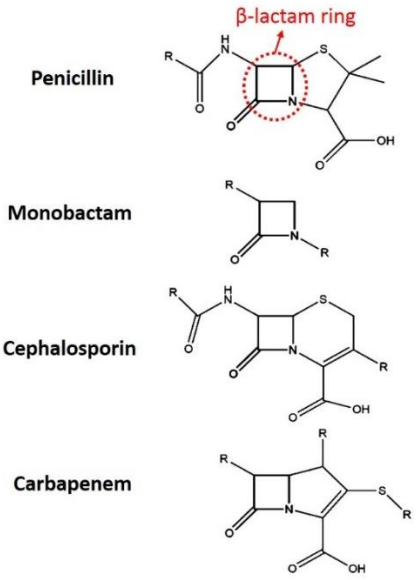
آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Penicillin) اولین بار در سال ۱۹۲۸ توسط دانشمند انگلیسی الکساندر فلمینگ* معرفی شد. بعدها در سال ۱۹۴۲ هاوارد والتر فلوری[1] و ارنست بوریس چاین[2] مکانیسیمی برای تولید انبوه این ماده ارزشمند را طراحی کردند (۱). کشف پنی‌سیلین انقلابی را در صنعت پزشکی ایجاد کرد و جان هزاران نفر را نجات داد. اما با گذشت زمان باکتری‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک یکی پس از دیگری شناسایی شدند که اولین مورد آن در سال ۱۹۴۰ به وسیله‌ی سویه *E. coli* گزارش شد (۲). در سال ۱۹۴۲ چهار سویه *Staphylococcus aureus* مقاوم شناسایی شدند و تا اواخر دهه ۶۰ میلادی بیش از ۸۰ سویه *S. aureus* مقاوم به پنی‌سیلین گزارش شده بود (۳). بعدها مقاومت به پنی‌سیلین در طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها شناسایی شدند. همزمان با گزارش‌های مقاومت به پنی‌سیلین دانشمندان نسل‌های جدیدی از پنی‌سیلین را معرفی کردند اما گزارش‌های مقاومت به آنها نیز یکی پس از دیگری ارائه شدند (شکل ۱).



شکل ۱- تاریخچه شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام (پنی‌سیلین) و گزارش‌های مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها

آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در ساختار مولکولی خود دارای یک حلقه‌ی بتا-لاکتام[3] هستند (شکل ۲)، به همین دلیل آنها را آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام نیز می‌نامند (۴). باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ساختار پپتیدو گلیکان هستند که از تکرار زیرواحدهای دی‌ساکارید با پیوند متقاطع آمینواسیدها به دست آمده است (۵). آنزیم ترانس‌پپتیداز نقش کلیدی در فرایند تشکیل این ساختار در دیواره باکتریایی ایفا می‌کند. پنی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های دارای حلقه بتا-لاکتام با اتصال به آنزیم ترانس‌پپتیداز به صورت رقابتی فعالیت آن را مهار می‌کنند. مهار آنزیم ترانس‌پپتیداز از سنتز دیواره باکتریایی جلوگیری کرده و سبب مرگ باکتری می‌گردد (۳).

1. Alexander Fleming
2. Howard Walter Florey
3. Ernst Boris Chain
4. β-lactam



شکل ۲- حلقه بتا-لاکتام در آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام (پنی‌سیلین)

فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام به سه طریق متفاوت صورت می‌گیرد. اولین مکانیسم مقاومت مربوط به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که با تغییر در ساختار پورین‌ها (منافذ موجود در دیواره باکتریایی) مانع ورود آنتی‌بیوتیک به داخل باکتری می‌شوند. دومین مکانیسم مقاومت در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مشترک می‌باشد. این باکتری‌های مقاوم دارای آنزیم بتا-لاکتاماز هستند که توانایی شکستن پیوند C-N را در حلقه بتا-لاکتام دارد. باکتری‌های گرم مثبت نظیر *S. aureus* با ترشح آنزیم بتا-لاکتاماز (پنی‌سیلیناز) از اتصال آنتی‌بیوتیک به دیواره خارجی پپتیدو گلیکان جلوگیری می‌کنند. اما در باکتری‌های گرم منفی آنزیم بتا-لاکتاماز ترشح نشده و متصل به غشای سیتوپلاسمی می‌باشد. بنابراین فرایند تجزیه آنتی‌بیوتیک به صورت موضعی در فضای پری‌پلاسمیک صورت می‌گیرد. نهایتاً در مکانیسم سوم مقاومت به آنتی بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام، باکتری‌ها ساختار مولکولی آنزیم ترانس‌پپتیداز را تغییر می‌دهند به نحوی که دیگر آنتی‌بیوتیک قادر به اتصال به آن نباشد (۶، ۷).

همان‌طور که گفته شد، مکانیسم دوم مقاومت به پنی‌سیلین و سایر آنتی بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام در طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مشاهده می‌شود. شناسایی و مطالعه ژن‌های درگیر در فرایند آنزیم بتا-لاکتاماز می‌تواند در شکستن این مکانیسم دفاعی باکتریایی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام مؤثر باشد. به همین دلیل در این مطالعه با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده و با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی شبکه ژنی درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ترسیم می‌گردد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ابتدا ژن‌های شناخته شده بتا-لاکتاماز در باکتری *E. coli* از مقالات و پایگاه داده پروتئین Uniprot جمع‌آوری شدند (۸). سپس این ژن‌ها وارد پایگاه داده STRING-db شدند (۹) و با استفاده از پارامترهای Text mining، Neighborhood، Co-Expression، Databases، Experiments، Co-occurrence و نهایتاً Gene fusion سایر ژن‌های درگیر در فرایند سنتز بتا-لاکتاماز مشخص شدند. میزان همبستگی این ژن‌ها با یکدیگر بر اساس پارامترهای اشاره شده تعیین گردید. نتایج به‌دست آمده از آنالیز STRING-db با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape جهت بازسازی شبکه ژنی بتا-لاکتاماز مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). توپولوژی شبکه بر اساس مؤلفه‌های Betweenness Centrality و Closeness Centrality با استفاده از نرم‌افزار NetworkAnalyzer مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۱). 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 node ها. به عبارت ساده‌تر میزان بالای Betweenness Centrality و Closeness Centrality برای یک node نشان‌دهنده اهمیت بالای آن node در شبکه می‌باشد (۱۲، ۱۳). آنالیزهای آنتولوژی ژن‌های موجود در شبکه با استفاده از نرم‌افزار تحت وب DAVID انجام شد (۱۴). سپس برای تک تک ژن‌ها P- Benjamine value محاسبه شدند (۱۵).

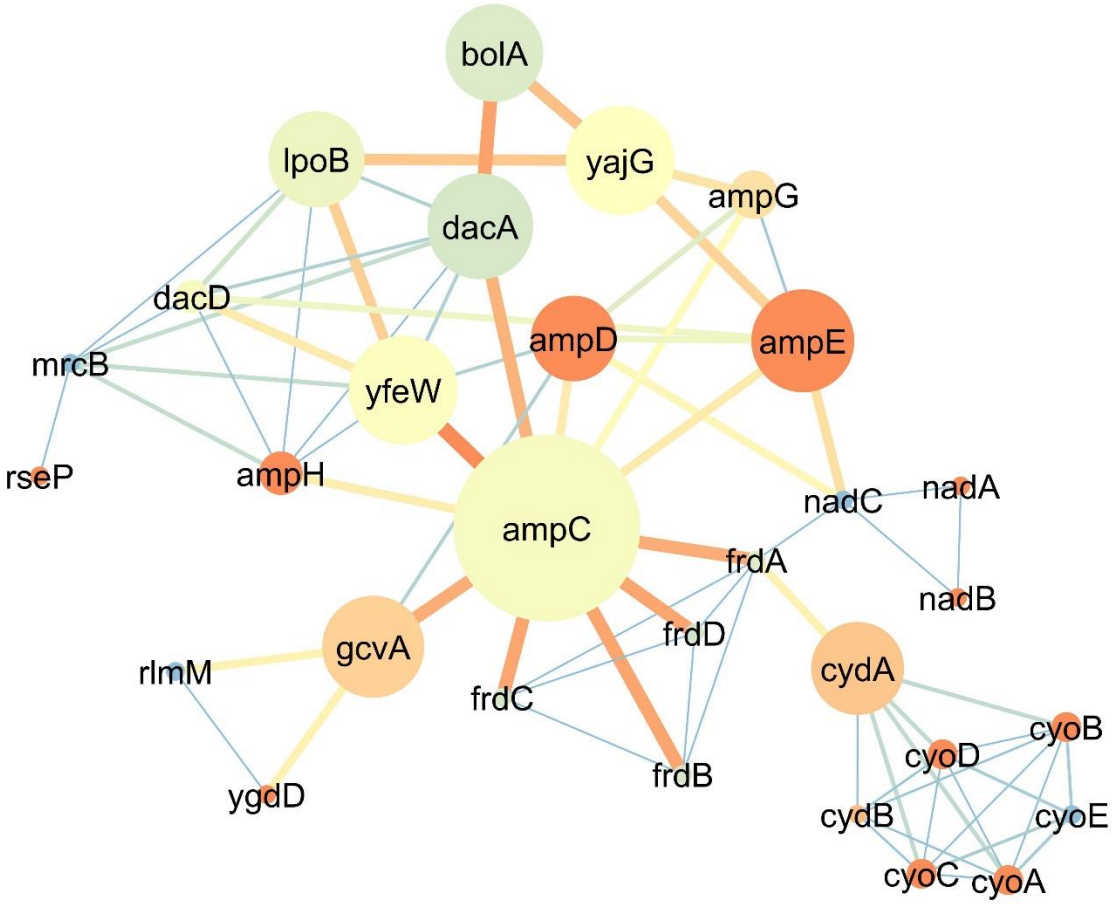
نتایج و بحث

دو دسته آنزیم بتا-لاکتاماز وجود دارند که دسته اول کلاس A,C و D هستند که از سرین برای هیدرولیز بتا-لاکتام استفاده می‌کنند و دسته دوم کلاس B هستند که از یون‌های دیوالانت روی برای هیدرولیز سوبسترا بهره می‌گیرند (۱۶). دانشمندان بیش از ۱۹۰ پروتئین را شناسایی کرده‌اند که می‌توانند با مولکول‌های حاوی حلقه بتا-لاکتام واکنش داده و آنها را تجزیه و یا از فعالیت آنها ممانعت کنند (۱۷).

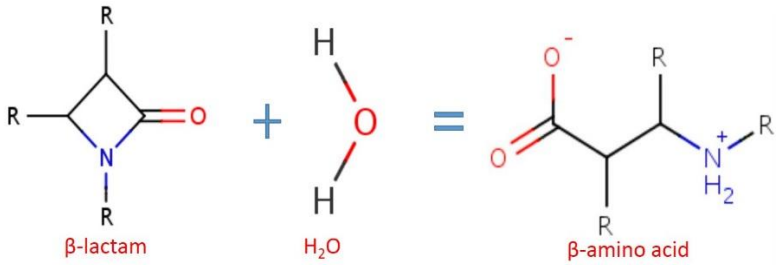
با بررسی مقالات و اطلاعات موجود در پایگاه داده Uniprot تعداد ۲۳ ژن با کارکرد بتا-لاکتاماز در باکتری *E.coli* مشخص شد. با استفاده از پایگاه داده STRING-db همبستگی این ژن‌ها محاسبه شد. نهایتاً شبکه ژنی مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape بازسازی شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود تعداد ۳۰ ژن اصلی در فرایند سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز نقش کلیدی دارند. آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد ژن *ampC* با (۱۱) ارتباط، بالاترین تعداد ارتباط با سایر ژن‌های موجود در شبکه را داشت و ژن‌های *yfeW* و *dacA* هر کدام با (۷) ارتباط در ردیف بعدی بودند. همچنین ژن‌های *cyoB*، *cyoD*، *cyoA*، *frdA*، *cyoC*، *cydA*، *lpoB*، *mrcB*، *ampE*، *ampD*، *dacD* و *ampH* هرکدام با (۶) ارتباط نقش کلیدی خود را در شبکه سنتز بتا-لاکتاماز نشان دادند. ژن *cyoB* در کنار ژن‌های *ampH*، *ampD*، *ampE*، *cyoC*، *cyoA*، *cyoD*، *nadA*، *nadB*، *ygdD* و *rseP* دارای بالاترین میزان Closeness Centrality برابر با (۱) بودند. در مقابل ژن *ampC* برابر با (۰/۰۷۲۶) بالاترین میزان Betweenness Centrality را دارا بود. ژن‌های *yfeW* (۰/۰۱۷۴)، *yajG* (۰/۰۱۷۲)، *dacA* (۰/۰۱۴۹) و *ampE* (۰/۰۱۲۹) به ترتیب در ردیف بعدی بالاترین میزان Betweenness Centrality قرار داشتند.

محصول ژن ampC یک آنزیم بتا-لاکتاماز سرین می‌باشد که سوبسترای اختصاصی آن آنتی‌بیوتیک cephalosporin می‌باشد (۱۸). این آنزیم واکنش شکل (۴) را کاتالیز کرده و در حضور مولکول آب حلقه بتا-لاکتام را شکسته و یک مولکول بتا-آمینو اسید تولید می‌کند (۱۹). شبکه ترسیم شده نشان می‌دهد ژن *ampC* یکی از اصلی‌ترین ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد. چرا که حذف ژن *ampC* از شبکه ترسیم شده ارتباط بخش بزرگی از ژن‌های موجود در شبکه را با یکدیگر قطع می‌کند. ژن *ampD* یک پروتئین سیتوپلاسمی ۲۰/۵ کیلودالتون را کد می‌کند در حالی که محصول ژن *ampE* یک پروتئین ۳۲/۱ کیلودالتونی غشایی با یک سایت اتصال ATP می‌باشد. از آنجا که نه *ampD* و نه *ampE* برای القاء بتا-لاکتام مورد نیاز نیستند و از آنجا که این پروتئین‌ها نمی‌توانند به صورت کووالانسی توسط بنزیل پنی‌سیلین نشان‌دار شوند، تصور نمی‌شود که آنها مستقیماً حضور بتا-لاکتام را در محیط سلولی گزارش دهند. بلکه به نظر می‌رسد که *ampD* و *ampE* اثر حضور بتا-لاکتام را در بیوسنتز پپتیدوگلیکان حس می‌کنند و این سیگنال را به *ampR* منتقل می‌کنند (۲۰، ۲۱). از همین خانواده ژن *ampH* نیز نقش بتا-لاکتامزی دارد، اما در مقایسه با سایر ژن‌ها نظیر *ampC* بسیار محدود بوده و نقش اصلی آن بازسازی زنجیره پپتیدوگلیکان در

دیواره باکتریایی می‌باشد (۲۲).



شکل ۳- شبکه ژن‌های درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز در باکتری *E. coli* 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 مقادیرکم متغیر است



شکل ۴- واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم بتا-لاکتاماز *ampC*. آنزیم *ampC* حلقه بتا-لاکتام موجود در آنتی بیوتیک را در حضور مولکول آب شکسته و یک مولکول بتا-آمینو اسید تولید می‌کند.

ژن *cydA* نقش کلیدی در شبکه بازسازی شده در شکل (۳) را دارا می‌باشد. این ژن ارتباط شش ژن دیگر هم‌خانواده با آن را با سایر ژن‌های شبکه قطع می‌کند. ژن‌های این زیرشبکه بخشی از خانواده سیتوکروم باکتری *E.coli* هستند که در زنجیره انتقال الکترون نقش دارند. *cydA* یک اکسیداز

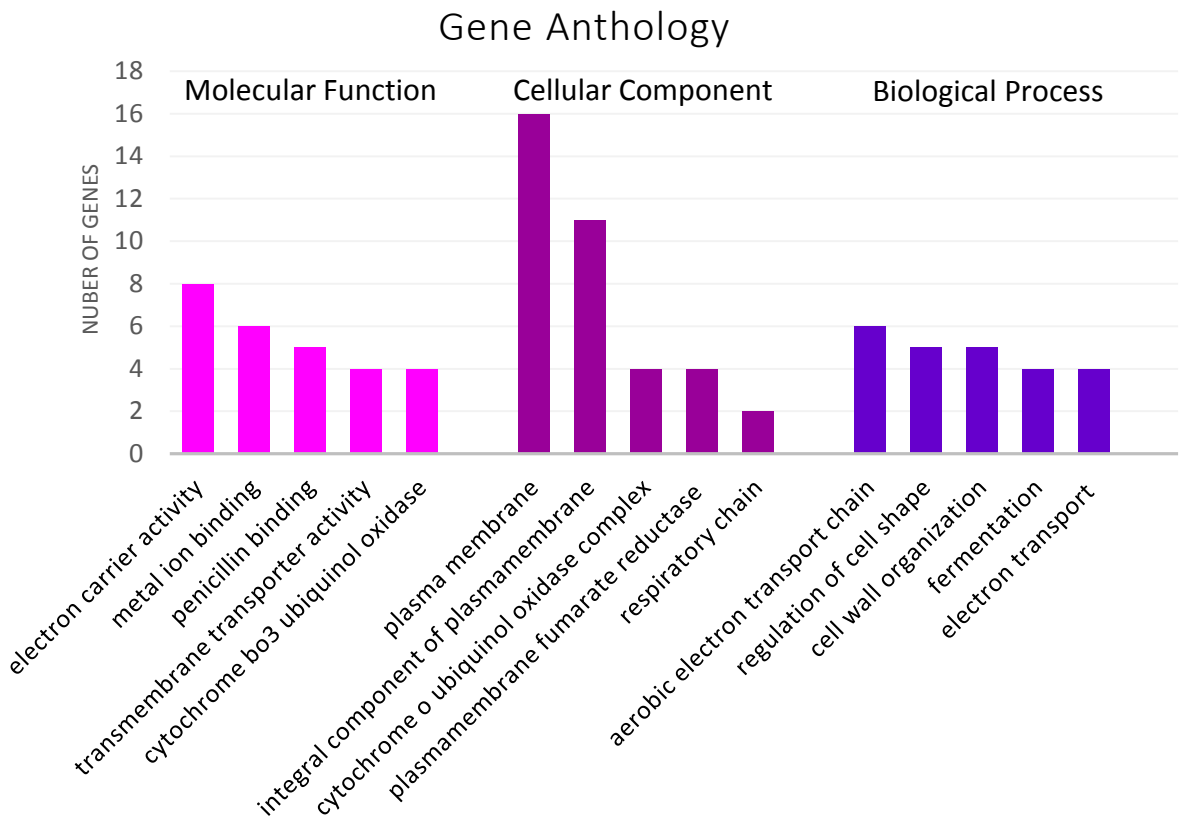
ترمینال است که با انتقال ناقل پروتون‌ها به غشای داخلی، نیروی حرکتی پروتون ایجاد می‌کند. این جزء زنجیره تنفسی هوازی *E.coli* است که در هنگام رشد سلول‌ها در هوادهی پایین غالب می‌شود (۲۳).

ژن *yfeW* یکی دیگر از ژن‌های مهم در شبکه بازسازی شده می‌باشد که توانایی اتصال به مولکول آنتی‌بیوتیک و تجزیه آن را دارد (۲۴). بی تردید این ژن نیز در کنار ژن *ampC* مستقیما با تجزیه ساختار آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام نقش کلیدی در مقاومت باکتری *E.coli* به این آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. بررسی عملکرد سایر ژن‌های موجود در شبکه سنتز بتا-لاکتاماز در باکتری *E.coli* نشان می‌دهد قابلیت بتا-لاکتامازی این ژن‌ها عملکرد جانبی این ژن‌ها بوده و طیف گسترده‌ای از عملکردهای مولکولی را کاتالیز می‌کنند که از مشارکت در زنجیره انتقال الکترون گرفته تا سنتز دیواره باکتریایی را در بر می‌گیرد.

شکل (۵) نمودار حاصل از آنالیز ژن آنتولوژی را نشان می‌دهد. با توجه به گستردگی تعداد عبارت‌های ژن آنتولوژی معنادار در سطح ۰/۰۵ درصد، تنها ۵ عبارت دارای بالاترین تعداد ژن در نمودار آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود از منظر عملکرد مولکولی، فعالیت حمل الکترون با p-value برابر با 6.5E-6 بالاترین تعداد ژن را در شبکه بازسازی شده دارا می‌باشد. همچنین اتصال به عناصر فلزی با p-value برابر با 9.1E-2 و اتصال به پنی‌سیلین با p-value برابر با 1.1E-6 در ردیف بعدی قرار دارند. از منظر جایگاه سلولی ژن‌های مورد مطالعه، ۱۶ ژن با p-value برابر با 4.4E-2 در غشای سلولی جای داشتند. همچنین با بررسی مسیر بیولوژیکی ژن‌های شبکه بتا-لاکتاماز مشاهده شد که زنجیره انتقال الکترون با p-value برابر با 2.6E-9 و تنظیم شکل و ابعاد سلول و ساخت دیواره سلولی به ترتیب با p-value برابر با 5.2E-4 و 2.3E-3 فعال‌ترین مسیرهای بیولوژیکی در زمان مواجه با آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام می‌باشند. نتایج ژن آنتولوژی به روشنی نشان می‌دهد فرایند مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام به شدت نیازمند انرژی به‌دست آمده از زنجیره انتقال الکترون می‌باشد. همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *E.coli* وابسته به عملکرد بتالاکتامازی پروتئین‌های فعال در غشای سلولی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

باکتری *E.coli* دارای مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین یا همان بتا-لاکتام می‌باشد. این فرایند از طریق سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز صورت می‌گیرد. شبکه بازسازی شده ژن‌های درگیر در فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک بتالاکتام نشان داد ژن *ampC* نقش محوری در القای مقاومت در *E.coli* دارد. همچنین بررسی جزئیات عملکردی تک تک ژن‌های شبکه نشان داد غیر از پنج ژن که وظیفه اصلی آنها تجزیه حلقه بتا-لاکتام آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، ویژگی بتا-لاکتامازی سایر ژن‌های شبکه، صرفا یک قابلیت ثانویه بوده و وظیفه اصلی آنها مشارکت در سایر فرایندهای غیر مرتبط سلولی می‌باشد. مطالعات ژن آنتولوژی نشان داد فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام همبستگی مثبت با زنجیره انتقال الکترون دارد. همچنین بررسی جایگاه سلولی ژن‌ها نشان داد غشای سلولی فعال‌ترین اندامک سلولی در زمان مواجهه با آنتی‌بیوتیک بتا-لاکتام در باکتری *E.coli* می‌باشد.



شکل ۵- نمودار بررسی ژن آنتولوژی ژن‌های استفاده شده در ترسیم شبکه ژنی بتا-لاکتاماز

سپاسگزاری

ضمن قدردانی از همکاران حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل اعلام می‌گردد این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است. شماره گرنت ۱۲۷-۹۶۱۸.

References

1- Gaynes R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. Emerg Infect Dis. 2017;23(5):849-53.

2- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. Reviews of infectious diseases. 1988;10:(۴)677-8.

3- Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? Yale J Biol Med. 2017;90(1):135-45.

4- Kong K-F, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS. 2010;118(1):1-36.

5- Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. Nat Rev Microbiol. 2011;10(2):123-36.

6- Patterson J, Tsilimigras MCB, Livesay DR, Jacobs DJ. Evolution of Stability/Flexibility Relationships in Beta-Lactamase. Biophysical Journal. 2019;116(3):472a.

7- Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: an ocular perspective. Clinical and Experimental Optometry. 2018;101(2):162-71.

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- 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.

10- 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.

11- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE,

Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. Bioinformatics. 2008;24(2):282-4.

12- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimie E, Emamjomeh A, Zahiri J. Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. Genomics. 2019.

13- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimie E, Emamjomeh A, Zahiri J. Unraveling the Transcriptional Complexity of Compactness in Sistan Grape Cluster. Plant Science. 2018.

14- 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.

15- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological). 1995;57(1):289-300.

16- Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010;54(3):969-76.

17- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995;39(6):1211-33.

18- Pierrard A, Ledent P, Docquier JD, Feller G, Gerday C, Frère JM. Inducible class C β-lactamases produced by psychrophilic bacteria. FEMS microbiology letters. 1998;161(2):311-5.

19- Horsfall LE, Garau G, Lienard BM, Dideberg O, Schofield CJ, Frere JM, et al. Competitive inhibitors of the CphA metallo-beta-lactamase from Aeromonas hydrophila. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):2136-42.

20- Lindquist S, Galleni M, Lindberg F, Normark S. Signalling proteins in enterobacterial AmpC beta-lactamase regulation. Mol Microbiol. 1989;3(8):1091-102.

21- Hesek D, Lee M, Zhang W, Noll BC, Mobashery S. Total synthesis of N-acetylglucosamine-1,6-anhydro-N-acetylmuramylpentapeptide and evaluation of its turnover by AmpD from Escherichia coli. Journal of the American Chemical Society. 2009;131(14):5187-93.

22- Gonzalez-Leiza SM, de Pedro MA, Ayala JA. AmpH, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of Escherichia coli. J Bacteriol. 2011;193(24):6887-94.

23- Borisov VB, Murali R, Verkhovskaya ML, Bloch DA, Han H, Gennis RB, et al. Aerobic respiratory chain of Escherichia coli is not allowed to work in fully uncoupled mode. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(42):17320-4.

24- Vega D, Ayala JA. The DD-carboxypeptidase activity encoded by pbp4B is not essential for the cell growth of Escherichia coli. Archives of microbiology. 2006;185(1):23-7.

Reconstitution of Gene Network on Penicillin Resistance in E.coli Using Databases Information

Yasoub Shiri[1*], Mohammad ali Karimiyan [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: December 1, 2019; Revise: January 8, 2020; Accept: January 11, 2020

Summary

The discovery of penicillin has revolutionized the medical industry and saved thousands of lives. But over time, the resistant bacteria to this antibiotic were identified one after another. Antibiotics of the penicillin family have a β-lactam ring in their molecular structure. By competitively binding to transpeptidase, penicillin and other β-lactam antibiotics inhibit its activity. Inhibition of transpeptidase activity prevents cell wall synthesis and causes bacterial death. Resistant bacteria, have β-lactamase enzyme which has the ability to break the C-N bond in the β-lactam ring. In this study, we reconstructed a network of known β-lactamase genes in *E.coli*. The results showed that *ampC* gene plays a central role in induction of resistance in *E.coli*. Molecular function analysis of other β-lactamase genes showed that β-lactamase activity is only a secondary function for them and their main function is to participate in other unrelated cellular processes. Gene ontology analysis showed that the process of resistance to β-lactam antibiotics was positively correlated with electron transport chain. Also, when exposed to β-lactam antibiotics, the cell membrane is the most active cellular component in *E.coli* and antibiotic resistance is dependent on the β-lactamase function of cell membrane proteins.

Key words: *Antibiotics, Beta-Lactam, Gene Network, Bacteria*

مطالعه باقیمانده داروی فلورفنیکل در گوشت مرغ عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مازیار محمدی[۱]، عزت اله فتحی هفشجانی*[۲]، مجید غلامی آهنگران[۳]

۱- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- استادیار بخش بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳- دانشیار بخش بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۰۲ بهمن ۱۳۹۸ ، ۲۰ اسفند ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۵ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

در بهار ۱۳۹۵ تعداد ۲۵ نمونه گوشت مرغ از کشتارگاه‌های شهرکرد جمع‌آوری شد و برای بررسی باقیمانده فلورفنیکل در گوشت با روش HPLC مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و مخلوط شدن با اسید کلریدریک و انتقال به کارتریج، استحصال شد و پس از خالص‌سازی در حجم ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق گردید. نتایج نشان داد که از مجموع ۲۵ نمونه ۵ نمونه دارای باقیمانده فلورفنیکل بود که یک نمونه از نظر مقداری بالاتر از حد مجاز وجود بقایای فلورفنیکل در گوشت مرغ بود. حداقل غلظت فلورفنیکل در نمونه‌های مورد بررسی ۱۵/۶ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر غلظت ۱۱۹/۰۷ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد. به‌طور کلی، با توجه به مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش طیور، بهتر است کنترل بیشتری در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها جهت کاهش باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در گوشت طیور انجام شود.

واژگان کلیدی: *گوشت مرغ، باقیمانده دارویی، HPLC، فلورفنیکل*

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

مقدمه

عوامل بیماری‌زای باکتریایی از مهم‌ترین آلودگی‌های عفونی در مراکز پرورش طیور هستند. این بیماری‌ها از دو جنبه واجد اهمیت هستند. از یک طرف با ایجاد عوارض و بیماری در طیور باعث تلفات و کاهش راندمان تولید می‌شوند و می‌توانند هزینه‌های تولید را افزایش دهند و از طرفی با انتقال ژن‌های مقاومت و بقایای دارویی در گوشت و تخم‌مرغ سلامت مصرف‌کنندگان را در معرض خطر قرار دهند (۱). عموماً بیماری‌های باکتریایی با استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در مقاطعی از دوره پرورش کنترل شوند اما گاهی اوقات در سویه‌های حاد و یا مقاوم برای کنترل مناسب بیماری لازم می‌شود چند دوره از آنتی‌بیوتیک‌های متنوع، مصرف شود (۲).

آنتی‌بیوتیک‌ها مهم‌ترین گروه مواد ضد میکروبی هستندکه به‌طور وسیع برای انسان و حیوان تجویز می‌گردند. سالانه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ هزار تن آنتی‌بیوتیک درسطح جهان تولید می‌شود (۳) که براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت نیمی از آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده جهان در پزشکی و نیم دیگر در امور دامپزشکی،کشاورزی و پرورش آبزیان مصرف می‌شوند. متأسفانه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی منجر به برجا گذاشتن باقیمانده‌هایی درگوشت، شیر و تخم‌مرغ می‌گردد (۴).

متأسفانه انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها بدون در نظر گرفتن عوارض جانبی و دوره دفع داروئی، علاوه بردامپزشکان، توسط تکنسین‌های دامپزشکی و حتی افراد غیرکارشناس شاغل دراین حرفه مورد استفاده قرار می‌گیرد که این امر باعث وجود باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک و دیگر مواد شیمیائی حاصل از متابولیسم آنها در فرآورده‌های دامی می‌گردد (۵).

عدم مراعات دستورات نوشته شده بر روی داروها اخطارها و بالاتر از همه عدم رعایت زمان بین آخرین مصرف دارو تا زمان ارائه دام به کشتارگاه از عوامل اصلی وجود مقادیر غیر مجاز مواد دارویی در حیوانات مولد غذا هستند (۶).

دسته دارویی فنیکل‌ها آنتی‌بیوتیک‌های جدید و بسیار قوی هستند که درمقابل بسیاری ازباکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی کارآمد و مؤثرند می‌باشند. فلورفنیکل یکی ازمهم‌ترین داروهای این گروه است که امروزه در صنعت طیور بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴).

روش‌های مختلفی جهت تعیین باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی وجود دارد. از جمله‌ی این روش‌های جداسازی که دارای ضریب اطمینان بالایی هستند روش کروماتوگرافی است (۳). با توجه به گستردگی طیف اثر فلورفنیکل بر روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی این دارو بیشتر از سایرین در مراکز پرورش مرغ در آخر دوره استفاده می‌شود. لذا در مطالعه حاضر به بررسی باقیماندگی این داروی پرمصرف در گوشت مرغ‌های عرضه شده در شهرکرد پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: نمونه‌ها از کشتارگاه‌های شهرکرد جمع‌آوری شد. زمان جمع‌آوری نمونه‌ها در فصل بهار و نمونه‌ها از عضله سینه مرغ تهیه گردید. نمونه‌ها به صوت تصادفی از هر واحد ۱۰ هزار قطعه‌ای یک نمونه (۱ و ۲) انتخاب گردید. جمعاً ۲۵ نمونه جمع‌آوری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها: ۴۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه گوشت مرغ با اسید کلریدریک ۰/۱۵ مولار مخلوط شد و پس از نگهداری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با دور ۴۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی صاف و برای انتقال به کارتریج آماده شد.

آزمون سنجش بقایای آنتی‌بیوتیک: ابتدا

کارتریج با ۵ سی‌سی مخلوط آب و متانول مخصوص Hplc آماده شد سپس مایع آماده شده مرحله قبل روی کارتریج ریخته شد و با آب مخصوص Hplc، سپس با بافر ۰/۲ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات (PH=۹ شرکت سیگما آلمان) و در نهایت دوباره با آب مخصوص Hplc شسته شد. پس از خشک کردن کارتریج، به هر کارتریج ۳/۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شد تا مواد از کارتریج خارج شود. مایع خارج شده از این مرحله در انکوباتور خشک شد و به آن ۲۵۰ میکرولیتر بافر دی سدیم هیدروژن فسفات اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و سپس در دور ۴۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شد. از مایع روئی به‌دست آمده ۲۰ میکرولیتر به دستگاه Hplc تزریق شد.

نمونه استاندارد فلورفنیکل (تهیه شده ازشرکت Sigma) را نیز به دستگاه تزریق کرده و با داشتن سطح زیر منحنی ماده مجهول، غلظت استاندارد و مساحت استاندارد و قرار دادن آنها در معادله، غلظت ماده مجهول را به دست می آوریم.

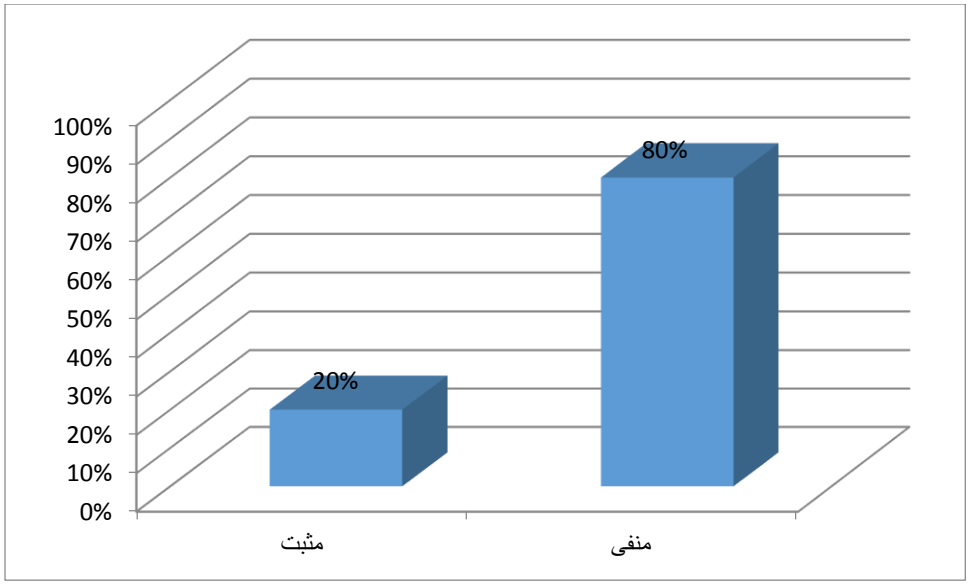
نتایج

آنالیز نمونه‌ها نشان داد ۲۰ درصد از نمونه‌ها (۵ نمونه از ۲۵ نمونه) واجد بقایای فلورفنیکل در عضله مرغ‌های نمونه‌گیری شده بود (جدول ۱). حداقل غلظت فلورفنیکل در نمونه‌های مورد بررسی ۱۵/۶۰ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر غلظت ۱۱۹/۰۷ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. میانگین نمونه‌های مثبت ۵۶/۶۴ و میانگین تمامی نمونه‌ها ۱۱/۳۲ می‌باشد. کروماتوگرام یک نمونه مثبت در تصویر ۲ ارائه شده است.

به احتساب MRL برابر ۳۰ میکروگرم در کیلوگرم (بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا) ۱۲ درصد کل نمونه‌ها دارای غلظت فلورفنیکل بالاتر از MRL بودند. (نمودار ۱).

جدول ۱- غلظت فلورفنیکل در نمونه‌های مثبت

شماره نمونه	AREA	RETENTION TIME	غلظت فلورفنیکل (PPM)
۴	۳۲۹۳۱۲۵	۶/۶۱	۱۵/۸۱
۹	۲۴۸۰۶۸۰۷	۶/۴۱	۱۱۹/۰۷
۱۷	۳۲۵۱۶۳۷	۶/۶۱	۱۵/۶۰
۱۹	۱۴۵۳۳۸۳۲	۶/۴۶	۶۹/۷۶
۲۰	۱۳۱۱۸۵۷۶	۶/۵۸	۶۲/۹۶



نمودار ۱- درصد نمونه‌های مثبت و منفی دارای بقایای فلورفنیکل

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج کلی مطالعه حاضر نشان داد که ۲۰ درصد نمونه‌های گوشت مرغ عرضه شده در شهرکرد واجد بقایای فلورفنیکل بود (۵ نمونه از ۲۵ نمونه) و از این تعداد ۲۰ درصد نمونه‌ها (یک نمونه از ۵ نمونه) واجد بقایای بالاتر از حد مجاز استاندارد بودند.

فلورفنیکل یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است که با توجه به شیوع بالای بیماری‌های میکروبی و از طرفی ممنوعیت مصرف داروی کلرامفنیکل (هم‌خانواده فلورفنیکل)، بیشتر مورد توجه واقع شده است. مصرف این دارو در سنین بالا گاهی همراه با عدم رعایت زمان پرهیز از مصرف است و این نگرانی را به‌وجود می‌آورد که به خوبی از بدن حذف نشده و باعث انتقال بقایای این دارو به مصرف‌کنندگان گوشت طیور شود. به همین دلیل در بررسی حاضر به تعیین میزان باقیمانده فلورفنیکل در گوشت مرغ پرداخته شده است. اگرچه مصرف این دارو عوارض ناشی از مصرف کلرامفنیکل مانند مسمومیت خونی را به همراه ندارد اما به‌دلیل خاصیت لیپوفیلیک می‌تواند در بافت چربی تجمع یابد و تجمع آن در بدن مصرف‌کننده می‌تواند منجر به بروز مقاومت دارویی شود (۷). بنابراین بررسی باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی یکی از معیارهای ارزیابی بهداشت گوشت طیور عرضه شده می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

درخصوص بررسی بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت مرغ مطالعات مختلفی صورت گرفته است که عمدتاً با تکنیک چهارپلیت و الیزا به ارزیابی پرداخته‌اند. تکنیک چهارپلیت و الیزا اگرچه می‌توانند بسیار با صرفه‌تر باشند اما از دقت کمتری برخوردار هستند. منفی کاذب مهم‌ترین پیامد استفاده از روش‌های چهارپلیت و الیزا است (۳، ۴). تعیین باقیمانده آنتی‌بیوتیک با روش کروماوگرافی روش دقیق و حساس است که می‌تواند مقادیر جزئی وجود آنتی‌بیوتیک را در گوشت و یا محصولات فرعی ردیابی کند.

در رابطه با بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت مرغ مطالعات مختلفی در ایران و سایر کشورها انجام شده است. در ایران تاجیک و همکاران در سال

۲۰۰۶ با مطالعه‌ای بر روی گوشت مرغ در استان مازندران با استفاده از روش کروماتوگرافی مشخص نمودند که بیش از ۵۰ درصد نمونه‌های گوشت دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای از آنتی‌بیوتیک است (۸). در مطالعه دیگری که در یکی از کشتارگاه‌های اطراف شیراز توسط خان ناظر و همکاران در سال ۱۳۸۷صورت گرفته گزارش کردند که حدود ۵۴ درصد گوشت مرغ‌های کشتار شده دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی است (۹). علاوه بر این در مطالعه دیگری واحدی و همکاران در سال ۱۳۹۰ بیان کردند ۴۴/۵ درصد گوشت مرغ شمال کشور دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیکی است (۱۰). در رابطه با بقایای فلورفنیکل در گوشت طیور تاکنون در ایران بررسی صورت نگرفته است. در خارج از کشور یک گزارش از پاکستان وجود دارد. نسیم و همکاران در سال ۲۰۱۴ بقایای فلورفنیکل را با روش کروماتوگرافی در ۱۵۰ نمونه گوشت و کبد مرغ عرضه شده در نواحی مختلف پاکستان بررسی کردند و بیان نمودند که ۸۴ درصد نمونه‌ها دارای باقیمانده فلورفنیکل است که در ۶۷ درصد نمونه‌ها، بقایای فلورفنیکل بالاتر از حد مجاز می باشد (۱۱). وجود آلودگی پایین و درصد پایین‌تر آلودگی بیش از حد مجاز در مطالعه اخیر نسبت به مطالعه مشابه در پاکستان بیانگر تفاوت در نوع و الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز سطح بهداشت و دانش تولیدکنندگان طیور است. اگرچه حجم نمونه مورد بررسی در مطالعه اخیر کمتر است و این مطالعه محدود به مرزهای جغرافیایی استان چهارمحال و بختیاری است اما به‌طور کلی، سطح مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های خوراکی تا حدودی تحت تأثیر سطح بهداشت یک جامعه است. با توجه به عدم وجود یک استاندارد مشخص برای بیان حد مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها در گوشت و فرآورده‌های خوراکی، در شرایط فعلی سطح استاندارد اروپا به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در هر گرم (۷) به عنوان الگو پیروی می‌شود. آنچه مسلم است رعایت زمان پرهیز از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در کاهش موارد بالاتر از سطح مجاز و ارتقای کیفیت بهداشتی گوشت مرغ مؤثر باشد. در مورد زمان پرهیز از مصرف فلورفنیکل در گوشت و محصولات فرعی مرغ مطالعات زیادی انجام شده است. شریف و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند باقیمانده فلورفنیکل در کبد به طور معنی‌دار بالاتر از سرم و گوشت است و برای دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به مدت ۵ روز تا ۵ روز و برای دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به مدت ۵ روز برای ۷ روز میزان باقیمانده فلورفنیکل در عضلات بالاتر از حد مجاز استاندارد خواهد بود (۱۲). به هر حال تا پس از مدت زمان اعلام شده نیز فلورفنیکل در عضلات قابل ردیابی است اما میزان آن پایین تر از حد مجاز است و به مرور زمان به صفر می‌رسد به‌طوری که Elsenhwy و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که باقیمانده فلورفنیکل تا ۸ روز در عضلات قابل ردیابی است و بعد از آن به صفر می‌رسد اما در بافت‌هایی نظیر کبد و کلیه بقایای فلورفنیکل پس از ۸ روز نیز وجود دارد (۱۳). همچنین در بررسی دیگری بیان شده که غلظت فلورفنیکل در سرم، عضلات و کبد در ۳ روز پس از شروع درمان به حداکثر می‌رسد (۱۱) لذا باید به این نکته توجه داشت که به محض شروع درمان صرف نظر از اینکه دوره درمان به پایان رسیده یا خیر، دوره پرهیز از مصرف به شکل کامل رعایت شود.

لذا به‌طور کلی لازم است مراقبت‌های مستمر جهت کنترل بقایای آنتی‌بیوتیک در گوشت به منظور افزایش کیفیت بهداشتی گوشت و جلوگیری از مشکلات عدیده‌ای که ممکن است به دنبال بقایای آنتی‌بیوتیکی رخ دهد صورت بگیرد.

References

1- Dadgarnia M, Gholami-Ahangaran M, Shakerian A. The determination of enrofloxacin residue in quail meat, in Yazd by HPLC. *Iran Food Hyg.* 2018; 8: 83-90 [In Persian].

2- Teimuri S, Gholami-Ahangaran M, Shakerian A. The comparison of enrofloxacin residue in chicken and turkey meat, by high performance liquid chromatography in Isfahan province. *Iran Food Hyg*. 2018; 8: 95-100 [In Persian].

3- Salehzadeh F, Salehzdeh A, Rokni N, Madani R, Golchinefar F. Enrofloxacin residue in Chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pak J Nut*. 2007; 6(4): 409-13.

4- Aarostrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxical*. 2005; 96: 271-281.

5- Franco D, Wabb J, Taylor CE. Antibiotic and Sulphonamide residues in meat: implication for human health. *J Food Protect*. 1995; 53(2): 175-178.

6- Rokni N, Kamkar A, Salehzadeh F, Madani R. Study on the Enrofloxacin Residues in Chicken Tissues by HPLC. *Iran J Food Sci Technol.* 2007; 4(13): 11-17 [In Persian].

7- Marwa A, Elsenhwy Bakry HH, El-Ahawarby RM, Abou Salem ME, Elham A, El-shewy A. Residual studies of florfenicol in broiler chicken. *Benha Vet Med J*. 2013; 24(1): 209-217.

8- Tajick MA, Shohreh B. Detection of Antibiotics Residue in Chicken Meat Using TLC. *Int J Poult Sci*. 2006; 5(7): 611-612.

9- Khan Nazer AH, Hosseinzadeh S, Parvandeh H. Determination of antibiotic residues in poultry carcasses using quadriplegic testing in slaughterhouses around Shiraz. *Iran J Vet Res*. 2008; 54 (3): 79-83 [In Persian].

10- Vahedi N, Motamedi A, Golchin M. Determination of antibiotic residues in the carcass of industrial poultry by FPT method in Mazandaran province. *Iran J Food Sci Technol.* 2011; 8(1): 65-72 [In Persian].

11- Nasim A, Aslam B, Javed l, Ali A, Muhammad F, Razaa A, Zia-ud-Din S. Determination of florfenicol residues in broiler meat and liver samples using RP-HPLC with UV–visible detection. *J Sci Food Agric*. 2016; 96: 1284–1288.

12- El-Shafei RA, Eladi AH. Determination of Florfenicol and Doxcycline Residues in Chickens by Microbiological Assay. *Int J Innov Appl Stud*. 2014; 7(3):1148-1155.

13- Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Diseases of poultry. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press; 2013, P: 182-202.

The study of florfenicol residue in chicken meat in Charmahal-va-Bakhtiyari province by high purified liquid chromatography

Mazyar Mohammadi[1], Ezatollah Fathi-Hafshejani[2*], Majid Gholami-Ahangaran[3]

1- Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2- Assistance Professor in Poultry Diseases Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3- Associate Professor in Poultry Diseases Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: January 22, 2020; Revise: March 12, 2020; Accept: March 15, 2020

Summary

In spring 2016, 25 poultry meat samples were collected from slaughterhouses in Shahrekord and tested by HPLC for fluorophenyl residues in meat. The samples were extracted after preparation and mixed with hydrochloric acid and transferred to the cartridge. After purification in 20 µl volume, the samples were injected into HPLC. The results showed that out of 25 samples, 5 samples (20%) had florfenicol residues, one of which had a higher concentration of florfenicol residues in poultry meat. The minimum concentration of florfenicol in the studied samples was 15.6 µg / kg and the maximum concentration was 119.07 µg /Kg. In general, given the widespread use of antibiotics in poultry farming, it is better to have more control over the use of antibiotics, to reduce the antibiotic residues in poultry meat.

Keywords: *Chicken, Drug residue, Florfenicol, HPLC*

بررسی تأثیر عصاره آبی برگ گیاه گزنه (*Urtica dioica*) بر فراسنجه‌های خون‌شناسی در موش صحرایی

مهدی راسخ*[۱]، کیاندخت میری[۲]

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۵ بهمن ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۲ اسفند ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۱۸ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

امروزه استفاده از گیاهان دارویی به دلیل خواص درمانی، عوارض کم، در دسترس بودن و سهولت استفاده جایگاه ویژه‌ای در طب پیدا کرده است. گزنه گیاهی است دارویی که در اغلب مناطق ایران یافت شده و در طب سنتی خواص منحصر به فردی نظیر درمان کم‌خونی دارد. در این مطالعه تأثیر عصاره آبی برگ گیاه گزنه بر پارامترهای خون‌شناسی در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ۱۶ سر موش صحرایی وارد مطالعه شده و در دو گروه ۸ تایی تیمار و کنترل قرار گرفتند. هر موش صحرایی در گروه تیمار، ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی برگ گیاه گزنه را به‌صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز دریافت کرده و در روزهای صفر و ۲۸ خون‌گیری به عمل آمده و پارامترهای خون‌شناسی مربوطه اندازه‌گیری شده و در نهایت با پارامترهای خونی موش‌های گروه کنترل که گزنه دریافت نمی‌کردند، مقایسه شده و در نهایت داده‌های به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. حجم متوسط سلولی(MCV) در گروه تیمار افزایش معناداری داشت (P=۰/۰۴۴) که در کنار پارامترهایی نظیر میزان هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت نشان‌دهنده افزایش خون‌سازی در این گروه از موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز خوراکی عصاره آبی برگ گیاه گزنه می‌تواند اثرات خون‌سازی در موش صحرایی داشته باشد.

واژگان کلیدی: *خون‌سازی، گیاه دارویی، هماتولوژی*

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

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مزمن مختلف، طرفداران بسیاری دارد (۱) و در سال‌های اخیر شواهد زیادی درباره اثربخشی گیاهان دارویی در زمینه طب سنتی به دست آمده است (۲، ۳) بنابراین با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی، توجه بسیاری از محققان بر استفاده از گیاهان دارویی متمرکز شده است (۴).

یکی از گیاهانی که از زمان‌های بسیار دور به‌عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شده است، گزنه است. این گیاه دارای حدوداً ۳۰ الی ۴۵ گونه‌ی متعدد است (۵) ولی سه گونه‌ی آن‌که به لحاظ دارویی حائز اهمیت است، در ایران نیز یافت می‌شود و شامل گزنه درشت (*U. dioica L.*)، گزنه‌ی کوچک (*U. urens L.*) و گزنه یونانی (*U. pilulifera L.*) می‌شود. دو گونه اول از قدیم در ایران در طب سنتی استفاده می‌شده‌اند (۶).

