نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ۳، شماره ۱

ناشر: دانشگاه زابل

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

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

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

هیات دبیران:

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

محمد بکائیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

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

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

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

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

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

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

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

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

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

کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

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

پیشگفتار

به نام خدا

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

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

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه

تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

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

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

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

شیوه نگارش مقاله:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

نحوه رفرنس نویسی:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می‌باشد:

گزارش موردی (CaseReport) باید شامل بخش‌های زیر باشد:

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

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

***بحث**

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

مقاله مروری (Review)

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

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

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

مقاله کوتاه (ShortCommunication)

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

نامه به سردبیر (Letter to Editor)

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

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

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

تعهد نامه

سردبیر محترم مجله تازه ها در میکروب شناسی دامپزشکی

با سلام؛

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

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

امضاء و تاریخ

عنوان مقاله: ----------

مشخصات کلیه نویسندگان مقاله به ترتیب مندرج در مقاله

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

آدرس پستی و الکترونیک نویسنده مسئول:

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

فرم تعارض منافع

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

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

.....

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

.....

عنوان مقاله: ----------

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

امضاء و تاریخ

اثرات ضد میکروبی عصاره‌های هندوانه ابوجهل و کلپوره بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای

بهمن فاضلی نسب*[۱]، زهرا یزدان پور[۲]

۱- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۸ بهمن ۱۳۹۸، بازنگری: ۲۵ خرداد ۱۳۹۹ ، پذیرش نهایی: ۱۵ تیر ۱۳۹۹

چکیده

در طول تاریخ بشری، بسیاری از بیماری‌های عفونی به‌طور سنتی با داروهای گیاهی درمان شده‌اند، به‌طوری‌که امروزه در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، داروهای گیاهی نقش اصلی را در درمان اولیه ایفا می‌کنند. هدف از این تحقیق، بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات هندوانه ابوجهل (میوه) و کلپوره (برگ) بر برخی باکتری‌های بیماری‌زا بوده است. گیاهان مورد بررسی از شهرستان زابل جمع‌آوری شده، سپس آسیاب شده و در حلال‌های اتانول، متانول، اتیل استات قرار داده و در نهایت عصاره‌گیری با دستگاه روتاری انجام شد. باکتری با جمعیت استاندارد تهیه شده و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی با روش میکرودایلوشن بر روی باکتری‌های *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* و *لیستریا مونوسیتوژنز* تعیین شد. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی (۱۲/۵ پی‌پی‌ام)، متانولی (۲۵ پی‌پی‌ام) و اتیل استات (۲۵ پی‌پی‌ام) هندوانه ابوجهل به ترتیب بر باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *ویبریو کلرا* و *باسیلوس سرئوس* مؤثر بوده‌اند. عصاره اتانولی کلپوره با کمترین غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام تنها توانسته باکتری *ویبریو کلرا* را مهار کند. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی کلپوره (۲۵ پی‌پی‌ام) در برابر باکتری *ویبریو کلرا* مشاهده و باکتری *باسیلوس سرئوس* در تمام غلظت‌ها رشد کرده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات با ۱۲/۵ پی‌پی‌ام بر *باکتری ویبریو کلرا* مشاهده شده است. در کل عصاره اتانولی هندوانه ابوجهل بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و عصاره اتیل استات کلپوره بر *باکتری ویبریو کلرا* مؤثر بوده‌اند لذا پیشنهاد می‌گردد بسته به هدف استفاده از عصاره گیاهی از نوع خاص گیاه به همراه مؤثرترین حلال مربوطه استفاده شود.

واژگان کلیدی: *فعالیت ضد میکروبی، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی، باکتری بیماری‌زا*

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

مقدمه

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

متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی هستند که برخلاف متابولیت‌های اولیه به شکل مستقیم در رشد، نمو و تولید مثل یک موجود زنده دخیل نیستند. فقدان متابولیت‌های ثانویه باعث مرگ فوری موجود نمی‌شود بلکه در طولانی مدت می‌تواند سبب اختلال در بقا، باروری و یا تغییرات ظاهری شده و گاهی نیز تغییری ایجاد نمی‌کند (۳). متابولیت‌های ثانویه گیاهان از آغاز زندگی بشر برای درمان عفونت‌ها و بیماری‌ها استفاده شده‌اند. طی صد سال گذشته داروهای شیمیایی ساختگی جایگزین ترکیب‌های طبیعی شده‌اند که برای ساختن داروهای شیمیایی همچون آسپرین و سالیسیلیک اسید نیز از ساختار گیاهان الگو برداری شده است (۴، ۶).

تقاضای رو به رشد بازار امروز برای محصولات طبیعی قابل تجدید و با در نظر گرفتن گیاهان به عنوان کارخانه بالقوه تولیدکننده محصولات بیوشیمیایی، زمینه‌های تحقیقاتی جدیدی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ایجاد شود (۴، ۷). از نیمه دوم قرن گذشته، تحقیقات وسیعی روی گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای جهان انجام گرفته و در پی آن داروهای گیاهی فراوانی تهیه و به بازار عرضه گردیده است و با توجه به فلور غنی ایران که بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی بوده و تعداد بسیار زیادی از آنها دارویی هستند ضرورت مطالعه بر روی مواد مؤثر دارویی فلور طبیعی ایران را حائز اهمیت کرده است (۸، ۹).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مرکبات و سبزی‌ها، بازدارنده‌ی رشد بیماری‌های بالینی مهم بوده و برخی تحقیقات، رابطه بین مصرف میوه‌ها و سبزی‌ها با کاهش بیماری‌های مزمن را تائید نموده‌اند (۱۰). گرچه میوه‌ها و سبزی‌ها از نظر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی متنوع هستند لیکن آنهایی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا دارند معمولاً حاوی آنتی‌اکسیدان‌های بیشتری هستند (۱۱، ۱۲).

مواد آنتی‌اکسیدانی کاربردهای زیادی علاوه بر درمان و پیشگیری از بیماری‌های سرطانی و تصلب شرایین داشته مثلاً از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی برگ زیتون جهت افزایش انبارمانی چربی‌ها و روغن‌ها، از عصاره پوست بادام‌زمینی به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی جهت نگهداری چیپس‌های سیب‌زمینی و غیره استفاده شده است (۱۳). تحقیقات نشان داده که منبع دریافت فنل‌ها و فلاونوئیدها در نقاط مختلف جهان به نوع رژیم غذایی مردم منطقه وابسته است. برای مثال در کشورهایی همچون ژاپن و چین مصرف چای سبز تأمین‌کننده این ترکیبات مورد نیاز بدن هست در حالی‌که این مواد در کشورهای غربی با مصرف سیب و پیاز و در کشورهای شرقی با مصرف سبزی‌ها و مواد غذایی تخمیری تأمین می‌شوند (۱۴).

در کشور ایران به‌طور جامع نوع خاص استفاده از انواع مواد حاوی آنتی‌اکسیدان وجود ندارد اما با تبلیغات مختلف کارهایی ازجمله مصرف سبزی‌ها به‌صورت خام و پخته، برگ گیاهان و درختان مختلف (به‌صورت دم‌نوش، عرقیات، عطرمایه، عصاره، مربا، شربت، ترشی، مواد شوینده (از جمله سدر) و حتی مصرف به صورت دلمه و غیره) صورت گرفته که پیرو تحقیقات مختلف باید از اندام‌های مختلف گیاهان که دارای نوع خاص مواد آنتی‌اکسیدانی بوده استفاده خاصی از آنها بشود (۱۵).

امروزه ترکیبات شناسایی شده در گیاهان دارویی به

عنوان داروهای جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند و می‌توانند به عنوان، کلیدی برای شناسایی روش‌های درمانی کم هزینه و دارای عوارض جانبی کمتر در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار روند (۱۶) همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی سال‌های زیادی مورد بررسی قرار گرفته است، اما بیشترین تمرکز و بررسی طی سی سال گذشته است. در این دوره بیشتر روی گیاهانی که کاربرد سنتی داشته به ویژه در کشورهایی نظیر چین و آمریکا کار شده است. درحالی‌که گزارش‌های مربوط به گیاهان بومی کشور ما ایران، بسیار پراکنده و جزئی است (۱۷). بر این اساس در تحقیق حاضر سعی شد تا اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات، هندوانه ابوجهل، کلپوره بر برخی باکتری‌های *ویبریو کلرا* ، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد ارزیابی قرار گیرد.

گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L)، از خانواده *Cucurbitaceae* و راسته کدوئیان *Cucurbitales* بوده که از جمله گیاهان دارویی ارزشمند است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار برده شده است (۱۸). عصاره میوه این گیاه شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، تری ترپنوئیدها و گلیکوزیدها است (۱۹). از میوه هندوانه ابوجهل به عنوان ضد قند خون، ضد فشار خون، ضد تومور، ضد تب، ضد میکروب ذکر نام شده است (۲۰). این گیاه انتشار بیشتری در ایران، در نواحی جنوب کشور و مناطقی همچون جنوب استان خراسان دارد.

کلپوره (*Teucrium polium*) گیاهی معطر از خانواده نعناعیان است که در نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می‌روید (۲۱). گونه‌های مختلف کلپوره به عنوان گیاه دارویی شناخته شده و اثرات ضد تشنج، ضد التهاب، ضد درد، تب بر، التیام دهندگی زخم در آنها ثابت شده است .این گیاه پراکندگی وسیع در نواحی مختلف شمال، غرب، جنوب و مرکز ایران، منطقه البرز، اطراف تهران، مخصوصاً در غالب نواحی نیمه بایر و کوهستان‌های نیمه خشک دارد (۲۲، ۲۳).

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات: گیاهان هندوانه ابوجهل (میوه) و کلپوره (برگ) در شهرستان زابل (در فصل بهار محوطه پژوهشکده کشاورزی منطقه سیستان) جمع‌آوری و خشک گردیدند. برای تهیه عصاره اتانولی، متانولی و اتیل استات، مقدار ۱۰ گرم پودر خشک گیاه در داخل ارلن‌های نیم لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد (برای تهیه عصاره اتانولی)، متانول، اتیل استات قرار داده شد. محتوی ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (Pars Azma- ایران) با سرعت ۱۳۰ rpm مخلوط شده، سپس به وسیله کاغذ واتمن شماره ۲ صاف گردید. جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری (Heidolph- آلمان) و با کمک پمپ خلأ (تقطیر در خلأ) انجام گرفت. عصاره به دست آمده وزن شده سپس در حلال DMSO حل شد. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در آزمایش‌های ضد میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (۲۴، ۲۵).

تهیه باکتری و ذخیره‌سازی: جدایه باکتری‌های ویبریو کلر (ATCC1611)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC1189)، باسیلوس سرئوس (ATCC1015)، شیگلا دیسنتری (ATCC1188) و لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC1298) از کلکسیون قارچ و باکتری ایران تهیه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مایع نوترینت براث گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از ۲۴ ساعت در محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱۰ درصد گلیسرول استریل در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی ذخیره‌سازی شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: باکتری‌های *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسنتری* و *لیستریا مونوسیتوژنز* را پس از انجماد زدایی در دمای ۳۷ درجه، در محیط نوترینت براث و همچنین به منظور بررسی کلنی‌های خالص از نمونه‌های باکتریایی روی

محیط جامد TSA (Tripton soy broth) کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت از کلنی‌های خالص هر باکتری برداشته و در آب مقطر استریل کدورتی معادل نیم مک فارلند ساخته و بعد برای اطمینان از غلظت باکتری‌ها با اسپکتروفتومتر (UV-2100, Unico – آلمان) جذب آن با طول‌موج ۶۰۰ nm قرائت شده، تراکم باکتری‌ها با غلظت ۱/۵ ×۱۰^{۶} cfu/ml جذبی معادل ۰/۱- ۰/۰۸ دارد (۲۶).

تعیین میزان حساسیت جدایه‌های باکتری نسبت به عصاره‌های مختلف گیاهان: 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 براث 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 ۱۰^{۷} 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 (MIC)(Minimum inhibitory concentration) 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 (MBC)(Minimum bactericide concentration) محاسبه گردید (۲۷).

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌های هندوانه ابوجهل با حلال‌های مختلف دارای اثر مهارکنندگی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه است، به طوری‌که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی در برابر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* مشاهده شده است (۱۲/۵ پی‌پی‌ام). بیشترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی هندوانه ابوجهل ۵۰ پی‌پی‌ام بود که رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس* و *ویبریو کلرا* در این غلظت مهار شد. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی هندوانه ابوجهل در برابر باکتری *ویبریو کلرا* مشاهده شد (۲۵ پی‌پی‌ام) و بیشترین غلظت مهارکنندگی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز* و *شیگلا دیسنتری* دیده شد و همچنین، کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات هندوانه ابوجهل در برابر باکتری *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد (۲۵ پی‌پی‌ام) و بیشترین غلظت مهارکنندگی نیز برابر با ۵۰ پی‌پی‌ام بود (جدول ۱).

نتایج حاصل از بررسی عصاره‌های مختلف کلپوره نشان داد که عصاره اتانولی کلپوره با غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام تنها توانسته باکتری *ویبریو کلرا* را مهار کند در صورتی‌که باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسیتوژنز* و *شیگلا دیسنتری* در تمام غلظت‌های عصاره، رشد کردند و عصاره اتانولی هیچ اثر مهارکنندگی از خود نشان نداده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی کلپوره در برابر باکتری *ویبریو کلرا* مشاهده شد (۲۵ پی‌پی‌ام) و بیشترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز* و *شیگلا دیسنتری* دیده شد (۵۰ پی‌پی‌ام). باکتری *باسیلوس سرئوس* در تمام غلظت‌ها رشد کرد. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات برابر با ۱۲/۵ پی‌پی‌ام در برابر *باکتری ویبریوکلرا* بود و رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در غلظت ۲۵ پی‌پی‌ام عصاره اتیل استات مهار شد و بیشترین غلظت مهارکنندگی این عصاره، برابر با ۵۰ پی‌پی‌ام، در برابر *شیگلا دیسنتری* مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات هندوانه ابوجهل

باکتری	MIC/MBC عصاره اتانولی	MIC/MBC عصاره متانولی	MIC/MBC عصاره اتیل استات
استافیلوکوکوس اورئوس	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ -۱۰۰
باسیلوس سرئوس	۵۰ -۱۰۰	رشد	۲۵ - ۵۰
ویبریو کلرا	۵۰ -۱۰۰	۲۵ - ۵۰	۵۰- ۱۰۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲/۵ -۲۵	۵۰- ۱۰۰	۵۰ - ۱۰۰
شیگلا دیسنتری	۲۵ - ۵۰	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ -۱۰۰

جدول -۲: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات کلپوره

باکتری	MIC/MBC عصاره اتانولی	MIC/MBC عصاره متانولی	MIC/MBC عصاره اتیل استات
استافیلوکوکوس اورئوس	رشد	۵۰ - ۱۰۰	۲۵- ۵۰
باسیلوس سرئوس	رشد	رشد	۲۵ - ۵۰
ویبریو کلرا	۵۰ -۱۰۰	۲۵ - ۵۰	۱۲/۵ - ۲۵
لیستریا مونوسیتوژنز	رشد	۵۰ - ۱۰۰	رشد
شیگلا دیسنتری	رشد	۵۰ - ۱۰۰	۵۰ -۱۰۰

بحث

کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی (۱۲/۵ پی‌پی‌ام)، متانولی (۲۵ پی‌پی‌ام) و اتیل استات (۲۵ پی‌پی‌ام) هندوانه ابوجهل به ترتیب بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، *ویبریو کلرا* و *باسیلوس سرئوس* مؤثر بوده‌اند. عصاره اتانولی کلپوره با کمترین غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام تنها توانسته باکتری *ویبریو کلرا* را مهار کند. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی کلپوره (۲۵ پی‌پی‌ام) در برابر باکتری *ویبریوکلرا* مشاهده و باکتری *باسیلوس سرئوس* در تمام غلظت‌ها رشد کرده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات با ۱۲/۵ پی‌پی‌ام بر *باکتری ویبریو کلرا* مشاهده شده است.

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف هندوانه ابوجهل بررسی و مشخص شده است که قطر هاله مهاری عصاره اتیل استات هندوانه ابوجهل در برابر باکتری‌های *B.cereus*، *S.aureus*، *E.faecalis*، *E.coli* و *S.enteritidis*، *P.aeruginosa* به ترتیب برابر با ۱۲/۱±۰/۳، ۱۳/۱±۰/۸، ۲۹/۵±۰/۵، ۷±۰/۵، ۱۳±۰/۵ و ۱۲/۶±۰/۳ میلی‌متر بوده است و حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتیل استات در برابر همین باکتری‌ها برابر با ۰/۶۲۵، ۵، ۲/۵، ۱۰>، ۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۸). در تحقیق حاضر نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتیل استات هندوانه ابوجهل نیز نشان داد که عصاره اتیل استات کمترین غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری باسیلوس سرئوس داشته است درحالی‌که عصاره اتانولی و متانولی با کمترین غلظت باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و ویبریو کلرا را مهار کرده‌اند.

قطر هاله مهاری عصاره استونی برگ هندوانه ابوجهل با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در برابر باکتری‌های *S.aureus*، *E.coli*، *P.aeruginosa*، *K.pneumonia* و *S.marcescens* برابر با ۱۱/۲ – ۱۱/۸، ۱۴، ۱۰ و ۹ میلی‌متر بوده است (۲۹). قطر هاله مهاری عصاره خام هندوانه ابوجهل در برابر باکتری‌های *E,coli*، *P.aeruginosa*، *P.mirabilis*

K.pneumoniae و *S.aureus* به ترتیب برابر با ۲۱/۸±۰/۴۱، ۲۲±۰/۴۷، ۱۶/۳±۰/۲۶، ۱۳/۱±۰/۵۱، ۲۳/۱±۰/۴۷ میلی‌متر بوده است (۳۰). عصاره متانولی هندوانه ابوجهل مهارکننده باکتری‌های *باسیلوس سابتی لیس*، *استرپتوکوکوس پایوژنز*، و *سالمونلا تیفی موریوم* بوده درحالی‌که هیچ اثری بر روی باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس*، *پروتئوس ویولگری* و *ویبریو کلرا* نداشته است (۳۱). از طرفی عصاره اتانولی هندوانه ابوجهل با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قطر هاله مهاری ۱۷، ۱۴، ۱۵ و ۱۲ میلی‌متر در برابر باکتری‌های *باسیلوس سابتی لیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، و *سالمونلا تیفی موریوم* ایجاد کرده است (۳۲). از نتایج تحقیقات ارائه شده و همچنین تحقیق حاضر می‌توان فهمید که بیشترین نقش و تأثیر عصاره هندوانه ابوجهل مربوط به عصاره اتانلی و سپس اتیل استات، آن هم بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* بوده است. ضمناً در تحقیقی عدم تأثیر عصاره متانولی هندوانه ابوجهل بر برخی باکتری‌ها از جمله *ویبریو کلرا* ذکر شده و با تحقیق حاضر که هر سه نوع عصاره متانولی، اتانلی و اتیل استاتی بر باکتری نامبرده مؤثر بوده و بیشترین اثر را نیز عصاره متانولی دارا بوده مغایرت داشته است که این می‌تواند به دلیل منطقه رویشی گیاه مورد استفاده و شرایط حاکم بر آزمایش باشد.

اثر ضد میکروبی عصاره الکلی کلپوره بر روی باکتری‌ها بررسی و مشخص شده است که غلظت معینی از عصاره این گیاه دارای بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتی لیس* اثر داشته اما تأثیر عصاره‌ها با کم شدن غلظت آن‌ها کم می‌شده است. همچنین این عصاره تنها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر *کلبسیلا پنومونیا* بوده و بر روی باکتری *اشریشیاکلی* اثر نداشت (۳۳). حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره کلپوره بر باکتری‌های *S.aureus, S.typhi* برابر با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است درحالی‌که برای باکتری‌های *Bordetella bronchiseptica, Bacillus anthracis* برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۳۴). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره اتیل استات کلپوره با کمترین غلظت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مهار کرده است درحالی‌که *استافیلوکوکوس اورئوس* در تمامی غلظت‌های عصاره اتانولی کلپوره رشد کرده است، همچنین باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در تمامی غلظت‌های عصاره اتانولی و اتیل استات کلپوره رشد کرده است. ضمناً بر اساس نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات ارائه شده مشخص شد که نوع عصاره نقش مهمی در اثر ضد باکتریایی داشته است که همین امر نیز قبلاً ثابت شده است (۳۵). پس جهت به دست آوردن بهترین نتیجه اثر ضد باکتریایی بایستی ابتدا گیاهان را از مناطق رویشی متفاوت جمع‌آوری و سپس انواع عصاره‌های ممکنه را امتحان تا نتیجه دلخواه حاصل شود.

عطرمایه کلپوره بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* دارای اثر مهارکنندگی داشته است (۳۶) اما عطرمایه و عصاره متانولی کلپوره هیچ‌گونه فعالیت مهارکنندگی از خود بر علیه *P. aeruginosa* و *P. cartovorum* نشان نداده ولی بر *B.nigrifluens*، *R.solanaceaearum*، *S.scabies* و *P.agglomerans* مؤثر بوده است (۳۷). قطر هاله مهاری ۳/۷، ۲ و ۲ میلی‌متر کلپوره بر باکتری‌های *باسیلوس سابتی لیس*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *پاراکوکوس پاراترونوس* گزارش شده است (۳۸). در نتایج تحقیق حاضر و همچنین تحقیقات ارائه شده مشخص شد که عصاره‌های مختلف کلپوره بر باکتری‌های مختلفی مؤثر بوده‌اند اما آنچه در تحقیق حاضر نمود بیشتری داشت این است که به ترتیب عصاره‌های اتیل استات، متانولی و اتانلی بیشترین نقش را در مهار *ویبریو کلرا* داشته است که حتی در تحقیقات قبلی از عدم مهار این باکتری توسط عصاره‌های مختلف گزارش شده بود (۳۱).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌ها با حلال‌های مختلف، فعالیت ضد میکروبی متفاوتی از خود نشان دادند به طوری‌که در کل عصاره هندوانه ابوجهل با

حلال‌های مختلف اثر مهاری بیشتری نسبت به عصاره‌های کلپوره از خود نشان داده که ناشی از مواد مؤثره مختلف گیاه است و می‌توان از این عصاره‌ها برای کاهش آلودگی باکتریایی و کاهش عفونت ناشی از آنها استفاده کرد؛ اما به طور خاص مثلاً بر باکتری *ویبریو کلرا* عصاره اتیل استاتی کلپوره مؤثرتر بوده است لذا پیشنهاد می‌گردد بسته به هدف استفاده از عصاره گیاهی از نوع خاص گیاه به همراه مؤثرترین حلال مربوطه استفاده شود.

Reference

1- Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology.2012;156(1):7-17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006

2- Kwok CY, Wong CNY, Yau MYC, *et al.* Consumption of dried fruit of *Crataegus pinnatifida* (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. Journal of functional foods. 2010;2(3):179-186. doi: 10.1016/j.jff.2010.04.006

3- Caraci F, Crupi R, Drago F, Spina E. Metabolic drug interactions between antidepressants and anticancer drugs: focus on selective serotonin reuptake inhibitors and hypericum extract. Current drug metabolism. 2011; 12(6): 570-577.

4- Omidi M, Abdollahi P. Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites. Genetics Novin. 2014; 9(4): 391-402.

5- Van Wyk B, Wink M. Medicinal plants of the world. Pretoria: South Africa: Briza Publications, 2004.

6- van Wyk BE, Albrecht C. A review of the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of Sutherlandia frutescens (Fabaceae). J Ethnopharmacol. 2008; 119(3): 620-629. 10.1016/j.jep.2008.08.003

7- Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research. 2009; 3(13): 1222-1239.

8- Zakizadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Ebrahimzadeh M. In vitro antioxidant activity of flower, seed and leaves of Alcea hyrcana Grossh. European review for medical and pharmacological sciences. 2011; 15(4): 406-412.

9- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Eslami S. Effect of Increasing the Polarity of Solvent on Total Phenol and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Myrtle (Myrtus communis L.). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2015; 25(126): 68-81 [Farsi with abstract English].

10- Hayat K. Citrus: Molecular Phylogeny, Antioxidant Properties and Medicinal Uses. Nova Science Publishers. 2014: 235 Pages. ISBN: 9781631179853

11- Guo C, Yang J. Progress in the study of antioxidant capacity of fruits and vegetables. China public health. 2001; 17(87-88).

12- Fazeli-Nasab B, Sirousmehr A, Mirzaei N, Solimani M. Evaluation of total phenolic, flavenoeid content and antioxidant activity of Leaf and Fruit in 14 different genotypes of *Ziziphus mauritiana* L. in south of Iran. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants. 2017; 4(4): 1-14.

13- Rehman Z-U. Evaluation of antioxidant activity of methanolic extract from peanut hulls in fried potato chips. Plant Foods for Human Nutrition. 2003;58(1):75-83. https://doi.org/10.1023/A:1024031522588

14- Wach A, Pyrzyńska K, Biesaga M. Quercetin content in some food and herbal samples. Food chemistry. 2007; 100(2): 699-704. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.028

15- Jahantigh Haghighi z, fahmideh l, Fazeli Nasab b. Evaluation and comparison of Leaf antioxidant properties and morphological traits of tomato varieties (*Lycopersicon esculentum* L). Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research. 2018; 13(50): 63-76.

16- Abtahi Froushani M, Nafisi S, Esmaili Gourvarchin Galeh H, *et al.* The Effects of Citrullus Colocynthis (L.) Hydroalcoholic Extract on the Function of Lymphocyte Proliferation and Innate Immune System Responses after Challenge with the REV1 Vaccine in Wistar Rats. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016; 6(2): 227-234.

17- Mohammadi M, Asili J, Kamali H. Study of the antioxidant and antibacterial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos*. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2014; 6(1):161-167.

https:doi.org/10.29252/jnkums.6.1.161

18- Kumar S, Kumar D, Saroha K, *et al.* Antioksidativni potencijal i sposobnost hvatanja slobodnih radikala metanolnog ekstrakta plodova *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Acta Pharmaceutica. 2008; 58(2): 215-220. https://doi.org/10.2478/v10007-008-0008-1

19- Marzouk B, Marzouk Z, Haloui E, *et al.* Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of Citrullus colocynthis from southern Tunisia. J Ethnopharmacol 2010;128(1):15-19. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.027

20- Marzouk Z, Marzouk B, Mahjoub MA, *et al.* Screening of the antioxidant and the free radical scavenging potential of Tunisian Citrullus colocynthis Schrad. from Mednine. Journal of Food, Agriculture & Environment 2010;8(2):261-265. Record Number : 20103205646

21- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods (a review). International Journal of Food Microbiology. 2004; 94(3): 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

22- Fazeli-Nasab B, Rahnama M, Shahriari S. The antimicrobial properties of hydro-alcoholic extracts of 29 medicinal plants on *E. coli* and *Staphylococcus aureus* microbes. New Findings in Veterinary Microbiology. 2018; 2(2): 1-15.

23- Mozafarian V. Classification of plant morphology and taxonomy. Amir Kabir Publications. 2010:512.

24- Fazeli-Nasab B. Evaluation of Antibacterial Activities of Hydroalcoholic Extract of Saffron Petals on Some Bacterial Pathogens. Journal of Medical Bacteriology. 2019; 8(5, 6): 8-20.

25- Rahnama M, Fazeli Nasab B, Mazarei A, Shahriari S. Evaluation of antimicrobial activity hydro alcoholic extract of some medicinal herbs against a range of Gram-positive and gram-negative bacteria. New Findings in Veterinary Microbiology 2018; 2(1): 1-19.

26- Malayeri FA, Yazdanpour Z, Bandani H, *et al.* Antimicrobial and anti-biofilm effects of *Thyme* essential oils and *Peppermint* on *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* resistant to different antibiotics. New Findings in Veterinary Microbiology. 2020; 2(2): 41-51.

27- Saeedi S, Sabbagh SK, Sabori RE. A Study of antibacterial activity of plant extract and essential oil of *Myrtus communis* against resistant strains of *Staphyloccocus aureus* bacteria to selective antibiotics. Journal of Zabol University of Medical Sciences and Health Services (Journal of Rostamineh). 2012; 4(3): 21-32.

28- Chawech R, Mhalla D, Trigui M, *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of extracts and compounds isolated from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2015; 4(4): 197-203.

29- Priyavardhini S, Vasantha K, Umadevi M. Antibacterial activity on Citrullus colocynthis leaf extract. Anc Sci Life. 2009; 29(1): 12-13. PMCID: PMC3336298; PMID: 22557336

30- Srivastava G, Jain R, Vyas N, *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and isolated compounds from Citrullus colocynthis (L.) Schrad 2013.

31- Gurudeeban S, Rajamanickam E, Ramanathan T, Satyavani K. Antimicrobial activity of Citrullus colocynthis in Gulf of Mannar. International Journal of Current Research. 2010; 2(March): 78-81.

32- Aljabry AS, Alrasheid AA, Ramadan E. Citrullus Colocynthis a Prospective Antimicrobial and Antifungal Agent. American Journal of Medicine and Medical Sciences. 2019; 9(2): 41-45. https:doi.org/10.5923/j.ajmms.20190902.01

33- Teimori M. Investigation of antimicrobial effect of extract of Teucrium polium L. on some gram positive and gram negative bacteria. Scientific Journal Management System. 2012; 8(1): 1-6.

34- Darabpour E, Motamedi H, Nejad SMS. Antimicrobial properties of Teucrium polium against some clinical pathogens. Asian Pac J Trop Med. 2010; 3(2): 124-127. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60050-8

35- 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]

36- Moghtader M, Salari H, Farahm A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. Journal of Ecology and the Natural Environment. 2011; 3(6): 210-214.

37- Purnavab S, Ketabchi S, Rowshan V. Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian Teucrium polium against some of phytobacteria. Nat

Prod Res 2015; 29(14): 1376-1379. https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1000320

38- Setif A. Antibacterial activity of extract of *Ajuga iva* and *Teucrium polium*. Adv Environ Bio. 2011; 52: 491-495.

Antimicrobial effects of extract of *Citrullus colocynthis* and *Teucrium polium* on some Bacteria

Bahman Fazeli-Nasab*[1], Zahra Yazdanpour [2]

1- Research Department of Agriculture and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Zabol, Iran.
2- Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

Receive: January 28, 2020; Revise: June 14, 2020; Accept: June 15, 2020

Summary

Throughout human history, many infectious diseases have traditionally been treated with herbal medicines, so today, in many developing countries, herbal medicines play a major role in early treatment. The purpose of this study was to investigate antimicrobial effects of ethanol, methanol, ethyl acetate *Citrullus colocynthis* (Fruit) and *Teucrium polium* (Leaf) on some pathogenic bacteria. The plants were collected from Zabol City, then milled and placed in solvents of ethanol, methanol ethyl acetate. Finally, extraction was carried out using a rotary machine. The bacteria were prepared as standard and the minimum inhibitory concentration and minimum destructive concentration were determined by micro-dilution method. The lowest inhibitory concentrations of ethanolic (12.5 ppm), methanolic (25 ppm) and ethyl acetate (25 ppm) extracts of *Citrullus colocynthis*were observed on the bacteria Listeria *monocytogenes*, *Vibrio chlora* and *Bacillus cereus*, respectively. The ethanolic extract of *Teucrium polium* with a minimum concentration of 50 ppm was only able to inhibit the bacterium *Vibrio cholerae*. The lowest inhibitory concentration of chloroprene methanolic extract of *Teucrium polium* with 25 ppm was observed against *Vibrio cholerae* bacterium and the bacterium *Bacillus cereus* grew at all concentrations. The lowest inhibitory concentration of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* was observed with 12.5 ppm on *vibriochlora bacteria*. In general, ethanolic extracts of *Citrullus colocynthis* have been effective on *Listeria monocytogenes* bacteria and Ethyl acetate extracts of *Teucrium polium* have been effective on *Vibrio cholerae*, so it is recommended to use a special type of plant with the most effective solvent depending on the purpose of using herbal extracts.

Key Words: *antimicrobial effect, MIC, MBC, virulence Bacteria*

تأثیر محلول روئی عاری از سلول *Lactobacillus reuteri* بر میزان رشد گونه توکسین‌زای قارچ *Fusarium oxysporum* در آزمایشگاه

مریم رحیمی کاکلکی[۱]، آرش امیدی[۲*]

۱- دانشجوی دکتری بهداشت خوراک دام، گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲- استاد گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

دریافت مقاله: ۰۵ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۱۸ تیر ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۵ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

لاکتوباسیلوس روتری یک پروبیوتیک است که در حضور گلیسرول، روترین را که یک ماده ضد میکروب با طیف گسترده است تولید می‌کند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثربخشی محلول روئی عاری از سلول *لاکتوباسیلوس روتری* بر رشد قارچ *فوزاریوم اوکسیسپوروم* انجام گرفت. بدین منظور، محلول روئی عاری از سلول باکتری، از سانتریفیوژ (۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه) کشت اورنایت باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در محیط با و بدون گلیسرول، تهیه شد. اثر مهاری آن با استفاده از دو روش: میکروتیترپلیت (مقادیر سریالی از ۱۰۰ تا ۶/۲۵ میکرولیتر از دو نوع محلول روئی عاری از سلول؛ ۱۰ میکرولیتر اسپور قارچ (۲×۱۰^{۶} spores/ml)؛ محیط PDB) و روش کشت در لوله (مقادیر ۶۰ و ۸۰ مایکرولیتر از دو نوع محلول روئی عاری از سلول؛۱۰ میکرولیتر اسپور قارچ (۲×۱۰^{۶} spores/ml)؛ محیط SDB) بررسی شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشنده محلول روئی عاری از سلول حاصل از محیط کشت حاوی دو درصد گلیسرول، ۶۰ میکرولیتر تعیین گردید. محلول روئی عاری از سلول حاصل از محیط کشت فاقد گلیسرول، اثر مهاری بر رشد قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* نشان نداد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر محلول رویی عاری از سلول به‌دست آمده از محیط کشت *لاکتوباسیلوس روتری* حاوی دو درصدگلیسرول احتمالاً به دلیل حضور روترین، قادر به مهار رشد گونه توکسین‌زای *فوزاریوم اکسیسپوروم* بوده و می‌تواند به‌عنوان یک عامل کنترل‌کننده زیستی بالقوه علیه گونه‌های توکسین‌زای *فوزاریوم*، در صنایع خوراک دام و مواد غذایی، مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *باکتری اسید لاکتیک، روترین، فوزاریوم، گلیسرول، مایکوتوکسین*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: aomidi@shirazu.ac.ir

مقدمه

فوزاریوم‌ها از جمله مهم‌ترین قارچ‌های مولد مایکوتوکسین هستند که به‌طور گسترده در سراسر جهان، غلات و خوراک حیوانات را آلوده می‌کنند و طیف گسترده‌ای از اثرات سمی را به صورت حاد و مزمن در حیوانات مزرعه و انسان ایجاد می‌کنند و می‌توانند منجر به مرگ انسان یا حیوانات شوند (۱، ۲). با توجه به مقاوم بودن این سموم به دما و فشار بالا و همچنین زیان‌های اقتصادی ناشی از آنها (۳) و نیز به دلیل محدودیت‌های استراتژی‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی که به منظور سم‌زدایی مواد غذایی و خوراک‌های آلوده دامی به کار گرفته شده است (۴)، توجه پژوهشگران به استفاده از میکرو ارگانیسم‌های ایمن* به منظور کاهش اثرات مایکوتوکسین‌ها معطوف شد.

به‌دنبال مطالعات صورت گرفته، قابلیت مهار رشد و تولید مایکوتوکسین در برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک به اثبات رسید (۵) و تعدادی از آنها یا متابولیت‌های ضد قارچ آنها به عنوان نگهدارنده طبیعی جهت جلوگیری از رشد قارچ‌های توکسین‌زا و مهار تولید مایکوتوکسین مورد استفاده قرار گرفتند (۶) قابلیت مهارکنندگی این باکتری‌ها عمدتاً به تولید ترکیبات ضد میکروبی نظیر اسیدهای آلی، اسیدهای چرب، پراکسید هیدروژن، فنیل‌لاکتیک اسید، دی‌پپتیدهای حلقوی، ترکیبات پروتئینی، دی‌استیل، باکتریوسین‌ها و روترین مربوط می‌باشد (۷). در این میان *لاکتوباسیلوس روتری* از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک است که در دستگاه گوارش انسان، حیوانات و در غذاهای تخمیر شده یافت می‌شود و به عنوان پروبیوتیک در تغذیه انسان و دام استفاده می‌گردد (۸). این باکتری در محیط‌های با اکسیژن محدود رشد می‌کند و به دامنه وسیعی از pHهای محیط مقاوم بوده (۹) و به کمک مکانیسم‌های متعددی از طریق ترشح واسطه‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای ارگانیک، اتانول و روترین (۱۰)، قادر به مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است (۱۰، ۱۱). *لاکتوباسیلوس روتری* گلیسرول را به یک مهارکننده رشد قوی به نام روترین تبدیل می‌کند؛ این متابولیت جالب توجه قادر به مهار طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها از جمله پروتوزوآها، باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است (۱۲). از این رو به نظر می‌رسد این باکتری بتواند بر مهار رشد قارچ‌های *فوزاریوم* نیز مؤثر باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر محلول روئی عاری از سلول▯ (CFCS) *لاکتوباسیلوس روتری* حاصل از محیط کشت با و بدون گلیسرول بر میزان رشد گونه توکسین‌زای قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* بوده است.

مواد و روش‌ها

قارچ *Fusarium oxysporum* (PTCC-۵۱۱۵) و باکتری *Lactobacillus reuteri* (PTCC-۱۶۵۵) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران، تهیه و فعال‌سازی طبق دستورالعمل ارائه شده انجام گرفت. در این مطالعه از محیط‌های کشت PDA‡، PDB§، MRS Agar** و MRS Broth محصول شرکت ایرانی "تعاونی کاردان آزما" با نام تجاری MIRMEDIA و محیط SDB†† محصول شرکت آلمانی Merck استفاده شد. به منظور جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی تمام آزمایشات زیر هود میکروبی انجام گرفت.

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ: سوسپانسیون اسپور قارچ *F. oxysporum* با استفاده از کشت ده روزه در محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. بدین منظور میسلیوم‌های رشد یافته بر روی محیط PDA از طریق افزودن آب مقطر استریل به روش پیپتینگ ملایم شستشو داده شد و مایع حاصل از شستشو که حاوی

* Generally Regarded As Safe (GRAS)

▯ Cell Free Culture Supernatant (CFCS)

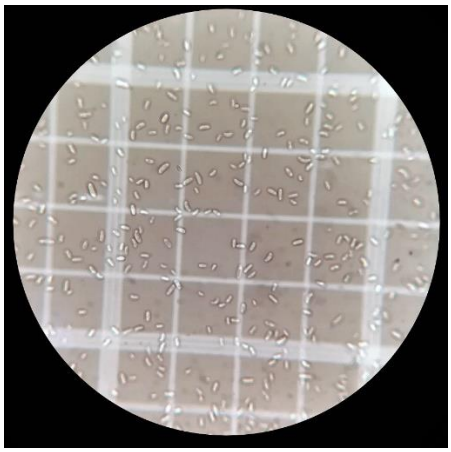
▯ Potato Dextrose Agar

▯ Potato Dextrose Broth

** DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS)

▯▯ Sabroud Dextrose Broth

اسپورهای قارچ بود جمع‌آوری شد. تعداد اسپورها توسط لام نئوبار شمارش و غلظت نهایی اسپور روی spores/ml ۲×۱۰^{۶} تنظیم شد (شکل ۱).



شکل ۱- اسپورهای قارچ *Fusarium oxysporum* جمع آوری شده ازکشت ده روزه در محیط PDA (بزرگنمایی 40×)

کشت و آماده سازی باکتری: مقدار یک میلی‌لیتر از محتویات فعال شده باکتری ***L. reuteri*** به محیط کشت MRS Agar انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط با اکسیژن محدود گرمخانه‌گذاری و از این کشت در مطالعه استفاده گردید. به منظور محدود کردن اکسیژن مقدار محیط آگار بیشتری (۲۵ میلی‌لیتر) نسبت به مقدار متداول (۱۵-۲۰ میلی‌لیتر در پلیت شیشه‌ای به قطر شش سانتی‌متر) به منظور کم کردن فاصله سطح کشت و درب پلیت و به حداقل رساندن هوای موجود (و نه حذف کامل هوا) به هر کدام از پلیت‌ها اضافه شد. از باکتری کشت شده به منظور بررسی خلوص و عدم آلودگی، اسمیر تهیه شد. تصویر مشاهده شده در زیر میکروسکوپ حاکی از خلوص و عدم آلودگی باکتری کشت شده بود (شکل ۲).

شکل- ۲- اسمیر تهیه شده از کشت ۴۸ ساعته باکتری *Lactobacillus reuteri*

تهیه محلول روئی عاری از سلول: مقدار ده میلی‌لیتر محیط MRS Broth با و بدون دو درصد گلیسرول با ۱۰۰ میکرولیتر کشت اورنایت باکتری *L. reuteri* (۱×۱۰^{۸} CFU/ml) تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط با اکسیژن محدود گرمخانه‌گذاری شد. به منظور محدود کردن اکسیژن از لوله درب‌دار با حجم ۱۰ میلی لیتر استفاده شد (کاهش حجم هوای موجود روی محیط مایع و نه حذف کامل آن). بعد از گذشت ۲۴ ساعت،

محیط کشت حاصل سانتریفیوژ شد (۸۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه) و مایع فوقانی جمع‌آوری و به منظور حذف باکتری‌های موجود احتمالی از فیلتر ۰،۲۲ میکرون عبور داده شد. محلول روئی عاری از سلول استریل به‌دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

بررسی فعالیت ضد قارچی محلول روئی عاری از سلول: بررسی فعالیت ضد قارچی محلول CFCS باکتری *L.reuteri* به دو روش ۱- میکروتیتر پلیت* و ۲- کشت در لوله[] انجام شد:

۱- به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی محلول CFCS باکتری *L.reuteri* به روش میکروتیتر پلیت از میکروپلیت ۹۶ خانه استفاده شد. مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با و بدون دو درصد گلیسرول و محلول CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول به صورت غلظت‌های سریالی از ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر به یک میلی‌لیتر محیط PDB اضافه و با مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (۲×۱۰۶ spores/ml) تلقیح شد. سه چاهک به عنوان کنترل مثبت و سه چاهک به عنوان کنترل محیط (منفی) در نظر گرفته شد، به این ترتیب که در چاهک‌های کنترل مثبت ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ به محیط استریل اضافه و در چاهک‌های کنترل محیط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت PDB افزوده شد. میکروپلیت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. آزمون فوق دو بار و با سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. کمترین غلظت محلول CFCS که منجر به مهار کامل رشد قارچ شود به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC)[] محلول در نظر گرفته شد. خوانش میکروپلیت‌ها به صورت چشمی (ماکروسکوپی) و با مشاهده میسلیوم‌ها انجام گرفت (۵، ۱۳).

۲- در آزمونی جداگانه به منظور بررسی اثر بازدارندگی مایع رویی فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بر رشد قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* در فاصله مقادیر بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر، مقادیر ۶۰ و ۸۰ میکرولیتر از محلول CFCS با و بدون گلیسرول به روش کشت در لوله بررسی شد. مقادیر ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر از هر دو نوع CFCS به همراه ۱۰۰ میکرولیتر اسپور قارچ (۲×۱۰۶ spores/ml) در لوله اضافه شد و حجم با محیط SDB به دو میلی‌لیتر رسانده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شد.

تفکیک اثر قارچ کشی از اثر قارچ ایستایی: به‌منظور تعیین کمترین غلظت کشنده قارچ (MFC)[] و تفکیک اثر قارچ ایستایی محلول CFCS از اثر قارچ‌کشی، پس از اتمام انکوباسیون ۷۲ ساعته میکروپلیت مرحله MIC، مقدار ۲۰ میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رشد قارچ و ۲۰ میکرولیتر از چاهک کنترل مثبت، روی پلیت‌های حاوی محیط PDA کشت داده شد. کمترین غلظت از محلول CFCS که پس از هفت روز رشد قارچ در آن مشاهده نشود به عنوان MFC محلول CFCS مربوطه در نظر گرفته شد. آزمون فوق دو بار و با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

نتایج

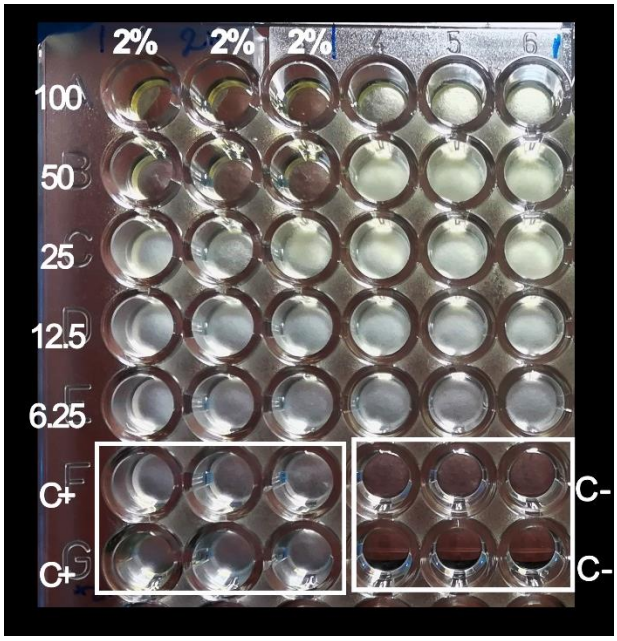
اثر بازدارندگی مایع رویی باکتری: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) مایع رویی فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* با و بدون افزودن دو درصد گلیسرول به روش میکروتیتر پلیت بررسی شد. نتیجه اثردهی غلظت‌های سریالی ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر تلقیح شده با مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (spores/ml ۲×۱۰۶) در جلوگیری از رشد قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* پس از نگهداری در دمای ۲۵درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در تصویر ۳ قابل مشاهده است.