گزنه (گزنه کبیر، گزنه دوپایه، گزنه درشت) با نام علمی *Urtica dioica*، گیاه علفی چند ساله از تیره Urticaceae بوده که در طب سنتی بنام انجره کبیر هم شناخته می‌شود (۶، ۷). این‌گونه که تقریباً در تمام مناطق معتدل دنیا رویش دارد، بومی اروپا، آسیا، شمال آفریقا و آمریکای شمالی است (۸). اراضی کشت نشده حاوی ازت، اطراف جاده‌ها و نزدیک ساختمان‌ها مکان‌های مساعدی برای رشد این گیاه هستند. همچنین در اطراف خرابه‌ها، باغ‌های اطراف شهر و مکان‌هایی که حیوانات به سر می‌برند، به‌صورت خودرو وجود دارد (۹). این گیاه به فراوانی در نواحی مرطوب ایران به خصوص مناطق شمالی و غربی و مرکزی کشور در استان‌هایی نظیر گلستان، مازندران، آذربایجان، لرستان، خوزستان، فارس، کهکیلویه و بویراحمد، کاشان، بوشهر و اصفهان دیده می‌شود (۸، ۱۰، ۱۱).

از این گیاه جهت انواع مختلفی از بیماری‌ها از جمله کم‌خونی، بیماری‌های دستگاه تناسلی، اختلالات کلیوی، دیابت، آلرژی و آلوپسی استفاده شده است (۱۲). همچنین گیاه گزنه در طب سنتی ایران به‌عنوان داروی ضد التهاب، دیورتیک، ضد درد، بی‌حس‌کننده موضعی، رفع التهاب پروستات، قاعده آور و رفع اخلاط خونی به کار می‌رود (۶). ترکیبات گزنه شامل فلاونوئید، ترکیبات هیدروفیلیک نظیر لکتین و پلی‌ساکاریدها، ترکیبات استروئیدی نظیر استیگومسترول و همچنین موادی نظیر هیستامین، اسید فرمیک، استیل کولین، اسیداستیک، اسید بوتیریک، لکوترین، ۵ هیدروکسی تریپتامین است (۱۳، ۱۴). همچنین شامل بسیاری از ترکیبات از جمله مواد معدنی (آهن، منگنز، کلسیم و پتاسیم)، ویتامین C، ویتامین K، ویتامین‌های گروه B (B2 و B1)، اسید فرمیک، پروتئین‌ها، کلروفیل و اسیدهای آمینه است (۱۵، ۱۶).

آنمی یا کم‌خونی به شرایطی گفته می‌شود که در آن تعداد گلبول‌های قرمز خون کمتر از حد معمول است یا هموگلوبین گلبول‌های قرمز به میزان کافی نیست (۱۷). علائم بالینی کم‌خونی معمولاً شامل غشاهای مخاطی کم‌رنگ، تنگی نفس، خستگی و سرگیجه است (۱۸). کمبود آهن، شایع‌ترین کمبود غذایی در جهان، شایع‌ترین علت کم‌خونی است. با توجه به اینکه مهم‌ترین علت کم‌خونی، کمبود آهن است و همچنین گزنه حاوی مقادیر زیادی آهن است، بنابراین می‌تواند در بهبود کم‌خونی مؤثر باشد. از آنجاکه مطالعات درزمینه اثر عصاره گزنه بر کم‌خونی انجام نشده است، در این مقاله تأثیر عصاره آبی گزنه بر گلبول‌های قرمز و سایر پارامترهای خونی موش‌های صحرایی بالغ بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه: گیاه تازه گزنه (*Urtica dioica*) در تابستان ۱۳۹۵ از مزارع شمالی کشور ایران جمع‌آوری گردید. گیاه تهیه شده توسط هرباریوم دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی و با کد علمی ۳۲۱۰۸ مورد تأیید قرار گرفت. پس از تأیید، برگ‌های گیاه با احتیاط، به دقت و به طور کامل شسته شده و سپس در دمای اتاق در سایه و به دور از نور خورشید در طی دو هفته خشک گردید.

تهیه عصاره گیاه: در این مرحله برگ‌های خشک شده گیاه، توسط آسیاب به حالت پودر درآمد. ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ گرم پودر حاصله از برگ گیاه گزنه اضافه شد و در یک فلاسک مخروطی در بسته توسط دستگاه ورتکس به مدت ۲ ساعت به آرامی مخلوط گردید. مخلوط حاصله سپس خود به خود تا دمای اتاق سرد شده، پالایه شده و به ظرف شیشه‌ای درب‌دار منتقل شده و در دمای یخچال در تاریکی تا زمان شروع فاز عملی مطالعه نگهداری گردید (۱۹).

حیوانات مورداستفاده: در این مطالعه از ۱۶ سر رت ویستار نر بالغ با دامنه وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که در دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل نگهداری می‌شدند، استفاده گردید. دمای محل نگهداری ۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد با سیکل ۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی بود. رت‌ها در قفس‌های استیل ضد زنگ نگهداری می‌شدند و از پلت استاندارد و آب آشامیدنی به طور آزاد به عنوان تغذیه بهره می‌بردند. رت‌ها به دو گروه ۸ تایی تقسیم شدند. بدین ترتیب که گروه اول، گروه درمان بوده و عصاره آبی برگ گزنه را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن به صورت گاواژ روزانه به مدت ۴ هفته دریافت کرده و گروه دوم به عنوان گروه کنترل بوده و گزنه دریافت نمی‌کردند. نمونه‌های خون در دو نوبت، یکی قبل از شروع آزمایش و دیگری پس از پایان دوره (روز صفر و ۲۸) اخذ گردید. تمامی کارهای انجام‌شده روی رت‌ها بر اساس رعایت حقوق حیوانات طبق قوانین بین‌المللی صورت گرفت.

نمونه‌های خون جهت ارزیابی پارامترهای خون‌شناسی نظیر شمارش گلبول‌های قرمز (RBC)، شمارش گلبول‌های سفید (WBC)، میزان هموگلوبین خون (Hb)، درصد هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط سلولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین سلولی (MCHC)، غلظت هموگلوبین (Hb) و میزان پلاکت (PLT) با دستگاه سل کانتر Sysmex مدل KX21 ساخت کشور ژاپن پس از کالیبره نمودن با پارامترهای خونی استاندارد موش صحرایی انجام گرفت.

تجزیه وتحلیل آماری: داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون T Test جهت مقایسه میانگین پارامترها در روزهای صفر و ۲۸ استفاده گردید و سطح معنی‌داری $P<0.05$ جهت تفسیر داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

تاثیر عصاره آبی گیاه گزنه بر روی پارامترهای خون‌شناسی موش‌های صحرایی در جدول ۱ نشان داده شده است. در روز صفر آزمایش، میانگین پارامترهای گلبول‌های قرمز (RBC)، گلبول‌های سفید (WBC)، میزان هموگلوبین خون (Hb)، درصد هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط سلولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین سلولی (MCHC) و میزان پلاکت (PLT) بین گروه کنترل و گروه تیمار تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0.05$).

در روز ۲۸ آزمایش، میانگین پارامترهای گلبول‌های قرمز (RBC)، گلبول‌های سفید (WBC)، میزان هموگلوبین خون (Hb)، درصد هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین سلولی (MCHC) و میزان پلاکت (PLT) بین گروه کنترل و گروه تیمار تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0.05$) اما در همین روز میانگین پارامتر حجم متوسط سلولی (MCV) بین گروه کنترل و تیمار به طور معنی‌داری متفاوت بود ($P=0.044$).

جدول ۱: میانگین ± انحراف معیار (Mean±SD) پارامترهای خون‌شناسی در گروه شاهد و گروه تیمار

روز	نوع پارامتر	گروه شاهد	گروه تیمار گزنه (۲۰۰mg/kg)
روز صفر	گلبول‌های سفید ($\times10^3/\mu l$)	۲/۶±۲/۲۹	۷±۱/۷۴
	گلبول‌های قرمز ($\times10^6/\mu l$)	۶/۴±۰/۱۹	۶/۳±۰/۲۵
	هموگلوبین (g/dl)	۱۳/۳±۰/۵۴	۱۳/۱±۰/۲۹
	هماتوکریت (٪)	۳۵/۳±۴/۲۶	۳۶/۹±۱/۳۲
	حجم متوسط سلولی (fl)	۵۸±۱/۳۵	۵۸/۲±۲/۵
	هموگلوبین متوسط سلولی (pg)	۲۰/۸±۰/۷	۲۰/۸±۰/۷۷
	غلظت متوسط هموگلوبین سلولی (g/dl)	۳۵/۹±۰/۸۳	۳۵/۷±۰/۶۶
	پلاکت ($\times10^3/\mu l$)	۶۰۶/۵±۱۲۲/۷۸	۶۱۵/۸±۱۷۳/۵۶
روز ۲۸	گلبول‌های سفید ($\times10^3/\mu l$)	۵/۸±۰/۷۹	۴/۴±۱/۲۶
	گلبول‌های قرمز ($\times10^6/\mu l$)	۶/۸±۰/۳۷	۷/۱±۰/۵۱
	هموگلوبین (g/dl)	۱۴/۶±۰/۷۸	۱۵/۳±۰/۹۷
	هماتوکریت (٪)	۳۹/۵±۱/۹۴	۴۲/۲±۳/۱۷
	حجم متوسط سلولی (fl)	۵۷/۷±۰/۴۸	۵۹/۱±۱/۲۳*
	هموگلوبین متوسط سلولی (pg)	۲۳/۲۴±۴/۶	۲۱/۴±۰/۲۸
	غلظت متوسط هموگلوبین سلولی (g/dl)	۳۶/۹±۰/۸۵	۳۶/۳±۰/۸۶
	پلاکت ($\times10^3/\mu l$)	۷۲۸/۲±۷۲/۴۴	۵۴۱/۸±۳۲۹/۱

* تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه تیمار وجود دارد ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

حدود بیست ترکیب شیمیایی در گیاه گزنه وجود دارد که غلظت ترکیبات شیمیایی گزنه در برگ بیشتر از سایر قسمت‌ها مثل ریشه و ساقه آن است (۲۰). بنابراین برای بهره‌گیری از اثرات مختلف این گیاه، بیشتر از عصاره‌های برگ آن استفاده می‌شود. در یک مطالعه مشخص شده که میزان پروتئین برگ (۲۶/۸۹ درصد) بیشتر از میزان پروتئین ساقه (۱۴/۵۴ درصد) و ریشه (۱۰/۸۹ درصد) است (۲۱). بنابراین برگ این گیاه هم به عنوان منبع غذای انسانی در جهت تقویت قوای جسمی و هم به عنوان منبع غذای حیوانی در جهت افزایش وزن و بهبود کیفیت گوشت استفاده می‌شود (۲۴-۲۲). در مطالعه حاضر نیز برگ گیاه گزنه پس از برداشت، در سایه خشک شده، عصاره آبی آن تهیه شده و در گروه تیمار مورد استفاده قرار گرفت.

گزنه همچنین دارای مواد معدنی بسیاری است که مهم‌ترین آن آهن است (۲۷-۲۵). برگ‌های تازه گیاه گزنه حاوی مقادیر قابل توجهی از ویتامین‌های مختلف نظیر A، C، D، E، K و B-Complex می‌باشد (۲۸). برای مدت‌های طولانی از این گیاه در طب سنتی برای درمان مشکلاتی نظیر اگزما،

اختلالات گوارشی و جنسی، التهاب مفاصل و کم‌خونی استفاده می‌شده است (۲۹). یکی از موارد مهم مصرف گزنه در میان سایر گیاهان دارویی، استفاده از تونیک تغذیه‌ای آن در درمان آنمی می‌باشد (۳۰). مطالعات حیوانی مختلف نیز اثرات ضد کم‌خونی آن را به اثبات رسانیده است. کرمر در سال ۱۹۳۴ اثرات مثبت تجویز خوراکی عصاره‌ی گزنه را پس از بیست روز در خرگوش‌های دارای کم‌خونی و در مقایسه با گروه کنترل گزارش کرد و درنهایت اثرات اریتروپویتیک این گیاه را مشابه با مکانیسم اثر ترکیبات حاوی آهن دانسته است و بیان کرده که به دنبال تجویز گزنه میزان تولید پورفیرین نیز افزایش می‌یابد (۳۱). کانتر و همکاران در مطالعه‌ای دیگری که بر روی موش‌های صحرایی مبتلا شده به کم‌خونی متعاقب تجویز تتراکلرید کربن، انجام دادند بیان کردند که درمان با روغن دانه گزنه می‌تواند اثرات منفی تتراکلریدکربن را بر روی پارامترهای خونی خنثی سازد و بر روی میزان کاهش یافته گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت اثر افزایشی داشته باشد (۳۲).

از طرفی برخی از گیاهان دارویی که به لحاظ ذخایر آهن قابل توجه هستند شناسایی شده‌اند. در مطالعه‌ای یازده گونه‌ی گیاهی که به لحاظ ذخایر آهن شناخته شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت *Tectona grandis*، *Stylosanthes erecta* و *Amaranthus spinosus* به ترتیب با میزان آهن ۲۶۶/۶، ۲۰۶/۶ و ۲۳۶/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم دارای بیشترین میزان آهن و *Khaya senegalensis* و *Justicia secunda* با ۳۳/۳ و ۲۶/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم کمترین میزان آهن را در خود داشتند (۳۳). بر اساس مطالعات صورت گرفته مشخص شده که میزان آهن موجود در برگ گیاه گزنه حدود ۲۲۷/۸۹±۰/۲۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم است (۳۴) که می‌توان نتیجه گرفت که میزان آهن موجود در برگ گیاه گزنه قابل توجه بوده و بخشی از قابلیت اریتروپویتیک بودن آن را می‌توان به دلیل میزان بالای آهن موجود در گیاه تلقی کرد. آهن به واسطه وجود در ساختار هموگلوبین گلبول‌های قرمز با خون‌سازی دارای نقش اساسی در جلوگیری از کم‌خونی و عدم انتقال اکسیژن متعاقب آن است (۳۵). هرچند قابلیت درمانی گیاهان تنها بر مبنای میزان آهن موجود در آنها نیست و فاکتورهای دیگری نیز در جذب آهن توسط بدن نقش دارند (۳۶). بعضی از این فاکتورها شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، کلسیم، روی، ویتامین C و K هستند (۳۷). برای مثال فلاونوئیدها باعث حفاظت از ساختار مویرگ‌ها (۳۸) ویتامین C باعث تسهیل دسترسی و جذب آهن در بدن می‌شود (۳۹). بنابراین علاوه بر آهن، وجود ترکیبات ساپونین، تانن، فلاونوئید و کلسیم، ویتامین‌های گروه ب و کبالت موجود در گزنه می‌تواند در اثرات خون‌سازی یا مقابله با کم‌خونی آن دارای نقش باشند.

در مطالعه حاضر عصاره برگ خشک شده گیاه گزنه (*Urtica dioica*) به مدت ۲۸ روز با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به موش‌های صحرایی از طریق گاواژ خورانده شد. تغییرات کلیه پارامترهای خونی در گروه‌های شاهد و تیمار از زمان شروع مطالعه تا پایان آن در بازه‌ی طبیعی قرار داشت. مقایسه پارامترها در دو گروه کنترل و درمان نشان داد که حجم متوسط سلولی در گلبول‌های قرمز در روز ۲۸ ام افزایش داشته است ($p=0.044$). افزایش حجم متوسط سلولی در گلبول‌های قرمز بیانگر افزایش میزان گلبول‌های قرمز جوان در خون یا رتیکولوسیت‌ها است. از طرفی در این مطالعه، در گروه تیمار گزنه تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین نیز در روز ۲۸ نسبت به

گروه کنترل افزایش داشتند، هرچند که این افزایش، معنی‌دار نبود اما در کنار افرایش معنی‌دار میزان حجم متوسط سلولی (MCV) می‌تواند بیانگر خون‌سازی بیشتر در گروه موش‌های صحرایی تیمار نسبت به گروه کنترل باشد.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره‌ی برگ گیاه گزنه به مدت چهار هفته و به طور خوراکی می‌تواند اثرات خون‌سازی در موش‌های صحرایی داشته باشد. مطالعات بیشتری در خصوص اثرات هماتوپویتیک سایر بخش‌های این گیاه نظیر ساقه و ریشه مورد نیاز است. علاوه براین انجام تحقیقات مشابه در خصوص تأثیرات این گیاه بر خون‌سازی در سایر گونه‌های دامی می‌تواند کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری

بخشی از این مطالعه با همکاری دانشکده دامپزشکی زابل در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و بدین وسیله از آقای دکتر حاجی‌نژاد تشکر و قدردانی می‌گردد. منابع مالی این مطالعه با کمک پژوهانه (گرنت) دانشگاه زابل به شماره UOZ-GR-9618-159 تأمین گردید.

References

1- Fattahi S, Zabihi E, Abedian Z, Pourbagher R, Ardekani AM, Mostafazadeh A, *et al.* Total phenolic and flavonoid contents of aqueous extract of stinging nettle and in vitro antiproliferative effect on hela and BT-474 Cell lines. Int J Mol Cell Med. 2014; 3(2):102.

2- Hasani-Ranjbar S, Larijani B, Abdollahi M. A systematic review of Iranian medicinal plants useful in diabetes mellitus. Arch Med Sci. 2008; 4(3): 92-285.

3- Hasani-Ranjbar S, Larijani B, Abdollahi M. A systematic review of the potential herbal sources of future drugs effective in oxidant-related diseases. Inflammation & Allergy: Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy). 2009; 8(1): 2-10.

4- Aghilikhorasani A. Treasure of spice. Islamic revolution education press. 1992; 115: 5-324.

5- Bodros E, Baley C. Study of the tensile properties of stinging nettle fibres (Urtica dioica). Mater Lett. 2008; 62(14): 5-2143.

6- Kavalalı G, Tuncel H, Göksel S, Hatemi H. Hypoglycemic activity of Urtica pilulifera in streptozotocin-diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 84(2): 5-241.

7- Farzami B, Ahmadvand D, Vardasbi S, Majin F, Khaghani S. Induction of insulin secretion by a component of Urtica dioica leave extract in perifused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2003; 89(1): 47-53.

8- Emami A, Ahi A. Medical botany. Mashhad: Mashhad University of Medical Science. 2012: 403.

9- Shahraki M, Mirshekari H, Shahraki A, Shahraki E, Divband K. Effect of urtica dioica boiling on serum glucose, insulin and lipids in fructose-fed male rats. Ofogh-E-Danesh. 2008; 14(3): 10-15

10- Zargari A. Medicinal plants. 6 ed. Tehran: Tehran University Publication; 1997.

11- Jafarnia S, Ghasemi M. Medicinal plants. ۱ed. Mashhad: Sokhan-Gostar Publications; 2007.

12- Dizaye K, Alberzingi B, Sulaiman S. Renal and vascular studies of aqueous extract of Urtica dioica in rats and rabbits. Iraq J Vet Sci. 2013; 27: 25-31.

13- Wagner H, Willer F, Samtleben R, Boos G. Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (Urtica dioica) roots. Phytomedicine. 1994; 3(1): 24-213.

14- Emmelin N, Feldberg W. Distribution of acetylcholine and histamine in nettle plants. New Phytol. 1949; 48(2): 8-143.

15- Gutowska I ,Jakubczyk K, Dec K, Baranowska-Bosiacka I, Drozd A, Janda K, *et al.* Effect of the extract from nettle (Urtica dioica L.) fruit cluster on the synthesis of pro-inflammatory agents in hepatocytes treated with fluoride. Res Rep Fluoride. 2014; 47(2): 18-109.

16- Kukrić ZZ, Topalić-Trivunović LN, Kukavica BM, Matoš SB, Pavičić SS, Boroja MM, *et al.* Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (Urtica dioica L.). Acta Period Technol. 2012(43): 72-257.

17- Nazar H, Usmanghani K. An integrated approach to iron deficiency anemia. Indian j tradit knowl. 2015; 1(1): 36-41.

18- Karnath BM. Anemia in the adult patient. Hosp Physician. 2004; 40: 6-32.

19- Barnes J ALA, Phillipson JD. Herbal Medicine. edition r ,editor: Pharmaceutical Press; 2007.

20- HABIBI LS, Amini K, Moradi P, Asaadi K. Investigating the chemical composition of different parts extracts of bipod nettle Urtica dioica L. in Tonekabon region. Iran J Plant Physio 2011; 2(1): 339-342

21- Rafajlovska V, Kavrakovski Z, Simonovska J ,Srbinoska M. Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. Quality of life. 2013; 7(1-2).

22- Hanczakowska E, Wiytkiewicz M, Szewczyk A. Effect of dietary nettle extract on pig meat quality. Med Wet. 2007; 63: 7-525.

23- Khosravi A, Boldaji F, Dastar B, Hasani S. The use of some feed additives as growth promoter in broilers nutrition. Int J Poult Sci. 2008; 7(11): 9-1095.

24- Kwiecień Mg, Winiarska-Mieczan A. Effect of addition of herbs on body weight and assessment of physical and chemical alterations in the tibia bones of broiler chickens. J Elem. 2009; 14(4).

25- Kara D. Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. Food Chem. 2009;11(1): 54-1347.

26- Tack F, Verloo M. Metal contents in stinging nettle (Urtica dioica L.) as affected by soil characteristics. Sci Total Environ. 1996; 192(1): 9-31.

27- Kregiel D, Pawlikowska E, Antolak H. Urtica spp. Ordinary Plants with Extraordinary Properties. Molecules. 2018; 23(7): 1664.

28- Rutto LK, Xu Y, Ramirez E, Brandt M. Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (Urtica dioica L.). Int J Food Sci. 2013.

29- Mills S, Bone K. Principles and practice of phytotherapy. Modern herbal medicine: Churchill Livingstone; 2000.

30- Upton R. Stinging nettles leaf (Urtica dioica L.): Extraordinary vegetable medicine. J Herb Med. 2013; 3(1): 9-38.

31- Cremer H. Wissenschaftlicher Teil: Biologische Versuche mit Pflanzensaften. Dtsch Apoth Zeit. 1934; 80: 9-1277.

32- Kanter M, Meral I, Dede S, Cemek M, Ozbek H, Uygan I, *et al*. Effects of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl4-treated rats. J Vet Med, A. 2003; 50(5): 8-264.

33- Koné WM, Koffi AG, Bomisso EL, Tra Bi FH. Ethnomedical study and iron content of some medicinal herbs used in traditional medicine in Cote d'Ivoire for the treatment of anaemia. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2011; 9(1): 7-81.

34- Adhikari BM, Bajracharya A, Shrestha AK. Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (Urtica dioica) flour with wheat and barley flours. Food Sci Nutr. 2016; 4(1): 24-119.

35- Claude B, Paule S. The manual of natural living. Edn. 1979; 1: 98-101.

36- Omolo OJ, Chhabra SC, Nyagah G. Determination of iron content in different parts of herbs used traditionally for anaemia treatment in East Africa. J Ethnopharmacol. 1997; 58(2): 97-102.

37- N'guessan K, Kouassi K, Ouattara D. Plants used to treat anaemia, in traditional medicine, by Abbey and Krobou populations, in the South of Côte-d'Ivoire. J Appl Sci Res. 2010; 6: 7-1291.

38- Bruneton J. Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales. 1993.

39- Asobayire FS. Development of a food fortification strategy to combat iron deficiency in the Ivory Coast(dissertation). Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zurich; 2000.

The effect of aqueous extract of *Urtica dioica* leaf on hematological parameters in rats

Mehdi Rasekh[*1], Kiandokht Miri[2]

1- Department of clinical sciences, faculty of veterinary medicine, university of Zabol, Zabol, Iran.
2- Graduated student, faculty of veterinary medicine, university of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: February 4, 2020; Revise: March 2, 2020; Accept: March 8, 2020

Summary

The use of medicinal plants has a special importance in medicine because of its therapeutic properties, low side effects, availability, and ease of use. Nettle is a medicinal plant found in most parts of Iran and has unique properties in traditional medicine such as the treatment of anemia. In this study, the effect of aqueous extract of *Urtica dioica* leaf on hematological parameters in rats was investigated. For this purpose, 16 rats were studied and divided into two groups of 8 cases. Each rat in the treatment group received 200 mg/kg of aqueous extract of nettle leaf orally for 28 days and blood sampling was performed on days 0 and 28 and hematological parameters were measured and finally, hematological parameters of control rats that did not receive nettle were compared and the obtained parameters were analyzed. The mean cell volume (MCV) was significantly increased in the treatment group (p=0.044), which, along with parameters such as hemoglobin, red blood cell count and hematocrit, showed an increase compared to the control group. The results of this study indicate that oral administration of aqueous extract of nettle leaf can have hematopoietic effects on rats.

Keywords: Hematopoiesis, Hematology, Medicinal plant

شناسایی سرمی موارد تحت بالینی کم‌خونی عفونی در بلدرچین‌های استان اصفهان

مجید غلامی آهنگران[۱*]، آسیه احمدی دستگردی[۲]، محمدرضا شهیری[۳]

۱- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- استادیار گروه صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.
۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ دی ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۷ اسفند ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۲ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

ویروس کم‌خونی جوجه‌ها یکی از عوامل تضعیف‌گر سیستم ایمنی در ماکیان است. اگرچه ماکیان به عنوان تنها میزبان طبیعی این ویروس مطرح هستند، اما شواهدی وجود دارد که بیان می‌کند سایر پرندگان نیز به این ویروس حساسند و این ویروس می‌تواند در بدن آنها تکثیر شود. با توجه به مشاهده پاسخ نامناسب ایمنی علیه واکسن نیوکاسل، آلودگی‌های مکرر باکتریایی و نیز رشد نامناسب بلدرچین‌ها، در این مطالعه به وضعیت اپیدمیولوژیک این آلودگی در بلدرچین‌ها به روش سرولوژی پرداخته شد. به این منظور، ۱۵۰ نمونه سرمی از ۱۵ مرکز پرورش بلدرچین در اصفهان جمع‌آوری شد و پس از آماده‌سازی با کیت تجاری کم‌خونی عفونی به شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه ویروس کم‌خونی عفونی و با روش ممانعت از هماگلوتیناسیون به بررسی تیتر نیوکاسل پرداخته شد. نتایج نشان داد از ۱۵ مرکز پرورش، ۹ مرکز (۶۰ درصد) و از ۱۵۰ نمونه سرمی، ۶۰ نمونه (۴۰ درصد) مثبت ارزیابی شدند. در این بررسی، اگرچه در تمامی مراکز پرورش بلدرچین از واکسن نیوکاسل استفاده شده بود اما تیتر قابل توجه در زمان کشتار ردیابی نشد. لذا به نظر می‌رسد ویروس کم‌خونی عفونی می‌تواند در بلدرچین نیز به شکل تحت بالینی منجر به عوارض تضعیف سیستم ایمنی گردد.

واژگان کلیدی: *الیزا، بلدرچین، کم‌خونی عفونی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mgholami6@gmail.com

مقدمه

ویروس کم‌خونی اولین بار توسط یواسا در سال ۱۹۷۹ جداسازی و توصیف شد (۱) اما شواهدی وجود دارد که این ویروس قبل از گزارش یوآسا در طیور حضور داشته است (۲). این ویروس بدون غشاء و نسبتاً مقاوم است و در برابر عوامل شیمیایی و فیزیکی مقاومت قابل توجهی دارد. دارای ژنوم DNA تک رشته ای و حلقوی می‌باشد. این ویروس از جنس ژیروویروس و از خانواده سیرکوویریده است که به شکل عمودی از مادر و به شکل افقی از طریق تماس با جوجه های آلوده و مدفوع منتشر می‌شود (۳).

کم‌خونی عفونی به دو شکل بالینی و تحت بالینی بروز می‌کند (۲، ۴). شکل بالینی بیماری که با آلودگی جوجه‌ها در طول دو هفته اول زندگی یا اکتساب ویروس از طریق مادر غیر ایمن حاصل می‌شود به شکل کمخونی، آتروفی عمومی بافت‌های خون‌ساز و لنفاوی، خونریزی‌های گسترده زیرپوستی و در نهایت تضعیف سیستم ایمنی مشخص می‌شود. اگر جوجه‌ها پس از دو هفته اول زندگی با ویروس مواجه شوند بیماری به شکل بالینی آشکار نمی‌شود و فرم تحت بالینی شکل می‌گیرد. شکل بالینی بیماری با انتقال مقادیر کافی آنتی بادی از مرغ مادر به جوجه ها قابل پیشگیری است (۳، ۵). به هر حال، عفونت با این ویروس تحت تأثیر فاکتورهای مختلف محیطی، مدیریتی و بیولوژیک است. بیماری‌زایی این ویروس بستگی به حدت ویروس، دوز ویروس و فاکتورهای مربوط به میزبان مانند ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد (۶). اگرچه در بدو شناسایی این ویروس در ایران علایم بالینی بسیار تیپیک مانند آتروفی عمومی لنفوئیدی و خونریزی-های گسترده زیر پوستی جلب توجه می‌کرد اما امروزه به نظر می‌رسد ایمن‌سازی مرغ‌های مادر منجر به رخداد فرم تحت بالینی این بیماری شده است (۴).

این ویروس از این لحاظ که می‌تواند به شکل تنهایی و یا در ترکیب با سایر عوامل عفونی مانند ویروس گامبورو تضعیف ایمنی شدید ایجاد کند واجد اهمیت است (۷). نتایج سرولوژی کم‌خونی عفونی نشان می‌دهد این ویروس در تمام کشورهای تولیدکننده طیور وجود دارد و شیوع آن در مزارع ماکیان به اشکال سرمی، مولکولی و حتی جداسازی ویروس ثابت شده است (۲). اگرچه شواهدی وجود دارد که این عامل می‌تواند علاوه بر ماکیان، سایر پرندگان را نیز آلوده کند اما عمدتاً بررسی وضعیت اپیدمیولوژیک این بیماری محدود به ماکیان بوده است (۶، ۸، ۹، ۱۰). با توجه به رشد صنعت پرورش بلدرچین در ایران لازم است مطالعات اختصاصی در این گونه پرندگان انجام شود و اقدامات کنترلی برای بیماری‌های واگیری در این پرندگان نیز به انجام برسد. مشاهدات بالینی نشان می‌دهد علی‌رغم عدم وجود علایم بالینی واضح، بلدرچین نیز مانند ماکیان در طول دوره پرورش با عوارض ناشی از تضعیف سیستم ایمنی روبرو است که گاهی با شکست ایمنی‌زایی واکسن‌ها در برابر سایر پاتوژن‌ها و رخداد آلودگی‌های ثانویه باکتریایی و ویروسی و نیز رشد نامناسب جلوه می‌کند. لذا در این بررسی به توصیف فرم تحت بالینی بیماری کم‌خونی عفونی در مراکز پرورش بلدرچین در استان اصفهان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

از بهار ۱۳۹۵ تا بهار ۱۳۹۶ با مراجعه به ۱۵ مزرعه پرورش بلدرچین واقع در شهر اصفهان و توضیح درباره طرح مورد نظر، پرورش دهندگان را کاملاً توجیه نموده تا اطلاعات مورد نظر را اعم از شاخص های رشد، بیماری و تلفاتی که در طول دوره رشد رخ می‌دهد و نیز برنامه واکسیناسیون

بلدرچین‌ها در پایان دوره در اختیار قرار دهند. در پایان دوره پرورش از هر مزرعه به طور تصادفی ۱۰ نمونه خون اخذ و کدبندی شد که بلافاصله با انتقال به آزمایشگاه، سانتریفوژ شده و پس از تهیه نمونه سرمی، با حفظ کدهای قبلی در یخچال نگهداری شد.

نمونه‌های سرمی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد بن گذاری شد و سپس وضعیت سرمی نمونه‌های جمع آوری شده، از لحاظ کم‌خونی عفونی با کیت تجاری الایزای کم‌خونی عفونی ماکیان (IDEXX Laboratories. Inc., Maine, USA) مشخص شد. به این منظور از نمونه‌های سرمی رقت یک‌دهم تهیه و طبق پروتکل توصیه شده توسط شرکت سازنده به سنجش تیتر سرمی پرداخته شد. در نهایت تراکم نوری در طول موج ۶۵۰ با دستگاه اسپکتروفتومتری الیزا ریدر قرائت شد. مثبت یا منفی بودن نمونه‌های سرمی از لحاظ تیتر سرمی علیه کم‌خونی عفونی بر اساس نسبت جذب نوری بین نمونه‌های سرمی با کنترل منفی (S/N) گزارش شد. نمونه‌هایی که S/N کمتر از ۰/۶ داشتند به عنوان نمونه مثبت و نمونه‌هایی که S/N آنها مساوی یا بیشتر از ۰/۶ بود منفی گزارش شد. میانگین و ضریب پراکندگی تیترها (CV)، درصد نمونه‌های مثبت از مجموع نمونه‌های سرمی تست شده، درصد نمونه‌های مثبت در هر مرکز پرورش و درصد مراکز مثبت به مجموع مراکز مورد مطالعه گزارش شد. علاوه بر این نمونه‌های سرمی بار دیگر با آنتی‌ژن اختصاصی نیوکاسل (سویه لاسوتا) تست HI(Haemaglutin Inhibiton) شد و وضعیت سرمی جوجه‌ها علیه نیوکاسل نیز مشخص گردید.

برای تجزیه و تحلیل داده از برنامه نرم افزاری SPSS استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین تیترهای نیوکاسل و کم‌خونی عفونی از روش آماری Pearson Corrlation و برای مقایسه میانگین‌ها از روش واریانس یک‌طرفه داده‌ها (One way ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود اختلاف میانگین بین گروه‌ها با آزمون Tukey میزان اختلاف تعیین می‌شود. سطح اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شده است.

نتایج

سرولوژی کم‌خونی عفونی: ۶۰ درصد مراکز مورد بررسی (۹ مرکز پرورش از ۱۵ مرکز پرورش) از لحاظ سرمی مثبت ارزیابی شدند. دامنه درصد موارد مثبت در هر مرکز پرورش از ۱۰ درصد تا حداکثر ۱۰۰ درصد متغیر بوده است. به طور متوسط ۴۰ درصد نمونه های سرمی از لحاظ کم‌خونی عفونی مثبت بودند به عبارتی، از مجموع ۱۵۰ نمونه سرمی اخذ شده ۶۰ نمونه (۴۰ درصد) مثبت ارزیابی گردید. در بین نمونه های سرمی کمترین S/N ، ۰/۰۳۰ و بیشترین آن ۰/۹۰ بوده است. از مجموع ۱۵ مرکز پرورش نمونه گیری شده کمترین میانگین S/N، ۰/۰۷۵ و بیشترین میانگین S/N ، ۰/۶۶ بوده است. میانگینS/N ۱۵۰ نمونه سرمی اخذ شده از ۱۵ مرکز پرورش نمونه گیری شده برابر ۰/۵۰می‌باشد. از مجموع ۱۵ مرکز پرورش کمترین درصد پراکندگی (CV) ۸/۵ درصد و بیشترین درصد پراکندگی ۹۵ درصد می‌باشد. درصد پراگندگی ۱۵۰ نمونه سرمی اخذ شده از ۱۵ مرکز پرورش ۳۳ درصد می‌باشد.

سرولوژی نیوکاسل: از ۱۵ مرکز پرورش مورد بررسی همگی علیه نیوکاسل واکسینه شده بودند. میانگین تیتر سرمی متعلق به مراکز پرورش مورد بررسی برابر ۳/۶۰ بود. کمترین تیتر مراکز پرورش واکسینه ۱/۲۰ و بیشترین آن ۶/۷۰ بود. میانگین CV مراکز پرورش واکسینه برابر ۴۰ بود. کمترین CV برابر ۱۵ و بیشترین آن ۷۰ بود.

ارتباط تیتر سرمی نیوکاسل و کم‌خونی عفونی: میانگین تیتر سرمی علیه ویروس نیوکاسل در مراکز پرورش مثبت و منفی از لحاظ کم‌خونی عفونی، به ترتیب، ۱/۳۶ ± ۲/۷۸ و ۱/۲۷ ± ۴/۵۰

با ضریب پراکندگی به ترتیب ۲۸ و ۴۹ درصد می‌باشد. اگرچه ارتباط آماری بین تیتر سرمی نیوکاسل و کم‌خونی عفونی وجود ندارد اما ارزیابی میانگین تیتر نیوکاسل در مراکز پرورش که از لحاظ کم‌خونی عفونی مثبت ارزیابی شدند و مراکزی که از نظر کم‌خونی عفونی منفی بودند نشان داد تیتر نیوکاسل به طور معنی‌دار در مراکز مثبت از نظر کم‌خونی عفونی بیشتر از مراکز پرورشی بود که از نظر کم‌خونی عفونی منفی بودند (P= 0.025).

بحث

نتایج این بررسی نشان داد شیوع کم‌خونی عفونی در ۱۵ مرکز پرورش بلدرچین گوشتی ۶۰ درصد و در ۱۵۰ نمونه سرمی متعلق به بلدرچین‌های گوشتی فاقد علایم بالینی ۴۰ درصد با دامنه ۱۰ تا ۱۰۰ درصد است که نشان‌دهنده شیوع بالای کمخونی شکل تحت بالینی در جوجه بلدرچین‌های گوشتی استان اصفهان می‌باشد. به نظر می‌رسد شیوع این بیماری که کمتر به آن توجه می‌شود در اکثر کشورهای تولیدکننده طیور بالا است. عمده گزارشات مربوط به وضعیت آلودگی ماکیان و آن هم در مرغ‌های مادر، تخم‌گذار تجاری و جوجه گوشتی است (۴) که گزارشات زیادی از کشورهای مختلف وجود دارد. اما تا به حال کمتر به این پاتوژن به عنوان یک عامل مشترک بیماری‌زا در سایر رسته‌های پرندگان پرداخته شده است.

در ایران اولین گزارش مربوط به کم‌خونی عفونی از طرقی و همکاران مربوط به ۴ مرکز پرورش گوشتی در استان اصفهان با علایم کالبدگشایی خونریزی‌های پراکنده در سطح عضلات است که با انجام PCR، هر ۴ مرکز پرورش از نظر کم‌خونی عفونی مثبت گزارش می‌شود. علاوه بر آن محزونیه و همکاران در سال۲۰۰۳ به بررسی این بیماری در جوجه‌های گوشتی استان چهارمحال و بختیاری پرداختند. آنها شیوع کمخونی عفونی در مراکز پرورش نمونه‌گیری شده ۱۰۰ درصد و در جوجه‌های گوشتی با سنین مختلف ۸۷/۷ درصد بیان کردند (۱۱). فرهودی و همکاران نیز در فاصله زمانی زمستان ۲۰۰۵ تا تابستان ۲۰۰۶ به بررسی کم‌خونی عفونی جوجه‌ها در مراکز پرورش جوجه گوشتی با علایم مشکوک به این بیماری در استان‌های تهران، اصفهان و خراسان پرداختند. در این بررسی ۷۱/۷ نمونه‌های سرمی با دامنه ۲۵ تا ۱۰۰ درصد مثبت گزارش کردند و بیان کردند این ویروس در ایجاد خونریزی‌های بافتی در مرغ‌های گوشتی نقش عمده ای ایفا می‌کند (۴). اگرچه این بیماری در اوایل دوره ظهور و شناسایی در ایران بیشتر به شکل بالینی جلب نظر می‌کرد اما با صدور مجوز استفاده از واکسن کم‌خونی عفونی در مرغ‌های مادر و انتقال آنتی‌بادی‌های مادری به نتاج آنها، فرم بالینی این بیماری کمتر مشاهده گردید و بیشتر عوارض این بیماری به شکل تحت بالینی جلوه می‌نمود که با تست‌های سرولوژیک و مولکولی و بعضاً جداسازی ویروس این مهم به اثبات می‌رسید. در مطالعه اخیر نیز اگرچه علایم اختصاصی بالینی در پرندگان نمونه‌گیری شده مشاهده نشد اما ردیابی آنتی‌بادی در بلدرچین‌های بالغ نشان از وجود حساسیت و آلودگی این پرندگان با ویروس کم‌خونی عفونی می‌باشد.

تیتر پایین نیوکاسل در بلدرچین‌های واکسینه که بعضاً در طول دوره پرورش دو نوبت واکسن نیوکاسل دریافت نموده اند و در بعضی موارد واکسن کشته نیوکاسل را نیز دریافت نمودند، حاکی از اثرگذاری ویروس کم‌خونی عفونی بر پاسخ ایمنی

ناشی از واکسن‌ها است که به دنبال تضعیف سیستم ایمنی با سیرکوویروس عامل بیماری اتفاق می‌افتد. عوامل متعدد دیگری از جمله نگهداری صحیح و تزریق درست واکسن نیوکاسل و حمل و نگهداری صحیح نمونه‌های سرمی و بعضاً سایر عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی نیز بر روی تیتر واکسن موثرند (۱۲) که در اینجا مورد بررسی قرار نگرفته است اما به نظر می‌رسد شیوع بالای کم‌خونی عفونی می‌تواند از دلایل قابل قبول و مؤثر بر تیتر واکسن نیوکاسل در مراکز پرورش مورد بررسی باشد به طوری که گزارشات متعددی نشان داده است ویروس کم‌خونی عفونی به شکل تنهایی و یا همراه با ویروس گامبورو از عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی می‌باشند (۷، ۱۳) لذا پاسخ ایمنی ضعیف در مقابل واکسن نیوکاسل می‌تواند دلیلی بر تأیید شیوع تحت بالینی کم‌خونی عفونی در بلدرچین‌ها باشد. از طرفی دیگر، مراکز پرورش مثبت عموماً رکورد وزنی و راندمان تبدیل کمتری نسبت به موارد منفی یا واجد تیتر پایین‌تر علیه کم‌خونی عفونی، داشتند و در این بلدرچین‌ها با توجه به تاریخچه اخذ شده عفونت‌های مایکوپلاسمایی، کلی‌باسیلوزی و انتریت‌های کلستریدیایی بیشتر بروز و ظهور داشته است. قبلاً یکی از عوارض مهم ویروس کم‌خونی عفونی در پرندگان آلوده، افزایش ضریب تبدیل غذایی، کاهش وزن‌گیری، پاسخ نامناسب نسبت به واکسن‌ها و استعداد بیشتر پرندگان به عفونت‌های ثانویه باکتریایی گزارش شده است. به طوری که در یک بررسی در ایرلند شمالی نشان داده شده است شاخص‌های تولید در جوجه‌های آلوده با ویروس کم‌خونی عفونی به ظاهر سالم در مقایسه با جوجه‌های غیرآلوده ۱۳ درصد کمتر بوده است (۷، ۱۴). بنابراین پاسخ ضعیف در مقابل واکسن‌ها و بعضاً مشاهده تیتر صفر در برخی بلدرچین‌ها ممکن است به دلیل شیوع و گستردگی بالای ویروس کم‌خونی عفونی در این پرندگان باشد.

به هر حال، آنچه مسلم است شیوع سرمی بالای کم‌خونی عفونی در بلدرچین‌ها است که می‌تواند به خاطر عدم اقدامات پیشگیری‌کننده مناسب و از جمله عدم واکسیناسیون در برابر این بیماری باشد، به طوری که عدم انجام واکسیناسیون در پرندگان حساس و بعضاً آلودگی مرغ‌های مادر و انتقال آنتی‌بادی مادری به جوجه‌های آنها می‌تواند یکی از علل شیوع سرمی بالای کم‌خونی عفونی باشد. از طرفی عدم رعایت اصول امنیت زیستی مؤثر در مراکز پرورش بلدرچین می‌تواند یکی از علل شیوع بالای کم‌خونی عفونی در بلدرچین‌های گوشتی باشد.

به هر حال این بررسی نشان داد بلدرچین‌های پرورشی در اصفهان در برابر ویروس کم‌خونی عفونی تیتر آنتی‌بادی دارند که می‌تواند این پرندگان را به عنوان یک مخزن ویروس کم‌خونی عفونی معرفی نماید.

References

1- Yuassa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and some characteristics of an agent-inducing anaemia in chicks. *Avian Dis.* 1979; 23: 366-385.

2- Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Diseases of poultry. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press; 2013, P: 182-202.

3- Adair BM. Immunopathogenesis of chicken anaemia virus infection. *Dev Comp Immunol*. 2000; 24: 247-255.

4- Gholami-Ahangaran M, Momtaz H, Zia-Jahromi N, Momeni M. Genomic detection of the chicken anaemia virus from apparently healthy commercial broiler chickens in Iran. *Revue Méd. Vét.* 2011; 162: 604-606.

5- De Wit JJ, van Eck JH, Crooijmans RP,

Pijpers A. A serological survey for pathogens in old fancy chicken breeds in central and eastern part of The Netherlands. *Tijdschr Diergeneesk*. 2004; 129: 324-327.

6- Farkas T, Maeda M, Sugiura H, Kai K, Hirai K, Ostuki K, Hayashi TA. A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan. *Avian Pathol*. 1998; 27: 316-320.

7- Campbell G. Investigation into evidence of exposure to infectious bursal disease virus (IBDV) and chick infectious anaemia virus (CIAV) in wild birds in Ireland, Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia Conference 2001; July 15-16, 2001; Rauischholzhausen, Germany: Institut für Geflügelkrankheiten Press; 2001. P: 230–233.

8- Gholami-Ahangaran M, Zia-Jahromi N. Molecular detection of chicken anaemia virus (CAV) in house sparrow (*Passer domesticus*) in Iran. *Revue Méd. Vét*. 2013; 164: 487-491.

9- Todd D, Scott ANJ, Fringuelli E, Shivraprasad HL. Gavier-Widen D, Smyth JA. Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathol.* 2007*;* 36: 75-81.

10- Twentyman CM, Alley MR, Meers J, Cooke MM, Duignan PJ. Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (Larus dominicanus). *Avian Pathol*. 1999; 28: 513-516.

11- Mahzounieh M, Karimi I, Zahraei Salehi T. Serological evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in Shahrekord, Iran. Int J Poult Sci. 2005; 4(7):500-503.

12- Gholami-Ahangaran M, Zia-Jahromi N, Fathi-Hafshejani E. Identification of Subclinical cases of chicken anemia infection and its effect on influenza vaccine (H9N2 subtype) response in broiler chickens in Isfahan province. Iran Comp Biopath. 2009; 6(4): 123-128 (In Persian).

13- Cloud SS, Rosenberger JK, Lillehoj HS. Immune dysfunction following infection with chicken anaemia agent and infectious bursal disease virus. II. Alterations of in vitro lymphoproliferation and in vivo immune responses. *Vet Immunol Immunopathol*. 1992; 34: 353-366.

14- McNulty MS, McIlroy SG, Bruce DW, Todd D. Economic effects of subclinical chicken anaemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis.* 1991; 35: 263-268.

Serological identification of subclinical chicken anemia virus in quails, in Isfahan
Running title: Chicken anemia virus in quails

Majid Gholami-Ahangaran[1*], Asiye Ahmadi-Dastgerdi[2], Mohammad Reza Shahiri[3]

1- Associate Professor, Group of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord,, Iran.
2- Asistance Professor, Group of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.
3- Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: January 20, 2020; Revise: March 7, 2020; Accept: March 12, 2020

Summary

Chicken anemia virus (CAV) is one of the immune-suppressive agents in the fowls. Although, fowls are the only natural host of this virus, there is some evidence that other avian species are susceptible to the virus or the virus can replicate in this bird. Therefore, considering the complications of inappropriate response to Newcastle disease vaccine, frequent bacterial contamination and inappropriate growth in quail farms; in this study, the epidemiological situation of CAV infection was investigated in quail farms by serological method. To this end, 150 serum samples from 15 quail farms in Isfahan were collected. After preparation, the CAV specific antibody was detected by one commercial CAV Elisa kit, and the Newcastle titer was tested by hemagglutination inhibition (HI) test. The results showed that 60% of the farms had at least one positive serum sample against the CAV that was evaluated from a total of 40% positive serum samples. In this study, although Newcastle vaccine was used in all farms, no prominent titer was detected at slaughter time. Therefore, it seems that CAV can also lead to immune suppression in quails in the subclinical form.

Key words: *Elisa, Quail, Chicken anemia virus*

جداسازی و شناسایی تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم در اسهال گوساله در استان البرز

غلامرضا کریمی[1*]، حبیب اله پایکاری[1]، شهلا ریواز[1]، وحید نصیری[1]، محمد عبدی گودرزی[1]، محمدمهدی رنجبر[1]

۱- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۰۷ مهر ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۹ آبان ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲ بهمن ۱۳۹۸

چکیده

کریپتوسپوریدیوز یک بیماری انگلی است که به وسیله تک‌یاخته‌ای از جنس کریپتوسپوریدیوم (*Cryptosporidium*) در جانوران ایجاد می‌شود. این انگل در دام‌ها به ویژه نشخوارکنندگان، سندرم‌های اسهال نوزادان را به وجود می‌آورد. منبع مستقیم و عمده آلودگی، مدفوع حاوی اووسیست و انتقال از راه دهان می‌باشد. هدف از این پروژه جداسازی و شناسایی گونه‌های تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم به روش ریخت‌شناسی در اسهال گوساله‌ها به منظور پیشگیری و کنترل بیماری بوده است. تخلیص اووسیست از مدفوع با استفاده از تکنیک شناورسازی، رنگ‌آمیزی با روش زیل نیلسون اصلاح شده (روش هنریکسن) و شناسایی با کلیدهای تشخیصی انجام شده است. بدین منظور، از گوساله‌های مبتلا به اسهال و بدون اسهال در استان البرز به ترتیب ۱۵۰ و ۵۰ نمونه مدفوع به طور تصادفی جمع‌آوری گردید. از تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده به صورت تصادفی، تعداد ۶۰ نمونه مثبت بود که ۴۰ درصد آلودگی را نشان می‌دهد. در هیچ یک از نمونه‌های مدفوع بدون اسهال گوساله‌ها(۵۰ نمونه) انگلی(اووسیست) مشاهده نشد. در گوساله‌های زیر یک ماه مبتلا به اسهال به ویژه در دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد که ناشی از کریپتوسپوریدیوم پاروم بود. در کشور ایران تلفات گوساله‌ها ۱۲-۲۰ درصد (متوسط ۱۶ درصد) می‌باشد که از این تلفات ۱۶ درصدی حدود ۷۵ درصد را سندرم اسهال به خودش اختصاص می‌دهد و یکی از تک‌یاخته‌های مهم که موجب اسهال می‌شود انگل کریپتوسپوریدیوم است. در بررسی حاضر نمونه‌های مدفوع بدون اسهال گوساله‌ها انگلی نداشتند و در گوساله‌های زیر یک ماه مبتلا به اسهال به ویژه در دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد.

واژگان کلیدی: *جداسازی، شناسایی، کریپتوسپوریدیوم، اسهال گوساله‌ها، استان البرز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: karimighr2003@yahoo.com

مقدمه

اسهال گوساله‌ها یکی از عوامل مهم مرگ و میر، کاهش بهره‌دهی و از بین رفتن منابع پروتئینی حیوانی است و خسارات اقتصادی ناشی از مرگ و میر، لاغری، هزینه‌های درمان و کاهش شیر مادران است. عواملی چون ویروس‌ها، باکتری‌ها، تک‌یاخته‌ها، قارچ‌ها و تغذیه باعث آن می‌شوند. میانگن تلفات گوساله‌ها در ایران ۱۶ درصد می‌باشد که ۷۵ درصد آن را سندرم اسهال به خودش اختصاص می‌دهد.کریپتوسپوریدیوز یک بیماری انگلی است که به وسیله تک‌یاخته‌ای از جنس کریپتوسپوریدیوم در جانوران ایجاد می‌شود. این انگل برای مهره‌داران از جمله پستانداران، پرندگان، خزندگان و ماهیان بیماری‌زا می‌باشد. در دام‌ها به ویژه نشخوارکنندگان سندرم‌های اسهال نوزادان را به وجود می‌آورد (۱۰). علاوه بر اهمیت پزشکی آن، آلودگی در حیوانات ممکن است باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی به دلیل میزان ابتلای فراوان و گاهی اوقات کاهش شدید رشد و در نتیجه لاغری و حالت ضعف عمومی حیوانات مبتلا شود (۱۲، ۱۶). ۹۰ درصد گاوداری‌ها و بیش از ۵۰ درصد گوساله‌های یک گاوداری می‌توانند آلوده باشد. توان بقای جرم در میزبان برای تمام طول زندگی دائم انسان آلوده، روش زیاد شدن آن در فرد آلوده، تکرار آلودگی در داخل بدن موجود آلوده، تعداد و تنوع فراوان میزبان و زنده ماندن طولانی در محیط زیست باعث شده که مبارزه بیولوژیک با این تک‌یاخته غیر ممکن شود.کریپتوسپوریدیوم پاروووم تنها در روده کوچک تکامل می‌یابد و اووسیست‌های آن کوچکتر از کریپتوسپوریدیوم موریس است. به تنهایی باعث بیماری بالینی در گوساله‌های جوان می‌شود و زمان عفونت نهفته آن ۳ تا ۶ روز می‌باشد (۱۶).

کریپتوسپوریدیوم برای اولین بار در سال ۱۹۰۷ توسط Tyzzerدر غدد معدی موش از ایالات متحده امریکا گزارش شد (۱۷). در سال ۱۹۷۱ در نوع گاو و در سال ۱۹۷۶ در انسان مورد شناسایی قرار گرفت. از ۱۹۷۸ میلادی به بعد اهمیت یافت و از تمام دام‌ها و انسان گزارش شد. کریپتوسپوریدیوز در گونه‌های مختلف پستانداران اهلی و وحشی، پرندگان و به ندرت خزندگان و ماهی‌ها گزارش شده است (جدول شماره ۱) (۳، ۱۵). کریپتوسپوریدیوم در ایران برای اولین بار در گوساله توسط قراگوزلو در سال ۱۳۶۳ گزارش شده است. درپستانداران دو نوع کریپتوسپوریدیوم که شامل کریپتوسپوریدیوم پاروم وکریپتوسپوریدیوم آندرسونی می‌باشد از اهمیت خاصی برخوردارند. کریپتوسپوریدیوز از نقاط مختلف جهان گزارش شده و می‌توان گفت یک بیماری جهانی است.

در دام‌های بزرگ روش آلوده شدن با لیسیدن بافت‌های پوششی خارجی پوست و اشیاء آلوده به اووسیست، مکیدن بافت‌های سر پستانک، بند ناف، نوشیدن آب یا شیر آلوده و پوز زدن یا خوردن مواد مغذی و غیر مغذی آلوده می‌باشد.

در حیوانات جوان اسهال‌های مقاوم یکی از عوارض بالینی انگل محسوب می‌شود و حیوانات کم سن و بره‌ها را می‌کشد. علائم درمانگاهی شامل اسهال آبکی که اغلب بدبو است و تبدیل به موکوسی زرد یا سبز و بسیار زیاد می‌شود که ۲ تا ۱۴ روز طول می‌کشد، بی اشتهایی، افسردگی، درد، دهیدراتاسیون و از دست دادن وزن به همراه تب می‌باشد. در اسهال حاد با دفع غیر طبیعی مدفوع، کم آبی پیشرونده و مرگ به فاصله چند روز مشخص می‌شود. دوره کمون بین ۲ تا ۱۰ روز می‌باشد. آلودگی اغلب موارد مربوط به کریپتوسپوریدیوم پاروومی‌باشد اگر چه آلودگی شیردان با کریپتوسپوریدیوم موریس در گاوهای گوشتی

مشاهده شده است. کریپتوسپوریدیوم پاروووم به تنهایی باعث بیماری بالینی در گوساله‌های جوان می‌شود و زمان عفونت نهفته آن ۳ تا ۶ روز می‌باشد (۱۲). در گاوها، این بیماری انگلی معمولاً گوساله‌های کوچکتر از یک ماه (۵ تا ۱۰ روزه) را مبتلا می‌کند و بخشی از کمپلکس اسهال نوزادان را تشکیل می‌دهد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم به روش ریخت‌شناسی در اسهال گوساله‌ها به منظور پیشگیری و کنترل بیماری بوده است. در این مطالعه در نظر است با جداسازی و شناسایی گونه‌های بیماری‌زای کریپتوسپوریدیوم با روش ریخت شناسی در نمونه‌های ارسالی گوساله‌های جوان گامی مطمئن در راه مبارزه با مشکل برداشته شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: چند گاوداری به طور تصادفی از مناطق مختلف البرز مانند ماهدشت، کردان، ساوجبلاغ و نظرآباد انتخاب شد و یکصد و پنجاه نمونه مدفوع از گوساله‌های جوان مبتلا به اسهال و ۵۰ نمونه هم از موارد بدون علامت به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. روش نمونه‌گیری از رکتوم با استفاده از دستکش یک بار مصرف و انتقال به ظروف پلاستیکی دربدار صورت گرفت و مشخصات و تاریخچه گله و گوساله مورد نمونه‌برداری شامل سن، جنس، علائم بالینی و غیره. ثبت شد و نمونه‌های مدفوع تحت شرایط مناسب کنار یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل شدند.

آماده سازی نمونه: تخلیص اووسیست از مدفوع با استفاده از تکنیک شناورسازی با کمک شکر یا نمک اشباع انجام شد. طبق روش Casemore و همکاران (۲)، مقدار ۵ سی‌سی از مدفوع گوساله‌ها را با ۱۰ سی‌سی فسفات بافر سالین اضافه و مخلوط و سوسپانسیون را از چند لایه گاز استریل عبور داده‌اند و ۵ سی‌سی از محلول سوکروز یک مولار به آن اضافه شده و محلول حاصل به لوله آزمایش منتقل و پس از سانتریفیوژ قسمت رویی به لوله استریل دیگر منتقل و دوباره سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب حاصله از سانتریفیوژ با ۱ سی‌سی نرمال سالین مخلوط شد. از نمونه‌های مستقیم مدفوع و نمونه‌های تغلیظ شده اووسیست گسترش تهیه نموده و به روش زیل‌نیلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی کرد و مورد بررسی قرار گرفت.

ذخیره اووسیست‌ها به صورت زنده: جهت حفظ اووسیست‌های احتمالی به صورت زنده، یا در صورت تغلیظ و تشخیص اووسیست‌ها، مقداری از نمونه مدفوع یا سوسپانسیون اووسیست را در داخل محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد مخلوط کرده و در یخچال ۴ درجه نگهداری کرده اند. اووسیست‌های زنده در صورت لزوم، برای آلوده‌سازی و تکثیر در تخم‌مرغ جنین‌دار یا حیوان آزمایشگاهی استفاده خواهد شد.

رنگ‌آمیزی با روش زیل نیلسون اصلاح شده (روش هنریکسن): روش زیل نیلسون سرد اصلاح شده که اولین بار توسط هنریکسن و پوهلنز ارائه شد و تغییرات دیگری پس از آن هم پیشنهاد شده است به صورت گسترده برای رنگ‌آمیزی اووسیست‌های کریپتوسپوریدیم استفاده می‌شود:

۱- تهیه اسمیر از مدفوع در اسلاید

۲- خشک کردن آن در دمای اتاق

۳- ثابت کردن (فیکس) با متانول ۹۶ درصد به مدت ۲ تا ۶ دقیقه

۴- خشک کردن آن در دمای اتاق

۵- ثابت کردن (فیکس) مختصر با حرارت

۶- کربول فوشین غلیظ به مدت ۲۰ تا ۶۰ دقیقه

۷- شستشوی کامل و رنگ‌زدایی خفیف با

اسیدکلریدریک یک درصد در الکل اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه (یک سی‌سی اسیدکلریدریک در ۹۹ سی سی اتانول).

۸- شستشوی اسلاید در با آب

۹- رنگ‌آمیزی با مالاشیت گرین ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه

۱۰- شستشو با آب

تشخیص: برای تشخیص اولیه، ابتدا گسترش‌ها با عدسی شیئی ۴۰ حداقل ۵۰ میدان میکروسکوپی و موارد مشکوک با عدسی ۱۰۰ ایمرسیون بررسی می‌شوند و اگر حتی یک اووسیست در گسترش مشاهده شود، نمونه مثبت تلقی می‌شود. برای تشخیص و تأیید نهایی اووسیست‌ها و مشاهده اسپوروزوئیت‌ها، کلیه گسترش‌های مثبت با عدسی ۱۰۰ هم بررسی می‌شوند.

جهت طبقه‌بندی شدت آلودگی،اووسیست‌ها با درشت‌نمائی عدسی شیئی ۴۰ مشاهده و بررسی شدند و تعداد اووسیست‌ها در ۳ تا ۵ میدان میکروسکوپی شمارش شد و میانگین شدت آلودگی را با (+)، (++)، (+++) به طریق زیر بیان شد:

۱) با مشاهده۱ تا ۴ اووسیست انگل در هر میدان (+)، آلودگی خفیف گزارش شد.

۲) با مشاهده ۵ تا ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (++)، آلودگی ملایم گزارش شد.

۳) با مشاهده بیش از ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (+++)، آلودگی شدید گزارش شد.

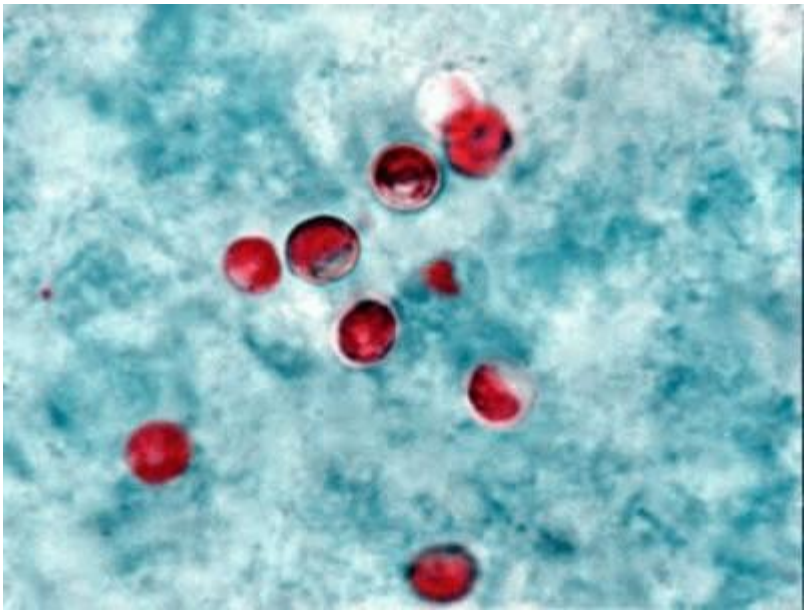
نتایج

از تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده از استان البرز به صورت تصادفی در سال های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶، تعداد ۶۰ نمونه مثبت بود که ۴۰ درصدآلودگی را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی با روش زیل نیلسون اصلاح شده انجام شده و۱ تا ۴ اووسیست انگل در هر میدان (+)، ۵ تا ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (++) و بیش از ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (+++) در نظر گرفته شده است. معمولاً با مشاهده انگل در ۳ تا ۵ میدان میکروسکوپی و میانگین آن نتیجه اعلام می‌شود. حضور بیش از ۲۵ اووسیست در هر میدان دید اغلب همراه با علائم بالینی می‌باشدو چنانچه در گوساله اسهالی در هر میدان میکروسکوپی بیش از ۲۰ اووسیست شمارش شود یا شمارش تخم‌ها آن گونه باشد که در هر گرم مدفوع $4x10^6$ عدد اووسیست وجود داشته باشد. می‌توان اسهال را کریپتوسپوریدیایی تلقی نمود. تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت درصدگیری ساده انجام شده است.

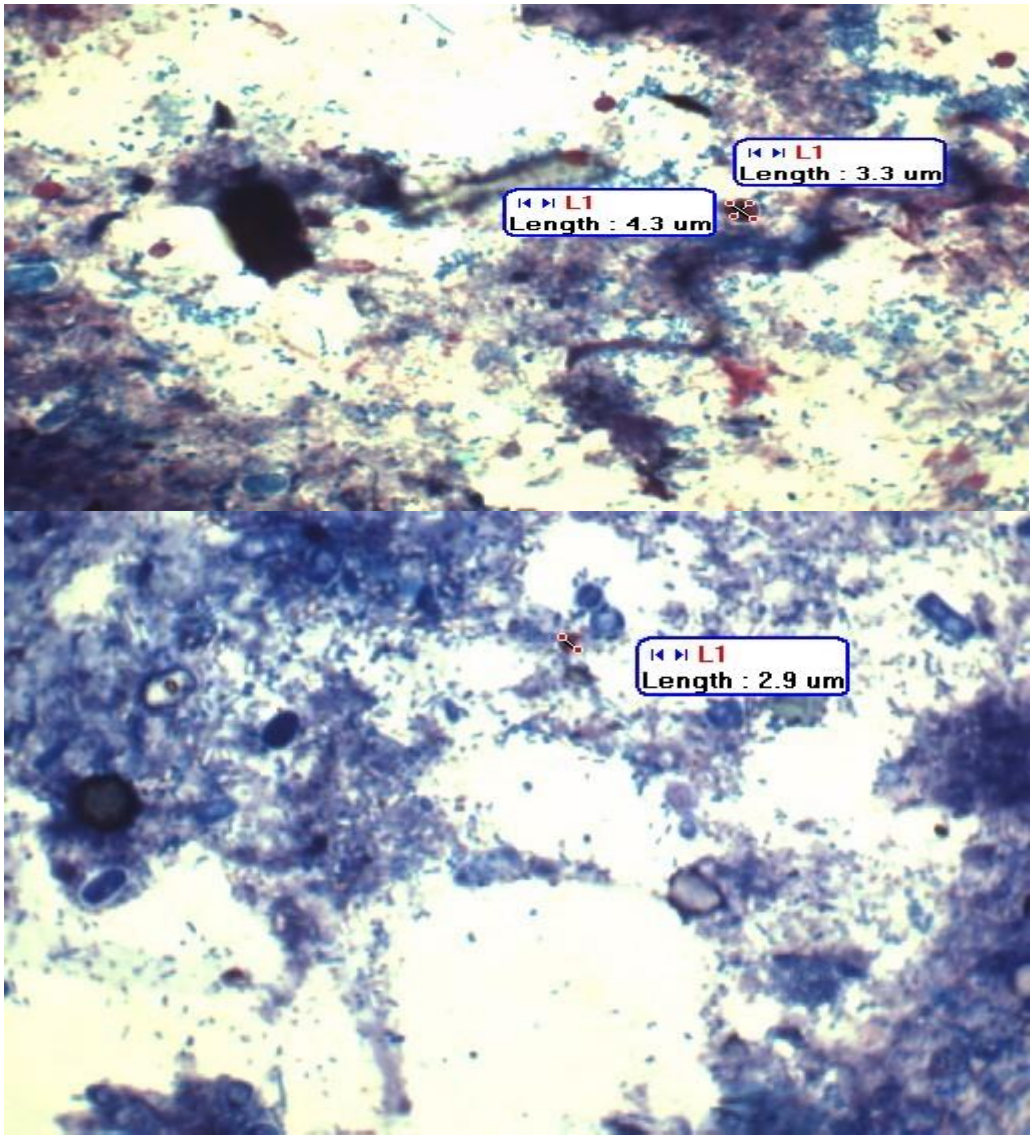
در این تحقیق اندازه اووسیست‌ها گرفته شد (جدول ۱) و با گزارش‌های دیگر محققین مقایسه شده است.

اندازه کریپتوسپوریدیوم موریس ۷/۴-۵/۶، اندازه کریپتوسپوریدیوم پاروم ۶-۴ میکرون، کریپتوسپوریدیوم آندرسونی۵/۷-۵/۴ میکرون می‌باشد. اندازه کریپتوسپوریدیوم ریانی ۳/۷-۳/۲ میکرون و کریپتوسپوریدیوم هومینیس۴/۴-۳/۹ میکرون است.

در کلیه نمونه‌های مدفوع بدون اسهال گوساله‌ها انگلی (اووسیست) مشاهده نشد. در گوساله‌های زیر یک ماه به ویژه دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد که به نظر کریپتوسپوریدیوم پاروم می‌باشد (شکل۱و۲).



شکل ۱- نمونه مثبت تشخیص داده شده در رنگ‌آمیزی زیل نیلسون اصلاح شده



شکل ۲- نمونه‌های اندازه‌گیری شده با میکروسکوپ نوری (۱۳۹۶-۱۳۹۷).

جدول شماره۱- طول و عرض اووسیست‌های اندازه‌گیری شده با میکروسکوپ نوری (۱۳۹۶-۱۳۹۷).

	lenght	Width		lenght	Width
1	4.6	4.5	21	4.6	3.7
2	4.6	3.8	22	4.9	4.2
3	4.9	4.6	23	4.5	3.8
4	3.4	3	24	4.5	3.9
5	3.6	3.5	25	5.1	4.5
6	5.0	4.4	26	4.4	4.1
7	4.6	4.2	27	4.8	4.4
8	4.7	4	28	4.4	4.3
9	4.5	3.6	29	3.9	3.2
10	3.8	3.6	30	4.9	3.2
11	3.9	3.4	31	4.7	3.1
12	3.9	3.0	32	4.0	3.2
13	3.8	3.1	33	4.7	4.1
14	4.0	3.2	34	4.1	3.5
15	4.4	4.3	35	4.4	4.1
16	3.9	3.8	36	4.5	3.9
17	4.0	3.8	37	4.7	4.0
18	4.3	3.6	38	3.9	3.5
19	4.4	4.3	39	4.7	4.1
20	4.2	3.7	40	3.3	3.1

بحث و نتیجه‌گیری

اسهال ناشی از کریپتوسپوریدیوز در گوساله‌های نوزاد یکی از مشکلات مهم بهداشتی می‌باشد و موجب خسارات شدید اقتصادی می‌شود. اسهال گوساله‌ها یکی از عوامل مهم مرگ و میر و کاهش بهره‌دهی و از بین رفتن منابع پروتئینی حیوانی است و خسارات اقتصادی آن ناشی از مرگ و میر، لاغری، هزینه درمان و کاهش شیر مادران می‌باشد (۱۰). نزدیک به ۴۰ تا ۵۰ در صد گوساله‌ها در خلال اولین ماه زندگی خود مبتلا به اسهال می‌شوند. در کشور ما تلفات گوساله‌ها ۲۰-۱۲ درصد (متوسط ۱۶ درصد) می‌باشد که از این تلفات ۱۶ درصدی حدود ۷۵ درصد را سندرم اسهال به خودش اختصاص می‌دهد. یکی از تک‌یاخته‌های مهم که موجب اسهال می‌شود این انگل است. اختصاصی نیست و یکی از بیماری‌های مشترک نوپدید بین انسان و حیوان تلقی می‌شود و این مسأله و عدم درمان مؤثر بر ضد آن اهمیت این بیماری را دو چندان می‌کند.

کریپتوسپوریدیوز از نقاط مختلف جهان گزارش شده است و می‌توان گفت یک بیماری جهانی است. در گونه‌های مختلف پستانداران اهلی و وحشی، پرندگان و به ندرت خزندگان و ماهی‌ها گزارش شده است. در اروپا ۸ گونه کریپتوسپوریدیوم در گاو گزارش شده است که عبارتند از: کریپتوسپوریدیوم پاروووم، آندرسونی، بوویس، ریانی، فلیس، هومینیس، ملئه اگریدیس و سوئیس. مطالعات کتابخانه‌ای نشان‌دهنده ۴ نوع کریپتوسپوریدیوم در ایران می‌باشد که کریپتوسپوریدیوم پاروووم در پستاندارانی چون گاو (گوساله‌های جوان)، گوسفند، بز، اسب، موش، خوک و انسان بوده وکریپتوسپوریدیوم بوویس، کریپتوسپوریدیوم آندرسونی وکریپتوسپوریدیوم ریانی در گوساله‌هایی که از شیر گرفته شده‌اند، گزارش شده است. کریپتوسپوریدیوم آندرسونی درگاوهای بالغ وجود دارد.

در بررسی عزیزی و همکاران مشخص شد که در گوساله‌های آلوده میزان بروز اسهال ۲/۳ برابر بیشتر از گوساله‌های غیر آلوده است (۱). اغلب موارد

گزارش شده مربوط به گاو و گوسفند و بز می‌باشد اما در دیگر دام‌ها نیز مانند شتر می‌توانند به عنوان یک مخزن عمل نموده و سبب انتقال تک‌یاخته به حیوانات دیگر شوند (۱۳). گرچه وجود کریپتوسپوریدیوم در مدفوع دام همواره نشانه بیماری نمی‌باشد اما در دام‌های اسهالی آلودگی به این تک‌یاخته می‌تواند سیر بیماری را وخیم‌تر سازد. در بررسی رنجبر بهادری و علیاری در سال ۱۳۹۰ آلودگی عمدتاً در گوساله‌های زیر ۲ ماه گزارش شد (۱۱). فتوحی اردکانی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز کریپتوسپوریدیوز را در ۱۸/۹ درصد گاوهای مورد بررسی گزارش نمودند که البته در این تحقیق نیز سن حیوان از عوامل تأثیرگذار بر آلودگی محسوب می‌شود و گوساله‌های شیرخوار با سن زیر ۲ ماه با شیوع ۳۳/۶ درصد بیشترین میزان آلودگی را نشان دادند (۴).

مخبر دزفولی و مشکی در سال ۱۳۸۱ میزان آلودگی در جمعیت گاوهای تحت مطالعه بدون اسهال را ۱۱ درصد گزارش کرده‌اند، آنها میزان آلودگی در گوساله‌های اسهالی زیر ۳ ماه را ۲۰ درصد و میزان آلودگی در گوساله‌های کمتر از ۳ ماه بدون اسهال را ۲۴ درصد گزارش کرده‌اند (۸، ۹).

لطف‌الله زاده و همکاران در سال ۱۳۸۳ میزان آلودگی در گوساله‌های اسهالی زیر یک ماه سن در قائم شهر و بابل را ۲۲/۸ درصد گزارش کرده‌اند (۵).

رضازاده و همکاران در سال ۱۳۸۱ در یک واحد شیری اطراف تهران میزان آلودگی در گوساله‌های مبتلا به اسهال را ۲/۱ درصد و در گوساله‌های ظاهراً سالم صفر درصد گزارش کردند (۱۴).

محبعلی و همکاران در سال ۱۳۷۸ میزان آلودگی در گوساله‌های ظاهراً سالم در گاوداری‌های اسلام شهر را ۱۲/۷ درصد گزارش کردند (۷). بنابر مطالعات ملکی و نایب زاده در سال ۱۳۸۶ در شهرستان خرم آباد میزان آلودگی در گاوها و گوساله‌های اسهالی و غیر اسهالی در چهار فصل یکسان بوده است، طبق این مطالعه در جمعیت دام‌های بدون اسهال، گاوهای بالغ بالاترین میزان آلودگی (۲۳/۷۵ درصد) و در جمعیت دام‌های مبتلا به اسهال گوساله‌ها بالاترین میزان آلودگی (۲۱/۸ درصد) را نشان دادند. بنابر همین بررسی درصد آلودگی در دام‌های مزبور در خرم آباد ۱۷/۵ درصد بوده است (۶). در مطالعه‌ای که توسط نورمحمدزاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ در آذربایجان شرقی انجام شد میزان شیوع آلودگی در نمونه‌های مدفوع درگوساله‌های مبتلا به اسهال ۴۰/۴ درصد بود (۱۰). در بررسی حاضر نمونه‌های مدفوع بدون اسهال گوساله‌ها انگلی نداشتند و در گوساله‌های مبتلا به اسهال زیر یک ماه به ویژه در دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد.

References

1- Azizi H R, Pour Jafar M, Dabaghzadeh B, Rajabi H. Study on prevalence rate of Cryptosporidium parvum in calves with under one year age group old in Shahrekord. Iranian Vet. J.2007; 17: 96-99.

2- Casemore D.P, *et al*. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J. Clinical pathology.1985; 38: 1337-1341.

3- Fayer R. Cryptosporidium and Cryptosporidium. CRC press.1997; 64,111-128.

4- Fotouhi Ardakani R, Fasihi Harandi M, Solayman Banani S, Kamyabi H, Atapour M, *et al*. Epidemiology of Cryptosporidium infection of cattle in Kerman/Iran and molecular genotyping of some isolates. J. Kerman Univ. Med. Sci.2008; 15: 313-320.

5- Lotfollahzadeh S, Ziaei Daroonkolai N, Zahraei Salehi T, Poorbakhsh S A, Mokhber Dezfouli M.R, Afshari Gh R. A study on the presence of Escherichia coli, coccidia and cryptosporidium in stool samples of under one month age diarrheic calves in Ghaemshahr and Babol and antibiotic

sensitivity of isolates. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.2004; 59: 131-135.

6- Maleki Sh, Nayebzadeh H. A survey of prevalence of cryptosporidiosis among diarrheic and Healty cattle and calves in Khoram Abad, Iran. J. Vet. Res.2008; 62: 423-426.

7- Mohebali M, Nateghpour M, Korsandinia A. A survey on prevalence rate of calves cryptosporidium infection in Islam-Shahr district, Tehran province and its health importance in human. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.1999; 54: 59-62.

8- Mokhber Dezfouli M R, Meshgi B. Epidemiological study of cryptosporidial infestation of man and animals. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.2002; 57: 87-91.

9- Mokhber Dezfouli M R, Meshgi B, Maleki S H, Nayebzadeh H. A survey of prevalence of cryptosporidiosis among diarrheic and Healty cattle and calves in Khoram Abad, Iran. J. Vet. Res.2008; 62: 423-426.

10- Nour Mohammadzadeh F, Davoudi Y, Jamali R, Norouzian I. Epidemiological study of Cryptosporidium in newborn cattle in eastern Azbayjan Province. Quarterly J. of Vet Research 65-3. 2010; 247-254[In Persian].

11- Ranjbar-Bahadori S H, Aliari M. Risk factors for cryptosporidial diarrhea in calves. J. Vet. Res.2011; 67: 205-209.

12- Rasstegar Moghadam D, Azimi M. Isolation and purification of oocyses and sporozoites of Cryptosporidium using pointed sucrose gradiant and percoll gradiant methods. Journal of Basic Medical Sciences. Vol. 8, No.1, 2005;18-24[In Persian].

13- Razawi S M, Oryan A, Bahrami S, Mohammadalipour A. Gowhari M. Prevalence of Cryptosporidium infection in camels (Camelus dromedarius) in a slaughterhouse in Iran. Trop. Biomed.2009; 26: 267-73.

14- Rezazadeh, F, Zahraei Salehi T, Mokhber Dezfouli M R, Rabani M, Morshedi A, Khaki Z, Nabian S, Rahbari S, Bahonar A. Clinical, biochemical and microbiological findings of calves diarrhea in a dairy herd in suburbs of Tehran. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.2004; 59: 301-307.

15- Ronald F. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, 1st. ed. Nourbakhsh publication conter. 2001; 34-40[In Persian].

16- Taghipour T, Bghebanzadeh A, Rasouli A. Cryptosporidiosis a Universal Disease in human and animal. Islamic society of students at Vet. College of Tehran University press. 1989; 35-38 [In Persian].

17- E.E. TyzzerA sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 5 (1907), pp. 12-13.

Isolation and identification of Cryptosporidium spp. in diarrhetic calves in Alborz province

Karimi, Gh.R.[1*]; Paykari, H.[1]; Rivaz, Sh.[1]; Nasiri, V.[1]; Abdigoudarzi, M.[1] Ranjbar,M.M.[1]

1- Razi vaccine and serum research institutes, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Receive: September 29, 2019; Revise: November 10, 2019; Accept: January 22, 2020

Summary

Crytosporidiosis is a parasitic disease caused by the cryptosporidium protozoan in the vertebrate animal. This parasite in livestock special ruminants causes diarrhea syndromes in infants. The main sources of the parasite spread are infectious feces and the host mouth. The purpose of this project was to isolate and identify the cryptosporidium species by morphological indices in diarrheic calves in order to detect and control the disease. According to the method of Casemore *et al.*, purification of oocysts from feces using flotation technique was carried out. Staining with modified Zeil nelson method (Henrisksen method) and identification with diagnostic keys was done. *Cryptosporidium parvum* alone causes clinical disease in young calves; the latent infection time is 3 to 6 days. *Cryptosporidium muris*, *C. Andersoni* and *C. ryanae* have been reported in weaned calves, and *C. Andersoni* has been also observed in adult cattle. The total of 150 cattle fecal samples were randomly collected from Alborz province. 60 out of 150 (40%) calf diarrhea positive samples were detected by modified Zeil nelson method staining. In all fecal samples from calves without diarrhea, the oocyst was not observed. In calves below one month, especially in the first two weeks, 40% of the diarrheic samples were infected. This protozoon is a zoonotic and opportunistic parasite and, in Iran, it has been reported from various species like poultry, cattle, sheep and goats and it may cause significant economic losses which need much more attentions.

Keywords: *Isolation, Identification, Cryptosporidium spp., Calf Diarrhea*

بررسی اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عطرمایه‌های نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

فردین‌علی ملایری[۱]، زهرا یزدان‌پور[۲]، حسین بندانی[۳]، بهمن فاضلی‌نسب[۴]، سعیده سعیدی*[۵]

۱- دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.
۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.
۳- دانشجوی دکتری علوم دام، دانشگاه ملی زابل، زابل، ایران.
۴- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۵- پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۸ آبان ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۹ بهمن ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است. جدایه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اسینتو باکتر بومانی* از بیمارستان‌های شهرستان زابل جداسازی شد و عطرمایه گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی با دستگاه کلونجر به دست آمد. حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهارکنندگی با روش میکرودایلوشن تعیین گردید. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱،۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. نتایج حاصل از مطالعه ما بر روی آویشن شیرازی نشان داد که کمترین غلظت عطرمایه آویشن در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱/۲۵ و ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. نتایج نشان داد که عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی مهارکننده رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و اسینتو باکتر بوده است.

واژگان کلیدی: عطرمایه، *استافیلوکوکوس اورئوس* ، *اسینتو باکتر بومانی*، حداقل غلظت مهارکنندگی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: s.saeedi12@yahoo.com

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع دارویی در جهان هستند (۱). امروزه به دلیل تبیین عوارض جانبی داروهای شیمیایی، مصرف داروهای گیاهی در حال افزایش است.

نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) حد واسط دو گونه قدیمی *Mentha spicata* و *Mentha aquatic* است و به طور عمده با نام Peppermint شناخته می‌شود. نعناع فلفلی گیاهی علفی و چندساله است. در طب سنتی از گیاه خشک شده نعناع فلفلی و اسانس (عطرمایه) آن برای کاهش اشتها، درمان سرماخوردگی، تهوع، سردرد، سرفه، تب، آماس روده بزرگ (۲) و به عنوان ضد اسپاسم، ضد نفخ، و همچنین در درمان التهاب ریه‌ها (۳-۵) استفاده می‌شود. این گیاه به عنوان سبزی، ادویه و گیاه دارویی کشت و استفاده می‌شود. از برگ‌های خشک‌شده این گیاه برای تهیه دم‌کرده و جوشانده‌های گیاهی، از اندام‌های رویشی تازه برای استفاده به‌عنوان سبزی و از عطرمایه آن به‌عنوان ماده افزودنی در تولید آدامس‌های نعنایی، صنایع بهداشتی مانند خمیردندان و دهان‌شویه و در محصولات مختلف صنایع داروسازی و رایحه‌درمانی استفاده می‌شود. نعناع فلفلی یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی است که مقدار مصرف سالانه عطرمایه آن در جهان به حدود ۷۰۰۰ تن می‌رسد. مقدار عطرمایه این گیاه بسته به شرایط کشت بین ۱ تا ۳ درصد متغیر است. عطرمایه نعناع فلفلی خاصیت ضد باکتری و قارچی (۶، ۷)، آنتی‌اکسیدانی (۸)، ضد تومور و ضد حساسیتی (۹) دارد. از مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده این گیاه می‌توان به منتول، منتون و متیل‌استات اشاره کرد (۱۰).

آویشن شیرازی گیاهی از خانواده لامیاسیه (معادل فارسی یا لاتین نویس شود) است. مؤثرترین ماده ضد میکروب آن تیمول و کارواکرول است. این گیاه در ایران، پاکستان، هندوستان و افغانستان رشد می‌کند .برگ‌های خشک این گیاه در صنایع غذایی به‌عنوان نگهدارنده و همچنین به دلیل طعم مطلوب آن، برای مزه، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱، ۱۲).

بیوفیلم‌های باکتریایی، تجمعات پیچیده باکتری‌ها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می‌چسبند (۱۳). بیوفیلم‌ها با عواملی همچون ضد عفونی‌کننده‌ها و دارو از بین نمی‌روند و بر روی سطح باقی می‌مانند و سبب آلودگی و انتقال بیماری‌های عفونی می‌گردند (۱۴). بیوفیلم‌های میکروبی در ۶۵ درصد عفونت‌های انسان مانند بیماری‌های ریشه دندان، پوسیدگی دندان، عفونت‌های شنت مغزی، مفصل مصنوعی، سوندهای وریدی، زخم‌های ناشی از سوختگی، سوندهای ادراری و تنفسی دیده می‌شوند (۱۵).

با توجه به فراوانی نمونه‌های باکتریایی مشاهده شده در ادرار بیماران مراجعه‌کننده، اهمیت عوامل بیماری‌زا و همچنین حجم و هزینه پژوهش، سعی شد تا در این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *اسینتوباکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

۱- جداسازی و تأیید آزمایشگاهی اسینتو باکتر بومانی و استافیلوکوکوس اورئوس

۱-۱- اسینتو باکتر بومانی: از ادرار ۵۰ بیمار (۲۳ زن (در محدوده سنی ۲۲ تا ۶۰ سال) و ۲۷ مرد (۲۵ تا ۶۵ سال))، تعداد ۱۰ جدایه اسینتو باکتر بومانی با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جداسازی و بر روی ژلوز مک کانکی و ژلوز خون‌دار تلقیح گردید و پلیت‌های کشت داده‌شده در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. جدایه‌های باکتریایی جداشده به وسیله

تنوعی از واکنش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد (اکسیداز، کاتالاز، حرکت باکتری، تست‌های قندی از قبیل: تخمیر لاکتوز، سوکروز، گلوکز) و همچنین تست‌های استاندارد از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسید فاست، مورفولوژی و رنگ کلنی قابل شناسایی هستند (۱۶) که در تحقیق حاضر بعد از مشاهده رشد کلونی، از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده کوکسی‌ها و دیپلوکوکسی‌های گرم منفی و همچنین آزمون اکسیداز جهت شناسایی استفاده شد. در مرحله بعد، با استفاده از آزمودن‌های بیوشیمیایی، کشت بر روی مکانکی آگار و انکوباسیون در حرارت‌های ۳۷ درجه و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، آزمودن سیترات، آزمودن حرکت و کشت بر روی محیط OF (تخمیر و اکسیداسیون) حاوی قند گلوکز، تشخیص قطعی باکتری‌ها صورت گرفت.

۲-۱- *استافیلوکوکوس اورئوس:* ۱۰جدایه مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده در این تحقیق از ادرار بیماران بستری شده در بخش عفونی بیمارستان امیرالمومنین شهرستان زابل جداسازی شده و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی مانیتول سالت آگار و ژلوز خون‌دار کشت و خالص‌سازی شدند و با استفاده از آزمودن‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کواگولاز، DNase، رشد بر روی محیط کشت افتراقی مانیتول سالت آگار و همچنین تشکیل آگلوتیناسیون بر روی لام شیشه‌ای به‌عنوان گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند (۱۷).

۲- *تهیه عطرمایه گیاهان آویشن شیرازی و نعناع فلفلی:* گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی از مزارع تحقیقاتی مجتمع بقیه ا... الاعظم دانشگاه زابل به دست آمد. این گیاهان در سایه خشک و آسیاب شدند. برای تهیه عطرمایه، ۵۰ گرم پودر خشک از هر دو گیاه در دستگاه کلونجر (شرکت گلدیس، ایران) به مدت ۴-۳ ساعت قرار داده شدند و عطرمایه به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید.

۳- *تعیین حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک:* تعیین حساسیت جدایه‌ها با روش آگار دیسک دیفیوژن استاندارد (Kirby-Bauer) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مانند جنتامایسین(GM)(۱۰ µg)، آزیترومایسین(AZM)(۱۵ µg)، اگزاسیلین(OX)(۱۰ µg)، سفازولین(CZ)(۳۰µg) و آمپی‌سیلین (AM) (۲۵ µg)، ونکومایسین (V) (۲۵ µg)، آموکسی‌سیلین کلاوید اسید (AMC)(۱۵ µg) (پادتن طب- ایران) انجام گرفت (۱۸). بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری گردید و نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس، حد واسط و مقاوم ثبت شد (۱۹).

۴- *تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر روی اسینتو باکتر بومانی:* تعیین حساسیت جدایه‌های باکتری نسبت به عصاره گیاهان با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک انجام شد. در محیط کشت جامد تعداد شش چاهک ایجاد شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره‌های گیاهان اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه کرده و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت خارج کرده مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^7 واحد در میلی‌لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به

مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده باشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده در نظر گرفته شد. برای اطمینان از چاهک‌های شفاف ۱۰ میکرولیتر برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشنده نشان داده شد.

۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس: برای تعیین حداقل غلظت مهاری عصاره گیاهان ، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث (ساخت شرکت Merk- آلمان) به هر چاهک پلیت میکروتیتر اضافه شد (۲۰، ۲۱). در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۲۰mg/ml عصاره اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد به همین ترتیب ساخت رقت‌های دوبرابری در سایر چاهک‌ها ادامه یافت. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی($cfu=1/5.10^8$ در هر میلی‌لیتر، نیم مک فارلند) به چاهک‌ها اضافه شد. به چاهک شاهد منفی DMSO اضافه شد (بدون عصاره) سپس پلیت میکروتیتر برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. حداقل غلظت مهاری، به عنوان پایین‌ترین غلظتی که برای توقف رشد باکتری‌ها در انتهای ۲۲ ساعت گرمخانه گذاری نیاز است، تعریف شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC=Minimum Bactericidal Concentration) ۱۰ میکرولیتر از محتوای چاهک‌ها در انتهای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، روی محیط نوترینت آگار (ساخت شرکت Merk- آلمان) کشت ثانویه داده شد و پلیت‌ها به منظور بررسی رشد باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند، پایین‌ترین غلظت عصاره که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمام آزمایش‌های ضد میکروبی حداقل ۳ مرتبه تکرار شدند.

۶- روش میکروتیتر پلیت برای تعیین کمیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها: برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های جداشده یک کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر ایزوله در تریپتیکاز سوی براث (TSB(Tryptic Soy Broth)(شرکت مرک، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط TSB استریل اضافه شد و کدورت آن از طریق قرائت جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ nm تنظیم گردید. این عمل با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. کدورت این سوسپانسیون معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند هست و حاوی بیش از ۱۰۸ باکتری در هر میلی‌لیتر است. سپس از این سوسپانسیون ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک در میکرو پلیت انتقال داده شد. هر هشت چاهک در میکرو پلیت با یک سوسپانسیون باکتریایی مشخص پر شدند که در این صورت در هر چاهک نزدیک به ۲۵×۱۰۶ CFU/well باکتری موجود هست. چاهک‌های شاهد فقط حاوی TSB استریل می‌باشند. جنس میکرو پلیت‌های ۹۶ چاهکی، پلی استرن و ظرفیت هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر بود و ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاه با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز استفاده شده است. سپس سطح پلیت‌ها پوشیده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محلول غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهک‌ها خارج شد و هر چاهک سه

مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد.

همچنین پلیت‌ها به‌منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک یا غیر متصل در حین شستن به شدت تکان داده می‌شوند. سپس باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه محتویات چاهک‌ها تخلیه شد. پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال (بلوره) ویوله ۲درصد که برای رنگ‌آمیزی گرم مورد استفاده قرار می‌گیرد رنگ‌آمیزی شدند. بعد از شستن رنگ‌های اضافی پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه قرار می‌گیرد تا خشک شوند. سپس سنجش کمی تولید بیوفیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳درصد به هر چاهک صورت گرفت. سپس جذب نوری رنگ بلوره ویوله موجود در حلال رنگ‌بر در طول موج ۴۹۲ nm به وسیله دستگاه الایزا خوانده شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *استرپتوکوکوس بومانی* برابر با ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که ۴ جدایه باکتری در این غلظت مهار شده‌اند و کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه آویشن شیرازی ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که ۳ جدایه در این غلظت مهار شده است و یک جدایه باکتری در تمام غلظت‌های عطرمایه رشد کرده است (جدول ۱).

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *استرپتوکوکوس بومانی*

جدایه باکتری	MIC-MBC نعناع فلفلی	MIC-MBC آویشن شیرازی	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی
۱	۱/۲۵-۲/۵	۱/۲۵-۲/۵	-
۲	۲/۵ -۵	۱/۲۵-۲/۵	OX
۳	۲/۵ -۵	رشد	OX-Am
۴	۲/۵ -۵	۲/۵ -۵	OX
۵	۲/۵ -۵	۲/۵ -۵	-
۶	۲/۵ -۵	۲/۵ -۵	OX- Am-Amc
۷	۲/۵ -۵	۱/۲۵-۲/۵	OX
۸	۱/۲۵-۲/۵	۲/۵ -۵	-
۹	۱/۲۵-۲/۵	۲/۵ -۵	OX
۱۰	۱/۲۵-۲/۵	۲/۵ -۵	OX-Am

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*

جدایه باکتری	MIC-MBC نعناع فلفلی	MIC-MBC آویشن شیرازی	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی
۱	۱/۲۵-۲/۵	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX-V
۲	۲/۵ -۵	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX
۳	۲/۵ -۵	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۴	۵ -۱۰	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۵	۵ -۱۰	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۶	۵ -۱۰	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX
۷	۱/۲۵-۲/۵	۰/۳۱ -۰/۶۲	OX
۸	رشد	۱/۲۵-۲/۵	OX
۹	رشد	۰/۶۲-۱/۲۵	OX
۱۰	رشد	۱/۲۵-۲/۵	OX

جدول ۳- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتو باکتر بومانی*

جدایه باکتری	AZM	CZ	GM	AM	AMC	OX
حساس	۱۰ (۱۰۰)	۱۰ (۱۰۰)	۱۰ (۱۰۰)	۴(۴۰)	۸ (۸۰)	۳ (۳۰)
نیمه حساس	۰(۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۴ (۴۰)	۱(۱۰)	۰(۰)
مقاوم	۰ (۰)	۰ (۰)	۰(۰)	۲ (۲۰)	۱(۱۰)	۷ (۷۰)

جنتامایسین(GM)، آزیترومایسین(AZM)، اگزاسیلین(OX)، سفازولین(CZ)، آمپی‌سیلین (AM)، ونکومایسین (V)، آموکسی سیلین کلاوید اسید (AMC)

جدول ۴- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*

جدایه باکتری	AZM	CZ	GM	AM	AMC	OX	V
حساس	۸ (۸۰)	۸(۸۰)	۱۰ (۱۰۰)	۸ (۸۰)	۹(۹۰)	۱۰ (۱۰۰)	۸ (۸۰)
نیمه حساس	۲ (۲۰)	۲(۲۰)	۰ (۰)	۲(۲۰)	۱ (۱۰)	۰ (۰)	۱(۱۰)
مقاوم	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱(۱۰)

جنتامایسین(GM)، آزیترومایسین(AZM)، اگزاسیلین(OX)، سفازولین(CZ)، آمپی‌سیلین (AM)، ونکومایسین (V)، آموکسی سیلین کلاوید اسید (AMC)

کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که دو جدایه در این غلظت مهار شده و ۴ جدایه در تمام غلظت‌های عطرمایه رشد کرده‌اند، بیشترین غلظت کشندگی برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه آویشن ۰,۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که ۴ جدایه در این غلظت مهار شده‌اند درحالی‌که بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۱,۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که ۲ جدایه در این غلظت مهار شده است (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتو باکتر بومانی* نشان داد که یک جدایه به همه آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بوده است درحالی‌که تنها جدایه شماره ۶ به ۳ آنتی‌بیوتیک (OX-AMC-AM) مقاوم بوده است (جدول ۳).

نتایج الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که همه *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین مقاوم بوده و تنها جدایه ۱ که هم به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین و هم ونکومایسین مقاوم بوده است (جدول ۴).

نتایج مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت عطرمایه میزان تشکیل بیوفیلم کاهش پیدا می‌کند، همچنین عطرمایه آویشن شیرازی مهارکنندگی خوبی در برابر بیوفیلم *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داد.

بحث

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.

در مطالعه امیری و جمعه‌پور که فعالیت ضد میکروبی نعناع فلفلی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی کرده بودند نتایج نشان داده که حداقل غلظت مهارکنندگی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* برابر با ۳/۲۵، ۳/۲۵، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۲). در مطالعه جبلی جوان و همکاران حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در برابر باکتری *اشریشیاکلی* ۱۴ و ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ، و در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱۰/۵ و ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۳) و همچنین در مطالعه الوندی و

همکاران اثر ممانعت‌کننده عطرمایه نعناع فلفلی را بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب ۳۰۰-۱۵۰ و ۲۵۰ پی‌پی‌ام بوده است (۲۴) که نتیجه تحقیق حاضر در مقایسه با تحقیقات ارائه شده نشان داد که عطرمایه نعناع فلفلی قدرت بیشتری در مهار میکروب‌ها داشته است که شاید به علت وجود ماده فیتوشیمیایی منتول موجود در گیاه نعناع فلفلی که قدرت ضد میکروبی بیشتری داشته می‌باشد (۱۲).

در مطالعه محبوبی و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عطرمایه آویشن شیرازی و ترکیبات اصلی آن را در برابر *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی کردند نتایج نشان داد که ترکیبات اصلی شامل کارواکرول بوده است که کارواکرول بیشترین اثر مهارکنندگی بر فعالیت میکروب‌ها داشته اما فعالیت ضعیفی در برابر بیوفیلم *سودوموناس* از خود نشان داده است (۲۵). در مطالعه دینی و همکاران حداقل غلظت مهارکنندگی عطرمایه برگ گیاه آویشن در برابر باکتری‌های *B.cereus*، *S.aureus*، *E.coli* و *P.aeroginosa* برابر با ۰/۵۲±۲/۶، ۰/۵۲±۲/۰۸، ۰/۱۳±۰/۶۵ و ۰±۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۶). همچنین در مطالعه افتخاری و همکاران که فعالیت ضد میکروبی و آنالیز فیتوشیمیایی عطرمایه آویشن شیرازی بررسی کرده بودند به این نتیجه رسیدند که MIC و MBC در محدوده ۲/۶۴ و ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۷). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که توانایی مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر *اسینتو باکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با عطرمایه آویشن شیرازی بوده است.

در مطالعه‌ای، اثرات ضد قارچی عطرمایه نعناع فلفلی بررسی و نتایج نشان داده که عطرمایه نعناع فلفلی در غلظت ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ میلی‌متر قطر هاله مهاری ۲۶، ۲۱، ۱۶، ۱۲ و ۸ میلی‌متر ایجاد کرده (۲۸) و در مطالعه پرامیلا و همکاران که اثر عصاره متانولی برگ نعناع فلفلی بررسی کردند نتایج نشان داده که قطر هاله مهاری در برابر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *اسینتو باکتر* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۰/۲۹±۱/۳۷، ۰/۰۵±۰/۸۳۳ و ۰/۱±۱/۱۰ میلی‌متر بوده است و قطر هاله مهاری در برابر قارچ‌های *کاندیدا آلبکانس* و *کاندیدا گلابراتا* برابر با ۰/۰۵۸±۱/۶۳ و ۰/۰۵۸±۰/۵۶۷ میلی‌متر بوده است (۲۹).

بهنام و همکاران فعالیت اثر مثبت ضد قارچی عطرمایه نعناع فلفلی را در برابر قارچ‌های *Rhizopus stolonifer, Botrytis cinerea and Aspergillus niger* اثبات کردند (۷).

در مطالعه آیدا و همکاران (۳۰) که آنالیز فیتوشیمیایی و فعالیت ضد میکروبی عطرمایه آویشن شیرازی در خراسان بررسی کرده بودند به این نتیجه رسیدند که حداقل غلظت مهاری در برابر *باسیلوس سرئوس* برابر با ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است و حداقل غلظت مهاری در برابر مخمر *ساکارومیس سرویسیا* برابر با ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۳۰). درصورتی‌که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی در تحقیق حاضر بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱/۲۵ و ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.