* Microdilution method

[] Tube culture method

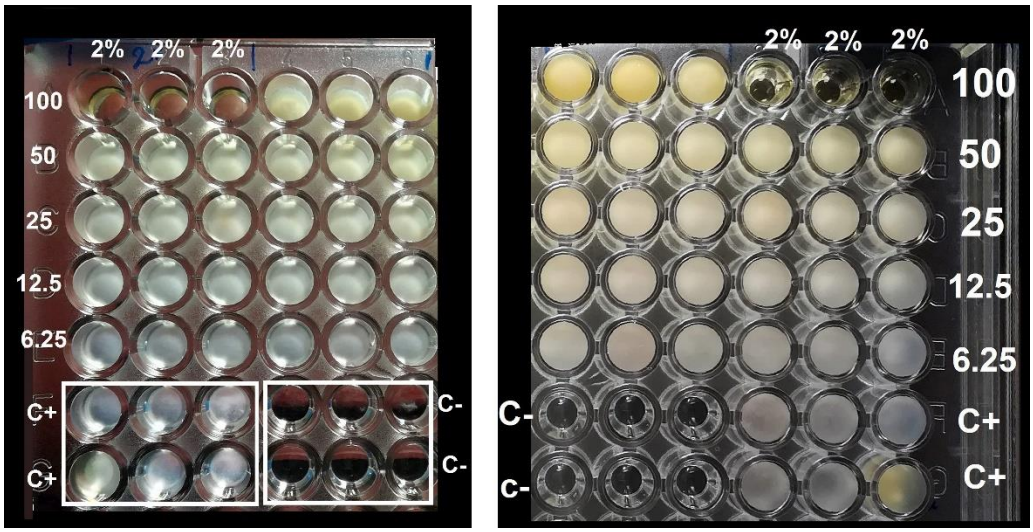
[] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

[] Minimum Fungicidal Concentration (MFC)



شکل ۳- کشت سه روزه اسپورقارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* spores/ml ۲×۱۰^۶ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط PDB در حضور غلظت‌های سریالی از ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر دو نوع مایع CFCS لاکتوباسیلوس روتری. ستون‌های ۱، ۲ و ۳ مشخص شده با ۲ درصد، حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول، ستون‌های ۴، ۵ و ۶ حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول. ردیف F و G چاهک‌های مشخص شده با +C، کنترل مثبت و چاهک مشخص شده با -C کنترل منفی.

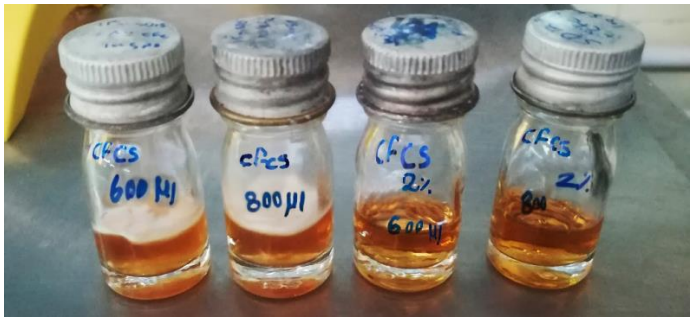
در چاهک کنترل مثبت قارچ تمام سطح چاهک را پوشانده بود. مایع CFCS حاوی دو درصد گلیسرول، در مقدار ۱۰۰ مایکرولیتر توانسته بود رشد قارچ *F. oxysprom* را مهار کند. مایع CFCS حاصل از محیط کشت فاقد گلیسرول در هیچ کدام از غلظت‌ها اثر مهارکنندگی نشان نداد. میکروپلیت فوق پس از ۲۱ روز در شکل ۴ آورده شده است.



شکل ۴- کشت ۲۱ روزه اسپورقارچ فوزاریوم اکسیسپوروم spores/ml ۲×۱۰^۶ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط PDB در حضور غلظت‌های سریالی از ۱۰۰ الی ۶/۲۵ میکرولیتر دو نوع مایع CFCS لاکتوباسیلوس روتری. تصویر سمت راست، نمای زیر میکروپلیت و تصویر سمت چپ نمای سطح فوقانی میکروپلیت؛ ستون‌های ۱، ۲ و ۳ مشخص شده با ۲ درصد، حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول؛ ستون‌های ۴، ۵ و ۶ حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول. سه چاهک اول ردیف‌های F و G کنترل مثبت و سه چاهک دوم این ردیف‌ها کنترل منفی.

در روش کشت در لوله مشاهده شد محلول CFCS حاصل از کشت باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول، در مقدار ۶۰ میکرولیتر قادر به مهار رشد قارچ *F. oxysprom* است (شکل ۵).

تفکیک اثر قارچ کشی از اثر قارچ ایستایی: بعد از گذشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر رشد کلونی قارچ بررسی شدند؛ به جز پلیت کنترل مثبت در هیچ یک از پلیت‌ها رشد میسلیوم قارچ مشاهده نشد. در نهایت میزان MFC برای مایع رویی *لاکتوباسیلوس روتری* حاصل از کشت در محیط واجد گلیسرول مقدار ۶۰ مایکرولیتر تعیین شد.



شکل۵- کشت هفت روزه اسپور قارچ *فوزاریوم اکسیسپورم* (2×10^6 spores/ml) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در حضور غلظت‌های ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر دو نوع CFCS *لاکتوباسیلوس روتری* در محیط SDB. دو لوله سمت چپ حاوی مایع CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط فاقد گلیسرول و دو لوله یونیورسال سمت راست حاوی CFCS حاصل از کشت باکتری در محیط مخلوط با دو درصد گلیسرول.

بحث و نتیجه‌گیری

مایکوتوکسین‌های حاصل از قارچ‌های فوزاریوم از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های غلات و خوراک حیوانات هستند که طیف گسترده‌ای از اثرات سمی در انسان و حیوانات مزرعه ایجاد می‌کنند (۲). *لاکتوباسیلوس روتری* از طریق تولید واسطه‌های ضد میکروبی متعدد قادر به مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله قارچ‌ها است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثربخشی محلول روئی عاری از سلول *L. reuteri* بر رشد گونه توکسین‌زای قارچ *F. oxysporum* بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد محلول CFCS به‌دست آمده از محیط کشت باکتری حاوی دو درصد گلیسرول، در مقدار ۶۰ میکرولیتر مانع رشد قارچ *F. oxysprom* شد. محلول CFCS حاصل از محیط کشت فاقد گلیسرول در هیچ کدام از مقادیر استفاده شده، اثر مهاری بر رشد قارچ *F. oxysprom* نشان نداد.

لاکتوباسیلوس روتری گلیسرول را به یک مهار کننده رشد قوی به نام روترین تبدیل می‌کند، این متابولیت جالب توجه قادر به مهار طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها از جمله پروتوزوآها، باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است (۱۲) این ترکیب غیر پپتیدی، محلول در آب، مقاوم به حرارت و آنزیم‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک بوده (۱۴) و فعالیت ضد میکروبی آن در pH های پایین و غلظت‌های بالای NaCl حفظ می‌شود (۱۵) لذا به عنوان یک افزودنی کاندید، برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و رشد پاتوژن در مواد غذایی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶).

ترکیبات دیگری نیز در مهار میکرواورگانیسم‌ها توسط *لاکتوباسیلوس روتری* تولید می‌شوند که فعالیت ضد قارچی و ضد میکروبی آنها به اثبات رسیده است، از جمله اسیدهای‌آلی (اسیداستیک و اسید لاکتیک)، پراکسید

هیدروژن، ترکیبات پروتئینی، اسیدهای چرب هیدروکسیل و ترکیبات فنلی (۱۰). Heller و همکاران (۲۰۰۱) پیشنهاد کردند اثر ضد میکروبی محلول CFCS حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک را می‌توان به تولید اسیدلاکتیک نسبت داد زیرا در طی رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدیته محیط افزایش یافته و باکتری‌های بیماریزا که به طور طبیعی به شرایط اسیدی حساس هستند از بین می‌روند (۱۷). با این حال، مقایسه اثر محلول CFCS سویه‌های لاکتوباسیلوس و محیط‌های MRS اسیدی شده با اسید لاکتیک و اسید معدنی HCL نشان داد که محلول CFCS نسبت به محیط‌های اسیدی شده به طور مؤثرتری رشد قارچ *Penicillium nordicum* (BFE 487) را مهار کرد که این نشان‌دهنده آن است که علاوه بر اسید لاکتیک و اسید استیک، متابولیت‌های دیگری نیز توسط لاکتوباسیلوس‌ها تولید می‌شوند که در فعالیت مهاری آنها نقش دارند (۱۸). Lavermicocca و همکاران (۲۰۰۰) نیز پتانسیل مهار *Lactobacillus plantarum* سویه 21B جدا شده از خمیر ترش را بر سویه‌هایی از قارچ‌های *Penicillium*، *Aspergillus* و *Fusarium* مربوط به اسیدهای ارگانیک و متابولیت‌های با جرم مولکولی کم و یا دی‌پپتیدهای حلقوی مربوط دانستند (۱۹). توانایی تولید H_2O_2 توسط *لاکتوباسیل روتری* و اثر مهاری آن بر شش گونه قارچ کاندیدای دهانی نیز تأیید شد (۲۰).

از آنجا که در مطالعه حاضر محلول CFCS به‌دست آمده از محیط کشت باکتری فاقد گلیسرول، در هیچ کدام از غلظت‌های استفاده شده نتوانست مانع رشد قارچ *F. oxysporum* شود، لذا می‌توان نتیجه گرفت که مهار رشد قارچ *فوزاریوم* توسط محلول CFCS حاوی گلیسرول به ترکیب یا ترکیباتی غیر از موارد بررسی شده در مطالعات فوق مربوط خواهد بود. با توجه به این که تفاوت دو محلول CFCS مورد آزمایش در مطالعه حاضر، گلیسرول بوده است و ترکیب شناخته شده‌ای که در اثر تخمیر گلیسرول در باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* ایجاد می‌شود، روترین گزارش شده است (۱۰، ۱۵، ۲۱) لذا می‌توان این طور نتیجه گرفت که عامل مؤثر مهارکننده موجود در محلول CFCS حاوی دو درصد گلیسرول، در این مطالعه، احتمالاً متابولیت روترین بوده که در اثر تخمیر گلیسرول تولید شده است.

تولید ترکیب ضد میکروبی ۳-هیدروکسی پروپیونالدئید* مشهور به روترین که به‌عنوان یک مرحله واسطه در تبدیل گلیسرول به ۱،۳-پروپانیدیول[▯] تولید می‌شود، مسیری است که برای احیا NAD^+ از NADH و بهبود عملکرد رشد پیشنهاد می‌شود (۱۶). گفتنی است ۱،۳-پروپانیدیول، محصول رایج از تخمیر گلیسرول است که در تبدیل بی‌هوازی سایر سوبستراهای آلی یافت نمی‌شود و تنها از گلیسرول از طریق مسیر متابولیزه روترین تولید می‌شود (۱۰).

از آنجا که روترین می‌تواند به ترکیبات مختلف تبدیل شود، تعیین مکانیسمی که توسط آن اثر ضد میکروبی اعمال می‌کند، دشوار است. در این خصوص دو فرضیه اصلی ارائه شده است: اول اینکه پیشنهاد شده، گروه آلدئیدی روترین با گروه‌های تیول و آمین‌های اولیه بسیار واکنش پذیر بوده، بنابراین می‌تواند از طریق تغییر گروه‌های تیول، پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک حاوی این گروه‌ها را غیرفعال کند، این امر می‌تواند اثرگذاری روترین بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را توضیح دهد (۲۲). از طرف دیگر، شکل دایمری روترین (دایمر HPA) از لحاظ ساختاری به قند ریبوز شباهت دارد، لذا می‌تواند به‌طور اختصاصی با عمل به‌عنوان یک مهارکننده رقابتی، آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز را مسدود کند. این آنزیم برای تولید دی‌اکسی‌نوکلئوتیدها، که برای سنتز DNA لازم هستند، ضروری است (۱۶). Perczak و همکاران (۲۰۱۸) نیز بیان کردند روترین فعالیت ریبونوکلئاز -آنزیمی که در بیوسنتز DNA دخیل است را سرکوب می‌کند. این عمل رشد *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس* را مهار می‌کند (۲۲). یک

* 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA)

▯ 1,3-propanediol

گزارش قدیمی‌تر نیز بیان کرد که روترین از طریق مهار ریبونوکلئوتید ردوکتاز، احتمالاً قادر است طیف گسترده‌ای از اثرات مهاری را اعمال کند (۱۱). از آنجا که جایگاه فعال این آنزیم حاوی یک گروه تیول است، نمی‌توان تعیین کرد که کدام یک از فرضیات پیشنهادی از آزمایش‌های قبلی درست‌تر است (۱۶). مطالعات اخیر خواص ضد قارچی *L. reuteri* را به ترکیب ضد میکروبی ۳- فنیل لاکتیک‌اسید که از کاتابولیسم فنیل‌آلانین ایجاد می‌شود نیز مربوط می‌دانند (۲۳). فعالیت ضد قارچی فنیل‌لاکتیک اسید وابسته به مکانیسم سینرژیک با سایر متابولیت‌های باکتریایی است. با این وجود اگر مسیر متابولیک فنیل‌لاکتیک اسید تحریک شود، فعالیت ضد قارچی احتمالاً افزایش می‌یابد (۲۳، ۲۴).

با توجه به مطالعات صورت گرفته و نتایج مطالعه حاضر محلول رویی عاری از سلول به‌دست آمده از محیط کشت *لاکتوباسیلوس روتری* حاوی دو درصدگلیسرول احتمالاً به دلیل حضور روترین قادر به مهار رشد گونه توکسین‌زای *فوزاریوم اکسیسپوروم* است. لذا این محلول قابلیت این را خواهد داشت که به‌عنوان یک عامل کنترل‌کننده زیستی علیه گونه *فوزاریوم* در صنایع خوراک دام و مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از حمایت های مالی حوزه پژوهشی دانشگاه شیراز قدردانی می‌گردد.

References

1- Bertero A, Moretti A, Spicer LJ, Caloni F. Fusarium molds and mycotoxins: Potential species-specific effects. Toxins. 2018; 10(6): 244.

2- Cortinovis C, Pizzo F, Spicer LJ, Caloni F. Fusarium mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals—A review. Theriogenology. 2013; 80(6): 557-64.

3- Cserháti M, Kriszt B, Krifaton C, Szoboszlay S, Háhn J, Tóth S, *et al.* Mycotoxin-degradation profile of Rhodococcus strains. International journal of food microbiology. 2013; 166(1): 176-85.

4- Ji C, Fan Y ,Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins. Animal Nutrition. 2016; 2(3): 127-33.

5- Taheur FB, Mansour C, Kouidhi B, Chaieb K. Use of lactic acid bacteria for the inhibition of Aspergillus flavus and Aspergillus carbonarius growth and mycotoxin production. Toxicon. 2019; 166: 15-23.

6- Kabak B, Dobson AD, Var Il. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Critical reviews in food science and nutrition. 2006; 46(8): 593-619.

7- Nasrollahzadeh A, Khomeiri M. Application of lactic lacid bacteria to biological control of fungal spoilage in food; metabolites, mechanisms and health effects. Food Science and Technology. 2019; 16(92): 113-27.

8- Britton R. Lactobacillus reuteri. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Elsevier; 2017. p. 89-97.

9- Mu Q, Tavella V, Luo XMJFim. Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases. 2018; 9: 757.

10- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Le Blay G. Glycerol induces reuterin production and decreases Escherichia coli population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. FEMS microbiology ecology. 2008; 63(1): 56-64.

11- Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1989; 33(5): 674-9.

12- Jones SE, Versalovic JJBm. Probiotic Lactobacillus reuteri biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. 2009; 9(1): 35.

13- Ganjali HR, abkhoo j, Dahmardeh E. Effect of extracts of Glycyrrhiza glabra, Cinnamomum zeylanicum and Ocimum basilicum on Fusarium graminearum control and expression of essential genes in zearalenone biosynthetic pathway. Biological Control of Pests and Plant Diseases. 2018; 7(1): 58-64.

14- Arqués JL, Fernández J, Gaya P, Nuñez M, Rodríguez E, Medina M. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. International Journal of Food Microbiology. 2004; 95(2): 225-9.

15- Langa S, Martín-Cabrejas I, Montiel R, Landete J, Medina M, Arqués J. Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. Journal of dairy science. 2014; 97(10): 6116-21.

16- Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RAJM. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. 2010; 156(6):

1589-99.

17- Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. The American journal of clinical nutrition. 2001; 73(2): 374s-9s.

18- Schillinger U, Villarreal JV. Inhibition of Penicillium nordicum in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. Food control. 2010; 21(2): 107-11.

19- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(9): 4084-90.

20- Jørgensen MR, Kragelund C, Jensen PØ, Keller MK, Twetman S. Probiotic Lactobacillus reuteri has antifungal effects on oral Candida species in vitro. Journal of oral microbiology. 2017; 9(1): 1274582.

21- Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic JJA. Human-derived probiotic Lactobacillus reuteri demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. 2008; 14(3): 166-71.

22- Perczak A, Goliński P, Bryła M, Waśkiewicz A. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 2018; 69(1): 32-45.

23- Schmidt M, Lynch KM, Zannini E, Arendt EK. Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of Lactobacillus reuteri R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. Food Control. 2018; 88: 139-48.

24- Cortés-Zavaleta O, López-Malo A, Hernández-Mendoza A, García H. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. International journal of food microbiology. 2014; 173: 30-5.

Effect of cell-free supernatant of *Lactobacillus reuteri* on the growth rate of toxigenic *Fusarium oxysporum in vitro*

Maryam Rahimi Kakolaki [1], Arash Omidi [2]*

1- PhD candidate of feed hygiene, Department of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Professor, Department of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Receive: June 25, 2020; Revise: July 8, 2020; Accept: September 15, 2020

Summary

Lactobacillus reuteri is a probiotic bacterium that produces a wide-range of antimicrobial substance, "reuterin", in the presence of glycerol. The present study was aimed to evaluate the efficacy of *Lactobacillus reuteri* against the growth of *Fusarium oxysporum*. So, the cell-free culture supernatant (CFCS) of *Lactobacillus reuteri* was prepared by centrifugation (8000 rpm for 15 min) of bacterial overnight *culture,* with and without 2% glycerol medium. Inhibition effects were evaluated by two methods: micro-well dilution (both of CFCSs: two-fold dilution series (100, … 6.25 µl); 10 µl fungal spore suspension (2×10^6 spores/ml); PDB medium) and Tube culture (both of CFCSs: (80, 60 µl); 10 µl fungal spore suspension (2×10^6 spores/ml); SDB medium). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of CFCS obtained from glycerol-medium was determined as 60µl. The CFCS obtained from glycerol-free medium had no inhibitory effect on *F.oxysprom* growth. The results of the present study revealed that the CFCS of *Lactobacillus reuteri* obtained from medium with 2% glycerol, probably due to the presence of reuterin, is able to inhibit the growth of toxigenic *Fusarium oxysporum* and can be used in the feed and food industry as a potential bio-controller against toxigenic *Fusarium* species.

Key words: *Fusarium, glycerol, lactic acid bacteria, mycotoxin, reuterin*

بررسی ژنوتیپ و مشخصه‌های ملکولی سویه‌های ویروس نکروز عفونی پانکراس شناسایی شده در برخی مزارع قزل‌آلای کشور

سهراب احمدی وند[۱*]، مهدی سلطانی[۱]

۱- گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۲۸ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۰۳ شهریور ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۶ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

بیماری نکروز عفونی پانکراس ناشی از ویروسIPNV است که سویه‌های مختلف آن دارای حدت متفاوتی مرتبط با برخی موتیف های کپسید VP2 می‌باشند. در مطالعه حاضر نمونه‌های مشکوک به بیماریIPN از مزارع قزل‌آلا در سال‌های ۲۰۱۸ تا ۲۰۱۹ بررسی و نمونه‌های مثبت تعیین ژنوتیپ شده و از نظر حدت مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. ویروس در نمونه‌های مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان با استفاده از واکنش RT-PCR ردیابی گردید. براساس آنالیز توالی آنتی‌ژن VP2، سویه‌های شناسایی شده متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp بوده و با همدیگر و با سایر سویه‌های ایرانی و همچنین سویه‌های گزارش شده در ترکیه و برخی کشورهای اروپایی بیش از ۹۹ درصد شباهت دارند. همچنین سویه‌های ایرانی شناسایی شده در این مطالعه دارای اسیدهای آمینه پرولین و ترئونین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ بودند که معمولاً در سویه‌های با حدت کم دیده می‌شوند. به طور خلاصه می‌توان عنوان نمود که سویه‌های شناسایی شده در برخی مزارع قزل‌آلای کشور (استان‌های همدان و کرمانشاه) متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشندکه علیرغم داشتن موتیف $P_{217}T_{221}$ دارای حدت متوسط می‌باشند و احتمالاً از طریق واردات تخم چشم زده به کشور وارد شده اند.

واژگان کلیدی: *IPN، ایران*، فیلوژنی، *قزل‌آلا*، *VP2*

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

مقدمه

نکروز عفونی پانکراس ویروس (IPN) یک بیماری ویروسی واگیردار و از عوامل اصلی تلفات در آبزیان به ویژه آزادماهیان است که عامل آن (IPNV) متعلق به جنس آکوا بیرنا ویروس و خانواده بیرناوریده می‌باشد (۱).

ویروس IPNV دارای ژنوم دو قطعه‌ای (A, B) و RNA دو رشته ای است که بدون پوشش غشایی بوده و دارای تقارن بیست وجهی و یک کپسید متشکل از ۹۲ کپسومر و با ضخامت حدود ۶۰ نانومتر می‌باشد (۲). قطعه ژنومیB با اندازه کوچکتر، پروتئین غیر ساختاری VP1 را کد می‌کند. قطعه A با اندازه بزرگتر از نظر ساختاری و عملکردی، تک پیامه و شامل یک قالب باز خواندنی (ORF) بزرگ و یک قالب بازخواندنی کوچک است. قالب بازخواندنی بزرگ، پلی‌پروتئین پیش‌ساز (NH2-pre VP2-VP4-VP3-COOH) و قالب بازخواندنی کوچک، پروتئین غیر ساختاری غنی از آرژینین به نام VP5را کد می‌کند (۱، ۲).

بیماری IPN معمولاً در دمای ۱۰- ۱۵ درجه سانتی‌گراد بروز می‌نماید و با علائم عمومی شامل شنای چرخشی، تیرگی پوست، اگزوفتالمی، آسیت شکمی و کم‌رنگ شدن آبشش‌ها همراه است. تلقات بیماری با توجه به سویه ویروس، گونه و سن ماهی و همچنین شرایط محیطی می‌تواند از ۵ تا ۹۰ درصد متفاوت باشد (۳، ۴).

این ویروس باعث تلفات بالا به‌ویژه در بچه ماهیان نورس تازه به تغذیه افتاده و بچه ماهیان انگشت قد، ماهیان وحشی و پرورشی به‌ویژه ماهی آزاد اطلس و قزل‌آلا می‌گردد (۱، ۴). بعلاوه باعث ایجاد حاملین بدون علامت در ماهیان بازمانده می‌گردد که در تمام طول زندگی حامل این ویروس بوده که علاوه بر انتقال عمودی با دفع ویروس به محیط موجب انتقال افقی و متعاقباً ماندگاری و انتشار بیشتر ویروس در جمعیت ماهیان می‌شوند (۵).

دو گروه سرمی (A و B) مجزای بیرناویروس‌های آبزی شامل ۱۰سروتیپ وجود دارد (سروتیپ‌های B1 و A1-A9) که همه به جز *Tellina virus-1* متعلق به گروه سرمی B، برای ماهی‌ها بیماری‌زا هستند (۶).

همچنین سویه‌های مختلف IPNV براساس توالی آنتی‌ژن VP2 به ۷ گروه ژنومی تقسیم بندی می‌شوند که با منشأ جغرافیایی و گروه سرمی تطابق دارند (۷، ۸).

آنتی ژن VP2مسئول تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی تیپ می‌باشد و تغییرات در بقایای برخی اسید آمینه‌های آن به ویژه ۲۱۷، ۲۲۱ و ۲۴۷ روی حدت سویه‌هایIPNV تاثیر می‌گذارد (۹، ۱۰).

بیش از یک دهه است که IPN در ایران با سرعت پیشرونده‌ای به صورت یک بیماری همه‌گیر درآمده و باعث ضرر و زیان‌های اقتصادی به صنعت در حال رشد قزل‌آلای کشور گردیده است. بر اساس مطالعه فیلوژنی انجام شده توسط سلطانی و همکاران در طی سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۳ تمامی ژنوتیپ‌های IPNV در مزارع کشور شایع بوده‌اند (۱۱)، اگرچه حدت سویه‌ها در مطالعه مذکور ارزیابی نشده است. آنالیز توالی ژن‌های مختلف یک سویه ایرانی در ۲۰۱۲ مشخص نمود که ویروس متعلق به ژنوتیپ ۵ با منشأ اروپایی می‌باشد و علیرغم اینکه از مزرعه‌ای با تلفات متوسط جداسازی شده بود دارای موتیف $P_{217}T_{221}A_{247}$ بود که معمولاً در سویه‌های غیر بیماری‌زا مشاهده شده است (۱۲).

اگرچه IPNV همچنان در مزارع کشور شایع است، اما از سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ی دیگری در خصوص ژنوتیپ و مشخصه‌های ملکولی سویه‌های موجود در کشور صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر نمونه‌های مشکوک به IPN به‌دست آمده از برخی مزارع قزل‌آلای کشور در طی سال‌های ۲۰۱۸ و ۲۰۱۹ تعیین ژنوتیپ شده و از نظر حدت مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و بررسی آزمایشگاهی: نمونه‌های ماهی براساس گزارش انجام شده از تلفات مشکوک به بیماری IPNاز مزارع پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان های کرمانشاه (شهرستان پاوه)، همدان (شهرستان نهاوند) و مازندران (آمل) جمع‌آوری شدند. وزن ماهیان کمتر از ۱۰

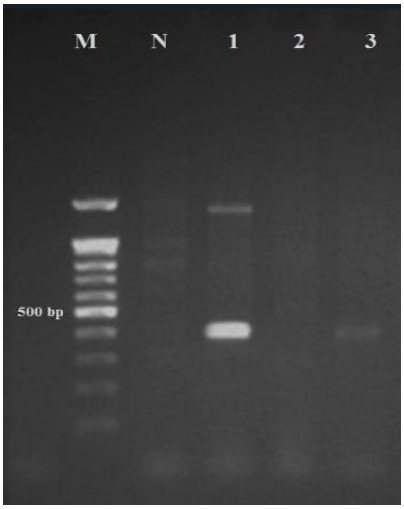
گرم و میانگین دمای آب مزارع نیز بین ۹ تا ۱۳ درجه سانتی‌گراد بود. میزان تلفات حدود ۴۰- ۶۰ درصد گزارش شده و در ماهیان مشکوک علائمی نظیر تیرگی پوست، بیرون‌زدگی چشم و کم‌رنگی آبشش‌ها و جود مایع زرد رنگ داخل روده مشاهده گردید. برای بررسی آلودگی انگلی از پوست و آبشش ماهیان لام مرطوب تهیه شد. همچنین از بافت کلیه ماهیان کشت باکتریایی بر روی محیط ژلوز خون‌دار در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. به منظور تشخیص مولکولی عفونت‌های ویروسی بافت کلیه و طحال ماهیان نمونه‌برداری و در اتانول ۷۰ درصد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR): استخراج RNA ویروس با استفاده از کیت (ExgeneTM Viral DNA/RNA kit (GeneAll, Korea مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. کیفیت RNA های استخراج شده با استفاده از نانو دراپ و قرار دادن در ژل الکتروفورز بررسی شد. سپس با استفاده ازکیت HyperScript^{TM} First strand Synthesis Kit (GeneAll, Korea) بر طبق پروتوکل شرکت سازنده cDNA تهیه گردید. در نهایت واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VP2 (۱۳)، SVP2-F: 5‘GTTCGACAAGCCATACGTCC 3’ و SVP2-R: 5‘GCTTGGTGATGTTCTCGGTC 3‘در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱۲/۵ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase Mix Red (GeneAll, Korea) و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. برنامه واکنش شامل ۱ سیکل ۹۴ ^{o}C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل (۹۴^{o}C به مدت ۳۰ثانیه، ۵۸ ^{o}C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ ^{o}C به مدت ۴۰ ثانیه) و ۱ سیکل۷۲ ^{o}C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در پایان نیز محصول واکنش‌ها با استفاده از الکتروفورز برروی ژل ۱ درصد اگارز بررسی و باندها با استفاده از کیت اختصاصی شرکت Viogen خالص‌سازی و به‌صورت تجاری توالی‌یابی گردید. تشخیص افتراقی نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی IHNV و VHSV بر اساس مطالعات قبلی Ahmadivand و همکاران صورت گرفت (۱۴، ۱۵).

مطالعه فیلوژنی نمونه‌های ویروسی: نمونه‌ها پس از خوانش توالی با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime (http://www.geneious.com/) و BioEdit آنالیز شده و در نهایت پس از بلاست نمودن و تایید در NCBI در بانک ژن ثبت و از نظر فیلوژنی (روش Neighbor-joining مدل HKY و بوت استراپ ۱۰۰۰) نیز با سایر سویه‌ها مقایسه شدند و درخت فیلوژنی رسم گردید.

نتایج

تشخیص مولکولی: بر اساس نتایج آزمایش RT-PCR وجود ویروس IPNV با مشاهده باند ۴۰۵ bp آنتی‌ژن VP2 در نمونه‌های مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان تایید شد (شکل ۱). در نمونه مشکوک استان مازندران ژنوم ویروس IPNV مشاهده نگردید و بر اساس آزمایش تشخیص تفریقی تلفات ناشی از ویروس IHNV بود. کشت باکتریایی نمونه‌هایIPNV مثبت هیچ گونه پاتوژنی را نشان نداد و همچنین هیچ گونه آلودگی انگلی در ماهیان مبتلا به IPN مشاهده نشد.



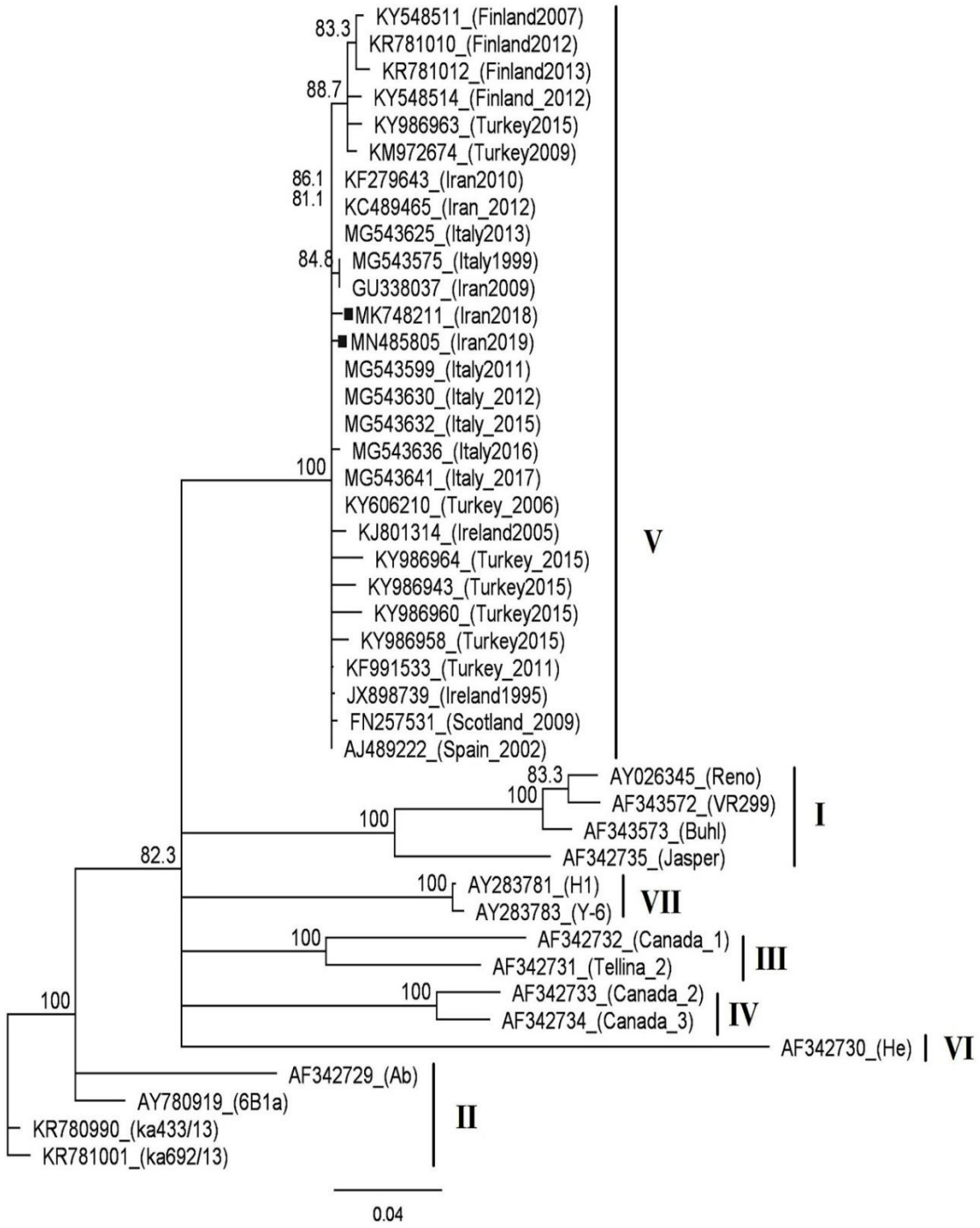
شکل ۱- انجام واکنش RT-PCR برای تشخیص ویروس عامل بیماری IPN با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن VP2 (۴۰۵ bp) در نمونه‌های بافت کلیه ماهیان مشکوک به بیماری. M: مارکر ۱۰۰ bp ، N: کنترل منفی، ستون‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب نمونه‌های مزارع استان‌های همدان، مازندران و کرمانشاه می‌باشند. محصول واکنشRT-PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد آنالیز شده است.

آنالیز توالی: نمونه‌های مثبت IPNV با استفاده از توالی‌یابی قطعه ژنوم تکثیر شده تأیید شدند. توالی آنتی‌ژن VP2 دو سویه IPNV شناسایی شده از مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان در بانک جهانی NCBI به ترتیب با کدهای دسترسی MK748211 و MN485805 ثبت شده‌اند.

براساس آنالیز فیلوژنی آنتی‌ژن VP2، سویه‌های شناسایی شده متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشند (شکل ۲). مقایسه توالی آنتی‌ژن سویه‌های ویروس با همدیگر و با سایر سویه‌های جداسازی شده از دیگر استان‌های کشور در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۲ (GU338037، KF279643 و KC489465) و همچنین سویه‌های شناسایی شده در ترکیه و برخی کشورهای اروپایی ازجمله اسپانیا، ایتالیا، اسکاتلند، فلاند و ایرلند بیش از ۹۹ درصد شباهت نشان دادند (شکل ۳).

سویه‌های ایرانی شناسایی شده دارای اسیدهای آمینه پرولین و ترئونین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ بودند که معمولاً در سویه‌های با حدت کم یا تحت بالینی دیده می‌شوند. همچنین اسیدهای آمینه موجود در موقعیت ۲۴۷ پروتئینVP2 که معمولاً بسیار متغیر است و ممکن است با حدت ویروس در ارتباط باشد در سویه‌های شناسایی شده در کرمانشاه و همدان به ترتیب اسید گلوتامیک و آلانین بودند (موتیف‌های $P_{217}T_{221}A_{247}$ و $P_{217}T_{221}E_{247}$).

به‌علاوه سویه‌های SP10 و S.AV-IR.IPNV5 به ترتیب دارای موتیف‌های $I_{199}D_{252}D_{257}T_{281}N_{282}G_{286}V_{288}$ و $I_{199}N_{252}H_{257}T_{281}N_{282}R_{286}V_{288}$ بودند که پیشنهاد شده با حدت مرتبط هستند (۱۶)، (جدول ۱).



شکل۲- آنالیز فیلوژنی سویه‌های ایرانی ویروس عامل نکروز عفونی پانکراس (IPNV) بر اساس توالی آنتی‌ژن VP2 (۴۰۵ bp). هم‌ردیف‌سازی و آنالیز فیلوژنی با استفاده نرم‌افزار Geneious Prime با روش Neighbor-joining (مدل HKY) و بوت استراپ ۱۰۰۰ انجام شده است. نمونه‌های ویروس یافت شده در این مطالعه با مربع سیاه رنگ مشخص شده‌اند.

شکل ۳- هم‌ردیف‌سازی قسمتی (۴۰۵ bp) از توالی آنتی‌ژن (VP2) سویه‌های ویروس IPNV شناسایی شده در این مطالعه (MK748211 و MN485805) با سایر سویه‌های ایران در طی سال‌های ۲۰۰۹تا ۲۰۱۲ (GU338037، KF279643، KC489465) و کشورهای اسپانیا (AJ489222)، ترکیه (KF991533)، ایتالیا (MG543632)، اسکاتلند(FN257531)، ایرلند (KJ801314) و فنلاند (KR781010) که همگی متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ A2 (Sp) می‌باشند.

جدول ۱- مقایسه اسیدهای آمینه آنتی‌ژن VP2 مرتبط با حدت سویه‌های ویروس IPNV شناسایی شده در مزارع قزل‌آلا

جدایه	ژنوتیپ (سروتیپ)	کد دسترسی	موقعیت اسید آمینه									
			۲۸۸	۲۸۶	۲۸۲	۲۸۱	۲۵۷	۲۵۲	۲۴۷	۲۲۱	۲۱۷	۱۹۹
SP10	5 (Sp)	MN485805	V	G	N	T	D	D	A	T	P	I
S.AV-IR.IPNV5	5 (Sp)	MK748211	V	R	N	T	H	N	E	T	P	I
[1] IRIPNV	5 (Sp)	KC489465	V	G	N	T	H	D	A	T	P	I
[2] Sp (1164)	5 (Sp)	AJ489222	V	R	N	T	H	N	A	T	P	I

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص و شناسایی سریع عوامل بیماری‌زای اختصاصی مانند IPNV در نظارت فعال بهداشتی و

جلوگیری از گسترش عفونت به‌ویژه در حاملین بدون علامت سودمند است . در حال حاضر، تشخیص IPNV بر ایجاد اثرات سیتوپاتیک مشخص در کشت‌های سلولی و سپس تأیید به وسیله انواع مختلفی از روش‌های سرم‌شناسی و مولکولی استوار است (۱۶). اگرچه حاملین بدون نشانه ممکن است مانع تشخیص و جداسازی موفقیت آمیز IPNV شوند (۱۷، ۱۸).

تشخیص اسیدهای نوکلئیک ویروسی به وسیله روش‌هایی بر پایه PCR عموماً به‌عنوان روش‌های دارای اختصاصیت بالا ارزیابی شده‌اند. یکی از روش‌های تشخیص IPNV آزمایش RT-PCR با استفاده نمونه‌های بافتی کلیه است که ژنوم ویروس را در موارد بالینی و تحت بالینی به آسانی ردیابی می‌نماید و می‌تواند جایگزین مناسبی برای کشت سلولی شود (۱۸-۱۶).

در این مطالعه نیز وجود ویروس IPNV با استفاده از واکنش RT-PCR و تکثیر آنتی‌ژن VP2در نمونه‌های مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان تایید شد.

علاوه بر تشخیص، توالی آنتی ژن VP2 برای مطالعات فیلوژنی و همچنین تعیین حدت سویه های ویروس IPNV مورد استفاده قرار می گیرد (۱۹).

بر اساس مقایسه توالی اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدهای آنتی‌ژن VP2 تعدادی از بیرناویروس‌های آبزی، شش ژنوگروپ (I-VI) مجزا گزارش شده که با سروتیپ‌های شناخته شده قبلی همبستگی و هم‌خوانی دارد (۷). همچنین ژنوگروپ دیگری (VII) نیز بر اساس تجزیه ناحیه اتصالی VP2/NS قطعه ژنومی A ویروس پیشنهاد شده است (۸).

براساس آنالیز فیلوژنی آنتی‌ژن VP2، مشخص شد که سویه‌های شناسایی شده در مزارع همدان و کرمانشاه متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشند و شباهت زیادی (>۹۹٪) با همدیگر و با سویه‌هایی از کشورهای اروپایی، ترکیه و موارد قبلی گزارش شده از ایران دارند.

بنابرین با توجه به واردات بی‌رویه این احتمال وجود دارد که منشأ آلودگی ویروس‌های ایرانی از مسیر واردات تخم‌های چشم زده آلوده از اروپا بوده باشد که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق ترکیه صورت گرفته باشد. بعلاوه میزان شباهت سویه‌های شناسایی شده در این مطالعه با همدیگر و سایر سویه‌های ایرانی می‌تواند ناشی از معرفی ویروس از یک منبع محدود و جابجایی بیش از حد آن بین مزارع کشور باشد.

پروتئین VP2 کپسید خارجی ویروس را تشکیل می‌دهد که حاوی همه اپی‌توپ‌های خنثی‌کننده، محل‌های اتصال به سلول میزبان و رده‌های سلولی رشدیافته در آن است (۱، ۲). VP2 حامل فاکتورهای تعیین‌کننده‌ای برای حدت IPNV است به‌طوری که تغییر اسیدآمینه‌های آن می‌توانند ویژگی‌های این پروتئین به ویژه خاصیت آنتی‌ژنتیکی و میزان مرگ و میر ایجاد شده به وسیله ویروس در ماهیان را تحت تأثیر قرار دهند (۹، ۱۰).

بر اساس مطالعات آزمایشگاهی ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*)، در گونه‌های حاد، ترئونین و آلانین به ترتیب در موقعیت‌های ۲۱۷ و ۲۲۱ از پروتئین VP2وجود دارند، در حالی که سویه‌های با حدت متوسط تا خفیف دارای پرولین و آلانین در این موقعیت هستند. سویه‌های با اسید آمینه ترئونین در موقعیت ۲۲۱ معمولاً سویه‌های غیرحاد هستند (۹، ۱۰). اسیدهای آمینه موجود در موقعیت ۲۴۷ پروتئین VP2 بسیار متغیر است و ممکن است با حدت ویروس در ارتباط باشد. Santi و همکاران (۹) نشان دادند که موتیف‌های $T_{217}A_{221}T_{247}$ در ارتباط با حدت بالای یروس هستند و موتیف‌های $P_{217}A_{221}A_{247}$ در سویه‌های با حدت کم تا متوسط دیده می‌شوند. اگرچه میزان حدت IPNV را با برخی موتیف‌های دیگر در موقعیت‌های ۱۹۹ ،۲۵۰ ، ۲۵۲، ۲۸۱، ۲۸۲، ۲۸۶، ۲۸۸، ۳۲۱ و ۵۰۰ نیز مرتبط دانسته است (۱۶، ۲۰، ۲۱). با این جود گزارشات متناقضی در خصوص ارتباط این موتیف‌ها با حدت IPNV در سایر گونه‌های وحشی و پرورشی به ویژه در قزل‌آلا و در شرایط فیلد ارائه شده است (۱۲، ۲۴-۲۲).

Bain و همکاران گزارش کرده‌اند که سویه‌های با

پرولین و آلانین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ به ترتیب دارای حدت‌های بالایی در شرایط فیلد و در شرایط آزمایشگاهی هستند (۲۲).

سویه‌های ایرانی شناسایی شده در این مطالعه دارای اسیدهای آمینه پرولین و ترئونین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ بودند که معمولاً در سویه‌های با حدت کم یا تحت بالینی دیده می‌شوند. علیرغم حضور ترئونین در موقعیت ۲۲۱ که نشانگر غیرحاد بودن سویه‌ها است تلفات مشاهده شده در قزل‌آلا نشانگر وجود سویه با حدت متوسط است. نتایج مشابهی توسط Dadar و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش شده است (۱۲). حدت خفیف تا متوسط سویه‌های ایرانی ممکن است در ارتباط با اسید آمینه آلانین موجود در دیگر موقعیت‌ها به ویژه ۲۴۷ باشد.

به‌علاوه مطالعات اخیر تفاوت بسیار زیادی (۱۰۰-۰ درصد) در خصوص حساسیت نژادهای مختلف گونه قزل‌آلای رنگین کمان به ویروس IPNV را گزارش نموده‌اند (۲۵). بنابرین تفاوت‌های نژادی – گونه‌ای میزبان و سایر خصوصیت‌های ژنتیکی ویروس می‌توانند تبیین‌کننده این نتایج باشند.

به طور خلاصه می‌توان عنوان نمود که سویه‌های شناسایی شده در مزارع قزل‌آلای کشور (استان همدان و کرمانشاه) متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشند، که علیرغم داشتن موتیف $P_{217}T_{221}$ دارای حدت متوسط می‌باشند و احتمالاً از طریق واردات تخم چشم زده به کشور وارد شده‌اند. بنابراین اقدامات پیشگیرانه و نظارت بهداشتی بیشتر برای کنترل بیماری IPNدر کشور پیشنهاد می‌گردد.

References

1- Evensen Ø, Santi N. Infectious pancreatic necrosis virus, In: Mahy BWJ, Van Regenmortel, M.H.V (Ed.) Encyclopedia of virology (3rd edn). Academic Press, Oxford. 2008, p:83−89.

2- Dobos P. Size and Structure of Genome of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. Nucleic Acids Res. 1976; 3: 1903–1924.

3- Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1988, p: 476.

4- Reno P. W. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In P. T. K. Woo, & D. W. Bruno (Eds.), Fish Diseases and Disorders. New York: CABI publishing. 1999, p: 1–55.

5- Rodriguez Saint-Jean S, Vilas Minondo M.P, Palacios A, Perez-Prieto S. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Richardson*), by flow cytometry. J. Fish Dis. 1991; 14: 545-553.

6- Hill B.J, Way K. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. Ann Rev Fish Dis. 1995; 5: 55-77.

7- Blake S, Ma J.Y, Caporale D.A, Jairath S, Nicholson BL. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. Dis Aquat Org. 2001; 45: 89−102.

8- Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M.. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. J Gen Virol. 2005; 86: 1973-1978.

9- Santi N, Vakharia V.N, Evensen Ø. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology. 2004; 322: 31–40.

10- Shivappa R, Song H, Yao K, Aas-Eng A, Evensen Ø, Vakharia V.N. Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting divergences in virulence. Dis. Aquat. Org. 2004; 61: 23–32.

11- Soltani M, Rouholahi S, Ebrahimzadeh Mousavi H.A, Abdi K, Zargar A, Mohamadian S. Genetic diversity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Iran. Bulletin European Association of Fish Pathologists. 2014; 34: 155-164.

12- Dadar M, Peyghan R, Memari H. R, Shapouri M.R.S.A, Hasanzadeh R, Goudarzi L.M. Vakharia, V.N.. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Iranian reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2012. Virus Genes. 2013; 47: 574-578.

13- Ahmadivand S, Soltani M, Behdani M, Evensen Ø, Alirahimi E, Hasanzadeh R, Soltani

E.. Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in trout. Dev. Comp. Immunol. 2017; 74: 178-189.

14- Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, Shokrpoor S, Hassanzadeh R, Rahmati-Holasoo H, Ahmadpoor M. Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) outbreak in farmed rainbow trout in Iran: viral isolation, pathological findings, molecular confirmation, and genetic analysis. Virus Res. 2017; 229: 17-23.