همچنین در مطالعه محبوبی و کاظم‌پور حداقل غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر باکتری‌های *S.aureus*، *S.epidermidis*، *S.saprophyticus*، *E.faecalis*، *E.faecium*، *S.pyogenes*، *S.pneumoniae* و *S.agalactica* برابر با ۱، ۱، ۱، ۲، ۲، ۱، ۱ و ۱ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر بوده است (۳۱) که با تحقیق حاضر مشابهت داشت.

در مطالعه ایسکان و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عطرمایه نعناع فلفلی بررسی کردند نتایج

نشـــان داده عطرمایـــه نعنـــاع فلفلـــی مهارکننـــده ۲۱ پـاتوژن انسـانی و پـاتوژن هـای گیـاهی بـوده و در آنـالیز فیتوشـیمیایی و همچنـین بررسـی‌های ممکنـه بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه منتـول موجـود در گیـاه نعنـاع فلفلـــی دارای فعالیـــت ضـــد میکروبـــی اســـت (۳۲) همچنـین در مطالعـه میمیکـا دوکـیچ و همکـاران کـه فعالیـت ضـد میکروبـی عطرمایـه نعنـاع فلفلـی بـر *اشریشـیاکلی*، *میکروکوکـوس فـاووس* و *شـیگلا سـونیا* بـه اثبـات رسـیده اسـت (۳۳). در مطالعـه سـحرخیز و همکـاران حـداقل غلظـت مهارکننـدگی عطرمایـه نعنـاع فلفلـــی در برابـــر گونـــه‌های آســـپرژیلوس شـــامل *A.flavus* *A.fumigatus* *A.oryza* *A.clavatus* بـه ترتیـب برابـر بـا ۴، ۰/۵، ۲، ۲ و ۰/۵ میکـرو لیتـر بـر میلی‌لیتـر بـوده اسـت (۳۴). در مطالعـه کـاریچری و اتنـونی حـداقل غلظـت مهارکننـدگی عطرمایـه نعنـاع فلفلـی در برابـر ۳۰ گونـه *A. actinomycetemcomitans* بررسـی و نتـایج نشـان داده کـه غلظت‌هـای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکـرو لیتـر بـر میلی‌لیتـر مهارکننـده باکتری‌هـا بـوده اسـت (۳۵). درصـورتی‌که حـداقل غلظـت مهارکننـدگی و حـداقل غلظـت کشـندگی عطرمایـه نعنـاع فلفلـی و آویشـن شـیرازی در تحقیـق حاضـر بـه ترتیـب ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌گـرم بـر میلی‌لیتـر و ۱/۲۵ و ۰/۳۱ میلی‌گـرم بـر میلی‌لیتـر بـر روی *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* بوده است.

نتیجه‌گیری

بـا توجـه بـه نتـایج ایـن تحقیـق می‌تـوان از عصـاره آویشـن شـیرازی و نعنـاع فلفلـی در برنامـه غـذایی گنجانـده تـا ضـمن درمـان بیماری‌هـای عفـونی از اثـرات سوء استفاده از داروهای شیمیایی نیز کاسته شود.

References

1. Zarayneh S, Sepahi AA, Jonoobi M, Rasouli H. Comparative antibacterial effects of cellulose nanofiber, chitosan nanofiber, chitosan/cellulose combination and chitosan alone against bacterial contamination of Iranian banknotes. Int J Biol Macromol 2018; (118): 1045-1054. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.160

2. Galeotti N, Mannelli LDC, Mazzanti G, *et al.* Menthol: a natural analgesic compound. Neurosci Lett 2002;322(3):145-148. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02527-7

3. Fazeli-Nasab B, Mirzaei N. Evaluation of total phenol and flavonoid content in a wide range of local and imported plants. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 2018;26(2):141-154. http://doi.org/10.29252/sjimu.26.2.141 [In Persian].

4. 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 [In Persian].

5. Keikhaie KR, Fazeli-Nasab B, Jahantigh HR, Hassanshahian M. Antibacterial Activity of Ethyl Acetate and Methanol Extracts of Securigera securidaca, Withania sominefra, Rosmarinus officinalis and Aloe vera Plants against Important Human Pathogens. Journal of Medical Bacteriology 2018; 7(1-2): 13-21.

6. Eteghad S, Mirzaei H, Pour S, Kahnamui S. Inhibitory effects of endemic Thymus vulgaris and Mentha piperita essential oils on Escherichia coli O157: H7. Research Journal of Biological Sciences 2009; 4(3): 340-344. Record Number : 20093100926

7. Behnam S, Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Tehrani AS. Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogens. Commun Agric Appl Biol Sci 2006; 71(3 Pt B): 1321-1326. PMID:17390896

8. Yang S-A, Jeon S-K, Lee E-J, *et al.* Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. Nat Prod Res 2010; 24(2): 140-151. https://doi.org/10.1080/14786410802496598

9. Rasouli H, Farzaei MH, Mansouri K, *et al.* Plant cell cancer: may natural phenolic compounds prevent onset and development of plant cell malignancy? A literature review. Molecules 2016; 21(9): 1104. https://doi.org/10.3390/molecules21091104

10. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. J Ethnopharmacol 2008; 119(2): 325-327.

https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.023

11. Fazeli-Nasab B, Rossello JA, Mokhtarpour A. Effect of TiO2 nanoparticles in thyme under reduced irrigation conditions. Potravinárstvo: Slovak Journal of Food Sciences 2018; 12(1): 622-627. https://doi.org/10.5219/958

12. Fazeli-nasab B, Moshtaghi N, Forouzandeh M. Effect of Solvent Extraction on Phenol, Flavonoids and Antioxidant Activity of some Iranian Native Herbs. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 2019; 27(3): 14-26. https:doi.org/10.29252/sjimu.27.3.14 [In Persian].

13. Ghotaslou R, Salahi B. Effects of oxygen on in-vitro biofilm formation and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosae. Pharmaceutical Sciences 2013; 19(3): 96-99.

14. Parsek MR, Greenberg E. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in microbiology 2005; 13(1):27-33. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007

15. Adal KA, Farr BM. Central venous catheter-related infections: a review. Nutrition 1996; 12(3): 208-213. https://doi.org/10.1016/S0899-9007(96)91126-0

16. Shafiee P, SHOJA AS, Charkhabi AH. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic mixed bacterial culture isolated from hydrocarbon polluted soils. Iranian Journal Of Chemistry And Chemical Engineering(IJCCE) 2006; 25(3): 73-78 [In Persian].

17. Prashanth K, Badrinath S. Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status. Journal of medical microbiology 2000; 49(9): 773-778. https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-9-773

18. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology 1966; 45(4): 493-496.

19. Wikler MA. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI (NCCLS) 2006; 26(M7-A7). NII Article ID (NAID): 20001404762

20. Owuama CI. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. African Journal of Microbiology Research 2017; 11(23): 977-980. https:doi.org/10.5897/AJMR2017.8545

21. Lambert R, Pearson J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. J Appl Microbiol 2000; 88(5): 784-790. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x

22. Amiri A, Jomehpour N. Evaluation the Effect of Anti bacterial of *Ferula assa-foetida* L, *Carum copticum*, *Mentha piperita* L Hydroalcoholic Extract on Standard Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157H7 and *Salmonella typhimurium*. journal of ilam university of medical sciences 2016; 24(2): 72-79. https:doi.org/10.18869/acadpub.sjimu.24.2.72 [In Persian].

23. Jebelli Javan A, Ahmadi Hamedani M, Bayani M, *et al.* Antioxidant and antimicrobial effects of different mints, the most widely used in Caspian Sea areas, Iran. Journal of Veterinary Laboratory Research 2014; 6(2): 93-102. 10.22075/jvlr.2017.1265

24. Kazem Alvandi R, Sharifan A, Aghazadeh Meshghi M. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. Journal of Comparative Pathobiology 2010; 7(4): 355-364.

25. Mahboubi M, Heidarytabar R, Mahdizadeh E. Antibacterial activity of *Zataria multiflora* essential oil and its main components against *Pseudomonas aeruginosa*. Herba Polonica 2017; 63(3): 18-24. https:doi.org/10.1515/hepo-2017-0015

26. Dini S, Dadkhah A, Fatemi F. Biological Properties of Iranian *Zataria Multiflora* Essential Oils: A Comparative Approach. Electronic Journal of Biology 2015; 11(3): 57-62.

27. Eftekhar F, Zamani S, Yousefzadi M, *et al.* Antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against extended spectrum β lactamase produced by urinary isolates of *Klebsiella pneumonia*. JJM 2011; 4(Supplement1): S43-S49.

28. Moghtader M. In vitro antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. African Journal of Plant Science 2013; 7(11): 521-527. https:doi.org/10.5897/AJPS2013.1027

29. Pramila D, Xavier R, Marimuthu K, *et al.* Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (Mentha piperita: Lamiaceae). Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(2): 331-335. https:doi.org/10.5897/JMPR11.1232

30. Aida A, Ali MS, Behrooz MV. Chemical composition and antimicrobial effect of the essential oil of *Zataria multiflora* Boiss endemic in Khorasan-Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2015; 5(3): 181-185. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60649-6

31. Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) Essential oil. Songklanakarin J. Sci. Technol 2014; 36(1): 83-87.

32. İşcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu Mn, *et al.* Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of agricultural and food chemistry 2002; 50(14): 3943-3946. https://doi.org/10.1021/jf011476k

33. Mimica-Dukić N, Božin B, Soković M, *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. Planta Med 2003; 69(05): 413-419. https:doi.org/10.1055/s-2003-39704

34. Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, *et al.* Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. ISRN pharmaceutics 2012; 2012(Article ID 718645, 718646 Pages). https:doi.org/10.5402/2012/718645

35. Karicheri R, Antony B. Antibacterial and antibiofilm activities of peppermint (*mentha piperita* linn) and menthol mint (*mentha arvensis* linn) essential oils on aggregatibacter actinomycetemcomitans isolated from orodental infections. European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research 2016; 3(7): 577-580.

Antimicrobial and anti-biofilm effects of *Thyme* essential oils and Peppermint on *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* resistant to different antibiotics

Fardin Ali Malayer[i1], Zahra Yazdanpour[2], Hosein Bandani[3], Bahman Fazeli Nasab[4]. Saeedeh Saeedi[5]*

1- Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.
2- MSc in Microbiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.
3- PhD Student of Animal Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
5- Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: October 30, 2019; Revise: February 8, 2020; Accept: March 10, 2020

Summary

The aim of this study was to investigate the antimicrobial and anti-biofilm effects of peppermint and Thyme on the antibiotic-resistant Acinetobacter baumannii and Staphylococcus aureus. Staphylococcus aureus and Acinetobacter baumannii strains were isolated from hospitals in Zabol city. The essential oil of Shirazi thyme and peppermint was obtained by Clevenger apparatus. Minimum lethal concentration and minimum inhibitory concentration were determined by microdilution method. Results showed that the lowest inhibitory concentration of peppermint essential oil against Acinetobacter baumannii and Staphylococcus aureus was 1.25 mg/ml. The results of our study on Thyme showed that the lowest concentration of Thyme essential oil against Acinetobacter baumannii and Staphylococcus aureus was 1.25 and 0.31 mg / ml, respectively. The results indicated that peppermint essential oil and Thymus vulgaris inhibited the growth of Staphylococcus aureus and Acinetobacter.

Keywords: *Essential oil, Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Minimum Inhibitory Concentration*

مروری بر عوامل ویروسی مولد بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی در ایران

روزبه فلاحی*

دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ بهمن ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۰ اسفند ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۵ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

عفونت‌های ویروسی مخاطی با اهمیت‌ترین و مشکل‌سازترین بیماری‌ها را ایجاد می‌کنند. هر ساله گزارشات متعددی از وقوع بیماری‌های مخاطی اعلام می‌گردد که خسارات هنگفتی به صنعت دامپروری کشور وارد می‌آورند. از مهم‌ترین بیماری‌های مخاطی ویروسی شبه طاعون گاوی، می‌توان به اسهال ویروسی و بیماری مخاطی گاوها، بیماری تورم عفونی بینی و نای گاو و همچنین تب نزله‌ای بدخیم اشاره کرد. بررسی مطالعه کانون‌های گزارش شده این بیماری‌ها طی دو دهه اخیر نشانگر این موضوع است که همه ساله در سطح واحدهای اپیدمیولوژیک خصوصاً دامداری‌های صنعتی در گردش بوده و خسارات اقتصادی به این واحدها تحمیل نموده‌اند. متأسفانه برنامه مطالعاتی جامعی در خصوص سوش‌های مولد بیماری‌های فوق در کشور به اجرا گذاشته نشده و مطالعات انجام‌یافته صرفاً در حد بررسی ارزیابی‌های سرمی بوده است. در این تحقیق ضمن معرفی و وضعیت بیماری‌های فوق‌الذکر در ایران و سایر کشورها، به مسایل و محدودیت‌ها برای کنترل آنها پرداخته و پس از تعیین نقاط قوت، ضعف، فرصت‌ها و تهدیدها، موارد یاد شده با استفاده از روش SWOT مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و استراتژی‌های مربوط به کنترل بیماری‌ها معرفی شده است.

واژگان کلیدی: *عوامل ویروسی، بیماری‌های مخاطی، شبه طاعون گاوی، ایران*

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

مقدمه

کشور ما به دلیل همسایگی با کشورهای آلوده به طاعون گاوی تاکنون چندین اپیدمی این بیماری را تجربه نموده است و هر بار با اقدامات سریع نسبت به کنترل آلودگی اقدام گردیده است و نهایتاً در سال ۱۳۸۷ با اعلام رسمی سازمان بهداشت جهانی دام (O.I.E)، ایران در لیست کشورهای عاری از طاعون گاوی قرار گرفت.گذشته از اپیدمی‌های طاعون گاوی گزارشات متعددی مبنی بر وقوع مواردی از بیماری‌های مخاطی وجود دارد که به دلیل نزدیکی علائم بالینی آنها با طاعون گاوی و اهمیت آن می‌بایست مورد بررسی قرار گیرند. بروز بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی می‌تواند در روند کنترل سایر بیماری‌های مخاطی از جمله طاعون گاوی مشکلاتی به وجود آورد (۱). عفونت‌های ویروسی مخاطی با اهمیت‌ترین و مشکل‌سازترین بیماری‌ها را در دامپزشکی تشکیل داده و بیشترین خسارت را به صنعت دامپروری کشور ما وارد می‌سازند. اکثر این بیماری‌ها در کشور ما غیر بومی بوده و در سال‌های نه‌چندان دور و به واسطه باز بودن مرزهای کشور و عدم کنترل دقیق از مرزهای ورودی و ورود غیر قانونی دام از کشورهای مجاور متأسفانه این بیماری‌ها در سطح کشور گسترش یافته و خسارات جبران ناپذیری را بر پیکره اقتصاد کشور وارد می‌کنند. اکثر این بیماری‌ها دارای علائم و نشانه‌های بالینی مشابه بوده و در اکثر موارد با یکدیگر اشتباه گرفته می‌شوند (۲، ۳). از مهم‌ترین بیماری‌های مخاطی ویروسی شبه طاعون گاوی، می‌توان به BVD-MD ، IBR و MCF اشاره کرد که به طور اختصار به آنها اشاره می‌گردد.

اسهال ویروسی و بیماری مخاطی گاوها (***Bovine Viral Diarrhea-Mocusal Disease***): عامل اسهال ویروسی و بیماری مخاطی گاوها جزء خانواده Flaviviridae و از جنس Pestivirus می‌باشد. این ویروس در تمامی نقاط جهان یافت شده و انتشار جهانی دارد (۴). ویروس RNA دار بوده و دارای پوشش لیپیدی می‌باشد بنابراین به حلال‌های چربی، حساس می‌باشد. ویروس BVD-MD دارای دو ژنوتیپ BVD-1 و BVD- 2 می‌باشد. این ویروس به شرایط محیطی بسیار حساس بوده و دام‌های دارای عفونت پایدار امکان بقاء و گسترش سریع آن را فراهم می‌کنند. در شرایط طبیعی گاو حساس‌ترین میزبان ویروس BVD-MD است ولی تقریباً اکثر نشخوارکنندگان اهلی و وحشی به آن آلوده شده و علائم بیماری را نشان می‌دهند. گاوها در هرسنی نسبت به ویروس BVD-MD حساس هستند ولی شکل حاد بیماری در گاوهای جوان ۸ ماهه تا ۲ ساله بروز می‌کند. گاوهای ماده در اواخر آبستنی ممکن است آلوده شوند ولی معمولاً علائم بیماری را نشان نمی دهند اما ویروس می‌تواند جنین آنها را آلوده کند.گوسفند بعد از گاو در میان دام‌های اهلی مهم‌ترین میزبان این ویروس است و در اثر آلودگی با این ویروس علائم بیماری مرزی را نشان می‌دهد و بعلاوه همانند گاو به صورت عفونت پایدار در آمده و ویروس را دائماً در محیط خود پخش می‌کند (۴، ۵). علائم بالینی اسهال ویروسی گاو شامل تب بالا، اسهال و ایجاد زخم در داخل دهان، گونه‌ها، لثه‌ها، سطوح مختلف زبان، لب‌ها و کام می‌باشد. اسهال آبکی بوده و ممکن است همراه با تکه‌های مخاط و خون باشد. ادرار خونی و کراتیت نیز اتفاق می‌افتد.آلودگی در هر مرحله از آبستنی می‌تواند منجر به سقط جنین گردد (۴، ۵).

بیماری تورم عفونی بینی و نای گاو (***Infectious Bovine Rhinotracheitis***): بیماری IBR از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های دستگاه تنفسی و تناسلی در گاوها است که خسارات ناشی از آن در صنعت دامپروری جهان بسیار

چشمگیر می‌باشد. عامل مولد این بیماری هرپس ویروس تیپ یک گاوی (BHV-1) متعلق به خانواده هرپس ویریده و دون خانواده آلفاهرپس ویرینه می‌باشد (۴، ۶، ۷). این ویروس دارای ۳ تحت تیپ به شرح ذیل می‌باشد:

الف) BHV-1.1 یا ویروس‌های(IBR-like) که مسبب فرم تنفسی بیماری است و سقط جنین نیز ایجاد می‌کند.

ب) BHV-1.2 یا ویروس‌های (IVP-Like) که مسبب فرم تناسلی بیماری است. BHV-1.2 دارای دو تحت تیپ a که سبب سقط جنین و b که سقط جنین ایجاد نمی‌کند، است.

ج) BHV-1.3 که BHV-5 نیز خوانده می‌شود که ایجاد آنسفالیت می‌کند (۴، ۶، ۷).

حضور مادام‌العمر ویروس در بدن میزبان به صورت پنهان به طور معمول چهره بارز همه عفونت‌های هرپس ویروسی است. انتشار ویروس می‌تواند به طور مداوم یا متناوب بدون حضور بیماری و یا به شکل دوره‌ای همراه با عفونت‌های بالینی برگشت‌پذیر صورت گیرد و یا ممکن است تا سال‌ها پس از عفونت اولیه انتشار ویروسی اتفاق افتد. عفونت ناشی از ویروس IBR همانند اغلب هرپس ویروس‌ها حالت نهفته پیدا کرده و در هنگام بروز استرس مجدداً نمایان می‌شود (۴، ۶، ۷). از خواص دیگر ویروس پنهان شدن (Latency) و پایداری است که با فراهم شدن شرایط مناسب فعال شده و تظاهر می‌نماید (۴، ۶، ۷). میزان واگیری و تلفات در موارد مختلف متفاوت بوده و در گله‌های شیری کمتر از گاوهای پرواری گوشتی است به طوری‌که در گاوهای شیری میزان واگیری ۸ درصد و تلفات ناشی از آن ۳ درصد می‌باشد در حالی که در گاوهای پرواری گوشتی واگیری حدود ۳۰-۲۰ درصد و به طور نادر ۱۰۰ درصد می‌باشد. سقط جنین از عوارض معمول بیماری است که معمولاً چند هفته پس از ابتلا یا متعاقب واکسیناسیون با واکسن‌های زنده ایجاد شده و بیشتر در ماه ۸-۶ آبستنی بروز می‌کند (۴، ۶، ۷). به طور کلی معمول‌ترین روش پیشگیری از بیماری، واکسیناسیون است. ریشه‌کنی بدون استفاده از آزمون‌های حساس که تشخیص‌دهنده پادتن ایجاد شده مربوط به عفونت یا واکسیناسیون است، غیر ممکن می‌باشد (۴، ۶، ۷).

تب نزله‌ای بدخیم (Malignant Catarrhal Fever): تب نزله‌ای بدخیم (MCF) از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی دام بوده که به لحاظ سبب‌شناسی به دو فرم مرتبط با تیپ ویلدبیست (Wildebeest) ناشی از هرپس ویروس ۱ آلسلافین (AlHV-1) و فرم مرتبط با گوسفند (SA-MCF) که ناشی از هرپس ویروس ۲ گوسفند (OvHV-2) است ایجاد می‌شود (۴، ۸، ۹).

در گاو بیماری به صورت حاد بوده و انتشار جهانی دارد و معمولاً به فرم انفرادی دیده می‌شود. علائم بالینی بیماری شامل تب، ترشحات چشمی و بینی، اختلالات تنفسی، اسهال، ایجاد زخم‌ها در مخاطات دستگاه تنفس و نیز دستگاه گوارش، تیرگی قرنیه و کوری و آنسفالیت می‌باشد. گاوها در تمام سنین و نژادها به بیماری حساس می‌باشند. میزان ابتلاء ۵-۱ درصد ولی میزان تلفات ۱۰۰-۹۰ درصد می‌باشد (۱۰، ۱۱).

انتقال عامل بیماری از گاوهای آلوده صورت می‌گیرد ولی این فرضیه وجود دارد که گوسفندان، به‌عنوان منبعی از بیماری در انتقال آن به گاو نقش موثری دارند (۴، ۸، ۱۰).

وضعیت بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی در ایران:

وضعیت بیماری BVD-MD در ایران: در بررسی‌هایی که در ایران صورت گرفته، بیشتر به

تشخیص سرمی بیماری اکتفا شده است. در تحقیقی که صدیقی نژاد (۱۳۷۳) به منظور تعیین وضعیت بیماری BVD-MD انجام داد نمونه‌های سرمی از استان‌های مختلف کشور جمع‌آوری و از نظر وجود آنتی‌بادی بر علیه این بیماری مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج به دست آمده از وجود ۳۹/۶ درصد آلودگی در گاوهای کمتر از دو سال و ۶۲ درصد در گاوهای با سن بیشتر از دو سال می‌باشد و ویروس عامل بیماری از تعدادی نمونه‌های غدد لنفاوی جدا گردید (۱۲). در سال ۱۳۷۴ در تحقیقی که بر روی گاوداری‌های اطراف تهران انجام شد میزان موارد دارای پادتن ۸۲/۷ درصد بود (۱۲). در بررسی صدیقی نژاد در سال ۱۳۷۵ با استفاده از تست الایزا و SN میزان آلودگی سرمی گاوها به ویروس BVD-MD در استان‌های مختلف کشور بین ۹۰-۲۰ درصد گزارش شد که در این میان استان چهار محال و بختیاری با ۹۰ درصد آلودگی بیشترین میزان را داشت. در بررسی‌های انجام شده در سال ۱۳۷۵ میزان آلودگی سرمی گوسفندان به پستی ویروس ۱/۵ درصد گزارش گردید. به طور کلی ۸۰-۶۰ درصد گاوها در طی یک سال اول ممکن است آلوده شده و پادتن ضد ویروس BVD-MD را کسب نمایند. مقدار متوسط دام‌های دارای عفونت پایدار در گله ۱۰-۱ درصد گزارش شده است (۱۲). همت زاده و همکاران (۱۳۸۰) در بررسی سرمی نمونه های خون گاوهای استان چهارمحال و بختیاری به روش آزمون خنثی سازی سرم با استفاده از سویه استاندارد NADL، میزان شیوع آلودگی را از ۱۵/۶۶ الی ۳۷/۷۷ درصد گزارش نمودند (۱۳). در گزارش دیگری که توسط ممتاز در سال ۱۳۸۲ منتشر شد میزان عفونت با ویروس BVD در جمعیت گاوهای تحت بررسی در شهرستان شهرکرد با انجام آزمون الایزا ۶/۲۹ درصد برآورد شد که از میزان آلودگی در جمعیت دامی برخی از کشورها زیادتر می‌باشد (۲).

کارگر مؤخر و همت‌زاده (۱۳۸۳) موارد مثبتی از عفونت پستی ویروسی را با آزمون الایزا و ایمونوفلورسانت مستقیم گزارش که با روش RT-PCR مورد تأیید قرار گرفتند و با تکنیک RFLP توانستند دو ژنوگروپ ۱ و ۲ از ویروس BVD را از هم تفریق نمایند (۱۴). بهاری و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی سرولوژیک ویروس BVD در گاوداری‌های صنعتی و سنتی اطراف همدان، با استفاده از روش الایزا و جستجوی آنتی‌بادی ضد ویروس، میزان آلودگی را به ترتیب ۷۶/۸ درصد و ۷۸/۴ درصد اعلام نمودند (۱۵). موسی خانی و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی گاوداری‌های استان تهران، با استفاده از روش Multiplex PCR، میزان موارد مثبت تیپ ۱ اسهال ویروسی گاوان را ۱۰۰ درصد و میزان موارد تیپ ۲ را ۱۵ درصد گزارش نمودند (۱۶). دواساز تبریزی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی شیوع بیماری اسهال ویروسی گاوهای شیری منطقه تبریز با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم، در ۱۸/۷ درصد از موارد مورد بررسی، آنتی‌بادی ضد ویروس را مشخص نمودند (۱۷). خاکپور و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی مخازن شیر گاوداری‌های تبریز، میزان آنتی‌بادی علیه ویروس BVD را با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم ۴۵ درصد گزارش نمودند (۱۸). حاجی حاجیکلایی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی آلودگی گاومیش‌های کشتارگاه اهواز، با استفاده از روش خنثی‌سازی ویروس، میزان وجود پادتن ضد ویروس BVD در آنها را ۲۱/۴۳ درصد گزارش نمودند (۱۹). Safarpoor Dehkordi (۲۰۱۱) در بررسی جنین‌های سقط شده گاوها، گوسفندان، بزها، گاومیش‌ها و شترهای ایران، با استفاده از روش الایزای تسخیری و RT-PCR، میزان موارد مثبت به ویروس BVD را به ترتیب ۱۵/۹۶ و ۱۸/۴۹ درصد ارائه نمود (۲۰). Ghaemmaghami و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی

شیوع بیماری BVD-MD در گاوداری‌های صنعتی اراک، با استفاده از روش الایزا، میزان شیوع را ۵۴/۳ درصد اعلام نمودند (۲۱). Farjani Kish و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی شیوع بیماری BVD-MD در گاوداری‌های استان فارس با استفاده از روش الایزا، میزان شیوع را ۴ درصد اعلام نمودند (۲۲). Khodakaram-Tafti و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی آلودگی گاوهای شیری استان فارس و با استفاده از روش‌های nested RT-PCR، میزان وجود آلودگی نمونه‌های بافی‌کوت را ۴ درصد ارائه نمودند (۲۳). Abbasi و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی گاوهای بومی و وارداتی شمال استان سیستان و بلوچستان به ویروس BVD، با استفاده از روش الایزا، در ۶۸/۳۳ درصد موارد، آنتی‌بادی ضد ویروس را تشخیص دادند (۲۴). Tajbakhsh و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از روش RT-LAMP، میزان موارد مثبت به ویروس BVD را در نمونه‌های خون گاوها، ۳۰ درصد ارائه نمودند (۲۵).

وضعیت بیماری IBR در ایران: در ایران هرپس ویروس گاوی در سال ۱۳۵۲ برای نخستین بار از تعدادی ماده گاو آبستن وارداتی از انگلستان توسط دکتر حضرتی جدا شد (۲۶). از آن سال تا کنون آلودگی به هرپس ویروس گاوی بارها در بین گاوهای نژاد خارجی گاوداری‌های اطراف تهران و سایر استان‌ها مشاهده شده است. کارگر مؤخر طی مطالعه‌ای در سال‌های ۱۳۷۸ تا ۱۳۷۹ از ۹۹۶۸ نمونه سرم توسط نتایج ۳۰ درصد آلودگی سرمی را نشان داد (۲۷، ۲۸). در گزارش بررسی سرولوژیکی هرپس ویروس تیپ یک گاوی (IBR) در گاوداری‌های صنعتی اطراف تهران که توسط تاجیک (۱۳۸۰) صورت گرفت در ۳۶/۲ درصد از نمونه‌ها موارد مثبتی از وجود آنتی‌بادی بر علیه این ویروس مشخص گردید و میزان آلودگی در گاوهای بالاتر از دو سال بیشتر از سایر گروه‌های سنی بود (۲۹). در تحقیقی که همت‌زاده و همکاران (۱۳۸۱) به منظور مشخص نمودن وضعیت آلودگی گاوداری‌های استان چهار محال و بختیاری به ویروس IBR انجام دادند، با انجام آزمون SN از نمونه‌های سرمی اخذ شده، میزان آلودگی برابر با ۴۶/۶۸ درصد به دست آمد (۳). Sakhaee و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی بیماری‌های ویروسی شامل BVD، IBR و PI3 گاوهای شیری استان کرمان با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم، وجود آنتی‌بادی‌های ضد ویروس را به ترتیب ۷۷/۹ ، ۳۰/۳۹ و ۱۰۰ درصد گزارش نمودند (۳۰). Sadri (۲۰۱۲) در بررسی سرمی گاوداری‌های استان‌های یزد، خراسان، فارس، مرکزی، آذربایجان شرقی و قم از نظر آنتی‌بادی‌های ضد ویروس IBR، با استفاده از روش الایزا، موارد مثبت را ۵۶ درصد ارائه نمود (۳۱). Sasani و همکاران (۲۰۱۳) عامل بیماری IBR را در تمام اندام‌های مختلف جنین‌های سقط شده با استفاده از روش PCR تشخیص دادند (۳۲). Bahari و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی گاوهای شیری استان همدان از نظر آلودگی به بیماری IBR، با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم، تعداد موارد مثبت از نظر وجود آنتی‌بادی‌های ضد ویروس را ۸۲/۹۳ درصد اعلام نمودند (۳۳). Nikbakht و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی شیوع بیماری IBR در مناطق مختلف ایران، که به روش الایزا صورت گرفت، میزان شیوع را ۳۱/۹ درصد اعلام نمودند (۳۴). Lotfi و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی سرواپیدمیولوژی بیماری‌های BVD، IBR و PI3 در گاومیش‌های استان خوزستان، میزان موارد مثبت آنتی‌بادی‌های ضد ویروس را در مورد IBR، با روش الایزا ۵/۵ درصد ، BVD با روش آنتی‌بادی درخشان به روش غیر مستقیم، ۳۲/۶ درصد و PI3 را با روش الایزا به میزان ۴۵/۲ درصد گزارش نمودند (۳۵).

وضعیت بیماری MCF در ایران: در مورد

حضور بیماری در ایران گزارشات متعددی وجود دارد. Ramyar و Hessami (۱۹۷۳) گزارش مقدماتی از جداسازی ویروس MCF از موارد شیوع این بیماری در گاوهای شیری اطراف تهران را از طریق تلقیح به کشت سلول و انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس ارائه نمودند (۳۶). اهورایی و همکاران (۱۹۸۹) در تحقیقی از گاوهای مناطق شمالی و غربی کشور که مشکوک به این بیماری بودند، نمونه‌های خون سیتراته جهت جداسازی ویروس و نیز آزمایشات هیستوپاتولوژی از نمونه‌های بافت‌های مختلف بدن تهیه و مورد بررسی قرار دادند. با تلقیح بافی‌کوت خون‌ها به سلول‌های پرایمری تیروئید گوساله موفق به مشاهده ضایعات سلولی (CPE) گردیدند. در مشاهدات هیستوپاتولوژی در تمام موارد مشابه بیماری MCF بود (۳۷). مظفری و درخشان‌فر (۱۳۸۹) با استفاده از روش هماتولوژیک و هیستوپاتولوژیک، بیماری MCF را در یک رأس غزال ایرانی تشخیص دادند (۳۸). آذری امین (۱۳۸۹) گزارشی از میزان فراوانی بیماری MCF در شهرستان‌های استان آذربایجان شرقی را منتشر نمود که در آن بیشترین موارد ابتلا در مرند به میزان ۴۴/۶ درصد و کمترین موارد مربوط به مراغه، جلفا و آذرشهر به میزان ۱/۰۶ درصد بود (۳۹).

وضعیت بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی در سایر کشورها

BVD-MD: Olafson و همکاران (۱۹۴۶) در گاوهای شیری آمریکا نوعی بیماری واگیردار گزارش کردند که بسیار شبیه طاعون گاوی بود با این تفاوت که درصد مرگ و میر پایینی داشت (۸-۴ درصد) (۵). در همان سال Childs نوعی بیماری مشابه را در گاوهای کانادایی گزارش کرد با این تفاوت که میزان مرگ و میر بالا و درصد واگیری کم بود (۵). در سال ۱۹۵۳ Ramsey و Chivers در ایالت آیوا آمریکا نوعی بیماری مشابه را گزارش کردند ولی به دلیل وجود ضایعات شدید مخاطی آن را به نام بیماری مخاطی (Mocusal Disease) نام‌گذاری نمودند (۵). Baker و Gillespie ویروس‌های جدا شده از دو بیماری فوق را مورد بررسی قرار دادند و مشخص کردند که ارتباط پادگنی بین آنها وجود دارد (۵). در سال ۱۹۶۲ برای این دو بیماری نام واحد اسهال ویروسی و بیماری مخاطی را انتخاب کردند. این بیماری ابتدا در آمریکا گزارش گردیده اما امروزه تقریباً انتشار جهانی دارد و از تمامی قاره های جهان با وفور ۹۰-۱۰ درصد گزارش گردیده است (۵). بررسی‌های سرولوژیکی نشان داده است که با وجود کم بودن تعداد گاوهایی که نشانه‌های درمانگاهی بیماری را بروز می‌دهند، میزان عفونت خیلی زیاد است. در انگلستان لااقل ۵۰ درصد گاوها از نظر سرمی واکنش مثبت نسبت به بیماری دارند و در استرالیا این نسبت به ۸۹ درصد بالغ می‌گردد که در مناطق گرم، میزان آلودگی ۹۱ درصد و در نواحی معتدل ۵۴ درصد است. در کنیا ۱۹ درصد گاوهای بالغ در آزمایش سرمی مثبت می‌باشند. سویه‌های ویروس در این کشور با سویه‌هائی که در آمریکا و آلمان جدا گردیده مشابه است. در آلمان ۷۶ درصد گاوهایی که مورد آزمایش قرار گرفته‌اند در آزمایش سرمی آلوده بوده‌اند. میزان شیوع از ۴۰ درصد در گوساله‌های ۶ ماهه تا ۹۱ درصد در گاوهای بالغ متغیر بوده است. در رودزیا ۶۴ درصد گاوها آلوده تشخیص داده شده‌اند (۵). این بیماری گسترش جهانی داشته و بر اساس بررسی بر روی ۲۵۶ گله گاو گوشتی در امریکا بیش از ۹۰ درصد گله‌ها و بیشتر از ۶۸ درصد گاوها چه از طریق آلودگی طبیعی و یا واکسیناسیون در معرض بیماری BVDقرارگرفته‌اند. گاوهای جوان آلوده با گروه NCPو عفونت پایدار (PI) منبع اصلی انتشار عفونت در گله می‌باشند. برعکس این موضوع، در گله‌هایی

که دام PI حضور ندارد دام‌ها از نظر سرولوژی منفی باقی می‌مانند. مطالعه‌ای که در دانمارک در ۱۹ گله گاو شیری صورت گرفت نشان داد که ۱/۴ درصد از دام‌های گله، PI هستند. حضور یک یا چند دام PI در گله موجب شیوع دام‌های سرم مثبت به میزان ۸۷ درصد از نظر بیماری BVD می‌گردد. کشورهای اسکاندیناوی (دانمارک، سوئد، نروژ و فنلاند) سیاست ریشه‌کنی بیماری را بدون راهکار استفاده از واکسیناسیون از سال ۱۹۹۳ در پیش گرفته و برخی از آنها به این امر نائل شده‌اند (۵). Ridpath و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی شیوع تحت ژنوتیپ‌های BVDV در آمریکا و استرالیا، BVD-1b را در آمریکا و BVD-1c را در استرالیا، تحت ژنوتیپ‌های غالب اعلام نمودند (۴۰).

IBR: این بیماری در گاو گستره جهانی دارد. در اروپا، آسیا، آمریکای شمالی، آفریقا، استرالیا و حتی در زلاند نو مشاهده شده است. مطالعات سرم‌شناسی حاکی از آن است که بر حسب وضعیت واکسیناسیون بین ۱۰ تا ۵۰ درصد گاوها سرم مثبت بوده‌اند. مشکل تنفسی در گله‌های گاو گوشتی متداول‌تر است. مطالعه سیر بیماری در انگلستان در دهه ۱۹۶۰ نشان داده است که کمتر از ۱۰ درصد گاوها سرم مثبت بوده‌اند. از اواسط تا اواخر دهه ۱۹۷۰ میزان شیوع عفونت به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است و تا قبل از سال ۱۹۸۶، ۳۵ درصد از دام‌ها و ۴۸ درصد گله‌ها مثبت بوده‌اند (۴، ۶). در استرالیا در گله‌های گاو گوشتی تا ۹۶ درصد گاوهای نر و ۵۲ درصد گاوهای ماده سرم مثبت بوده‌اند. در اسکاتلند و انگلیس شمالی در ۱۰ مورد رخداد IBR شدید طی سال‌های ۱۹۷۸و ۱۹۷۹ در گله‌های گوشتی و شیری حداقل ۱۰، و حداکثر ۹۰، با میانگین ۵۰ درصد دارای نشانه‌های بالینی بیماری بودند. میزان مرگ و میر بیماری بین ۱ تا ۳ درصد گزارش شده است. کاهش شیر در هر گاو مبتلا ۱۴ لیتر در روز به مدت ۵ روز بوده است. سقط جنین در عفونت با BHV-1 در هر مرحله آبستنی می‌تواند اتفاق بیفتد ولی غالباً در سه ماهه آخر آبستنی تشخیص داده می‌شود. میزان سقط جنین از رخداد بیماری در یک گله شیری ۱۶۰ رأسی در انگلستان ۹/۴ درصد بوده است. مطالعات دیگری طی سال‌های ۱۹۹۵-۱۹۸۰ در انگلستان، به طور متوسط میانگین سقط جنین ناشی از بیماری IBR را ۰/۲۵ درصد نشان می‌دهد (۴، ۷). Trangadia و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی شیوع بیماری IBR در هند که با روش الایزا صورت گرفت، میزان شیوع را ۶۰/۸۴ درصد اعلام نمودند (۴۱).

MCF: تب نزله‌ای بدخیم گسترش جهانی دارد. این بیماری در آفریقا به طور طبیعی در حیوانات حیات وحش نیز دیده می‌شود. در آمریکای شمالی و سایر مناطق دنیا افزایش سرمی آنتی‌بادی‌ها در گاوها متعاقب تماس با گوسفندان و بزهای آلوده دیده می‌شود که بدون علائم کلینیکی بوده ولی در اثر استرس و عوامل تضعیف‌کننده سیستم ایمنی می‌تواند باعث بروز بیماری گردد. در اکثر کشورها، گوسفندان به عنوان مخزن بیماری برای آلوده کردن گاوها مطرح هستند که در آنها علائم کلینیکی دیده نمی‌شود (۴، ۴۲). گزارشات متعددی در بریتانیا در خصوص ایجاد آلودگی در گاوها متعاقب تماس با گوسفندان آلوده منتشر گردیده است. بیماری در گاوها به دیگر گاوها سرایت نمی‌کند. تب نزله‌ای بدخیم یکی از مشکلات جدی در سلامت جمعیت‌های دامی در اندونزی و کشورهای آفریقایی می‌باشد. در آمریکا یکی از عوامل اصلی بیماری در گاومیش‌ها می‌باشد. در بریتانیا به صورت انفرادی بوده و معمولاً تعداد کمی از گاوها را مبتلا می‌سازد ولی به عنوان یک بیماری ویروسی در گوزن‌ها مطرح می‌باشد و در برنامه‌های مراقبت از بیماری‌های ویروسی از این لحاظ حائز

اهمیت است. همچنین مواردی از بیماری تب نزله‌ای بدخیم اخیراً در خوک‌ها نیز گزارش شده گونه‌ای که قبلاً به عنوان حیوان غیر حساس به بیماری مطرح بود (۴، ۸، ۴۳).

آثار سوء اقتصادی اجتماعی فرهنگی و سیاسی ناشی از بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی:

- سقط جنین (یا مومیایی شدن جنین و عوارض آن)
- مرده‌زایی
- ظایعات مادرزادی
- افزایش مرگ و میر گوساله‌ها
- کاهش رشد قبل یا بعد از تولد
- کاهش تولید (تولید شیر)
- افزایش مشکلات تولید مثلی در گله، مانند نازایی و تکرار فحلی
- افزایش درصد بیماری‌های مختلف عفونی در گوساله‌ها مانند پنومونی یا اسهال
- تضعیف سیستم ایمنی
- مرگ و میر گوساله‌ها به علت بیماری مخاطی
- افزایش مخارج دارو و درمان (۱، ۴۴، ۴۵).

بررسی مسائل و محدودیت‌ها برای کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی: در این تحقیق برای بررسی محدودیت‌ها و مشکلات در کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی در ایران از روش SWOT استفاده گردید. SWOT ابزاری بسیار مناسب برای درک و تصمیم‌گیری برای موقعیت‌ها در برنامه‌های راهبردی است که چارچوب مناسبی را برای بازنگری استراتژی‌ها، موقعیت و جهت‌گیری یک برنامه راهبردی یا یک ایده فراهم می‌آورد. از SWOT می‌توان برای تجزیه و تحلیل برنامه راهبردی، برنامه ریزی استراتژیک و توسعه استفاده کرد. این ابزار الگوئی است که بر پایه تفکر پیشرونده می‌باشد نه بر پایه اعتماد بر عکس‌العمل‌های غریزی و همیشگی و یک ابزار برنامه‌ریزی مهم است که یک سازمان طی یک روش نظام‌مند، نقاط قوت داخلی خود را شناسایی کرده و آنها را با بهترین فرصت‌ها در محیط اطراف هماهنگ نموده و مطابقت می‌دهد. SWOT یک روش مؤثر برای تعیین نقاط قوت و ضعف سازمان‌ها و بررسی آنها در مقایسه با تهدیدها و فرصت‌هایی که با آنها روبرو هستند بوده و برای تعیین تغییرات مفید در سازمان و اقدامات مورد نیاز جهت اجرا مناسب می‌باشد (۴۶). نقطه قوت یک برنامه، یک کاربرد موفق از یک شایستگی یا بهره برداری از یک عامل کلیدی در جهت توسعه می‌باشد. نقطه ضعف یک برنامه، یک کاربرد ناموفق از یک شایستگی یا عدم بهره برداری از یک عامل کلیدی است که توسعه را کاهش می‌دهد. یک فرصت یک حالت خارجی است که با استفاده مناسب از آن می‌توان به طور مثبت بر روی برنامه‌های عملیاتی مورد مطالعه تأثیر گذاشت. یک تهدید یک حالت خارجی است که می‌تواند به طور منفی بر روی برنامه‌های عملیاتی مورد مطالعه تأثیر بگذارد. پس از مشخص نمودن نقاط قوت درون سازمان‌های مسئول در کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی، میزان اهمیت و حساسیت و میزان اثر آن عوامل در کنترل بیماری‌ها مشخص و در نهایت، نقاط قوت به ترتیب اولویت مشخص گردیدند (جدول ۱) (۴۶).

جدول ۱- فهرست اولویت‌بندی‌شده نقاط قوت کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی (۴۶).

نقاط قوت	میزان اهمیت /حساسیت	اثر بر عملکرد یا قابلیت رقابتی سازمان	اولویت
مورد توجه بودن بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی و اهمیت اقتصادی بسیار زیاد آنها در صنعت دامپروری	بالا	بالا	۱
وجود ادارات دامپزشکی و آزمایشگاه‌های تشخیصی در اکثر مناطق کشور جهت تشخیص سریع شیوع بیماری‌های ویروسی	بالا	بالا	۲
شناسایی عوامل مختلف ویروسی و وجود اطلاعات وسیع و نسبتاً دقیق از شیوع بیماری‌های ویروسی شبه طاعون گاوی	بالا	بالا	۳
وجود قوانین مرتبط در خصوص کنترل بعضی از بیماری‌ها در سازمان دامپزشکی	بالا	بالا	۴
استفاده از واکسن‌های وارداتی تحت نظر سازمان دامپزشکی جهت پیشگیری از بعضی از بیماری‌های ویروسی	بالا	متوسط	۵
امکان تولید داخلی بعضی از واکسن‌ها در صورت اعلام نیاز سازمان دامپزشکی	بالا	متوسط	۶

نقاط ضعف موجود در سازمان‌های مسئول در کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی، مورد بررسی قرار گرفت و به ترتیب اولویت در جدول۲ آمده است.

جدول۲- فهرست اولویت‌بندی‌شده نقاط ضعف کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی (۴۶).

نقاط ضعف	میزان اهمیت /حساسیت	اثر بر عملکرد یا قابلیت رقابتی سازمان	اولویت
عدم وجود برنامه مصوب جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های مخاطی در کشور	بالا	بالا	۱
عدم وجود پرسنل کارشناس ورزیده کافی	بالا	بالا	۲
عدم وجود اعتبار کافی	بالا	بالا	۳
ناکافی بودن هماهنگی بین مراکز مرتبط	بالا	بالا	۴
عدم انجام مطالعات جامع و وسیع در سطح کشور جهت تشخیص و شناسایی بیماری‌های مختلف ویروسی	بالا	بالا	۵
عدم وجود قرنطینه مناسب و کنترل‌های مرزی	بالا	بالا	۶
گران بودن واکسن‌های موجود	بالا	متوسط	۷
عدم تولید واکسن در داخل کشور	بالا	متوسط	۸

فرصت‌هائی که خارج از سازمان‌های مسئول کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی در کشور وجود دارند و می‌توان از آنها در کنترل این بیماری‌ها بهره جست به ترتیب اولویت در جدول۳ آمده اند.

جدول۳- فهرست اولویت‌بندی‌شده فرصت‌های کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی (۴۶).

فرصت ها	احتمال وقوع	اثر بر عملکرد یا قابلیت رقابتی سازمان	اولویت
وجود بخش دامپزشکی غیر دولتی در اکثر مناطق کشور	بالا	بالا	۱
وجود اساتید و محققین برجسته در کشور	بالا	بالا	۲
وجود مراکز مختلف تحقیقاتی مرتبط با موضوع	بالا	بالا	۳
وجود الگوهای موفق در کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی در سایر کشورها	بالا	بالا	۴

گسترش خدمات الکترونیکی و استفاده بهینه در امر تشخیص بیماری‌های دامی	متوسط	بالا	۵

مواردی که خارج از حیطه سازمان‌های مسئول کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی در کشور وجود دارند و می‌توانند موفقیت برنامه را تهدید نمایند و بایستی در تدوین برنامه، آنها را در حد امکان کنترل نمود به ترتیب اولویت در جدول ۴ آمده اند.

جدول ۴: فهرست اولویت‌بندی‌شده تهدیدهای کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی (۴۶).

تهدیدات	احتمال وقوع	اثر بر عملکرد یا قابلیت رقابتی سازمان	اولویت
وجود کانون‌های آلوده به عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی و انتقال سریع و راحت این بیماری‌ها در سطح کشور	بالا	بالا	۱
درگیری کشورهای منطقه و همسایه با عوامل مختلف بیماری‌های ویروسی و واردات غیر قانونی (قاچاق) دام از آنها و کشتار غیر قانونی در سطح شهرها	بالا	بالا	۲
وسعت و پراکندگی مناطق مورد استفاده در نگهداری و پرورش دام و وجود جمعیت دامی حساس بخصوص در دامداری‌های صنعتی کشور	بالا	بالا	۳
عدم هماهنگی مراکز اجرایی و تحقیقاتی در برنامه‌های کنترلی بیماری‌های ویروسی	بالا	متوسط	۴
عدم وجود روش کاملاً موثر در پیشگیری از بیماری‌های ویروسی و مداخله عوامل گوناگون در کنترل بیماری‌ها	بالا	بالا	۵
محدودیت در تأمین واکسن مورد نیاز با توجه به گران بودن و وارداتی بودن آن	بالا	متوسط	۶

استراتژی‌های کنترل عوامل ویروسی بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی: برای تدوین استراتژی‌ها، جدول SWOT مد نظر گروه قرار گرفت و از درون آنها استراتژی‌های زیر به دست آمد (۴۶).

استفاده از نقاط قوت جهت بهره‌برداری از فرصت‌ها:

۱- استفاده از اطلاعات موجود در خصوص وضعیت بیماری و اهمیت بهداشتی و اقتصادی آن در خصوص بهداشت واحدهای دامداری و وجود قوانین در جهت ارتقاء وضعیت به منظور جلب نظر موافق مسئولان و مدیران ارشد نظام در جهت حمایت از برنامه کنترل بیماری‌های ویروسی مخاطی.

۲- افزایش انگیزه دامپزشکان و کارکنان شاغل در سطح شهرستان‌ها و بخش‌ها با حمایت مادی و معنوی و گسترش تحقیقات در زمینه‌های مختلف مربوط به بیماری‌ها و کنترل آنها.

۳- اجرای صحیح قوانین تدوین شده از سوی سازمان دامپزشکی در خصوص کنترل بیماری‌های ویروسی شبه طاعون گاوی.

۴- استفاده از سیستم‌های جدید نظیر فن آوری اطلاعات در اجراء و کنترل بیماری‌ها.

۵- تأمین واکسن مناسب و ثبت شده متعدد مورد نیاز (۴۶).

استفاده ازفرصت‌ها جهت رفع نقاط ضعف:

۱- تلاش در زمینه توجیه مسئولین در خصوص تخصیص منابع مالی و انسانی مورد نیاز برای اجرای طرح.

۲- ایجاد هماهنگی بین تمام مراکز تشخیصی و تحقیقاتی جهت اجرای برنامه های کنترل و مبارزه با بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی.

۳- ارتقاء سطح آگاهی‌های دامداران در خصوص خطرات ناشی از بیماری‌های ویروسی و توصیه‌های بهداشتی در این خصوص.

۴- برخورد قانونی با کسانی که قوانین ابلاغ شده را رعایت نمی‌کنند با استفاده از قوانین مرتبط

۵- کنترل پدیده قاچاق دام.

۶- تلاش در جهت تولید واکسن‌های ساخت داخل (۴۶).

استفاده ازنقاط قوت جهت احتراز از تهدیدها:

۱- تأمین اعتبار مالی طرح کنترل بیماری‌های مخاطی از طریق توجیه مسئولین در خصوص منافع انسانی واقتصادی حاصل از اجرای طرح.

۲- استفاده از توان علمی و کارشناسی مراکز مختلف کشور در جهت تدوین و اجراء برنامه جامع کنترل بیماری‌ها.

۳- ایجاد ستاد برنامه‌ریزی، هدیت و نظارت بر اجرای برنامه کنتری بیماری جهت ایجاد هماهنگی بین سازمان‌های مختلف.

۴- استفاده از خدمات الکترونی و استفاده بهینه از روش‌های تشخیص بیماری‌های ویروسی شبه طاعون گاوی.

۵-توسعه آموزش‌های فراگیر دامداران از طریق رسانه‌های محلی و استفاده از روش‌های متنوع آموزشی (۴۶).

کاهش نقاط ضعف و احتراز از تهدیدها:

۱- اجرای برنامه در حد وسع مالی و اجرائی در منطقه و یا استان خاص.

۲- دریافت بخشی از هزینه‌ها از دیگر منابع تأمین کننده مالی موجود و یا از کمک‌های مردمی جهت تأمین بخشی از اعتبارات طرح در صورت نیاز.

۳- فراهم نمودن شرایط لازم جهت اصلاح ساختاری مدیریت بهداشتی در مراکز پرورش و نگهداری دام.

۴- مطالعه روش‌های مختلف و مؤثر در کنترل و مبارزه با بیماری‌های مخاطی شبه طاعون گاوی (۴۶).

References

1- Kargar Moakhar R, Ahooraei P, Hesami M, Taghipour Bazargani T, Gholami M, *et al.* Report of the prevalence and rate of prevalence of BVD / MD in dairy farms around Tehran. Pajouhesh va Sazandegi. 1996; 28(3): 112-116 [In Persian].

2- Momtaz H, Determination of pestivirus infection rate in dairy farms of Shahrekord. 2nd Iranian Congress of Virology Feb. 13-15 2004; Tehran, Iran. [In Persian].

3- Hemmatzadeh F, Momtaz H, Tajbakhsh E, Safari H, A serological survay on bovine rhinotracheitis virus infection in Chahar Mahal Bakhtiary province. Pajouhesh va Sazandegi. 2002; 55(2): 38-43 [In Persian].

4- OIE, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2018

5- Houe H, Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarroea virus (BVDV) infections. Vet Microbio. 1999; 64:89-107.

6- Donskersgoed JV, Babiuk LA, Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotrachitis. Vet Med. 1991; 86: 86-88.

7- Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E, Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Vet Res. 2007; 38: 181–209.

8- Bexiga R, Clinical differentiation of malignant catarrhal fever, mucosal disease and bluetongue. Vet Rec. 2007; 161: 858-859.

9- Orono SA, Gitao GC, Mpatswenumugabo JP, Chepkwony M, Mutisya C, Okoth E, *et al.* Field validation of clinical and laboratory diagnosis of wildebeest associated malignant catarrhal fever in cattle. BMC Vet Res. 2019; 15:69, 1-10.

10- Li H, McGurre TC, Muller-Doblies UU, Crawford TB, A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever virus. J Vet Diagn Invest. 2001; 13: 361–364.

11- Michel AL, Aspeling IA, Evidence of persistent malignant catarrhal fever infection in a cow, obtained by nucleic acid hybridisation. J S Afr Vet Assoc.

12- Sedighinejad S, Study of bovine viral diarrhea / mucosal disease in Iran. Pajouhesh va Sazandegi. 1996; 30(1): 128-131 [In Persian].

13- Hemmatzadeh F, Kojouri G, Kargar

Moakhar R, Rohany M, A serological survay on bovine viral diarrhea virus infection in Chahar Mahal Bakhtiary province, Iran. J Vet Res. 2001; 56(3): 85-93 [In Persian].

14- Kargar Moakhar R, Hemmatzadeh F, A survey for detecting pestivirus antigen in persistanty infected cattle around Tehran. Pajouhesh va Sazandegi. 2004; 63(2): 21-25 [In Persian].

15- Bahari A, Sadeghi MR, Ghaemmaghami S, Sadeghi-nasab A, Serological survey on bovine viral diarrhea virus infection of cattle in industrial and non-industrial farms of hamedan area. Pajouhesh Keshavarzi. 2008; 8(1): 153-160 [In Persian].

16- Moosakhani F, Badiei A, Loghmani M, Shaghayegh A, Zafari M, Genotyping of BVDV type 1 and 2 isolated from PI cattle in Tehran province by multiplex PCR. J Vet Clin Res. 2010; 1(3):173-180 [In Persian].

17- Davasaz Tabrizi A, Mosaferi S, Zare P, Davoudi Y, Alamdari M, Prevalence of bovine viral diarrhea disease investigated with indirect ELISA method in dairy holstein cows of Tabriz region. Vet J Islamic Azad Uni Tabriz Branch. 2011; 5(1): 1067-1073 [In Persian].

18- Khakpour M, Ahmadi H, Monadi AR, Mosaferi S, Prevalence of antibodies to BVD virus in milk tanks, dairy farms in Tabriz with history of abortions in 90-1389. Vet J Islamic Azad Uni Tabriz Branch. 2012; 6(1): 1471-1476 [In Persian].

19- Haji Hajikolaei MR, Seyfiabad Shapouri MR, Mami F, Comparison between commercial ELISA kit and virus neutralization test for detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in buffalo. Iran Vet J. 2016; 12(3): 24-31 [In Persian].

20- Safarpoor Dehkordi F, Prevalence study of bovine viral diarrhea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in bovine, ovine, caprine, buffalo and camel aborted fetuses in Iran. AMB Express. 2011; 1:32.

21- Ghaemmaghami S, Ahmadi M, Deniko A, Mokhberosafa L, Bakhshesh, M, Serological study of BVDV and BHV-1 infections in industrial dairy herds of Arak, Iran. Iran J Vet Sci Tech. 2013; 5(2): 53-61.

22- Farjani Kish GH, Khodakaram-Tafti A, Mohammadi A, Serological survey of bovine viral diarrhoea virus by antigen capture ELISA in dairy herds in Fars province, Iran. Bulg J Vet Med. 2013; 16(3): 217−222.

23- Khodakaram-Tafti A, Mohammadi A, Farjani Kish GH, Molecular characterization and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea virus in dairy herds of Fars province, Iran. Iran J Vet Res. 2016; 17(2): 89-97.

24- Abbasi J, Hajinezhad MR, Sadati D, Jamshidian A, Najimi M, Ghalyanchi Langeroudi A, Comparative prevalence of bovine viral diarrhea virus antibodies among Native and imported cattle in north of Sistan and Baluchistan-Iran. Iran J Vir. 2016; 10(2-3): 48 – 52.

25- Tajbakhsh A, Rezatofighi SE, Mirzadeh K Pourmahdi M, A reverse transcriptase-loop mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP) for rapid detection of bovine viral diarrhea virus 1 and 2. Arch Razi Inst. 2017; 72(2): 73-81.

26- Hazrati A, Amjadi AR, The isolation and identification of infectious bovine rhinotrachitis virus in Iran. Arch Razi Inst. 1975; 27: 21-36.

27- Kargar Moakhar R, Seroprevalence of herpesvirus type 1 (IBR) and herpesvirus type 4 (BH4) in Iranian dairy cattle by Seronotralization (SN) method. 1st Iranian Congress of Virology 2001; Tehran, Iran. [In Persian].

28- Kargar Moakhar R, Bokaie S, Akhavizadegan MA, Charkhkar S, Meshkat M, Seroepidemiological survey for antibodies against infectious bovine rhinotrachitis and bovine herpes 4 viruses among cattle in different provinces of Iran. Arch Razi Ins. 2001; 52: 93-100.

29- Tajik S, Serological study of bovine type 1 of herpes virus (IBR) in five industrial dairies around Tehran (Karaj, Shahriar), 12th Iranian Veterinary Congress Feb. 12-14 2002; Tehran, Iran. [In Persian].

30- Sakhaee E, Khalili M, Kazemi nia S, Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran. Iran J Vet Res. 2009; 10(1): 49-53.

31- Sadri R, A new way of occurrence and serodiagnosis for Infectious Bovine rhinotrchitis in iranian cattle herds. Iran J Vet Med. 2012; 6(2): 99-103.

32- Sasani F, Vazirian A, Javanbakht J, Aghamohammd Hassan M, Detection of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion by PCR and histopathology assays. Am J Clin Exp Med. 2013; 1(2): 35-39.

33- Bahari A, Gharekhani J, Zandieh M, Sadeghi-Nasab A, Akbarein H, Karimi-Makhsous A, *et al.* Serological study of bovine herpes virus type 1 in dairy herds of Hamedan province, Iran. Vet Res Forum. 2013; 4(2): 111-114.

34- Nikbakht G, Tabatabaeia S, Lotfollahzadeh S, Nayeri Fasaeia B, Bahonar A, Khormalia M, Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus 1 and bovine leukaemia virus in Iranian cattle and associations among studied agents. J Appl Anim Res. 2015; 43(1): 22–25.

35- Lotfi M, Kamalzadeh M, Navidpour SH, Seroepidemiological assay of water buffalo (*Bubalus bubalis*) enzootic pneumonia agents (BVDV, BHV-1, bPI3V) in Khuzestan province of Iran. J Adv Agr Tech. 2016; 3(3): 213-216.

36- Ramyar H, Hessami M, A preliminary report on the isolation of bovine malignant catarrhal fever virus in Iran. Arch Inst Razi. 1973; 25: 47 – 48.

37- Ahourai P, Gholami MR, Ezzi A, Amiri Moghaddam H, Firoozi SH, Hesami M, *et al.* The clinico-pathology of malignant catarrhal fever syndrome in cattle in Iran. Arch. Razi Ins. 1989; 40: 59-67.

38- Mozaffari AA, Derakhshanfar A, Hematological and histopathological diagnosis of MCF like disease in a Persian gazelle (*Gazella subgutturosa)* (first report). J Vet Med Lab. 2010; 2: 111-117.

39- Azari Amin AA, Masoudi Gavgani MH, Azari Amin T, Frequency of malignant fever in East Azarbaijan province in 1387. 16th Iranian Veterinary Congress April 27-29 2010; Tehran, Iran. [In Persian].

40- Ridpath JF, Fulton RW, Kirkland PD, Neill JD, Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. J Vet Diagn Invest. 2010; 22: 184–191.

41- Trangadia B, Rana SK, Mukherjee F, Srinivasan VA, Prevalence of brucellosis and infectious bovine rhinotracheitis in organized dairy farms in India, Trop Anim Health Prod. 2010; 42:203–207.

42- Li H, O'Toole D, Kim O, Oaks L, Crawford TB, Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. J Vet Diagn Invest. 2005; 17: 171–175

43- Li H, Karnet G, O'Toole D, Crawford TB, Long distance spread of malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. Can Vet J. 2008; 49: 183-185.

44- Fallahi R, Paykari H, Sadri R, Abdollahi D, Review on viral agents caused rinder pest like mucosal diseases and condition in Iran, 13th Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AITVM) Conferences August 23-26 2010; Bankok, Thailand.

45- Fallahi R, Paykari H, Abdollahi D, Sadri R, Emadi A, Presentation of guidance program for control of viral agents caused rinderpest like mucosal diseases, 16th Iranian Veterinary Congress April 27-29 2010; Tehran, Iran. [In Persian].

46- Fallahi R, Paykari H, Keyvanfar H, Warshoei H, Abdollahi D, Khedmati K, *et al.* Collection of guidance program for viral agents caused rinderpest like mucosal diseases. Razi Vaccine and Serum Research Institute Publication. 2010; P: 1-52 [In Persian].

Review on viral agents caused rinder pest like mucosal diseases in Iran

Roozbeh Fallahi*

۶۵

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

Receive: February 9, 2020; Revise: February 29, 2020; Accept: March 15, 2020

Summary

Mucosal viral infections cause the most important and the most difficult diseases. Every year there are numerous reports of mucosal diseases that cause huge damage to the country's livestock industry. Bovine Viral Diarrhea-Mocusal Disease, Infectious Bovine Rhinotracheitis, and Malignant Catarrhal Fever are the most important viral mucosal diseases of the bovine species. A study of the reported foci of these diseases over the last two decades indicates that epidemiological units, especially industrial livestock, are circulating annually and have inflicted economic damage on these units. Unfortunately, there has been no comprehensive study program on the strains producing the mentioned diseases in the country and the studies have been limited to the evaluation of serum assessments. In this study, while introducing and describing the mentioned diseases in Iran and other countries, the problems and limitations for their control are discussed and after determining the strengths, weaknesses, opportunities and threats, the SWOT method and related strategies are analyzed and introduced to disease control.

Keywords: *Viral agents, Mucosal diseases, Rinderpest like, Iran*

جداسازی و شناسائی مایکوپلاسماهای عامل بیماری آگالاکسی مُسری از گوسفند و بز در استان تهران

سیدجلال میریان*[۱]، سیدعلی پوربخش[۱]، احمدرضا محمدی[۱]، هرمزحمیدیه[۱]، عباس اشتری[۱]، منصور بنانی[۱]، سیدعلی امامی[۲]

۱ - عضوهیئت علمی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی)، کرج، ایران.
۲ - کارشناس ادره کل دامپزشکی استان تهران، ایران

دریافت مقاله : ۰۷ اسفند ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۷ اسفند ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۵ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

بیماری آگالاکسی واگیر به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی دامی در کشورهای مدیترانه‌ای، آفریقا، اروپا، آمریکا و درکشورهای غرب آسیا مانند ایران که پرورش متراکم دام دارند، از سال‌ها قبل شناخته شده است و سبب خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای می‌گردد. این بیماری با تب، بی‌اشتهایی، لنگش، افت شیر در میش‌های شیرده، از کاهش تا قطع کامل شیر و سقط جنین در دام‌های آبستن ظاهر می‌شود. تا کنون در رابطه با جداسازی عامل بیماری آگالاکسی و تعیین هویت مولکولی آن در گله‌های گوسفند و بز در استان تهران تحقیقی صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق جداسازی و تعیین هویت مولکولی عامل بیماری آگالاکسی (مایکوپلاسما آگالاکتیه) در گوسفند و بز دارای علائم آگالاکسی به روش کشت و PCR در استان تهران بود. از ۳۳ نمونه‌ی اخذ شده، در ۱۴ نمونه جنس مایکوپلاسما تأیید شده که باند اختصاصی bp۱۶۳ را روی ژل آگارز نشان داده و در یک نمونه از ۱۴ نمونه مذکور کشت مثبت بوده است. نتایج این تحقیق، جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه از گوسفند و بز مبتلا را برای اولین بار در تهران تأیید نمود. هدف اصلی از این پروژه جداسازی و شناسایی عوامل مایکوپلاسمایی از دام‌های زنده دارای علائم بیماری با استفاده از PCR و روش کشت درگله‌های گوسفند در استان تهران بود که از ۳۳ نمونه‌ی اخذ شده در ۱۴ نمونه جنس مایکوپلاسما تأیید شده که باند اختصاصی bp۱۶۳ را روی ژل آگارز نشان داده و در یک نمونه از ۱۴ نمونه مذکور کشت مثبت بوده است.

واژگان کلیدی: *مایکوپلاسما، آگالاکسی، گوسفند و بز، استان تهران*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mirian@rvsri.ac.ir

مقدمه

بیماری آگالاکسی واگیردار به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی دامی که در دنیا شیوع فراوان دارد همواره سبب خسارت‌های اقتصادی در جمعیت‌های دامی گوسفندان و بزها می‌شود. این بیماری در بسیاری از کشورهای خاور میانه و مدیترانه در جمعیت دام‌های اهلی و حیوانات وحشی شیوع دارد (۳).

بیماری باعث سقط جنین، فلجی و عدم تحرک مناسب دام، تورم مفاصل، لنگش، تورم قرنیه و ملتحمه چشم و در نهایت لاغری و ضعیف شدن دام‌ها می‌گردد (۲). گرچه این بیماری تلفات چندانی ندارد اما به دلیل طولانی بودن دوره بیماری در دامداری‌ها خسارت اقتصادی زیادی به همراه دارد.

تولید شیر حتی پس از بهبودی دام نیز به میزان عادی برنمی‌گردد. همچنین بالا بودن میزان سقط جنین در گله از جمله خسارت‌های اقتصادی شناخته شده است.

در جهت مقابله با بیماری هر ساله جمعیت گوسفند و بز استان با واکسن داخلی تولیدی مؤسسه رازی مایه‌کوبی شده ولی در بعضی گله‌ها علی‌رغم انجام منظم مایه‌کوبی همچنان درگیر بیماری می‌شوند.

نظر به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در مورد جداسازی و شناسایی عوامل بیماری آگالاکسی در استان تهران انجام نشده، مطالعه حاضر به عنوان اولین مطالعه بیماری اگالاکسی در گوسفند و بز در استان تهران به حساب می‌آید.

بررسی نتایج مطالعه حاضر بیانگر این است که شیوع گله‌ای بیماری تا ۱۰۰ درصد رسیده که این مسئله نشان‌گر گسترش بیماری است.

در بررسی میزان حساسیت گوسفند و بز به مایکوپلاسما مشخص شده که میزان ابتلا در بزها ۲۸/۶ درصد و درگوسفندان ۴۶ درصد می‌باشد (۹).

استان تهران به دلیل موقعیت جغرافیایی (چهارراه تردد دام)؛ با داشتن بیشترین بازار مصرف گوشت کشور به عنوان یکی از قطب‌های دامپروری کشور به ویژه در امر پرواربندی محسوب می‌گردد.

با وجود شرایط ذکر شده بیماری‌های دامی متنوعی در این استان وجود دارد و از آن جمله بیماری آگالاکسی واگیردار (شیر آب) است. می‌توان از علائم بالینی (وقوع ورم پستان، تورم مفصل، تورم قرنیه و ملتحمه چشم) برای تشخیص اولیه کمک گرفت، تشخیص قطعی و نهایی بیماری با جدا کردن مایکوپلاسما از شیر، مایع مفصلی، اشک، ترشحات گوش یا بافت‌های صدمه دیده‌ی چشم و سپس شناسائی مایکوپلاسما آگالاکتیه امکان‌پذیر است. تشخیص عفونت‌های مایکوپلاسمائی عموماً بر پایه آزمایشات سرم‌شناسی شامل آزمایشات بیوشیمیائی و ایمونوفلورسنت و یا مشاهده آنتی‌بادی در شیر یا سرم به وسیله آزمایش ثبوت عناصر مکمل و یا الایزا و یا جداسازی ارگانیسم به روش کشت در آزمایشگاه صورت می‌گیرد (۵). به هر حال روش‌های سرم‌شناسی اغلب به دلیل ایجاد واکنش‌های متقاطع بین‌گونه‌ای مختل می‌شوند در حالی که روش کشت وقت‌گیر بوده و برای جداسازی بسیاری از مایکوپلاسماهای سخت‌رشد دشوار است. با استفاده از روش ردیابی DNA برای تشخیص اختصاصی گونه، امکان تمیز بین گونه‌های مختلف وجود دارد این روش، سرعت و ویژگی روش‌های تشخیصی را بهبود می‌بخشد. به طور معمول در آزمایشگاه، شیر یا نمونه مشکوک را در محیط کشت پایه اختصاصیPPLO Broth که به آن سرم نرمال اسب (۲۰ درصد) و استات تالیوم (یک در چهار هزار) افزوده شده، کشت داده و به مدت ۳ تا ۴ روز در گرمخانه ۳۷ درجه قرار می‌دهند. سپس قطره‌ای از آن را در سطح محیط کشت جامد اختصاصی

PPLO Agar که روش‌های معمول در تشخیص مایکوپلاسماها عمدتاً بر پایه‌ی روش‌های کلاسیک مانند تست‌های بیوشیمیائی و ایمونوفلورسنت قرار دارد. این روش‌ها وقت‌گیر بوده و تفسیر نتایج آنها اغلب دشوار است و در حال حاضر تست‌های استاندارد و مرجعی وجود ندارد تا بتوان توسط آنها نتایج به‌دست آمده در آزمایشگاه‌های مختلف را با هم مقایسه کرد.

پیرعلی و همکاران بیشترین نمونه‌های مثبت (۸۵ درصد) را از سوآب‌های چشمی اخذ شده از گوسفند و بزهای بیمار گزارش کردند (۱۵).

دلافا و همکارانش اولین جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه را از منی بزهای نر در شرایط سلامت با استفاده از روش کشت و PCR انجام دادند (۸). آمورس و همکاران نشان دادند که روش PCR به عنوان روشی سریع و حساس در تشخیص و جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه از سواب گوش بز می‌باشد (۸).

مواد و روش‌ها

مراحل اجرای این تحقیق به صورت زیر بود:

جامعه‌ی مورد بررسی در این پژوهش تمامی گوسفند و بزهای بیمار (مشکوک به بیماری آگالاکسی) استان تهران بوده و نمونه‌گیری مبتنی بر هدف (Purposive Sampling) انجام گرفت، بدین صورت که به مدت دو سال در چهار فصل مختلف در استان تهران از گله‌های مشکوک نمونه‌گیری به عمل آمده و پس از جداسازی عامل، نسبت به تأیید جنس و گونه‌ی باکتری عامل و تعیین هویت مولکولی جدایه‌ها اقدام گردید.

در این تحقیق ابتدا با مسئولین (رؤسای ادارات بررسی و مبارزه با بیماری‌های دامی شبکه‌های دامپزشکی) اداره کل دامپزشکی استان تهران، گفتگو و تبادل نظر به عمل آمده و در خصوص نحوه شناسائی و تشخیص گله‌های مشکوک به بیماری، جمع‌آوری آمار و نحوه نمونه‌برداری و انتقال آن به داخل ظروف محتوی مواد نگهدارنده (PPLO براث) انجام گردید. به دنبال گزارش کانون بیماری، همکاران مسئول طرح از گله‌های بیمار بازدید نموده و درصورت تأیید بیماری از نظر بالینی، نسبت به تکمیل پرسش‌نامه پیوستی اقدام می‌گردد. گله‌هائی تحت مطالعه قرار گرفت که حداقل در یک سال اخیر بر علیه بیماری آگالاکسی واکسینه نشده بود. از دام‌های بیمار نمونه‌های مرضی به صورت آسپتیک بسته به ناحیه درگیر، از شیر، و سواب چشمی، سواب گوش، ترشحات جنین سقط شده و یا ترشحات ریوی دام‌های بیمار جمع‌آوری گردیده و به محیط ترانسپورت شامل : محیط (Heart infusion broth + 20% سرم + ۱۰٪ عصاره مخمر + IU/ml 200 آمپی سیلین + گلوکز ۰/۱ ٪ + فنل رد ۰/۲ ٪) منتقل و بلافاصله در شرایط زنجیره سرد جهت جداسازی سویه و شناسائی به مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارسال گردید. در آزمایشگاه نمونه‌ها ابتدا روی محیط PPLO براث وسپس روی محیط PPLO آگار کشت شدند و هر یک به مدت ۳-۲۱روز در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. از روز سوم محیط کشت مایع از نظر کدورت و محیط کشت جامد از نظر وجود کلنی مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. به صورت موازی در این مطالعه جهت جداسازی عامل بیماری از PCR برای تشخیص موارد مثبت استفاده شده است . جهت تخلیص DNA با استفاده از کیت تجاری PCR Maser kit تهیه شده از شرکت سیناژن و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با محصولاتی به طول 270bp در ژن 16SrRNA برای جنس مایکوپلاسما و 375bp در ژن لیپوپروتیین برای گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه استفاده شد. جمعاً ۳۳ نمونه مرضی از ۳۳رأس گوسفند و بز بیمار برداشت گردید.

نتایج

پس از کشت و PCR از ۳۳نمونه اخذ شده در ۱۹ نمونه نتیجه آزمایش کشت و PCR منفی بود. و در یک نمونه نتیجه آزمایش کشت و PCR مثبت بود و در ۱۳ نمونه فقط PCR مثبت بود.

همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌گردد، نمونه‌های برداشت شده از ۵ گله مشکوک بوده‌اند.

جدول ۱- فراوانی گله‌ها بر اساس نتایج کشت، PCR جنس مایکوپلاسما

	کشت	PCR جنس مایکوپلاسما
+	۱	۵
-	۴	۰
جمع	۵	۵

در این مطالعه جمعاً از ۴ گله حداقل یک نمونه دارای مایکوپلاسمای آگالاکتیه جدا گردید و در یک گله هیچ نمونه‌ای مثبت نبود. به عبارتی میزان آلودگی گله‌ای به مایکوپلاسما آگالاکتیه ۲۰ درصد می‌باشد. همان‌طور که در جداول شماره ۳ و ۶ مشاهده می‌گردد از ۳۳ رأس گوسفند و بز بیمار نمونه‌برداری شده، از ۱۴ رأس در آزمایش انجام شده جنس مایکوپلاسما جدا گردید.

از ۲۶ رأس گوسفند مشکوک به بیماری نمونه‌برداری شده در ۱۲ رأس در آزمایش PCR جنس مایکوپلاسما از آنها جدا گردید. به عبارتی میزان آلودگی به جنس مایکوسما در گوسفندان نمونه‌برداری شده ۴۶/۱۵ درصد می‌باشد. از ۷ رأس بز بیمار نمونه‌برداری شد که از ۲ رأس در آزمایش PCR جنس مایکوپلاسما از آنها جدا گردید، به عبارتی میزان آلودگی به جنس مایکوسما در بزهای نمونه‌برداری شده ۲۸/۵۷ درصد می‌باشد.

جدول ۲- فراوانی نتایج PCR جنس مایکوپلاسما به تفکیک گوسفند و بز

	تعداد رأس دام نمونه‌برداری شده	PCR جنس مایکوپلاسما
گوسفند	۲۶	۱۲
بز	۷	۲
جمع	۳۳	۱۴

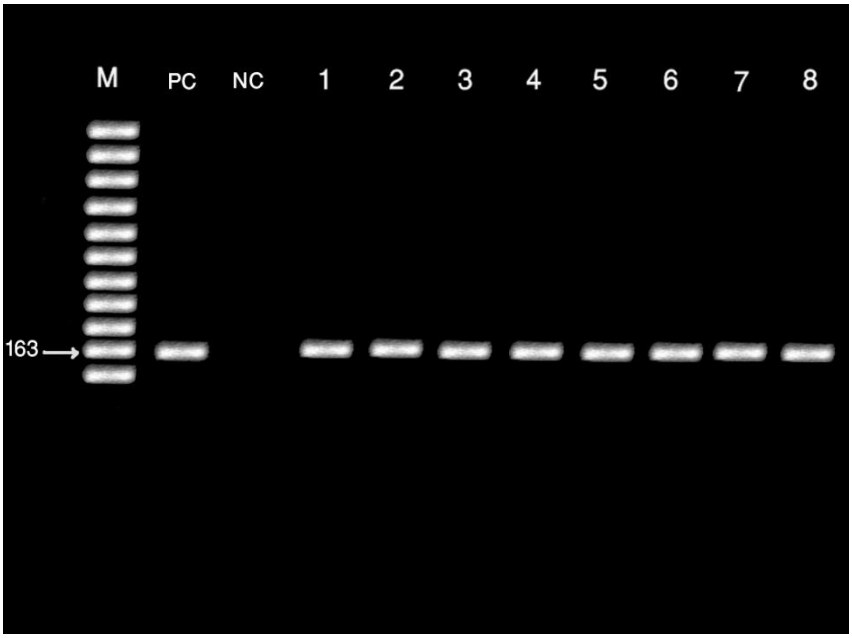
در این مطالعه جمعاً ۳۳ نمونه مرضی برداشت و به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ارسال گردید.

نمونه‌های برداشت شده شامل سواپ چشم، شیر (جدول ۴) بود، بررسی نتایج نمونه‌های برداشت شده (جدول ۴) نشان می‌دهد که ۱۹ نمونه در

کشت و PCR منفی بودند. به عبارتی ۵۷/۵۷ درصد نمونه‌ها علی‌رغم داشتن علائم بالینی منفی بودند همچنین ۱۳ نمونه در آزمایش PCR مثبت بودند و ۱ نمونه هم در کشت و هم در PCR مثبت بود.

همان‌طور که در جدول شماره ۴ مشاهده می‌گردد از مجموع ۳۳ نمونه مرضی برداشت شده، بیشترین میزان فراوانی مربوط به شیر با ۶۶/۵ درصد نمونه و کمترین میزان فراوانی مربوط به سواب چشم است.

شکل ۱- تصویر میکروسکوپی (×۴۰) پرگنه‌های مشاهده شده بر روی محیط PPLO Agar



شکل۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه‌ی مایکوپلاسما آگالاگتیه

از ۱۴ مورد جنس مایکوپلاسما مثبت در آزمایش PCR بیشترین میزان فراوانی موارد مثبت در محل‌های نمونه‌برداری مربوط به چشم با میزان ۴۵/۴۵ درصد و کمترین میزان مربوط به شیر با ۴۰/۹ درصد می‌باشد.

در این مطالعه مشخص شده که ۴۲ درصد نمونه‌های مرضی برداشت شده علی‌رغم بیمار بودن دام با علائم منتسب به آگالاکسی و در کشت و PCR جنس مایکوپلاسما جدا نگردید که این مسأله ضرورت توجه به دیگر عوامل عفونی که می‌توانند علائم شبیه اگالاکسی را به‌وجود آورند را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری آگالاکسی بعنوان یکی از بیماری‌های عفونی که در دنیا شیوع فراوان دارد همواره سبب خسارت‌های اقتصادی در جمعیت‌های دامی خصوصاً گوسفند و بز می‌شود. مطالعات مختلفی به‌منظور شناسایی توزیع جغرافیایی بیماری، جداسازی و شناسایی عوامل مسبب بیماری انجام شده است. در مطالعه‌ای روی ۴۹۰ نمونه شیر جمع آوری شده از نواحی مختلف کشور ۹۶ نمونه از نظر آزمایشات بیوشیمیایی حاوی مایکوپلاسما بودندکه ۲۳ نمونه از آنها از نظر سرم‌شناسی، مایکوپلاسما آگالاکتیه تشخیص داده شدند (۱۵). قادرسهی و همکاران یک طرح تحقیقاتی تحت عنوان شناسایی مایکوپلاسما آگالاکتیه و دیگر عوامل مسبب آگالاکسی در گوسفند و بز به وسیله PCR و کشت در ایران در سال ۱۳۸۵ در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی جهت دسترسی به بذر عوامل مایکوپلاسمائی بیماری آگالاکسی گوسفند و بز انجام دادند (۹). در این طرح حدود ۲۰۰۰ نمونه را تحت آزمایش PCR و کشت قرار دادند. این تحقیق در ۱۷ استان کشور انجام شده است. نمونه‌های ذکر شده از حیوانات سالم و بیمار اخذ شده است و شیر، سوآب چشمی و مایع سینوویال مفصلی به‌عنوان نمونه استفاده شد. در پژوهش دیگری که توسط بیدهندی و همکاران انجام شده است جداسازی و شناسائی مایکوپلاسما آگالاکتیه از شیر گوسفندان و بزهای استان کردستان هدف از تحقیق ذکر شده است. در نهایت ۵ جدایه تعیین توالی نوکلئوتیدی گردیده و یکی از آنها با نام HQ722028 در بانک ژن ثبت شده است (۱۳). طبق مطالعات انجام شده روی عوامل مسبب بیماری آگالاکسی در گوسفند و بز مشخص شده، ۴ گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه، مایکوپلاسما مایکوییدس تحت گونه کاپری و مایکوپلاسما کاپریکولوم تحت گونه کاپریکولوم و مایکوپلاسما پوتریفیسینس در بروز آگالاکسی دخیل هستند (۱۵).

بررسی سوابق بیماری در کشور این مسئله را تائید می‌کند که بیماری هر ساله باعث زیان فراوان اقتصادی به جمعیت دامی کشور می‌گردد (۱۳).

در جهت مقابله با بیماری هر ساله جمعیت گوسفند و بز استان با واکسن داخلی تولیدی مؤسسه رازی مایه‌کوبی شده ولی در بعضی گله‌ها علی‌رغم انجام منظم مایه‌کوبی همچنان درگیر بیماری می‌شوند. نظر به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در مورد جداسازی و شناسایی عوامل بیماری آگالاکسی در استان تهران انجام نشده، مطالعه حاضر به‌عنوان اولین مطالعه بیماری اگالاکسی در گوسفند و بز در استان تهران به حساب می‌آید. بررسی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که شیوع گله‌ای بیماری تا ۱۰۰ درصد می‌رسد که این مسئله گسترش بیماری را نشان می‌دهد.

در تحقیقات مشابه در ایران و کشورهای همسایه فقط از شیر جهت جداسازی عامل مذکور استفاده شده است (۱۳). در سال‌های اخیر به دلیل حساسیت بالا، اختصاصی بودن روش، سرعت تشخیص و سهولت در مطالعه و تحلیل، باعث شده

پژوهشگران به سمت مطالعات مولکولی به خصوص استفاده از روش PCR تمایل یابند.

تولا و همکاران (۱۶) اقدام به جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما آگالاکتیه به روش PCR روی نمونه‌های شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان در چهار ناحیه ایتالیا نمود و نتیجه‌گیری کرد که این روش یک روش سریع و اختصاصی برای جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه است. در پژوهش‌های مشابه در اردن و مراکش نیز توانسته‌اند گونه‌های مایکوپلاسما آگالاکتیه را از گوسفندان و بزهای مبتلا با روش PCR جدا نمایند. در ایران نیز برای جداسازی و شناسایی عوامل مایکوپلاسمایی بیماری آگالاکسی با استفاده از روش PCR تلاش فراوانی شده است از جمله پیرعلی و ابراهیمی از مایع اشک و شیر ۲۶ گله نمونه‌گیری و با روش PCR بررسی و از ۲۰ درصد نمونه‌ها باکتری مایکوپلاسما آگالاکتیه را جدا کردند (۱۵). مرادی و همکاران با استفاده از روش کشت و PCR از ۳۶۷ نمونه شیر اخذ شده در استان کردستان موفق به جداسازی ۱۲ مورد مایکوپلاسما شدند که ۵ مورد از آن آگالاکتیه بود (۱۳).

خیرخواه و همکاران با استفاده از روش کشت و PCRاز ۱۷ نمونه شیر اخذ شده درشهرستان بافت موفق به جدا کردن مایکوپلاسما از ۸ نمونه گردید که یکی از آنها گونه آگالاکتیه بود (۱۲).

این پژوهش نشان داد که بهترین محل نمونه‌گیری برای جداسازی عامل بیماری (مایکوپلاسما آگالاکتیه) به ترتیب اولویت ترشحات پستان و چشم هستند. در مطالعات محققین مختلف اعلام شده که مایکوپلاسما اگالاکتیه عامل اصلی بیماری اگالاکسی بوده است (۷). اما در این مطالعه همانند یافته‌های قادر سهی و همکاران و خیرخواه و همکاران تنها در ۲۱درصد موارد گونه آگالاکتیه جدا شده است و در بقیه موارد سایر گونه‌های مایکوپلاسما جدا شده. نتیجه مذکور تأثیر ضعیف واکسن فعلی در استان تهران و دیگر استان‌های کشور من‌جمله استان‌های قم و کرمان را تأیید می‌کند زیرا گونه مایکوپلاسما موجود در واکسن (گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه) با گونه در گردش همخوانی کامل را ندارد.

بررسی میزان حساسیت گوسفند و بز به مایکوپلاسما آگالاکتیه مشخص شده که میزان ابتلا در بزها (۳۶درصد) بیشتر از گوسفندان (۱۴/۹۴ درصد) بوده است (۹).

در این مطالعه مشخص شده که ۳۶ درصد نمونه‌های مرضی برداشتی علی‌رغم بیمار بودن دام با علائم منتسب به آگالاکسی ولی در کشت و PCR جنس مایکوپلاسما جدا نگردید که این مسأله باعث توجه به دیگر عوامل عفونی که می‌توانند علائم شبیه اگالاکسی را به وجود آورند می‌گردد. از جمله دلایل عدم رشد باکتری در محیط کشت می‌توان به عدم رعایت شرایط مناسب اخذ، نگهداری و ارسال نمونه، عدم وجود مایکوپلاسما در نمونه اخذ شده به دلیل درگیری با سایر عوامل بیماری‌زا با علائم مشابه، استفاده از کورتون و یا آنتی‌بیوتیک از سوی دامدار قبل از نمونه‌گیری و کم بودن مایکوپلاسماهای رشد کرده در محیط کشت که قابل بررسی نبوده‌اند،و همچنین کند و سخت رشد بودن مایکوپلاسماها اشاره کرد.

مطالعه حاضر همانند مطالعه تولا و همکاران (۱۶) نشان داد که بیشترین میزان جداسازی گونه آگالاکتیه از نمونه‌های شیر و مایع مفصلی بوده است. در تحقیقات مشابه در ایران و کشورهای همسایه فقط از شیر جهت جداسازی عامل مذکور استفاده شده است (۱۳). نظر به اینکه ۷۹ درصد مایکوپلاسماهای جدا شده غیرآگالاکتیه بوده است، به همین دلیل مطالعات تکمیلی جهت شناسائی آنها در حال انجام است. جهت تکمیل مطالعات انجام

شده لازم است مطالعاتی با هدف شناسایی و تعیین هویت مولکولی عوامل مایکوپلاسمائی انجام گیرد و سویه‌های آگالاکتیه جداشده از نظر میزان شباهت با سویه‌های موجود در واکسن مورد بررسی مولکولی قرار گیرد و در صورت لزوم از سویه های جدید در تهیه واکسن استفاده گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مساعدت‌ها و زحمات مسئولین محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و اداره کل دامپزشکی استان تهران قدردانی می‌نمایند و اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

References

1- Amores J, Corrales JC, Martin AG. Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri* in ear swabs taken from goats. Vet. Mic. 2009; 102: 42-48.

2- Cokrevski S, Crcev D, Loria GR, Nicholas RAJ. Outbreaks of contagious agalactia in small ruminant in the republic of Macdonia. Vet. Rec. 2001; 148: 667-670.

3- Contreras AC, Luengo A, Corrales JC. The role of intramamary pathogens in dairy goats, Livestock Pro. Sci. 2003; 9: 273-283.

4- Corrales J, Ensal A, De La Fe C, Sanchez A, Assuncao P, Poveda J, Contreras A. Contagious agalactia in small ruminants. Small Ruminant Res. 2007; 68: 154-166.

5- Cottew GS. Caprine-ovine mycoplasmas. In: Tully JG, Whitcomb RF. the mycoplasmas. Human and animal mycoplasmas, ed., Academic press pp: 1979; 103-132.

6- DaMassa AJ, Brooks DL, Holmberg CA. Pathogenecity of *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. Isr. J. Med. Sci. 1984; 20: 975-978.

7- Dedieu L, Mady V, Lefevre PC. Development of two PCR assays for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. FEMS Microbiol. Lett. 1995; 129: 243-249.

8- De La Fe C, Assuncao P, Rosales RS, Antunes T, Poveda JB. Characterisation of Protein and antigen variability among *Mycoplasma Mycoides* subsp *Mycoides LC* and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. Vet. J. 2006; 171: 532-538**.**

9- Ghadersohy A,Madani R,Naseryrad Aa,Vandyousefi J. I dentification of Mycoplasmas causing contagious Agalactia syndrome in sheep & goats by using PCR and culture method in Iran ,Razi Vaccine and serum research Institue Karaj 2006; 10-12. [In Persian]

10- Gobel UB, Geiser A, Stanbridge FJ. Oligonucleotide probes complementary to two variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. J. Gen. Microbiol. 1987; 133: 1969-1974.

11- Hassani tabatabaee A,Firoozi R. Livstook bacterial diseases.Tehran university pub,pp 2001; 469-484. [In Persian]

12- Kheirkhah B,Pourbakhsh S A,Ashtary A,Amini K. Detection of *Mycoplasma agalactiae* by culture andPolymerase Chain Reaction (PCR) methods from affected sheep to contagious agalactiae in Baft.Jurnal of comparative pathobiology 2012; 1: 423-430. [In Persian]

13- Moradi Bidhendi S, Khaki P, Pilehchian Langroudi R. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and Polymerase Chain Reaction in sheep and goat milk samples in Kordestan province, Iran. Arch. Razi Ins. 2011; 66: 11-16. [In Persian]

14- Shimi A. veterinary bacteriology and bacterial diseases.Jehade danneshgahy pub,1998; 446-456. [In Persian]

15- Pirali K., Ebrahimi A. Investigation ofMycoplasma agalactiae in milk and conjunctival swab samples. [In Persian]

from Sheep !ocks in west central, Iran. Pakistanian Journal of Biological Sciences, 2007; 10(8), 1346-1348.

16- Tola S, Angioi A, Rocchigiani AM, Idini G, Manunta D, Galleri G, Leori G. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by Polymerase Chain Reaction. Vet. Mic. 1997; 54(1): 17-22.

17- Tola S, Manunta D, Rocca S, Rocchigiani AM, Idini G, Angioi A, Leori G. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactived vaccines. Vac. 1999; 17: 2764-2768.

18- Zendulkova D, Madanat A, Lany P, Pospisil Z, Ball HJ. Detection of *Mycoplasma agalactiae* antigen in sheep and goats by monocolonal antibody-based sandwitch ELISA, Acta. Vet. Brono. 2004; 73: 461-464.

Isolation and identification of Mycoplasmas which cause contagious Agalactia from sheep & goats in Tehran province

Seyed Jalal Mirian[*1], Seyed Ali Pourbakhsh[1], Ahmad Reza Mohammadi[1], Hormoz Hemidieh[1], Abbas Ashtari[1], Mansur Banani[1], Seyed Ali Emami[2]

1 - Faculty member of Razi vaccine and serum Research Institute,Karaj,Iran.
2 - Agriculture Research ,Education andExtension Organization Tehran,Iran.

Receive; February 26, 2020; Revise: March 7, 2020; Accept: March 15, 2020

Summary

Agalactia, has been known as a contagious disease in Mediterranean countries, Africa, Europe, and west Asia e.g. Iran where the livestock were reared massively for approximately several years ago and it has been led to noticeable economic damages and losses. This disease appears by symptoms such as fever, inappetence, lameness and loss of milk in dairy ewes, reduction to total lack of lactation and abortion in pregnant livestock. No study has been so far conducted on isolation of Agalactia disease factor and determining its molecular identity in ovine and caprine herds in Tehran province. The current research aimed to isolate and determine molecular identity of Agalactia disease factor (Agalactiae mycoplasma) in sheep and goat that suffered from Agalactia, using culture and PCR methods in Tehran province. Among the total 33 taken samples, 14 samples were confirmed as mycoplasma species that showed specific band (bp163) on agarose gel and in one of these 14 given samples, the culture was positive.

Keywords: *agalaxy, sheep,goat,Tehran*

بررسی مولکولی تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در ناقلین کنه‌ای درمناطق روستایی شرق ایران

امیرسجاد جعفری[۱]، مهدی راسخ[۲*]، داریوش سعادتی[۳]، فائزه فقیهی[۴]، مهدی فضلعلی پور[۵]، سحر خاکی فیروز[۵]، تهمینه جلالی[۵]، زهرا احمدی[۵]

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۴- مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران.
۵- بخش آربوویروس‌ها و تب‌های خونریزی دهنده ویروسی، انستیتوپاستور، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ مهر ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ مهر ۱۳۹۹ ، پذیرش نهایی: ۲۷ مهر ۱۳۹۹

چکیده

تب خونریزی‌دهنده کریمه کنگو یک عفونت ویروسی کشنده (نرخ مرگ و میر بین ۳ تا ۳۰ درصد) می‌باشد که از بیش از ۳۰ کشور دنیا گزارش شده است. این بیماری بین انسان و دام مشترک بوده و انتقال از طریق گزش کنه، تماس با خون و ترشحات یا لاشه دام و انسان آلوده رخ می‌دهد. هدف از مطالعه‌ی حاضر مشخص شدن شیوع ویروس تب خونریزی‌دهنده کریمه کنگو در کنه‌های جدا شده از دام‌های اهلی روستاهای شهرستان بیرجند در استان خراسان جنوبی می‌باشد. در این مطالعه از ۳۹۰ رأس دام شامل ۱۶۷ گوسفند، ۲۰۵ بز، ۹ گاو و ۹ شتر، در چهار روستای نوفرست، حسن‌آباد، امیرآباد و شوکت آباد نمونه‌برداری صورت گرفت. هشت گونه کنه سخت شناسایی شد که شامل شامل *ریپیسفالوس سانگوئینوس* (۲۱/۹ درصد)، *هیالوما دتریتیوم* (۲۵ درصد)، *هیالوما مارژیناتوم* (۴/۲ درصد)، *هیالوما آناتولیکوم* (۰/۸٪)، *هیالوما آسیاتیکوم*(۱/۶٪)، *هیالوما درومداری* (۴۳٪) و سایر *هیالوما* ها (۷/۴ درصد) بود. حضور ویروس در ۱۵/۹ درصد از نمونه‌های ارسال شده به آزمایشگاه با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس مورد تأیید قرار گرفت. حضور ژنوم ویروسی در کنه‌های *ریپیسفالوس سانگوئینوس*، *هیالوما دتریتیوم* و *هیالوما آسیاتیکوم* به تأیید رسید. آلوده‌ترین میزبان‌ها گوسفند و بز بودند و کنه‌های صید شده همه از مناطق کم‌ارتفاع بودند. روستاهای این منطقه را می‌توان به عنوان کانون‌های آلودگی در نظر گرفت. بنابراین توصیه می‌شود سیاست‌های کنترلی و پایشی دام‌ها ی منطقه، با دقت بیشتری دنبال شود.

واژگان کلیدی: *تب خونریزی دهنده کریمه کنگو، کنه سخت، بیرجند، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس*

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

مقدمه

تب خونریزی دهنده کریمه کنگو (Crimean Congo Haemorrhagic Fever) یک عفونت ویروسی کشنده (نرخ مرگ و میر بین ۳ تا ۳۰ درصد) می‌باشد که از بیش از ۳۰ کشور دنیا گزارش شده است (۲۲). این بیماری بین انسان و دام مشترک بوده و انتقال از طریق گزش کنه، تماس با خون و ترشحات یا لاشه دام و انسان آلوده ممکن می‌باشد (۶). ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو یک RNA ویروس است که در جنس *نایرو ویروس* و خانواده *بنیاویریده* قرار می‌گیرد (۷). این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۴۴ در کریمه گزارش شد و نام آن تب هموراژیک کریمه بود. این بیماری بعداً در سال ۱۹۶۹ به‌عنوان علت بیماری در کنگو شناخته شد و به این ترتیب نام فعلی این بیماری به صورت ترکیبی از دو اسم انتخاب گردید (۱۳، ۲۴). این ویروس مانند سایر عوامل زئونوتیک منتقل شونده از کنه ، چرخه کنه- مهره داران- کنه را دنبال می‌کند و با وجود عدم شواهدی از بیماری بالینی در حیوانات (به جز نوزاد موش)، وقوع آن در طیف گسترده‌ای از مخازن حیوانی اهلی و وحشی از جمله اسب، الاغ، بز، گاو، گوسفند، خوک و جوجه تیغی گزارش شده است. از سال ۱۹۵۰ تا کنون اپیدمی‌های زیادی در مناطق مختلف رخ داده است. به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۸ در کشورهای ترکیه، سودان و بلغارستان، در سال ۲۰۰۹ در ایران، قزاقستان و تاجیکستان و ۲۰۱۷ در پاکستان شیوع گسترده ویروس (Out Break) گزارش شده است (۳، ۱۱). نرخ مرگ و میر بالا، انتقال توسط ناقلین بندپا، مشترک بودن بین انسان و دام و توزیع گسترده‌ی جغرافیایی از علل اهمیت این ویروس می‌باشد (۸). جمعیت نشخوارکنندگان سبک و سنگین استان خراسان جنوبی به ترتیب ۱۳۹۱۹۹۰ و ۳۴۸۰۷ راس دام می‌باشد که نقش قابل توجهی در اقتصاد و معیشت مردم منطقه ایفا می‌کند (۱۰). از طرف دیگر پرورش دام به روش‌های سنتی و نیمه صنعتی در استان رواج دارد. خراسان جنوبی ۴۶۰ کیلومتر مرز مشترک با کشور افغانستان دارد که بیماری‌های زیادی از جمله مالاریا، لشمانیوز، انسفالیت کنه‌ای و تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در آن اندمیک هستند (۹، ۱۵، ۲۶). هدف از مطالعه‌ی حاضر تعیین میزان شیوع آلودگی کنه‌های جمع‌آوری شده از برخی مناطق روستایی خراسان جنوبی به ویروس خونریزی دهنده تب کریمه کنگو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منطقه جغرافیایی و نمونه‌برداری: در این مطالعه از ۳۹۰ رأس دام شامل ۱۶۷ رأس گوسفند، ۲۰۵ بز، ۹ گاو و ۹ شتر، در چهار روستای نوفرست، حسن آباد، امیرآباد و شوکت آباد از شهرستان بیرجند در بازه زمانی تیر ۱۳۹۸، نمونه‌برداری صورت گرفت. استان خراسان جنوبی با مساحت ۱۵۱۱۹۳ کیلومتر مربع و آب و هوای گرم و خشک بین ۵۷ درجه و ۱ دقیقه تا ۶۰ درجه و ۵۷ دقیقه طول شرقی و ۳۰ درجه و ۳۲ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۳۶ دقیقه عرض شمالی قرار گرفته است. این استان از شمال با استان خراسان رضوی، از غرب با استان‌های یزد، اصفهان و سمنان، از شرق با کشور افغانستان و از جنوب با استان‌های سیستان و بلوچستان و کرمان هم‌مرز است. برای جداسازی کنه‌ها به صورت زنده، از نزدیک‌ترین مکان ممکن به پوست و با زاویه ۴۵ درجه جداسازی صورت گرفت و کنه‌ها در لوله‌های درب بسته قرار داده شدند. سپس اطلاعات مربوط به نوع دام، سن دام، جنس دام، منطقه جمع‌آوری، صاحب دام و تاریخ جمع‌آوری در جداول از پیش تهیه شده ثبت شد. کنه‌ها در فریزر ۲۰- نگهداری شده و پس از اتمام پروسه‌ی نمونه‌گیری، با حفظ زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه

دانشکده بهداشت دانشگاه تهران منتقل شدند. تشخیص بر اساس کلیدهای تشخیصی مورفولوژیک و استریومیکروسکوپ در حد جنس و گونه صورت پذیرفت (۲۵).