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

16- Dopazo C.P. The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known. Pathogens. 2020; 9: 94.

17- OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 5th edition. Health World Organization for Animal, Paris. 2006.

18- Taksdal T, Dannevig B.H, Rimstad E.. Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 2001; 21: 214–219.

19- Ørpetveit I, Mikalsen A.B, Sindre H, Evensen O, Dannevig B.H, Midtlyng P.J. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. J Vet Diagn Invest. 2010; 22: 886-895.

20- Smail D. A, Bain N, Bruno D. W, King J. A Thompson F, Pendrey D. J, Cunningham C. O. Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar L*., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. J. Fish Dis. 2006; 29: 31-41.

21- Mutoloki S, Jøssund T.B, Ritchie G, Munang'andu E.M Evensen, Ø. Infectious Pancreatic Necrosis Virus Causing Clinical and Subclinical Infections in Atlantic Salmon Have Different Genetic Fingerprints. Front. Microbiol. 2016; 7: 195–210.

22- Bain N, Gregory A, Raynard R. S. Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from Scotland. J Fish Dis. 2008; 31: 37–47.

23- Eriksson-Kallio A.M, Holopainen R, Viljamaa-Dirks S, Vennerström P, Kuukka-Anttila H, Koski, P, Gadd T.. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strain with genetic properties associated with low pathogenicity at Finnish fish farms. Dis Aquat Org. 2016; 118: 21–30.

24- Büyükekiz A.G, Altun S, Hansen E.F, Satıcıoglu I.B, Duman M, Markussen T, Rimstad E. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp is prevalent in Turkish rainbow trout farms. J. Fish Dis. 2017; 41: 95–104.

25- Yoshida G. M, C arval heiro R, R odriguez F. H, L horente J. P, YanezJ. M. Single-step genomic evaluation improves accuracy of breeding value predictions for resistance to infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout. Genomics. 2019; 111: 127-132.

Genotyping and molecular characterization of the infectious pancreatic necrosis virus isolates detected in some Iranian trout farms

Sohrab Ahmadivand[1*], Mehdi Soltani[1]

1 - Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: July 18, 2020; Revise: August 24, 2020; Accept: September 16, 2020

Summary

Infectious pancreatic necrosis is caused by IPNV virus that is represented by various strains with different virulence linked to some motifs of the VP2 capsid. In this study (2018-2019), we screened some suspected Iranian trout farms for IPNV, and the genotype and virulence motifs of the positive samples were characterized. The causative agents of two outbreaks in trout farms of Kermanshah and Hamedan Provinces in Iran were diagnosed as IPNV by RT-PCR assay. Phylogenetic analysis of VP2 gene revealed that the detected IPNV isolates belonged to the Genotype 5 (Sp serotype) with close identity (> 99%) with European, Turkish, as well as previously reported Iranian isolates. Characterization of VP2 from both outbreaks has also shown the detected isolates have proline and threonine at amino acid residues 217 and 221, respectively, which are associated with low pathogenicity. In conclusion, the IPNV isolates from some Iranian trout farms (Kermanshah and Hamedan Provinces) are of Sp serotype (Genotype 5) that despite $P_{217}T_{221}$ motif show moderate virulence, and may have originated from Europe via eyed eggs.

Keywords: *IPN, VP2, trout, phylogeny, virulence*

تاثیر سیر تازه در جیره روی جمعیت *اشریشیاکلی* روده و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در جوجه‌های گوشتی

صالحه اردونی[۱]، محمد جهانتیغ[*۲] داریوش سعادتی[۳]، مهرناز هرمزی[۱]

۱- دانش‌آموخته، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت مقاله: ۳۰ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ مرداد ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

هدف از این تحقیق ارزیابی اثرات سیر تازه در جیره روی جمعیت *اشریشیاکلی* و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون در جوجه‌های گوشتی بود. در مجموع ۱۰۵ جوجه در شهرستان زابل برای این تحقیق استفاده شدند. در روز هفتم ۹۶ جوجه با وضعیت بهتر انتخاب و به‌طور تصادفی به ۳ گروه مساوی با ۲ تکرار تقسیم شدند. جیره‌ی گروه‌های ۱ (کنترل)، ۲ و ۳ (درمان) به‌ترتیب با مقادیر ۰، ۱ و ۲ درصد سیر تازه مخلوط گردید. در سن ۳۵ روزگی از هر تکرار ۸ جوجه به‌طور تصادفی انتخاب و وزن شدند و از آنها نمونه خون تهیه گردید و سپس کشتار شدند. پس از کالبدگشایی غده لنفاوی بورس فابریسیوس از بدن خارج و وزن گردید. برای شمارش تعداد پرگنه‌های *اشریشیاکلی* در روده از محتویات ایلئوم استفاده شد. نتایج بررسی نشان داد جوجه‌هایی که سیرتازه در جیره دریافت کرده بودند افزایش معنی‌داری در وزن بورس فابریسیوس را نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P<0/05$). تفاوت معنی‌داری برای جمعیت *اشریشیاکلی*، میزان کلسترول، تری‌گلیسرید و پروتئین تام بین گروه کنترل و گروه‌های درمان مشاهده نگردید ($P>0/05$).

واژگان کلیدی: *جوجه‌های گوشتی، فاکتورهای بیوشیمیایی، اشریشیاکلی، سیر*

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

مقدمه

سال‌ها است که مواد افزودنی خوراک به‌طور گسترده‌ای برای افزایش عملکرد حیوانات و اخیراً نیز در صنعت طیور برای افزایش رشد و افزایش بازده غذایی استفاده می‌شود (۳-۱). سیر دارای خواص درمانی و نیز دارای خواص ضد باکتریایی می‌باشد (۶-۴). استفاده از سیر در جیره جوجه‌های گوشتی باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی و کاهش تلفات می‌شود (۷). در پرورش حیوانات اهلی برای بهبود تولید و سلامتی از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (۸)، ولی امروزه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث نگرانی‌هایی گردیده است که این نگرانی‌ها شامل ایجاد سویه‌های مقاوم باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز آسیب رساندن به سلامتی انسان می‌باشد (۹، ۱۰). سیر تازه دارای آلیسین است. نشان داده شده است که آلیسین و فراورده‌های آن دارای خواص جلوگیری کننده از رشد باکتری‌ها می‌باشد. آلیسین روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مؤثر است و دارای خواص ضد قارچی مثل *Candida albicans* و ضد ویروسی مثل ویروس آنفلوآنزا می‌باشد (۱۱). سیر همچنین دارای سلنیوم می‌باشد که روی سیستم ایمنی بدن مؤثر است (۱۲). محققین زیادی گزارش نموده‌اند که سیر در انسان و حیوانات باعث کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید سرم می‌شود (۱۵-۱۳).

در خصوص تأثیر سیر تازه در جیره جوجه‌های گوشتی گزارشی وجود ندارد و یا تحقیقات کمی در این زمینه صورت گرفته است. با توجه به خواص درمانی سیر، این تحقیق با هدف بررسی اثر مقادیر مختلف سیر تازه مخلوط شده در جیره، روی جمعیت *اشریشیاکلی* روده، رشد بورس فابریسیوس و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون در جوجه‌های گوشتی طراحی و انجام شد.

مواد و روش

حیوانات مورد آزمایش: درمجموع ۱۰۵ جوجه یک روزه‌ی نژاد گوشتی راس ۳۰۸ شامل هر دو جنس نر و ماده در این تحقیق استفاده گردید. حجم نمونه مورد نیاز برای انجام این تحقیق با کمک فرمول تعیین حجم نمونه در آزمون آنوا با در نظر گرفتن خطای نوع اول برابر ۰/۰۵ و خطای نوع دوم برابر ۰/۲۰ تعیین شد (۱۶). در شروع ۷ روزگی جوجه‌های ضعیف (جوجه‌های دارای وزن کم، جوجه‌هایی که چرت می‌زدند و یا بیمار بودند) حذف و ۹۶ جوجه با وضعیت بهتر (جوجه‌های شاداب و دارای وزن مناسب) انتخاب و به‌طور تصادفی به ۳ گروه مساوی با ۲ تکرار و ۱۶ جوجه در هر تکرار تقسیم شدند. تمام جوجه‌ها بر علیه بیماری‌های ویروسی شایع در منطقه‌ی پرورش واکسینه شدند. پرورش جوجه‌ها در شهرستان زابل در شمال استان سیستان و بلوچستان انجام گردید. تمام جوجه‌ها با جیره‌های استاندارد مراحل آغازین و رشد که با توجه به جداول احتیاجات غذایی تا سن ۳۵ روزگی تهیه شده بودند تغذیه شدند. جیره گروه‌های آزمایشی با سطوح مختلف سیر تازه کوبیده شده مخلوط گردید به‌طوری که میزان سیر در جیره گروه ۱ (گروه کنترل) و گروه‌های ۲ و ۳ (گروه‌های درمان) به ترتیب ۰، ۱ و ۲ درصد بود. برای تهیه سیر از بوته‌های سیر استفاده گردید. غلاف‌های خارجی و سخت بوته‌های سیر خارج و سپس حبه‌های سیر به قسمت‌های کوچک بریده و کوبیده شدند. نمونه‌های سیر کوبیده شده، به‌صورت روزانه تهیه می‌گردید و با درصدهای ذکر شده در بالا با جیره‌ی گروه‌های مورد آزمایش مخلوط می‌شدند. سیر دارای آلیسین می‌باشد که اشتهاآور است و جیره‌ها به خوبی توسط جوجه‌ها مصرف می‌شدند. پرورش جوجه‌ها بر روی بستر انجام گرفت. در ۴۸

ساعت اولیه پرورش از ۲۴ ساعت نور و در ادامه از ۲۳ ساعت نور و ۱ ساعت تاریکی استفاده گردید. در طول دوره آزمایش تمام شرایط پرورش از قبیل دما، نور و غیره برای تمام جوجه‌ها یکسان بود و جوجه‌ها به‌صورت آزاد به آب و غذا (*ad libitum*) دسترسی داشتند.

نمونه گیری و انجام آزمایشات: در سن ۳۵ روزگی، به‌طور تصادفی ۸ جوجه از هر تکرار انتخاب، وزن، بی‌هوش و نمونه خون از طریق ورید بال تهیه گردید. سپس جوجه‌ها کشتار و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند (کد اخلاق: UOZ.ECRA/2016/005). پس از کشتار، بورس فابریسیوس از بدن جوجه خارج و وزن گردید. برای جداسازی سرم، نمونه‌های خون با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (هریوس آلمان) شدند. سپس، سرم‌ها جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم شامل: کلسترول، تری‌گلیسرید و پروتئین تام توسط دستگاه اتوآنالیزر Selectra Pro M ساخت کشور هلند انجام گرفت.

برای شمارش پرگنه‌های *اشریشیاکلی* از محتویات قسمت ایلئوم روده کوچک استفاده شد. بدین منظور ابتدا محتویات قسمتی از ایلئوم داخل میکروتیوب‌های استریل تخلیه و میکروتیوب‌ها به یخچال منتقل گردید. سپس مقدار یک گرم از محتویات روده به ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین اضافه و بعد رقت‌های متوالی ۱۰ برابر از نمونه تهیه شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از این رقت‌ها روی سطح محیط‌های کشت مک‌کانکی آگار یا ائوزین متیلن بلو آگار ریخته و پخش گردید. محیط‌های آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۲۴ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفتند. کلنی‌های تخمیر کننده قند لاکتوز روی محیط‌های کشت مک‌کانکی آگار یا ائوزین متیلن بلو آگار که دارای واکنش اسید/اسید در محیط TSI (Triple sugar iron agar)، ایندول مثبت، H_2S منفی، اوره‌آز منفی و سیترات منفی بودند به‌عنوان *اشریشیاکلی* شناسایی می‌شدند (۱۷). تعداد پرگنه‌های *اشریشیاکلی* در هر گرم یا CFU/g (Colony forming unit) از محتویات روده محاسبه و سپس نتیجه‌ی شمارش تعداد باکتری‌ها به $\log_{10}$ تبدیل گردید و برای آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت.

تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ مورد آنالیز قرار گرفت. تفاوت بین میانگین گروه‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون تکمیلی توکی مورد ارزیابی قرار گرفت و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ >P در نظر گرفته شد.

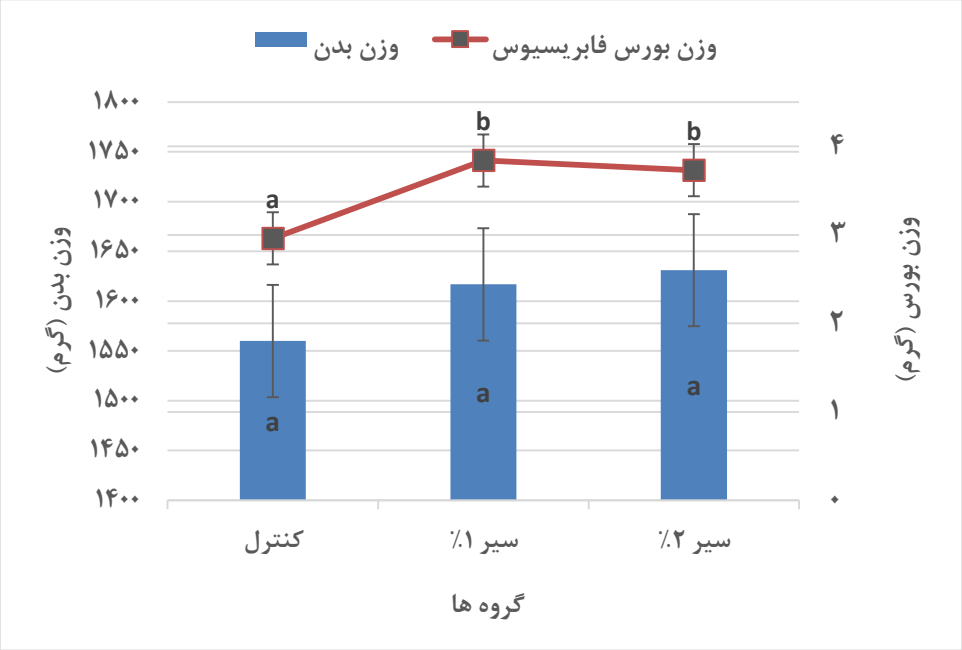
نتایج

نتایج حاصل از تاثیر سطوح مختلف سیر تازه در جیره روی جمعیت *اشریشیاکلی* در محتویات روده، میزان کلسترول، تری‌گلسیرید، پروتئین تام سرم، وزن بدن، وزن بورس فابریسیوس، و نسبت وزن بورس فابریسیوس به وزن بدن در جدول ۱ و نمودار ۱ نشان داده شده است. براساس نتایج این مطالعه، سیر تازه باعث افزایش وزن بورس فابریسیوس می‌شود به‌طوری که جوجه‌های تغذیه شده با ۱ و ۲ درصد سیر دارای وزن بورس بیشتری نسبت به گروه کنترل بودند (P<۰/۰۵). بین گروه‌های تغذیه شده با ۱ و ۲ درصد سیر تفاوت معنی‌داری در وزن بورس فابریسیوس مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). همان طوری که در جدول ۱ و نمودار ۱ آمده است، دریافت سیر از طریق جیره تأثیر معنی‌داری روی جمعیت *اشریشیاکلی* روده، وزن بدن، نسبت وزن بورس فابریسیوس به وزن بدن، میزان کلسترول، تری‌گلیسرید و پروتئین تام سرم را ندارد (P>۰/۰۵).

جدول ۱ - میانگین و انحراف معیار پارامترهای مورد اندازه گیری در گروه‌های مختلف در روز ۳۵ آزمایش

شماره گروه	میزان سیر جیره (%)	*اشریشیا کلی* (log_{10} cfu/g)	کلسترول (mg/dl)	تری‌گلیسرید (mg/dl)	پروتئین تام (g/dl)	نسبت وزن بورس/وزن بدن (%)
۱	۰	۶/۴۲±۰/۴۸^{a}	۱۲۹/۶۳±۹/۸۲^{a}	۱۱۷/۸۸±۱۲/۳۱^{a}	۳/۷۰±۰/۴۰^{a}	۰/۱۹±۰/۰۳^{a}
۲	۱	۶/۲۶±۰/۶۱^{a}	۱۲۹/۱۳±۱۵/۲۷^{a}	۱۰۸/۶۳±۱۴/۲۵^{a}	۳/۳۷±۰/۴۶^{a}	۰/۲۴±۰/۰۵^{a}
۳	۲	۶/۲۹±۰/۴۶^{a}	۱۳۰/۱۳±۱۶/۷۹^{a}	۱۱۰/۶۳±۱۹/۰۲^{a}	۳/۱۷±۰/۴۳^{a}	۰/۲۳±۰/۰۷^{a}

*مقادیر در هر ستون با حروف کوچک انگلیسی غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵)



نمودار ۱ – میانگین وزن بورس و وزن بدن در گروه‌های مختلف در روز ۳۵ آزمایش (میله‌های خطا، خطای معیار را در تست آنوا نشان می‌دهند. در هر پارامتر حروف کوچک انگلیسی غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، جوجه‌هایی که سیر تازه از طریق جیره دریافت کرده بودند افزایش معنی‌داری در وزن بورس فابریسیوس را نسبت به گروه کنترل نشان دادند. براساس یافته‌های این تحقیق وزن بورس فابریسیوس تحت تاثیر میزان یا درصد سیر جیره قرار نگرفته بود، به‌گونه‌ای که تفاوت معنی‌دار و یا قابل توجهی در وزن بورس فابریسیوس بین گروه‌هایی که ۱ و ۲ درصد سیر دریافت کرده بودند مشاهده نشد. نتایج حاصل از تاثیر سیر تازه بر وزن بورس فابریسیوس در این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیقات الاگیب و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت ندارد (۱). هم‌راستا نبودن نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعات الاگیب و همکاران در سال ۲۰۱۳ می‌تواند به دلیل استفاده از پودر سیر بجای سیر تازه در تحقیقات آنها باشد.

جمیل و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ تأثیر افزودن سیر در جیره را بر تولید آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آنها نشان داد جوجه‌هایی که سیر از طریق جیره دریافت کرده بودند، افزایش معنی‌داری را در تیتر آنتی‌بادی نسبت به گروه کنترل نشان

دادنـد (۱۸). جاسـلینگ و همکـاران در سـال ۲۰۰۱ گزارش نمودند کـه سـیر محـرک سیسـتم ایمنـی اسـت و باعـث تقویـت سیسـتم دفـاعی بـدن در برابـر ارگانیسـم‌های عفـونی می‌شـود (۱۹). همچنـین، سـیر دارای سـلنیوم می‌باشـد کـه روی سیسـتم ایمنـی بـدن مؤثر است (۱۲).

در ایـن تحقیـق تفـاوت معنـی‌داری در میـزان کلسـترول، تری‌گلیسـرید و پـروتئین تـام سـرم بـین گروه کنترل و گروه‌هـای تحـت درمـان بـا سـیر مشـاهده نگردیـد هـر چنـد کـاهش قابـل ملاحظـه‌ای در میـزان تری‌گلیسـرید سـرم در گروه‌هـایی کـه سـیر تـازه از طریـق جیـره دریافـت کـرده بودنـد مشـاهده شـد. مهـدی‌زاده و همکـاران (۲۰۱۷) گـزارش نمودنـد کـه عصـاره آبـی سـیر روی غلظـت لیپیـدهای سـرم در بلـدرچین تـأثیر نـدارد (۲۰). بـورک در سـال ۲۰۰۱ گزارش نمود کـه سـیر اثـر کاهنـدگی بـر روی کلسـترول و تری‌گلیسـرید سـرم در مـوش صـحرایی را دارد (۱۳). محققـین زیـادی نیـز گـزارش کرده‌انـد کـه سـیر در انسـان و حیوانـات باعـث کـاهش کلسـترول و تری‌گلیسرید سرم می‌شود (۱۳-۱۵).

نتـایج حاصـل از شـمارش پرگنـه‌های *اشریشـیاکلی* در محتویـات روده نشـان داد کـه دریافـت سـیر تـازه از طریـق جیـره تـاثیر معنـی‌داری روی جمعیـت *اشریشـیاکلی* روده نـدارد. شـاماس شـارق و همکـاران در سال ۲۰۱۲ نیز مشـاهده کردنـد کـه دریافـت سـیر از طریـق جیـره تـاثیر معنـی‌داری روی جمعیـت کلی‌فـرم محتویـات ایلئـوم نـدارد (۲۱). گـزارش شـده اسـت کـه سـیر روی *اشریشـیاکلی* و سـایر باکتری‌هـای بیمـاریزای روده‌ای کـه موجـب اسـهال می‌شـوند مـؤثر اسـت (۲۲). همچنـین، اجـا و همکـاران در سـال ۲۰۰۷ گـزارش نمودنـد کـه باکتری‌هـای گـرم منفـی بیمـاری‌زای ایجادکننـده اسـهال بـه سـیر شـدیداً حسـاس هسـتند (۲۳). سـیر دارای آلیسـین می‌باشـد کـه اشـتهاآور و محـرک هضـم می‌باشـد، بعـلاوه سـیر دارای فعالیت‌هـای ضـد باکتریـایی در روده اسـت کـه باعـث افـزایش وضـعیت سـلامتی و رشـد می‌شـود (۱۸). مهـدی‌زاده و همکـاران در سـال ۲۰۱۷ گـزارش نمودنـد کـه عصـاره آبـی سـیر باعـث کـاهش تعـداد پرگنـه‌های *اشریشـیاکلی* در محتویـات روده بلـدرچین می‌شـود (۲۰). بـه‌هرحال، بـا توجـه بـه وجـود ترکیبـات ضـد باکتریـایی موجـود در سـیر (۲۴) عـدم تـأثیر قابـل توجـه سـطوح مـورد اسـتفاده‌ی سـیر از طریـق جیـره بـر جمعیـت *اشریشـیاکلی* در شـرایط بـدن جوجـه‌ها، می‌توانـد در ارتبـاط بـا سـطوح مـورد اسـتفاده سـیر، نـوع سـیر و شرایط پرورش در این تحقیق باشد.

بـا توجـه بـه محـدودیت اسـتفاده از آنتی‌یوتیک‌هـای محـرک رشـد در تغذیـه طیـور بـه واسـطه باقی‌مانـده آنتی‌بیوتیک‌هـا، سـیر تـازه می‌توانـد بـه‌عنوان یـک جـایگزین مناسـب در جیـره طیـور مطـرح باشـد و بـرای سلامتی و تقویـت سیسـتم ایمنـی طیـور اسـتفاده شـود. براسـاس نتـایج حاصـل از ایـن تحقیـق مصـرف سـیر تـازه‌ی کوبیده‌شـده از طریـق جیـره می‌توانـد باعـث افـزایش وزن بـورس فابریسـیوس و تقویـت سیسـتم ایمنـی در جوجـه‌های گوشـتی شـود. همچنـین، براسـاس یافتـه‌های ایـن تحقیـق دریافـت سـیر از طریـق جیـره تـأثیر قابـل ملاحظـه‌ای روی جمعیـت *اشریشـیاکلی* روده، میـزان کلسـترول، تری‌گلیسـرید و پروتئین تام سرم را ندارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسـیله از کارکنـان محتـرم آزمایشـگاه‌های بیوشـیمی و همـاتولوژی و تغذیـه دام دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه زابـل کـه مـا را در انجـام ایـن تحقیق کمـک نمودنـد کمـال تشـکر و سـپاس را داریـم. شماره گرنت: UOZ-GR-9718-40.

References

1- Elagib, H.A.A.; EL-Amin, W.I.A.; Elamin, K.M. and Malik, H.E.E.; Effect of dietary garlic (Allium sativum) supplementation as feed additive on broiler performance and blood profile. J Anim Sci Adv; 2013; 3: 58-64.

2- Khan, H.S.; Sardar, R. and Anjum, M.A.; Effects of dietary garlic on performance and serum and egg yolk cholesterol concentration in laying hens. Asian J Poult Sci; 2007; 1: 22 – 27.

3- Saeid, J.M.; Mohammed, A.B. and Al-Baddy, M.A.; Effect of garlic powder (Allium sativum (and black seed (Nigella sativum) on broiler growth performance and intestinal morphology. Iran J Appl Anim Sci; 2013; 3: 185-188.

4- Freitas, R.; Fonseca, J.B.; Soares, R.T.R.N.; Rostango, H.S. and Soares, P.R.; Utilization of garlic (Allium sativum L.) as growth promoter of broilers. Rev Bras Zootecn; 2001; 30: 761-765.

5- Jafari, R.A.; Ghorbanpoor, M. and Hoshmand Diarjan, S.; Effect of dietary garlic on serum antibody titer against Newcastle disease vaccine in broiler chicks. J Biol Sci; 2008; 8: 1258-1260.

6- Lewis, M.R.; Rose, S.P.; Mackenzie, A.M. and Tucker, L.A.; Effects of dietary inclusion of plant extracts on the growth performance of male broiler chickens. Brit Poult Sci; 2003; 44: 43-44.

7- Tollba, A.A.H. and Hassan ,M.S.H.; Using some natural additives to improve physiological and productive performance of broiler chicks under high temperature conditions. 2. Black cumin (Nigella sativa) or garlic (Alliurn sativurn). Poult Sci; 2003; 23: 327-340.

8- Wegener, H.C.; Aarestrup, F.M.; Gerner-Smidt, P. and Bger, F.; Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. Acta Vet Scand Suppl; 1999; 92: 51-57.

9- Rahmatnejad, E.; Roshanfekr, H.; Ashayerizadeh, O.; Mamooee, M. and Ashayerizadeh, A.; Evolation the effect of several non- antibiotic additives on growth performance of broiler chickens J Anim Vet Adv; 2009; 8: 1757-1760.

10- Rehmana, Z.U. and Munir, M.T.; Effect of garlic on the health and performance of broilers. Veterinaria; 2015; 3(1): 32-39.

11- Chang, K.J. and Cheong, S.H.; Volatile organosulfur and nutrient compounds from garlic by cultivating areas and processing methods. Fed Am Soc Exp Bio J; 2008; 22: 1108-1112.

12- Seo, T.C.; Spallholz, J.E.; Yun, H.K. and Kim, S.W.; Selenium-enriched garlic and cabbage as a dietary selenium source for broilers. J Med Food; 2008; 11: 687-692.

13- Borek, C.; Antioxidant heath effects of aged garlic extract. J Nut; 2001; 131: 1010-1015.

14- Choi, I.H.; Park, W.Y. and Kim, Y.J.; Effects of dietary garlic powder and α-tocophero supplementation on performance, serum cholesterol levels and meat quality of chicken. Poult Sci; 2010; 89: 1724–1731.

15- Mosallanejad, B.; Avizeh, R.; Razi Jalali, M. and Jahanmardi, A.; Comparative evaluation of garlic and atorvastatin effects on lipid profiles changes in dog. Iranian Vet J; 2016; 12: 94-124.

16- Chow, S.C.; Shao, J. and Wang, H.; Sample size calculations in clinical research. 1st Ed. New York, CRC Press; 2007, pp: 68-71.

17- Swayne, D.E; Glisson, J.R; Jackwood, M.W; Pearson, J.E. and Reed, W.M; A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens; 4th Ed.; American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, Kennett Square, 1998, pp: 14-16.

18- Jameel, Y.J.; Abed, A.R. and Al-Shimmary, F.O.; Influence of adding garlic and thyme and their combination on immune response and some blood parameters in broiler. Sci Agri; 2014; 6: 102-106.

19- Josling, P.; Preventing the common cold with a garlic supplement: a double–blind, placebo-controlled survey. Adv Ther; 2001; 18: 189-193.

20- Mahdizadeh, S.; Mohammadi, M. and Mohiti-Asli, M.; Effect of different levels of garlic (Allium sativum) aqueous extract in drinking water on performance, blood lipids and intestinal microflora of Japanese quail. Anim Prod Res; 2017; 5: 22-32.

21- Shamas Shargh, M.; Dastar, B.; Zerehdaran, S.; Khomeiri, M. and Moradi, A.; Effects of using plant extracts and a probiotic on performance, intestinal morphology, and microflora population in broilers. J App Poult Res; 2012; 21: 201-208.

22- Caldwell, D.R. and Danzer, C.J.; Effects of allyl sulfides on the growth of predominant gut anaerobes. Curr Microbiol; 1988; 16: 237-41.

23- Eja, M.E.; Asikong, B.E.; Abriba, C.; Arikpo, G.E.; Anwan, E.E. and Enyi-Idoh, K.H.; A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (Allium sativum) and antibiotics on

diarrheagenic organisms. Southeast Asian J Trop Med Public Health; 2007; 38(2): 343-8.

24- Martin, K.W. and Ernst, E.; Herbal medicines for treatment of bacterial infections: A review of controlled clinical trials. J Antimicrob Chemother; 2003; 51: 241-6.

Effect of fresh dietary garlic on intestinal *Escherichia coli* and some blood serum biochemical factors of broiler chickens

Saleheh Ordoni[1]; Mohammad Jahantigh[*2]; Dariush Saadati[3]; Mehrnaz Hormozi[1]

1- Graduated student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol - Iran.
3- Associate Professor, Department of of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol - Iran.

Receive: July 21, 2020; Revise: August 15, 2020; Accept: September 10, 2020

Summary

Garlic has therapeutic and also antibacterial properties and its inclusion in broiler diets improves their feed efficiency and lowers their mortality rates. The present research intended to evaluate the effects of fresh dietary garlic cloves on the intestinal *Escherichia coli* population and some blood serum biochemical factors in broilers. In this study, one hundred and five day-old broiler chicks were used in Zabol. On the seventh day of age, sick birds were removed and 96 chicks with better body conditions were selected and randomly divided into 3 equal groups with 2 replicates. Groups 1, 2, and 3 (the control and treatment groups) received 0, 1, and 2 percent of fresh crushed garlic cloves in their diets, respectively. When the broilers were 35 days old, 8 chicks from each replicate were selected randomly, weighed and blood samples were taken from the wing veins. They were then slaughtered and their bursa of Fabricius was removed and weighed. Their ileum contents were used to determine the *E. coli* population. Results indicated that bursa of Fabricius weight increased in broilers receiving fresh crushed garlic cloves in their diets compared to the control group ($P<0.05$). There was not significant differences in *E. coli* population, cholesterol, triglyceride and total protein between the groups ($P>0.05$).

Key words: *Broiler chickens, Biochemical factors, E. coli, Garlic*

بررسی تاثیر نانو کمپلکس قارچ و مس بر روی باکتری‌های ایجاد کننده‌ی عفونت بیمارستانی

سمیرا کدوغنی ثانی[۱]، مجید جمشیدیان مجاور[۲*]، حمیدرضا فرزین[۲]، محدثه امیری[۴]

۱- دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار، سبزوار، ایران.
۲- استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، مشهد، ایران.
۳- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۵ شهریور ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۵ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

عفونت بیمارستانی یکی از عمده‌ترین و اساسی‌ترین مشکلات درمانی در تمام بیمارستان‌ها تلقی می‌گردد و به طور میانگین ۵ تا ۱۰ درصد بیماران بستری را درگیر می‌نماید. از عوامل تشدید کننده‌ی عفونت بیمارستانی می‌توان به استفاده‌ی مکرر از ابزارها و همچنین تماس‌های پی‌درپی با کادر درمانی اشاره نمود. در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مس با استفاده از عصاره‌ی آبی قارچ *گانودرما لوسیدوم* بر روی سوش‌های استاندارد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اسینتوباکتر بومانی* و *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* که عامل ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند مورد بررسی قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانو ذرات مس از میکروسکوپ الکترونی استفاده گردید. همچنین جهت بررسی ترکیبات آلی احتمالی که در سنتز نانو ذرات امکان دخالت را داشتند آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز انجام شد. جهت مشاهده‌ی میزان اثربخشی این نانوکمپلکس تست MTT بر روی دو رده‌ی سلولی vero و رده‌ی سلولی فیبروبلاست929 L صورت پذیرفت. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی این پژوهش نشان داد که نمونه عصاره دارای مورفولوژی کاملاً یکنواخت می‌باشد. نانو ذرات مس کروی و در محدوده ۳۰-۲۰ نانومتر می‌باشند. همچنین در بررسی تست mtt آزمون ANOVA نشان داد که مقدار Sig برابر صفر است که نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف و نمونه‌های شاهد مثبت و منفی است. طبق نتایج این مطالعه نانو کمپلکس قارچ و مس دارای اثر ضد باکتریایی قوی علیه باکتری‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی بوده است.

واژگان کلیدی: *سوش‌های استاندارد باکتریایی، قارچ گانودرما لوسیدوم، عفونت بیمارستانی، نانو ذرات مس*

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

مقدمه

به طور کلی عفونت‌های بیمارستانی به آن دسته از عفونت‌هایی گفته می‌شود که در زمان پذیرش بیماران به مراکز درمانی در فرد وجود نداشته و پس از مراجعه، به آن عفونت به طور اکتسابی از بیمارستان دچار شده است. عفونت‌های بیمارستانی اغلب پس از ۷۲ ساعت از مراجعه‌ی بیمار به مراکز درمانی تظاهر می‌نماید (۱). میزان شیوع عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های گوناگون بیمارستان متفاوت می‌باشد و در بخش مراقبت‌های ویژه میزان شیوع ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از شیوع عفونت در بخش‌های دیگر می‌باشد (۲). از عمده‌ترین و حساس‌ترین محل‌های ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌توان به سیستم ادراری، سیستم تنفسی و جریان خون اشاره نمود (۳). عفونت‌های بیمارستانی می‌توانند در اثر متقابل و ارتباط با کادر درمانی بیمارستان، بیماران مبتلا به عفونت‌های گوناگون، لوازم و تجهیزات آلوده و همچنین باکتری‌هایی از قبیل *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *اسینتوباکتر بومانی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اینتروباکترها* و *انتروکوک‌ها* اشاره نمود (۴). امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از معضلات و مشکلات و همچنین یکی از چالش‌های مهم در درمان و کنترل بیماری‌های عفونی و عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد (۵). گسترش روز افزون علم نانوتکنولوژی، فرصت‌های نو و جدیدی را برای کشف تأثیرات ضد باکتریایی نانو ذرات فلزی ایجاد کرده است (۶). از مزایای مواد ضد باکتری معدنی نسبت به مواد ضد باکتری آلی می‌توان به دارای پایداری فوق‌العاده، سمیت کمتر، قابلیت انتخاب گسترده و مقاوم در برابر حرارت آنها اشاره کرد (۷).

نانو ذره اکسید روی با ایجاد مکانیسم‌های ضد میکروبی مانند القای استرس اکسیداتیو به دلیل تولید رادیکال‌های اکسیژن فعال که واکنش رادیکال‌ها با اجزایی مانند پروتئین‌ها و لیپیدها سبب مرگ سلول باکتریایی می‌شود و یا با از بین بردن آرایش غشا سبب بروز و تجمع در میکروارگانیسم‌ها می‌شوند (۸).

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌باکتریال نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما و مس بر روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسینتوباکتر بومانی* و همچنین بررسی سمیت نانو کمپلکس بر رده‌ی سلولی ورو و رده‌ی سلولی فیبروبلاست L 929 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی قارچ گانودرما: جهت تهیه عصاره‌ی آبی این قارچ به میزان ۲۵ گرم قارچ *گانودرما* توسط هاون چینی خرد نموده تا به قطعات کوچک در بیاید سپس به میزان ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر به آن اضافه گردید، محلول فوق را به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و پس از طی این مدت آن را از کاغذ صافی عبور می‌دهیم. جهت استریل نمودن محلول به‌دست آمده آن را اتوکلاو می‌نماییم.

سنتز نانو ذره مس و قارچ گانودرما: جهت تهیه عصاره قارچ و مس ۰/۸۳ گرم ازمس با ۱۰۰سی‌سی آب مقطر مخلوط کرده و مقدار ۰/۵ سی‌سی از مس را با ۹/۵ سی‌سی عصاره آبی قارچ به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. محلول حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ (اپندورف-آلمان) کرده و پس از چند بار شستشو از رسوب حاصل برای انجام تست‌های تعیین حساسیت استفاده گردید.

به منظور تأیید تولید نانو ذره مس و اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانو ذرات مس از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (ساخت کشور چک) و همچنین از دستگاه FTIR (ساخت کشور آلمان)

استفاده شد.

تست MTT: جهت بررسی اثر عصاره قارچ + مس بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده گردید. این متد تشخیص حساس، کمی و قابل اعتماد برای اندازه‌گیری میزان زنده بودن، تکثیر و فعالیت سلول‌ها می‌باشد. اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و تولید بلورهای بنفش رنگ و نا محلول فورمازان است. هر چه تعداد سلول‌های زنده بیشتر باشد شدت رنگ تولید شده بیشتر خواهد بود و بر عکس (۹).

در این پژوهش جهت سنجش سمیت سلولی از آزمون MTT استفاده گردید. جهت انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی از رده‌ی سلولی فیبروبلاست929 L در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM (Grand Island, NY) داخل پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند، پس از طی مدت زمان انکوباسیون میکروپلیت را در زیر میکروسکوپ بررسی نموده تا از اتصال سلول‌ها به کف میکروپلیت اطمینان حاصل نمائیم. از ردیف اول میکروپلیت به عنوان شاهد و از ردیف دوم به عنوان کنترل استفاده شد.

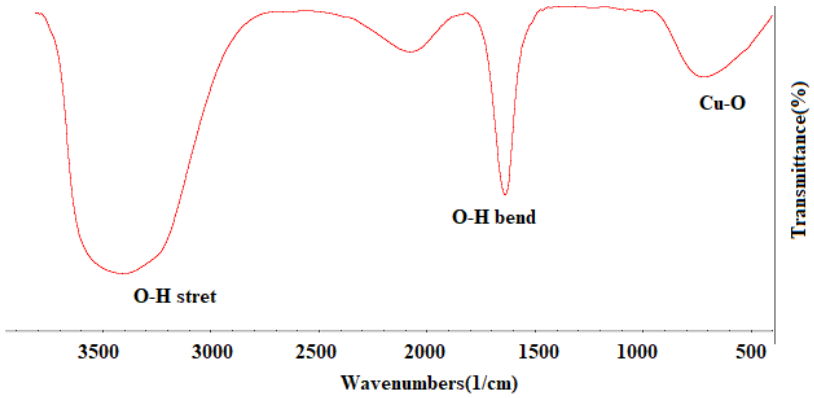
در این پژوهش از غلظت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی قارچ و نانو ذره تهیه شد و میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید پس از طی مدت زمان مذکور محیط کشت درون پلیت ۹۶ خانه‌ای تخلیه گردید و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد FBS (سرم جنین گاو) به همراه ۱۵ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور انکوبه گردید. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون محیط‌های درون گودهای پلیت تخلیه شد و به هر گوده‌ی پلیت ۹۶ خانه به میزان ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه شد و جذب سلول‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (Biotek.USA) خوانده شد.

نتایج

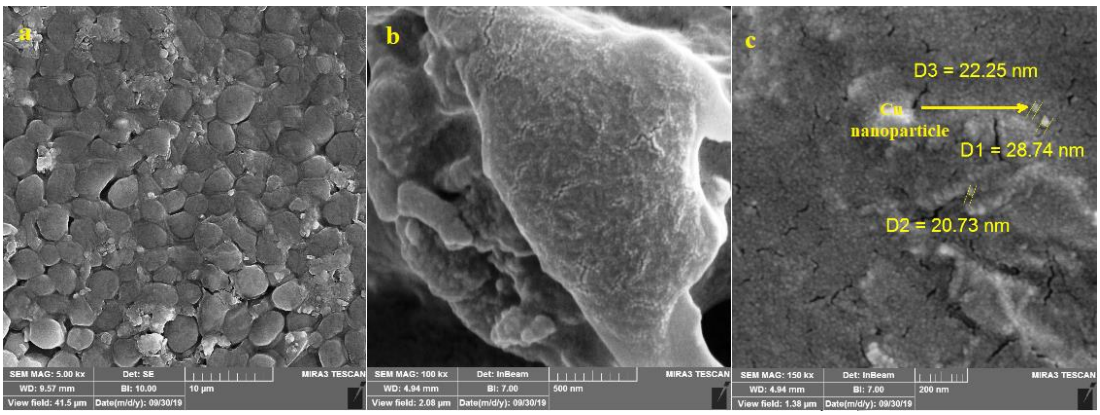
نتایج آنالیز FT-IR: به منظور شناسایی گروه‌های عاملی، ساختار شیمیایی و نیز برهمکنش‌های بین اجزای کامپوزیتی، آنالیز FT-IR به‌کار گرفته شد. طیف IR نمونه عصاره قارچ گانودرما/مس کلرید در شکل ۱ نشان داده شده است. ارتعاش کششی هیدروکسیلی O-H که ناشی از آب جذب سطحی شده در نمونه است، در cm^{-1} ۳۴۰۸ دیده می‌شود و ارتعاش خمشی آن در cm^{-1} ۱۶۳۸ قابل شناسایی است. از آنجا که ارتعاشات فلز-اکسیژن در نواحی cm^{-1} ۴۰۰-۷۵۰ قرار می‌گیرند پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۷۱۸ به ارتعاش کششی مس- اکسیژن نسبت داده می‌شود. عدم حضور پیک‌های مربوط به قارچ احتمالاً به درصد کمتر آن در نمونه کامپوزیتی مربوط است.

نتایج میکروسکوپ الکترونی FE-SEM

روبشی: تصاویر SEM نمونه عصاره قارچ گانودرما/مس کلرید را نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل ۲ مشاهده می‌شود، نمونه عصاره درای مورفولوژی کاملاً یکنواخت می‌باشد. شکل ۲b، حضور نانو ذرات مس را نشان می‌دهد که طبق نتایج به‌دست آمده در محدوده ۳۰-۲۰ نانومتر است.



شکل۱- طیف FT-IR نمونه کامپوزیتی



شکل ۲- تصاویر SEM از نمونه کامپوزیتی با بزرگ نمایی‌های متفاوت

نتایج MTT: آزمون ANOVA نشان داد که مقدار Sig برابر صفر است که نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف و نمونه‌های شاهد مثبت و منفی است (P<0.05).

جدول شماره ۱- نتیجه تست MTT بر روی رده‌ی سلولی فیبروبلاست L 929

OD	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.050	4	.012	83.029	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.051	14			

جدول شماره ۲- نتیجه تست MTT روی رده‌ی سلولی vero

OD	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.377	4	.094	17.046	.000
Within Groups	.055	10	.006		
Total	.432	14			

بحث

مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر داروهای رایج مورد استفاده در درمان عفونت‌های گوناگون یک مشکل جدی در سلامت عمومی در سراسر جهان است. گسترش روز افزون ظهور مقاومت در باکتری‌ها و همچنین هزینه‌های بالای داروهای ضد میکروبی در درمان عفونت‌های میکروبی، محققان را تشویق به جستجو برای داروهای با طیف وسیع و خاصیت ضد باکتری قوی‌تر و مؤثر و مقرون به صرفه‌تر می‌کند. بنابراین، توسعه ترکیبات قوی ضد میکروبی جدید بسیار مهم است (۱۰).

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی این پژوهش نشان داد که نمونه عصاره دارای مورفولوژی کاملاً یکنواخت می‌باشد. نانو ذرات مس کروی و در محدوده ۳۰-۲۰ نانومتر می‌باشند. همچنین در بررسی تست mtt آزمون ANOVA نشان داد که مقدار Sig برابر صفر است که نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میان غلظت‌های مختلف و نمونه‌های شاهد مثبت و منفی وجود دارد. همچنین نانو کمپلکس قارچ و مس دارای اثر ضد باکتریایی نسبتاً قوی علیه باکتری‌های مولد عفون های بیمارستانی بوده است.

یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در اصفهان به بررسی میزان اثر آنتی‌باکتریال نانو ذرات مس بر روی سوش‌های باکتریایی و استاندارد در عفونت‌های بیمارستانی پرداختند. آنها در این پژوهش اثر نانو ذره مس را بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار دادند . آنالیز جهت تأیید شکل‌گیری نانو ذرات و همچنین تشخیص اشکال نانو ذرات صورت پذیرفت. در آنالیز نانو ذرات مس با روش تبخیر قوس الکتریکی قطر به‌دست آمده نانو ذرات ۲۰ نانومتر مشاهده گردید. همچنین نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که سویه‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس آرئوس* دارای حساسیت نسبت به نانو ذرات مس می‌باشند (۱۱).

روپارلیا و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی تأثیر آنتی میکروبی نانو ذرات مس و نقره بر سه سوش *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* پرداختند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نانو ذرات مس دارای توان کمتری نسبت به نانو ذرات نقره در مقابله با رشد باکتری‌ها بودند (۱۲).

دهقان نیری و همکاران در سال ۲۰۱۷ در قزوین به بررسی اثر ضد باکتری و ضد قارچی نانو ذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره آبی اندام‌های هوایی کنجد به دو روش دیسک و چاهک پرداختند. در مطالعه‌ی دهقان نیری و همکاران جهت تأیید تولید نانو ذرات نقره از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر و جهت اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانو ذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که ذرات حاصل کروی بوده و در محدوده ۱۸ تا ۷۰ نانومتر قرار داشتند. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، نانو ذرات تولید شده به‌وسیله عصاره آبی گیاه کنجد فعالیت ضد میکروبی مؤثری علیه مخمر ساکارومایسز سروزیه، باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis* و قارچ بیماری‌زای *کاندیدا آلبیکنز* نشان دادند (۱۳).

مفاخری و همکاران در سال ۲۰۱۹ در قزوین به بررسی تولید زیستی و اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره تولید شده به‌وسیله عصاره متانولی گیاه دارویی میخک هندی پرداختند. در این مطالعه اثر ضد باکتری و ضد قارچی نانو ذرات نقره تولید شده، به دو روش دیسک و چاهک مورد آزمایش قرار گرفت و برای تأیید تولید نانو ذرات نقره از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر

استفاده شد. همچنین به منظور بررسی SEM ابعاد و شکل نانو ذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. نتایج حاصل از FTIR نشان داد که ترکیبات آلی احتمالی که در سنتز نانو ذرات دخالت دارند و همچنین نانو ذرات تولید شده به وسیله عصاره متانولی میخک هندی کروی بوده و در محدوده ۲۷ تا ۶۹ نانومتر قرار داشتند و نانو ذرات تولید شده، فعالیت ضد میکروبی مؤثری علیه باکتری‌های این پژوهش داشتند (۱۴).

شفیعی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در قائم‌شهر به بررسی سنتز نانو ذرات اکسید مس و بررسی خصوصیات باکتری‌کشی آن بر روی باکتری *آئروموناس هیدرو فیلا* پرداختند. در این پژوهش مورفولوژی و قطر نانو ذرات و نسبت سطح این نانو ذرات به‌وسیله تصاویر TEMو SEM مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد که نانو ذرات اکسید مس دارای قطر تقریبی ۵ تا ۶ نانومتر بودند. همچنین در این پژوهش به بررسی حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و حداقل غلظت بازداری (MIC) و بررسی خلوص نانو ذرات توسط طیف پراش پرتو-X پرداخته شد (۱۵).

سپاسگزاری

بدین‌وسیله، نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق کشور که از هیچ کوششی در راستای انجام این مطالعه دریغ ننمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1- Ghotbi F, Raghibmotlagh M, Valaie N. Nosocomial sepsis in NICU department in Taleghani hospital, 2001-2002. Research in Medicine. 2005 Dec 10; 29(4): 313-7. [In Persian].

2- Bienve nido D,Alora, M.D, Manuel B, Zacarias M.D, et al.,Nosocamial Infection in santo Tomas university Hospital. J Microbiol Infect Dis1984; 13(1):36-48.

3- Berenholtz S.M, Pronovost P.J, Lipsett P.A, et al, Eliminating catheter-related bloodstream infections in the intensive care unit. Crit Care Med 2004; 32(10):2014–2020.

4- Emilia Ma, Baleva A, Adrian C. Catheter-Related Intravascular Infections in Critical Care Units. Infect Diseases & Tropical Med 1990; 26(2): 251-54.

5- Amiri M, Jajarmi M, Ghanbarpour R. Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of *qnr* genes among *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection. Int J Enteric Pathog. 2017;5(4):100-5. [In Persian].

6- Roy N, and Barik A. Green Synthesis Of Silver Nanoparticles From The Unexploited Weed Resources. IJNT 2010; 4: 95–101.

7- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. J Nanomedicine. 2007; 3(1): 95-101.

8- Ketabchi M, Iessazadeh Kh, Massiha A. Evaluate the inhibitory activity of ZnO nanoparticles against standard strains and isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from food samples. JFM 2017; 4(1): 63-74.

9- Mosmann,T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. Immunol. Methods; 65:55-63.

10- Mayeur, S., Spahis, S., Pouliot, Y., & Levy, E. (2016). Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease. Antioxidants & redox signaling, 24(14), 813-836.

11- Yousefi E, Rafienia M, Fazeli H, Zaman Kasai M. In-Vitro Effects of Copper Nanoparticles on Common Bacterial Strains Implicated in Nosocomial Infections. J Isfahan Med Sch 2013; 31(240): 830-42. [In Persian].

12- Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater 2008; 4(3): 707-16.

13- Dehghan Nayeri, F., Mirhosseini, M., Mafakheri, S., Zarrabi, M. Antibacterial and antifungal effects of silver nanoparticles synthesized by

the aqueous extract of sesame (Sesamum indicum L.). Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 2018; 31(1): 16-26. [In Persian].

14- Mafakheri, S., Dehghan Nayeri, F., Mirhosseini, M. study the biological production and antibacterial and antifungal effects of silver nanoparticles synthesized by the methanolic extract of clove (Syzygium aromaticum). JMBS. 2017; 8 (2) :93-103. [In Persian].

15- Shaffiey SF, Ahmadi M, Shaffiey SR, Shapoori M, Varshoie H, Azari F. Synthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles and surveying its bactericidal properties against Aeromonas Hydrophila bacteria. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2015; 5(1):36-43. [In Persian].

Investigation of the effect of fungal and copper nanocomplexes on bacteria causing nosocomial infections

Samira Kadoughani Sani[1], Majid Jamshidian-Mojaver [2*], Hamidreza Farzin[2], Mohadese Amiri[3]

1- Master of Microbiology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University of Sabzevar, Sabzevar, Iran.
2- Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
3- Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

Receive: July 15, 2020; Revise: August 26, 2020; Accept: September 15, 2020

Summary

Nosocomial infection is considered as one of the major and most basic medical problems in all hospitals and affects an average of 5 to 10% of hospitalized patients. Exacerbating factors of nosocomial infections include frequent use of tools as well as repeated contacts with medical staff. In this study, the antibacterial effects of copper nanoparticles using aqueous extract of *Ganoderma lucidum* on standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* and *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* which are the cause of nosocomial infections were investigated. Electron microscopy was used to measure the dimensions and shape of copper nanoparticles. Infrared spectroscopy was also performed to investigate possible organic compounds that could be involved in the synthesis of nanoparticles. Also, to observe the effectiveness of this nanocomplex, MTT test was performed on two vero cell lines and L 929 fibroblast cell line. The results of scanning electron microscopy in this study showed that the sample of the extract in morphology is completely uniform. Copper nanoparticles are spherical and in the range of 20-30 nm. Also, in the study of MTT test, ANOVA test showed that the value of Sig is zero, which indicates a significant difference between different concentrations and positive and negative control samples. According to the results of this study, fungal and copper nanocomplexes had a relatively strong antibacterial effect against bacteria that cause nosocomial infections. The non-toxicity proposal of copper nanoparticles should be investigated in laboratory spaces in order to use the antibacterial properties of these nanoparticles in human applications.

Keywords: *Copper nanoparticles , Ganoderma lucidum, Nosocomial infection, Standard bacterial strains*

بررسی تأثیر ضد میکروبی عصاره‌های الکلی آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعناع فلفلی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی شیر پاستوریزه

سید محمد احمدی[۱*]، سمیه نیک‌نیا[۱]، محمد امین میری[۱]، طیبه حدادی[۲]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- مربی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ مرداد ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۳۰ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

اخیراً تحقیقات در خصوص استفاده از ترکیبات گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی سه گیاه دارویی آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعناع فلفلی کشت شده در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای شیر پاستوریزه شامل *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *لیستریامنو سایتوژنز* و *اشرشیاکلی* و در مرحله بعد بررسی اثر عصاره‌های اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی بر ماندگاری شیر پاستوریزه بود. نتایج نشان داد که گیاه آلوئه‌ورا بیشترین اثر ضد میکروبی را داشت و گیاهان بابونه آلمانی و نعناع فلفلی به ترتیب بعد از آن قرار داشتند ($P\leq ۰/۰۵$). به طور کلی عصاره اتانولی گیاهان مورد آزمایش دارای اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره متانولی بود ($P\leq ۰/۰۵$). غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ (درصد حجمی/حجمی) از عصاره‌های اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی، به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در شیر پاستوریزه مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج حاکی از آن بود که تیمار شیر پاستوریزه با ۰/۳ و ۰/۱۵ درصد بابونه آلمانی و همچنین آلوئه‌ورا با غلظت ۰/۳ درصد ضمن داشتن خصوصیات حسی قابل قبول، به‌طور معنی‌داری جمعیت میکروبی پایین‌تر و زمان ماندگاری طولانی‌تری در مقایسه با نمونه شاهد داشت. بنابراین استفاده از عصاره گیاهان مذکور به‌عنوان نگهدارنده در شیر پاستوریزه با خصوصیات مفید یک غذای عملگرا پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: *آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی، شیر پاستوریزه، عصاره اتانولی، فعالیت ضد میکروبی*

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

مقدمه

فساد باکتریایی مهم‌ترین عامل محدودکننده عمر ماندگاری شیر پاستوریزه می‌باشد. متابولیسم و رشد میکروب‌ها به دلیل اثرات نامطلوبی که دارند، زمان نگهداری شیر را کوتاه می‌کنند (۱). پاستوریزاسیون، اغلب میکروب‌های بیماری‌زای شیر را نابود می‌کند اما تقریباً یک درصد فلور میکروبی شیر نظیر میکروب‌های ترموفیل متعلق به گونه‌های *میکروکوکوس*، *باسیلوس*، *کلستریدیوم* و گاهی اوقات باکتری‌های میله‌ای‌گرم منفی ممکن است در دمای پاستوریزاسیون زنده بمانند و سبب فساد محصول شوند، خصوصاً زمانی که تعداد آنها در شیر خام زیاد باشد (۱، ۲).

سایکروتروف‌ها گروه بسیار مهمی از میکروب‌هایی هستند که در شیر و محصولات لبنی حضور دارند که در بین آنها گونه‌های سودوموناس به‌عنوان مهم‌ترین میکروب‌های شرکت‌کننده در فساد شیر مورد توجه می‌باشند. این باکتری‌ها می‌توانند در دمای یخچال رشد و آنزیم‌ها، سموم و سایر متابولیت‌ها را تولید نمایند. اکثر این باکتری‌ها آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک خارج سلولی تولید می‌کنند که تعدادی از این آنزیم‌ها به‌وسیله پاستوریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یا فرایند UHT[۱۹] غیر فعال نمی‌شوند. فعالیت باقی‌مانده این آنزیم‌ها می‌تواند کیفیت ارگانولپتیکی و عمر ماندگاری محصولات لبنی فرآوری شده را کاهش دهد (۱). شیر پاستوریزه همچنین ممکن است بعد از فرایند پاستوریزاسیون تحت شرایط غیر بهداشتی دچار آلودگی میکروبی شود. یکی از میکروب‌هایی که ممکن است به واسطه آلودگی ثانویه وارد شیر شود، باکتری *اشرشیاکلی* است که یک میکروب انتروپاتوژن با منشأ غذایی می‌باشد و می‌تواند سبب اسهال و در شرایط حادتر منجر به مرگ شود (۲).

گزارشات متعددی درباره بیماری‌های ناشی از شیر پاستوریزه وجود دارد که از جمله آنها، بیماری *لیستریوزیس* می‌باشد. که سبب بیماری‌های مننژیت، انسفالیت و عفونت خونی می‌گردد. این بیماری دارای نرخ مرگ و میر بالا (۲۰ تا ۳۰ درصد) است. اگرچه پاستوریزاسیون HTST باعث حذف *لیستریا منوسایتوژنز* می‌شود، اما محصول ممکن است در مراحل بعد از فرایند حرارتی دچار آلودگی شود. بنابراین پاستوریزاسیون نمی‌تواند خطر حضور *لیستریامنوسایتوژنز* را در شیر حذف کند. شیوع بیماری لیستریوزیس در فنلاند در سال ۱۹۹۸ تا ۱۹۹۹ نشان می‌دهد که محصولات لبنی تهیه شده از شیر پاستوریزه ممکن‌است در مراحل بعد از تولید آلوده به *لیستریامنوسایتوژنز* شوند (۲، ۳).

نگرانی در خصوص بی‌خطر بودن ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی سبب شده که تقاضای مصرف‌کننده برای تولید مواد غذایی فرآوری شده به طور طبیعی افزایش یابد. از این رو اخیراً تحقیقات در مورد استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاها مورد توجه قرار گرفته است (۴). گیاهان دارویی نظیر آلوئه‌ورا، نعناع فلفلی و بابونه برای هزاران سال در سرتاسر جهان برای اهداف دارویی و درمانی مختلفی مورد استفاده قرارگرفته‌اند. نعناع و بابونه بیشتر برای معطرکردن محصولات لبنی تخمیری استفاده می‌شوند (۵). گیاهان دارویی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی برای انسان و محیط زیست بی‌خطر بوده، لذا می‌توانند به آسانی توسط عموم استفاده گردند (۶، ۷).

با توجه به این که میکروب‌های مختلفی در

[۱۹] Ultra high temperature

فساد مواد غذایی نظیر شیر پاستوریزه نقش دارند، بنابراین کاربرد عصاره‌های گیاهان دارویی به‌عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی علاوه بر میزان فعالیت ضد میکروبی آنها مستلزم تأثیر این عصاره‌ها بر تمامی میکروب‌هایی است که در فسادشان نقش دارند. میزان فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی به فاکتورهای مختلفی نظیر نوع گیاه، نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد (۸). بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکی گیاهان دارویی گشنیز و بولاغ اوتی نشان داد که اگر چه عصاره‌های مذکور در برخی غلظت‌ها هاله عدم رشد بر علیه باکتری‌های گرم مثبت (*لیستریامنوسایتوژنز* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس*) ایجاد کردند اما هیچ کدام از گیاهان مذکور اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های گرم منفی نداشتند (۹).

مطالعه گلشنی و داوودی (۱۳۹۲) حاکی از آن بود که عصاره متانولی رزماری دارای اثر ضد میکروبی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد در حالی که بر *باسیلوس‌سرئوس* بی‌تأثیر است.

شرایط محیطی رشد نیز عامل مهم دیگری است که با تأثیر بر کمیت و کیفیت ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی بر فعالیت میکروبی آنها مؤثر است (۱۱، ۱۲). مقایسه تأثیر محل رویش گیاه گزنه بر محتوای تانن و اسید آسکوربیک نشان داد که میزان ترکیبات مذکور در مناطق مختلف به‌طور بسیار معنی‌داری متفاوت است (۱۳). همچنین مطالعات نشان داده است که به‌طور کلی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان دارویی، فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها دارند که این ممکن است به حضور ترکیبات فنولیک و پلی‌فنولیک در محلول مرتبط باشد (۱۴).

در کشور ما به دلیل آلودگی میکروبی بالای شیر، عمر ماندگاری آن حدود ۳ -۲ روز است، در حالی که در سایر کشورها عمرماندگاری شیر پاستوریزه بیشتر است و از طرفی استفاده از ترکیبات شیمیایی به‌عنوان نگهدارنده در شیر ممنوع می‌باشد. لذا هدف از این تحقیق ابتدا ارزیابی آزمایشگاهی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی سه گیاه دارویی آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعناع فلفلی کشت شده در مزرعه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای شیر پاستوریزه و در مرحله بعد بررسی تأثیرگذاری عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه به‌عنوان نگهدارنده طبیعی بر ماندگاری این محصول پرمصرف بود.

مواد و روش کار

مواد اولیه : باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *باسیلوس سرئوس*(ATCC 11778)، *لیستریا منوسایتوژنز*(ATCC 19115)، *میکروکوکوس لوتئوس* (CIPA 270)، و *اشرشیاکلی* (ATCC 10536) بودند که کشت خالص آنها از کلکسیون میکروبی مؤسسه پژوهش‌های علمی و صنعتی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تهیه شد.

آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی : گیاهان آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعناع فلفلی از مزرعه گیاهان دارویی واقع در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه گردید. برای آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان فوق، ژل تازه گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) و برگ‌های گیاه بابونه آلمانی (*German chamomile*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) ابتدا در سایه تحت خشک کردن اولیه قرار گرفتند و پس از آن در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک گردیدند و سپس پودر شدند. ۲۰ گرم از این پودر در ۲۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های

متانول و اتانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. مایع رویی پس از استخراج به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید و در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای استفاده‌های بعدی عصاره خشک‌شده در آب مقطر حل گردید (۱۵، ۱۶).

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی: به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاهان مورد آزمایش از روش چاهک پلیت[۲۰] استفاده گردید. از تمامی باکتری‌ها در محیط نوترینت براث سوسپانسیون میکروبی تهیه و این سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. سپس سوسپانسیون فوق در محیط نوترینت آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌وسیله لوپ استریل چند کلنی از باکتری‌های رشد یافته به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل شدند، کدورت میکروبی لوله‌ها با اضافه‌کردن سرم فیزیولوژی با کدورت شاهد مک فارلند ۰/۵ (معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ کلنی در میلی‌لیتر) استاندارد شد (۱۷، ۷، ۶، ۱۸).

بعد از تهیه مایه میکروبی، یک سوآپ استریل در لوله حاوی مایه میکروبی فرو برده و در سه جهت روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت شد. سپس به‌وسیله قسمت انتهایی یک پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌لیتر روی محیط کشت ایجاد گردید. محلولی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاهان مورد آزمایش تهیه شد. به منظور حل شدن بهتر عصاره‌ها در آب مقطر استریل از توئین ۸۰ به‌عنوان کمک حلال استفاده شد و محلول تهیه شده به‌وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استریل گردید.

۰/۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده در چاهک‌ها ریخته و پلیت‌های تلقیح شده به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره‌ها به خوبی جذب محیط شوند. نهایتاً پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. در این تحقیق همچنین کلرامفنیکل به‌عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل حاوی ۱۵ درصد توئین جهت اثبات عدم تأثیر ضد میکروبی آب و توئین ۸۰ به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۱۸، ۷، ۶، ۱۹).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC[۲۱])، غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ازعصاره‌های گیاهان مذکور تهیه و فعالیت ضد میکروبی آنها به روش فوق بررسی شد. پائین‌ترین غلظتی که از رشد میکروب‌ها جلوگیری کرده بود به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد (۱۸، ۱۹). کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

آماده‌سازی نمونه‌های شیر حاوی عصاره: به منظور بررسی اثر نگهدارندگی عصاره‌های اتانولی بابونه آلمانی و آلوئه‌ورا بر ماندگاری شیر پاستوریزه، در ابتدا نمونه‌های شیر تحت تیمار حرارتی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه قرار گرفتند. سپس غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ درصد حجمی/حجمی عصاره‌های فوق با استفاده از فیلتر سرنگی استریل شد (اندازه منافذ ۰/۲۲ میکرومتر) و عصاره‌های به دست آمده تحت خلأ برداشت شد. در نهایت عصاره‌های استریل شده به نمونه‌های شیر حرارت دیده اضافه‌گردید. همچنین یک نمونه شیر فاقد عصاره به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد.

[۲۰] Agar-well diffusion

[۲۱] Minimum inhibitory concentration

نمونه‌های شیر حاوی عصاره (۱۰۰ میلی‌لیتر) به بطری‌های پلاستیکی استریل منتقل شد و پس از دربندی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ارزیابی حسی در زمان صفر و تغییرات میکروبی در فواصل زمانی صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بر روی نمونه‌های مذکور طبق روش‌های ذیل انجام شد (۲۰).

ارزیابی حسی: ویژگی‌های حسی نمونه‌های شیر با استفاده از یک گروه ارزیاب ۱۲ نفره آموزش‌دیده مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که آنها به ویژگی‌های مورد بررسی یعنی آروما، رنگ، مزه و قابلیت پذیرش با استفاده از سیستم نمره‌دهی هدونیک ۵ نقطه‌ایی (۵ (عالی)، ۴ (خوب)، ۳ (نه خوب نه بد)، ۲ (بد) و ۱ (بسیار بد)) امتیاز دادند (۲۱).

آنالیز میکروبی نمونه‌های شیر حاوی عصاره: شمارش کلی باکتری[۲۲] نمونه‌های شیر به‌وسیله روش پور تعیین شد. ابتدا، رقت‌های سریالی (۱-۱۰ تا ۶-۱۰) از نمونه‌های شیر آماده شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده به پلیت اضافه گردید سپس محیط کشت نوترینت آگار به پلیت‌ها اضافه و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گرمخانه‌گذاری کلنی‌ها شمارش و نتایج بر اساس لگاریتم تعداد کلنی بر میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۲، ۲۳).

طرح آماری: این آزمایش بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین صفات کمی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت (۲۳).

نتایج

قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهارکنندگی: نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۱) نشان داد که میزان فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی مورد بررسی به‌طور معنی‌داری به نوع گیاه، نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد ($p<0/05$). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین فعالیت ضد میکروبی و کمترین حداقل غلظت مهارکنندگی به عصاره گیاه آلوئه‌ورا تعلق داشت.

قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی آلوئه‌ورا برای باکتری‌های *لیستریامنوسایتوژنز*، *باسیلوس‌سرئوس*، *میکروکوکوس‌لوتئوس*، *سودوموناس‌آئروژینوزا* و *اشرشیاکلی* به ترتیب ۳۴، ۳۰، ۳۰، ۲۵ و ۲۲ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. در صورتی که بیشترین و کمترین اثر ضد میکروبی عصاره متانولی آن به ترتیب بر باکتری باسیلوس سرئوس (۲۴ میلی‌متر) و باکتری‌های *میکروکوکوس‌لوتئوس* و *سودوموناس‌آئروژینوزا* (۲۰میلی‌متر) بود. به عبارت دیگر ترتیب حساسیت باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی بسته به نوع عصاره آلوئه‌ورا متفاوت بود به‌طوری‌که *لیستریامنوسایتوژنز* حساس‌ترین به عصاره اتانولی و *باسیلوس سرئوس* حساس‌ترین به نوع متانولی این گیاه بود.

[۲۲] Total plate count

جدول۱- میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) و حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعناع فلفلی بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای شیر پاستوریزه*

نوع گیاه	عصاره	نوع میکروب									
		لیستریامونوسایتوژنز		*میکروکوکوس‌لوتئوس*		*باسیلوس‌سرئوس*		*اشرشیاکلی*		*سودوموناس‌آئروژینوزا*	
		DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC
آلوئه‌ورا	اتانولی	۳۴^{a}	۱۲/۵	۳۰^{b}	۱۲/۵	۳۰^{b}	۱۲/۵	۲۲^{d}	۱۲/۵	۲۵^{c}	۲۵
	متانولی	۲۲^{b}	۱۲/۵	۲۰^{c}	۲۵	۲۴^{a}	۱۲/۵	۲۲/۵^{ab}	۵۰	۲۰^{c}	۲۵
بابونه‌آلمانی	اتانولی	۱۶ ^{b}	۲۵	۱۴^{c}	۵۰	۱۸^{a}	۱۲/۵	۱۷/۵^{a}	۱۰۰	۱۳^{d}	۱۰۰
	متانولی	۱۶^{a}	۲۵	۸^{b}	۲۵	۱۶^{a}	۱۲/۵	۱۷^{a}	۵۰	۱۶^{a}	۵۰
نعناع‌فلفلی	اتانولی	۰^{c}	۰†	۱۴^{a}	۱۰۰	۹^{b}	۵۰		۵۰	۱۰^{b}	۵۰
	متانولی	۰^{d}	۰†	۱۲/۵ ^{a}	۵۰	۱۳/۵^{a}	۵۰	۱۴/۵^{a} ۱۰^{b}	۵۰	۸^{c}	۱۰۰
کنترل‌مثبت		۵۰		۲۸/۵		۴۰		۳۳/۵		۱۷	
کنترل‌منفی		-		-		-		-		-	

*مقادیر برای هر عصاره گیاهی با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. † فاقد اثر مهارکنندگی

کنترل‌مثبت (کلرامفنیکل ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، کنترل‌منفی (آب مقطر حاوی ۱۵ درصد توئین)

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، میانگین قطر هاله عدم رشد (DGI)

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی آلوئه‌ورا بر باکتری‌های *لیستریامنوسایتوژنز*، *میکروکوکوس‌لوتئوس*، *باسیلوس‌سرئوس*، *اشرشیاکلی* ۱۲/۵ و برای *سودوموناس آئروژینوزا* ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی آن بر باکتری‌های مذکور به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵، ۱۲/۵، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. در واقع همان‌طور که قبلاً اشاره گردید پائین‌ترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی به گیاه آلوئه‌ورا تعلق داشت.

این نتایج با یافته‌های لورنس و همکاران (۲۰۰۹) مشابهت داشت، آنها گزارش کردند که عصاره اتانولی آلوئه‌ورا از فعالیت ضد میکروبی بالاتری در مقایسه با عصاره متانولی برخوردار است، همچنین عصاره متانولی آن در مقایسه با اتانولی اثر ضد میکروبی بیشتری بر اشرشیاکلی دارد. علاوه بر آن آنها قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی و متانولی گیاه آلوئه‌ورا را بر باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۲۳ و ۱۰/۶ میلی‌متر گزارش کردند (۱۵). در تحقیقی دیگر قطر هاله عدم رشد عصاره آبی آلوئه‌ورا بر *سودوموناس آئروژینوزا* ۲۰ میلی‌متر گزارش شده است در حالی که عصاره مذکور هیچ‌گونه تأثیری بر باکتری گرم‌منفی اشرشیاکلی نداشته است (۲۵). Takon و همکاران (۲۰۱۵) عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا کشت شده در نیجریه را بر میکروب‌های مختلف ارزیابی کردند. آنها گزارش نمودند که عصاره مذکور بر *سودوموناس آئروژینوزا* تأثیری ندارد (۲۴). اختلاف بین فعالیت ضد میکروبی آلوئه‌ورا در این تحقیق و مطالعات دیگر می‌تواند به تفاوت میزان ترکیبات بیواکتیو آنها نظیر مانان‌ها[۲۳]، پلی‌مانان[۲۴]،

[۲۳] Mannans

[۲۴] Polymannans

آنتـرون‌هـا[۲۵]، آنتراکوئینـون[۲۶] و لکتـین‌هـا[۲۷] (۲۵) مـرتبط باشـد کـه بـه شـدت متـأثر از نـوع عصـاره و همچنین محیط کشت مـی‌باشد. عصاره اتـانولی بابونـه بیشـترین و کمتـرین اثـر مهارکننـدگی را بـه ترتیـب بـر بـاکتری باسـیلوس سـرئوس (۱۸ میلـی‌متـر) و *سـودوموناس آئروژینـوزا* (۱۳ میلـی‌متـر) نشـان داد در حـالی کـه عصـاره متـانولی آن بیشـترین اثـر مهارکنندگی را بـر بـاکتری *اشرشـیاکلی* (۱۷ میلـی‌متـر) و کمتـرین فعالیـت ضـد میکروبـی را بـر *میکروکـوس‌لوتئـوس* (۸ میلـی‌متـر) داشـت. بـه عبـارت دیگـر *باسـیلوس‌سـرئوس* و *اشرشـیاکلی* حسـاس‌تـرین و *میکروکـوس‌لوتئـوس* و *سـودوموناس‌آئروژینـوزا* مقـاوم‌تـرین بـاکتری‌هـا نسـبت بـه عصـاره‌هـای بابونـه بودند.

نتـایج اتـانولی بابونـه در تحقیـق حاضـر بـا نتـایج معصـومیان و زنـدی (۱۳۹۶) از نظـر ترتیـب فعالیـت ضد میکروبی مشابهت داشت. آنها اثـر هالـه عـدم رشـد عصـاره هیـدروالکلی بابونـه را بـر *اشرشـیاکلی* و *سـودوموناس آئروژینـوزا* بـه ترتیـب ۱۳ و ۱۰ میلـی‌متـر انـدازه‌گیـری کردنـد، اگرچـه عصـاره آبـی بابونـه بـر *سودوموناس* بی‌اثر بـود. گزارشـاتی نیـز مبنـی بـر بـی‌اثـر بـودن بابونـه بـر اشرشـیاکلی منتشـر شـده اسـت (۵). مکانیسم فعالیـت ضـد میکروبـی بابونـه ممکـن اسـت بـه ترکیب بیسـابولول[۲۸] مـرتبط باشـد کـه در غلظـت پـائین بـر میکـروب‌هـایی نظیـر *اسـتافیلوکوکوس‌اورئـوس*، *باسـیلوس سـوبتیلیس* و *سـودوموناس‌آئروژینـوزا* مـؤثر اسـت و همچنـین دی سـایکلواترها[۲۹] کـه فعالیـت باکتریواستاتیکی در غلظـت‌هـای بـالاتر نشـان مـی‌دهنـد (۱۰۰ میلـی‌گـرم بـر میلـی‌لیتـر). ایـن ترکیبـات بـا افـزایش نفوذپـذیری غشـای سـلول باکتریـایی و ممانعـت از فعالیـت آنـزیم‌هـای غشـای سـلولی نقـش ضـد میکروبی دارند (۲۶).

پـائین‌تـرین اثـر ضـد میکروبـی گیاهـان دارویـی مـورد بررسی بـرای نعنـاع فلفلـی انـدازه‌گیـری شـد. عـلاوه بـر این، بـر خـلاف عصـاره‌هـای دو گیـاه قبلـی عصـاره‌هـای گیـاه مـذکور در کلیـه غلظـت‌هـای مـورد اسـتفاده بـر بـاکتری *لیسـتریامنوسـایتوژنز* بـی‌اثـر بودنـد (۰ میلـی‌متـر). ایـن نتـایج بـا نتـایج Bayoub و همکـاران (۲۰۱۰) متفاوت بـود کـه بـرای عصـاره نعنـاع تیمیجا[۳۰] فعالیـت ضـد میکروبـی عـالی در برابـر لیسـتریامنوسـایتوژنز در مقایسـه بـا بابونـه گـزارش کردنـد (۲۶ در برابـر ۱۵ میلـی‌متـر). در مطالعـه‌ای کـه توسـط معصـومیان و زنـدی (۱۳۹۶) انجـام شـد عصـاره هیـدروالکلی نعنـاع بـر *اشرشـیاکلی* و *سـودوموناس‌آئروژینـوزا* بـی‌تـأثیر بـود در حـالی کـه عصـاره آبـی آن بـر *اشرشـیاکلی* و *سـودوموناس‌آئروژینـوزا* بـه ترتیـب هالـه عـدم رشـد ۱۷و ۱۵ میلی‌متری ایجاد نمود.

همان‌طور کـه نتـایج جـدول ۱ نشـان مـی‌دهـد بـالاترین مقـادیر حـداقل غلظـت مهارکننـدگی بـه نعنـاع فلفلـی تعلـق داشـت. بـه عنـوان مثـال ایـن شـاخص بـرای بـاکتری *میکروکوکـوس لوتئـوس* ۱۰۰ و بـرای *باسـیلوس‌سـرئوس*، *اشرشـیاکلی* و *سـودوموناس‌آئروژینـوزا* ۵۰ میلـی‌گـرم در میلـی‌لیتـر انـدازه‌گیـری شـد. ابوحسـین تبـری و همکـاران اثـر ضعیف نعناع را بر بـاکتری‌هـای گـرم‌مثبـت و گـرم‌منفـی گزارش کردند (۲۵).

آنالیز میکروبـی نمونـه‌های شـیر حـاوی عصـاره :

نتـایج آنـالیز میکروبـی (جـدول ۲) نشـان داد کـه بسـته بـه نـوع و غلظـت عصـاره اخـتلاف معنـی‌داری در

[۲۵] Anthrones

[۲۶] Anthraquinones

[۲۷] Lectins

[۲۸] Bisabolol

[۲۹] Dicycloethers

[۳۰] Mint timija

شمارش‌کلی نمونه‌های شیر در طول نگهداری وجود دارد. به‌طوری‌که نمونه‌های شیر تیمار شده با عصاره اتانولی بابونه آلمانی به‌طور معنی‌داری دارای شمارش میکروبی پائین‌تری در مقایسه با نمونه‌های حاوی عصاره آلوئه‌ورا بودند. بجز نمونه شیر حاوی ۰/۱۵ درصد عصاره آلوئه‌ورا، بقیه تیمارهای حاوی عصاره اتانولی گیاهان مورد بررسی دارای شمارش‌کلی کمتری در مقایسه با نمونه شاهد بودند. به عبارت دیگر غلظت ۰/۱۵ درصد عصاره آلوئه‌ورا نه تنها قادر به کاهش شمارش‌کلی میکروب نبود بلکه میزان آن را در مقایسه با نمونه شاهد افزایش داد.

نتایج هاله عدم رشد نشان داد (جدول ۱) که عصاره اتانولی آلوئه‌ورا فعالیت ضد میکروبی قوی بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *لیستریامنوسایتوژنز*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیاکلی* موجود در شیر پاستوریزه دارد. از این رو افزایش شمارش‌کلی نمونه‌های تیمار شده با عصاره اتانولی ۰/۱۵ درصد آلوئه‌ورا در مقایسه با نمونه کنترل در تمامی طول زمان نگهداری ممکن‌است مربوط به تحریک رشد تعدادی از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر حرارت دیده به‌وسیله این عصاره باشد.

جدول ۲- تغییرات در شمارش‌کلی نمونه‌های شیر حرارت دیده حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ساعت

نوع گیاه	غلظت عصاره (درصد)	زمان (ساعت)					
		صفر	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
آلوئه‌ورا	۰/۱۵	۲/۴۸^{Ca}±۰/۱	۵/۶۴$^{C a}$±۰/۲	۶/۴۳^{ABa}±۰/۳	۶/۷۳^{Aa}±۰/۴	۶/۰۲^{BCa}±۰/۲	۵/۸۱^{BCa}±۰/۲
	۰/۳	۲/۵۴^{Ca}±۰/۱	۳/۸۵^{Bb}±۰/۲	۴/۷^{ABc}±۰/۴	۴/۹۱^{Ac}±۰/۴	۴/۴۸^{ABc}±۰/۲	۴/۸۰^{Ab}±۰/۲
	۰/۶	۲/۷۴$^{C a}$±۰/۳	۳/۵۴^{Bbc}±۰/۱	۴/۴۸^{Ac}±۰/۱	۴/۸۹^{Ac}±۰/۱	۴/۷۸^{Ac}±۰/۱	۴/۴۰^{Ab}±۰/۲
بابونه‌آلمانی	۰/۱۵	۲/۵۴^{Ca}±۰/۰۱	۳/۰۰^{Bcd}±۰	۳/۵۴^{Ad}±۰/۰۵	۲/۹۵^{Bd}±۰/۰۷	۰/۹۵^{Dd}±۰	۰/۹۵^{Dc}±۰
	۰/۳	۲/۴۸^{Ba}±۰/۰۵	۲/۹۵^{Acd}±۰/۰۷	۲/۹۵^{Ad}±۰	۲/۰۰^{Ce}±۰/۳	۰/۹۵^{Dd}±۰	۰/۹۵^{Dc}±۰
	۰/۶	۲/۳۰^{Aa} ±۰/۱	۲/۵۴^{Ad} ±۰/۲	۲^{ABe}±۰/۲	۱/۴۸^{BCe}±۰/۴	۰/۹۵^{Cd}±۰	۰/۹۵^{Cc}±۰
کنترل	٪۰	۲/۴۸^{Ca}±۰/۴	۳/۹۰^{Bb}±۰/۱	۵/۶۰^{Ab} ±۰/۲	۶/۰۰^{Ab}±۰/۳	۵/۴۰^{Ab}±۰/۱	۵/۴۸^{Aa}±۰.۱

اعداد با حروف انگلیسی بزرگ مشابه در هر سطر و حروف انگلیسی مشابه کوچک در هر ستون اختلاف معنی‌داری با هم ندارند

تحقیقات نشان داده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبتاً به اثرات سمی ادویه‌جات و مشتقات آنها مقاومند و برخی از این ادویه‌ها اثرات تحریک‌کنندگی بر این دسته از میکروارگانیسم‌ها اعمال می‌کنند (۲۹، ۲۸، ۲۳، ۲۷).

اثر نگهداری بر تعداد باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست پروبیوتیک غنی‌شده با آلوئه‌ورا در ابتدا با افزایش در تعداد دو باکتری فوق‌الذکر و در ادامه با کاهش ناچیزی همراه بوده است (۱۷).

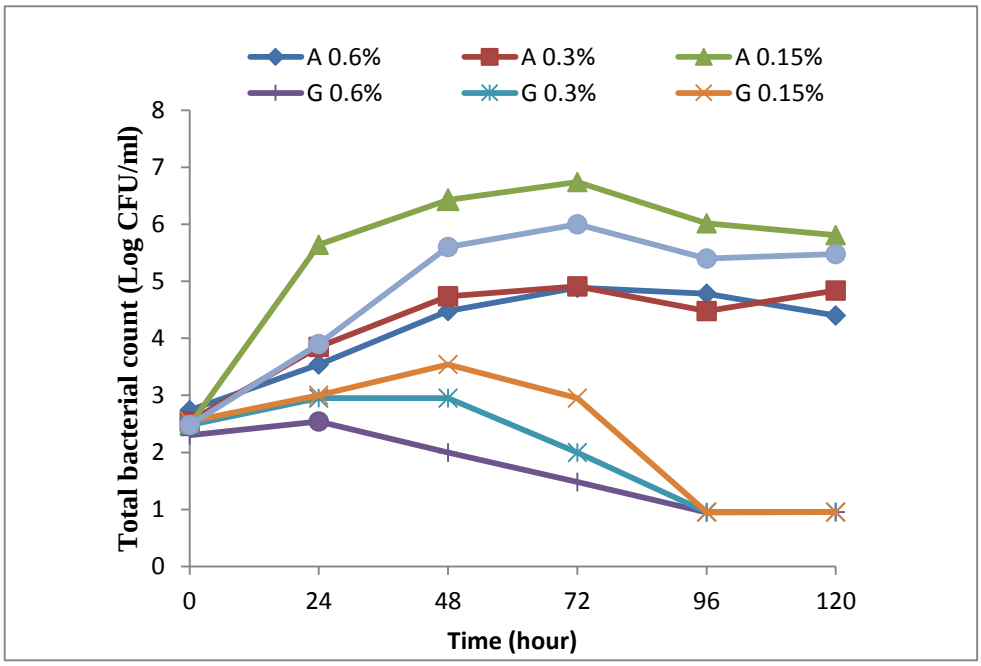
با افزایش غلظت عصاره اتانولی آلوئه‌ورا کاهش معنی‌داری در شمارش میکروبی مشاهده شد به‌طوری‌که نمونه‌های شیر حاوی ۰/۳ و ۰/۶ درصد آلوئه‌ورا، دارای شمارش‌کلی پائین‌تری در مقایسه با نمونه شاهد بودند.

بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ترکیبات فعال عصاره اتانولی آلوئه‌ورا در غلظت پائین (۰/۱۵درصد) رشد برخی از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری‌های اسیدلاکتیک را تحریک می‌کند که به افزایش در شمارش‌کلی نمونه‌های تیمار شده منجر

شده است در صورتی که با افزایش غلظت عصاره مذکور اثر ضد میکروبی آن بر میکروب‌های شیر بیشتر شده است. به‌طوری‌که نمونه‌های شیر حاوی ۰/۶ درصد عصاره آلوئه‌ورا دارای کمترین شمارش میکروبی بودند.

کوسنیاتی و یانتیاتی (۲۰۰۸) گزارش کردند که یک دلیل کاهش در شمارش کلی نمونه‌های شیر حاوی ۰/۳ و ۰/۶ درصد عصاره می‌تواند به کاهش تولید باکتری‌های سایکروتروف نسبت داده شود.

نتایج آنالیز میکروبی (جدول۲) همچنین نشان داد که اگرچه کمترین مقدار شمارش‌کلی (تا زمان ۷۲ ساعت) به نمونه‌های شیر حاوی ۰/۶ درصد بابونه تعلق داشت اما به‌طور کلی بر خلاف نمونه‌های شیر حاوی آلوئه‌ورا اختلاف معنی‌داری در شمارش‌کلی بین نمونه‌های شیر حاوی غلظت‌های مختلف عصاره بابونه وجود نداشت. این نتایج نشان می‌دهد که ماده مؤثره عصاره اتانولی بابونه در غلظت پائین قادر به تأثیرگذاری بر طیف وسیعی از میکروب‌هایی است که در شیر وجود دارد.



شکل ۱- تغییرات شمارش‌کلی نمونه‌های شیر پاستوریزه حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد و ۱۲۰ ساعت انبارداری (A, *Aloe vera* –G, *German chamomile*)

علاوه بر این منحنی روند تغییرات شمارش‌کلی و همچنین زمان تأثیرگذاری عصاره اتانولی گیاهان مورد بررسی نیز با هم متفاوت بود به‌طوری‌که منحنی‌های شمارش‌کلی نمونه‌های شیر حاوی عصاره آلوئه‌ورا صعودی بودند و همچنین این افزایش در کلیه غلظت‌های عصاره آلوئه‌ورا تا زمان ۴۸ ساعت معنی‌دار و بعد از این زمان غیر معنی‌دار بود در حالی که به‌طور کلی منحنی‌های شمارش‌کلی تیمارهای حاوی عصاره اتانولی بابونه آلمانی از شیب کاهشی ملایمی برخوردار بودند و از زمان ۹۶ ساعت به بعد تعداد میکروب‌های آنها غیر قابل شمارش بود (شکل۱).

نتایج مشابهی از آنالیز میکروبی نمونه‌های پنیر نرم وارا تیمار شده با عصاره کارسیا پاپایا و ترمینالیا

کاتاپا که تحت خلا در دمای ۱۵ درجه‌سانتی‌گراد بسته‌بندی شده بودند، پس از ۳ هفته انبارداری گزارش شده‌است (۳۱).

ارزیابی حسی: همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد، نمونه‌های شیر حاوی عصاره‌های اتانولی گیاهان آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی از امتیاز حسی کمتری در مقایسه با نمونه شاهد برخوردار بودند. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره مورد بررسی میزان رضایتمندی ارزیاب‌ها از ویژگی‌های حسی نمونه‌های حاوی عصاره کاهش یافته است به‌طوری‌که نمونه‌های شیر حاوی ۰/۶ درصد از عصاره اتانولی هر دو گیاه دارای مزه تلخ، رنگ تیره و بوی نامطلوب بودند و ارزیاب‌ها آنها را با امتیاز کمتر از ۳ به‌عنوان نمونه‌های غیر قابل قبول معرفی نمودند. با کاهش غلظت عصاره بهبودی معنی‌داری در ویژگی‌های حسی نمونه‌های شیر حاوی عصاره هر دو گیاه مشاهده گردید به‌طوری‌که ارزیاب‌ها، نمونه‌های حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد عصاره را از نظر ویژگی‌های حسی مورد بررسی قابل قبول ارزیابی نمودند.

جدول۳- نتایج آزمون حسی نمونه‌های شیر تیمار شده با عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی در زمان صفر انبارداری

نوع گیاه	غلظت عصاره	ویژگی‌های حسی			
		مزه	بو	رنگ	پذیرش کلی
آلوئه‌ورا	۰/۱۵	۳/۳b	۳/۶b	۳/۴b	۴ab
	۰/۳	۳/۱۶b	۳/۲b	۳/۲b	۳/۶۶b
	۰/۶	۳b (غ.ق.ق)	۲/۸ c (غ.ق.ق)	۲/۶c (غ.ق.ق)	۲/۸c (غ.ق.ق)
بابونه‌آلمانی	۰/۱۵	۳/۶b	۳/۵b	۳/۴b	۴ab
	۰/۳	۳/۲b	۳/۵b	۳/۴b	۳/۵b
	۰/۶	۲/۴c (غ.ق.ق)	۲/۸c (غ.ق.ق)	۲/۳c (غ.ق.ق)	۳c (غ.ق.ق)
کنترل	۰	۴/۶۶a	۴/۸۳a	۴/۵a	۴/۸۳a

اعداد با حروف مشابه انگلیسی برای هر ویژگی حسی مربوط به هر یک از عصاره‌ها گیاهی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بحث و نتیجه‌گیری

در پایان نتایج این تحقیق نشان داد که دو عصاره آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی فعالیت ضد میکروبی بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل میکروب‌هایی که عامل فساد در شیر هستند و از نظر اقتصادی و تکنولوژیکی اهمیت دارند مثل *باسیلوس‌سرئوس*، *میکروکوس‌لوتئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* و موارد بیماری‌زا نظیر *لیستریامنوسایتوژنز* و *اشرشیاکلی* دارند.

بر اساس نتایج حاصل عصاره اتانولی بابونه آلمانی به‌عنوان یک ترکیب طبیعی به‌دست‌آمده از گیاهان دارویی، پتانسیل خوبی برای استفاده به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی دارد. بر پایه ارزیابی حسی و شمارش‌کلی صورت گرفته در این تحقیق تیمار شیر پاستوریزه با عصاره اتانولی بابونه آلمانی (۰/۳ و ۰/۱۵ درصد) و آلوئه‌ورا (۰/۳ درصد) در کنار خصوصیات مفید به عنوان غذای عملگرا سبب کاهش بسیار معنی‌داری در جمعیت میکروبی، افزایش زمان ماندگاری با طعم قابل قبول در شیر پاستوریزه خواهد شد. بنابراین استفاده از عصاره‌های گیاهان مذکور به‌عنوان نگهدارنده در شیر پاستوریزه پیشنهاد می‌گردد.

References

1- Torkar, K. G., & Teger, S. G. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta agriculturae Slovenica*, 2008; 92(1): 61-74.

2- Valik, L., Goerner, F., & Laukova, D. Growth dynamics of Bacillus cereus and shelf-life of pasteurised milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 2003-UZPI (Czech Republic).

3- Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science*,2004; 87: E6-E12.

4- Owen, R. J., & Palombo, E. A. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, Eremophila alternifolia and Eremophila duttonii, in food homogenates and milk. *Food Control*, 2007; 18(5): 387-390.

5- Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., Retmane, A & ,.Soukri, A. (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against Listeria monocytogenes and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*, 2010; 9(27): 4251-4258.

6- Ehsan, B., Vital, A., & Bipinraj, N. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of Bryonopsis laciniosa leaf, stem, fruit and seed. *African Journal of Biotechnology*, 2009; 8(15).

7- Ertürk, Ö. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 2006; 61(3): 275-278.

8- Mahesh, B., Satish, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World Journal of Agricultural Sciences, 2008; 4: 839-843.

9- Farshbaf Derhami, S., Ghiami Rad, M., Mahmoudi, R., Asadi Nadari, M. R. Comparative studies of antibacterial activity of extracts nasturtium officinale and coriandrum sativum against some of pathogenic bacteria. Journal of Veterinary Microbiology, 2017; 13(2): 47-55. [In Persian]

10- Golshani, Z., Dawoodi, V. In vitro study of antimicrobial effects of Rosmarinus officinalis leaf extract against some pathogens. Arak Medical University Journal, 2013; 16(77): 82-89. [In Persian]

11- Ağaoğlu, S., Dostbil, N., & Alemdar, S. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2007; 51: 53-57.

12- Ashrafpour, M., Rezaei, h., sefidgar, a., Baradaran, M., & Sharifi, H. Survey of the Antibacterial Properties of Aqueous Ethanolic and Methanolic Extraction of Artemisia Annua Around the City of Babol. *journal of ilam university of medical sciences*, 2016; 23(6): 129-141.

13- Mirzaee, M., Aghdasi, M., Mianabadi, M., Khalfi, M. Survey the amount of tannins and ascorbic acid of differnt organs of the nettle plant (Urtica dioica L) in Golestan province. National Conference on Medicinal Plants.Tehran, 2012; 319-323.

14- Igbinosa, O., Igbinosa, E., & Aiyegoro, O. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from Jatropha curcas (Linn). *African journal of pharmacy and pharmacology*, 2009; 3(2): 058-062.

15- Lawrence, R., Tripathi, P., & Jeyakumar, E. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from Aloe vera. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009; 40(4): 906-915.

16- Olaleye, M., & Bello-Michael, C. Comparative antimicrobial activities of Aloe vera gel and leaf. *African Journal of Biotechnology*, 2005; 4(12).

17- Alemdar, S., & Agaoglu, S. Investigation of in vitro antimicrobial activity of aloe vera juice. *Journal of animal and veterinary advances*, 2009; 8(1): 99-102.

18- Dildar, A., Muhammad, M., Abdul, H., Muhammad, B., & Nazia, B. Antibacterial activity of Ballota limbata against potential multidrug resistant human pathogens (running head: antibacterial activity of B. limbata against potential Mdr pathogens). *Journal of Applied Sciences Research*(October), 2009; 1611-1614.