آزمایشات مولکولی برای تشخیص ژنوم ویروس: کنه‌ها به صورت جداگانه دو بار توسط PBS شسته و با هاون در ۲۰۰-۳۰۰ میکرولیتر PBS خرد شدند. RNA کل با استفاده از مینی‌کیت RNeasy QIAGEN مطابق با دستورالعمل‌های تأمین کننده استخراج شد. RNA استخراج شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره شد. سپس واکنش یک مرحله‌ای پلی‌مراز معکوس توسط کیت تک مرحله‌ای *QIAGEN* RT-PCR به شرح زیر انجام شد: ۲۸ میکرولیتر آب بدون RNase ، ۱۰ میکرولیتر بافر (۵x)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۲ میکرولیتر آنزیم مخلوط حاوی آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و Taq DNA پلیمراز و ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase با یکدیگر مخلوط شدند. سپس ۱ میکرولیتر آغازگر رو به جلو 5’ TGGACACCTTCACAAACTC-3’ و ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس 5’- GACAATTCCCTACACC-3’ به مخلوط واکنش اضافه شد تا قطعه ۵۳۶ جفت بازی در داخل بخش S ژنوم ویروسی تکثیر شود. آب مقطر استریل و RNA استخراج شده از یک نمونه سرم بیمار تأیید شده به ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو، به ترتیب به‌عنوان شاهد منفی و مثبت در همه آزمایشات استفاده شدند. برنامه سیکل‌های حرارتی برای RT-PCR ، شامل یک چرخه اولیه ۳۰ دقیقه‌ای در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA) و به دنبال آن ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای فعال سازی DNA پلیمراز Taq و غیر فعال کردن رونوشت بردار معکوس تعیین شد. سپس ۴۰ چرخه که هر کدام شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (جدا سازی دو رشته)، ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها) و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (تکثیر رشته‌ها) برای دستگاه ترموسایکلر انتخاب شد. پس از اتمام چرخه‌ها، یک تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز در ژل‌های آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شد (۱۴، ۲۱).

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون مجذور کای استفاده شد. همچنین سطح اطمینان ۹۵ درصد برای شیوع آلودگی ویروسی با استفاده از توزیع دوجمله‌ای محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد. سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

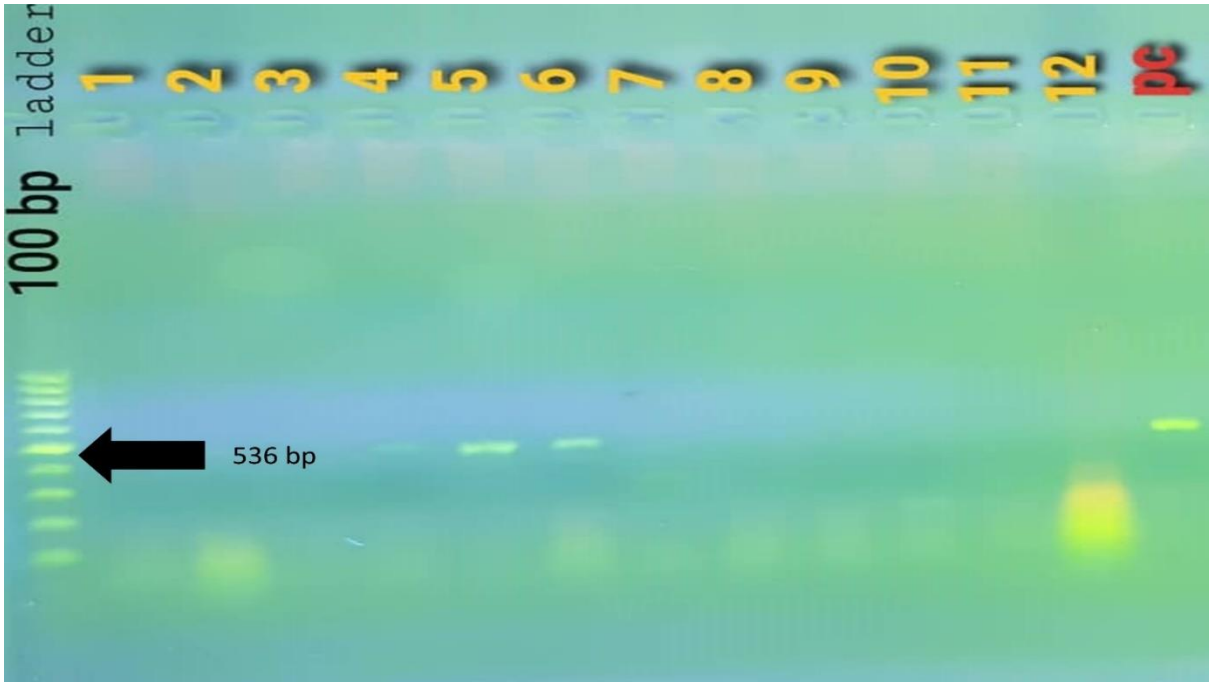
از ۳۹۰ رأس دام مورد بررسی، ۱۲۷ کنه جمع‌آوری شد. به طور متوسط میزان آلودگی به کنه برای هر رأس دام برابر با ۰/۳۲ می‌باشد. از کل کنه‌های جمع‌آوری شده ۳۵ کنه (۲۷/۳ درصد) از شتر، ۹ کنه (۷ درصد) از گاو، ۲۴ کنه (۱۸/۸ درصد) از بز و ۶۰ کنه (۴۶/۹ درصد) از گوسفند جدا گردید. از نظر طبقه‌بندی علمی دو جنس و هشت گونه کنه‌ای تشخیص داده شد. جنس‌های شناسایی شده شامل ۲۸ عدد *ریپیسفالوس* (۲۲ درصد) و ۹۹ عدد *هیالوما* (۷۸ درصد) وگونه‌ها شامل ۲۸ عدد *ریپیسفالوس سانگوئینوس* (۲۱/۹ درصد)، ۳۲ عدد *هیالوما دتریتیوم* (۲۵ درصد)، ۳ عدد *هیالوما مارژیناتوم* (۲/۴ درصد)، ۱ عدد *هیالوما آناتولیکوم* (۰/۸ درصد)، ۲ عدد *هیالوما آسیاتیکوم* (۱/۶ درصد)، ۵۵ عدد *هیالوما دورمداری* (۴۳ درصد) و ۶ عدد سایر *هیالوما* ها (۴/۷ درصد) بود. جدول شماره ۱ فراوانی جنس و گونه را بر اساس

میزبان نشان می‌دهد. فراوان‌ترین گونه در شتر، گاو و گوسفند *هیالوما درومداری* و در بز *ریپیسفالوس سانگوئینوس* می‌باشد. آزمون آماری نشان داد که شیوع آلودگی به کنه‌های مختلف در میزبان‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱. فراوانی جنس و گونه بر اساس میزبان

کنه	میزبان				مجموع
	شتر	گاو	بز	گوسفند	
ریپیسفالوس سانگوئینوس	-	-	۱۹	۹	۲۸
هیالوما دتریتیوم	۲	-	۰	۳۰	۳۸
هیالوما مارژیناتوم	۱	-	۱	۱	۳
هیالوما آناتولیکوم	-	-	۱	-	۱
هیالوما آسیاتیکوم	-	۱	۱	-	۲
هیالوما درومداری	۲۹	۶	۱	۱۹	۵۵
گونه های *هیالوما*	۳	۲	۱	-	۶
مجموع	۳۵	۹	۲۴	۵۹	۱۲۷

حضور ویروس در ۷ نمونه از ۴۴ نمونه (۱۵/۹ درصد) ارسال شده به آزمایشگاه مورد تأیید قرار گرفت. جنس‌هایی که در آنها حضور ویروس تأیید شد عبارتند از: *ریپیسفالوس سانگوئینوس*، *هیالوما دتریتیوم* و *هیالوما آسیاتیکوم*. لازم به ذکر است سایر گونه‌های ارسالی از نظر حضور ویروس منفی گزارش شدند. در این مطالعه از ۷ نمونه مثبت ۵ نمونه (۷۲ درصد) ماده و ۲ نمونه (۲۸ درصد) نر بودند. ۲ نمونه از ۷ نمونه‌ی مثبت از بز و ۵ نمونه باقی‌مانده نیز از گوسفند جدا شدند. از شتر و گاو به‌عنوان میزبان هیچ کنه‌ای از نظر حضور ویروس به تأیید نرسید (جدول ۴). همچنین هر ۷ نمونه مثبت از میزبانانی با سن کمتر از یک سال و جنسیت نر و مناطق کم ارتفاع و دشتی جمع‌آوری شدند. جدول ۳ نشان دهنده‌ی فراوانی نمونه‌های تست شده بر اساس گونه کنه‌ی جمع‌آوری شده می‌باشد.



شکل ۱- نتایج الکتروفورز در ژل برای شناسایی ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو، چاهک شماره ۱ کنترل منفی و PC کنترل مثبت

جدول ۳- فراوانی نمونه های تست شده بر اساس گونه کنه‌ی جمع‌آوری شده

کنه	حضور ژنوم CCHFV		مجموع	معنی‌داری
	مثبت	منفی		
ریپیسفالوس سانگوئینوس	۱	۵	۶	۰،۰۵۴
هیالوما دتریتیوم	۳	۷	۱۰	
هیالوما مارژیناتوم	-	۵	۵	
هیالوما آسیاتیکوم	۳	۳	۶	
هیالوما درومداری	-	۱۴	۱۴	
گونه های *هیالوما*	-	۳	۳	
مجموع	۷	۳۷	۴۴	-

جدول ۴- فراوانی ژنوم ویروسی در کنه‌های جمع‌آوری شده به تفکیک میزبان

میزبان	حضور ژنوم CCHFV		مجموع	معنی‌داری
	مثبت	منفی		
بز	۲	۴	۶	۰،۰۶۲
گوسفند	۵	۱۶	۲۱	
شتر	-	۱۵	۱۵	
گاو	-	۲	۲	
مجموع	۷	۳۷	۴۴	-

بحث

تب خونریزی دهنده کریمه کنگو یک عفونت ویروسی مشترک انسان و دام است که بیشتر توسط کنه بین میزبانان مهره‌دار منتقل می‌شود. در مطالعه‌ی چم پور و همکاران بر روی شترهای تک کوهانه استان‌های خراسان جنوبی، رضوی و شمالی مشخص شد درصد آلودگی کنه‌های جمع‌آوری شده از شترهای بیرجند ۳۵درصد می‌باشد در حالی که در مطالعه‌ی حاضر درصد کنه‌های آلوده جمع‌آوری شده ۱۵/۹ درصد است و هیچ شتر آلوده‌ای یافت نشده، بلکه آلودگی مربوط به سایر میزبان‌ها تشخیص داده شد (۵). علت این تفاوت را می‌توان به حجم نمونه بالاتر، تک میزبانه بودن و نمونه‌گیری توأم از شترهای صحرا و آغل در تحقیق چم پور و همکاران دانست. در استان یزد، سلیم آبادی و همکاران در سال ۲۰۰۸ اقدام به جمع‌آوری کنه‌ها از دام‌های اهلی نموده و پس از آزمایش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس ژنوم ویروس در ۵/۷۱ درصد کنه‌ها یافت شد که کمی کمتر از شیوع در استان خراسان جنوبی است (۲۷). جنس غالب در هر دو مطالعه هیالوما بود با این تفاوت که در استان خراسان جنوبی کنه‌های سخت *ریپیسفالوس* نیز با درصد کمتر از *هیالوما* از نظر حضور ویروس تأیید شدند. شایان ذکر است گونه غالب از نظر آلودگی به *ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو* در استان یزد *هیالوما درومداری* و میزبان اصلی گاو گزارش شد، درحالی که در مطالعه حاضر آلوده‌ترین گونه *هیالوما آسیاتیکوم* و آلوده‌ترین میزبان گوسفند بود. در کشورهای مختلف از جمله ترکیه مطالعات زیادی صورت گرفته است اما نکته حائز اهمیت آن که در سال‌ها و مناطق مختلف آلوده‌ترین میزبان متفاوت است (۴، ۲۰). مطالعات قبلی نشان داده است که میزان عفونت *هیالوما* و *ریپیسفالوس* در ایران به ترتیب از ۳۳-۰/۲درصد و ۵۵-۱/۸درصد است (۱،

۱۶، ۲۱، ۲۴). رابطه‌ی معنی‌داری از نظر حضور ژنوم ویروس با ارتفاع محل جمع‌آوری وجود داشت و تمام کنه‌های آلوده از یک منطقه دشتی جمع‌آوری شده بودند. همچنین عمده‌ی دام‌های آلوده در سنین یک تا سه سال قرار داشتند که این نتایج همسو با نتایج گذشته می‌باشد. در مطالعه‌ای که در بهار همدان انجام شد مشخص شد بیشترین سن دام‌ها از نظر آلودگی به ویروس بین یک تا سه سال می‌باشد و مناطق کم ارتفاع نیز آلوده‌تر هستند (۲۱). در بین سال‌های ۲۰۱۲-۲۰۱۱ در استان ایلام، شریفی‌نیا و همکاران میزان آلودگی در کنه‌های سخت را ۶/۶ درصد گزارش کردند. تمام کنه‌های جمع‌آوری شده‌ی جنس *هیالوما* مثبت بودند که نشان از اهمیت این جنس به‌عنوان ناقل بیماری در این منطقه دارد (۱۹). در مطالعاتی که در شهر زاهدان و استان لرستان در سال ۲۰۱۲ به انجام رسید آلودگی کنه‌های سخت به *ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو* به ترتیب ۳/۴ و ۶/۷ درصد گزارش شد (۱۲، ۱۴). فرهادپور و همکاران در سال ۲۰۱۳ با روش RT-PCR توانستند در ۹ نمونه از ۲۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از کنه‌های شهرستان مرودشت استان فارس، ژنوم ویروس را شناسایی کنند. محمدی و همکاران در همین سال ۸۵۱ کنه از استان کرمانشاه را جمع‌آوری کردند که از مجموع کنه‌های تست شده ۳/۸ درصد آلوده به ویروس بودند (۲، ۱۲). صداقت و همکاران در سال ۲۰۱۴ میزان آلودگی به ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در استان گلستان را ۵/۴ درصد گزارش کردند کنه‌های مثبت شامل *هیالوما* و *ریپیسفالوس سانگوئینوس* بودند (۱۷). همچنین در همین سال در غرب ایران (استان آذربایجان)، ۱۱۷ کنه توسط RT-PCR مورد بررسی برای حضور یا عدم حضور ویروس قرار گرفتند که ۵ درصد آنها آلودگی را در تست‌ها نشان دادند. کنه‌های آلوده متعلق به دو جنس هیالوما و درماسنتور بودند (۱۸). در مطالعه‌ای که در ۵۸ روستای استان کهگیلویه و بویر احمد توسط حسینی و همکاران انجام شد از میان کنه‌های جمع‌آوری شده تنها یک کنه متعلق به گونه‌ی *ریپیسفالوس بورسا* که از یک منطقه مرتفع سرد جمع‌آوری شده بود آلوده بود و در نهایت درصد آلودگی به ویروس در این مطالعه ۰/۲ محاسبه شد (۱۸). دام‌های اهلی استان خراسان شمالی در بین سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۷ به صورت تصادفی برای خون‌گیری و جمع‌آوری کنه انتخاب شدند. در این مطالعه که توسط ثقفی پور و همکاران انجام شد، ۸/۱ درصد از کنه‌ها و ۱۵/۵درصد نمونه‌های خون آلوده به ویروس هستند (۱۶). به طور کلی می‌توان اذعان داشت اصلی‌ترین ناقلین کنه‌ای در ایران جنس‌های *هیالوما* و *ریپیسفالوس* هستند و تفاوت در شیوع آلودگی ویروسی در کنه‌ها و گونه‌ی غالب هر منطقه به علت تفاوت در آب و هوا، پوشش گیاهی، فراوانی دامی، رفت و آمد دام‌ها، بهداشت و حساسیت میزبان‌ها بستگی دارد (۱، ۲۳). گونه غالب در مناطق روستایی خراسان جنوبی *ریپیسفالوس سانگوئینوس* و جنس غالب *هیالوما* می‌باشد. از نظر بررسی حضور ژنوم ویروس تب خونریزی دهنده تب کریمه کنگو، مشخص شد روستاهای این منطقه را می‌توان به‌عنوان کانون‌های آلودگی در نظر گرفت. آلوده‌ترین میزبان‌ها گوسفند و بز بودند و کنه‌های جمع‌آوری شده همه از مناطق کم ارتفاع بودند. ناقل اصلی مطابق با اکثر نقاط دنیا کنه‌ی *هیالوما* می‌باشد. البته جنس ریپیسفالوس که به‌عنوان ناقل دوم تب کریمه کنگو در ایران مطرح است نیز در این مطالعه از نظر حضور ژنوم ویروسی با درصدی کمتر از جنس *هیالوما* مورد تأیید قرار گرفت. بنابراین توصیه می‌شود سیاست‌های کنترلی و پایشی دام‌ها به همراه آگاهی بخشی به قشر پرخطر و در رابطه با ناقلین کنه‌ای مثل دامداران و

کشاورزان در این منطقه، با دقت بیشتری دنبال شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین و کادر بخش آربوویروس‌ها و تب‌های خونریزی دهنده ویروسی انستیتوپاستور نیز برای کمک‌های بی دریغشان کمال تشکر خود را اعلام می‌نماییم.

بودجه این پروژه به طور مشترک توسط دانشگاه زابل (UOZ-GR-9618-159 و UOZ-GR-9618-141) و اعضای تیم تحقیقاتی تأمین شد.

References

1- Abdoli, R. *et al.* The Distribution of Hard Ticks as a Vector of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in the Border Areas in the North West of Iran. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*, 2019; 17(1): 71–82.

2- Ahi, M.R., Pourmahdi Borujeni, mahdi, Haji Hajikolaei, M.R. and Seifi Abad Shapouri, M.R. A Serological Survey on Antibodies against Akabane Virus in Sheep in Southwest of Iran TT -. *Virusj*, 2015; 9(2): 20–25.

3- Alam, M.M. *et al.* Surveillance of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Pakistan. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017; 17(8): 806.

4- Albayrak, H., Ozan, E. and Kurt, M. Molecular Detection of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus (CCHFV) but not West Nile Virus (WNV) in Hard Ticks from Provinces in Northern Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 2010; 57(7-8): e156–e160.

5- Champour, M. *et al.* Crimean-Congo hemorrhagic fever in the one-humped camel (Camelus dromedarius) in East and Northeast of Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 2016; 10(2): 168.

6- Ergonul, O.rimean–Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Current Opinion in Virology*, 2012; 2(2): 215–220.

7- Ergonul, O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006; 6(4): 203–214.

8- Farhadpour, F. *et al.* Molecular detection of Crimean–Congo haemorrhagic fever virus in ticks collected from infested livestock populations in a New Endemic Area, South of Iran. *Tropical Medicine & International Health*, 2016; 21(3): 340–347.

9- Ignatiev, P. Afghanistan: Balancing between Pakistan and Iran. *Indian Journal of Asian Affairs*, : 2014; 43–62.

10- Iran, S. C. of. "Country livestock statistics". [Online] https://www.amar.org.ir/Portals/0/News/1396/a-dams96.pdf, 2017.

11- Kamboj, A. and Pathak, H. Crimean-Congo hemorrhagic fever: a comprehensive review. *Veterinary World*, 2013; 6(10).

12- Kayedi, M.H. *et al.* Crimean–Congo hemorrhagic fever virus clade iv (Asia 1) in ticks of western Iran. *Journal of Medical Entomology*, 2015; 52(5): 1144–1149.

13- Maltezou, H.C. *et al.* Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness. *Eurosurveillance*, 2010; 15(10): 19504.

14- Mehravaran, A. *et al.* Molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus in ticks from southeastern Iran. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2013; 4(1–2): 35–38.

15- Mustafa, M.L. *et al.* Crimean-congo hemorrhagic fever, Afghanistan, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 2011; 17(10): 1940.

16- Saghafipour, A. *et al.* Molecular and seroepidemiological survey on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus in Northeast of Iran. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 2019; 33: 41.

17- Sedaghat, M.M. *et al.* Vector prevalence and detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Golestan Province, Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*, 2017; 54(4): 353.

18- Shafei, E., Dayer, M.S. and Telmadarraiy, Z. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks in northwest of Iran. *J Entomol Zool Stud*, 2016; 4(5): 150–154.

19- Sharifinia, N. *et al.* Hard ticks (Ixodidae) and Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in south west of Iran. 2015.

20- Tekin, S., Bursali, A., Mutluay, N., Keskin, A. and Dundar, E. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in various ixodid tick species from a highly endemic area. *Veterinary Parasitology*, 2012; 186(3–4): 546–552.

21- Telmadarraiy, Z. *et al.* Crimean-Congo hemorrhagic fever: a seroepidemiological and molecular survey in Bahar, Hamadan province of Iran. *Asian J Anim Vet Adv*, 2008; 3(5): 321–327.

22- Telmadarraiy, Z. *et al.* A survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever in livestock and ticks in Ardabil Province, Iran during 2004–2005. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2010; 42(2): 137–141.

23- Telmadarraiy, Z., Chinikar, S., Vatandoost, H., Faghihi, F. and Hosseini-Chegeni, A. Vectors of Crimean Congo

hemorrhagic fever virus in Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 2015; 9(2): 137.

24- Telmadarraiy, Z., SAGHAFIPOUR, A., Farzinnia, B. and Chinikar, S. Molecular detection of Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus in ticks in Qom Province, Iran, 2011-2012.

25- Walker, A.R. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*. Bioscience Reports Edinburgh, 2003.

26- Wallace, M.R. *et al.* Endemic infectious diseases of Afghanistan. *Clinical Infectious Diseases*, 2002; 34(Supplement_5): S171–S207.

27- Yaser, S.A. *et al.* Crimean–Congo hemorrhagic fever: a molecular survey on hard ticks (Ixodidae) in Yazd Province, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2011; 4(1): 61–63.

Molecular detection of Crimean Congo hemorrhagic fever in tick vectors in rural areas of eastern Iran

Amirsajad Jafari[1], Mehdi Rasekh[2*], Dariush Saadati[3], Faezeh Faghihi[4], Mehdi Fazlali-pour[5], Sahar Khakifirouz[5], Tahmineh Jalali[5], Zahra Ahmadi[5]

1- Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Department of Nutrition and Animal Breeding, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5- Department of Arboviruses and Viral Hemorrhagic Fevers (National Ref Lab), Pasteur Institute of Iran (IPI), Tehran, Iran.

Receive: October 12, 2020; Revise: October 16, 2020; Accept: October 18, 2020

Summary

Crimean Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) is a deadly viral infection (mortality rate between 3 and 30%) reported from more than 30 countries. The disease is common between humans and animals and can be transmitted through tick bites, contact with blood and secretions or carcasses of infected animals and humans. The aim of this study was to determine the prevalence of CCHF virus in ticks isolated from domestic livestock in rural areas of Birjand City in South Khorasan Province. In this study, 390 livestock including 167 sheep, 205 goats, 9 cows and 9 camels were sampled in four villages (Nofarest, Hassanabad, Amirabad and Shaukatabad) of Birjand County. Eight species of hard ticks were identified, including *Rhipicephalus sanguineus* (21.9%), *Hyalomma detritium* (25%), *Hyalomma marginatum* (2.4%), *Hyalomma anatolicum* (0.8%), *Hyalomma asiaticum* (1.6%), *Hyalomma dromedarii* (43). %) and other *Hyalomma* (4.7%). The presence of virus was confirmed in 15.9% of the samples sent to the laboratory by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). The virus was observed in *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma detritium* and *Hyalomma asiaticum*. The most infected hosts were sheep and goats, and the ticks caught were all from lowland areas. The villages of this region can be considered endemic for CCHF. Therefore, it is recommended to follow controlling and monitoring policies in the region more carefully.

Keywords: *Crimean Congo Hemorrhagic Fever, Hard Tick, Birjand, RT-PCR*

مروری بر سموم قارچی مهم خوراک طیور، بیماری‌زایی و روش‌های از بین بردن آنها

احسان اسکوئیان[۱،۲*]، فاروق کارگر[۲،۳]، حسن کرمانشاهی[۴]، مهدی سالاری پور[۲،۵]

۱- شعبه مشهد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
۲- گروه تحقیق و توسعه شرکت دانش بنیان توسعه مکمل زیست فناور آریانا، مشهد، ایران.
۳- دانشجوی دکتری تخصصی تغذیه طیور، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۵- دانشجوی دکتری تغذیه دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ آبان ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۸ بهمن ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۵ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

فعالیت قارچها در محصولات کشاورزی باعث تولید سموم و ترکیبات شیمیایی در این محصولات می‌شود که تهدیدی جدی برای سلامت حیوانات و انسان‌ها بحساب می‌آید. از مهم‌ترین سموم قارچی موجود در این محصولات می‌توان به آفلاتوکسین B1 (Aflatoxin B1)، دئوکسی نیوالنول (Deoxynivalenol)، زرالنون (Zeralenone)، اکراتوکسین A (Ochratoxin A)، توکسین T2 (Toxin T2) و فومنسین B1 (Fumonisin B1) اشاره کرد. حضور این سموم در جیره حیوانات، منجر به افزایش تلفات، افزایش ضریب تبدیل غذایی، کاهش بازدهی تولید و در نهایت افزایش هزینه‌های تولید در صنعت پرورش طیور خواهد شد. روش‌های مختلفی برای مهار سموم قارچی پیشنهاد شده است که از جمله آنها می‌توان به استفاده از جاذب‌های معدنی، جاذب‌های آلی، میکروارگانیسم‌ها، متابولیت‌های میکروبی و ترکیبات گیاهی و یا به طور کلی ترکیبی از آنها (مهارکننده سموم قارچی چند جزئی) جهت مهار این سموم و بهبود عملکرد کبد و سیستم ایمنی اشاره نمود. به دلیل تفاوت ماهیت شیمیایی هر یک از سموم قارچی، استفاده از مجموعه مکانیسم‌های مختلف مهار بسیار مؤثرتر عمل نموده، از این رو استفاده از مهارکننده‌های سموم قارچی چند جزئی برای حذف سموم قارچی در جیره طیور منطقی‌تر به نظر می‌رسد. این پژوهش با هدف بررسی اثرات سموم قارچی مختلف در خوراک طیور و همچنین پیامدها و روش‌های مبارزه و مهار این سموم انجام شده است.

واژگان کلیدی: *مهارکننده سموم قارچی، ترکیبات گیاهی، تغییر شکل زیستی، آفلاتوکسین، زرالنون، اکراتوکسین، فومنسین*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: e.oskoueian@abrii.ac.ir

مقدمه

تأمین غذا و امنیت غذایی جایگاه مهمی در زندگی اجتماعی، اقتصادی و سیاسی کشورها دارد. در این راستا توجه به امنیت غذایی از جمله دغدغه‌های دستگاه‌های مسئول در سال‌های اخیر بوده است. امروزه به علت تغییرات اقلیمی امنیت غذایی انسان با تهدید جدی مواجه شده است؛ از جمله این تغییرات اقلیمی می‌توان به تغییر در میزان و تناوب بارندگی‌ها، خشکی، دما و افزایش دی‌اکسید کربن اشاره کرد که بر تولیدات کشاورزی تأثیرگذار بوده است. این تغییرات شدید اقلیمی، تنش زیادی بر گیاهان وارد نموده و با تضعیف سیستم ایمنی، آنها را مستعد آلودگی با قارچها به ویژه قارچهای تولید کننده سموم کرده است.

مایکوتوکسین‌ها ترکیبات شیمیایی حاصل از فعالیت بعضی از قارچها هستند که در محصولات کشاورزی ایجاد می‌شوند و با آلوده نمودن مواد غذایی موجب از بین رفتن ارزش غذایی و وارد شدن خسارات اقتصادی می‌شوند، از سوی دیگر مصرف محصولات آلوده به این سموم سلامت انسان را تهدید نموده و باعث جهش ژنتیکی، سرطان، ناقص الخلقه‌زایی و سرکوب یا تضعیف سیستم ایمنی می‌شوند. سموم قارچی تولید شده توان آلوده‌سازی محصولات کشاورزی قبل از برداشت و بعد از برداشت را دارا هستند. مدیریت صحیح کاشت و داشت مانند استفاده از بذور مقاوم، مبارزه با آفات و علف‌های هرز و تغذیه صحیح گیاهان می‌تواند آلودگی به قارچها و سموم آنها را تا حدودی کاهش دهد. عوامل دیگری نظیر زمان برداشت و انبارداری محصولات زراعی نیز از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده در آلودگی محصولات زراعی به قارچها و سموم قارچی است. متأسفانه امروزه به علت نبود دستورالعمل کامل و صحیح جهت کنترل و کاهش سموم قارچی در محصولات کشاورزی و از سوی دیگر توانایی رشد و نمو قارچهای مولد سموم قارچی در مرحله کاشت، داشت، برداشت و انبار، امکان افزایش آلودگی محصولات در تمامی مراحل وجود دارد.

سموم قارچی بسیار متنوع بوده و پیامدهای مختلفی را بر حیوانات به ویژه طیور تحمیل می‌کنند، وجود بیش از حد مجاز این سموم در جیره غذایی طیور می‌تواند به کاهش بازدهی تولید گوشت و تخم مرغ، بالا رفتن ضریب تبدیل و افزایش آسیب‌پذیری در برابر بیماری‌ها، تضعیف سیستم ایمنی، افزایش تلفات، کاهش عیار پادتن خون، عدم پاسخ مناسب به واکسیناسیون و کاهش بازدهی در جوجه درآوری منجر شود (۱۰، ۱۲، ۱۸، ۱۹).

روش‌های مختلفی نظیر کروماتوگرافی، طیف سنجی، و الایزا برای شناسایی و تعیین غلظت سموم قارچی وجود دارد که دارای دقت و حساسیت بالایی بوده اما پرهزینه و زمان‌بر هستند. بررسی‌های صورت گرفته تأییدکننده وجود مقادیر نسبتاً زیادی از سموم قارچی در محصولات زراعی نظیر ذرت، سویا و گندم تولید شده در کشور هستند (۱، ۲). ذرت، سویا و گندم حدود ۸۰ درصد از جیره طیور را تشکیل می‌دهند. کیفیت تغذیه حیوانات مزرعه‌ای به طور مستقیم بر سلامت و عملکرد آنها اثرگذار بوده و به طور غیرمستقیم بر سلامت انسان تأثیرگذار است. جیره نامناسب و آلوده به سموم قارچی خطر راهیابی این سموم قارچی به چرخه غذایی انسان را نیز فراهم می‌نماید (۳).

سموم قارچی

سموم قارچی متابولیت‌های سمی هستند که توسط قارچهای جنس *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*)، *فوزاریوم* (*Fusarium*)، *پنی سلیوم* (*Penicillium*)، *کلاویسپس* (*Claviceps*) و *آلترناریا* (*Alternaria*) تولید می‌شوند. بیش از ۲۰۰ گونه قارچی تولید کننده سم شناسایی شده‌اند که مهم‌ترین سموم آنها

شامل آفلاتوکسین‌ها (Aflatoxins)، فومونسین‌ها (Fumonisins)، اکراتوکسین‌ها (Ochratoxins)، تریکوتسن‌ها (Trichothecene) و زرالنون (Zearalenone) می‌باشند (۴). این سموم ترکیباتی هستند که در مقابل حرارت مقاوم بوده و توانایی ذخیره شدن در بافت‌های زیستی را دارا هستند. وزن مولکولی این ترکیبات در حدود ۰/۳ تا ۰/۷ کیلو دالتون است. تولید آفلاتوکسین در مواد غذایی ممکن است قبل از برداشت محصول یا بعد از آن در سطح مزرعه، در طول مدت ذخیره، حمل و نقل، در جریان فرآوری مواد خوراکی و حتی در ظروف خوراک‌دهی صورت پذیرد. سموم قارچی در مقابل فرآیندهای نظیر آسیاب نمودن، پختن و تخمیر مقاوم هستند و حضور آنها سبب کاهش ارزش غذایی خوراک می‌گردد و با صدمه به ترکیبات نیتروژنی و لیپیدی موجود در خوراک، می‌تواند مقدار پروتئین، انرژی و ویتامین‌های خوراک را کاهش دهد.

دمای بالای محیط و رطوبت از فاکتورهایی هستد که باعث رشد قارچ و تولید سموم قارچی می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها در اغلب اجزای خوراک دام و طیور تولید می‌شوند. پراکنش جهانی و وسعت آلودگی در سرتاسر جهان نگرانی‌های زیادی را در رابطه با این سموم ایجاد کرده است. به طوری که طبق گزارش سازمان خوار و بار جهانی بیش از ۲۵ درصد مواد خوراکی در جهان آلوده به انواع این سموم هستند. به دلیل شرایط انبارداری نامناسب، آلودگی به این سموم در شرایط ایران در برخی نقاط کشور بیش از میانگین جهانی است. نتایج چندین پژوهش داخلی آلودگی‌های خوراک‌های ایران را به سموم قارچی تأیید کرده است (۱، ۲). شیوع سرطان مری در مازندران و گلستان همبستگی مثبت با سطح بالای فومنسین و آفلاتوکسین در گندم، ذرت و برنج کشت شده در این مناطق نشان داده است (۵، ۶). سموم قارچی مهم در تغذیه دام، طیور و آبزیان شامل آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین‌ها، زرالنون، تریکوتسن‌ها و فومونیسین‌ها است که در ذیل به آنها اشاره شده است.

آفلاتوکسین‌ها

آفلاتوکسین‌ها شایع‌ترین و با اهمیت‌ترین سموم قارچی در صنعت خوراک دام و طیورهستند که خسارات اقتصادی و بهداشتی زیادی را در این صنعت به بار می‌آورند و کنترل آنها به روش‌های مختلف هدف تحقیقات بسیاری از محققین است. این سموم قارچی به وسیله برخی سویه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* (*A. Flavus*)، آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* (*A. parasiticus*) و *آسپرژیلوس نومینوس* (*A. nominus*) تولید می‌شود. چهار تیپ آفلاتوکسین عمده وجود دارد که عبارتند از B1، B2، G1 و G2 به علاوه دو تیپ دیگر نیز حائز اهمیت هستند که M1 و M2 نامیده می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها جزء سموم قوی برای همه حیوانات محسوب شده و در بعضی گونه‌ها سرطان‌زا می‌باشند. سازمان بین‌المللی تحقیقات سرطان‌شناسی، آفلاتوکسین‌ها را جز دسته اول ترکیبات سرطان‌زا در انسان نیز تقسیم‌بندی نموده است. آفلاتوکسین‌ها عامل اصلی ۴/۶ تا ۲۸/۲ درصد سرطان‌های کبد در سراسر دنیا هستند. آفلاتوکسین B1 سمی‌ترین نوع آنهاست (۷). اثر آفلاتوکسین‌ها روی حیوانات با مقدار، طول اثر آنها، گونه، نژاد و رژیم با توجه به وضعیت تغذیه‌ای حیوان متفاوت است. این سموم در صورت مصرف زیاد ممکن است باعث مرگ شوند و مقادیر کمتر باعث مسمومیت مزمن منتج به سرطان گردد، که عمدتاً به صورت اختلال در عملکرد کبد و در ادامه سرطان کبد در انواع حیوانات تظاهر می‌نماید.

به طور کلی حیوانات جوان‌تر بیش از حیوانات پیر به توکسین حساسیت نشان می‌دهند. از بین

تمام سموم قارچی آفلاتوکسین‌ها، سمی‌ترین نوع بوده و از نظر سرطان‌زایی بیشترین خطر را دارند. رشد قارچ‌ها و تولید آفلاتوکسین در رطوبت و حرارت افزایش می‌یابد. بر اساس پیشنهاد سازمان خوار و بار جهانی سطح آلودگی به مجموع آفلاتوکسین‌های G1، G2، B1، B2 در خوراک طیور نباید از ۰/۰۲ میلی‌گرم در کیلوگرم فراتر رود (۷). در واقع حساسیت به سطح مجاز آفلاتوکسین‌ها در خوراک طیور از این حقیقت ناشی می‌شود که این سموم می‌توانند با تغییر شکل شیمیایی وارد گوشت و تخم‌مرغ شوند و خوراک انسان را آلوده نمایند (۸).

آفلاتوکسین از نظر اقتصادی شایع‌ترین و با اهمیت‌ترین سموم قارچی در صنعت خوراک دام و طیور، در سراسر دنیا است که بر اثر رشد قارچها بر روی مواد غذایی مورد استفاده طیور نظیر دانه حبوبات، ذرت، تخم پنبه دانه ایجاد می‌شود. *آسپرژیلوس فلاووس* شایع‌ترین نوع این قارچها است و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* بیشترین میزان سم را تولید می‌کند. *آفلاتوکسین* معمولاً در دزهای بالا می‌تواند به طور مستقیم باعث تلفات شود، اما ضرر اقتصادی اصلی ناشی از آن، به علت کاهش رشد و افزایش ضریب تبدیل غذایی در مقادیر بالاتر از یک میکروگرم در کیلوگرم جیره است. *آفلاتوکسین* با تضعیف سیستم ایمنی، زمینه ساز ابتلا به بیماری‌هایی نظیر *سالمونلا*، *کوکسیدیوزیس*، بورس عفونی و *کاندیدیازیس* می‌باشد . علاوه بر این در پرنده بالغ موجب کاهش تولید تخم‌مرغ و جوجه درآوری شده و در خروس‌ها کاهش باروری اسپرم را به دنبال دارد (۹) و مهم‌تر آن که آفلاتوکسین و متابولیت‌های آن در چندین بافت خوراکی تجمع یافته و بدین ترتیب وارد زنجیره غذایی انسان شده و بهداشت و سلامت انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آفلاتوکسین‌ها ایمنی پرنده‌ها را تضعیف و منجر به شکست واکسیناسیون شده و از این طریق نیز موجب ضعف سیستم ایمنی و بروز بیماری خواهند شد(۹).

اکراتوکسین‌ها

این سموم به طور عمده توسط قارچ‌های *آسپرژیلوس اکراسئوس* (*Aspergillus ochraceus*)، *پنی‌سیلیوم وریکوسوم* (*Penicillium verrucosum*) و *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) تولید می‌شود. اکراتوکسین‌ها شامل انواع A، B و C هستند و آلودگی به آنها مسمومیت کبدی و کلیوی و سرکوب سیستم ایمنی را به دنبال دارد. در تحقیقی که توسط شیرازی و همکارن انجام شده است مشخص شده است که اکراتوکسین‌ها سمیت بیشتری نسبت به آفلاتوکسین‌ها دارند (۳). در میان اوکراتوکسین‌ها، اوکراتوکسین A که بسیار سمی بوده به طور عموم در اجزای خوراک طیور یافت می‌شود، که مقادیر بالای آن باعث صدمات شدید در کبد و کلیه حیوانات شده و اثر ناقص الخلقه‌زایی و سرکوب سیستم ایمنی در طیور را به همراه دارد (۱۰). وجود بیش از حد مجاز این سم در جیره غذایی طیور، کاهش وزن، ضریب تبدیل بالا، کاهش تولید تخم‌مرغ را به همراه دارد که عوارض و صدمات زیادی را به صنعت پرورش طیور وارد می‌کند. این سم برای انسان سرطان‌زا بوده و سیستم عصبی را با اختلال مواجه می‌کند. اکراتوکسین A از طریق گوشت و تخم‌مرغ قابلیت انتقال به انسان را داشته از این رو میزان سطح مجاز این سم در جیره طیور حداکثر ۰/۰۴ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک طیور گوشتی، تخم‌گذار و مادر تعیین شده است (۱۰).

زرالنون

زرالنون یک ترکیب استروژنیک (Estrogenic) است که به نام سم F2 نیز مرسوم است و توسط سویه‌های مختلف *فوزاریوم* (*Fusarium*) تولید می‌شود. زرالنون به طور طبیعی در ذرت و در اواخر

پاییز و زمستان که میزان رطوبت بالاتر است یافت می‌شود. میزان زرالنون در ذرت‌های کشت شده در ایران در حدود ۰/۰۱ تا ۱/۴۹ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش شده است. مقدار زرالنون در ذرت‌های تولید شده در کشورهای برزیل ۰/۰۴ تا ۱/۷ و آرژانتین ۰/۰۲ تا ۱/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش شده است (۱۱). حد مجاز زرالنون در جیره طیور ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره است و مقادیر بیش از این باعث تحریک پاسخ‌های فیزیولوژیک در بدن طیور می‌شود.

زرالنون از سمیت نسبتاً پایین‌تری برخوردار است و به دلیل شباهت ساختمانی با هورمون استروژن یک مایکواستروژن محسوب شده و در سطوح بین ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، رشد و تولید تخم‌مرغ را محدود می‌کند. همچنین در صورت افزایش غلظت به سطوح بالاتر از ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم در جیره، عملکرد سیستم تولید مثل را نیز با اختلال مواجه می‌کند. در این سطح زرالنون، طیور تخم‌گذار و مادر دچار عوارض ناشی از سطوح غیر متعارف استروژن، کیست‌های تخمدانی، کاهش تولید تخم مرغ، مشکلات تولید مثلی و ناباروری تخم مرغ‌ها و کاهش کیفیت اسپرم در خروس‌ها می‌شوند. این سموم قارچی اگر چه باعث مرگ و میر طیور نمی‌شود اما تأثیرات بیولوژیک شدیدی بر روی عملکرد تولید مثلی و اقتصادی طیور می‌گذارد. زرالنون در طیور تخم‌گذار کاهش وزن مخصوص تخم‌مرغ، کاهش ضخامت پوسته تخم مرغ، کاهش کیفیت محتویات تخم مرغ، اختلال در جذب کلسیم، کاهش مصرف خوراک و تولید تخم‌مرغ، التهاب بورس فابرسیوس (Bursa of fabricius)، ایجاد کیست‌های تخمدانی و لکوپنی (Leukopenia) می‌نماید. زرالنون می‌تواند از طریق مصرف ذرت و گندم آلوده به گوشت و تخم مرغ راه یافته و در نهایت به چرخه غذایی انسان راه یابد (۱۱).

تریکوتسن‌ها

سمومی هستند که توسط قارچ‌هایی از جنس *فوزاریوم*، *تریکودرما* (*Trichoderma*)، *تریکوتیسیوم* (*Trichothecium*)، *میروتسیوم* (*Myrothecium*)، *سفالواسپوریوم* (*Cephalosporium*)، *استاکی بوتریس* (*Stachybotrys*) و *ورتیسی مونواسپوریوم* (*Verticimonosporium*) تولید می‌شود. تریکوتسن‌ها به دو گروه A و B تقسیم می‌شوند که گروه A شامل T-2 toxin، HT-2 toxin و دی استوکسی اسکریپینول (Diacetoxyscirpenol) است و گروه B شامل deoxynivalenol، nivalenol و ۳-و 15-acetyldeoxynivalenol است. در بین این سموم، سم T2 بسیار کشنده بوده و حتی در جوجه‌های ۷ روزه این سم بسیار قوی‌تر از آفلاتوکسین عمل می‌کند. متوسط غلظت کشنده (Median lethal dose) این سم در خوراک ۶/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم است. با وجود این نیز سم T2 از اکراتوکسین A با متوسط غلظت کشندگی (LD_{50}) ۲/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم ضعیف‌تر است. متوسط غلظت کشندگی سم T2 در جیره طیور هفت روزه حدود ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن جوجه‌ها است (۱۲). سم T2 سنتز DNA، RNA، پروتئین و سیکل سلولی را مختل کرده و باعث ایجاد آپوپتوزیس می‌شود. همچنین این سم باعث سرکوب سیستم ایمنی شده و باعث نکروز و از بین رفتن سلول‌های B و T در غده تیموس، طحال و غدد لنفاوی طیور شده و از این طریق سبب افزایش حساسیت طیور در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شود. از سوی دیگر این سم با کاهش تیتر آنتی‌بادی در اثر واکسیناسیون در طیور بر سیستم ایمنی پرنده نیز تأثیر می‌گذارد. سم T2 با غلظت ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌تواند در دستگاه گوارش ایجاد خونریزی نموده و بافت دستگاه گوارش را نکروزه (Necrosis)

کند.

مشخص شده است که این سم در کبد باعث اختلال در عملکرد کبد و بروز استرس اکسیداتیو می‌شود. همچنین با تأثیر بر روی سیستم خون‌رسانی به مغز و اعصاب عملکرد این ارگان را نیز با اختلال مواجه می‌کند. به طور کلی می‌توان گفت وجود سم T2 در مقادیر بالاتر از حد تحمل پرنده بازدهی تولید، ضریب تبدیل، افزایش وزن و تولید تخم‌مرغ را مختل می‌کند. غلظت ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم از سم T2 میزان تخم‌گذاری را تا ۱۲/۵ درصد کاهش داده و با افزایش این غلظت به ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم میزان تخم‌گذاری تا ۶۸ درصد کاهش خواهد یافت (۱۲). براساس پیشنهاد سازمان خوار و بار جهانی سطح مجاز سموم T2، دئوکسی نیوالنول و دی استوکسی اسکریپینول در جیره طیور گوشتی به ترتیب ۲، ۰/۴ و ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره و در طیور تخم‌گذار و مرغ مادر ۵، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره می‌باشد. به طور کلی میزان تریکوتسن‌ها در جیره طیور نباید از ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره افزایش یابد. تریکوتسن‌ها در واقع خطرناک‌ترین سموم قارچی به لحاظ تأثیرات فیزیولوژیکی بر روی طیور به حساب می‌آیند. همچنین به دلیل دارا بودن ساختمان غیر قطبی، این سموم قارچی توسط باندرهای معدنی جذب نمی‌شوند و لزوماً باید از روش‌های تجزیه میکروبی و آنزیمی برای تخریب آنها استفاده شود (۱۲، ۱۳). حلقه‌های ۱۲ و ۱۳ اپوکساید عامل اصلی ایجاد سمیت در تریکوتسن‌ها هستند و باکتری‌هایی که توانایی تولید آنزیم‌های استراز دارند با تغییر شکل زیستی (Biotransformation) و تجزیه می‌توانند تریکوتسن‌ها را به ترکیبات غیر سمی تبدیل کنند (۱۴).

فومنسین‌ها

فومنسین‌ها غالباً توسط قارچ‌های جنس *Fusarium* و *Alternaria* تولید می‌شوند. این سموم دارای نوع B1، B2 و B3 هستند. گزارش‌های اخیر نشان داده که نوع B1 و B2 سمی بوده در حالی که نوع B3 سمیتی برای پرندگان ندارد. به طور معمول ذرت به عنوان یکی از اصلی‌ترین اجزای تشکیل دهنده جیره طیور حاوی ۱ تا ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم فومنسین است که این مقدار در برخی مواقع بین ۲۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش می‌یابد. غلظت‌های بالای ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فومنسین، کاهش اشتها، کاهش وزن و مشکلات استخوانی را در طیور در پی دارد. این سم در جیره طیور باعث اختلال در افزایش وزن روزانه، بالا رفتن ضریب تبدیل، اسهال، اختلال در عملکرد کبد، کلیه‌ها و سرکوب سیستم ایمنی می‌شود. همچنین فومنسین‌ها از طریق مهار سنتز اسفنگولیپیدها در سیستم عصبی، سبب تحلیل میلین، بافت پوششی اعصاب می‌شوند. فومنسین B1 با غلظت ۸/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره مرغ تخم‌گذار باعث ۱۰ درصد تلفات، ۲۰ درصد کاهش تولید تخم‌مرغ می‌شود.

اندازه‌گیری نسبت اسفنگونین (Sphinganine) به اسفنگوزین (Sphingosine) در سرم طیور نشانگر زیستی مناسبی برای بررسی تأثیر فومنسین در طیور محسوب می‌شود. میزان سطح مجاز فومنسین‌ها در طیور گوشتی ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و در طیور مادر و تخم‌گذار ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم است. جاذب‌هایی نظیر زغال فعال و هیدروآلومینوسیلیکات‌ها در حذف مؤثر فومنسین‌ها عملکرد خوبی نشان نداده‌اند (۱۵). تجزیه آنزیمی یا تغییر شکل زیستی (Biotransformation) یکی از بهترین روش‌ها برای از بین بردن سمیت فومنسین‌ها است . باکتری‌های سویه *یوباکتریوم* (*Eubacterium sp.*) با تولید آنزیم‌های استراز، توانایی تجزیه این سموم و تبدیل آنها به ترکیبات

غیر سمی را دارند. فومنسین در انسان ایجاد سرطان نموده، لذا احتمال انتقال بقایای فومنسین از طریق گوشت و تخم‌مرغ به انسان باید به حداقل میزان ممکن کاهش یابد (۱۶).