19- Komeilizadeh, H., Hakemi vala, M., Kamalinejad, M., & Neshat ashofteh, S. Study of Antimicrobial Effects of Organic and Aqueous Extracts of Grains of Triticum sativum Lam. on Gram – positive and Gram-negative Bacteria. *Journal of Medicinal Plants*, 2008; 7(28): 105-111. [In Persian]

20- Adesokan, I., Abiola, O., & Ogundiya, M. Influence of ginger on sensory properties and shelf-life of ogi, a Nigerian traditional fermented food. *African Journal of Biotechnology, 2010; 9*(12).

21- Krumov, K., Ivanov, G., Slavchev, A., & Nenov, N. Improving the processed cheese quality by the addition of natural spice extracts. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2010; 2(6): 335-339.

22- Abid, H., Ali, J., Waqas, M., Anwar, Y., &

Ullah, J. Microbial quality assessment study of branded and unbranded milk sold in Peshawar City, Pakistan. *Pakistan J Nut*, 2009; 8(5): 704-709.

23- Khusniati, T., & Yantyati ,W. Antibacterial Effects of Aromatic Materials Produced in Indonesia on the Preservation of Skimmed and Whole Milk in Storage, 2008.

24- Takon, I. A., Ekei Victor, I., Ochegbe, O. Comparative study of the antimicrobial properties of Aloe Vera juice and gel (leaf) extracts against selected clinical isolates. International Journal of Technical Research and Applications, 2015; 3(6): 108-111.

25- Masoumian, M., & Zandi, M. (2017). Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*, 2017; 1(11) ,9e10080. doi: 10.5812/zjrms.10080

26- Alkuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Albuhadilly, A. K., & Alwindy, S. In vitro assessment of the antibacterial activity of Matricaria chamomile alcoholic extract against pathogenic bacterial strains. *Microbiology Research Journal International*, 2015; 55-61.

27- Belewu, M., Belewu, K., & Nkwunonwo, C. Effect of biological and chemical preservatives on the shelf life of West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology*, 2005; 4(10).

28- Masibo, M., & He, Q. (2009). In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of Mangifera indica L. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2009; 5(2): 73-80.

29- Mocanu, G. D., Botez, E., Nistor, O. V., & Andronoiu, D. G. Characterization of probiotic yoghurt obtained with medicinal plant extracts and modelling of bacteria cell growth during its production. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2011; 17: 65-71 .

30- Souza, E. L. d., Stamford, T. L. M., Lima, E. d. O., Trajano, V. N., & Barbosa Filho, J. M. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2005; 48(4): 549-558.

31- Adetunji, V. O. Comparative assessment of the effect of crude extracts of Carica papaya and Terminalia cattapa, and a bacteriocin on vacuum-packed West African soft cheese (wara). *African Journal of Microbiology Research, 2008; 2*(10): 272-276.

Survey of antibacterial activity of alcoholic extracts of *Aloe vera*, *German chamomile* and *Mentha piperita L* as natural preservative of pasteurized milk

Seyed mohammad Ahmadi[1*], Somayeh niknia[1], Mohammad amin Miri[1], Tayebeh Hadadi[2]

1- Assistant Professor, Department of food science and Technology, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Instructor, Department of food science and Technology, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: July 10, 2020; Revise: August 15, 2020; Accept: September 20, 2020

Summary

Recently, studies have been conducted to use plant compounds as natural preservatives in foods. So, the objective of this study was first to evaluate antimicrobial activity of ethanolic and methanolic extracts of *Aloe vera*, *German chamomile* and *Mentha piperita L* cultivated in Medicinal plants farm of agricultural research institute of Zabol university, against spoilage and pathogenic microorganisms associated with pasteurized milk including *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Micrococcus luteus, listeria monocytogenes* and *Escherichia* coli and the next stage was to investigate the impact of ethanolic extracts of aloe vera and *German chamomile* on the shelf life of pasteurized milk. The results indicated that *Aloe vera* had the most antimicrobial activity followed by *German chamomile* and *Mentha piperita L*, respectively ($P<0.05$). In general, the ethanolic extract of studied plants was found to possess more powerful antibacterial activity than methanolic one ($P<0.05$). Ethanolic extracts of *Aloe vera* and *German chamomile* were evaluated as natural preservatives at concentrations of 0.15, 0.3 and 0.6 (% v/v). The results revealed that the treatments of pasteurized milk with 0.3% and 0.15% of *German chamomile* and also *Aloe vera* with a concentration of 0.3% with acceptable sensory properties had a significantly lower total microbial count and longer shelf life compared to the control sample. Therefore, this study confirmed the possibility of using the extract of mentioned plants as a preservative in pasteurized milk besides its beneficial properties of a functional food.

***Key words**: Antibacterial activity, Aloe vera, German chamomile, Ethanolic extract, Pasteurized milk*

تعیین میزان شیوع *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در جنین‌های سقط شده مادیان به روش مولکولی

نصیر رفعتی*[۱]، محسن جعفریان[۲]

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- استادیار بخش کلینیکال‌پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۳۰ مرداد ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

سقط جنین در دام‌های اهلی همواره به‌عنوان یکی از معضلات صنعت دامپروری در تمام نقاط جهان مطرح بوده که عوامل مسبب آن متعدد و متنوع است. *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* یک کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی است که یکی از علل مهم سقط و از دست دادن کره در هنگام آبستنی، در مادیان به حساب می‌آید. هدف از این مطالعه بررسی حضور ژنوم این باکتری در تعدادی از جنین‌های سقطی مادیان در استان‌های غربی کشور بود. برای این منظور ۱۲۵ نمونه محتویات آسپیره شده معده‌های سقط شده با روش PCR برای شناسایی ژن sodA آزمایش شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ۲۳ (۱۸/۴ درصد) مورد از ۱۲۵ نمونه جنین سقط شده با *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* آلوده بودند. یافته‌های مطالعه حاضر نشان‌دهنده حضور بالایی از عفونت استرپتوکوکوزیس بوده و نشان می‌دهد که این باکتری یکی از علل مهم سقط جنین در مادیان بوده و برنامه‌های کنترلی برای کاهش ضررهای اقتصادی این باکتری در ایران ضروری است. در این مطالعه برای اولین بار یک باکتری در محتویات معده جنین‌های سقط شده مادیان به‌عنوان یکی از علل اصلی سقط جنین در ایران تشخیص داده شد.

کلمات کلیدی: *مادیان، سقط جنین، استرپتوکوکوس اکوئی تحت‌گونه زواپیدمیکوس، PCR*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: nasir.rafati@gmail.com

مقدمه

سقط جنین در دام‌های اهلی همواره به‌عنوان یکی از معضلات صنعت دامپروری در تمام نقاط جهان مطرح، که عوامل مسبب آن متعدد و متنوع است. عوامل متعددی وجود دارد که منجر به سقط جنین در مادیان شده، که می‌توان به علل عفونی و غیر عفونی اشاره کرد. اختلالات مربوط به بند ناف، اختلالات جفت، دوقلوزایی، ناهنجاری‌های مادرزادی، استرس و تروما (عوامل مکانیکی) نمونه‌هایی از علل غیر عفونی هستند. از علل عفونی می‌توان به عفونت‌های باکتریایی مانند *E. coli*، *Streptococcus spp*، *Leptospira spp* و *Klebsiella spp* و *Pseudomonas spp*، عفونت‌های قارچی مانند *Candida spp* و *Aspergillus spp* و عفونت‌های ویروسی مانند *EHV-1* و *EVA* اشاره کرد. بسیاری از ارگانیسم‌های دیگری نیز وجود دارند که می‌توانند جفت یا جنین را آلوده کرده و منجر به سقط جنین شوند. عفونت‌های باکتریایی از طریق درگیری جفت می‌توانند موجب سقط گردند. در عفونت‌های باکتریایی جفت اغلب ضخیم و پوشیده از اگزودا است. باکتری‌هایی که سبب آندومتریت می‌شوند توانایی ایجاد تورم جفت (Placentitis) را نیز دارند. باکتری‌ها با ورود به مایع آمنیوتیک به سرعت رشد کرده و جنین با بلع این مایع و ورود باکتری دچار سپتی‌سمی و آلودگی می‌گردد (۲، ۵، ۱۴، ۱۷). یکی از مهم‌ترین عوامل باکتریایی مولد سقط در مادیان می‌توان به جنس *استرپتوکوکوس* اشاره کرد. این جنس متشکل از گونه‌های متنوعی از کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی است که رشد آنها در محیط مایع، آرایش زنجیری شکل دارد. استرپتوکوک‌ها از تخمیر هیدروکربن‌ها به میزان زیادی اسیدلاکتیک تولید می‌کنند، هموفرمانتر و بی‌هوازی اختیاری، فاقد هاگ و غیر متحرک هستند. *استرپتوکوکوس* اولین بار توسط Rosenbach از ضایعات چرکی در انسان جدا گردید و به این نام شناخته شد. اولین گروه‌بندی سرولوژیکی به‌وسیله Lansfid در سال ۱۹۳۳ در تفریق سویه‌های بیماری‌زای واجد همولیز بتا انجام گرفت. با توجه به این تقسیم‌بندی مهم‌ترین گونه‌هایی که از این جنس منجر به سقط در مادیان بوده در گروه C لانسفید قرار دارند که شامل گونه *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *اکوئی* و *زواپیدمیکوس* است. زئونوز بودن این گروه از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت است. جایگاه طبیعی *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس*، مهبل و پوست است و عامل ورم پستان، تورم رحم، سقط جنین، پنومونی ثانویه، عفونت‌های ناف، پایومترا و عقیمی در اسب است. انتقال بیماری در بین اسبان بیشتر از طریق تماس جنسی صورت می‌گیرد. این باکتری در سایر گونه‌های دامی نیز سبب ایجاد بیماری می‌گردد. در جوجه‌ها سپتی‌سمی، در بره‌ها عفونت‌های دستگاه تنفسی و در گاو و بز ورم پستان شدید ایجاد می‌کند (۱، ۹، ۱۸). از آنجائی که سقط جنین می‌تواند زیان‌های اقتصادی فراوانی به صنعت اسب‌داری وارد سازد، لذا شناسایی عوامل مولد سقط جنین در دام‌ها و به‌خصوص در مادیان و به‌کارگیری روش‌های لازم برای پیشگیری و کنترل آن از اهمیت به سزائی برخوردار است. روش‌های متعددی برای تشخیص عفونت جنین وجود دارد اما در این میان، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک روش اختصاصی و با حساسیت بالا برای تشخیص محسوب می‌گردد (۱۱، ۱۳). در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط Kocabiyik و همکاران در سال ۲۰۰۵، شیوع سقط جنین ناشی از *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در مادیان درکشور ترکیه گزارش شد (۱۲). هدف از انجام این مطالعه شناسایی ژنوم *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در جنین‌های سقط

شده به روش PCR به منظور شناسایی یکی از علل عمده‌ی سقط جنین در مادیان برای پیشگیری و کاهش اثرات اقتصادی این عفونت باکتریایی است.

مواد و روش‌ها

از زمستان ۱۳۹۵ تا پاییز ۱۳۹۹، ۱۲۵ عدد محتوای معده از جنین‌های سقط شده از مادیان در استان‌های غربی کشور (جدول ۱) جمع‌آوری شد. نمونه‌های اخذ شده از نژادهای مختلف مادیان بوده و از سقط جنین در تمام مراحل آبستنی گرفته شد. پس از ارجاع جنین‌های سقط شده به آزمایشگاه، ناحیه‌ی بطنی باز و به روش آسپتیک محتویات معده آسپیره و به میکروتیوب استریل منتقل گردید. تمام نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام فرایند آزمایش نگهداری شدند.

جدول ۱- استان‌های اخذ نمونه در غرب کشور

نام استان	کردستان	همدان	کرمانشاه	لرستان	ایلام	چهارمحال و بختیاری	خوزستان	کهگیلویه و بویر احمد	جمع
تعداد نمونه	۱۵	۱۳	۲۰	۲۰	۱۴	۱۶	۱۷	۱۰	۱۲۵
تعداد نمونه مثبت	۳	۲	۴	۵	۲	۳	۴	---	۲۳ (۱۸/۴)

به منظور استخراج DNA پس از لیز سلول‌ها با پروتئیناز K، DNA با روش فنل / کلروفرم / ایزو آمیل الکل ، استخراج گردید که به‌طور خلاصه به شرح زیر است : ۱- برای لیز سلولی، ۱میلی‌لیتر محتویات معده به میکروتیوب ۱/۵میلی‌لیتر منتقل و سپس به مدت ۷ دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی بعدی مایع رویی را دور ریخته سپس به رسوب میزان ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (SDS +Tris-HCl + EDTA) اضافه گردید. سپس ۳ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه کرده و در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. ۲- به نمونه‌ی لیز شده، میزان ۲۵۰-۲۰۰ میکرولیتر فنل اشباع شده اضافه و سپس ۲۵۰-۲۰۰ میکرولیتر محلول (۱به۲۴) کلروفرم - ایزوآمیل الکل اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در محیط تکان داده شد و سپس در دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید.۳- فاز بالایی که شفاف است برداشت شد و به ویال ۱/۵ میلی‌لیتر جدید انتقال داده شد. سپس هم حجم، الکل مطلق اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از آن در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. ۴- در این مرحله باید مقدار بسیار کمی رسوب دیده شود. فاز رویی (الکل) را دور ریخته و مجدداً به رسوب ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد اضافه کرده، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. ۵- الکل ۷۰ درصد رویی را دور ریخته و کمی درب ویال‌ها را باز نگه داشته تا خشک شود. ۶- رسوب را در۴۰-۳۰ میکرولیتر آب تزریقی حل کرده و در ۲۰- درجه نگهداری شد (۱۵).

برای تکثیر از پرایمرهای الیگونوکلئوتید با توالی جدول شماره ۲ شرح داده شده توسط Alberاستفاده شد (۳). انجام واکنش PCR از دستگاه Mastercycler Gradient (ساخت شرکت Ependorf، آلمان) استفاده شد و واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲۰ نانوگرم DNA الگو ، ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر ، ۱واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Taq و ۲۰۰ میکرومولار dNTPS Mix انجام گرفت. در هر واکنش از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی و برای کنترل مثبت از نمونه‌ی کلینیکی که در همین آزمایش با روش PCR مثبت ارزیابی شد، پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی، ۱۰۰ درصد با توالی مربوط به ژن sodA *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* مشابهت داشت استفاده شد. شرایط دمایی برای تکثیر ژن شامل یک سیکل حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه ، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز و از ژل حاصله تصویربرداری و ثبت گردید. DNA ladder ۱۰۰ جفت باز (ساخت شرکت Fermentaz آلمان) برای تعیین طول قطعه تکثیر شده به‌عنوان یک مارکر وزن مولکولی مورد استفاده شد.

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه برای شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس*

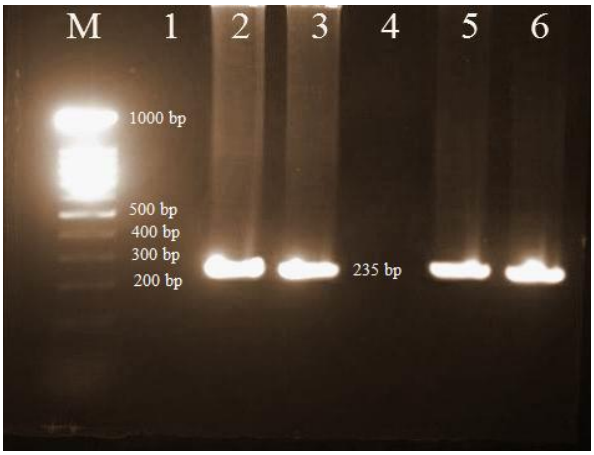
توالی پرایمر	وزن مولکولی محصول PCR (bp)	هدف (ژن)
F: 5'-CAGCATTCCTGCTGACATTCGTCAGG 3' R: 5'-CTGACCAGCATTATTCACAACCAGCC 3'	۲۳۵	sodA

نتایج

تعداد ۱۲۵ نمونه مایع معده اخذ شده از جنین‌های سقط شده مادیان به منظور ارزیابی آلودگی به *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* با هدف ردیابی ژن sodA در نمونه‌ها به روش PCR بررسی شدند که از این تعداد، ۲۳ نمونه (۱۸/۴ درصد) واجد قطعه ژنی مربوطه بودند. ژل حاصل از الکتروفورز ژن sodA *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در شکل ۱ نشان داده شده است که نمونه‌های مثبت واجد قطعه ۲۳۵ جفت بازی در آزمایش PCR هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

خروج کره اسب قبل از زمان طبیعی وقوع زایمان و در هر مرحله از آبستنی، سقط جنین نامیده شده، که می‌تواند زیان‌های اقتصادی فراوانی به صنعت اسب‌داری وارد سازد. اغلب سقط جنین‌ها در سه ماهه اول آبستنی رخ می‌دهد که در واقع ۱۰۰روز پس از جفت‌گیری با نریان کششی است. مادیانی که سقط جنین می‌کند مایعات آلانتوئیک و آمنیوتیک را به همراه جفت به خارج از بدن می‌فرستد. اگر سقط جنین با عفونت همراه باشد در آن صورت جنین، مایع و پرده‌های اطراف آن و نیز جفت آلوده خواهد بود. از همین رو شناسائی عوامل مولد سقط جنین در دام‌ها و به‌خصوص در مادیان و به‌کارگیری روش‌های لازم برای پیشگیری و کنترل آن اهمیت فراوانی دارد (۴، ۷، ۱۶).



شکل۱- الکتروفورز ژل آگارز برای تشخیص عفونت *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در نمونه‌های جنین سقط شده. خط M، ladder(۱۰۰ جفت باز، ساخت شرکت Fermentaz آلمان)، خط ۱ کنترل منفی، خط۲ کنترل مثبت ،خط‌های ۳، ۵ ،۶ نمونه‌های مثبت و خط ۴ نمونه‌ی منفی را نشان می دهد.

اگر چه روش‌های کشت متداول، همیشه برای جداسازی و مشخص کردن سویه‌های باکتری ارزشمند است اما تکنیک‌های تشخیصی مولکولی می‌توانند مزایای قابل توجهی را از لحاظ سرعت، اختصاصی بودن و حساسیت بالا نسبت به این روش‌ها داشته باشند. علاوه بر این، مزیت تکنیک‌های مولکولی محدود به تشخیص عوامل بیماری‌زا نبوده و می‌توان برای تمایز بین گونه‌های نزدیک ارگانیسم‌ها و شناخت عوامل ویروسی استفاده شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یکی از تکنیک‌های تشخیصی مولکولی بوده که یک روش اختصاصی و با حساسیت بالا برای تشخیص عوامل عفونی به حساب می‌آید (۶). مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه، مبنی بر شناسایی ژنوم *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در جنین‌های سقط شده مادیان برای شناسایی یکی از علل مهم سقط جنین در مادیان در ایران است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۲۳ (۱۸/۴درصد) مورد از ۱۲۵ نمونه جنین سقط شده در مادیان آلوده به *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* بوده‌اند. این آمار نشان دهنده‌ی میزان بالای سقط جنین ناشی از این باکتری در بین نمونه‌های بررسی شده است که با توجه به سیستم پرورشی اسب در اسب‌داری‌ها، این باکتری می‌تواند در محیط رشد و تکثیر پیدا کرده و به سرعت بین اسب‌ها منتقل گردد و خطری بالقوه برای تمام مادیان‌های اسب‌داری ایجاد گردد. مطالعات انجام شده در مورد عفونت *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در جنین‌های سقط شده نشان‌دهنده ارتباط این عفونت باکتریایی با سقط جنین و کاهش میزان باروری در مادیان بوده است. در مطالعه صورت گرفته توسط Kocabiyik و همکاران در سال ۲۰۰۵، شیوع سقط جنین ناشی از *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در مادیان درکشور ترکیه گزارش شد (۱۲). امروزه تست PCR به‌عنوان آزمایش بسیار حساس و اختصاصی برای تشخیص عوامل پاتوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد با این حال، تست PCR در ایران به طور روتین و گسترده برای تشخیص عوامل سقط جنین در مادیان استفاده نشده است. در این مطالعه، ما یک تست سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در محتوای معده جنین‌های سقط شده در مادیان از روش PCR توصیف کرده‌ایم. روش PCR در دیگر مطالعات

تحقیقاتی برای تشخیص *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در اسب، نیز مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که Javed و همکاران در جامو در سال ۲۰۱۶ برروی ۹۶ راس تک‌سمی به روش PCR انجام دادند، باکتری *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* در ۱۲ مورد جدا شد (۱۰). که با توجه به تعداد نمونه مورد آزمایش، با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. اهمیت این مطالعه آن است که برای اولین بار یک باکتری در محتویات معده مادیان به‌عنوان یکی از علل اصلی سقط جنین در ایران تشخیص داده شد. این مطالعه توصیه می‌کند که روش PCR به‌عنوان یک روش معمول برای تشخیص عفونت استرپتوکوکوزیس در اسب استفاده گردد. مزیت اصلی این تست نبود موارد مثبت کاذب و نیز غیر حساس به سایر باکتری‌ها است. این آزمایش برای بررسی اپیدمیولوژیک سقط جنین در مادیان در ایران سودمند است. علاوه بر این، یافته‌های این مطالعه نشان داد که حضور بالایی از عفونت *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت‌گونه *زواپیدمیکوس* علت مهم سقط جنین و از دست رفتن سرمایه اقتصادی اسب در ایران است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از رؤسا و کارشناسان ادارات کل و شبکه‌های دامپزشکی استان‌های اخذ نمونه و همچنین آقایان علی صارمی، نیما خالدی، اکبر زاهدی و رضا طالبی و خانم‌ها بهاره ستوده نیا، نازنین ریاحی، الهام قادری، یاسمین جمشیدی، ترلان بهادری اعلام می‌دارند.

References

1- Hasani Tabatabaei A.H, Firouzi R. Bacterial Diseases of Livestock. University Of Tehran Press. 2005; 2(2): 29-49. [In Persion]

2- Arthur G.H, Pierson H, Parkinson T.J. Veterinary Reproduction and Obstetrics; W.B. 8th.Ed. Saunders London; 2001, P: 601-650.

3- Alber J, El-Sayed A, Lammler C, Hassan A.A, Weiss R, Zschock M. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcusequi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp.*equi*. J. Vet. Med. B. 2004; 51(10): 455-458.

4- Brinsko S.B, Blanchard T.L, Varner D.D, Schumbacher J, Love C.C, Hinrichs K, Hartman D. MANUAL OF EQUINE REPRODUCTION; 3rd.Ed. Mosby; 2011, P: 100-120.

5- Casagrande Proietti P, Bietta A, Coppola G, Felicetti M, Cook R.F, Coletti M, *et al.*, Isolation and characterization of *b-haemolytic-Streptococci* fromendometritis in mares. Veterinary Microbiology. 2011; 152(1-2): 126–130.

6- Cordoni G.C, Williams A.W, Durham A, Florio D.F, Zanoni R.G , La Ragione R.M. Rapid diagnosis of strangles *(Streptococcus equi* subspecies *equi*) using PCR. Research in Veterinary Science. 2015; 102(2): 162-166.

7- Davies Morel M.C.G. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. 2nd.Ed. CABI Publishing; 2003, P: 263-295.

8- England G.C.W. Fertility and Obstetrics in the Horse.3rd.Ed. Blackwell Publishing; 2005, P: 170-177.

9- Erol E, Jackson C.J, Horohov D, Locke S, Smith J.S , Carter C.C. Elevated serum amyloid A levels in cases of aborted equine fetuses due to fetal and placental infections. Theriogenology. 2016; 86(4): 971-975.

10- Javed R, Taku A.K, Gangil R , Sharma R.K. Molecular characterization of virulence genes of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* in equines. Veterinary World. 2016; 9(8): 875-881

11- Knottenbelt D.C, Pascoe R.R, Lopate C, Leblanc M.M. Equine Stud Farm Medicine and Surgery. 1st.Ed. Saunders London;2003, P: 191-203.

12- Levent Kocabiyik A, Sonmez G, Ulgen M, Ozakin C, Kocakaya E, Alasonyalilar A. Abortion due to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in a Mare. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29(12): 937-940.

13- Medina L, Cruz-Va´zquez C, Quezada T,

Morales E , Garcı´a-Va´zquez Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. Veterinary Parasitology. 2006; 136(3-4): 187-191.

14- McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W.E , Varner D.D. Equine Reproduction. 2nd .Ed. Blackwell Publishing Ltd; 2011, P: 1963-1980.

15- Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989, P: 150-250

16- Szeredi L, Tenk M, Jánosi S, Pálfi V, Hotzel H, Sachse K, ET AL. A survey of equine abortion and perinatal foal losses in Hungary during a three-year period (1998-2000). Acta Veterinaria Hungarica. 2008; 56 (3): 353-367.

17- Van der kolk J.H, Veldhuis kroeze, E.J.B. Infectious Diseases Of The Horse; Manson Publishing Ltd; 2013, P: 10-124.

Determination of the prevalence of *Streptococcus equi* subspecies *zooepi-demicus* In aborted fetuses of Mare by Molecular Method

Nasir Rafati[1*], Mohsen Jafarian[2]

1- Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, ShahreKord, Iran.
2- Assistance Professor in Clinica Pathology Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: July 15, 2020; Revise: August 20, 2020; Accept: September 10, 2020

Summary

Abortion in domestic animals has always been considered as one of the problems of the livestock industry in all parts of the world, whose causes are numerous and varied. *Streptococcus equi subspecies zooepidemicus* is a gram positive coccus and negative catalase which is one of the most important causes of abortion and loss of foal during pregnancy in mares. The aim of this study was to investigate the presence of DNA of this bacterium in a number of mare abortion fetuses in western provinces of Iran. For this purpose, 125 samples of aspirated stomach contents of the aborted fetuses were tested by PCR method to detect the sodA gene. The results of this study showed that 23 (18.4%) of 125 aborted fetuses were infected with *Streptococcus equi subspecies zooepidemicus*. The findings of this study indicate a high incidence of Streptococcusis infection and showed that this bacterium is one of the most important factors in abortion in mares so that control programs to reduce the economic losses of this bacteria in Iran is necessary. In this study, for the first time, a bacterium in the contents of the stomach of aborted fetuses of mares was identified as one of the main causes of abortion in Iran.

Key words: *Mare, Abortion, Streptococcus equi subspecies zooepidemicus,PCR*

مروری بر کنترل و درمان جرب قرمز طیور (*Dermanyssus gallinae*)

امیر اصغری باغخیراتی، سید مصطفی پیغمبری*

۶۸

گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۲۶ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۷ شهریور ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۷ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

جرب قرمز طیور، مهم‌ترین انگل خارجی خون‌خوار در گله‌های تخم‌گذار و مادر در بسیاری از کشورها است. آلودگی با این جرب اجباری، بسیار رایج بوده و بر اساس گزارشات اپیدمیولوژیک، ۸۳ درصد از مزارع اروپایی به آن آلوده هستند. همچنین، درمانیسوس گالینه به‌عنوان رایج‌ترین و مهم‌ترین آفت طیور در ایران توصیف شده است. آلودگی با جرب قرمز طیور، می‌تواند منجر به کاهش تولید تخم‌مرغ، استرس، سرکوب سیستم ایمنی، پرکنی، کانی‌بالیسم، آنمی و مرگ شود. به علاوه، اثبات شده است که این جرب، می‌تواند برخی از عوامل بیماری‌زا از جمله سالمونلا را منتقل کند. از این گذشته، آلودگی انسان به جرب درمانیسوس گالینه به صورت فزاینده‌ای از کشورهای مختلف از جمله ایران، گزارش شده است. اگرچه روش‌های گوناگونی برای کنترل این جرب در سالن‌های طیور گزارش شده، اما رویکرد اصلی، متکی بر استفاده از ترکیبات ضد کنه سنتتیک می‌باشد. اهداف این مطالعه‌ی مروری، بررسی جنبه‌های گوناگون آلودگی با جرب درمانیسوس گالینه، توصیف ترکیبات ضد کنه مختلف و ارزیابی اثرات هر کدام از ترکیبات ضد کنه بر روی این جرب می‌باشند.

کلمات کلیدی: *انگل خارجی، درمانیسوس گالینه، جرب قرمز، طیور، ترکیبات ضد کنه*

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

مقدمه

جرب قرمز طیور، درمانیسوس گالینه (*Dermanyssus gallinae*) (De Geer, 1778)، (مزواستیگماتا، درمانیسیده)، که به آن جرب ماکیان هم گفته می‌شود، رایج‌ترین و مهم‌ترین انگل خارجی خون‌خوار در گله‌های تخم‌گذار و مادر بسیاری از کشورها از جمله ایران است (۱، ۲). این جرب، یک انگل خون‌خوار اجباری و غیر دائمی است که معمولاً شبانگاه، برای زمان کوتاهی در حدود ۳۰ الی ۶۰ دقیقه، از پرنده تغذیه می‌کند و سایر اوقات، در درز و شکاف‌های سالن مرغداری مخفی می‌شود (۳، ۴). درمانیسوس گالینه، دارای چرخه‌ی زندگی کوتاهی است و تکامل کامل آن از مرحله تخم تا بلوغ، معمولاً در طی ۲ هفته رخ می‌دهد، البته ممکن است این اتفاق در نصف این مدت زمان نیز صورت گیرد. به عبارت دیگر، اگر شرایط مطلوبی برای رشد و تکثیر درمانیسوس گالینه فراهم گردد، جمعیت آن می‌تواند هر هفته در سالن‌های مرغداری دو برابر شود (۵، ۶، ۷). تراکم این جرب می‌تواند در سیستم قفس، به ۵۰ هزار جرب و در موارد شدیدی آلودگی، حتی به ۵۰۰ هزار جرب (به ازای هر پرنده) نیز برسد (۸). گذشته از رشد و تکثیر سریع، درمانیسوس گالینه دارای مقاومت بالایی است. این جرب می‌تواند به مدت ۹ ماه بدون صرف خون، زنده مانده و رطوبت نسبی ۷۰ الی ۹۰ درصد و دمای ۳۷-۱۰ °C را به خوبی تحمل کند. جالب توجه است که جرب مذکور، حتی قادر است در دمای ۲۰°C- نیز زنده بماند (۹). آلودگی با این جرب، باعث وارد آمدن استرس، بر هم خوردن الگوی خواب پرنده، افزایش رفتارهای تهاجمی، پرکنی و حتی کانی‌بالیسم می‌شود. علاوه بر این، افزایش ضریب تبدیل غذایی، وجود لکه خون بر روی تخم‌مرغ، کاهش کیفیت آن و کاهش در میزان تولید تخم‌مرغ از جمله اثرات این انگل است (۱۰، ۱۱). این جرب، می‌تواند هم به صورت ناقل بیولوژیک و هم ناقل مکانیکی عمل کرده و عوامل بیماری‌زایی از قبیل پارامیکسوویروس، ویروس‌های انسفالومیلیت شرقی، غربی و ونزوئلایی اسبی، ویروس انفلوانزای پرندگان، اسپیروکت، اشریشیا کلای، اریزیپلوتریکس، پاستورلا مولتوسیدا، سالمونلا گالیناروم و سالمونلا اینتریتیدیس را منتقل کند. اگرچه که موارد انتقال بیماری‌های انسانی از طریق جرب پرندگان، نادر است، اما باید در نظر داشت که این جرب می‌تواند به صورت یک ناقل بالقوه برای انتقال عوامل بیماری‌زا به انسان عمل کند (۱۰، ۱۲، ۱۳). اولین علامت بالینی در حیوانات آلوده به این جرب، آنمی تحت حاد در اثر گزش‌های مکرر است. یک مرغ تخم‌گذار می‌تواند هر شب ۳ درصد از حجم خون خود را در اثر آلودگی با این جرب از دست بدهد (۱۴). در موارد شدید آلودگی، ممکن است کم‌خونی موجب مرگ پرنده شود. جالب توجه است که در برخی از گزارشات، به افزایش ده برابری در میزان مرگ و میر پرندگان اشاره کرده‌اند (۱۵). یکی دیگر از مسائل مهم در آلودگی با این جرب، وارد آمدن استرس به پرنده است. طبق مطالعه‌ی Kowalski و Sokol(۲۰۰۹)، آلودگی با این جرب سبب افزایش سطح کورتیکوسترون و آدرنالین و کاهش سطح بتا و گاما گلوبولین‌ها در ماکیان آلوده گردید، که این امر نشان دهنده‌ی استرس و سرکوب سیستم ایمنی در آنان است (۱۶). این جرب، یکی از مشکلات اصلی در صنعت طیور تخم‌گذار و مادر به حساب می‌آید و به علت کوتاه بودن دوره پرورش طیور گوشتی، از اهمیت کمتری در آنان برخوردار است. علاوه بر این، محل‌های اختفای جرب مذکور در سیستم تولیدی مرغان تخم‌گذار، بیشتر از مرغان گوشتی است (۱). از لحاظ اقتصادی، آلودگی با جرب درمانیسوس گالینه، یک تهدید مهم برای مرغان تخم‌گذار در بسیاری از کشورهای جهان به

حساب می‌آید. در مورد ایالات متحده آمریکا، اگرچه که بیشتر درگیری‌ها با اورنیتونیسوس سیلویاروم بوده است، اما اخیراً، آلودگی با جرب قرمز طیور در آمریکای شمالی نیز گزارش شده است (۱۷). طبق بررسی صورت گرفته توسط Van Emous در سال ۲۰۰۵، تخمین زده شده است که هزینه‌های اقتصادی مرتبط با کنترل جرب درمانیسوس گالینه و خسارات اقتصادی ناشی از آن در صنعت تخم‌مرغ اتحادیه‌ی اروپا برابر با ۱۳۰ میلیون یورو در سال (برابر با ۰/۴۳ یورو به ازای هر مرغ) بوده است (۱۴). در سال ۲۰۱۷، ایشان تخمین زده‌اند که میزان کل هزینه‌های مربوط به آلودگی با جرب قرمز طیور در هلند، برابر با ۰/۶ یورو به ازای هر مرغ در سال است. این امر نشان می‌دهد که میزان خسارات اقتصادی ناشی از این جرب از سال ۲۰۰۵ تا سال ۲۰۱۷ در حدود ۴۰ درصد افزایش یافته است. در مجموع، ضررهای اقتصادی حاصل از جرب‌ها در اروپا در حدود ۲۳۱ میلیون یورو در سال تخمین زده شده است (۱۸).

شیوع آلودگی با جرب درمانیسوس گالینه در کشورهای مختلف

جرب قرمز طیور، دارای گسترش جهانی بوده و درصد بالایی از پرندگان در کشورهای سوئد (۶)، فرانسه (۱)، دانمارک، صربستان، مونته نگرو، هلند و ژاپن (۱۹) به این جرب آلوده‌اند. طی مطالعه‌ی گسترده‌ای که در زمینه‌ی آلودگی با انگل‌های خارجی در نمونه‌های به دست آمده از مزارع تخم‌گذار تجاری و مادر در ۱۱ استان چین صورت گرفت، مشخص شد که ۸۸/۴ درصد از مزارع، دارای آلودگی با حداقل یک انگل خارجی هستند. در این میان، جرب درمانیسوس گالینه رایج‌ترین انگل خارجی در مزارع تخم‌گذار تجاری (۶۴/۱ درصد) بود (۲۰). در انگلستان، ۶۰ درصد از مرغداران، آلودگی با جرب قرمز را یک مساله‌ی بسیار مهم اقتصادی می‌دانستند و تنها ۷ درصد از آنان، ادعا داشتند که هرگز مشکلی با جرب قرمز نداشته‌اند (۲۱). طی مطالعه‌ی دیگری در شمال انگلستان، مشخص شد که جرب قرمز طیور در ۸۷/۵ درصد از واحدهای تخم‌گذار حضور داشته و رایج‌ترین روش کنترلی مورد استفاده توسط مرغداران، بهره بردن از مواد ترکیبات ضد کنه در حین حضور پرنده در سالن است (۲۲). بررسی صورت گرفته در کشور لهستان، نشان داد که جرب درمانیسوس گالینه در تمامی مزارع تخم‌گذار مورد بررسی (آلودگی ۱۰۰ درصد) حضور دارد. همچنین، مهم‌ترین مشکل مرتبط با جرب مذکور در این مطالعه، کاهش ۲ الی ۱۵ درصدی در تولید تخم‌مرغ و افزایش مرگ و میر عنوان شد (۲۳). در واقع، بررسی‌های اخیر نشان دهنده‌ی شیوع بسیار بالای جرب درمانیسوس گالینه و شیوع فزاینده‌ی آن در اروپا هستند، بدین صورت که میانگین آلودگی با این جرب در مزارع اروپایی برابر با ۸۳ درصد است و میانگین آلودگی با آن در هلند، آلمان و بلژیک به ۹۴ درصد می‌رسد (۲۴). در رابطه با وضعیت جرب درمانیسوس گالینه در ایران، باید گفت که طی بررسی صورت گرفته در مورد آلودگی‌های انگلی ماکیان آزادچر استان گلستان، میزان آلودگی با این جرب در آنان برابر با ۲۰ درصد گزارش شد (۲۵). در بررسی اپیدمیولوژیک صورت گرفته در خصوص آلودگی گله‌های مرغان تخم‌گذار شهرستان مشهد، مشخص شد که ۴۵/۸۳ درصد از مزارع نمونه‌برداری شده، آلوده به جرب قرمز طیور بودند (۲۶). در سال ۲۰۰۹، Rahbari و همکاران، به بررسی حضور جرب‌های خون‌خوار در ۸ مزرعه تخم‌گذار و ۴ مزرعه مادر، در ۷ استان ایران (گیلان، مازندران، زنجان، قزوین، مرکزی، قم و تهران) پرداخته و ضمن ارائه‌ی اولین گزارش از اورنیتونیسوس بورسا (*Ornithonyssus bursa*) در ایران، عنوان داشتند

که درمانیسوس گالینه، شایع‌ترین و مهم‌ترین آفت طیور در ایران است (۲).

اهمیت جرب درمانیسوس گالینه در انسان و حیوانات

درمانیسوس گالینه می‌تواند بیش از ۳۰ گونه از پرندگان وحشی را آلوده کرده و اگرچه که به عنوان یک انگل پرندگان شناخته شده است، اما گزارشات فزاینده‌ای از حمله‌ی آن به میزبانان غیر پرنده وجود دارد (۲۷). طبق گزارشات، این جرب توانسته است از سایر حیوانات از جمله سگ و گربه نیز تغذیه کرده و سبب درماتیت در یک اسب شود (۲۸-۳۰). این جرب از موش‌های مرغداری در ایران جدا شده و برخی از جوندگان به این جرب آلوده شده‌اند (۳۱). در واقع، جرب مذکور، علاوه بر آنکه یک انگل پرندگان است، همچنین می‌تواند از سایر حیوانات نیز تغذیه کند و اگرچه که موارد گزارش شده از آلودگی پستانداران به این جرب، نسبتاً نادر است، اما با توجه به انعطاف پذیری ژنتیکی این گونه و شواهد حضور دائمی آن در برخی از میزبانان غیر پرنده، پتانسیل آن برای افزایش دامنه‌ی میزبانی‌اش، ممکن است وجود داشته باشد (۱۲). گذشته از حیوانات، آلودگی انسان با جرب قرمز طیور، می‌تواند منجر به ایجاد جراحات پوستی، اریتماتوز و جوش‌های پاپولار شود که معمولاً همراه با خارش هستند. امروزه موارد متعددی در خصوص آلودگی انسان به جرب درمانیسوس گالینه از سرتاسر دنیا از جمله آلمان، انگلستان، لهستان، سوئیس، ایتالیا، صربستان، اسپانیا، فرانسه، جمهوری چک، هلند، اتریش (۳۲) و ترکیه (۳۳) گزارش شده‌اند. اولین بار Abdigoudarzi و همکاران (۲۰۱۴) آلودگی انسان به جرب درمانیسوس گالینه را در ایران گزارش کردند. طبق گزارش آنان، سه نفر از اعضای یک خانواده دچار خارش شدید در بدن خود، به خصوص در ناحیه دست‌ها، ساعد، پشت گردن و قفسه سینه شده بودند و در معاینه‌ی فیزیکی آنان، یافته‌هایی از درماتیت خارشی (pruritus dermatitis) و بثورات ماکولوپاپولار اریتماتوز دیده شد (۳۴). باید گفت که پزشکان، معمولاً با درماتیت ایجاد شده به وسیله‌ی انگل‌های خارجی زئونوز، نا آشنا هستند و از آنجایی که تشخیص آلودگی با این جرب دشوار است، بسیاری از موارد به درستی تشخیص داده نشده و یا گزارش نمی‌شوند. بنابراین، به نظر می‌رسد که میزان واقعی بروز جراحات پوستی حاصل از این جرب، که به آن گامازوایدوزیس (Gamasoidosis) گفته می‌شود، بالاتر از آن چیزی باشد که هم اکنون فرض می‌شود (۳۲). به عنوان مثال پیرمردی در ترکیه دچار خارش شده بود که پزشکان در ابتدا آن را خارش پیری (senile pruritus) تشخیص داده و از آنتی‌هیستامین و کورتیکواستروئید موضعی برای درمان استفاده کردند، اما پس از انجام بررسی بیشتر مشخص گردید که فرد مورد نظر آلوده به جرب درمانیسوس گالینه است و از شامپوی پرمترین ۱ درصد برای درمان استفاده شد (۳۳). از سوی دیگر، به علت نقش احتمالی درمانیسوس گالینه به عنوان یک ناقل و یا مخزن برای عوامل بیماری‌زای زئونوز، تشخیص اشتباه آلودگی با آن می‌تواند نگران کننده باشد. در حقیقت درمانیسوس گالینه به یک نگرانی در حال افزایش برای سلامت انسانی بدل شده است و بایستی به عنوان یک خطر شغلی برای کارگران مرغداری تلقی شود (۱۲، ۳۲، ۳۵).

مبارزه با جرب درمانیسوس گالینه

تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه کنترل جرب درمانیسوس گالینه از طریق مختلف به انجام رسیده است. از میان آنان می‌توان به کنترل زیستی (به عنوان مثال با بهره‌گیری از *Bacillus thuringiensis*)، استفاده از محصولات گیاهی همچون سیر یا درخت چریش (Neem) اشاره کرد، که برخی از آنان اثرات امیدوار کننده‌ای از خود

نشـان داده‌انـد. بـه عنـوان مثـال، در بررسـی درون‌تـن عصـاره سـیر در مزرعـه مرغـان تخم‌گـذار، اثـر بخشـی مطلـوبی مشـاهده شـده اسـت (۳۶). همچنـین، مشـخص شـده اسـت کـه اثربخشـی عصـاره دانـه‌ی چـریش، قابـل قیـاس و حتـی بـالاتر از فوکسـیم بـوده اسـت (۳۷). همچنـین مطالعـات مختلفـی در خصـوص سـاخت واکسن، اسـتفاده از دشـمنان طبیعـی ایـن جـرب و مـواد بـی اثـر (از قبیـل کـائولین و سـیلیکا) صـورت گرفتـه اسـت. برخـی از مـرغداران نیـز از گازوئیـل بـرای رفـع آلـودگی بـا جـرب مـذکور اسـتفاده می‌کننـد، امـا بایـد اذعان داشـت کـه کنتـرل جـرب قرمـز طیـور، اصـولاً بـر پایـه‌ی اسـتفاده از ترکیبـات ضـد کنـه اسـت. بـه همـین علت، در ادامه بـه معرفـی ترکیبـات ضـد کنـه مختلـف و بررسی اثرات آنـان بـر روی جـرب قرمـز طیـور، پرداختـه می‌شود.

ترکیبـات ارگـانوکلره: سـموم ارگـانوکلره در سـال ۱۹۴۶ معرفـی شـدند و اولـین ترکیبـات ضـد کنـه‌های سـنتتیک تجـاری در دسـترس بودنـد. بنـزن هگزاکلرایـد (BHC) و دی‌کلـرو دی‌فنیـل تری‌کلرواتـان (DDT) اولـین ارکانوکلره‌هـایی بودنـد کـه بـه عنـوان ترکیبـات ضـد کنـه اسـتفاده شـدند. از ایـن ترکیبـات می‌تـوان بـه آلـدرین، دیلـدرین، هپتـاکلر، هپتـاکلر اپوکسـید، توکسـافن و غیـره نیـز اشـاره کـرد. ترکیبـات ارگـانوکلره بـه جایگـاه پیکروتوکسـینین در کمـپلکس یونوفـوره‌ی کلرایـد گامـا آمینـو بوتیریـک اسـید (GABA) متصـل شده و باعـث مهـار ورود کلـر بـه داخـل عصـب می‌شـوند که ایـن قضـیه منجـر بـه مـرگ ارگانیسـم می‌شـود (۳۸، ۳۹). ترکیبـات ارگـانوکلره، دارای انحـلال پـایین در آب و حلالیـت بـالا در چربـی می‌باشـند. ایـن ترکیبـات می‌تواننـد در بافت‌هـا تجمـع یافتـه و از طریـق خـوردن شـیر، گوشـت و تخم‌مـرغ بـه بـدن انسـان راه یابنـد. از سـوی دیگـر، گزارشـات متعـددی در خصـوص سـمیت پایـدار و اثـرات نـامطلوب آنـان، بـه خصـوص DDT بـر سـلامت انسـان وجـود دارد، کـه از میـان آنـان می‌تـوان بـه بـروز انـواع سـرطان‌ها از جملـه سـرطان پسـتان، سـرطان پـانکراس، لنفومـا، اثـرات نـامطلوب بـر سیسـتم تولیـد مثلـی، اثـرات نورولوژیـک، سـرکوب سیسـتم ایمنـی و ... اشـاره کـرد (۴۰، ۴۱). در گذشـته، نگرانـی کمـی در خصـوص اثـرات آفت‌کش‌هـا وجـود داشـت و از سـموم ارگـانوکلره بـه صـورت گسـترده‌ای اسـتفاده می‌شـد، تـا آنکـه ریچـل کارسـون در سـال ۱۹۶۲ کتـاب بهـار خـاموش (Silent Spring) را منتشـر کـرد و بسـیاری از مشـکلات را آشـکار سـاخت. در نهایـت، از اواخـر دهـه ۱۹۷۰ اسـتفاده از ایـن ترکیبـات در اکثـر کشـورهای صـنعتی، متوقـف شـد (۴۲). علی‌ای‌حـال، باقیمانـده‌ی ایـن ترکیبـات در نمونـه‌های گوشـت طیـور در چـین دیـده شـده‌اند (۴۳). همچنـین طـی مطالعـه‌ای در اردن، بـا اسـتفاده از روش کروماتوگرافی گـازی، بـه بررسـی باقیمانـده‌ی آفت‌کش‌هـای ارگـانوکلره در ۱۳۴ نمونـه تخم‌مـرغ و ۱۱۵ نمونـه گوشـت ماکیـان پرداختـه شـد و نتـایج نشـان داد کـه ۲۸درصـد از تخم‌مرغ‌هـا و ۲۰درصـد از گوشـت ماکیـان، آلـوده بـه باقیمانـده‌های ارگـانوکلره هسـتند (۳۹). مطالعـات انـدکی در خصـوص اثرات ایـن ترکیبـات بـر روی جـرب درمانیسـوس گالینـه صـورت گرفتـه اسـت، و برخـی از آنـان، از جملـه مطالعـه‌ی صـورت گرفتـه در چـک اسـلواکی سـابق، بـه سـطوح بـالایی از مقاومـت جـرب درمانیسـوس گالینـه، نسبت به DDT اشاره کرده‌اند (۴۴).

ترکیبـات ارگانوفسـفاته: دسـته دیگـری از آفت‌کش‌هـای محبـوب، ترکیبـات ارگانوفسـفاته هسـتند که از آنـان بـه صـورت گسـترده‌ای اسـتفاده می‌شـود. در چـین، ۳۹/۸ درصـد از واحـدهای تخم‌گـذار تجـاری و ۲۸/۶ درصـد از واحـدهای مـادر، از ترکیبـات ارگانوفسـفاته بـه تنهـایی و یـا همـراه بـا آورمکتین‌هـا اسـتفاده می‌کننـد (۲۰). در ایـن دسـته، می‌تـوان بـه متریفونـات (تـری کلوروفـون)، دیـازینون، کلورپیریفـوس، دی‌کلـوروس، مـالاتیون، فنیتروتیـون و فوکسـیم اشـاره کـرد. ایـن ترکیبـات، باعـث مهـار

استیل‌کولین‌استراز می‌شوند. این آنزیم، یک آنزیم هیدرولیتیک است که برای هیدرولیز استیل‌کولین و خاتمه دادن به پیام عصبی در محل سیناپس لازم می‌باشد. در نتیجه، مهار آن، باعث ترشح پیوسته‌ی پیام عصبی و متعاقباً دیگری بیش از حد گیرنده نورون پس‌سیناپسی با استیل کولین، فلجی و مرگ جرب می‌شود (۴۵، ۴۶). در سه دهه‌ی گذشته، آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته جزء رایج‌ترین ترکیبات، با اثر بخشی نسبتاً مطلوب برای کنترل آفات بوده‌اند. به عنوان مثال طی مطالعه‌ای در فرانسه، هیچ‌گونه مقاومتی در جمعیت جرب‌های قرمز طیور نسبت به دی‌کلوروس دیده نشد (۴۷). علی‌ای‌حال، آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده آمریکا در اوایل دهه ۲۰۰۰، شروع به توقف تدریجی استفاده مسکونی از دو ترکیب ارگانوفسفاته اولیه، دیازینون و کلورپریفوس، کرد که این تصمیم به خاطر پتانسیل آنان برای ایجاد سمیت در انسان بود (۴۲). باید گفت که مقاومت نسبت به ترکیبات ارگانوفسفاته از سال‌های گذشته دیده شده است (۴۴).

Nordenfors و Hoeglund (۲۰۰۰)، گله‌ی تخم‌گذار را با محلول ۰/۱۵ درصد متریفونات به شکل اسپری مورد درمان قرار دادند. پس از دوبار اسپری کردن، تنها یک کاهش اولیه در تعداد جرب‌های به دام افتاده در تله‌ها مشاهده شد، اما طی ۲ ماه پس از آن، تعداد جرب‌ها مجدداً افزایش یافت و حتی مقدار آن، از تعداد جرب‌های پیش از درمان نیز بیشتر شد (۴۸). متریفونات، که برای استفاده به صورت اسپری برای مرغان تخم‌گذار در اروپا به ثبت رسیده بود، دارای باقیمانده زیادی در تخم مرغ و گوشت بود و سرانجام در سال ۲۰۰۲ از بازارهای مصرف خارج شد. در بررسی دیگری، اکثر مرغداران انگلیسی اظهار داشتند که از فنیتروتیون استفاده کرده‌اند. اما از آن‌جایی که استفاده از آن ممنوع شده بود، Fiddes و همکاران(۲۰۰۵)، در مطالعه خود، از مالاتیون به جای آن در تست استفاده کردند و مشخص شد که اگرچه کمتر از ۵۰ درصد از مدیران مزارع، به مقاومت نسبت به فنیتروتیون در مزرعه خود اشاره کرده بودند. اما در آزمون‌های برون‌تن، مقاومت نسبت به مالاتیون (یک ارگانوفسفاته‌ی مشابه آن) در تمامی مزارع مورد بررسی، وجود داشت (۲۱).

یکی از محصولات بسیار مؤثر ارگانوفسفاته در سال‌های اخیر، فوکسیم بوده است. دوره منع مصرف تخم‌مرغ آن برابر با صفر روز و دوره منع مصرف گوشت در آن برابر با ۲۵ روز است. Meyer-Kuhling و همکاران (۲۰۰۷) سالن مرغداری تخم‌گذار را دوبار با محلول ۲۰۰۰ ppm فوکسیم، اسپری نمودند و با بهره‌گیری از فرمول اصلاح شده‌ی ابوت (Abbott's formula)، به بررسی میزان اثربخشی آن در کنترل جرب درمانیسوس گالینه پرداختند. اثربخشی این محصول پس از اسپری دوم، تا انتهای آزمایش، بیش از ۹۹ درصد بود. از سوی دیگر، هیچ‌گونه عارضه جانبی در استفاده از این محصول دیده نشد. مطالعه‌ی ایشان، نشان دهنده‌ی اثربخشی مطلوب فوکسیم در زمان انجام مطالعه است (۴۶).

اما، اخیرا طی مطالعه‌ی صورت گرفته بر روی ۱۱ جدایه‌ی به‌دست آمده از مزارع تخم‌گذار و مادر در فرانسه، اسپانیا و آلمان؛ مشخص شد که LC90 شش جدایه، در مورد فوکسیم، بیش از غلظت‌های توصیه شده برای مصارف تجاری است. این نتایج نشان می‌دهند که حساسیت جدایه‌های فیلدی نسبت به فوکسیم در حال کاهش است (۴۹). در بررسی انجام شده بر روی حساسیت جرب‌های جدا شده در ایتالیا از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۵، مشخص شد که فوکسیم (با میانگین اثربخشی ۸۰/۳۵ درصد) و آمیتراز، مؤثرترین ترکیبات ضد کنه بودند. فوکسیم توانست اثربخشی بالای خود را تا سال ۲۰۱۵ حفظ کند. بدین صورت که در سال ۲۰۱۴، هیچ جمعیت

نسبتاً مقاوم یا مقاومی نسبت به آن وجود نداشت، اما در سال ۲۰۱۵، میزان اثربخشی آن به شکل قابل توجهی افت کرد و تنها ۴۰ درصد از جمعیت جرب‌های تست شده، نسبت به این ترکیبات ضد کنه، حساس یا کاملاً حساس بودند. از سوی دیگر، در سال ۲۰۱۵، با دو برابر و یا چهار برابر کردن غلظت فوکسیم، هیچ‌گونه بهبود معنی‌داری در میزان اثربخشی آن دیده نشد (۵۰). این امر، به صورت واضحی نشان دهنده‌ی بروز سریع مقاومت است. امروزه عدم حساسیت استیل‌کولین‌استراز، به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی برای مقاومت در برابر ترکیبات ارگانوفسفاته در نظر گرفته شده است (۳۸).

پایرتروئیدها: پایرتروئیدها، یک دسته بزرگ از ترکیبات نوروتوکسیک بوده و آنالوگ‌های سنتتیک یکسری استرهای اسید کریسانتمیک (پایرترین I) و اسید پایرتریک (پایرترین II) هستند که در اصل، در گل‌های *Chrysanthemum cinerafolis* یافت می‌شوند. به عبارت دیگر، پایرترین‌ها، ترکیبات طبیعی به دست آمده از اعضای خانواده گل داوودی هستند و پایرتروئیدها، فرم‌های سنتتیک این ترکیبات‌اند که به منظور افزایش پایداری آنان تولید شده‌اند (۳۸، ۵۱). مدت‌ها پیش در چین باستان، از گل‌های خشک شده‌ی این گیاه، به عنوان یک حشره‌کش استفاده شده و این ترکیب در قرون وسطی در ایران یافت می‌شد. در حدود ۲۰۰ سال پیش، محصولی در اروپا (از طریق تجّار ارمنی) به‌عنوان پودر پارسی شناخته می‌شد که از گل‌های خشک شده‌ی *Chrysanthemum roseum* به دست آمده بود. تولید تجاری پایرترین‌ها از اواسط قرن ۱۹ ام میلادی آغاز گردید و ترکیبات اصلی آنان، پایرترین I و II بودند. علی‌ای‌حال، به علت پایداری کم آنان در هوا و نور و هزینه‌های تولیدشان، استفاده عمومی از آنان محدود شد (۵۱). اما ترکیبات پایدار در برابر نور، با قابلیت حشره کشی بالا و مسمومیت اندک برای پستانداران تولید شدند که اولین ترکیب از این دسته، پرمترین بود. پرمترین در سال ۱۹۷۳ سنتز شد و در ۱۹۷۷ وارد بازار شد. در همان سال‌ها، دلتامترین و سایپرمترین نیز تولید شدند و دارای اثرات فوق‌العاده بالایی بر علیه آفات بودند. به گونه‌ای که دلتامترین فعال‌ترین حشره‌کش شناخته شده در آن زمان به حساب می‌آمد. پایرتروئیدهایی از جمله بایفنترین، سیفلوترین و لامبدا سایهالوترین، در دهه ۱۹۸۰ در دسترس قرار گرفتند (۴۲، ۵۱).

پایرتروئیدها، اساساً به عنوان نوروتوکسین عمل کرده و با اثر بر روی کانال‌های سدیمی حساس به ولتاژ، سبب فلجی و مرگ جرب می‌شوند (۴۲). از پایرتروئیدها به صورت گسترده در سرتاسر جهان استفاده شده و هنوز هم استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال در چین، ۴۱/۲ درصد از واحدهای تخم‌گذار تجاری و ۳۵/۷ درصد از واحدهای مادر، از پایرتروئیدها به تنهایی و یا در ترکیب با آورمکتین‌ها استفاده می‌کنند (۲۰). امروزه موارد فزاینده‌ای از مقاومت درمانیسوس گالینه نسبت به این دسته از ترکیبات ضد کنه گزارش شده است. در فرانسه، اولین گزارش مربوط به Beugnet و همکارانش (۱۹۹۷) است، که با تحقیق بر روی ۵ مزرعه طیور، متوجه شدند که تمامی جمعیت‌های درمانیسوس گالینه‌ی این مزارع، نسبت به پرمترین مقاوم هستند. به گونه‌ای که غلظت پرمترین مورد نیاز برای کشتن ۵۰ درصد از جرب‌های موجود در این مزارع، ۸ تا ۴۰ برابر غلظت مورد نیاز برای مزرعه کنترل منفی بود. به عبارتی، مصرف بی رویه و مداوم از پایرتروئیدها توسط برخی مرغداران، سبب وارد آوردن فشار انتخابی شدید و متعاقباً شکل‌گیری جمعیت‌های مقاوم شده بود (۴۷). در ایتالیا نیز، با جداسازی جمعیت جرب قرمز از مزارع طیور

تخم‌گذار و بررسی حساسیت آنان (با استفاده از کاغذ صافی آغشته به ترکیبات ضد کنه)، مشخص شد که در ۴۲ درصد از مزارع مورد بررسی، جمعیت جرب‌های قرمز حتی نسبت به غلظت‌های بالای پرمترین مقاوم شده‌اند (۵۲). همچنین طی بررسی ۸ ساله‌ای که بر روی حساسیت جرب‌های قرمز جدا شده از ۸۶ مزرعه در ایتالیا صورت گرفت، لامبدا سایهالوترین دارای کمترین اثربخشی (در مقایسه با فوکسیم و آمیتراز) بود. ۸۳/۳۳ درصد از جرب‌های تست شده در سال ۲۰۱۲، دارای مقاومت نسبی تا زیادی نسبت به لامبدا سایهالوترین بودند و میانگین اثربخشی این ترکیبات ضد کنه در طی دوره ۸ ساله، تنها برابر با ۵۸/۳۳ درصد بود (۵۰). در انگلستان، مرغداران مقاومت نسبت به پایرتروئیدها را بسیار رایج دانسته و با انجام آزمون برون‌تن، مشخص شد که مقاومت نسبت به سایپرمترین در تمامی مزارع مورد مطالعه، وجود دارد (۲۱). در ایران، با بررسی میزان حساسیت جرب‌های درمانیسوس گالینه جدا شده از مزارع تخم‌گذار در شهرهای مختلف آذربایجان غربی و شرقی، مشخص شد که سایپرمترین با متوسط اثر ۳۶/۳۸ درصد ضعیف‌ترین عملکرد را در بین سموم آزمایش شده دارد و مرغداری‌های واقع در اطراف شهرهای مراغه و بناب، بیشترین میزان تحمل در مقابل این سم را از خود نشان دادند (۵۳). در مطالعه‌ی دیگری، حداد زاده و همکاران (۱۳۸۰) پس از سم‌پاشی دلتامترین در یک واحد مرغداری تخم‌گذار آلوده به درمانیسوس گالینه، مشاهده نمودند که دلتامترین نتوانست آلودگی را کنترل کند؛ و اگرچه سم‌پاشی سبب کاهش نسبی تعداد جرب در سالن شد، اما این کاهش در مقایسه با میزان آلودگی قبل از سم‌پاشی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (۵۴). مثال‌های زده شده در این بخش، نشان دهنده‌ی گستردگی مقاومت جرب‌های قرمز طیور، چه در کشورهای خارجه و چه در ایران، نسبت به پایرتروئیدها می‌باشند.

لاکتون‌های ماکروسیکلیک: آورمکتین‌ها، لاکتون‌های ماکروسیکلیکی هستند که از یک اکتینومیست به نام استرپتومایسس آورمایتیلیس (*Streptomyces avermitilis*) به دست آمده‌اند. ایجاد آورمکتین‌ها برمی‌گردد به جداسازی یک باکتری خاکزی جدید در آزمایشگاه‌های انستیتو کیتاساتو. در سال ۱۹۷۵، مشخص شد که این باکتری جدید، می‌تواند یک ماده ضد کرم قوی تولید کند، که این ماده شناسایی شده و در نهایت منجر به ساخت داروی ضد انگل شد (۵۵). دکتر ویلیام کمپبل و ساتوشی آمورا به خاطر اکتشافاتشان در این خصوص، در سال ۲۰۱۵ به صورت مشترک برنده جایزه نوبل فیزیولوژی و پزشکی شدند.

اولین لاکتون‌های ماکروسیکلیک به‌دست آمده برای کنترل انگل‌ها، آورمکتین (۸ مولکول مرتبط به هم، از جمله آبامکتین) و آیورمکتین بودند (۵۵). لاکتون‌های ماکروسیکلیک به طور کلی شامل دو نوع ترکیبات هستند: آورمکتین‌ها (شامل: آبامکتین، آیورمکتین، دورامکتین، اپرینومکتین، سلامکتین) و میلبمایسین‌ها (شامل موکسی‌دکتین، میلبمایسین و اوکسیم) که داروهای ضد انگل وسیع‌الطیفی هستند، و از آنان به صورت گسترده چه در مورد حیوانات خانگی و چه انسان به منظور کنترل انگل‌های داخلی و خارجی استفاده شده است (۵۶). آیورمکتین به‌عنوان یک آگونیست گابا عمل می‌کند. به عبارت روشن‌تر، انتقال دهنده‌ی عصبی گابا (برخلاف استیل کولین) از طریق مهار سیگنال‌های تحریکی، عمل کرده و این خاصیت مهاری، با استفاده از آیورمکتین و آبامکتین بیشتر می‌شود؛ زیرا این داروها باعث تحریک آزاد سازی گابا از نورون پیش‌سیناپسی شده و اتصال آن به گیرنده‌های پس‌سیناپسی گابا را افزایش می‌دهند.

این موضوع، از طریق افزایش جریان یون‌های کلراید، باعث القای هایپرپولاریزاسیون در غشای نورون پس‌سیناپسی شده و بر قابلیت پیام‌رسانی نورون اثر می‌گذارد (۴۵). همچنین مشخص شده است که این ترکیبات، از طریق اتصال به یک تحت واحد از گیرنده گلوتامات، باعث ایجاد فلجی شلی در انگل می‌شوند (۵۵). طبق بررسی‌ها در چین، ۶۳/۲ درصد از مزارع مرغ مادر و ۴/۹ درصد از مزارع تخم‌گذار تجاری، از آورمکتین‌ها (آیورمکتین یا آبامکتین) به تنهایی و یا در ترکیب با سایر ترکیبات ضد کنه، استفاده می‌کردند (۲۰). اکثر آنان، آبامکتین و یا آیورمکتین را به صورت پیوسته به مدت ۷ روز (به میزان ppm ۲-۱) به غذای پرنده اضافه می‌نمودند. این در حالی است که حتی تزریق داخل شکمی آیورمکتین در دوز mg/kg ۰/۶، برای کنترل جرب درمانیسوس گالینه ناکافی است و این دارو تنها در دوزهای بالا (بین mg/kg ۵/۴ -۱/۸) بر جرب درمانیسوس گالینه مؤثر است. گذشته از این، دوزهای مؤثر آیورمکتین، بسیار نزدیک به دوزهای توکسیک آن هستند (۵۷، ۵۸). اکثر افراد باور داشتند که چون آورمکتین‌ها دارای قدرت بالایی بر علیه انگل‌های خارجی در سایر حیوانات هستند، پس باید دارای قدرت بالایی برای از بین بردن جرب‌های طیور نیز باشند. باید در نظر داشت که استفاده‌ی غیر قانونی مرغداران از آورمکتین‌ها در پرندگان، می‌تواند باعث بروز مشکلات جدی از قبیل وجود باقیمانده دارویی و حتی مسمومیت شود (۲۰).

xu و همکاران (۲۰۱۹) سه عدد از لاکتون‌های ماکروسیکلیک به نام‌های اپرینومکتین، موکسی‌دکتین و آیورمکتین را به صورت خوراکی (با دوز mg/kg ۵) به جوجه‌ها تجویز کرده و به بررسی اثر این ترکیبات ضد کنه پرداختند. میزان اثربخشی در مورد موکسی‌دکتین برابر با ۴۵/۶۰ درصد، در مورد آیورمکتین برابر با ۷۱/۳۲ درصد و در مورد اپرینومکتین برابر با ۱۰۰ درصد بود. این داروها توانستند سبب کاهش معنی‌دار در قابلیت تولید مثلی جرب‌ها (تخم‌گذاری، باروری و تفریخ تخم‌ها) و آهسته‌تر شدن هضم غذا در آنان شوند (۵۶). به طور کلی، لاکتون‌های ماکروسیکلیک حتی با دوزهای کم (mg/kg ۰/۵-۰/۲) دارای اثر بخشی مطلوب در پستانداران هستند؛ اما دوز استفاده شده در مطالعه‌ی ایشان، بسیار بیشتر (۲۵-۱۰ برابر) از دوزهای استفاده شده برای کنترل جرب در پستانداران بود. طبق مطالعات، میزان اثر بخشی لاکتون‌های ماکروسیکلیک بر علیه جرب قرمز طیور، در مقایسه با جرب‌های پستانداران، پایین‌تر است (۵۷، ۵۸). این اختلاف می‌تواند به خاطر تفاوت در فارماکوکینتیک آنان (در پرندگان و پستانداران) و یا اختلاف در میزان حساسیت جرب‌ها نسبت به آنان باشد. هنوز مکانیسم دقیق مقاومت در برابر این ترکیبات مشخص نشده است. اما احتمالاً مکانیسم مقاومت جرب‌ها، مربوط به عدم حساسیت کانال‌های یون کلر GABA یا گلوتامات می‌باشد.

کاربامات‌ها: دسته‌ی دیگری از ترکیبات ضد کنه‌های پرمصرف، کاربامات‌ها هستند که از میان آنان می‌توان به کاربارل، متومیل، پروپوکسور، بندیوکارب اشاره کرد. این ترکیبات همانند سموم ارگانوفسفاته، از طریق مهار استیل‌کولین‌استراز، سبب فلجی و مرگ جرب می‌شوند. برخی از مطالعات به اثربخشی مناسب این ترکیبات اشاره کرده‌اند. در مطالعه‌ی صورت گرفته بر روی ۳۲ مزرعه‌ی تخم‌گذار در لهستان، مشخص شد که مؤثرترین ترکیبات برای مبارزه با جرب قرمز طیور، فوکسیم و بندیوکارب هستند (۵۹). همچنین به نظر می رسد که کاربارل با میانگین اثر ۷۰/۷۷ درصد، محصولی مؤثر بر علیه جرب قرمز طیور در ایران است (۵۳). اما مقاومت درمانیسوس گالینه

نسبت به کاربامات‌ها و پایرتروئیدها، به صورت گسترده‌ای از کشورهای انگلستان، سوئد، فرانسه و ایتالیا گزارش شده است (۱۰). همچنین مشخص شده است که حساسیت جدایه‌های فیلدی جرب قرمز طیور در اروپا و برزیل نسبت به پروپوکسور کاهش یافته است (۴۹) و در ایتالیا، جمعیت‌های جرب قرمز، در ۸۶ درصد از مزارع مورد بررسی، حتی نسبت به غلظت‌های بالای کاربارل مقاوم بوده‌اند (۵۲). طی مطالعه دیگری که بر روی میزان باقیمانده‌ی کاربارل در ۴۵ مرغ تخم‌گذار (۲۲۵ نمونه بافتی) از سه مزرعه ایتالیا صورت گرفت، مشخص شد که ۸۲/۲ درصد از مرغان مورد بررسی دارای باقیمانده‌ی کاربارل بودند و از ۲۲۵ نمونه بافتی، ۹۱ نمونه از از لحاظ وجود باقیمانده‌ی کاربارل، مثبت بودند. این در حالی است که استفاده از کاربارل در اتحادیه اروپا از سال ۲۰۰۷ ممنوع شده است. وجود این باقیمانده‌ها، زنگ خطری برای سلامت عمومی جامعه است و نشان می‌دهد که هنوز برخی از مرغداران، از این ترکیبات استفاده می‌کنند. لازم به ذکر است که به علت ساختار لیپوفیلیک و پایداری برخی از ترکیبات ضد کنه، پوست و چربی مرغان، پرخطرترین بافت‌ها برای تجمع این ترکیبات هستند (۶۰).

آمیتراز: آمیتراز یک ترکیب فورامیدینی با خواص ضد کنه‌ای است که برای بیش از ۳۰ سال مورد استفاده قرار گرفته و جزء مؤثرترین ترکیبات در میان ترکیبات ضد کنه‌های مختلف به حساب می‌آید (۳۸، ۵۲). در مطالعه صورت گرفته بر روی میزان حساسیت جرب‌های قرمز طیور (نسبت به آمیتراز، کاربارل و پرمترین) در ایتالیا، میزان اثربخشی آن در تمامی غلظت‌ها و در تمامی مزارع مورد بررسی (به جز یک مزرعه)، برابر با ۱۰۰ درصد بود، که این امر، نشان دهنده‌ی اثر بخشی بالای آن است (۵۲). همچنین در ایران، آمیتراز با میانگین اثر ۶۷/۸۶ درصد، عملکردی متوسط در از بین بردن جرب‌های جدا شده از مزارع تخم‌گذار داشت (۵۳). آمیتراز از طریق اثر بر گیرنده اوکتاپامین عمل می‌کند. بنابراین بروز تغییرات در این گیرنده، می‌تواند منجر به مقاومت جرب‌ها نسبت به آمیتراز شود (۳۸). همچون سایر ترکیبات ضد کنه، مقاومت نسبت به این ترکیب نیز دیده شده است. طی یک بررسی ۸ ساله در خصوص اثربخشی آمیتراز، فوکسیم و لامبدا سایهالوترین بر روی جرب قرمز طیور در ایتالیا، مشخص شد که آمیتراز (با میانگین اثربخشی ۸۰/۸۳ درصد) و فوکسیم، مؤثرترین ترکیبات ضد کنه بودند؛ اما میزان اثربخشی آمیتراز به صورت معنی‌داری در طی سال‌های ۲۰۱۲ الی ۲۰۱۵ کاهش یافت. در سال ۲۰۰۸، تمام جرب‌ها به آمیتراز کاملا حساس بودند و هیچ‌گونه جمعیت مقاومی نسبت به آن وجود نداشت اما در سال ۲۰۱۲، هیچ جمعیت کاملا حساسی نسبت به آمیتراز وجود نداشت و ۴۲/۸۶ درصد از جمعیت جرب‌ها، نسبت به آن مقاومت داشتند. باید گفت که آمیتراز، مجوز استفاده در مورد طیور را ندارد، بنابراین وجود مقاومت، می‌تواند نشان دهنده‌ی استفاده غیر قانونی و مکرر از آن در ایتالیا باشد. به علاوه، لازم به ذکر است که افزایش غلظت آمیتراز در سال ۲۰۱۲، سبب افزایش در میزان مرگ و میر جرب‌ها نشد (۵۰).

اسپینوساد: این ترکیبات ضد کنه، یک محصول به دست آمده از میکروارگانیسمی به نام *Saccharopolyspora spinosa* می‌باشد که در سال ۲۰۱۰ در بازارها عرضه شد (۱۰، ۶۱). اسپینوساد، مخلوطی از اسپینوسین A و D است. اسپینوسین A به گیرنده‌های استیل کولین در نورون پس‌سیناپسی متصل می‌شود و محل هدف اسپینوسین D، گیرنده‌های گابا (گاما آمینوبوتیریک اسید) است. بنابراین با تمرکز این ترکیبات ضد کنه بر دو گیرنده

مختلف، احتمال ایجاد مقاومت طبیعی بر علیه آن کاهش می‌یابد (۴۵). اثر ترکیبات ضد کنه‌ی این محصول بر جرب درمانیسوس گالینه، چه در شرایط برون‌تن و چه درون‌تن، به اثبات رسیده است (۶۲). Liebisch و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی اثربخشی اسپینوساد بر جرب قرمز طیور پرداختند. در سالن دریافت کننده‌ی اسپینوساد با غلظت ppm ۲۰۰۰، تقریباً ۱۰۰درصد کاهش در تعداد جرب‌ها (در طی ۲۸ روز پس از درمان) دیده شد و در سالن دریافت کننده‌ی این ترکیب با غلظت ppm۴۰۰۰، میزان کاهش در تعداد جرب‌ها (تا روز ۷۷) بالای ۹۰ درصد بود (۶۳). البته در مطالعه‌ی اخیر که به مقایسه‌ی اثر اسپینوساد با برخی از ترکیبات ضد کنه (از جمله فلورالانر) پرداخت، مشخص گردید که اگرچه جدایه‌های فیلدی نسبت به غلظت‌های ۲۰۰۰ الی ۴۰۰۰ ppm از اسپینوساد حساس بودند اما LC90 اسپینوساد در مورد جدایه‌ی آزمایشگاهی و جدایه‌های فیلدی اروپایی، تا ppm۴۰۰۰ رسید؛ این قضیه نشان می‌دهد که این ترکیب دارای قدرت کمتری نسبت به فلورالانر است (۴۹).

فلورالانر: روش مرسوم برای مقابله با جرب قرمز، استفاده از ترکیبات ضد کنه‌های مختلف به صورت اسپری یا پودر است. اما محدودیت‌هایی در این خصوص وجود دارد، از جمله آنکه ممکن است ترکیبات ضد کنه مورد نظر، نتواند در محل‌های اختفای جرب، به غلظت‌های کشنده‌ی خود دست یابد، استفاده از آن استرس‌آور می‌باشد، خطر ایجاد مقاومت و باقیمانده دارویی وجود داشته باشد و در نهایت کارگر مرغداری با ترکیبات ضد کنه مورد نظر مواجه شود (۶۴). بنابراین روش ارجح برای تجویز داروها، تجویز آنان به صورت خوراکی است. این روش، بسیار مؤثر و راحت بوده و جرب‌های موجود در سالن، در نهایت از طیور درمان شده، تغذیه کرده و بدین شکل دارو را دریافت می‌نمایند (۶۵). فلورالانر، یک ترکیب ایزوکسازولین و اولین محصول مجاز تولید شده به منظور استفاده در آب آشامیدنی با هدف مبارزه با جرب قرمز طیور است. از سال ۲۰۱۴ مشخص شد که این ترکیب دارای اثربخشی بسیار بالایی به منظور کنترل کنه و کک در حیوانات است. پس از تجویز، فلورالانر به سرعت جذب شده و حداقل تا ۱۵روز در پلاسما باقی می‌ماند (۶۶). فلورالانر توانست در سال ۲۰۱۷، برای کنترل جرب درمانیسوس گالینه در اتحادیه‌ی اروپا مجوز لازم را دریافت کند (۶۷). این ترکیب دارای فعالیتی دوگانه است که متمایز از عمل سایر ترکیبات ضد کنه‌ها است، بدین شکل که به صورت انتخابی، به محل‌های اتصالی مجزایی بر روی کانال‌های کلراید وابسته به لیگاند ال-گلوتامات و گابا (که به صورت گسترده‌ای در سیستم عصبی-عضلانی محیطی و اعصاب مرکزی کنه‌ها و حشرات وجود دارند) متصل شده و سبب فلجی و مرگ جرب می‌شود. (۶۸). علاوه بر این، حاشیه امنیت این محصول بالا بوده و دوره منع مصرف تخم‌مرغ آن برابر با صفر روز است (۶۶، ۶۹). Thomas و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی اثربخشی فیلدی فلورالانر در ۱۲ مزرعه‌ی تجاری در فرانسه، آلمان و اسپانیا پرداختند. این ترکیب به صورت خوراکی با دوز ۰/۵ mg/kg (دو بار به فاصله ۷ روز) از طریق آب آشامیدنی تجویز شد. سپس، میزان اثربخشی آن بر حسب تعداد جرب‌های به دست آمده (از تله‌های کار گذاشته شده) و استفاده از فرمول هندرسون-تیلتون (Henderson-Tilton formula) مشخص گردید. مطالعه ایشان نشان داد که میزان اثربخشی این ترکیب در روز ۳ برابر با ۹۵/۳ تا ۹۹/۸ درصد و میزان اثربخشی آن در روز ۹ برابر با ۹۷/۸ تا ۱۰۰ درصد بود. پس از آن، میزان اثر بخشی این ترکیب به مدت ۵۶ تا ۲۳۸ روز پس از قطع درمان، بالای ۹۰ درصد باقی ماند (۶۴). در

مطالعه دیگری، به مقایسه‌ی فعالیت فلورالانر و سایر ترکیبات ضد کنه‌های رایج (سایپرمترین، دلتامترین، فوکسیم، پروپوکسور و اسپینوساد) بر علیه ۱۳ جدایه‌ی به‌دست آمده از آلمان، فرانسه، اسپانیا و برزیل پرداخته شد و نتایج تست حساسیت تماسی نشان دادند که ظاهراً، حداقل یک مورد مقاومت نسبت به یکی از محصولات فوکسیم، دلتامترین، سایپرمترین و پروپوکسور در ۱۳ جدایه‌ی فیلدی وجود دارد، اما تمامی جدایه‌ها نسبت به فلورالانر به شدت حساس بودند. فلورالانر در تست خوراکی، تقریباً ۱۰۰۰ برابر فعال‌تر از تست تماسی است. قوی‌تر بودن فعالیت سیستمیک فلورالانر نسبت به فعالیت تماسی آن، از جهت نحوه تجویز نوآورانه‌ی این ترکیب (در آب آشامیدنی)، ارزشمند است (۴۹).

ترکیبات ضد کنه با منشاء گیاهی: استفاده مکرر و بی رویه از ترکیبات ضد کنه‌ی شیمیایی، مقاوم شدن جمعیت جرب‌های قرمز نسبت به آنان و وجود باقیمانده این محصولات در مواد غذایی دامی و محیط، از جمله نگرانی‌های موجود هستند. به همین علت، محققان همواره به دنبال یافتن ترکیبات ضد کنه‌ی طبیعی، جدید و ایمن، مخصوصاً با منشاء گیاهی بوده‌اند. به‌عنوان مثال، طی بررسی اثر اسانس ۱۱ گیاه بر روی جرب قرمز، مشخص شد که ریحان (*Ocimum basilicum*)، گشنیز (*Coriandrum sativum*)، نعنا فلفلی (*Mentha x piperita*) و مرزه (*Satureja hortensis*) مؤثرترین گیاهان هستند (۷۰).

تیمول و کارواکرول از جمله ترکیبات اصلی موجود در آویشن هستند که اثرات ضد کنه‌ای آنان به اثبات رسیده و به خصوص از کارواکرول به‌عنوان یک ضد کنه‌ی قوی بر علیه درمانیسوس گالینه یاد شده است (۷۱). به همین جهت، اثر سمیت ترکیبی کارواکرول و تیمول نیز مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که ترکیب کارواکرول و تیمول در نسبت ۴ به ۱، خاصیت سینرژیستیک داشته و دارای بالاترین اثربخشی بر علیه جرب قرمز طیور، در مقایسه با سایر نسبت‌ها می‌باشد (۷۲). در مطالعه دیگری، Rajabpour و همکاران (۲۰۱۸) اثر ضد کنه‌ای عصاره‌های کنوکارپوس (*Conocarpus erectus*)، خرفه پرپهن (*Portulaca oleracea*) و پسته کوهی (*Pistacia atlantica*) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که اگرچه سمیت تمام عصاره‌ها از آبامکتین کمتر است، اما عصاره‌ی کنوکارپوس، دارای اثر دور کنندگی بر جرب درمانیسوس گالینه بوده و می‌توان از آن به عنوان یک ترکیب ضد کنه‌ی ایمن در مرغداری‌ها استفاده نمود (۷۳). طی مطالعه‌ی Tabari و همکاران (۲۰۲۰) بر روی اسانس ۷ گیاه، مشخص شد که اسانس میخک صدپر با LC90 برابر با 19.7 µg/mL، قوی‌ترین ترکیب ضد کنه بر علیه جرب قرمز در آزمون سمیت تماسی است. این درحالی است که LC90 پرمترین برابر با 210.2 µg/mL بود. از طرفی، اسانس سرخالو (*Litchi chinensis*) توانست سبب مرگ و میر ۸۰ درصد از جرب‌ها شده و به‌عنوان قوی‌ترین عامل در سمیت فاز بخار شناخته شود. میخک صدپر و سرخالو دارای فعالیت ماندگارتری نسبت به سایر گیاهان بودند و خواص آنان را می‌توان به ترتیب، به وجود اوژنول و سزکویی‌ترپن‌های موجود در آنان نسبت داد (۷۴). در مطالعه‌ی دیگری، Amer و همکاران (۲۰۲۰) به ارزیابی اثر یک مخلوط از روغن‌های گیاهی شامل: سیر، میوه گل رز، کلزا و پلی‌سوربات، بر روی جرب قرمز طیور پرداختند. در بررسی برون‌تن این ترکیب، مرگ و میر ۱۰۰ درصد در جرب‌ها مشاهده شد. همچنین با استفاده آشامیدنی از این ترکیب، تعداد جرب‌های بدن پرنده در روزهای ۴، ۷ و ۱۲، به ترتیب به ۰، ۱۰ و ۶۰ درصد کاهش یافتند. بر اساس این نتایج، می‌توان این مخلوط گیاهی بسیار

مـؤثر را بـه‌عنوان جـایگزینی ایمـن بـرای ترکیبـات شـیمیایی در نظـر گرفـت (۷۵). یکـی از منـابع مـورد توجـه بـرای تولیـد محصـولات ضـد کنـه بـا منشـاء گیـاهی، درخـت چـریش (*Azadirachta indica*) اسـت. محصـولات مبتنـی بـر چـریش، حـاوی ترکیبـاتی از جملـه آزادیـراختین (azadirachtin) و سـالانین (salanin) هسـتند کـه دارای اثـرات فعـال بـر علیـه جرب‌هـا و حشـرات می‌باشـند. در ایـن راسـتا، Camarda و همکـاران (۲۰۱۸) بـه بررسـی اثـر یـک محصـول جدیـد مبتنـی بـر روغـن چـریش در یـک مزرعه مرغ تخم‌گـذار پرداختنـد. پـس از سـه بـار تجـویز ایـن محصـول بـه صـورت نبـولایز، جمعیـت جرب‌هـای قرمـز بـه میـزان ۹۹/۸۰ درصـد کـاهش یافـت و اثـرات آن بـه مـدت بـیش از ۲ مـاه ادامـه داشـت (۷۶). در مجمـوع، آفت‌کش‌هـای گیـاهی می‌تواننـد جـایگزینی مناسـب و ایمـن بـرای ترکیبـات شـیمیایی باشـند، امـا لازم اسـت تـا مطالعـات بیشـتری در خصـوص روش مناسـب اسـتفاده، دوز صـحیح و کـارایی آنـان در شـرایط بـالینی صـورت گیـرد. در جـدول ۱، بـه سـایر مطالعـات صـورت گرفتـه در خصـوص ترکیبـات ضـدکنه اشـاره شده است.

جدول ۱- ترکیبات ضد کنه‌ی مختلف، نحوه اثر و سایر مطالعات صورت گرفته در خصوص آنها

گروه ترکیب ضد کنه	مکانیسم عمل	ترکیبات	اثر بر جرب درمانیسوس گالینه	منابع
ترکیبات ارگانوکلره	اتصال به جایگاه پیکروتوکسینین در کمپلکس گابا	DDT	در بررسی برون‌تن،DDT با LC50 برابر با ۱۵۱۴ $\mu g/m^2$، بر جرب قرمز بی‌اثر بود.	(۴۴)
		HCH	در بررسی برون‌تن، HCH با LC50 برابر با ۲۸۵۷۰ $\mu g/m^2$، بر جرب قرمز بی‌اثر بود.	
ترکیبات ارگانوفسفاته	مهار استیل‌کولین-استراز	دی‌کلوروس	در بررسی برون‌تن، دی کلوروس با LC50 برابر با ۰/۰۲ w/v بر روی جرب‌ها فعال بود و هیچ‌گونه مقاومتی نسبت به آن دیده نشد.	(۴۷)
			طی بررسی برون‌تن ۱۱ ترکیب ضد کنه بر روی جرب‌های قرمز به دست آمده از ۵ منطقه در کره جنوبی، مشخص شد که دی‌کلوروس، به جز در یک منطقه، دارای اثر بخشی ۱۰۰ درصدی بر جرب قرمز است.	(۷۷)
		متریفونات	تله‌های آغشته به ۲ درصد متریفونات در خارج از دسترس مرغ‌های تخم‌گذار و در محل تجمع جرب درمانیسوس گالینه قرار گرفته و هر دو روز درمیان به مدت دو هفته تعویض شدند. مشخص شد که این استراتژی بسیار مؤثر بوده و توانست سبب ۹۹ درصد کاهش در تعداد جرب‌های قرمز شود.	(۷۸)
		فنیتروتیون	در بررسی برون‌تن ، LC50 فنیتروتیون برابر با ۶۷۲/۱ $\mu g/m^2$ بوده و نسبت به آن مقاومت وجود داشت.	(۴۴)
		فوکسیم	سالن مرغداری ۲ بار (به فاصله ۷ روز) با محلول ۲۰۰۰ ppm فوکسیم، اسپری شد. ۳ روز پس از اولین اسپری، اثر بخشی فوکسیم برابر با ۹۶،۱ درصد و در روز ۷ (پس از اسپری دوم) تا آخر آزمایش (در روز ۴۹)، اثر بخشی این محصول بیش از ۹۹درصد بود. در سالن درمان نشده، جمعیت جرب‌ها به میزان ۴۰۰درصد افزایش یافت.	(۴۶)
پایرتروئیدها	اثر بر روی کانال‌های سدیمی حساس به ولتاژ	دلتامترین	در بررسی برون‌تن، دلتامترین با LC50 برابر با ۷/۸ $\mu g/m^2$، سمی‌ترین پایرتروئید تست شده بر جرب قرمز بود.	(۴۴)
		پرمترین	در بررسی برون‌تن، LC50 پرمترین برابر با ۰/۰۶ - ۰/۲۸ w/v بود و تمامی جرب‌های قرمز مورد مطالعه، نسبت به آن مقاوم بودند.	(۴۷)
		بایفنترین	طی بررسی برون‌تن صورت گرفته در کره جنوبی، حتی زمانی که بایفنترین ۱۰۰ بار رقیق شد، فعالیت ضد کنه‌ای بالایی (۱۰۰ درصد) بر جرب قرمز طیور داشت.	(۷۷)
		سایپرمترین ، فلووالینات و سیفلوترین	طی مطالعه برون‌تن Katsavou و همکاران (۲۰۲۰) که بر روی ۵۳ جمعیت جرب قرمز طیور (از ۱۵ کشور اروپایی) صورت گرفت. مشخص شد که LC50 هر سه ترکیب، بیش از ۱۰۰۰ mg a.i./L است و مقاومت بسیار شدیدی در جرب‌های قرمز یونان نسبت به این ترکیبات، مشاهده شد. (مقاومتی که بیش از ۱۰ هزار برابر، بیشتر از سویه آزمایشگاهی حساس بود).	(۷۹)
لاکتون‌های ماکروسیکلیک	آگونیست گابا، اتصال به گیرنده گلوتامات.	آیورمکتین	طی مطالعه Arisova (۲۰۲۰)، یک داروی مبتنی بر آیورمکتین با دوز ۰/۴ ml/L در آب آشامیدنی ماکیان، ۲ بار به فاصله ۲۴ ساعت تجویز گردید. این دارو، یکبار دیگر در روز ۱۴ آزمایش نیز تجویز شد و میزان اثربخشی آن برابر با ۹۵/۶ ٪ بود.	(۸۰)

		آیورمکتین، سلامکتین و موکسی-دکتین	سه گروه قناری آلوده به درمانیسوس گالینه، با این سه دارو تحت درمان قرار گرفتند. بدین صورت که از داروها به صورت موضعی در زیر کتف قناری‌ها استفاده شد. اما هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین سه گروه درمانی مشاهده نشد. در نهایت، نویسنده معتقد است که می‌توان این ترکیبات را به‌عنوان داروهایی مؤثر بر جرب قرمز در قناری در نظر گرفت.	(۸۱)
کاربامات‌ها	مهار استیل‌کولین-استراز	کاربارایل	در این مطالعه برون‌تن، کاربارایل با LC90 برابر با ۰/۸۳ ppm، دومین ترکیب سمی و مؤثر بر جرب قرمز طیور (به‌دست آمده از لانه کبوتران) بود.	(۸۲)
			طی بررسی برون‌تن در کره جنوبی، مشخص شد که کاربارایل در اکثر نواحی (به جز شهر گیونگجو) فعالیت ضد کنه‌ای ۱۰۰ درصدی بر جرب قرمز طیور دارد.	(۷۷)
		پروپوکسور	در این مطالعه برون‌تن (تست تماسی) LC90 سه جدایه‌ی فیلدی جرب قرمز از ۱۰۰۰ ppm فراتر رفته بود که بیانگر کاهش حساسیت آنان به پروپوکسور می‌باشد.	(۴۹)
		بندیوکارب	با بررسی برون‌تن صورت گرفته، بندیوکارب با LC90 برابر با ۰/۱۸ ppm، مؤثرترین ترکیب بر جرب قرمز (به‌دست آمده از لانه کبوتران) بود.	(۸۲)
آمیتراز	اثر بر گیرنده اوکتاپامین	آمیتراز	طی این مطالعه برون‌تن، آمیتراز با LC50 برابر با ۴۰/۸ $\mu g/m^2$، بر جرب قرمز نسبتاً مؤثر بود.	(۴۴)
اسپینوساد	اسپینوسین A: گیرنده استیل‌کولین. اسپینوسین D: گیرنده گابا.	اسپینوساد	اسپینوساد در آزمایش برون‌تن بسیار مؤثر بوده و در دوز ۳/۸۸ g/L ، اثر آن تا ۲۱ روز باقی ماند. طی آزمایش درون‌تن، تنها با یک‌بار استفاده از اسپینوساد (چه به میزان ۱/۹۴ g/L و چه ۳/۸۸ g/L)، اثرات آن بر جرب، در طول آزمایش (۲۸ روز) باقی ماند. و بیشترین اثربخشی آن در روز ۱۴ پس از اسپری بود. استفاده از این محصول اثری بر تولید تخم‌مرغ و یا وزن مرغان نداشت و میتوان از آن به صورت مؤثری حتی در هنگام حضور مرغان نیز استفاده نمود.	(۶۲)
فلورالانر	اتصال به کانال-های کلراید وابسته به ال-گلوتامات و گابا.	فلورالانر	فلورالانر پس از تجویز در دوز ۰/۵ mg/kg (دو بار به فاصله ۷ روز به صورت آشامیدنی)، به سرعت جذب شده و حداقل تا ۱۵ روز در پلاسما باقی می‌ماند که این مدت زمان، مطابق با ۲ چرخه زندگی جرب است. این مدت زمان، آنقدر کافی است که بتواند سبب شکسته شدن چرخه زندگی جرب و کاهش جمعیت آن به میزان بیش از ۹۹٪ شود.	(۶۶)
ترکیبات ضد کنه با منشاء گیاهی	مکانیسم‌های متفاوت (بسته به گونه‌ی گیاه و مواد موجود در آن).	چریش (*Azadira chta indica*)	اثر محصولی مبتنی بر عصاره دانه چریش بر روی جرب‌های قرمز، مورد بررسی برون‌تن قرار گرفت. بدین منظور کاغذ صافی با ۴۰۰ µl از محلول (دوز ۷ $\mu l/cm^2$) مرطوب شد. تماس دائمی با این ترکیب، دارای اثربخشی ۱۰۰ درصد بر جرب‌ها بود. ظاهراً هیچ‌گونه مقاومتی نسبت به این ترکیب مشاهده نشد و دوزهای پایین آن هم دارای اثربخشی بالایی بودند.	(۳۷)
		اجوان (*Trachys permum ammi*)	در ارزیابی برون‌تن صورت گرفته توسط Baran و همکاران (۲۰۲۰)، سایپرمترین، اسانس گیاه اجوان و تیمول توانستند در غلظت ۵۰ $\mu g/cm^2$ سبب مرگ و میر بیش از ۹۰ ٪ در جرب‌ها شوند. اما عصاره الکلی گیاه در غلظت ۱۵۰ $\mu g/cm^2$ توانست به این میزان دست یابد. طبق این مطالعه، اجوان دارای اثرات ضدکنه‌ای رضایت بخشی است.	(۸۳)
		سیر (*Allium sativum*)	طی این مطالعه درون‌تن، عصاره سیر ۲ بار (در روزهای ۱ و ۸) در مزرعه مرغان تخم‌گذار اسپری شده و برای سنجش میزان اثربخشی آن، از تله‌های مقوایی استفاده شد. این عصاره موفق عمل کرده و اثربخشی آن در از بین بردن جرب درمانیسوس گالینه (پس از ۲ بار اسپری) برابر با ۹۶/۴۷ درصد بود.	(۳۶)

بحث و نتیجه‌گیری

علی‌رغم وجود راهکار جدید در سال‌های اخیر، هنوز پر مصرف‌ترین ترکیبات برای کنترل آلودگی با جرب قرمز طیور، ترکیبات ضد کنه‌های سنتتیک هستند. با این وجود، محصولات بسیار کمی برای تجویز در مزارع طیور، مجوز گرفته‌اند. به‌عنوان مثال استفاده از ترکیباتی از قبیل کاربارایل، فنیتروتیون، دی کلوروس و پروپوکسور از سال ۲۰۰۷ در اتحادیه‌ی اروپا ممنوع شده است (۱۰) و در حال حاضر، اسپینوساد، فوکسیم و فلورالانر، تنها محصولاتی هستند که برای مصرف در حضور حیوان، در اکثر کشورهای اروپایی، مجوز گرفته‌اند (۵۰). امروزه ایجاد مقاومت نسبت به ترکیبات ضد کنه، به یک چالش بزرگ تبدیل شده و با توجه به اثرات اقتصادی عظیم درمانیسوس گالینه، تلاش‌های بسیاری برای مرتفع ساختن آلودگی با آن صورت گرفته است. عوامل مؤثر بر میزان حساسیت آفات را می‌توان به طور کلی در سه دسته‌ی عوامل

بیولوژیک (از جمله پتانسیل تولید مثلی، توزیع، دامنه‌ی میزبانی)، عوامل ژنتیکی (ازجمله حضور ژن‌های مقاومت) و عوامل عملیاتی (از جمله طیف فعالیت ترکیبات ضد کنه، میزان استفاده، میزان پوشش و دفعات درمان با آن) قرار داد. در این میان، درمانیسوس گالینه دارای پتانسیل بالایی برای مقاوم شدن به ترکیبات ضد کنه‌های مختلف است، چراکه اندازه‌ی جمعیت آن بسیار بالاست، پتانسیل تولید مثلی بالایی دارد، قابلیت پخش زیادی دارد و نسبتاً دارای دامنه‌ی میزبانی بالقوه‌ی وسیعی است. از سوی دیگر، اکثر ترکیبات ضد کنه بر روی یک محل هدف خاص، فعال هستند که این امر، به صورت بالقوه، یک فاکتور مهم در پدیدار شدن جرب‌های مقاوم نسبت به آنان می‌باشد (۵۰). به همین جهت توصیه شده است تا از ترکیبات ضد کنه‌ای با مکانیسم عمل متفاوت به صورت چرخشی استفاده شود (۳۸). مبرهن است که در صورت استفاده نادرست، بی رویه و غیر قانونی از برخی ترکیبات ضد کنه، جمعیت‌های مقاوم جرب درمانیسوس گالینه در یک منطقه شکل می‌گیرند. در این حالت، علی‌رغم صرف هزینه، آلودگی از بین نرفته و همچنان در مزرعه باقی می‌ماند. از سوی دیگر، برخی از مرغداران، به گمان افزایش اثربخشی یک ترکیب ضد کنه، غلظت آن را بالا می‌برند که این امر، می‌تواند منجر به حضور باقیمانده‌ی آن ترکیبات در محصولات طیور و متعاقباً انتقال آنان به انسان شود (۳۹، ۶۰).