میزان حد مجاز سموم قارچی در خوراک طیور

سازمان فائو آخرین بار در سال ۲۰۰۳ میزان حد مجاز برای برخی از سموم قارچی در خوراک طیور در کشورهای مختلف را منتشر کرد. حد مجاز آفلاتوکسین‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین سموم قارچی خوراک طیور تقریباً در تمامی کشورهای جهان از جمله ایران مشخص شده است (جدول۱). اما متأسفانه اکثر کشورهای جهان برای سایر سموم قارچی خوراک طیور حد استانداردی را در نظر نگرفته‌اند و برای تعیین حد مجاز این سموم تنها می‌توان به تحقیقات و پژوهش‌هایی که به بررسی این سموم پرداخته‌اند مراجعه کرد (جدول ۲).

جدول ۱- میزان حد مجاز سموم قارچی در خوراک طیور در کشورهای مختلف بر اساس اطلاعات منتشر شده توسط سازمان FAO در سال ۲۰۰۳ (µg/kg)

کشور	آفلاتوکسین B1	آفلاتوکسین (B2، G1، G3)	داکسی نیوالنول	زرالنون	اکراتوکسین	سم T2	فومونسین B1، B2
اتریش	۵	۵	۱۰۰۰	*	*	*	*
برزیل	۵۰	۵۰	*	*	*	*	*
کانادا	۲۰	۲۰	۵۰۰۰	۳۰۰۰	۲۰۰۰	۱۰۰۰	*
کلمبیا	۲۰	۲۰	*	*	*	*	*
کوبا	۵	۵	۳۰۰	*	*	*	*
ایران	۱۰	۲۰	*	*	*	*	*
ژاپن	۲۰	*	۱۰۰۰	۱۰۰۰	*	*	*
آمریکا	۲۰	۲۰	*	*	*	*	*

*: اطلاعاتی منتشر نشده است

میزان حد مجاز سموم در اقلام مورد استفاده در خوراک طیور

سازمان فائو در سال ۲۰۰۳ همزمان با انتشار اطلاعات در مورد حد مجاز سموم قارچی در کل خوراک طیور میزان حد مجاز این سموم در برخی از اقلام مورد استفاده در خوراک را در کشور های مختلف نیز منتشر کرد (جدول۲).

مسمومیت و بیماری‌زایی سموم قارچی

سموم قارچی چهار نوع سمیت حاد (Acute toxicity)، مزمن (Chronic toxicity)، جهش‌زا (Mutagenic) و ناقص الخلقه‌زا (Teratogenic) در حیوانات ایجاد می‌کنند. مسمومیت حاد شایع‌ترین نوع مسمومیت با سموم قارچی بوده که آسیب‌های جدی کبدی یا کلیوی را به دنبال دارد که در موارد خیلی شدید می‌تواند به مرگ منجر شود. برخی از سموم قارچی توکسین‌های عصبی (Neurotoxins) هستند که در مقادیر کم باعث بروز لرزش در حیوانات شده اما در مقادیر بالاتر باعث صدمات دائمی مغز یا مرگ می‌گردند. اثرات طولانی مدت مقادیر کم سموم قارچی نیز متفاوت است. مهم‌ترین اثر مزمن اکثر سموم قارچی تولید سرطان خصوصاً در کبد می‌باشد.

جدول ۲- میزان حد مجاز سموم قارچی در اقلام مورد استفاده در خوراک طیور بر اساس اطلاعات سازمان فائو (۲۰۰۳) در کشورهای مختلف (µg/kg)

کشور	اقلام خوراک	آفلاتوکسین B1	آفلاتوکسین (G3 ،G1 ،B2)	داکسی نیوالنول	زرالنون	اکراتوکسین	سم T2	فومونسین B2 ،B1
بلاروس	ذرت	۵	*	*	۱۰۰۰	*	*	*
	گندم	۵	*	۷۰۰	۱۰۰۰	*	*	*
کانادا	گندم	۱۵	۱۵	۲۰۰۰	*	*	*	*
چین	ذرت	۲۰	*	۱۰۰۰	*	*	*	*
	سویا	۵	*	*	*	*	*	*
	گندم	۵	*	۱۰۰۰	*	*	*	*
کلمبیا	ذرت	۲۰	۲۰	*	*	*	*	*
ایران	ذرت	۵	۲۰	۱۰۰۰	۲۰۰	۵۰	*	۱۰۰۰
	کنجاله سویا و سایر کنجاله های روغنی	۵	۲۰	*	*	*	*	*
	گندم	۵	۲۰	۱۰۰۰	۲۰۰	۵	*	*
	پودر پر و پودر خون	۵	۲۰	*	*	*	*	*
	مواد معدنی و ویتامین‌ها	۱۰	۱۰	*	*	*	*	*
آمریکا	ذرت	۲۰	۲۰	۱۰۰۰۰	*	*	*	۳۰۰۰۰
	گندم	۲۰	۲۰	۱۰۰۰۰	*	*	*	*
	کنجاله کتان	۳۰۰	۳۰۰	*	*	*	*	*

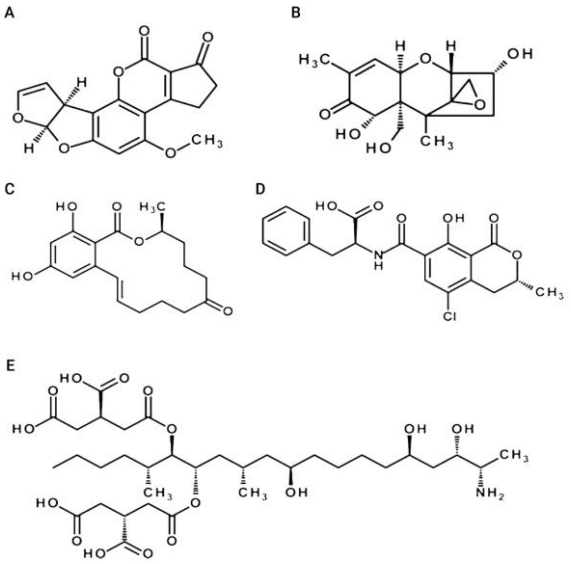
*: اطلاعاتی منتشر نشده است

بعضی از توکسین‌ها در همانندسازی DNA اثر گذاشته لذا اثرات جهش‌زائی و ناقص الخلقه‌زائی از خود به جای می‌گذارند. از عوارض سموم قارچی در طیور در شکل حاد می‌توان به کاهش بازده تولید گوشت و تخم‌مرغ، افزایش آسیب‌پذیری دربرابر بیماری‌ها، کاهش میزان رشد، کاهش کیفیت لاشه، کاهش وزن تخم‌مرغ، تضعیف سیستم ایمنی (که منجر به افزایش احتمال بروز کوکسیدز، عفونت خون (سپتی‌سمی) حاصل از کلی باسیل‌ها و بیماری سالمونلوز، کاهش تیترآنتی‌بادی خون و عدم پاسخ مناسب به واکسیناسیون می‌شود)، کاهش مصرف خوراک و یا توقف کامل آن، افزایش بروز مشکلات پا، سندرم افتادگی بال، افزایش مرگ و میر اشاره کرد (۱۷). از عوارض سموم قارچی در طیور در شکل مزمن می‌توان به افزایش حجم چربی کبد، کم‌خونی، کاهش زمان انعقاد، خون‌ریزی عمومی، اسهال آبکی و چرب، به هم خوردن متابولیسم چربی‌ها، افزایش وزن کبد، لاغری، کاهش تولید تخم‌مرغ، افزایش تخم مرغ‌های بی نطفه، پایین آمدن قدرت دفاعی بدن، تخریب سیستم‌های ایمنی بدن، عدم پاسخ لازم در برابر آنتی‌ژن‌ها و واکسن‌ها اشاره کرد (۱۳).

مهم‌ترین اثرات آفلاتوکسین‌ها در صنعت پرورش طیور

از مهم‌ترین اثرات آفلاتوکسین‌ها در پرورش طیور می‌توان به کاهش بازدهی تولید گوشت و

تخم‌مرغ و افزایش آسیب‌پذیری در برابر بیماری‌ها، تضعیف سیستم ایمنی، افزایش تلفات، کاهش عیار پادتن خون و عدم پاسخ مناسب به واکسیناسیون و کاهش بازده تولید مثل، تولید تخم‌مرغ و کاهش جوجه درآوری اشاره کرد. همچنین آفلاتوکسین B1 باعث افزایش فعالیت درون سرمی آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز می‌شود (۱۸، ۱۹).



شکل ۱- ساختار شیمیایی مهم‌ترین سموم قارچی که تولیدات طیور و به دنبال آن سلامت انسان را تهدید می‌کنند.
A: Aflatoxin B_1, B: Deoxynivalenol, C: Zeralenone, D: Ochratoxin A, E: Fumonisin B_1

گوشت و تخم‌مرغ آلوده به سموم قارچی از منابع خطرناک سرایت سموم قارچی به انسان محسوب می‌شوند. انواع اختلالات و بیماری‌های حاصل از مایکوتوکسین‌ها در حیوانات و انسان در جدول ۳ خلاصه شده است.

جدول ۳- اثر سموم قارچی مهم در حیوانات و انسان‌ها

نوع سموم قارچی	قارچ تولید کننده	اثر بر روی طیور
آفلاتوکسین B1	*A. flavus*, *A. parasiticus*	اختلال عملکرد کبد، سرطان‌زا، تراتوژن
داکسی نیوالنول	*F. graminearum* *F. sporotrichioides*	سرکوب سیستم ایمنی، ضایعات دستگاه گوارش، ادم، تغییرات بیوشیمیایی خون
زیرالنون	*F. graminearum*	اثرات استروژنیک، تحلیل تخمدان و بیضه‌ها، کاهش باروری
اکراتوکسین A	*A. ochraceus* *P. verrucosum*	اختلال در عملکرد کبد و کلیه، سرکوب سیستم ایمنی
مومنسین B1 و B2	*F. verticillioides* *F. proliferatum*	ادم تنفسی، اختلال دستگاه عصبی، اختلال در عملکرد کبد و کلیه

اثرات هم‌افزایی سموم قارچی

اغلب غلظت هر یک از سموم قارچی برای کاهش تولید یا وقوع بیماری در خوراک، کمتر از آن چیزی است که در مطالعات انجام شده، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این زمینه تأثیرپذیری حیوانات از یک نوع سم قارچی کمتر از اثر دو نوع آنها به همراه هم است. حضور انواع مختلف سموم قارچی در خوراک ممکن است سبب ایجاد تداخل و هم‌افزایی بین انواع سموم قارچی گردد. اثرات هم‌افزایی زمانی رخ می‌دهد که اثر دو سم قارچی بیشتر از اثر هر یک از آنها به تنهایی باشد. در شرایط مزرعه، حیوانات در معرض ترکیبی از سموم قارچی هستند که از سویه‌های مختلف *Fusarium*، *Aspergillus*، *Penicilium*، *Alternaria* و *Claviceps* منشأ می‌گیرند. بازدهی پایین و بیماری‌های پیچیده می‌تواند از نشانه‌های وجود سموم قارچی در جیره حیوانات باشد. سموم قارچی که از *فوزاریوم*‌ها منشأ می‌گیرند مانند تریکوتسن‌ها، خواص هم‌افزایی دارند به‌طوری که دئوکسی نیوالنول با فوزاریک اسید (Fusaric acid) و دئوکسی نیوالنول با فومنسین B1 و دی استوکسی اسکریفنول (Diacetoxyscirpenol) با آفلاتوکسین‌های مهم خواص هم‌افزایی نشان داده‌اند (۲۰). به طور کلی مسمومیت با سموم قارچی در غلظت‌های پایین‌تر از غلظت قابل تشخیص خیلی به ندرت اتفاق می‌افتد. تنها علت این امر خواص هم‌افزایی بین سموم قارچی است که با غلظت بسیار پایینی و غیر قابل تشخیص، مسمومیت ایجاد می‌کنند.

جدول ۴- خواص سینرژیستی و افزایشی بین سموم قارچی (۲۱)

سموم قارچی	نوع حیوان	خواص
AFB1 + OTA	مرغ گوشتی	سینرژیستی
AFB1 + T-2 toxin	مرغ گوشتی	سینرژیستی
AFB1 + DAS	مرغ گوشتی	سینرژیستی
AFB1 + CPA	مرغ گوشتی	سینرژیستی
OTA + CPA	مرغ گوشتی	افزایشی
Citrinin + OTA	مرغ گوشتی	سینرژیستی
PCA + OTA	مرغ گوشتی	سینرژیستی
FA+ FB1	مرغ گوشتی	سینرژیستی
MON + FB1	مرغ گوشتی	افزایشی
T-2 toxin + DON	مرغ گوشتی	سینرژیستی
T-2 toxin + OTA	مرغ گوشتی	افزایشی

AFB1:آفلاتوکسین بی وان ;OTA : اکراتوکسین آ ;DAS : دی استوکسی اسکریپنول ;DON: داکسی نیوالنول;FB1: فومنسین بی وان; CPA: سیکلوپیازونیک اسید; MON: مونیلی فرمین; PCA: پنیسیلیک اسید; FA: فوزاریک اسید ZON: زیرالنون.

تأثیرات هم‌افزایی آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین Aدر مطالعات متعددی در طیور مورد بررسی قرار گرفته است. آفلاتوکسین B1 به‌عنوان یک سم کبدی و اکراتوکسین A به‌عنوان یک سم عصبی به‌طور همزمان در جوجه‌های گوشتی اثرات هم‌افزایی ایجاد می‌کنند (۲۲). اختلالات عصبی حاصل از حضور همزمان این دو سم قارچی در کبد جوجه‌های گوشتی نسبت به زمانی که فقط آلودگی

به اکراتوکسین A وجود دارد به شکل معنی‌داری بیشتر است. زمانی که خوراک جوجه‌ها از یک روزگی تا ۳ هفتگی دارای ترکیب سموم آفلاتوکسینی و اکراتوکسین A باشد، افزایش در وزن سنگدان و کلیه‌ها و کاهش در وزن‌گیری نسبت به زمانی که هریک از این سموم به تنهائی در جیره وجود دارد، مشاهده شده است(۲۲). اثرات هم‌افزایی در بین سموم آفلاتوکسین B1 و T-2 نیز مشاهده شده است. هر دو نوع سم، ساخت پروتئین‌ها را با دو مکانیسم متفاوت تحت تأثیر قرار می‌دهند که نهایتاً سبب پاسخ هم‌افزایی یکسانی می‌شود. کاهش وزن در جوجه‌های گوشتی ۲۱ روزه در حضور آفلاتوکسین در جیره ۱۶ درصد بود که این کاهش وزن در جوجه‌های دریافت کننده جیره آلوده به دی استوکسی اسکریپینول در حدود ۱۱ درصد گزارش شد. جوجه‌هایی که جیره آنها به‌طور همزمان به آفلاتوکسین و دی استوکسی اسکریپینول آلوده شده بود میزان کاهش وزن ۳۶ درصد گزارش شده است که نشان‌دهنده اثرات هم‌افزایی بین این دو سم است (۲۳).

کنترل مایکوتوکسین‌ها

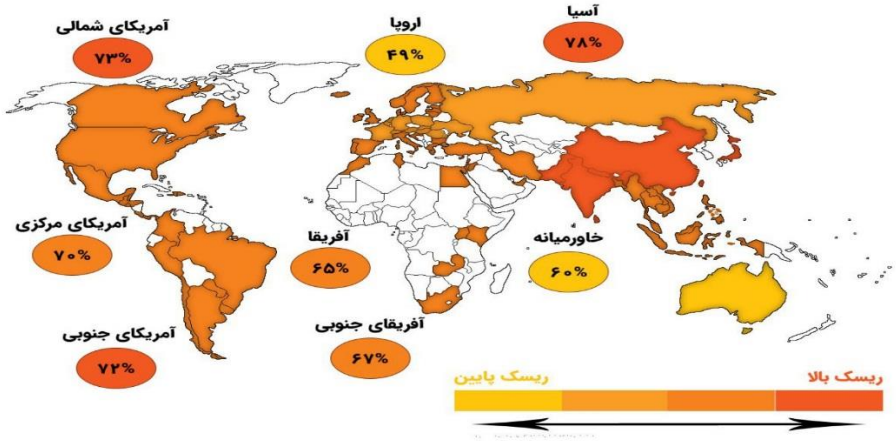
در واقع جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و خوراک به مایکوتوکسین‌ها اجتناب‌ناپذیر است، به‌ویژه عدم نظارت کامل در مراحل کاشت، داشت، برداشت و انبارداری محصولات زراعی شرایط را برای رشد قارچ‌ها و در نتیجه آلودگی با سموم قارچی فراهم می‌کند. به همین دلیل، سیاست‌های مختلفی در جهت به حداقل رساندن اثرات سوء سموم قارچی بر حیوانات مزرعه و نیز پیشگیری از انتقال آن به انسان صورت گرفته است (۲۴). از روش‌های مهار سموم قارچی می‌توان به استفاده از جاذب‌های معدنی (به‌صورت تک جزئی و یا ترکیبی از آنها)، جاذب‌های آلی، میکروارگانیسم‌ها، متابولیت‌های میکروبی، استفاده از ترکیبات گیاهی جهت بهبود عملکرد کبد و سیستم ایمنی (به‌صورت چند جزئی) اشاره نمود. به دلیل تفاوت ماهیت شیمیایی هر یک از سموم قارچی، استفاده از مجموعه مکانیسم‌های مختلف مهار، بسیار مؤثرتر عمل نموده از این رو استفاده از مهارکننده‌های سموم قارچی چند جزئی برای حذف مؤثر سموم قارچی در جیره طیور ضروری به نظر می‌رسد. حداکثر مجاز سموم قارچی در جیره طیور بر اساس استانداردهای اتحادیه اروپا (۲۰۱۳) در جدول ۵ گزارش شده است (۲۵).

جدول ۵-.حداکثر میزان مجاز سموم قارچی در جیره طیور بر اساس استانداردهای اتحادیه اروپا (۲۶)

سموم قارچی	نوع حیوان	مقدار
آفلاتوکسین B1 (mg/kg)	طیور جوان	۰/۰۰۵
آفلاتوکسین B1 (mg/kg)	طیور بالغ	۰/۰۲
داکسی نیوالنول (µg/kg BW)	طیور بالغ و نابالغ	۸
زیرالنون (µg/kg BW)	طیور بالغ و نابالغ	۲
اکراتوکسین A (mg/kg)	طیور بالغ	۰/۰۴
فومنسین B1 و B2 (µg/kg BW)	طیور بالغ و نابالغ	۲
سم T2 (µg/kg BW)	طیور بالغ و نابالغ	۲

نتایج بررسی‌های سال ۲۰۱۹ شرکت بیومین که بر روی ۱۸۴۲۴ نمونه از اجزای تشکیل‌دهنده خوراک حیوانات (ذرت، سویا، گندم، جو، گلوتن ذرت) از ۷۹ کشور در آسیا، اروپا، آمریکای شمالی، آمریکای مرکزی و جنوبی، آفریقای جنوبی و خاور میانه از جمله ایران صورت گرفته نشان داد که ۶۷

درصد نمونه‌ها با سموم قارچی آلوده بودند. میزان سموم قارچی نمونه‌ها در قاره‌های مختلف متفاوت بود. در آمریکای شمالی ۷۳ درصد، آمریکای مرکزی ۷۰ درصد، اروپا ۴۹ درصد، آمریکای جنوبی ۷۲ درصد، آفریقا ۶۵ درصد، آفریقای جنوبی ۶۷ درصد، آسیا ۷۸ درصد و خاور میانه ۶۰ درصد از نمونه‌های آنالیز شده حداقل به یکی از سموم قارچی آلوده بودند که در همه این موارد سموم قارچی غالب فومونسین B1 و داکسی نیوالنول بود. با در نظر گرفتن حد مجاز داکسی نیوالنول ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، زرالنون ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، اکراتوکسین A، ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، آفلاتوکسین B1، ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم، فومنسین B1، ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و سم T2، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌توان نتیجه گرفت که کشورهای خاور میانه ازجمله ایران جز کشورهای با ریسک آلودگی نسبتاً بالا طبقه‌بندی می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که آلودگی خوراک به سموم قارچی در خاور میانه بیش از حد مجاز بوده که بیشتر فومنسین B1 و داکسی نیوالنول را شامل می‌شوند (۲۷).



شکل ۲- میزان آلودگی نمونه‌های خوراک دام و طیور در نقاط مختلف دنیا در سال ۲۰۱۹(۲۷)

علاوه بر نتایج گزارش شده توسط شرکت بیومین، بررسی منابع داخلی نیز نشان می‌دهد که ذرت، گندم و جو تولید شده در کشور نیز حاوی مقادیر متفاوتی از سموم قارچی آفلاتوکسین B1، اکراتوکسین A، سم T-2، فومنسین B1، داکسی نیوالنول و زرالنون هستند شکل (۴). وجود غلظت‌های اندازه‌گیری شده سموم در مواد خوراکی که به مصرف طیور می‌رسد؛ میزان آلودگی با ریسک نسبتاً بالا را تأیید می‌کند.

جدول ۶- آلودگی اجزای اصلی جیره طیور به سموم قارچی در کشور ایران (میلی‌گرم در کیلوگرم) (۲۸-۳۳)

	AFLB1[۱]	OTA[۲]	T2[۳]	FUM[۴]	DON[۵]	ZON[۶]
ذرت	۰/۳۱۶ - ۰/۰۱۵	۰/۰۰۲-۰/۳۵		۰/۲-۱۶۷	۰/۰۵۴-۵/۱۸	۰/۰۱-۱/۴۹
گندم	۰/۰۸ - ۰/۰۰۳	۰/۲-۰/۰۰۱	۰/۰۲۷-۰/۴۶	۱۶/۵۶-۲۳/۳۴	۰/۰۱۷-۲/۳۹	۱/۹۸-۰/۰۰۲
جو	۰/۰۰۵ - ۰/۰۰۰۴۸	۰/۰۶۵-۰/۰۰۴	۰/۰۱۸			

[۱] آفلاتوکسین B1، [۲] اکراتوکسین A، [۳] سم T2، [۴] فومنسین B1، [۵] داکسی نیوالنول، [۶] زرالنون

قبل از استفاده از مهارکننده‌های سموم قارچی نیاز به شناسایی دقیق نوع سموم قارچی ضروری است تا با انتخاب درست مهارکننده روش مناسب جهت مبارزه با سموم قارچی اتخاذ شود. برای مهار و سم‌زدایی از سموم قارچی مختلف از ترکیبات و روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود.

جاذب‌ها

از روش‌های رایج کنترل سموم قارچی می‌توان به استفاده از جاذب‌ها اشاره کرد. جاذب‌ها به دو نوع معدنی و آلی تقسیم می‌شوند. معروف‌ترین جاذب‌های معدنی هیدروآلومینوسیلیکات‌ها نظیر زئولیت و بنتونیت می‌باشند. از جاذب‌های آلی می‌توان به کربن فعال (Activated carbon) و دیواره مخمر اشاره نمود (۳۴).

جاذب‌های معدنی

جاذب‌های معدنی به‌طور فیزیکی و یا از طریق بار الکترواستاتیکی به سموم قارچی متصل می‌شوند و در نتیجه مانع جابجایی آنها در دستگاه گوارش و در پی آن کاهش زیست فراهمی (Bioavailability) آنها می‌گردند. ترکیبات سدیم، کلسیم و آلومینوسیلیکات هیدراته مانند زئولیت و بنتونیت به‌عنوان مؤثرترین نوع از این گروه مواد شناخته شده‌اند (۳۵). درصورت ترکیب این مواد با غذای مصرفی، جذب آفلاتوکسین به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. ولی اثربخشی این مواد در مقابل سموم زرالنون، اکراتوکسین A، فومونسین B1 بسیار کم و محدود بوده و در مقابل سموم دئوکسی نیوالنول و T-2 به کلی فاقد اثر محافظتی می‌باشد. جاذب‌های معدنی حداکثر فعالیت خود را مستقل از pH و با ۰/۵ تا ۱/۵ کیلوگرم در هر تن جیره و بدون نیاز به حذف بخشی از مواد غذایی جیره اعمال می‌نمایند.

چنانچه میزان آلودگی جیره با این سموم بسیار بالا باشد، افزایش میزان مواد جاذب در جیره تأثیر چندانی نخواهد داشت و در عین حال ممکن است ویتامین‌ها و مواد معدنی موجود در جیره مواد خوراکی را جذب نموده و از دسترس حیوان خارج نماید. برخی از محققین در زمان استفاده از بنتونیت حتی در غلظت‌های پایین (۱/۵ درصد) اثرات منفی مشاهده نمودند. بنتونیت علاوه بر مهار سموم قارچی با داروها، ویتامین‌ها و مواد معدنی داخل جیره وارد واکنش شده و با ایجاد کمپلکس، قابلیت دسترسی این ترکیبات را برای حیوان کاهش می‌دهد. بنتونیت همچنین اثرگذاری ترکیبات ضد کوکسیدیوز را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۷). همان‌طورکه اشاره شد بنتونیت و زئولیت در جذب آفلاتوکسین‌ها مؤثر هستند ولی در جذب سموم فوزاریومی نظیر فومنسین‌ها و تریکوتسن‌ها و زرالنون ناتوان می‌باشند (۳۶).

جاذب‌های آلی

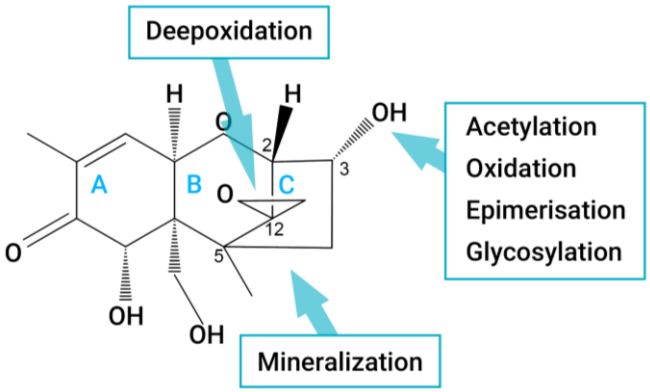
کربن فعال شده یکی از رایج‌ترین مواد جاذب است که دارای ظرفیت جذبی بالا می‌باشد. کربن فعال شده به‌عنوان یک مهارکننده آلی سموم قارچی شناخته می‌شود. کربن فعال نامحلول در آب، متخلخل و سطح جذب فعال بین ۵۰۰ تا ۳۵۰۰ متر مربع بر گرم دارد. این خصوصیات، کربن فعال را به جاذب خوبی برای سموم قارچی تبدیل کرده است. عامل محدود کننده اصلی استفاده از کربن فعال در جذب سموم قارچی، جذب مواد معدنی توسط آنها و کاهش قابلیت دسترسی مواد مغذی در دستگاه گوارش می‌باشد. دیواره مخمر نیز با داشتن پپتیدوگلیکان‌ها و پلی‌ساکاریدها در دیواره سلولی توانایی جذب سموم قارچی را دارد. مانان الیگوساکاریدهای تشکیل‌دهنده دیواره مخمرها به طور چشمگیری آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین A و سم T-2 را مهار می‌کنند (۳۷). مانان‌ها و بتاگلوکان‌های موجود در دیواره سلولی مخمرها می‌توانند اکراتوکسین‌ها را بین ۳۲ تا ۹۸ درصد

کاهش دهد دیواره سلولی مخمر علاوه بر اکراتوکسین، زرالنون را نیز جذب می‌کند (۳۸).

سم‌زدایی زیستی از سموم قارچی به‌وسیله تغییر شکل زیستی با استفاده از میکرواگانیسم‌ها

گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که سم‌زدایی زیستی از سموم قارچی به وسیله تغییر شکل زیستی (Biotransformation) برای سم‌زدایی سموم قارچی که در مقابل سیستم جذب مقاوم هستند، یکی از بهترین روش‌ها است. این مکانیسم به نام تجزیه آنزیمی نیز معروف بوده و استفاده از مهارکننده‌هایی که از این تکنولوژی برخوردارند بسیار موفقیت آمیز بوده است. به طور مثال باکتری غیر بیماری‌زایی از جنس *Eubacterium* با تولید گروهی از آنزیم‌ها، به‌طور اختصاصی باعث شکاف گروه‌های اپوکسی ۱۳ و ۱۲ گروه تریکوتسن شده و در نتیجه منجر به خنثی شدن اثرات سمی آنها می‌گردد. قابلیت سم‌زدایی این باکتری در مطالعات آزمایشگاهی و هم در مطالعات بر روی موجود زنده به اثبات رسیده است. علاوه بر آن مخمری بنام *Tnichosporom mycotoxinovorans* برای خنثی نمودن سموم زرالنون و اکراتوکسین A به طور مؤثری گزارش شد. در مطالعات مزرعه‌ای مصرف این مخمر در جیره غذایی حیوان باعث کاهش ضریب تبدیل و افزایش وزن‌گیری گردیده و موارد بروز اسهال و تلفات نسبت به گروه کنترل مثبت بسیار کمتر بوده است. درکل باکتری‌هایی نظیر *Bacillus sp.* و *Eubacterium sp.* و مخمرهایی مانند *Saccharomyces* sp.، *Trichomonascus* sp. و *Trichosporon* sp. در جذب، تجزیه و تغییر شکل زیستی (Biotransformation) سموم قارچی بسیار مؤثر هستند (۳۹).

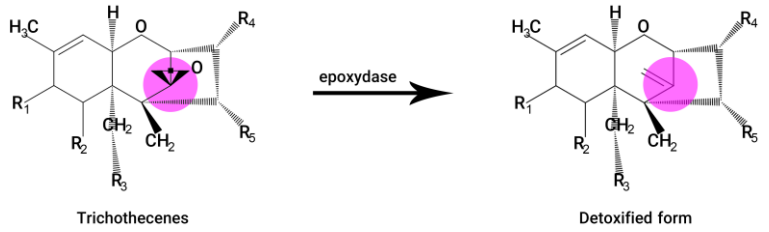
این میکروارگانیسم‌ها از طریق تولید آنزیم‌ها و افزودن گروه استیل، متیل و یا هیدروکسیل، اکسیداسیون و احیا، افزودن هیدروژن با دوباندهای کربن-کربن، استری نمودن، افزودن مواد معدنی به ساختار شیمیایی، حذف آمین‌ها از ساختار سموم، افزودن اکسیژن، افزودن قند به ساختار شیمیایی، همپاری یا تبدیل به ایزومرهای غیر سمی، و شکستن حلقه‌های ساختاری می‌توانند سموم قارچی را به ترکیبات غیر سمی تبدیل کنند (شکل‌های ۳، ۴ و ۵) (۳۷، ۴۰).



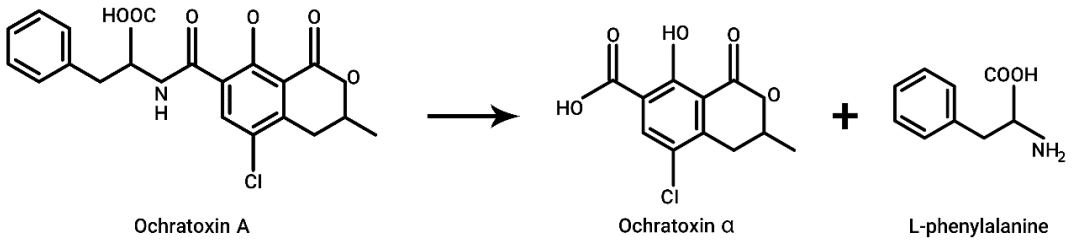
شکل ۳- سم زدایی خوراک از تریکوتسن‌ها با تغییر شکل زیستی (۴۰)

سموم قارچی که آب گریز بوده و غیر قابل یونیزه شدن هستند مانند تریکوتسن‌ها و زرالنون از طریق جاذب‌ها مهار نمی‌شوند و تنها از طریق میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده می‌توان آنها را

سم‌زدایی نمود. تاکنون به خوبی شناخته شده است که حلقه ۱۲، ۱۳-اپوکسید تریکوتسن‌ها عامل سمیت آنهاست و احیای این حلقه توسط آنزیم‌ها یا میکروب‌های زنده سبب کاهش اثرات سمی آنها می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴- سم‌زدایی خوراک از تریکوتسن‌ها توسط آنزیم اپوکسیداز میکروبی (۴۰)



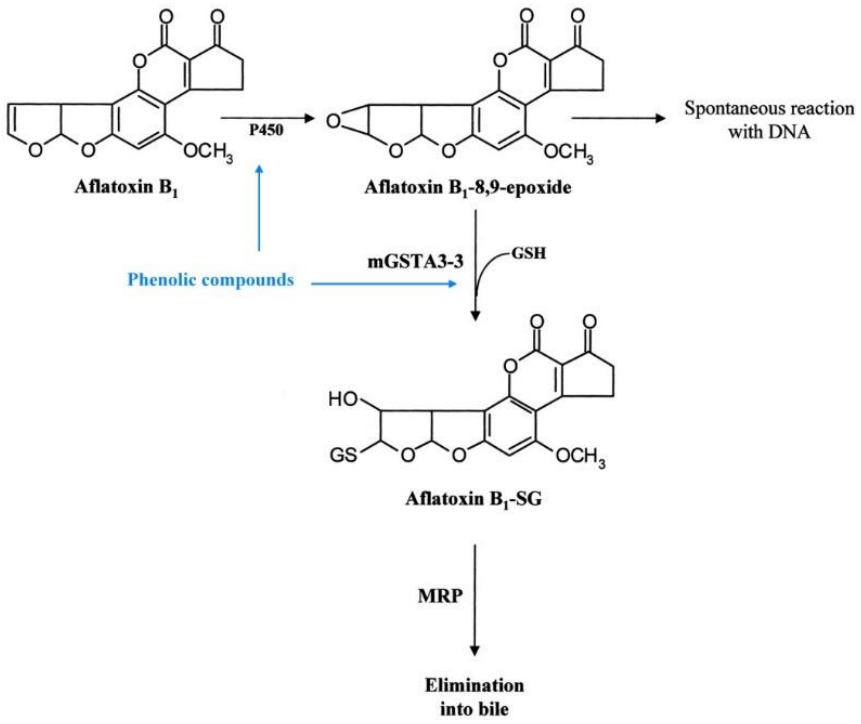
شکل ۵- سم زدایی خوراک از اکراتوکسین A توسط آنزیم میکروبی(۴۱)

استفاده از ترکیبات خاص گیاهی

امروزه با توجه به وجود مقادیر بالای سموم قارچی در مواد غذایی و از طرفی اثرات هم‌افزایی (synergism)بین آنها که باعث تشدید اثرات مضر آنها می‌شود، استفاده از ترکیبات گیاهی می‌تواند برای کاهش اثرات ناشی از سرکوب سیستم ایمنی، آسیب بافتی و التهاب به کار گرفته شود. لذا گیاهانی بدین منظور انتخاب می‌شوند که جزو گیاهان محرک سیستم ایمنی بوده و موجب افزایش سطح سیستم ایمنی بدن شوند. علاوه بر این ترکیبات گیاهی با داشتن خواص ضد قارچی مانع از رشد و تولید سموم قارچی در دستگاه گوارش نیز می‌شوند. ترکیبات گیاهی با ایجاد اختلال در دیواره سلولی قارچها باعث از بین رفتن آنها شده و تولید سموم قارچی را کاهش می‌دهند. در بین ترکیبات گیاهی ترکیبات فنولیک و فلاونوئید با باند شدن با سموم قارچی اثرات سمی این ترکیبات را کاهش می‌دهند. از طرفی این ترکیبات گیاهی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی عملکرد سیستم ایمنی و کبد را در حیوان افزایش می‌دهند. تقویت و تحریک سیستم ایمنی و افزایش پاسخ‌های ایمنی طبیعی بدن، این توان را به حیوان می‌دهد تا به مبارزه با آثار زیان‌بار سموم قارچی بپردازد (۴۲).

آفلاتوکسین‌ها در کبد توسط آنزیم Cytochrome P450 1A2 به فرم Aflatoxin B1– 8,9 epoxide که فرمی بسیار سمی است تبدیل می‌شوند. ترکیبات فنولیکی با مهار فعالیت این آنزیم مانع از تبدیل آفلاتوکسین به فرم سمی می‌شوند.

علاوه بر آن ترکیبات فنولیکی با تحریک کبد به تولید افزایشی آنزیم Glutathione S-transferase منجر شده تا این آنزیم با Aflatoxin B1–8,9 epoxide باند شده و ترکیب حاصل سم‌زدایی گردد و از طریق صفرا دفع شود (۳۷) (شکل ۶).



شکل ۶- مکانیسم اثر ترکیبات فنولیک جهت کاهش اثرات سمی آفلاتوکسین که شامل مهار آنزیم P450 و افزایش فعالیت آنزیم Glutathione S-transferase است (۴۳).

بر اساس اطلاعات ارائه شده در جداول ۵ و ۶ به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که در مقایسه بین جاذب‌های معدنی و آلی، زغال فعال جاذب خوبی برای آفلاتوکسین‌ها، فومنسین‌ها و اکراتوکسین‌ها است. زئولیت و بنتونیت به‌طور کلی آفلاتوکسین‌ها را جذب می‌کنند اما توانایی جذب فومنسین و اکراتوکسین به‌وسیله آنها کمتر است. دیواره سلولی مخمر جاذب خوبی برای اکراتوکسین و زرالنون است. جدول ۱۰ انواع مهارکننده سموم قارچی تجاری موجود در کشور را نشان می‌دهد. بررسی این مهارکننده‌های سموم قارچی نشان می‌دهد که اکثر این محصولات به شکل مهارکننده چند جزیی با بکارگیری روش‌های مختلف مهار، فرمولاسیون و تولید شده‌اند. استفاده از جاذب‌های معدنی، آلی، میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات گیاهی جز اصلی فرمولاسیون‌ها را تشکیل می‌دهد.

جدول ۷- راندمان جذب مهارکننده‌های سموم قارچی مختلف در شرایط ***in vitro*** (۴۴)

نوع سموم قارچی	نوع جاذب	غلظت (µg/ml)	مهار (٪)
آفلاتوکسین B1	بنتونیت	۱۰	۹۴
	بنتونیت فعال	۱۰	۹۸
	کربن فعال	۱۰	۱۰۰
	کربن فعال	۱۰	-
	دیواره مخمر	۱۰	۹۲/۷
اکراتوکسین A	بنتونیت فعال	۲	۹
	کربن فعال	۲	۹۴
	دیواره مخمر	۲	۷
فومنسین B1	زئولیت	۲۰	۰
	بنتونیت	۲۰	۱
	کربن فعال	۲۰	۱۰۰
	دیواره مخمر	۲۰	۵۰
داکسی نیوالنول	بنتونیت	۱۰	۱۳
	بنتونیت	۲/۵	۳
	زئولیت	۱۰	۳
	کربن فعال	۱۰	۵۲
	کربن فعال	۲/۵	۱۴/۴
	دیواره مخمر	۲/۵	۲۲/۹
زرالنون	بنتونیت	۲۰	۳۰
	زئولیت	۲۰	۳۶
	کربن فعال	۲۰	۱۰۰
	دیواره مخمر	۲۰	۹

جدول ۸- راندمان جذب سموم قارچی (>۶۰٪) در شرایط ***in vivo*** (۴۵)

	Aflatoxin	OTA	DON	T2 toxin	ZEA	FUM
بنتونیت	+					
زئولیت	+					
کربن فعال	+					
دیواره مخمر	+	+	+		+	
میکروارگانیسم ها		+	+	+	+	+

مشخصات مهارکننده سموم قارچی ایده آل

بالا بودن ظرفیت جذب سموم قارچی جهت جذب آلودگی‌های بالای سموم قارچی، وسیع الطیف بودن، حفظ خواص زیستی در طی فرآوری خوراک، جذب و مهار سموم قارچی با سرعت بالا، قبل از جذب آنها توسط قسمت ابتدایی دستگاه گوارش، داشتن حداقل اثرات متقابل با ویتامین‌ها و مواد معدنی به‌ویژه آهن و روی، تقویت کننده سیستم ایمنی و بهبود عملکرد دستگاه گوارش، دز مصرف کم و جذب حداکثری سموم قارچی، پایداری فعالیت

توکسین بایندر تا زمان دفع از دستگاه گوارش، بالا بودن میل ترکیبی جهت جذب آلودگی‌های کم به‌وسیله سموم قارچی و قابلیت استفاده در گونه‌های مختلف حیوانات از ویژگی‌های مهم یک مهارکننده سموم قارچی ایده آل می‌باشد (۴۶).

جدول ۹- انواع مهارکننده‌های سموم قارچی تجاری موجود در بازار ایران

نام محصول	سموم قارچی هدف	کشور تولید کننده	اجرای تشکیل دهنده
Biotal SC Micorbind	Aflatoxins, ZEA	انگلستان	مخمر فعال، مانان الیگوساکاراید، بتا گلوکان
UltraSorb 20 Mycotex	AFB1, FB1, OTA, DON, ZEA	انگلستان	هیدروآلومینوسیلیکات، مخمر هیدرولیز شده، میکروارگانیسم ها، روغن گیاهی و ویتامین ها
Mycosorb		آمریکا	مخمر هیدرولیز شده، هیدروآلومینوسیلیکات، کربنات کلسیم
Mycofix®	AFLs, Fumonisins Trichothecenes OTA, ZEA	آلمان	بنتونیت، آنزیم های میکروبی، مخمر، باکتری
Select BioCYCLE™		آمریکا	مخمر هیدرولیز شده، باکتری، زئولیت
Mastersorb® Gold	AFLs, fumonisins, DON, ZEA	آمریکا	عصاره گیاهی، مخمر هیدرولیز شده، بنتونیت
TOXO®-XL	Broad spectrum of mycotoxins	آمریکا	عصاره گیاهی، مخمر هیدرولیز شده، بنتونیت

نتیجه‌گیری

در بین سموم قارچی شناخته شده، آفلاتوکسین B1، داکسی نیوالنول، زرالنون، اکراتوکسین A، سم T-2 و فومنسین B1 به علت فراوانی آنها و آسیب‌های شدید کبدی و کلیوی که در طیور ایجاد می‌کنند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این سموم رشد و تولید را در طیور به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر ضررهای اقتصادی در حوزه پرورش طیور، در صورت راهیابی این سموم به زنجیره غذایی انسان از طریق مصرف گوشت و تخم‌مرغ آلوده می‌تواند سلامت جامعه را نیز تهدید نماید. با توجه به ماهیت شیمیایی سموم قارچی لزوم استفاده از روش‌های مختلف مهار ازجمله استفاده از جاذب‌های معدنی(مانند بنتونیت)، جاذب‌های آلی (مانند کربن فعال، دیواره مخمر)، سم‌زدایی زیستی با استفاده از آنزیم‌های اختصاصی و میکروارگانیسم‌ها و استفاده ترکیبات مؤثره گیاهی جهت تقویت سیستم کبدی ضروری به نظر می‌رسد. از این رو استفاده از مهارکننده‌های سموم قارچی که بر پایه اجزای ذکر شده فرمولاسیون و تولید شده باشند می‌توانند پتانسیل زیادی در مهار سموم قارچی ذکر شده داشته باشند.

References

1- Nazari F, Sulyok M, Yazdanpanah H, Kobarfard F, Krska R. A survey of mycotoxins in domestic rice in Iran by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicology mechanisms and methods*. 2014; 24(1): 37-41.

2- Feizy J, Beheshti HR, Eftekhari Z, Zhiany M. Survey of Mycotoxins in Wheat from Iran by HPLC Using Immunoaffinity Column Cleanup. *Journal of Chemical Health Risks*. 2014; 4.(۱).

3- Sherazi S, Shar Z, Sumbal G, Tan ET, Bhanger M, Kara H, *et al.* Occurrence of ochratoxin A in poultry feeds and feed ingredients from Pakistan. *Mycotoxin research*. 2015; 31(1): 1-7.

4- Gallo A, Giuberti G, Frisvad JC, Bertuzzi T, Nielsen KF. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*. 2015;7(8): 3057-111.

5- Alizadeh AM, Roshandel G, Roudbarmohammadi S, Rou dbary M, Sohanaki H, Ghiasian SA, *et al.* Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. Asian Pacific *Journal of Cancer Prevention*. 2012; 13(6): 2625-8.

6- Ghasemi-Kebria F, Joshaghani H, Taheri NS, Semnani S, Aarabi M, Salamat F, *et al.* Aflatoxin contamination of wheat flour and the risk of esophageal cancer in a high risk area in Iran. *Cancer epidemiology*. 2013; 37(3): 290-3.

7- Rawal S, Kim JE, Coulombe R. Aflatoxin B 1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. *Research in veterinary science*. 2010; 89(3): 325-31.

8- Yin H-B, Chen C-H, Kollanoor-Johny A, Darre MJ, Venkitanarayanan K. Controlling Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin production in poultry feed using carvacrol and trans-cinnamaldehyde. *Poultry science*. 2015: pev207.

9- Cravens R, Goss G, Chi F, DeBoer E ,Davis S, Hendrix S, *et al.* Products to alleviate the effects of necrotic enteritis and aflatoxin on growth performance, lesion scores, and mortality in young broilers. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2015; 24(2): 145-56.

10- Heussner AH, Bingle LE. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins*. 2015; 7(10): 4253-82.

11- Devreese M, Antonissen G, Broekaert N, De Baere S, Vanhaecke L, De Backer P, *et al.* Comparative Toxicokinetics, Absolute Oral Bioavailability, and Biotransformation of Zearalenone in Different Poultry Species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015; 63(20): 5092-8.

12- Yang L, Yu Z, Hou J, Deng Y, Zhou Z, Zhao Z, *et al.* Toxicity and oxidative stress induced by T-2 toxin and HT-2 toxin in broilers and broiler hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 2016; 87: 128-37.

13- Wang J, Xie G, Wang S. 10 Chemistry and Safety of Mycotoxins in Food. *Food Safety Chemistry: Toxicant Occurrence, Analysis and Mitigation*. 2014: 189.

14- Young JC, Zhou T, Yu H, Zhu H ,Gong J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45(1): 136-43.

15- Awad WA, Ghareeb K, Böhm J, Zentek J. Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives and Contaminants*. 2010; 27(4): 510-20.

16- Asrani R, Katoch R, Gupta V, Deshmukh S, Jindal N, Ledoux D, *et al.* Effects of feeding Fusarium verticillioides (formerly Fusarium moniliforme) culture material containing known levels of fumonisin B1 in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). *Poultry science*. 2006; 85(7): 1129-35.

17- Kermanshahi H, Hazegh A, Afzali N. Effect of Sodium Bentonite in broiler chickens fed diets contaminated with Anatoxin B1. *J Anim Vet Adv*. 2009; 8(8): 1631-6.

18- Kermanshahi H, Akbari M, Afzali N. Effect of low-level administration of aflatoxin B1 into diet on performance and activity of some blood enzymes in broiler chickens. *JWSS-Isfahan University of Technology*. 2007; 11(1): 443-50.

19- Kermanshahi H, Akbari MR, Maleki M, Behgar M. Effect of prolonged low level inclusion of aflatoxin B 1 into diet on performance, nutrient digestibility, histopathology and blood enzymes of broiler chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2007.

20- Speijers GJA, Speijers MHM. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology letters*. 2004; 153(1): 91-8.

21- Pedrosa K, Borutova R. Synergistic effects of mycotoxins discussed. *Feedstuffs*. 2011; 83(19): 1-3.

22- Verma J, Johri T, Swain B, Ameena S. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British poultry science*. 2004; 45(4): 512-8.

23- Kubena L, Harvey R, Huff W, Elissalde M, Yersin A, Phillips T, *et al.* Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *Poultry Science*. 1993; 72(1): 51-9.

24- Edlayne G, Simone A, Felicio JD. Chemical and biological approaches for mycotoxin control: a review. Recent patents on food, nutrition

& agriculture. 2009; 1(2): 155-61.

25- Selvaraj JN, Lu Z, Yan W, ZHAO Y-j, XING F-g, DAI X-f, *et al.* Mycotoxin detection—Recent trends at global level. *Journal of Integrative Agriculture*. 2015; 14(1): 2265-81.

26- Eskola M, Altieri A, Galobart JJWMJ. Overview of the activities of the European Food Safety Authority on mycotoxins in food and feed. 2018; 11(2): 277-89.

27- Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. *Toxins*. 2019; 11(7): 375.

28- Beheshti HR, Asadi M. Aflatoxins in animal feed in Iran. *Food Additives & Contaminants*: Part B. 2014; 7(1): 40-2.

29- Kachuei R, Rezaie S, Yadegari MH, Safaie N, Allameh A-A, Aref-poor M-A, *et al.* Determination of T-2 Mycotoxin Fusarium strains by HPLC with fluorescence detector. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2014; 1(1): 38-43.

30- Rahmani A, Soleimany F, Hosseini H, Nateghi L. Survey on the occurrence of aflatoxins in rice from different provinces of Iran. *Food Additives and Contaminants*: Part B. 2011; 4(3): 185-90.

31- Gholampour Azizi I, Ghadi H, Rouhi S. Ochratoxin A analysis in rice samples of different cities of Mazandaran (a province in Northern Iran). *Nutrition & Food Science*. 2014; 44(3): 223-9.

32- Rahimi E. The occurrence of ochratoxin A in rice in six provinces of Iran. *Toxicology and Industrial Health.* 2014.

33- Yazdanpanah H, Shafaati A, Foroutan SM, Zarghi A, Aboul-Fathi F, Khoddam A, *et al.* Occurrence of deoxynivalenol in foods for human consumption from tehran, iran. *Iranian journal of pharmaceutical research*: IJPR. 2013; 13(Suppl): 87-92.

34- Ghofrani Tabari D, Kermanshahi H, Golian A, Majidzadeh Heravi R. In Vitro Binding Potentials of Bentonite, Yeast Cell Wall and Lactic Acid Bacteria for Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Iranian Journal of Toxicology*. 2018; 12(2): 7-13.

35- Kermanshahi H, Ghofrani Tabari D, Golian A, Majidzadeh Heravi R, editors. Effect of aflatoxin B1 and three potential adsorbents on intestinal morphology in broiler chicks. *8th Interntional conference on Animal Health and Veterinary Medicine*; 2017.

36- Phillips TD, Afriyie-Gyawu E, Williams J, Huebner H, Ankrah N-A, Ofori-Adjei D, *et al.* Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. *Food additives and contaminants*. 2008; 25(2): 134-45.