غلظت، یکی از مسائل مهم در استفاده از ترکیبات ضد کنه‌ها است و باید در نظر داشت که استفاده از غلظت‌های کم و یا زیاد ترکیبات ضد کنه، می‌تواند سبب شکل‌گیری جمعیت‌های مقاوم شود. به همین علت توصیه می‌شود تا مرغداران، همواره از غلظت توصیه شده توسط شرکت سازنده استفاده نمایند. برخی گمان دارند که لزوماً با افزایش غلظت یک ترکیب ضد کنه، میزان فعالیت جرب‌کشی آن افزایش می‌یابد. اما مشخص شده است جمعیت‌های مقاوم جرب قرمز طیور، حتی در غلظت‌های بالای ترکیبات ضد کنه نیز متأثر نمی‌شوند (۵۰). بنابراین، باید مرغداران را در ارتباط با این موضوع آگاه ساخت تا از مصرف بی‌رویه و نادرست ترکیبات ضد کنه‌ها اجتناب شود.

از سوی دیگر اسپری کردن ترکیبات ضد کنه در بین دو دوره‌ی تولید، یک امر ضروری و بسیار مؤثر در کاهش و یا حتی حذف انگل‌های خارجی می‌باشد. اما در چین، تنها ۲۴٫۸ درصد از مزارع تخم‌گذار تجاری و ۳۶٫۱ درصد از مزارع مادر، در بین دو دوره، اقدام به استفاده از ترکیبات ضد کنه می‌کنند (۲۰). از سوی دیگر، به دلایل مختلفی از جمله عدم تأثیر اکثر ترکیبات ضد کنه‌ها بر تخم جرب‌ها، امکان عدم مواجه کافی جرب با ترکیبات ضد کنه در نوبت اول درمان و مخفی شدن جرب در درز و شکاف‌های سالن مرغداری، احتمال عود آلودگی پس از نوبت اول درمان وجود دارد. در نتیجه لازم است تا یک الی دو هفته پس از درمان اول، درمان دوم صورت گیرد. اما در چین ۳۴٫۶ درصد از مزارع تخم‌گذار و ۲۵٫۷ درصد از مزارع مادر، پرندگان خود را در طی دو هفته پس از درمان اول، مورد درمان ثانویه قرار نمی‌دهند، که این امر می‌تواند یکی از دلایل اصلی عدم موفقیت آنان در کنترل انگل‌های خارجی باشد (۲۰). بنابراین، آموزش مرغداران را باید به‌عنوان یک اصل مهم در کنترل جرب درمانیسوس گالینه در نظر گرفت. در حال حاضر، مدیریت یکپارچه‌ی آفات، رعایت اصول امنیت زیستی و نظارت بر آلودگی، به‌عنوان بهترین روش‌های موجود برای کنترل جرب قرمز طیور در نظر گرفته شده و می‌توان با مدیریت صحیح، استفاده از ترکیبات ضد کنه‌های مؤثر در غلظت مناسب، نظارت منظم بر استفاده از ترکیبات ضد

کنـه، انجـام مطالعـات متعـدد و مسـتمر بـه منظـور شناسـایی زود هنگـام مقاومـت و چـرخش در اسـتفاده از ترکیبـات ضـد کنـه، میـزان بـروز مقاومـت نسـبت بـه ترکیبـات ضـد کنـه‌ها را کـاهش داد (۳۸). پیشـنهاد می‌شـود مطالعـات بیشـتری در خصـوص اثـرات جـرب قرمـز طیـور در ایـران صـورت گیـرد تـا میـزان خسـارات حاصـله و الگـوی مقاومـت آن نسـبت بـه ترکیبـات ضـد کنـه‌هـای مختلـف در منـاطق مختلـف ایـران مشـخص گـردد و بتـوان بـا مـدیریت یکپارچـه‌ی آفـات، میـزان آلودگی با جرب مذکور را تا حد امکان کاهش داد.

References

1- Chauve C. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet Parasitol.*1998; 79(3): 239–45.

2- Rahbari S, Nabian S, Ronaghi H. Haematophagus Mites in Poultry Farms of Iran. *Iran J Arthropod Borne Dis*. 2009; 3(2): 18–21.

3- Maurer V, Bieri M, Folsch DW. Das Suchverhalten von *Dermanyssus gallinae* in Huhnerstallen. Host-finding of *Dermanyssus gallinae* in poultry houses. *Arch Geflugelk*. 1988; 52: 209-15.

4- Nakamae H, Fujisaki K, Kishi S, Yashiro M, Oshiro S, Furuta K. The new parasitic ecology of chicken mites *Dermanyssus gallinae*, parasitizing and propagating on chickens even in the daytime. *Jpn Poult Sci*. 1997; 34(2): 110-16.

5- Maurer V, Baumgartner J. Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). Exp Appl Acarol. 1992; 15(1): 27–40.

6- Hoglund J, Nordenfors H, Uggla A. Prevalence of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, in different types of production systems for egg layers in Sweden. Poult Sci. 1995; 74(11): 1793-98.

7- Axtell RC. Poultry integrated pest management; status and future. *Integr Pest Manag Rev*.1999; 4: 53–73.

8- Kilpinen O, Roepstorff A, Permin A, Norgaard-Nielsen G, Lawson LG, Simonsen HB. Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). Br Poult Sci. 2005; 46(1): 26-34.

9- Nordenfors H, Hoglund J, Uggla A. Effects of temperature and humidity on oviposition, molting, and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *J Med Entomol*. 1999; 36(1): 68-72.

10- Sparagano OAE, George DR, Harrington DW, Giangaspero A. Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Annu Rev Entomol. 2014; 59: 447-66.

11- Mul MF. Advancing Integrated Pest Management for *Dermanyssus gallinae* in laying hen facilities. Wageningen University; 2017.

12- George DR, Finn RD, Graham KM, Mul MF, Maurer V, Moro CV, Sparagano OAE. Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? Parasit Vectors. 2015; 25; 8:178.

13- De Luna CJ, Arkle S, Harrington D, George DR, Guy JH, Sparagano OAE. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* as a potential carrier of vector-borne diseases. Ann NY Acad Sci. 2008; 1149: 255–8.

14- Van Emous R. Wage war against the red mite. Poult Int. 2005; 44: 26-33.

15- Cosoroaba I. Massive *Dermanyssus gallinae* invasion in battery-husbandry raised fowls. Rev Med Vet. 2001; 152: 89-96.

16- Kowalski A, Sokół R. Influence of *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) invasion on the plasma levels of corticosterone, catecholamines and proteins in layer hens. Pol J Vet Sci. 2009; 12(2):231-5.

17- Tomley FM, Sparagano O. Spotlight on avian pathology: red mite, a serious emergent problem in layer hens. Avian Pathol. 2018; 47 (6); 533–535.

18- Van Emous R. Verwachtte schade bloedluis 21 miljoen euro. [Internet]. Netherlands; Available from: https://www.pluimveeweb.nl/artikel/163578-verwachtte-schade-bloedluis-21-miljoen-euro/. Updated 2017 januari 17.

19- Sparagano O, Pavlicevic A, Murano T, Camarda A, Sahibi H, Kilpinen O, *et al.* Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. Exp Appl Acarol. 2009; 48(1-2): 3-10.

20- Wang FF, Wang M, Xu FR, Liang DM, Pan BL. Survey of prevalence and control of ectoparasites in caged poultry in China. Vet Rec. 2010; 167(24): 934–7.

21- Fiddes MD, Le Gresley S, Parsons DG, Epe C, Coles GC, Stafford KA. Prevalence of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in England. Vet Rec. 2005; 157(8): 233-5.

22- Guy JH, Khajavi M, Hlalel MM, Sparagano O. Red mite (*Dermanyssus gallinae*) prevalence in laying units in northern England. Br Poult Sci. 2004; 45 (Suppl.): 15-6.

23- Cencek T. Prevalence of *Dermanyssus gallinae* in poultry farms in Silesia Region in Poland. Bull Vet Inst Pulawy. 2003; 47: 465–469.

24- Mul M. Fact sheet: The Poultry Red Mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) A small pest that packs a big punch [Internet]. Wageningen UR Livestock Research; Available from: https://www.researchgate.net/publication/258553789_Fact_sheet_Poultry_Red_Mite_in_Europe, uploaded on 2014 May 21.

25- Eslami A, Ghaemi P, Rahbari S. Parasitic Infections of Free –Range Chickens from Golestan Province, Iran. Iranian J Parasitol. 2009; 4(3): 10-14.

26- Razmi GR, Moaveni M, Kalidari GA. Epidemiological study of *Dermanyssus gallinae* infestation in egg laying flocks of Mashhad area, Iran. 4th National Symposium of Poultry Health and Diseases, Iran. 2008; P: 329-331 [In Persian].

27- Roy L ,Chauve CM. Historical review of the genus Dermanyssus Duges, 1834 (Acari: Mesostigmata: *Dermanyssidae*). Parasite. 2007; 14(2): 87-100.

28- Declerq J, Nachtegaele L. *Dermanyssus gallinae* infestation in a dog. Canine Pract. 1993; 18(4): 34-6.

29- Grant DI. Parasitic skin diseases in cats. J Small Anim Pract. 1989; 30(4): 250–4.

30- Mignon B, Losson B. Dermatitis in a horse associated with the poultrymite (*Dermanyssus gallinae*). Vet Dermatol. 2008; 19(1): 38-43.

31- Allymehr M, Tavassoli M, Manoochehri MH, Ardavan D. Ectoparasites and gastrointestinal helminths of house mice (*Mus musculus*) from poultry houses in northwest Iran. Comp Parasitol. 2012; 79(2): 283–7.

32- Cafiero MA, Barlaam A, Camarda A, Radeski M, Mul M, Sparagano O, *et al.* *Dermanysuss gallinae* attacks humans. Mind the gap. Avian Pathol. 2019; 48(sup1): S22-S34.

33- Dogramaci AC, Culha G, Ozçelik S. *Dermanyssus gallinae* infestation: an unusual cause of scalp pruritus treated with permethrin shampoo. J Dermatolog Treat. 2010; 21(5): 319-21.

34- Abdigoudarzi M, Mirafzali MS, Belgheiszadeh H. Human Infestation with *Dermanyssus gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*) in a Family Referred with Pruritus and Skin Lesions. J Arthropod-Borne Dis. 2014; 8(1): 119-123.

35- Cafiero MA, Galante D, Camarda A, Giangaspero A, Sparagano O. Why dermanyssosis should be listed as an occupational hazard. Occup Environ Med. 2011; 68(8): 628.

36- Faghihzadeh Gorji S, Faghihzadeh Gorji S, Rajabloo M. The field efficacy of garlic extract against *Dermanyssus gallinae* in layer farms of Babol, Iran. Parasitol Res. 2014; 113(3): 1209-13

37- Abdel-Ghaffar F, Semmler M, Al-Rasheid K, Mehlhorn H. In vitro efficacy of ByeMite and MiteStop on developmental stages of the red chicken mite *Dermanyssus gallinae*. Parasitol Res. 2009; 105(5): 1469-71.

38- Abbas RZ, Colwell DD, Iqbal Z, Khan A. Acaricidal drug resistance in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) and approaches to its management. World's Poult Sci J. 2014; 70(1): 113-124.

39- Ahmad R, Salem NM, Estaitieh H. Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan. Chemosphere. 2010; 78(6): 667-71.

40- Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. Environ Health Perspect. 2007; 115(10):1406-14.

41- Longnecker MP, Rogan WJ, Lucier G. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. Annu Rev Public Health. 1997; 18: 211-44.

42- Perveen F. Insecticides- Advances in Integrated Pest Management. Rijeka: InTech; 2011, P: 251-254.

43- Tao S, Liu WX, Li XQ, Zhou DX, Li X, Yang YF, *et al.* Organochlorine pesticide residuals in chickens and eggs at a poultry farm in Beijing, China. Environ Pollut. 2009; 157(2): 497-502.

44- Zeman P, Zelezný J. The susceptibility of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778), to some acaricides under laboratory conditions. Exp Appl Acarol. 1985; 1(1):17-22.

45- Pritchard J, Kuster T, Sparagano O, Tomley F. Understanding the biology and control of

the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*: a review. Avian Pathol. 2015; 44(3): 143-53.

46- Meyer-Kühling B, Pfister K, Müller-Lindloff J, Heine J. Field efficacy of phoxim 50% (ByeMite) against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* in battery cages stocked with laying hens. Vet Parasitol. 2007; 147(3-4): 289-96.

47- Beugnet F, Chauve C, Gauthey M, Beert L. Resistance of the red poultry mite to pyrethroids in france. Vet Rec. 1997; 140(22): 577-9.

48- Nordenfors H, Hoeglund J. Long-term dynamics of *Dermanyssus gallinae* in relation to control measures in aviary systems for layers. Br Poult Sci. 2000; 41(5): 533-40.

49- Thomas E, Zoller H, Liebisch G, Alves LFA, Vettorato L, Chiummo RM, *et al.* In vitro activity of fluralaner and commonly used acaricides against *Dermanyssus gallinae* isolates from Europe and Brazil. Parasit Vectors. 2018; 11(1): 361.

50- Pugliese N, Circella E, Cocciolo G, Giangaspero A, Horvatek Tomic D, Kika TS, *et al.* Efficacy of λ-cyhalothrin, amitraz, and phoxim against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 (Mesostigmata: Dermanyssidae): an eight-year survey. Avian Pathol. 2019; 48(sup1): S35-S43.

51- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life. 2007; 59(3): 151-62.

52- Marangi M, Cafiero MA, Capelli G, Camarda A, Sparagano OAE, Giangaspero A. Evaluation of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*) susceptibility to some acaricides in field populations from Italy. Exp Appl Acarol. 2009; 48(1-2): 11-8.

53- Alimehr M, Tavassoli M, Yousefian E. Susceptibility of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*) isolated from the layer farms to some acaricides. Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences. 2018; 11(2): 121-129 [In Persian].

54- Hadadzadeh HR, Torabi Goudarzi M, Rezaeian M. Evaluation of the effect of deltamethrin on dermanysus gallinae in an egg layer house in qom province in iran. Scientific-research Iranian veterinary journal. 2001; 4 (7): 29-35 [In Persian].

55- Campbell WC. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. Curr Pharm Biotechnol. 2012; 13(6): 853-65.

56- Xu X, Wang C, Zhang S, Huang Y, Pan T, Wang B, *et al.* Acaricidal efficacy of orally administered macrocyclic lactones against poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) on chicks and their impacts on mite reproduction and blood-meal digestion. Parasit Vectors. 2019; 12(1): 345.

57- Zeman P. Systemic efficacy of ivermectin against *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) in fowls. Vet Parasitol. 1987; 23(1-2): 141-6.

58- Ash LS, Oliver JH Jr. Susceptibility of *Ornithodoros parkeri* (Cooley) (Acari: *Argasidae*) and *Dermanyssus gallinae* (DeGeer) (Acari: *Dermanyssidae*) to ivermectin. J Med Entomol. 1989; 26(3): 133-9.

59- Cencek T, Zdybel J, Włodarczyk-Ramus M, Karamon J, Dempkowska-Kutrzepa M, Roczeń-Karczmarz, M. In vitro evaluation of the effectiveness of commercially available acaricides against the populations of red mites (*dermanyssus gallinae*) occurring in poland. 3rd COST conference, Portugal, 2017. P: 44.

60- Marangi M, Morelli V, Pati S, Camarda A, Cafiero MA, Giangaspero A. Acaricide Residues in Laying Hens Naturally Infested by Red Mite *Dermanyssus gallinae*. PLoS ONE. 2012; 7(2): e31795.

61- Kirst HA. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. J Antibiot. 2010; 63(3): 101–11.

62- George DR, Shiel RS, Appleby WG, Knox A, Guy JH. In vitro and in vivo acaricidal activity and residual toxicity of spinosad to the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Vet Parasitol. 2010; 173(3-4): 307-16.

63- Liebisch G, Hack R, Smid GA. Efficacy of spinosad against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata: *Dermanyssidae*), in laboratory and field trials. Zoosymposia. 2011; 6: 282-7.

64- Thomas E, Chiquet M, Sander B, Zschiesche E, Flochlay AS. Field efficacy and safety of fluralaner solution for administration in drinking water for the treatment of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestations in commercial flocks in Europe. Parasit Vectors. 2017; 10(1): 457.

65- Brauneis MD, Zoller H, Williams H, Zschiesche E, Heckeroth AR. The acaricidal speed of kill of orally administered fluralaner against poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) on laying hens and its impact on mite reproduction. Parasit Vectors. 2017; 10(1): 594.

66- Dolz, R. Introduction of exzolt (fluralaner 10 mg/ml solution) a new product for treatment of poul-

try red mite infestation in chickens. 3rd COST conference, Portugal. 2017. P: 26.

67- European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use [Internet]. United Kingdom ;Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_ assessment_report/veterinary/004344/WC500236953.pdf. Accessed 12 June 2018.

68- Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ-aminobutyric acid and L glutamate gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. Insect Biochem Mol Biol. 2014; 45: 111–24.

69- Prohaczik A, Menge M, Huyghe B, Flochlay-Sigognault A, Le Traon G. Safety of fluralaner oral solution, a novel systemic antiparasitic treatment for chickens, in laying hens after oral administration via drinking water. Parasit Vectors. 2017; 10(1): 363.

70- Magdaş C, Cernea M, Baciu H, Şuteu E. Acaricidal effect of eleven essential oils against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*). Sci Parasitol. 2010; 11(2): 71-75.

71- Tabari MA, Youssefi MR, Barimani A, Araghi A. Carvacrol as a potent natural acaricide against *Dermanyssus gallinae*. Parasitol Res. 2015; 114(10): 3801-3806.

72- Masoumi F, Youssefi MR, Tabari MA. Combination of carvacrol and thymol against the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). Parasitol Res. 2016; 115(11): 4239-4243.

73- Rajabpour A, Mashhadi ARA, Ghorbani MR. Acaricidal and repellent properties of some plant extracts against poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata: *Dermanyssidae*). Persian J Acarol. 2018; 7(1): 85–91.

74- Tabari MA, Rostami A, Khodashenas A, Maggi F, Petrelli R, Giordani C, *et al.* Acaricidal activity, mode of action, and persistent efficacy of selected essential oils on the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). Food Chem Toxicol. 2020; 138: 111207.

75- Amer AM, Amer MM, Mekky HM, Fedawy HS. Effect of Combined Plant Essential Oils on *Dermanyssus gallinae*: In vitro and in vivo study. World Vet J. 2020; 10(2): 199-206.

76- Camarda A, Pugliese N, Bevilacqua A, Circella E, Gradoni L, George D, *et al.* Efficacy of a novel neem oil formulation (RP03™) to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Med Vet Entomol. 2018; 32(3): 290-297.

77- Lee SJ, Yoon JU, Park GH, Kim HK, Kim GH. Evaluation of susceptibility of red poultry mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*) in Five regions to 11 acaricides. Korean J Appl Entomol. 2017; 56(4): 427-434.

78- Chirico J, Tauson R. Traps containing acaricides for the control of *Dermanyssus gallinae*. Vet Parasitol. 2002; 110(1-2): 109-116.

79- Katsavou E, Vlogiannitis S, Karp-Tatham E, Blake DP, Ilias A, Strube C, *et al.* Identification and geographical distribution of pyrethroid resistance mutations in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Pest Manag Sci. 2020; 76(1): 125-133.

80- Arisova GB. Efficacy of Ivermectin-Based Drugs against Ectoparasites in Broiler Chickens. World Vet J. 2020; 10(2): 160-164.

81- Todisco G, Paoletti B, Giammarino A, Manera M, Sparagano OA, Iorio R, *et al.* Comparing therapeutic efficacy between ivermectin, selamectin, and moxidectin in canaries during natural infection with *Dermanyssus gallinae*. Ann N Y Acad Sci. 2008; 1149(1): 365-367.

82- Fletcher MG, Axtell RC. Susceptibilities of northern fowl mite, *Ornithonyssus sylviarum* (Acarina: *Macronyssidae*), and chicken mite, *Dermanyssus gallinae* (Acarina: *Dermanyssidae*), to selected acaricides. Exp Appl Acarol. 1991; 13(2): 137-142.

83- Baran AI, Jahanghiri F, Hajipour N, Sparagano OAE, Norouzi R, Moharramnejad S. In vitro acaricidal activity of essential oil and alcoholic extract of *Trachyspermum ammi* against *Dermanyssus gallinae*. Vet Parasitol. 2020; 278: 109030.

A review on control and treatment of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*)

Amir Asghari Baghkheirati, Seyed Mostafa Peighambari*

Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: July 16, 2020; Revise: August 28, 2020; Accept: September 17, 2020

Summary

Poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, is the most important haematophagus ectoparasite in layer and breeder flocks in many countries. Infestation with this obligate parasite is very common and according to the epidemiological reports, 83 percent of the European farms are infested with this parasite. Also, *D. gallinae* has been described as the most prevalent and important pest of poultry in Iran. Infestation with red mite can lead to reduced egg production, stress, immunosuppression, feather pecking, cannibalism, anaemia and death. Besides, it has been proved that this mite can transmit some pathogens like *Salmonella*. Furthermore, infestation of human with *D. gallinae* has been increasingly reported from different countries, including Iran. Although diverse methods have been reported for control of this mite in poultry houses, the main approach has been relied on the use of synthetic acaricides. The objectives of this review study were to investigate the various aspects of the *D. gallinae* infestation, describe different acaricides, and evaluate the effects of each acaricide on this parasite.

Key words: *Acaricides, Dermanyssus gallinae, Ectoparasite, Poultry, Red mite.*

بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* جدا شده از گوسفندان مبتلا به لنفادنیت پنیری شهرستان بینالود مشهد

رضا محمد زاده[۱]، حمید رضا فرزین[۲*]، مجید جمشیدیان مجاور[۳]

۱- دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور مشهد، مشهد، ایران.
۲،۳- استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ مرداد ۱۳۹۹، بازنگری: ۱۲ شهریور ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

لنفادنیت پنیری یک بیماری عفونی پوستی بسیار شایع در بین گوسفندان و بزها در سراسر جهان است که عامل این بیماری باکتری *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* است. ایجاد این بیماری در بین دام‌ها همواره ضررهای اقتصادی چشمگیری به همراه دارد. در این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه از آبسه‌های موجود در موارد دام زنده و لاشه‌های کشتارگاه دام در شهرستان مشهد و بینالود مورد بررسی قرار گرفت. جهت نمونه‌گیری از عقده‌های لنفاوی دارای تورم و چرک، به وسیله سرنگ نمونه از داخل غدد متورم به مقدار حدود ۱ سی‌سی جمع‌آوری شد و سرنگ حاوی نمونه در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به محیط کشت BHI براث انتقال داده شدند و پس از تأیید توسط تست‌هایی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم ، تست کاتالاز و تشخیص از روی پرگنه باکتری، دیسک‌گذاری جهت تعیین میزان مقاومت و حساسیت جدایه‌ها به روش کربی بائر انجام شد. بررسی تعیین میزان حساسیت و مقاومت در جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک داکسی سایکلین (۷۲/۵ درصد) بود و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول تری‌متوپریم (۱۷/۵ درصد) بود. روش دیسک دیفیوژن آگار می‌تواند به عنوان یک روش غربالگری اولیه و ابتدایی جهت تعیین میزان مقاومت و حساسیت استفاده گردد لذا برای بررسی دقیق میزان مقاومت جدایه‌ها می‌توان از روش ژنوتیپی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: لنفادنیت پنیری، *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

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

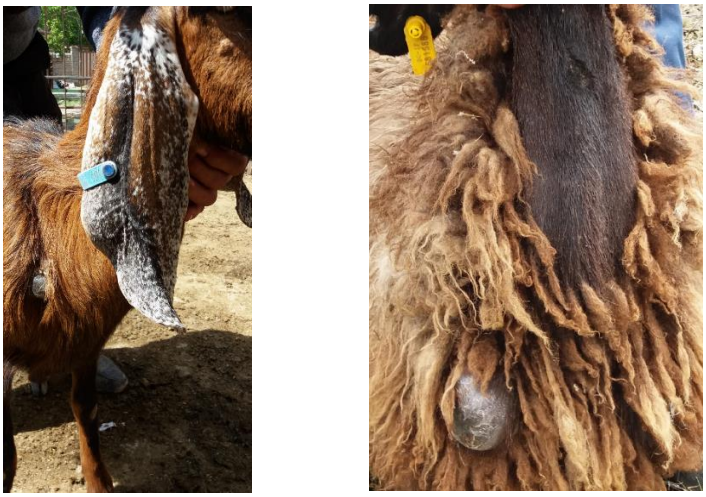
مقدمه

بیماری لنفادنیت پنیری یک بیماری پوستی مزمن می‌باشد که به صورت آبسه‌های جلدی در غدد لنفاوی و اندام‌های احشایی بز و گوسفند نمایان می‌گردد که غالباً این ضایعات دارای چرک سبز و یا سفیدرنگ می‌باشند. درگیری اندام‌های داخلی به خصوص ریه‌ها، شایع‌ترین ویژگی لنفادنیت پنیری در گوسفند است، در حالی که بیماری در بزها اغلب توسط جذب در گره‌های لنفاوی سطحی تظاهر می‌نماید (۱، ۲، ۳). این بیماری در سرتاسر جهان سبب خسارات شدیدی در تولید پشم، گوشت، شیر و کاهش باروری گوسفند و بز می‌گردد (۴). این بیماری یک عفونت مزمن باکتریایی است که عامل آن *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* می‌باشد (۵). *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* باکتری گرم مثبت چند شکلی دارای اشکال نامنظم مانند حروف چینی و یا چماق مانند می‌باشد. این باکتری یک داخل سلولی اختیاری است و در شاخه *اکتینوباکتریا* قرار می‌گیرد (۶، ۷). مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدین معنا است که میکروب‌های بیماری‌زایی که برای مبارزه با آنها از آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود، نسبت به یک یا بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دهند و نسل‌های جدیدی را به وجود بیاورند که دیگر قادر به مبارزه با آنها نمی‌باشیم (۸، ۹). از دیدگاه سلولی و مولکولی، اکثر داروهای ضد میکروبی به یکی از چهار طریق فوق اثر خود را نشان می‌دهند ممانعت از سنتز دیواره‌ی سلولی، ایجاد تغییراتی در تراوائی غشاء سلولی و یا جلوگیری از انتقال فعالانه‌ی مواد از طریق غشاء، ممانعت از سنتز پروتئین‌ها و جلوگیری از سنتز اسید نوکلئیک (۱۰). این مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در حیوانات، از طریق گوشت یا دیگر محصولات وارد زنجیره غذایی انسان می‌شوند. به همین دلیل است که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی یک تهدید برای سلامت انسان و حیوان به شمار می‌آید و باید جدی گرفته شود (۱۱، ۱۲).

هدف از انجام این پژوهش بررسی فنوتیپی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *کورینه باکتریوم سودو توبرکلوزیس* جدا شده از گوسفندان شهرستان بینالود مشهد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه از آبسه‌های موجود در موارد دام زنده (گوسفند و بز) و لاشه‌های کشتارگاه دام (گوسفند و بز) در شهرستان مشهد و بینالود مورد بررسی قرار گرفت. جهت نمونه‌گیری از عقده‌های لنفاوی دارای تورم و چرک، به وسیله سرنگ نمونه از داخل غدد متورم به مقدار حدود ۱ سی‌سی جمع‌آوری شد و سرنگ حاوی نمونه در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به محیط کشت BHI براث (مرک-آلمان) انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیدند. پس از طی مدت زمان انکوباسیون تمامی نمونه‌ها بر روی محیط کشت بلاد آگار (مرک-آلمان) انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند پس از طی مدت زمان انکوباسیون پلیت‌های حاوی کلنی‌های سفید رنگ انتخاب گردیدند و برای تأیید این جدایه‌ها تست‌هایی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم و تست اکسیداز انجام شد. جدایه‌های تأیید شده توسط تست‌های فوق برای انجام مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتخاب گردیدند.



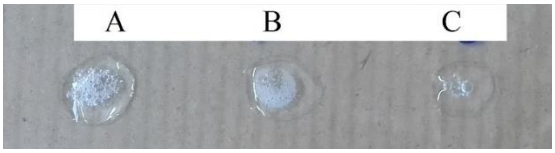
شکل ۱- محل نمونه‌گیری جدایه‌های مورد مطالعه

بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

جهت تعیین میزان حساسیت و مقاومت ایزوله‌های جدا شده از ۴۰ مورد تأیید شده از آبسه‌های موجود در موارد دام زنده و لاشه‌های کشتارگاه دام مبتلا به لنفادنیت پنیری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول تری متوپریم (۲۵ میکروگرم)، کلیسیتین (۱۰ میکروگرم)، داکسی سایکلین (۳۰ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم) ،کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اکسی تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) و تایلوزین (۳۰ میکروگرم)، (کرج- پادتن طب) آنتی بیوگرام به روش یعنی دیسک دیفیوژن آگار صورت پذیرفت. در این روش که روش معمولی و رایج است باکتری مورد نظر را بر روی محیط کشت اختصاصی کشت داده و پس از طی مدت زمان انکوباسیون یک کلنی از هر جدایه را انتخاب نموده و به محیط مایع مولر هینتون براث (مرک-آلمان) انتقال داده و پس از رسیدن به کدورت نیم مک فارلند با استفاده از سوآب استریل از محیط مایع برداشته و به صورت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) کشت داده شدند و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه با فاصله‌ی مناسب با کمک پنس استریل بر روی محیط قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، مقاومت یا حساسیت را بر اساس اندازه‌گیری منطقه عدم رشد بررسی نموده و نتایج آن با کمک جدول NCCLS و European تفسیر گردید همچنین از سویه‌های استاندارد استرپتوکوک و استافیلوکوک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۳، ۱۴، ۱۵).

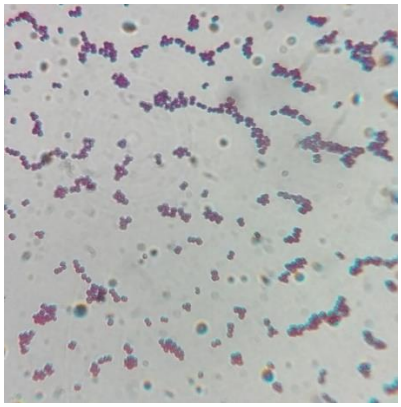
نتایج

نتیجه تست کاتالاز: کاتالاز آنزیمی است که H2O2را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند H2O2 یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات است. ایجاد حباب‌های سریع و ماندگار با حالت جوش زدن (کف) نشانگر مثبت بودن این تست است.



شکل ۲- نمونه‌های A,B,C اکسیداز مثبت

نتیجه رنگ‌آمیزی گرم



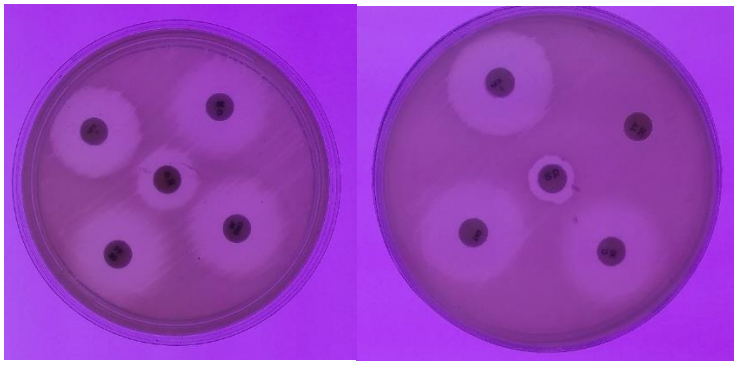
شکل ۳- اشکال شبه کوکسی باکتری *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در رنگ‌آمیزی گرم

نتایج میزان حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد مطالعه:

بررسی تعیین میزان حساسیت و مقاومت در جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های داکسی سایکلین (۷۲/۵ درصد) و تتراسایکلین (۷۰ درصد) بود و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های سولفامتوکسازول تری متوپریم (۱۷/۵ درصد) و سفتریاکسون (۲۲/۵ درصد) بود. همچنین در بررسی میزان حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک فوق بیشترین میزان حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول تری متوپریم بوده و کمترین آن متعلق به داکسی سایکلین بوده است.

جدول ۱- نتایج میزان حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	مقاوم	حساس	نیمه حساس
سفتریاکسون	۲۲/۵ درصد	۵۲/۵ درصد	۲۵ درصد
سولفامتوکسازول تری متوپریم	۱۷/۵ درصد	۷۰ درصد	۱۲/۵ درصد
کلیسیتین	۶۵ درصد	۲۵ درصد	۱۰ درصد
داکسی سایکلین	۷۲/۵ درصد	۱۲/۵ درصد	۱۵ درصد
تایلوزین	۶۰ درصد	۳۵ درصد	۵ درصد
فلورفنیکل	۱۵ درصد	۵۸ درصد	۲۷ درصد
تتراسایکلین	۷۰ درصد	۳۰ درصد	۰ درصد
کلرامفنیکل	۳۷ درصد	۶۰ درصد	۳ درصد
انروفلوکساسین	۲۵ درصد	۷۰ درصد	۵ درصد



شکل ۴- بررسی فنوتیپی میزان حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس یک پاتوژن گرم مثبت داخل سلولی است که مسئول ایجاد چندین بیماری از جمله لنفادنیت پنیری می‌باشد. این باکتری در نشخوار کنندگان کوچک سبب ایجاد بیماری لنفادنیت پنیری، در بوفالو سبب بیماری پوستی Oedematous، در اسب باعث زخم لنفانژیت، در گاو سبب ورم پستان و در انسان لنفادنیت نکروز کننده می‌گردد (۱۶).

بررسی تعیین میزان حساسیت و مقاومت در جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های داکسی سایکلین (۷۲/۵ درصد) و تتراسایکلین (۷۰ درصد) بود و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های سولفامتوکسازول تری متوپریم (۱۷/۵ درصد) و سفتریاکسون (۲۲/۵ درصد) بود. همچنین در بررسی میزان حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک فوق بیشترین میزان حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول تری‌متوپریم بوده و کمترین آن متعلق به داکسی سایکلین بوده است.

ROBAJ و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* جدا شده از ۳۸ گوسفند پرداختند. در این پژوهش به بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و اسیدکلاوولانیک، اکسی تتراسایکلین، جنتامایسین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، تری متوپریم و کلوکساسیلین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیشترین مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بوده و بیشترین حساسیت جدایه‌ها مربوط به آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم بوده است (۱۷).

Rizk و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۱۲۶ جدایه جدا شده از گوسفند و بز پرداخت. در این مطالعه میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، نئومایسین، آمیکاسین، اریترومایسین، استرپتومایسین، متی‌سیلین و نووبیوسین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش بیانگر این بود که بیشترین مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بوده و بیشترین میزان حساسیت نیز مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود (۱۸).

Li و همکاران در سال ۲۰۱۸ در چین به بررسی عوامل حدت و همچنین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، سفتریاکسون، استرپتومایسین، کانامیسین، کلاریترومایسین، لووفلوکساسین، روکسیترومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، لینومایسین، نیتروفورانتوئین، فورازولیدون،

وانکومایسین، نورفلوکساسین، سفادین، مینوسیکلین، آموکسی‌سیلین، سفوکسیتین، تری‌متوپریم و سفی‌پیم در جدایه‌های *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* به‌دست آمده از بز پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها دارای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفورانتوئین و فورازولیدون بودند. در بررسی میزان حساسیت جدایه‌ها تمامی آنها به آنتی‌بیوتیک‌های سفیپیم، وانکومایسین، نورفلوکساسین و سفادین حساسیت ۱۰۰ درصدی نشان داده بودند (۱۹).

روش دیسک دیفیوژن آگار می‌تواند به عنوان یک روش غربالگری اولیه و ابتدایی جهت تعیین میزان مقاومت و حساسیت استفاده گردد، لذا برای بررسی دقیق میزان مقاومت جدایه‌ها می‌توان از روش ژنوتیپی استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات مؤسسه" تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی "شعبه شمال شرق کشور که از هیچ کوششی در راستای انجام این مطالعه دریغ ننمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1- Rebouças MF, Portela RW, Lima DD, Loureiro D, Bastos BL, Moura-Costa LF, Vale VL, Miyoshi A, Azevedo V, Meyer R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 2011; 23(2): 213-20.

2- Rizk AM, El-Tawab A, Awad A, AFIFI SE, Mohamed SR. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminant and molecular study of virulence and resistance genes in Beni-Suef Governorate. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2019; 37(1):122-7.

3- Hussain SA, Ali M, Turkar S, Hassan N, Rais-ul-Islam M, Dar LM. Caseous lymphadenitis in goats: First report of two clinical cases from Punjab (India). *Microbiologia*. 2013; 39: 44-6.

4- Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Daignault D, Galarneau JR, Boisclair J, Simard C, Bélanger D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi–visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive veterinary medicine*. 2003; 59(1-2): 67-81.

5- Baird GJ, Fontaine MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of comparative pathology*. 2007; 137(4): 179-210.

6- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. *Veterinary medicine*. 2007; 10: 2045-50.

7- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick E. Veterinary microbiology and microbial disease. John Wiley & Sons; 2011 Oct 7.

8- Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases: 2-volume set. *Elsevier Health Sciences*; 2014 Aug 28.

9- Davis MA, Besser TE, Orfe LH, Baker KN, Lanier AS, Broschat SL, New D, Call DR. Genotypic-phenotypic discrepancies between antibiotic resistance characteristics of *Escherichia coli* isolates from calves in management settings with high and low antibiotic use. *Applied and environmental microbiology*. 2011; 77(10): 3293-9.

10- Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E. McGraw Hill Professional; 2015 Aug 12.

11- Amiri M, Farzin H, Jamshidian-Mojaver M. Phenotypic and Genotypic Study of Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* Isolates from Human Urinary Infection Cases in Bojnord Province. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*. 2019; 26(3): 173-80.

12- Lee JC, Oh JY, Cho JW, Park JC, Kim JM, Seol SY, Cho DT. The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 47(5): 599-604.

13- Jones RN, Stilwell MG, Wilson ML, Mendes RE. Contemporary tetracycline susceptibility testing: doxycycline MIC methods and interpretive criteria (CLSI and EUCAST) performance when testing Gram-positive pathogens. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013; 76(1): 69-72.

14- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2015). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.

15- Sariadji K, Sunarno S, Puspandari N, Sembiring M. Antibiotic susceptibility pattern of *Corynebacterium diphtheriae* isolated from outbreaks in Indonesia 2010-2015. *The Indonesian Biomedical Journal*. 2018; 10(1): 51-58.

16- Viana MV, Figueiredo H, Ramos R, Guimaraes LC, Pereira FL, Dorella FA, Selim SA, Salaheldean M, Silva A, Wattam AR, Azevedo V. Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. PLoS One. 2017; 12(4):e0176347.

17- Robaj AV, Hamidi A, Bytyqi HY, Sylejmani D. Frequency and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from caseous lymphadenitis in sheep in Kosovo. *Bulgarian J Agri Sci*. 2017; 23(6): 1033-6.

18- Rizk AM, El-Tawab A, Awad A, AFIFI SE, Mohamed SR. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminant and molecular study of virulence and resistance genes in Beni-Suef Governorate. Benha *Veterinary Medical Journal*. 2019; 37(1): 122-7.

19- Li H, Yang H, Zhou Z, Li X, Yi W, Xu Y, Wang Z, Hu S. Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*. 2018; 168: 69-75.

Antibiotic resistance phenotype study in *Corinne bacterium pseudotuberculosis* isolates isolated from sheep with cheese lymphadenitis in Binalood city of Mashhad

Reza Mohamadzadeh[1], Hamidreza Farzin*[2], Majid Jamshidian-Mojaver[3]

1- Graduate of Biochemistry, Faculty of Science, Payame Noor University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2,3- Assistant Professor-Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

Receive: August 15, 2020; Revise: September 2, 2020; Accept: September 5, 2020

Summary

Cheese lymphadenitis is a very common skin infectious disease among sheep and goats around the world caused by the bacterium *Corinne bacterium Pseudotuberculosis*. The development of this disease among livestock always causes significant economic losses. In this study, 40 samples of abscesses in live animal cases and carcasses of animal slaughterhouses in Mashhad and Binalood were examined. To sample swollen and purulent lymph nodes, a sample of about 1 cc was collected from the swollen glands by a sample syringe and the sample was transferred to the laboratory along with ice. The collected samples were transferred to BHI culture medium and after confirmation by tests such as hot staining, catalase test and detection from bacterial strain, discing was performed to determine the resistance and sensitivity of the isolates by Kirby Baer method. Examination of the sensitivity and resistance of the studied isolates showed that the highest resistance of the isolates was to Doxycycline antibiotics (72/5%) and the lowest resistance to Trimethoprim/Sulfamethoxazole antibiotics (17.5%). Also, in the study of the sensitivity of isolates, the highest sensitivity of isolates to antibiotics was in enrofloxacin and the lowest was in Chloramphenicol. The agar diffusion disc method can be used as a primary screening method to determine the level of resistance and sensitivity; so, a genotypic method can be used to accurately assess the resistance of the isolates.

Keywords: *Antibiotic resistance, caseous lymphadenitis, Corinne bacterium pseudotuberculosis*

مروری بر بیماری و شیوع ویروس اسهال ویروسی گاو (Bovine Viral Diarrhea Virus) در ایران

سیوان ویسی[۱]، ابوالفضل حاجی بمانی شورکی[*۲]

۱- دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۳۰ مرداد ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

بیماری اسهال ویروسی گاوان (BVD) در اکثر نقاط دنیا بومی شده و خسارت عمده این بیماری اعم از درگیری دستگاه‌های مختلف بدن، کاهش تولید شیر، مشکلات تولید مثلی مانند سقط جنین، کاهش وزن، کاهش رشد و تضعیف سیستم ایمنی می‌باشد. شیوع بالا و همچنین انتقال سریع بین دام‌ها از خصوصیات این بیماری است که اهمیت کنترل آن را چند برابر کرده است. شرایط گاوداری‌ها، وضعیت جغرافیایی مناطق، وجود فاکتورهای مستعدکننده‌ی دیگر از جمله وجود دیگر بیماری‌های ویروسی و باکتریایی در محل نگهداری دام‌ها و سیاست مدیریتی حاکم بر میزان زایش و تولید شیر همگی از عوامل مؤثر بر شیوع بیماری اسهال ویروسی گاوان است. در ایران مطالعات زیادی شیوع این بیماری را در مناطق مختلف گزارش کرده‌اند. به‌طوری که بیشترین شیوع این بیماری به ترتیب در شهرهای مشهد، کرج و کرمان گزارش شده است. میانگین درصد شیوع بیماری اسهال ویروسی گاوان در ایران بنابر مطالعات انجام گرفته تا اواخر سال ۱۳۹۹، برابر با ۴۷/۳۷ درصد است که شیوع و گستردگی فراوان این بیماری را در سراسر کشور نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *اسهال ویروسی، گاو، شیوع، ایران*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: a.hajibemani@tabrizu.ac.ir

مقدمه

بیماری اسهال ویروسی گاوان (Bovine Viral Diarrhea) با عامل پستی‌ویروس از خانواده فلاوی‌ویریده از جمله ویروس‌های RNA دار و تک‌رشته‌ای است که در اکثر نقاط دنیا بومی شده و اهمیت آن به‌عنوان علت سقط و ناباروری اخیرا آشکار گردیده است (۱). علایم بارز این بیماری در فرم گوارشی، اسهال و در فرم تولید مثلی ممکن است پس از گذر چند ماه از آبستنی، به‌صورت سقط و یا تولد نوزادهای ضعیف باشد. تشخیص سریع دام‌های درگیر بیماری به‌منظور جلوگیری از پخش و اندمیک شدن عفونت و همچنین قرنطینه و جدا کردن دام‌های ناقل و گوساله‌های با عفونت دائمی اهمیت ویژه‌ای دارد (۲، ۳).