37- Wielogórska E, MacDonald S, Elliott C. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal.* 2016; 9(3): 419-33.

38- Ringot D, Lerzy B, Bonhoure JP, Auclair E, Oriol E, Larondelle Y. Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process biochemistry*. 2005; 40(9): 3008-16.

39- Schatzmayr G, Täubel M, Vekiru E, Moll M, Schatzmayr D, Binder E, *et al.* Detoxification of mycotoxins by biotransformation. *The mycotoxin factbook*. 2006: 363-75.

40- Karlovsky P. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011; 91(3): 491-504.

41- Jard G, Liboz T, Mathieu F, Guyonvarc'h A, Lebrihi A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A.* 2011; 28(11): 1590-609.

42- Oskoueian E, Abdullah N, Zulkifli I, Ebrahimi M, Karimi E, Goh YM, *et al.* Cytoprotective effect of palm kernel cake phenolics against aflatoxin B1-induced cell damage and its underlying mechanism of action. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015; 15(1): 392.

43- Jowsey IR, Jiang Q, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Expression of the aflatoxin B1-8, 9-epoxide-metabolizing murine glutathione S-transferase A3 subunit is regulated by the Nrf2 transcription factor through an antioxidant response element. *Molecular pharmacology*. 2003; 64(5): 1018-28.

44- Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an in vitro gastrointestinal model. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2007; 55(12): 4810-9.

45- Boudergue C, Burel C, Dragacci S, Favrot M-C, Fremy J-M, Massimi C, *et al.* Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. 2009.

46- Murugesan G, Ledoux D, Naehrer K, Berthiller F, Applegate T, Grenier B, *et al.* Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry science* .2015; 94(6): 315-1298.

A Review on Important Poultry Feed Mycotoxins, their Pathogenicity and Methods of Combating

Ehsan Oskoueian[1, 2]*, Farough Kargar [2, 3], Hasan Kermanshahi[4], Mahdi Salari Pour[2, 5]

1- Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
2- Research and Development Group, Tosse Mokamel Zist Fanavar Ariana Company, Mashhad, Iran.
3- PhD student in poultry nutrition, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
5- PhD Student in Animal Nutrition, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Receive: November 16, 2019; Revise: February 7, 2020; Accept: March 15, 2020

Summary

Mycotoxins are chemical compounds produced by fungi in the agricultural products that pose a serious threat to animals and humans health. The most important mycotoxins are aflatoxin B1, deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin a, T2 toxin, and fumonisin B1. The presence of these mycotoxins in animal diets could impair feed conversion ratio, mortality rate, increased production costs, and ultimately reduced production efficiency in the poultry industry. Methods of inhibiting mycotoxins are including dietary application of mineral adsorbents, organic adsorbents, microorganisms, microbial metabolites, and plant bioactive compounds in individual or combination forms. These compounds inhibit the myctoxins through chelationg, degradation, biotransformation, or enhancing the liver function and the immune system against mycotoxins toxicity. Due to the differences in the chemical nature of each mycotoxins, considering the different inhibitory mechanisms in mycotoxin inhibitors in mandatory. Hence, the use of broad-spectrum mycotoxins inhiboitors seems to be necessary to eliminate wide variety of mycotoxins in poultry diets.

Keywords: *mycotoxins inhibitor, plant bioactive compounds, biotransformation, aflatoxin, zearalenone, ochratoxin, fumonisin*

بررسی اثر تجویز داخل رحمی عصاره آویشن در گاوهای مبتلا به آندومتریت بالینی بر میزان وقوع سقط در آبستنی متعاقب

ابوالفضل حاجی بمانی شورکی[1*]

۱- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ دی ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۷ اسفند ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۲ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

اندومتریت یکی از رایج‌ترین بیماری‌ها و عفونت‌های رحمی بعد از زایمان است که عوامل باکتریایی مختلفی از جمله *تروپرلا پایوژنز*، *اشریشیاکلی*، *فوزوباکتریوم نکروفروم* و *پری‌وتلا ملانینوجنیکوس* در پاتوژنز این بیماری نقش دارند. از داروی گیاهی آویشن به دلیل خواص ضد باکتریایی در درمان اندومتریت گاو استفاده شده است اما احتمال می‌رود دارای اثرات جانبی روی جنین باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات سقط‌زایی عصاره آویشن است که برای درمان گاوهای مبتلا به آندومتریت قبل از شروع آبستنی انفوزیون داخل رحمی شده است. تعداد ۴۸ رأس گاو شیری آبستن با سابقه اندومتریت بالینی که به دنبال انفوزیون داخل رحمی پلاسیبو (تعداد=۶)، پنی‌سیلین+استرپتومایسین (تعداد=۱۹) و عصاره آویشن (تعداد= ۲۳) بهبود یافته و آبستن شده بودند وارد این مطالعه گردیدند. ارزیابی آبستنی در گروه‌های درمانی از ۳۰ روزگی آبستنی تا زمان زایمان گاوها از راه اولتراسونوگرافی راست روده‌ای انجام شد. موارد سقط جنین در هر گروه ثبت گردید. آنالیز آماری داده‌های مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS با سطح معناداری P≤ ۰/۰۵ انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه عصاره آویشن میزان سقط‌زایی (۳۴/۸ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (صفر درصد) و گروه درمانی پنی‌سیلین+استرپتومایسین (۱۰/۵ درصد) بیشتر بود، که این تفاوت از لحاظ آماری به شدت نزدیک به معناداری بود (P= ۰/۰۶). با توجه به نتایج مطالعه حاضر انفوزیون داخل رحمی عصاره آویشن در گاوهای شیری می‌تواند رخداد سقط را افزایش دهد، لذا درمصرف آویشن بهتر است احتیاط بیشتری صورت گیرد.

واژگان کلیدی: *آویشن، اندومتریت، سقط، گاو*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: a.hajibemani@tabrizu.ac.ir

مقدمه

در دهه‌های اخیر، کاهش باروری گاوهای شیری به‌طور شایانی توجه دامپزشکان را به خود معطوف کرده است (۱). یکی از شرایط مورد نیاز برای داشتن باروری مناسب و قابل قبول در گله گاو شیری، داشتن محیط رحمی مناسب و سالم می‌باشد. محیط رحم سالم پایه اساسی برای داشتن میزان باروری بالا است؛ بنابراین از آنجایی‌که بازدهی تولید مثلی ارتباط تنگاتنگی با وضعیت رحم در پایان دوره‌ی انتظار اختیاری دارد (۲)، تشخیص، درمان و پیشگیری از عفونت‌های رحمی بعد از زایمان از دیرباز مورد تحقیق و بررسی قرار دارند. اندومتریت یکی از رایج‌ترین بیماری‌های رحمی بعد از زایمان است (۳) که با افزایش فاصله زایمان تا آبستنی مجدد و میزان حذف و کاهش میزان باروری، باعث زیان اقتصادی می‌شود. معمولاً تشخیص اندومتریت پس از روز ۲۱ مرحله شیردهی صورت می‌گیرد (۴). رایج‌ترین عوامل باکتریایی که در پاتوژنز اندومتریت نقش دارند شامل *تروپرلا پایوژنز*، *اشریشیاکلی*، *فوزوباکتریوم نکروفروم* و *پری‌وتلا ملانیوجنیکوس* می‌باشد. نشان داده شد که عفونت‌های شدید رحمی بستگی به اثر سینرژیستی پاتوژنی بین *تروپرلا پایوژنز* و ارگانیسم‌های غیر هوازی همچون *فوزوباکتریوم نکروفروم* دارد (۵). درمان عمده اندومتریت بالینی در حال حاضر شامل درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها (داخل رحمی و سیستمیک) و یا پروستاگلاندین‌ها (PGF2α به صورت سیستمیک) و یا ترکیبی از هر دو است. آنتی‌بیوتیک‌ها میزان باکتری‌ها در رحم و التهاب اندومتر را کاهش می‌دهند (۶). تزریق PGF2α باعث لوتئولیز جسم زرد و القای فحلی به همراه افزایش انقباضات رحمی و به دنبال آن پاک شدن محوطه رحمی می‌شود (۷، ۸). هدف نهایی درمان اندومتریت بالینی در گاوهای شیری، بهبود بازدهی تولیدمثلی است، درحالی‌که کمترین باقی‌مانده دارویی در شیر و گوشت را به دنبال داشته باشد. کارآیی آنتی‌بیوتیک‌های زیادی ازجمله سفاپیرین بنزاتین، سفتیوفور، پنی‌سیلین G، اکساسیلین، اکسی تتراسایکلین و آمپی‌سیلین برای درمان اندومتریت مورد ارزیابی قرارگرفته است (۹). ناکارآمدی آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها و ضدعفونی کننده‌ها و اثرات مضر آنها بر فعالیت گلبول‌های سفید توجه پژوهشگران را به سمت جایگزین‌های مناسب‌تر برای درمان عفونت‌های باکتریایی رحم در دوره پس از زایش معطوف کرده است (۱۰). ازجمله درمان‌های جایگزین، استفاده از داروهای گیاهی است که اقبال به آنها در حوزه‌های مختلف پزشکی و دامپزشکی در حال افزایش است و بیش از ۸۰ درصد مردم کشورهای در حال توسعه از درمان گیاهی استفاده می‌کنند. دلایلی از جمله اثرات جانبی کمتر، تحمل راحت‌تر بیمار، هزینه پایین‌تر، پذیرش بالا به وسیله بیمار در طی درمان، مقاومت دارویی کمتر و دسترسی بیشتر باعث افزایش گرایش به استفاده از این داروها هست (۱۱). یکی از داروهای گیاهی پر مصرف آویشن است. آویشن یک داروی گیاهی دارای خاصیت ضد باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی (۱۲)، ضد قارچ (۱۳)، ضد عفونی‌کننده و ضد درد (۱۴)، دارای خواص آنتی‌اکسیدان (۱۵) و ضد التهاب (۱۶) هست و در انسان مصارف دارویی زیادی دارد.

مطالعات نشان داده است عصاره آویشن دارای اثرات ضد باکتریایی بر علیه *استاف ارئوس* و *اشیرشیاکلی* هست. همچنین مطالعات دیگر نشان دادند که اسانس این گیاه روی تعداد بیشتر از باکتری‌ها ازجمله *باسیلوسسرئوس* و *سودوموناس ائروژینوز* را تأثیر دارد (۱۷-۱۹). این گیاه دارویی دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های ازجمله *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس آرئوس*،

باسیلوس سرئوس، *سالمونلا تیفی*، *پروتئوس ولگاریس* و *شیگلا فلکسنری* نیز هست (۲۰). از آویشن به علت اثرات ضد باکتریایی، در درمان اندومتریت گاوهای شیری مورد استفاده قرار گرفته است که نشان داده شده است می‌تواند دارای اثرات درمانی روی اندومتریت بعد از زایش در گاوهای شیری باشد (۲۱).

گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد استفاده بی‌رویه و غیر اصولی از ترکیبات گیاهی ممکن است اثرات سمی و جبران ناپذیری داشته باشد. از میان داروهای گیاهی مطالعه شده چای کوهی، مرزنجوش، رازیانه و گل گاوزبان اثرات سمی و تراتوژنیک بر روی جنین داشته‌اند (۲۲). مطالعات در انسان نشان داده است مصرف زیاد آویشن اثرات توکسیک فراوانی دارد و موجب اختلال در نظم دوران قاعدگی می‌شود و با وجود اینکه مصرف آن در زمان بارداری و شیردهی با غلظت‌های معمولی محدودیتی ندارد، مقادیر زیاد آن به خصوص در دوران بارداری توصیه نمی‌شود (۲۳). گزارش‌هایی از بهبود اندومتریت گاو در پی انفوزیون عصاره آویشن وجود دارد ولی اثرات استفاده از این داروی گیاهی روی آبستنی متعاقب بررسی نشده است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر انفوزیون داخل رحمی عصاره آویشن تجویز شده برای درمان آندومتریت بالینی در میزان وقوع سقط جنین در آبستنی متعاقب و مقایسه آن با انفوزیون داخل رحمی پنی‌سیلین+استرپتومایسین است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروالکلی آویشن: در این مطالعه از عصاره هیدروالکی آویشن استفاده شد. برای تهیه عصاره هیدروالکی (۱:۲)، ۴/۵ کیلوگرم برگ خشک شده از آویشن شیرازی به صورت پودر در آورده و با ۱۸ لیتر اتانول ۷۰° مخلوط شد. مخلوط حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق صاف شد. عصاره از فیلتر کاغذی عبور داده و چگالی عصاره در طیف $0/918\ g.cm^{-3}$ تعیین شد. با استفاده از واکنش امرسون (بر مبنای فارماکوپه آلمان) و دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/Vis) مجموع تیمول و کارواکرول تعیین شد. غلظت‌های مختلف تیمول استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید و با استفاده از آن و جذب به‌دست آمده از فراورده، میزان تیمول و کارواکرول در محصول محاسبه شد.

انتخاب حیوانات: مطالعه حاضردر یکی از گله‌های صنعتی گاو شیری نژاد هلشتاین در طی یک سال انجام شد. همه‌ی گاوهای مورد مطالعه در سیستم open shed نگهداری، روزانه سه بار شیردوشی می‌شدند و همچنین همه گاوها تحت یک شرایط محیطی و آب و هوایی و مدیریت یکسان بودند.گاوهای مبتلا به اندومتریت بالینی طی ۳۰ تا ۴۰ روز بعد از زایش تشخیص داده شدند. سپس با استفاده از انفوزیون داخل رحمی یکی از سه ترکیب شامل پلاسبو (کنترل)، پنی‌سیلین+استرپتومایسین و یا عصاره آویشن درمان شدند. گاوهای درمان شده دو هفته بعد، برای بررسی پاسخ به درمان به داروهای مورد اشاره معاینه می‌شدند. گاوهایی که پاسخ به درمان داده بودند و بهبود یافتند بعد از دوره انتظار اختیاری در اولین فحلی تلقیح می‌شدند و در ۳۰ روزگی بعد از تلقیح با استفاده از دستگاه سونوگرافی پروب ۷/۵ مگاهرتز (SIUI 900V) تشخیص آبستنی داده می‌شدند. تعداد ۴۸ رأس گاو شیری که با اولین تلقیح پس از درمان آندومتریت آبستن شده بودند وارد این مطالعه شدند. گاوهایی که بعد از درمان در معاینه مجدد اندومتریت آنها بهبود پیدا نکرده بود و همچنین گاوهایی که بعد از اولین تلقیح آبستن نشده بودند، از مطالعه حذف شدند. این ۴۸ رأس به سه گروه دسته بندی شدند:

گاوهایی که تحت درمان انفوزیون داخل رحمی عصاره هیدروالکلی آویشن (۶۰ سی‌سی، ۹۱۸ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، ساخت شرکت باریج اسانس کاشان) قرار گرفته بودند(تعداد= ۲۳ رأس گاو شیری)؛ گاوهایی که تحت درمان انفوزیون داخل رحمی پنی‌سیلین استرپتومایسین(۵۰ سی‌سی، ۲۵۰+۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، ساخت شرکت نوربروک) قرار گرفته بودند (تعداد= ۱۹ رأس گاو شیری) و گاوهایی که تحت درمان انفوزیون داخل رحمی پلاسیبو(۶۰ سی‌سی اتانول ۷۰°) قرار گرفته بودند (تعداد= ۶ رأس گاو شیری). وضعیت آبستنی تمام گاوهای مورد مطالعه در ۳ و ۷ ماهگی آبستنی مجدداً از راه اولتراسونوگرافی راست روده‌ای بررسی شد و موارد سقط جنین از روز ۳۰ تا انتهای آبستنی ثبت گردید. از تاریخچه هر گاو وضعیت دوره‌ی شیردهی، زایمان، بیماری‌های پیرامون زایمان و میزان تولید شیر استخراج و ثبت شد. شرایط نمره‌ی بدنی (بر مبنای درجه‌بندی ۱ تا ۵) گاوهای مورد مطالعه در زمان انجام درمان ثبت گردید.

معاینه بالینی برای تشخیص پاسخ به درمان اندومتریت در گاوها: ابتدا ناحیه مهبل، پرینه و اطراف دم به منظور وجود ترشحات چرکی ارزیابی شد. در مرحله بعد معاینه مهبلی انجام گرفت. به منظور گرفتن ترشحات واژنی، ابتدا ناحیه مهبل، پرینه و اطراف دم با محلول ساولون و آب شستشو و ضد عفونی گردید و سپس از راه ملامسه مهبلی (۲۴)، از دیوار جانبی، پشتی و شکمی فورنیکس واژن و قسمت سوراخ خروجی سرویکس نمونه ترشحات مهبل به منظور بررسی وجود چرک و اندومتریت گرفته شد.پس از معاینه مهبلی، از راه اولتراسونوگرافی راست روده‌ای با استفاده از پروب ۷/۵ مگاهرتز (SIUI 900V)، رحم از لحاظ وجود ترشحات چرکی در مجرا بررسی شد.گاوهایی که رحم آنها پاک تشخیص داده شد پس از مشاهده اولین فحلی ایستا بعد از گذراندن دوره انتظاری اختیاری(۵۵ روز) طبق برنامه AM-PMتلقیح مصنوعی شدند.

تولید شیر: تولید شیر در زمان شروع درمان، ماه‌های یک، دو ، سه و چهار بعد از زایش و میانگین ۱۲۰ روز اول شیردهی در همه گروه‌های درمانی رکوردگیری شدند. ارتباط میانگین تولید شیر (گاوهای پرتولید:≤ ۳۰ کیلوگرم وگاوهای کم و متوسط تولید:< ۳۰ کیلوگرم در روز) با میزان سقط در گروه‌های درمانی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آنالیز آماری: بررسی آماری داده‌های مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (Version 22.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois) انجام شد. آنالیز آماری میزان سقط در گروه‌های درمانی و همچنین ارتباط میانگین تولید شیر (گاوهای پرتولید و گاوهای کم و متوسط تولید در روز)با میزان سقط در گروه‌های درمانی با آزمون مربع کای انجام گردید. میانگین روزهای باز و میانگین تولید شیر در زمان درمان، ماه‌های یک، دو، سه و چهار بعد از زایش و میانگین تولید شیر در طی چهار ماه بین گروه‌های درمانی با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار و درصد بیان شدند. مقادیر P<۰/۰۵ به عنوان سطح آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

آنالیز عصاره آویشن شیرازی محصول شرکت باریج اسانس کاشان در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

BCS گاوها بین (۲/۷۵ تا ۳/۵) و میانگین تولید شیر (۳۵/۸کیلوگرم در روز) و همچنین میانگین تعداد شکم زایش (۲/۶) بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هیچ تفاوت

آماری معناداری بین میانگین تولید شیر در زمان شروع درمان، طی ۱۲۰ روز اول شیردهی، ماه اول، دوم، سوم و چهارم بعد از زایمان بین گروه‌های درمانی وجود نداشت (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

میانگین شکم زایش در گروه درمانی پلاسبو، پنی‌سیلین+استرپتومایسین و عصاره آویشن به ترتیب ۲، ۲/۱ و ۳/۲ بود که بین گروه‌های درمانی تفاوت آماری معناداری وجود نداشت (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که فاصله زایمان تا اولین تلقیح که منجر به آبستنی شد، بین گروه‌های درمانی تفاوت آماری معناداری وجود نداشت (P<۰/۰۵) و در طی ۱۰۰ روز اول شیردهی گاوها در گروه‌های درمانی مختلف آبستن شدند (نمودار ۱).

همان گونه که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است تأثیرات سقط‌زایی گروه درمانی عصاره آویشن در مقایسه با گروه درمانی پلاسبو و پنی‌سیلین+استرپتومایسین بالاتر بود به‌طوری که تعداد بیشتری از گاوها در گروهی که عصاره آویشن برای درمان اندومتریت آنها استفاده شد سقط کردند و این تفاوت هر چند از نظر آماری معنادار نبود ولی بسیار نزدیک به معناداری بود (p =۰/۰۶).

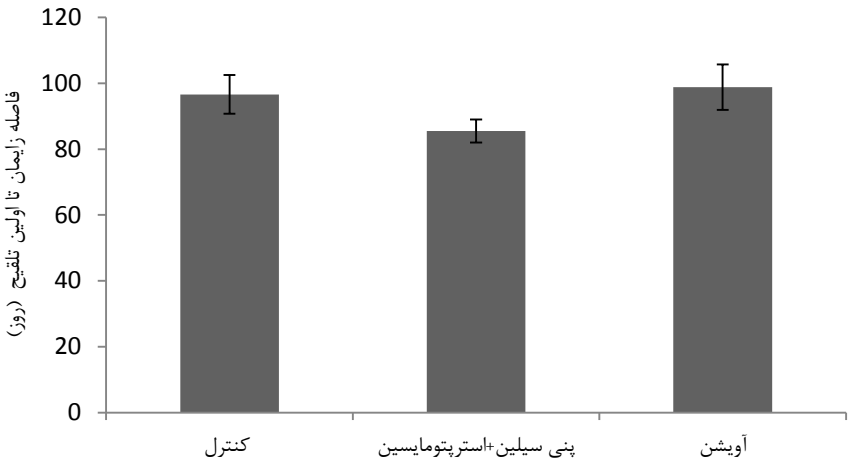
همان گونه که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است میزان تولید شیر بر اساس گاو پرتولید و یا کم و متوسط تولید، در طی ۱۲۰ روز شیردهی و زمان درمان و ماه‌های یک، دو، سه و چهار بر روی میزان وقوع سقط در گروه‌های درمانی تأثیر معناداری از نظر آماری نداشت.

جدول ۱- آنالیز عصاره آویشن شیرازی

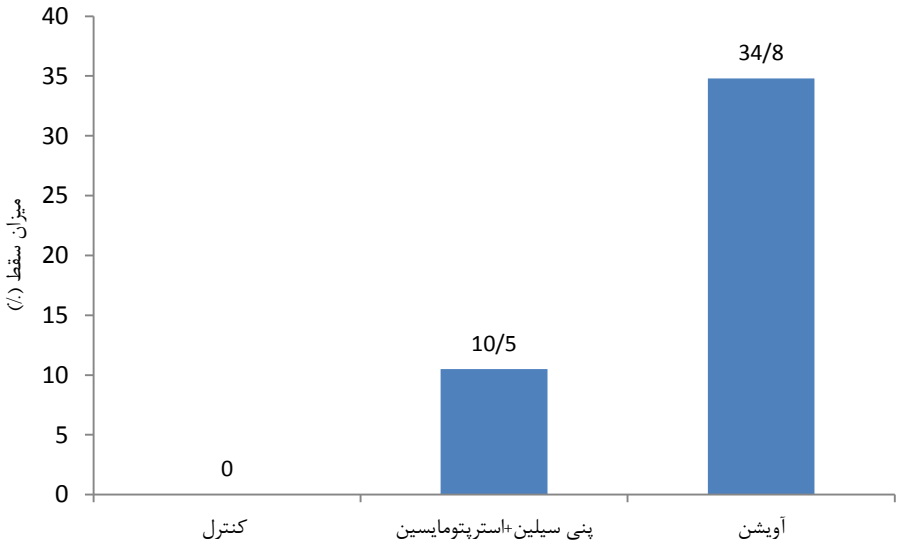
ردیف	نام آزمون	شماره استاندارد مرجع	روش آزمون	حد قابل قبول	نتیجه
۱	رنگ	-	-	سبز تیره	سبز تیره
۲	بو	-	-	مخصوص آویشن	مخصوص آویشن
۳	pH	USP30	WF001	۵-۶	۵/۴
۴	ماده خشک (%w/v)	BP 2010	WCL15	حداقل ۶/۵	۷/۱۵
۵	دانسیته (g/ml)	USP33-NF 28	WCL11	۰/۹۳۰- ۰/۸۹۰	۰/۹۱۴
۶	تیمول و کارواکرول (%w/w)	In-house	In-house	حداقل ۰/۴	۰/۶۹

جدول ۲- میانگین تولید شیر در زمان‌های مختلف در گاوهای مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه	تولید شیر در زمان درمان	تولید شیر در ماه اول	تولید شیر در ماه دوم	تولید شیر در ماه سوم	تولید شیر در ماه چهارم	میانگین تولید شیر در ۴ ماه اول
گروه کنترل (پلاسبو) (۶گاو)	۳۶/۳± ۲/۷	۳۰/۳±۲/۲	۳۷/۶±۲/۷	۳۹/۵±۲/۰	۳۶/۳±۲/۶	۳۵/۹±۲/۱
گروه پنی‌سیلین+استرپتومایسین (۱۹گاو)	۳۴/۷± ۱/۸	۳۱/۷±۱/۷	۳۶/۳±۱/۷	۳۹/۰±۱/۶	۳۷/۳±۱/۴	۳۶/۳±۱/۴
گروه آویشن (۲۳گاو)	۳۳/۳± ۱/۶	۳۱/۳±۱/۶	۳۷/۰±۱/۳	۳۶/۶± ۰/۹	۳۵/۴± ۰/۸	۳۵/۲± ۰/۹



نمودار ۱- فاصله زایمان تا اولین تلقیح منجر به آبستنی بین گروه‌های درمانی مورد مطالعه



نمودار ۲- میزان وقوع سقط (درصد) بین گروه‌های درمانی مورد مطالعه

نمودار ۳-میزان وقوع سقط (درصد) بین گروه‌های پرتولید (≤ ۳۰ کیلوگرم) و کم تولید (< ۳۰ کیلوگرم) بر اساس تولید در زمان‌های مختلف شیردهی

بحث و نتیجه‌گیری

اندومتریت یکی از رایج‌ترین بیماری‌های رحمی بعد از زایمان است که باعث کاهش سود اقتصادی در گله‌های شیری می‌شود (۳). عوامل باکتریایی از جمله *تروپرلا پایوژنز*، *اشریشیا کولی*، *فوزوباکتریوم نکروفروم* و *پری‌وتلا ملانینوجنیکوس* در پاتوژنز این بیماری نقش دارند (۵). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها (داخل رحمی و سیستمیک) و یا پروستاگلاندین‌ها (PGF2α به صورت سیستمیک)روش‌های عمده برای درمان اندومتریت در گاوهای شیری است (۲۵). ولی ناکارآمدی آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها و اثرات مضر آنها بر فعالیت گلبول‌های سفید توجه پژوهشگران را به سمت جایگزین‌های مناسب‌تر برای درمان عفونت‌های باکتریایی رحم در دوره پس از زایش معطوف کرده است (۱۰، ۲۱، ۲۶). از درمان‌های جایگزین که از زمان‌های گذشته تا الآن در حوزه‌های مختلف پزشکی و دامپزشکی مورد استفاده فراوان قرارگرفته، داروهای گیاهی است. مطالعات جدید نشان می‌دهند که گیاهان دارویی می‌توانند روی همهٔ ارگان‌ها و دستگاه‌های بدن ازجمله سیستم تولید مثل اثر بگذارند و عوارض جانبی روی جنین داشته باشند (۲۲، ۲۷). در مطالعه‌ای اثرات دوز بالای عصاره مرزنجوش بر روی جنین‌های موش صحرائی بررسی شد که یافته‌های مطالعه نشان داد که دوز بالای عصاره مرزنجوش باعث افزایش سقط جنین و از بین رفتن جنین‌ها و همچنین کاهش وزن و قد آنها می‌شود (۲۸). یکی از داروهای گیاهی پرمصرف، آویشن است که خواص ضد باکتریایی علیه باکتری *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی*، *پروتئوس ولگاریس* و *شیگلا فلکسنری* دارد (۲۰) و در درمان اندومتریت گاوهای شیری هم مورد استفاده قرار گرفته است (۲۱). آویشن ازجمله ترکیباتی است که منع مصرف آن در دوران بارداری در منابع ذکر شده است (۲۳). ولی در مورد اثرات سوء آویشن روی جنین مطالعه چندانی صورت نگرفته است، ضمن اینکه اثر آن بر جنین گاو تاکنون بررسی نشده است. در مطالعه‌ای اثرات مصرف عصاره آویشن در هفته دوم آبستنی در موش‌های سوری بررسی شد و نتایج این مطالعه

نشـان داد کـه اسـتفاده از عصـاره آویشـن روی میـزان سـقط و جـذب جنـین تـأثیری نـدارد و هـیچ گونـه اخـتلال و ناهنجـاری قابـل ملاحظـه‌ای روی سـتون فقرات و سـر ایجـاد نکـرد امـا باعـث تغییراتـی جزئـی در موفولوژی جنین شد بـه طـوری کـه طـول دم جنـین در گروهـی کـه عصـاره آویشـن اسـتفاده شـده بـود بلنـدتر ولـی میـانگین قطـر جفـت کـاهش پیـدا کـرده بـود. مصـرف آویشـن اگرچـه تـاثیری بـر لانـه گزینـی وسـقط جنینها نداشت ولـی باعـث بـروزاختلالات جزئـی وتغییـر در رشد انـدامهای انتهـایی شـد (۲۹). در مطالعـه حاضـر نتـایج بـه دسـت آمـده نشـان داد کـه گاوهـای انـدومتریتی کـه بـرای درمـان آنهـا از آویشـن اسـتفاده شـده بـود و در اولـین تلقـیح بعـد از درمـان آبسـتن شـدند، احتمـال رخـداد سـقط در آنهـا در مقایسـه بـا گروهـی کـه پنـی سیلین+استرپتومایسـین اسـتفاده کـرده بودنـد، بیشـتر بـود (۳۴/۸ درصـد در برابـر ۱۰/۵ درصـد) هـر چنـد ایـن تفـاوت از نظـر آمـاری معنـادار نبـوده ولـی نزدیـک بـه معنـاداری بـود (p =۰/۰۶). از اجـزای اصـلی عصـاره‌ی گیـاهی آویشـن کـارواکرول و تیمـول هسـتند کـه گزارشـاتی از اثـرات سیتوتکسـیک و تراتوژنیـک ایـن ترکیبـات نشـان داده شـده اسـت. مطالعـاتی نشـان دادنـد کـه تیمـول در غلظـت‌هـای مختلف می‌توانـد منجـر بـه آسـیب بـه DNA شـود (۳۰، ۳۱). گـزارش‌هـایی وجـود دارد کـه نشـان مـی‌دهـد کـه تیمـول وکـارواکرول بسـته بـه غلظـت و زمـان مـورد اسـتفاده، موجـب آسـیب کروزومـی وکـاهش تقسـیم سـلولی سـلول‌هـای مغـز اسـتخوان در مـوش صـحرایی می‌شـوند (۳۲). البتـه گـزارش‌هـایی هـم وجـود دارد کـه نشان مـی‌دهـد کـه اسـتفاده از عصـاره آویشـن در دوران بـارداری اثـری بـر روی رشـد، لانـه گزینـی و تکامـل جنـین‌هـا نداشـته و باعـث افـزایش مـرگ سـلولی و تغییرات در مورفولوژی جنین نشدند (۳۳).

نتایج حاصـل از مطالعـه حاضـر نشـان داد کـه تعـداد شـکم زایـش، میـزان تولیـد شـیر در زمـان درمـان و همچنـین میـزان تولیـد شـیر در ۱۲۰ روز اول پـس از زایـش تفـاوت معنـی‌داری بـین گـروه‌هـای درمـانی نداشتند. این نتایج نشـان مـی‌دهـد کـه انتخـاب گاوهـا و گروه‌بندی آنهـا در گـروه‌هـای درمـانی از صـحت و دقـت لازم برخـوردار بـوده و درنتیجـه مقایسـه نتـایج بـا حداقل خطا و دقت بالا انجام شده است.

موازنـه منفـی شـدیدتر انـرژی در گاوهـای پـر تولیـد پـس از زایمـان رخ می‌دهـد. گزارش‌هـای وجـود دارد کـه نشـان می‌دهـد طـولانی شـدن موازنـه منفـی شـدید انـرژی پـس از زایمـان باعـث کـاهش بـاروری و اخـتلال در آبسـتنی و جـذب جنـین می‌شـود (۳۴). در مطالعـه حاضـر نشـان داده شـد کـه میـزان رخـداد سـقط در گاوهـای شـیری پـر تولیـد در مقایسـه بـا گاوهـای کـم و متوسـط تولیـد تفـاوت آمـاری معنـاداری نداشـت. در نتیجه تولید شیر بـالا عامـل مسـتعد کننـده بـرای ایجـاد سقط نبود. به نظـر می‌آیـد در گاوهـای مـورد مطالعـه بـا توجـه بـه ایـن کـه BCS آنهـا بـین ۲/۷۵ تـا ۳/۵ بـود و کـاهش وزن و افـت BCS کمـی در ابتـدای دوران شـیردهی پـس از زایمـان داشـتند و فاصلـه زایمـان تـا اولین تلقیح که منجر بـه آبسـتنی شـده بودنـد، کمتـر از ۱۰۰ روز بـود پـس می‌تـوان نتیجـه گرفـت کـه گاوهـا دچـار بـالانس منفـی انـرژی شـدید پـس از زایمـان نشـدند بـه نحـوی کـه بتوانـد بـاروری را تحـت تـأثیر جدی بگذارد.

علیـرغم اینکـه گزارش‌هـای حـاکی از اثـرات سـوء آویشـن روی سـقط جنـین معـدود می‌باشـد ولـی بـا توجـه بـه نتـایج حاصـل از مطالعـه حاضـر، انفوزیـون داخـل رحمـی عصـاره آویشـن می‌توانـد رخـداد سـقط را افـزایش دهـد و اینکـه گیاهـان دارویـی، هماننـد داروهـای صـناعی می‌تواننـد اثـرات سـمی و جـانبی داشته باشـند، لـذا پیشـنهاد می‌شـود مطالعـات بیشـتری در ایـن زمینـه انجـام شـده و در تجـویز داخـل رحمـی عصاره آویشن احتیاط بیشتری صورت گیرد.

References

1- Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. Theriogenology. 2000; 53(9): 1729-59.

2- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology. 2006; 65(8): 1516-30.

3- Overton M, Fetrow J. Economics of postpartum uterine health. Proc Dairy Cattle Reproduction Council. 2008: 39-44.

4- LeBlanc S, Duffield T, Leslie K, Bateman K, Keefe GP, Walton J, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. J Dairy Sci. 2002; 85(9): 2223-36.

5- Azawi O. Postpartum uterine infection in cattle. Animal reproduction science. 2008; 105(3): 187-208.

6- Bretzlaff K. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *Vet* Clin *North* Am Anim Pract. 1987; 3(3): 593-607.

7- Hirsbrunner G, Küpfer U, Burkhardt H, Steiner A. Effect of different prostaglandins on intrauterine pressure and uterine motility during diestrus in experimental cows. Theriogenology. 1998; 50(3): 445-55.

8- Poyser N. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins* Leukot Essent *Fatty Acids*. 1995; 53(3): 147-95.

9- Lefebvre RC, Stock AE. Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F 2α in postpartum dairy cows with clinical endometritis: An evidence-based evaluation. *Vet* Clin *North* Am Anim Pract. 2012; 28(1): 79-96.

10- Hussain AM. Bovine uterine defense mechanisms: a review. *J Vet Med*. 1989; 36(9): 641-51.

11- Vermani K, Garg S. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. J Ethnopharmacol. 2002; 80(1): 49-66.

12- Agnihotri S, Vaidya A. A novel approach to study antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs. **Indian J** Exp Biol. 1996; 34(7): 712-5.

13- Khosravi AR, Eslami AR, Shokri H, Kashanian M. Zataria multiflora cream for the treatment of acute vaginal candidiasis. Int J Gynaecol Obstet. 2008; 101(2): 201-2.

14- Mansoori P, Ghavami R, Shafiei A. Clinical evaluation of Zataria multiflora essential oil mouthwash in the management of recurrent aphthous stomatitis. **DARU J** Pharm Sci. 2002; 10(2): 74-7.

15- Moshafi MH, Mansouri S, Sharififar F, Khoshnoodi M. Antibacterial and antioxidant effects of the essential oil and extract of Zataria Multiflora Boiss. J Kerman Univ Medical Sci. 2007; 14(1): 33-4.

16- Hosseinzadeh H, Ramezani M, Salmani G. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of Zataria multiflora Boiss extracts in mice and rats J Ethnopharmacol. 2000; 73(3): 379-85.

17- Almasi V. Antibacterial activity and chemical analysis of essential oils from Crocus sativus (Safrran) leaf and two variant of Thymus species from Lorestan. Medical Doctorate thesiss. (339).

18- Talei Gr, Meshkat Am, Mousavi Z. Antibacterial activity and chemical composition of essential oils from four medicinal plants of Lorestan, Iran. 2007.

19- Talei GR, Meshkatalsadat MH. Antibacterial activity and chemical constitutions of essential oils of Thymus persicus and Thymus eriocalyx from west of Iran. Pak J Biol Sci. 2007; 10(21): 3923-6.

20- Fazeli MR, Amin G, Attari MMA, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (Zataria multiflora) against some food-borne bacteria. Food control. 2007; 18(6): 646-9.

21- Hajibemani A, Mirzaei A, Ghasrodashti AR, Memarzadeh MR. The effect of Zataria multiflora extract on the clinical endometritis and reproductive indices in lactating Holstein dairy cows. Vet Res Forum. 2016; 7(4): 309–15.

22- Esmailizadeh M, Moradi B. Medicinal plants with adverse effects in pregnancy - an evidence-based review study. IJOGI. 2017; 20: 9-25 [In Persian].

23- Basch E, Ulbricht C, Hammerness P, Bevins A, Sollars D. Thyme (Thymus vulgaris L.), thymol. J Herb Pharmacother. 2004; 4(1): 49-67.

24- Sheldon I, Noakes D, Rycroft A. the vagina on uterine bacterial contamination. Vet Rec. 2002; 151: 531-4.

25- Lefebvre RC, Stock AE. Therapeutic

efficiency of antibiotics and prostaglandin F2α in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation. Veterinary Clinics: Food Anim Pract. 2012; 28(1): 79-96.

26- Davoodian N, Kadivar A, Elahi R, Esfandabadi NS, Tafti RD, Rashidzade HA, et al. Efficacy of a mixed herbal essential oils as a treatment option for clinical endometritis in dairy cattle. 2020.

27- Zhu X, Proctor M, Bensoussan A, Wu E, Smith CA. Chinese herbal medicine for primary dysmenorrhoea. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2008; (2).

28- Ragerdi Kashani I, Ansari M, Mehrannia K, Moazzemi K, Vardasbi Joybary S. Teratogenic effects of Origanum Vulgare extract in mice fetals. *Tehran Univ Med J*. 2013; 71(8): 502-508 [In Persian].

29- Anvari M, Dashti Mh, Zeynali F, Hosaini Bayuki Sm. Evaluation of the effect of Zataria multiflora Boiss (Zataria multiflora Boiss) on the placenta and embryos of mice. J Med Plant. 2012; 2 (38): 19-25 [In Persian].

30- Aydın S, Başaran AA, Başaran N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. Mutat Res Genet Toxicol Environ *Mutagen*. 2005; 581(1-2): 43-53.

31- Buyukleyla M, Rencuzogullari E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. Ecotoxicol Environ Saf. 2009; 72(3): 943-7.

32- Azirak S, Rencuzogullari E. The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. Environ Toxicol Chem. 2008; 23(6): 728-35.

33- Domarackỳ M, Rehak P, Juhás Š, Koppel J. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. Physiol Res. 2007; 56(1).

34- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S, Guenther J, Parrish J, Wiltbank M. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. J Dairy Sci. 2002; 85(11): 2803-12.

The effect of intrauterine administration of *Zataria multiflora* extract in cows with clinical endometritis on the incidence of abortion in subsequent pregnancy

Abolfazl Hajibemani Shouraki[1*]

1 - Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Receive: January 20, 2020; Revise: March 7, 2020; Accept: March 12, 2020

Summary

Endometritis is one of the most common uterine diseases postpartum. *Arcanobacterium pyogenes, Escherichia coli, Fusobacterium necrophorum* and *Prevotella melaninogenicus* bacteria are that correlated with endometritis. Zataria (Z) multiflora extract has antibacterial effect that has been used for treatment of endometritis in cows. But it may have adverse effects on the fetus. The objective of the present study was to determine the abortion effects of Z multiflora extract in pregnant cows that improved from endometritis before pregnancy using Z multiflora extract. 48 pregnant dairy cows with a history of clinical endometritis that improved and became pregnant following intrauterine infusion of placebo (n = 6), penicillin + streptomycin (n = 19) and Z multiflora extract (n = 23) were included in this study. Evaluation of pregnancy of treatment groups was performed using ultrasonography from 30 days of gestation to calving. Abortions were recorded in treatment groups. The data was statistically analyzed using the SPSS software .values of $p \leq 0.05$ was considered as significant data. The results of this study showed that the percentage of abortion was higher in *Z. multiflora* extract group(34.8%) compared to the control group (0%) and the penicillin + streptomycin group (10.5%), This difference was statistically very close to significant (P = 0.06). According to the results of the present study, intrauterine infusion of *Z. multiflora*can can increase the incidence of abortion in dairy cows, so it is to be more cautious in consuming of *Z. multiflora*.

Keywords: *Words:Abortion, Endometritis, Cow, Z. multiflora*

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

آسیه احمدی دستگردی*[1]، پانیذ زین‌ساز[2]، ندا ظهوریان[2]

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 فعالیت ارزیابی بومادران، اسانس اصلی استخراج و شناسایی ترکیبات مطالعه این جلب نموده است. هدف از انجام بررسی ترکیبات اسانس با روش .می‌باشد و سس مایونز (*in vitro*)اسانس در شرایط آزمایشگاهی (ضد میکروبی 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 اسانس بومادران را از استفاده کم‌چرب در مقایسه با نمونه پرچرب، بار میکروبی کمتری نشان داد. بنابراین می‌توان نمود سس مایونز پیشنهاد در طبیعی نگهدارنده یک به عنوان.

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 از شده استخراج طبیعی انجام شده است. ترکیبات مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای گیاهان و باکتری‌های بیماری‌زا روی بر فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی به حقیقت هستند. در فساد مولد آروماتیک ترکیبات فرار از زیادی مقادیر داشتن علت در طعم ایجادکننده مهم عوامل از آنها از برخی که می‌باشند (۱). توجه مورد می‌روند شمار به غذا نیز ضد و ضد اکسایشی خاصیت دارای ترکیبات فرار این طعم‌دهنده عنوان به می‌توانند و ذاتی بوده میکروبی روند (۲). به‌کار غذایی مواد در نگهدارنده و

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

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 مصرف طریق از *سالمونلا* توسط مسمومیت غذایی (۱۹۹۳) بورد رد و رادرف توسط خانگی مایونز است (۷). *سالمونلا اینتریتیدیس* یک شده گزارش 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، و اسانس *Ziziphora clinopodioides* 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 *سالمونلا* ATCC 25923 (*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25922) و *اشریشیاکلی* 4933 (*اینتریتیدیس* ATCC) لیوفیلیزه از سازمان صورت به پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. کلیه براث و EC محیط‌های کشت (بردپارکر آگار، 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 مجهز به ستون HP-5-MS (Agilent 7890 A مدل GC/MS) به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ طیف به متصل لایه ۲۵ میکرومتر ضخامت میلیمتر و تزریق شد. Agilent 5975 C مدل جرمی نگار شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، و مقایسه با RI)، شاخص کواتز (R_t زمان بازداری (طیف‌های جرمی استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه دستگاه GC/MS. (۱۲) صورت گرفت.

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

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

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

تهیه ***میکروبی:*** برای ***سوسپانسیون تهیه*** نوترینت آگار محیط کشت از میکروبی سوسپانسیون ساعت ۲۴ و کشت از استفاده شد. بعد شیب‌دار ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتورگذاری تهیه فارلند مک میکروبی معادل ۰/۵ سوسپانسیون 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 باشد. برای اطمینان از صحت تلقیح، کشت CFU/g میکروبی انجام گرفت. میزان رشد میکروارگانیسم‌ها پس از زمان‌های ۷۲ ساعت، ماه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ log 10 CFU/g گردید. نتایج به‌صورت ۶ تعیین و گزارش شد.

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

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تحلیل و ارزیابی آماری داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA( ) توسط نرم افزار Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA (Expert Design 8.0 برای تأیید وجود اختلاف بین داده‌ها انجام شد. نوع طراحی response surface optimal، نوع مطالعه Quadratic و مدل طراحی D-optimal 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) قطر اسانس، غلظت افزایش با بیشتر بود. همچنین یافته است. افزایش رشد عدم هاله

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 دارای معمولاً طبیعی سیستم‌های که آن‌جایی آزمایشگاهی شرایط به نسبت پیچیدگی بیشتری میکروبی ضد مطالعه خواص بر علاوه لذا هستند، ویژگی این آزمایشگاهی، محیط در بومادران اسانس بررسی مورد نیز باکتری‌ها بر روی سس مایونز و در گرفت. جدول ۳ جمعیت باکتریایی در انواع قرار 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

حسـاس‌ترین میکروارگانیسـم بـه اسـانس بومـادران) در بـین میکروارگانیســم‌های مــورد MIC(کمتــرین بررســی *اســتافیلوکوکوس اورئــوس* و مقــاوم‌ترین آنهــا *ســالمونلا اینتریتیــدیس* و *اشریشــیاکلی* بودنــد. اسـانس‌ها اثـرات ضـد میکروبـی خـود را از طریـق تغییـر سـاختار و عمـل غشـاء سـلولی اعمـال می‌کننـد. ایـن ترکیبـات نفوذپـذیری غشـا را افـزایش می‌دهنـد و بـا نفـوذ در غشـا منجـر بـه متـورم شـدن غشـا گردیـده و فعالیـت آن را تحـت تـاثیر قـرار می‌دهنـد و در نهایـت منجر بـه مـرگ سـلول خواهنـد شـد (۱۸). فعالیـت ضـد میکروبـی اسـانس بومـادران می‌توانـد ناشـی از حضـور مقادیر زیـاد کـامفور، بورنئـول، سـینئول و آلفـا کـادینول در اسانس باشد (۱۹).

جـدول ۱ و ۲ نشـان می‌دهـد کـه بـه‌طور معمـول باکتری‌هـای گرم‌مثبـت نسـبت بـه اسـانس حسـاس‌تر از باکتری‌هـای گرم‌منفـی هسـتند. نتـایج به‌دسـت آمـده در اســانس علیــه MIC|ایــن تحقیــق (بــالاتر بــودن باکتری‌هــای گرم‌منفــی نســبت بــه باکتری‌هــای گرم‌مثبـت) نیـز حـاکی از حسـاس‌تر بـودن باکتری‌هـای گرم‌مثبـت نسـبت بـه باکتری‌هـای گرم‌منفـی بـود. بـه دلیـل وجـود غشـاهای خـارجی نسـبتاً نفـوذ ناپـذیر احاطه‌کننـده دیـواره سـلولی در باکتری‌هـای گرم‌منفـی (لیپوپلی سـاکاریدهای دیـواره سـلولی) منطقـی بـه نظـر می‌رسـد کـه ایـن باکتری‌هـا در برابـر اثـرات ضـد میکروبـی اسـانس‌ها حساسـیت کمتـری از خـود نشـان دهند (۱، ۲۰).

در تیمارهــای مختلــف مــایونز، کلونی‌هــای *اشریشــیاکلی* و *ســالمونلا اینتریتیــدیس* در نمونــه‌های) مشـاهده نشـد. در مقابـل، تعـداد کلونی‌هـای Cشـاهد (*اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* پـس از ۷۲ سـاعت از تولیـد $۱۰^{۱}\times ۲/۵۳$ در CFU/g $۱۰^{۱}\times ۴/۲۶$ بــه CFU/g از ماه اول کـاهش یافـت. علـت ایـن امـر، احتمـالاً آلـودگی عرضـی بـا مـواد اولیـه بـه ویـژه وجـود تخم‌مـرغ غیـر

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، درجه حرارت، ویسکوزیته و غیره در این pH پایین، 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 می‌باشد. با این وجود a_w و pH رشد در مقادیر پایین در زمان pH در مایونز فاکتورهای دیگری را بجز 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 و *سالمونلا استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* مشاهده نشد. بنابراین مایونزی که *اینتریتیدیس* تحت شرایط خوب تولید شده باشد ریسک خطر pH، پاتوژن‌ها را ندارد (۲۴). برخی فاکتورها از جمله 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 حدود pH ۴ است. در این بررسی، pH بازدارنده نمونه‌های مایونز، نزدیک حد تحمل بیشتر پاتوژن‌ها افزایش pH می‌باشد. اثر اسید استیک، با کاهش pH می‌یابد (۲۲). اثرات سینرژیستی اسید استیک و 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 از نیز از اثرات لیزوزیم علیه باکتری‌های گرم مثبت 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، و غیره باشد (۲۳، pH، a_w نوع میکروارگانیسم‌ها، ۲۵).

و اسیدیته اثر مهمی در کاهش این pH 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* پایین pH آلوده کردند و در معرض *اینتریتیدیس* قرار دادند و مرگ سلولی را مشاهده کردند (۸). بنابراین جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم‌منفی در مایونز در ترکیب با فاکتورهای نامبرده از جمله pH، اسیدیته و غلظت نمک می‌باشد (۲۵، pH، ۳۰، 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. کمتر مایونز کم‌چرب یک اثر کشنده در pH 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 *E.*مایونز کم‌چرب حاوی ترکیبی با خاصیت ضد است که در مایونز پرچرب موجود نمی‌باشد *Coli* (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 اسیدی، اسید استیک، بنزوات و pH(لیزوزیم)، 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، pHبه ویژه علیه باکتری‌های گرم‌منفی بستگی به تأثیر بیشتری بر اثر pHدارد. درصد چربی نسبت به 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).

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

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*, *Salmonella enteritidis* which were inoculated into high fat mayonnaise (65%) and low fat mayonnaise (30%) 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 all of the microorganisms grew. The maximum cell counts of bacteria in low fat mayonnaise were approximately lower than the high fat mayonnaise or 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. In conclusion the essential oil of *Achillea millefolium* would lead to control food pathogen organisms as natural food preservative and therefore, it would be used as natural preservative in food industry.

Keywords: *Achillea, Antimicrobial properties, Essential oil, Mayonnaise*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 2, No. 2, Autumn & Winter 2020

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