بیماری BVD برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۸ در اصفهان، کرمان و مناطقی از خراسان گزارش گردید و در سال ۱۳۵۲ عامل بیماری از دو واحد دامداری واقع در کرج، از گاوهای وارد شده از انگلستان کشف شد (۴). خسارات زیاد ناشی از بیماری به‌ویژه در گله‌های بزرگ و متراکم که شیوع بیماری آسان است، ورود دامپزشکان به عرصه مدیریت و کنترل بیماری را امری اجتناب‌ناپذیر کرده است. ضرورت بررسی میزان شیوع این بیماری زمانی آشکار می‌شود که میزان ناباروری در گاوداری‌های صنعتی رو به فزونی بوده و از طرف دیگر هیچ‌گونه برنامه واکسیناسیون و یا مدیریت جدی برای کنترل این بیماری وجود ندارد. بسته به درگیری ارگان‌های مختلف بدن دام از جمله دستگاه گوارش، دستگاه تنفس و یا سیستم تولید مثل، میزان خسارات وارده بر دامداری‌ها متفاوت است. بیشترین ضرر اقتصادی، ناشی از اثر بیماری بر سیستم تولید مثل و ایجاد سقط و ناباروری است، اگرچه اثرات ثانویه ناشی از تضعیف سیستم ایمنی و ایجاد زمینه برای شیوع بیماری‌های بعدی نیز قابل چشم‌پوشی نیست. مطالعات متعددی در مورد شیوع بیماری اسهال ویروسی گاوان در مناطق مختلفی از کشور ایران صورت گرفته است. در بیشتر مناطقی که این بررسی‌ها صورت گرفته، شیوع BVDV ثابت شده است، لذا احتمال حضور این بیماری در دیگر مناطق کشور نیز وجود دارد که نیاز به مطالعات جامع و دقیق آماری دارد.

جمع‌آوری داده‌های مربوط به بیماری‌های متفاوت، به‌ویژه بیماری‌های با شیوع بالا دورنمایی از وضعیت مناطق مختلف کشور به ما می‌دهد تا با آگاهی بیشتر در اندیشه حفظ مناطق پاک و حذف یا کنترل بیماری در مناطق آلوده باشیم. مطالعه حاضر، کامل‌ترین جمع‌آوری تحقیقات صورت گرفته در زمینه‌ی شیوع بیماری BVD در ایران با هدف آشنایی بیشتر با مناطق آلوده و چاره‌اندیشی اساسی برای کنترل عفونت به‌ویژه در مناطق حساس است.

بیوتیپ‌ها و زنجیره‌های BVDV: این ویروس از نظر زیرگونه (Subtype) به دو زیرگونه ۱(BVDV-1) و ۲(BVDV-2) و از نظر بیوتیپ (Biotype) به دو بیوتیپ سایتوپاتیک (Cytopathic) و غیر سایتوپاتیک (Non-Cytopathic) طبقه‌بندی می‌شود. احتمالاً سویه سایتوپاتیک این ویروس سبب بیماری در گاوهای مبتلا به بیماری مخاطی (Mucosal Disease) می‌گردد. ویروس سایتوپاتیک BVD در جمعیت‌های گاوی عمر کوتاهی دارد و فقط سویه‌های غیرسایتوپاتیک با ایجاد دام‌های PI (Persistently Infected) قادر به بقاء در جمعیت‌های گاوی می‌باشند، بنابراین ویروس‌های جدید CP باید از سویه‌های NCP به وجود آیند (۵).

انتقال: عفونت‌های BVDV عمدتاً شامل درگیری اندام‌های تنفسی، روده‌ای یا تولید مثلی همانند افزایش خطر احتباس جفت و ورم پستان بالینی است که می‌تواند از راه جنین‌های سقط کرده، ادرار، مدفوع، مایع منی، شیر، بزاق دهان و

جنین‌های آلوده منتقل گردد اما راه اصلی انتقال عفونت، ترشحات تنفسی است (۶). لازمه انتقال عفونت بین دام‌ها، ارتباط نزدیک بین آنهاست، لذا به منظور کنترل و رعایت معیارهای امنیت زیستی (Biosecurity) جداسازی گاوهای آلوده، به‌خصوص گاوهای نر برای جلوگیری از جفت‌گیری ضروری است. حیوانات PI به‌طور کلی حاملان مادام العمر ویروس باقی می‌مانند و مقدار زیادی ویروس را از طریق مدفوع و دیگر ترشحات بدن دفع(shedding) می‌کنند اما دام‌های با آلودگی موقت و یا TI (Transiently Infected) عفونت را فقط در یک دوره ۱۴ روزه منتشر می‌کنند بنابراین برای تفریق حیوانات PI از TI باید دو تست تشخیص آنتی‌ژن به فاصله سه هفته از یکدیگر انجام گیرد (۷).

در تلیسه‌های شیری میزان بالایی از عفونت BVDV از زمان قطع شیر تا ۹ ماهگی مشاهده شده است. همزمان با انتقال حیوانات از باکس‌های جداگانه گوساله‌ها در گوساله‌دانی به محوطه گروهی و کاهش محافظت از آنتی‌بادی‌های آغوز، خطر عفونت BVDV از ۱۵۰ به ۲۶۰ روزگی افزایش یافت (۸). گوساله‌های مبتلا به عفونت مادرزادی و بدون عفونت مداوم، در مقایسه با گوساله‌های فاقد عفونت مادرزادی، دو برابر بیشتر در معرض فرم شدید بیماری هستند.

تماس مستقیم: ویروس از طریق تماس مستقیم بین حیوانات و از طریق ترانس پلاسنتال(Trans Placental) منتقل می‌شود. ترشحات دستگاه تولید مثل گاو آلوده و جنین‌های سقط شده می‌تواند منابع بالقوه ویروس باشد. تماس بینی با بینی (Nose to Nose) یک روش مؤثر در انتقال ویروس از دام‌های PI به حیوانات حساس است، بنابراین حیوانات PI ممکن است عفونت را به یک گله وارد کنند. همچنین زمانی که حیوانات آلوده در هنگام تولید مثل با حیوانات حساس مخلوط می‌شوند و یا تحت شرایط اضطراری همچون خشکسالی، سیل یا آتش‌سوزی نیاز به حرکت اضطراری دارند، انتقال آسان‌تر صورت می‌گیرد (۹). اختلاط تصادفی گاو نر PI با گاوهای ماده حساس در طول فصل تولید مثل در یک گله گاو پرواری ممکن است منجر به شیوع عمده بیماری مخاطی (MD) در گله شود (۱۰). انتقال ویروس بین حیوانات سالم و با سطح ایمنی بالا احتمالاً ناچیز است زیرا آنها با تولید آنتی‌بادی ویروس را از بین می‌برند. با این حال، گسترش انتقال از گاوهای با ویرمی گذرا به حیوانات منفی در یک گله شیری کند است. حیوانات آلوده اولیه انتقال‌دهنده مؤثر ویروس نیستند. حیوانات مستعد وارد شده به یک گله، به‌طور معمول تلیسه‌ها، در تماس با حیوانات دچار ویرمی آلوده می‌شوند و اگر در مرحله آسیب پذیری بارداری باشند، ضررهای عمده اقتصادی می‌توانند دامن‌گیر گله شود. ورود یک گاو یا تلیسه PI ناشناخته به یک گله حساس نیز می‌تواند خسارات اقتصادی بزرگی به بار آورد. جنین می‌تواند با انتقال ترانس‌پلاسنتال ویروس از سد جفتی، آلوده شود. اپیدمی سقط جنین و نقایص مادرزادی گوساله‌ها هنگامی رخ خواهد داد که جنین گاو در سه ماهه اول در گله‌های عاری از ویروس، در معرض حیوانات آلوده به BVD قرار گیرد. گاوهای ماده PI می‌توانند از نظر بالینی برای چندین سال طبیعی باقی بمانند و در این مدت از نظر تولید مثل موفق باشند و فرزندان آنها نیز ممکن است ظاهراً طبیعی باشند اما به‌طور نسبی PI هستند. به این ترتیب می‌توان یک خانواده ویرمیک در نسل مادر ایجاد کرد که می‌تواند برای چندین نسل پایدار بماند و یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌ها برای نگهداری ویروس در گله یا منطقه را فراهم کند (۱۱).

تماس غیرمستقیم: انتقال غیرمستقیم ویروس می‌تواند از طریق هوا در گوساله‌هایی که در نزدیکی

گوساله‌های PI قرار دارند، بدون تماس مستقیم رخ دهد. عفونت همچنین می‌تواند در گوساله‌های مستقر در باکس‌های جداگانه گوساله‌دانی که تمیز و ضد عفونی نمی‌شوند، به‌طور مستقیم حتی پس از حذف گاوهای PI رخ دهد (۱۲).

پاتولوژی و ایمنی: BVDV لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها را هدف قرار داده و با کاهش قدرت باکتریوسیدی، کموتاکسی، کاهش تکثیر لنفوسیتی، کاهش ترشح ایمنوگلوبولین‌ها به جریان خون، کاهش فعالیت و مهاجرت نوتروفیل‌ها و مهار تولید لوکوترین‌ها در تضعیف ایمنی نقش دارد (۱۳).

علایم بالینی: بیشتر دام‌ها علایم را به صورت تحت بالینی نشان داده و یا اصلاً علایمی بروز نمی‌دهند (۱۴). اما ویروس با تضعیف سیستم ایمنی و اثر سینرژیستی با دیگر میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها نیز می‌تواند سبب ایجاد علایم بالینی در گاو یا تلیسه شود. عفونت در دام‌هایی که برای بار اول آلوده می‌شوند سبب ویرمی موقت، تب، بی‌اشتهایی موقت و اسهال همراه با تضعیف سیستم ایمنی می‌شود. در گاوهای آبستن، ممکن است طی دوره ویرمی، عفونت رویان از طریق جفت اتفاق بیفتد و با توجه به زمان وقوع آن، ورود عفونت به رویان می‌تواند سبب مرگ زودرس، سقط جنین، تولد گوساله زنده و یا مرده با نقایص مادرزادی گردد. گوساله ممکن است زنده به دنیا بیاید ولی به‌طور دائم (PI) عفونت را به همراه داشته باشد. حیوانات PI راه اصلی پخش ویروس و روش اصلی حفظ عفونت BVDV در گاوداری‌ها هستند (۱۱). اگر تعداد دام‌های PI در گله زیاد باشد دام‌های با درگیری مخاطی(MD) ویروس با بیوتیپ سایتوپاتیک را از خود دفع می‌کنند که در این حالت امکان همه‌گیری بیماری در گله وجود دارد اما عفونت به صورت خفیف بروز کرده و بیوتیپ سایتوپاتیک نمی‌تواند سبب ایجاد عفونت ترانس پلاسنتال و آلوده کردن رویان شود. بیماری‌های مرتبط با BVDV در بیشتر کشورهایی که پرورش گاو رایج است، ثبت شده است و در برخی کشورها ممکن است مهم‌ترین عفونت ویروسی گاو باشد. شیوع عفونت زیاد است، اما میزان بروز MD (Mucosal Disease) بالینی کم است.BVDV باعث چندین ضایعه مختلف از جمله موارد زیر می‌شود:

- BVD خفیف که معمولاً تحت بالینی است،
- Fatal MD، که به‌طور مداوم رخ می‌دهد،
- اسهال تحت حاد با مرگ و میر بالا،
- ترومبوسیتوپنی و بیماری هموراژیک (خونریزی‌دهنده)،
- نارسایی‌های دستگاه تولید مثل،
- ناهنجاری‌های مادرزادی در گوساله‌ها در نتیجه عفونت جنین،
- سرکوب سیستم ایمنی (۱۵).

تشخیص: توانایی تشخیص بیماری در جلوگیری از شیوع و کمک به کنترل عفونت بسیار مهم است. تشخیص سنتی BVDV براساس کشت سلول و آزمایش خنثی‌سازی ویروس است. آزمایش‌های تشخیصی موجود مانند جداسازی ویروس (VI)، ایمونوهیستوشیمی (IHC) ، آنتی‌ژن ضبط الایزا (ACE) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR) برای تشخیص گاوهای PI استفاده می‌شود. هر کدام از روش‌های تشخیص BVDV دارای مزایا، معایب و کاربردهای مختلف در موارد مختلف تشخیصی است. قابلیت اطمینان آزمایش‌های تشخیصی با انتخاب استراتژی نمونه‌گیری مناسب بر اساس سن حیوان سنجیده می‌شود. همچنین می‌توان BVDV-1 را با روش nested-PCR در منی گاو نر شناسایی کرد (۱۶).

شیوع: بررسی وجود و شیوع ویروس BVD نخستین گام در راه کنترل و مبارزه با این بیماری

است. شیوع عفونت BVDV بین کشورهای مختلف و حتی بین استان‌های مختلف در یک کشور متفاوت است. این اختلاف ممکن است به تفاوت در مدیریت، تنوع محیطی، اندازه گله‌ها و وجود حیوانات PI در این گله‌ها مربوط باشد (۱۷). در بیشتر گزارش‌ها تفاوت معنی‌دار در شیوع عفونت BVDV بین گاو ماده و نر وابسته به سن دام تعریف شده است اما در برخی دیگر ارتباطی پیدا نشده است (۱۸).

آلودگی کل گاوهای ایران در سال ۱۳۴۸ به بیماری BVD حدود ۱۶ تا ۹۶ درصد طی سال‌های ۱۳۷۰ تا ۱۳۷۳در گاوهای زیر دو سال ۳۹/۶ درصدو در گاوهای بالای دو سال ۶۲ درصد گزارش گردید (۴). بررسی‌های سرولوژیکی در سال‌های ۱۳۷۵ و ۱۳۸۱، میزان آلودگی گاوهای شیری ایران را به ترتیب ۶۲ و ۵۶/۷۷ درصد نشان داد. حدود ۷۴/۱۷ درصد از سقط‌های گاوداری‌های صنعتی مشهد در سال ۱۳۹۰ ناشی از این بیماری بوده است (۱۹).

در یک مطالعه سرو اپیدمیولوژیک بر روی ۹۹۶۸ سرم جمع‌آوری شده از کل کشور، میزان عفونت ۳۰/۵۷ درصد برآورد شد (۲۰).

به‌منظور برآورد میزان شیوع و حضور همزمان آنتی‌بادی علیه BVDV، BoHV1 و BLV در گاوهای شیری ایران از ۸۸۲ حیوان نمونه‌برداری و حضور آنتی‌بادی علیه BVDV، BoHV1 و BLV توسط کیت‌های تجاری (ELISA) تعیین گردید. شیوع کلی BVDV در این مطالعه ۶۴/۴ درصد بود. شیوع آنتی‌بادی علیه عوامل بیماری‌زای ذکر شده در استان‌های مختلف مورد مطالعه متفاوت است و همچنین میان حضور BVDV و BoHV1 همبستگی مثبت وجود داشت ($P < ۰/۰۱$) که نشانگر وجود عامل خطر این عفونت‌ها با یکدیگر در آینده است (۲۱).

در یکی از مطالعات نمونه از محتویات شیردان جنین‌های سقط شده گونه‌های گاو، گوسفند، بز، بوفالو و شتر جمع‌آوری شده که برای شناسایی حساسیت و تعیین شیوع ویروس در جنین‌های سقط شده گرفتن آنتی‌ژن ELISA و RT-PCR توصیه شده است. از مجموع ۲۱۷۳ جنین سقط شده که در چهار استان تهران، اصفهان، کرمان و خراسان ثبت شده است، ۳۴۷ مورد (۱۵/۹۶ درصد) و ۴۰۲ مورد (۱۸/۴۹ درصد) به ترتیب با وجود گیرنده آنتی‌ژن ELISA و RT-PCR برای ویروس اسهال ویروسی گاو مثبت بودند. این نتایج حاکی از وجود زیاد این پاتوژن در ایران است و RT-PCR به‌طور قابل توجهی سریع‌تر و دقیق‌تر از ELISA برای شناسایی ویروس اسهال ویروسی گاو است. براساس این مطالعه شترها، مقاوم‌ترین (۱۴/۹۵ درصد) و گاوها، حساس‌ترین(۲۰/۴۸ درصد) گونه‌ها به سقط ناشی از اسهال ویروسی گاو بودند و شیوع این ویروس در جنین‌های سقط شده بز بیشتر از جنین‌های سقط شده گاو است. این مطالعه اولین گزارش شیوع ویروس اسهال ویروسی گاو با ارزیابی روش‌های ELISA و RT-PCR در جنین‌های سقط شده گونه‌های نامبرده در کشور ایران بود (۲۲).

در یک مطالعه برای بررسی حضور دام‌های PI از میان ۱۱ گله که شامل تقریباً ۲۰،۰۰۰ گاو شیری بود، از ۱۴۰ گاو به‌طور تصادفی نمونه گرفته شد. برای شناسایی آنتی‌بادی و ویروس BVDV از روش ELISA غیر مستقیم و RT-PCR استفاده شد. به‌طور همزمان، از نمونه‌های خون کامل که در گروه‌های ۱۰ تایی بودند، برای تشخیص مولکولی BVDV استفاده شد. نتایج نشان داد که ۱۳۸ نمونه (۹۸/۵۶ درصد) از ۱۴۰ نمونه برای آنتی‌بادی BVDV مثبت بودند، در حالی‌که آنتی‌ژن BVDV فقط در ۲ گاو (۱/۴۲ درصد) تشخیص داده شد، که برای آنتی‌بادی BVDV منفی بودند و بنابراین به‌عنوان عفونت مداوم (PI) در نظر گرفته شدند (۳).

در پژوهشی به‌منظور بررسی شیوع BVDV و

کنتـــرل آن در ســـه گـــاوداری موفـــق در اســـتان‌های تهـــران و قـــزوین و اصـــفهان، ۵۰۰ راس گـــاو نـــژاد هلشتاین بـه‌طور تصـادفی انتخـاب و نمونـه خـون از آنهـا تهیـه شـد. تیتـر آنتی‌بـادی و آنتـی‌ژن نمونـه‌ها بـا روش الایـزا انـدازه‌گیری شـد. سـپس بـه‌منظور اطمینـان از حضـور و تعیـین تیـپ ویروس‌هـا، تمـامی نمونـه‌های مثبـت از طریـق تکنیـک مولکـولی RT-PCR مـورد سنجش قرار گرفتنـد. نتـایج ایـن تحقیـق نشـان داد کـه میـــزان الایـــزا Ab+/Ag+ ، Ab-/Ag+، Ab+/Ag-، Ab-/Ag- بـه ترتیـب ۳/۸، ۷/۲، ۷۸/۸ و ۱۰/۲ درصـد بـوده اسـت. شـیوع آلـودگی آنتی‌بـادی و آنتـی‌ژن در مجمـوع سـه گـاوداری بـه ترتیـب حـدود ۸۰ و ۱۱ درصد گزارش شـد کـه از ایـن میـان، حـدود ۲/۸ درصـد حیوانـات، عفـونی مولـد (PI) بودنـد. همچنـین نتـایج RT-PCR نشـان داد کـه همـه نمونـه‌های مثبـت از نـوع تیـپ یـک ویـروس (BVDV-1) بـوده و تیـپ ۲ در ایـن مطالعه گزارش نشد (۲۳).

تهـــران: تعـداد ۲۵۱ نمونـه از جنین‌هـای سـقط شـده گاوداری‌هـای صـنعتی شـیری اسـتان تهـران کـه طـی یـک سـال بـه آزمایشـگاه مرجـع ارجـاع داده شـده بودند، ارزیـابی شـدند. نمونـه‌ها از بافت‌هـای کبـد، کلیـه، طحال و قلب جنـین تهیـه شـده بودنـد. براسـاس نتـایج، شـیوع سـقط ناشـی از BVD در اسـتان تهـران ۲۵/۲ درصـد و براسـاس فصـل بـه‌ترتیب ۳۳/۳ درصـد بهـار، ۱۸ درصـد تابسـتان، ۳۴/۲ درصـد پـاییز و ۲۳/۷ درصـد زمستان برآورد شد (۱۹).

مشـــــهد: در مطالعـــه‌ای ۱۲۰ نمونـــه خـــون از گاوهـای بـا سـابقه سـقط در دوره‌هـای مختلـف بـارداری از گلـه‌های مختلـف گـاو شـیری صـنعتی و ۳۰ نمونـه از گاوهـای بـدون سـابقه سـقط بـه‌عنوان گـروه شـاهد در منطقـه مشـهد جمـع‌آوری شـد. وجـود آنتی‌بـادی علیـه BVDV بـا روش ELISA غیـر مسـتقیم مـورد بررسـی قرار گرفـت. از ۱۲۰ نمونـه سـرمی کـه از گاوهـای سـقط شـده جمـع‌آوری شـد، ۸۹ نمونـه مثبـت بودنـد (۷۴/۱۶ درصـد) و از میـان نمونـه‌های مثبـت، ۱۲ مـورد (۱۳/۴۸ درصـد) مربـوط بـه سـه ماهـه اول آبسـتنی، ۵۴ مـورد (۶۰/۶۸ درصـد) مربـوط بـه سـه ماهـه دوم و ۲۳ مـورد (۲۵/۸۴ درصـد) مربـوط بـه سـه ماهـه آخـر بـارداری بودنـد. از ۸۹ نمونـه مثبـت، ۱۲ مـورد (۱۳/۴۸ درصـد) مرده‌زایـی و ۸ مـورد (۸/۹۹ درصـد) جنـین مومیـایی بودنـد. از ۸۹ نمونـه مثبـت، ۷۱ مـورد (۷۹/۷۸ درصـد) مربـوط بـه گاوهـای بـین ۲ تـا ۵ سـال و ۱۸ مـورد (۲۰/۲۲ درصد) مربـوط بـه گاوهـای بـالای ۵ سـال بـود. در گـروه شـاهد، ۲۰ نمونـه (۶۶/۶ درصـد) آنتی‌بـادی مثبـت بودنـد. همچنـین وجـود آنتـی‌ژن BVDV در نمونـه‌های سـرم توسـط الایـزا Ag-capture بررسـی شـد. از ۱۲۰ نمونـه سـرم، ۲ نمونـه مثبـت (۱/۶۷ درصد) بـود کـه مربـوط بـه دوره دوم بـارداری اسـت. در گـروه کنتـرل، هیچ‌کـدام از نمونـه‌ها آنتـی‌ژن مثبـت نداشـتند. نتـایج ایـن مطالعـه نشـان داد کـه شـیوع عفونـت BVDV در میـان گاوهـای سـقط شـده در منطقه مشـهد زیـاد اسـت. اگرچـه ایـن شـیوع بیشـتر از گـروه شـاهد اسـت، امـا تفـاوت مشـاهده شـده معنـی‌دار نیسـت (۲۴). ارزیـابی نمونـه هـای تانـک شـیر در گاوداری‌هـای اطـراف مشـهد نشـان داد کـه ۹۳/۹۸ درصد از گله‌ها آنتی‌بادی علیه BVDV دارند (۲۵).

اســـتان اراک: در مطالعـه‌ای کـه بـه‌منظور تعیـین شـیوع آنتی‌بـادی ضـد BVDV و BHV-1 در گلـه‌های شـیری صـنعتی در اراک انجـام گرفـت، ۸۰۳ نمونـه سرم کـه از ۱۲ گلـه غیـر واکسـینه شـده بـین ژوئـن تـا اکتبـر ۲۰۰۸ جمـع‌آوری و بـا اسـتفاده از کیت‌هـای ELISA موجـود در بـازار ارزیـابی شـدند. آنتی‌بـادی علیـه BVDV در همـه گلـه‌ها شناسـایی و میـزان شـیوع آن، ۵۴/۳ درصد برآورد شد (۲۶).

اســـتان قـــزوین: در بررســی ســرواپیدمیولوژی اسـهال ویروسـی گـاوان در اسـتان قـزوین، از گاوهـای بـالاتر از یـک سـال تعـداد ۲۲۰۵ نمونـه سـرم خـون از ۵۹ دامـداری واقـع در سـه شهرسـتان مختلـف اسـتان

قزوین شامل آبیک، بوئین‌زهرا و البرز در ماه‌های آبان و آذر ۱۳۸۶ و تابستان ۱۳۸۷، به‌صورت تصادفی تهیه شد. از کیت‌های استاندارد الایزای تشخیص پادتن‌های ضد ویروس BVD به‌منظور بررسی شیوع سرمی عفونت استفاده شد و تحلیل‌های آماری با استفاده از آزمون مربع کای انجام پذیرفت. بدین ترتیب شیوع سرمی پادتن‌های ضد ویروس BVD در گاوهای مورد بررسی و در مقطع زمانی مربوطه برابر با ۷۴/۵ درصد محاسبه گردید و ۱۰۰ درصد گاوهای مذکور آلوده بودند. شیوع آلودگی در شهرستان البرز، ۸۳/۲ درصد، در آبیک ۷۶/۲ درصد و در بوئین‌زهرا ۵۹/۶ درصد برآورد شد. در این مطالعه رابطه معنی‌داری(P=۰,۰۰۰۵) بین تعداد شکم‌های زایش و شیوع آلودگی برقرار بود (۱۹).

در مطالعه‌ای دیگر در استان قزوین مجموعاً ۵۰۰ نمونه سرم مشکوک از ۱۲۸گاو جداگانه در مراکز صنعتی برای تشخیص وجود آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن (P80) BVDV گرفته شد ، با استفاده از آزمون الایزا غیر مستقیم، موارد مثبت ۷۴-۵۹/۸۰ درصد، مشکوک ۷/۰۸-۱/۵۷ درصد و منفی ۴۲/۱۸-۲۴/۲۱ درصد گزارش شد (۲۷).

استان کرمان: اولین مطالعه در مورد شیوع BVDV در گاوداری‌های شیری حومه شهر کرمان در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت که نشان می‌دهد عفونت BVDV در گاوداری‌های صنعتی شیری در کرمان گسترش یافته است. بر این اساس ۶۵ نمونه شیر از مخزن بزرگ‌ترین مرکز تولیدی شیر در کرمان تهیه گردید سپس تمام نمونه‌ها توسط الایزای تجاری غیر مستقیم برای تشخیص آنتی‌بادی‌های BVDV مورد آزمایش قرار گرفتند. بر اساس نتایج سرولوژی، گاوداری‌ها در چهار کلاس (۰ ، ۱ ، ۲ و ۳) تقسیم شدند. در این میان، ۳۸ مزرعه (۴۶/۴۸ درصد) دارای سطح متوسط تا زیاد آنتی‌بادی (کلاس‌های ۲ یا ۳) بودند که نشان می‌دهد عفونت BVDV اندمیک و یا اینکه گله اخیراً درگیر عفونت شده است (۲۸).

در یک مطالعه مقطعی برای ارزیابی وضعیت سرولوژیکی BVDV، BHV-1، BRSV، PIV-3 و BAVدر گله‌های شیری ۱۵ گاوداری صنعتی در استان کرمان، از ژوئن تا نوامبر ۲۰۰۷، ۱۸۱ نمونه سرم با روش نمونه‌گیری خوشه‌ای از گاوهای ۱ تا ۳ ساله جمع‌آوری شد. نمونه‌ها توسط کیت‌های الایزا تجاری غیر مستقیم مورد آزمایش قرار گرفتند. میزان آنتی‌بادی در BVDV، ۷۷/۹۰ درصد تشخیص داده شد. همه مزارع حداقل برای یکی از این ویروس‌ها مثبت بودند و آنتی‌بادی علیه هر ۵ ویروس در ۴ گله در بین ۱۵ گاوداری شیری تشخیص داده شد (۲۹).

استان فارس: جستجوی ویروس BVD در گله‌های شیری ۱۲ گاوداری صنعتی استان فارس نیز شیوع گسترده این بیماری را نشان داد. در این مطالعه ۴۰۰ نمونه سرم با استفاده از کیت تجاری الایزا مورد بررسی قرار گرفت. آنتی‌ژن BVDV در ۱۶ نمونه از ۴۰۰ نمونه آزمایش شده (۴ درصد) و ۸ گله از ۱۲ گله (۶۶/۶ درصد) نشان داده شد (۳۰).

یک مطالعه مقطعی برای بررسی شیوع ویروس اسهال ویروسی گاو (BVD) با استفاده از آزمون ELISA در گله‌های گاو شیری صنعتی حومه شیراز انجام شد. ۹۹۴ نمونه خون از ۳۶ گله که هیچ برنامه واکسیناسیونی علیه BVDV برای آنها انجام نگرفته بود، تهیه گردید. نتایج نشان داد که ۵۱۲ گاو برابر با ۵۱/۵۱ درصد تست ELISA مثبت داشتند. با این حال، شیوع واقعی BVDV، ۵۲/۴۳ درصد برآورد شد. تمامی گله‌ها آنتی‌بادی مثبت در برابر BVDV داشتند و شیوع آن از ۱۱/۸ تا ۱۰۰ درصد در گله‌ها متفاوت بود. در این مطالعه هیچ تفاوت معناداری بین شیوع بیماری در چهار منطقه جغرافیایی

(شمال، جنوب، شرق و غرب) وجود نداشت لذا گسترش این بیماری در این منطقه نیز به اثبات رسیده است (۳۱).

استان کردستان: در مطالعه‌ای بر روی گاوهای شهرستان سنندج و روستاهای اطراف آن، تعداد ۴۱۰ نمونه سرمی تهیه شد و با استفاده از سویه استاندارد NADL ویروسBVD به روش خنثی‌سازی سرم (SN) مورد آزمایش قرار گرفتند که در نهایت ۲۷/۷ درصد پاسخ مثبت را نشان دادند که این نتایج در مقایسه با مطالعات مشابه در سایر استان‌های ایران تقریباً همخوانی دارد. مرزی بودن استان کردستان و متعاقباً ورود دام‌های کشورهای همسایه به داخل کشور و خرید و فروش آنها در داخل کشور می‌تواند از دلایل توجیه‌کننده گستردگی شیوع بیماری در داخل این استان باشد (۳۲).

اهواز: به‌منظور بررسی شیوع ویروس BVD در گاوهای گله‌های صنعتی و بومی (غیر صنعتی) در اهواز، ۵۷۲ نمونه خون از ورید وداج ۵۲۱ گاو ماده و ۵۱ گاو نر جمع‌آوری شد. از کیت تجاری ELISA برای تشخیص آنتی‌بادی اختصاصی ویروس اسهال ویروسی گاو (BVDV) استفاده گردید. نتایج با استفاده از آزمون مجذور کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۱۶۳ مورد (۲۸/۵ درصد) از نمونه‌های سرم مثبت بودند. با محاسبه جداگانه ابتلای گاوهای ماده و نر و همچنین حضور دام‌ها در مزارع صنعتی یا غیر صنعتی تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده گردید، به این صورت که در مزارع صنعتی و غیر صنعتی به ترتیب ۲۹/۵۵ و ۱۷/۶۴ درصد و در گاوهای ماده و نر به ترتیب ۷۵ و ۲۳/۳۴ درصد نمونه‌ها مثبت بودند (۳۳).

استان آذربایجان شرقی: به‌منظور بررسی آلودگی با ویروس BVD در منطقه تبریز، نمونه خون از ورید ۵۰۸ راس گاو شیری نژاد هلشتاین از گاوداری‌های صنعتی تبریز اخذ گردید. سرم‌ها تا زمان آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، سپس با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم و با کیت تجارتی جهت جستجوی آنتی‌بادی ویژه ویروس اسهال ویروسی گاو مورد آزمایش قرار گرفتند. از مجموع ۵۰۸ راس گاو تحت آزمایش، ۹۵ مورد (۱۸/۷ درصد) دارای آنتی‌بادی ضد اسهال ویروسی گاو بودند (۳۴).

در مطالعه‌ای دیگر برای شناسایی آنتی‌بادی سرم علیه BVDV با استفاده از روش ELISA در گاوهای شیری نژاد سرابی۸۴ نمونه خون کامل از گاوهای به ظاهر سالم جمع‌آوری و با کیت الایزا آزمایش شد. در مشاهده نتایج بر اساس آبستنی، ۲۵ مورد برابر با ۲۹/۸ درصد مثبت گزارش شد که نشانگر درگیری گسترده گاوهای شیری در استان است (۳۵).

اصفهان: مطالعه‌ای که هدف آن تعیین شیوع پنج علت عمده ویروسی عفونت‌های دستگاه تنفس گاو در گله‌های مناطق مرکزی ایران (استان اصفهان) است، از میان ۶۴۲ گاو شیری (نژادهای هلشتاین_فریزین) واقع در ۲۵ مزرعه، نمونه‌های سرم خون توسط کیت‌های تجاری ELISA برای تشخیص آنتی‌بادی علیه BRSV، BoHV-1، BPI-3V، BVDV و BAV-3 مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج با استفاده از آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میزان شیوع BVDV، ۴۹/۲ درصد گزارش شد (۳۶).

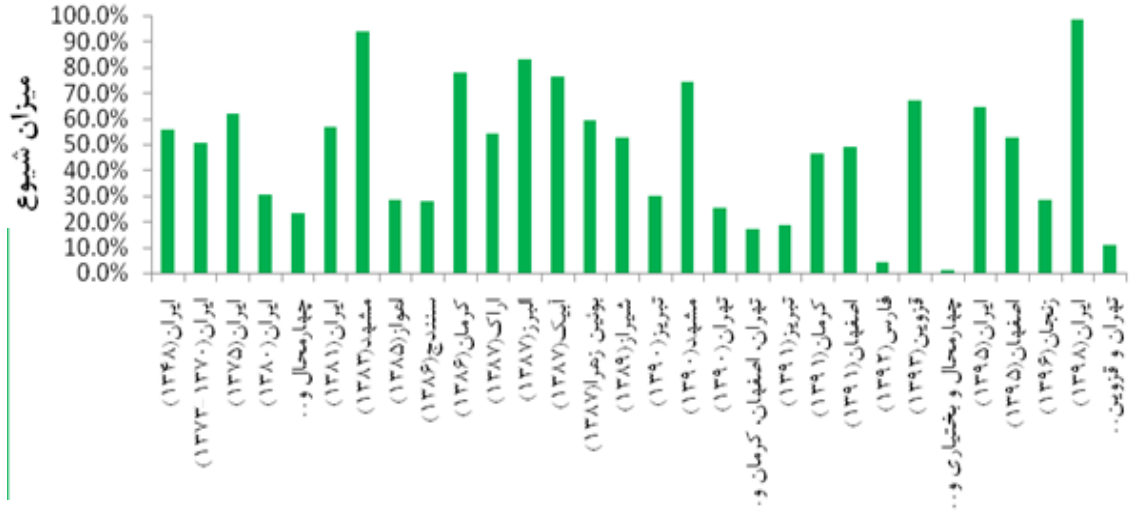
مطالعه‌ای دیگر با هدف تعیین شیوع و شناسایی عوامل خطر مرتبط با Neospora caninum، هرپس‌ویروس گاوی تیپ ۱(BHV-1) و عفونت ویروس اسهال ویروسی گاوان (BVDV) در گاوهای شیری صنعتی نژاد هلشتاین استان اصفهان انجام گرفت. بدین منظور از ۲۱۶ گاو به ظاهر سالم از ۱۶ گاوداری در شمال، جنوب، شرق و غرب اصفهان نمونه خون گرفته شد. آنتی‌بادی‌های N. caninum،

BHV-1 و BVDV بـــا اســـتفاده از کیـــت تجـــاری ELISA شناسـایی شـد. مهم‌تـرین فاکتورهـای خطـر عفونـت BVDV در گاوهـا، گروه‌هـای سـنی، میـزان زایـش دام، میـزان تولیـد شـیر و مرحلـه بـارداری بودنـد (p <۰/۰۵) و در نهایـت شـیوع کلـی BVDV ۵۲/۸ درصد برآورد شد (۳۷).

زنجـــان: در اســتان زنجـان بـه‌منظور شناسـایی آنتی‌بادی‌هـــای ویروس‌هـــای BVDV و BHV-1 از میـان ۱۰ گلـه، ۵۶۲ نمونـه از گاوهـای ایـن منطقـه بـه‌طور تصـادفی انتخـاب و مـورد آزمـایش قـرار گرفتنـد. داده‌هـا بـا ضـریب همبسـتگی پیرسـون (Pearson)، مجـذور کـای و آزمـون رگرسـیون لجسـتیک تحلیـل شـد. در مجمـوع ۱۰ گلـه آزمـایش شـده، BVDV در ۹ گلـه گـزارش شـد. شـیوع سـرمی عفونـت BVDV، ۲۸/۶ درصـد و درصـد دام‌هـای PI برابـر بـا ۰/۵۳ درصـد بـود. تجزیـه و تحلیـل آمـاری نشـان داد کـه جنسـیت و سـن از جمله عوامـل خطـر مهـم بـرای افـزایش شـیوع هـر دو بیمـاری هسـتند (P <۰,۰۵). درحالی‌کـه نـژاد بـه‌عنوان یک عامـل خطـر قـوی فقـط بـرای BVDV تعیـین شـد (P <۰,۰۰۱). علاوه بـر ایـن، مطالعـه حاضـر ثابـت کـرده اسـت کـه عفونـت BVDV همـراه بـا عفونـت BHV-1 احتمال رخداد بیشتری دارد (۳۸).

چهارمحـــال و بختیـــاری: در ارزیـابی کـل گاوهـای اســـتان چهارمحـــال و بختیـــاری، ۲۳/۳۶ درصـــد، آنتی‌بـــادی علیـــه BVDV داشـــتند (۳۸). در مطالـــه‌ای دیگـر کـه بـا هـدف تعیـین ارتبـاط احتمـالی بـین عفونت‌هـای BVDV و BIV بـود، از مجمـوع ۱۸۰۰ گـــاو در فارم‌هـــای صـــنعتی اســـتان‌های اصـــفهان و چهارمحـال و بختیـاری، ۱۹ مـورد برابـر بـا ۱/۰۶ درصـد عفونـت BVDV و ۱۰ مـورد برابـر بـا ۰/۵۵ درصـد عفونـت BIV نشـان داده شـد و ارتبـاط معنـی‌دار آمـاری بـین وضـعیت آلـودگی بـه BIV و BVDV مشاهده گردید (۳۹).

میـزان شـیوع آلـودگی در ایـران از سـال ۱۳۴۸ تـا سـال ۱۳۹۹ در شـهرهای مختلـف ایـران در نمـودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱-میزان شیوع آلودگی از سال ۱۳۴۸ تا سال ۱۳۹۹ در شهرهای مختلف ایران

درمان: با توجه به ماهیت عفونت‌های ویروسی، هیچ درمانی برای بهبود قطعی حیوان از عفونت ویروسی وجود ندارد.

کنترل: روش‌های کنترلی جهت پیشگیری از ورود ویروس BVD به دامداری فقط در دامداری‌های بسته قابل اجراست. سیستم‌های حفاظتی شدید با جداسازی و آزمایش همه دام‌هایی که وارد گاوداری می‌شوند، برای اطمینان از این که هیچ ویروسی وارد نمی‌شود، ضروری است. برنامه پیشگیری منطقی شامل محدودسازی رفت و آمد دام‌ها فقط در موارد ضروری و پرهیز از جابجایی دام‌های آبستن و خرید دام‌های جایگزین (شامل تلیسه‌های بارور) از گله‌هایی که ثبت درست و دقیقی از سابقه بیماری و برنامه مایه‌کوبی دارند، می‌باشد. جدا کردن دام‌های جدید به مدت ۳ هفته باید از انتقال ویروس از گاوهای به شدت آلوده (غیر PI) پیشگیری کند. اگر تعداد گاوهای جانشین گله کم باشد، ممکن است بتوان همه دام‌ها را پیش از خرید آزمایش کرد تا مطمئن شد که عفونی مستمر نیستند. این مورد خصوصاً در گاوهای نری که برای تلقیح استفاده می‌شوند حایز اهمیت است. در گزارشی به‌منظور بکارگیری روش‌های کنترلی عفونت BVD با جمع‌آوری داده‌های مربوط به ۱۰۷ کشور طی سال‌های ۱۹۶۰ تا ۲۰۱۷، وضعیت اپیدمیولوژیک ناهمگن برای شیوع BVD تعریف گردید. در این پژوهش برنامه‌های کنترلی در چند دسته قرار گرفتند که متأسفانه کشور ایران در دسته کشورهایی که آزمایش گله بدون هیچ برنامه کاهشی انجام می‌گیرد، قرار گرفت (BB). تحقیقات گسترده در سطح ملی کشورهای اروپایی نشان داده‌اند که عامل شیوع دام‌های PI در سطح دامداری‌ها، عدم موفقیت در کنترل و یا انجام برنامه‌های ریشه‌کنی همانند واکسیناسیون می‌باشد. شناسایی و حذف دام‌های PI، کنترل حرکت گله‌های آلوده، رعایت مسائل امنیت زیستی و نظارت بر اجرای دقیق این برنامه‌ها لازمه کنترل بیماری است. بنابراین به نظر می‌رسد مهم‌ترین اقدام جهت مبارزه جدی با این بیماری علاوه بر اعمال اصول امنیت زیستی، استفاده از سیاست‌های منسجم کلان مدیریتی در سطح ملی خواهد بود (۲۳). در گاوهای دچار استرس، عفونت ویروسی BVD تضعیف ایمنی ناشی از استرس را وخیم‌تر می‌کند. روش‌های مدیریتی که منجر به تضعیف ایمنی می‌گردد، مثل عملیات پروار‌بندی، غالباً منجر به افزایش انتقال عوامل بیماری‌زا شامل ویروس BVD می‌گردد. مایه‌کوبی علیه ویروس BVD پیش از رخداد بیماری تنفسی قابل پیش‌بینی ممکن است تضعیف ایمنی را که به تکثیر سویه‌های طبیعی ویروس BVD کمک می‌کند، به حداقل برساند. از طرف دیگر، این مایه‌کوبی شدت عفونت سایر عوامل بیماری‌زا را که در مجموعه بیماری تنفسی نقش دارند کاهش می‌دهد. تمامی برنامه‌های کنترلی که در بسیاری از کشورهای جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند، عمدتاً به تشخیص حیوانات PI، از بین بردن آنها و جلوگیری از بازگشت آنها به گله‌ها بستگی دارد. شناسایی حیوانات PI در مراحل اولیه، به‌ویژه بلافاصله پس از تولد، فایده قابل توجهی در اجرای برنامه‌های کنترل BVDV دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌های این مطالعه نشان داد که میانگین درصد شیوع بیماری اسهال ویروسی گاوان در ایران بنابر مطالعات انجام گرفته تا اواخر سال ۱۳۹۹، برابر با ۴۷/۳۷ درصد است که شیوع و گستردگی فراوان این بیماری را در سراسر کشور نشان می‌دهد. بیشترین میزان این شیوع و گستردگی به ترتیب در شهرهای مشهد، البرز و کرمان گزارش شده است. با توجه به مطالعات انجام شده در مورد شیوع این بیماری و پراکندگی آن، بسیار واضح است این بیماری در ایران اهمیت بالایی دارد. یکی از دلایل

کاهش باروری و بازدهی تولید مثلی و به دنبال آن افزایش خسارت اقتصادی در گله‌های گاو شیری در ایران می‌تواند به دلیل شیوع بالای این بیماری در گله‌ها باشد. بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که سیاست‌های کنترلی این بیماری در گله‌های گاو شیری در ایران دقیق‌تر و کامل‌تر انجام شود. که بر اساس منابع یکی از اقدامات اساسی در زمینه کنترل و حتی ریشه‌کنی این بیماری در گله‌های گاو شیری شناسایی حیوانات PI و حذف آن در گله می‌باشد که با انجام این سیاست می‌توان شاهد کنترل و کاهش چشم‌گیر این بیماری در گله‌های صنعتی گاو شیری در شهرهای مختلف ایران بود.

References

1- Pinior B, Köfer J. The effect of bovine viral diarrhoea virus on fertility in dairy cows: two case-control studies in the province of Styria, Austria. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2016; 129(3/4): 103-10.

2- Moennig V, Becher P. Control of bovine viral diarrhea. Pathogens. 2018; 7(1): 29.

3- Kholghi M, Moradi Shahre Babak M, Sadeghi M, Miraei-Ashtiani SR, Ranjbar MM, Lotfi M. Investigating on the fitness of the strategies to control the BVD infection in Holstein race. *Iran J Appl Anim Sci*. 2020; 51(2): 163-71 [In Persian].

4- Sedighi nejad S. A Survey on BVD-MD in Iran. *Vet res biol produc*. 1996; 9(1): 41-138 [In Persian].

5- Grom J, Barlic-Maganja D. Bovine viral diarrhoea (BVD) infections–control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. *Vet Microbiol*. 1999; 64(2-3): 259-64.

6- Taylor L, Rodwell B. Outbreak of foetal infection with bovine pestivirus in a central Queensland beef herd. *Aust Vet J*. 2001; 79(10): 682-5.

7- Billinis C, Leontides L, Amiridis G, Spyrou V, Kostoulas P, Sofia M. Prevalence of BVDV infection in Greek dairy herds. *Prev Vet Med*. 2005; 72(1-2): 75-9.

8- Wang Y, Feng B, Niu C, Jia S, Sun C, Wang Z, et al. Dendritic cell targeting of bovine viral diarrhea virus E2 protein expressed by Lactobacillus casei effectively induces antigen-specific immune responses via oral vaccination. *Viruses*. 2019; 11(6): 575.

9- Davasaz Tabrizi A, Zare P, Davoudi Y, Mosaferi S. Prevalence of bovine viral diarrhea disease investigated with indirect ELISA method in dairy Holstein cows of Tabriz region. Vet *Clin Pathol*. 2011; 5(1 (17) Spring): 1067-73.

10- Valle P, Martin S, Tremblay R, Bateman K. Factors associated with being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the Møre and Romsdal County of Norway. *Prev Vet Med*. 1999; 40(3-4): 165-77.

11- Mars M, Van Maanen C. Diagnostic assays applied in BVDV control in The Netherlands. *Prev Vet Med*. 2005; 72(1-2): 43-8.

12- Wernicki A, Urban-Chmiel R, Stegierska D, Adaszek L, Kalinowski M, Puchalski A, et al. Detection of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in young beef cattle in eastern and south-eastern regions of Poland. *Pol J Vet Sci*. 2015; 18(1.(

13- Brewoo JN, Haase CJ, Sharp P, Schultz RD. Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007; 115(3-4): 369-74.

14- Barr BC, Anderson ML. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *Veterinary Clinics of North America: Food Anim Pract.* 1993; 9(2): 343-68.

15- Baker JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Anim Pract.* 1995; 11(3): 425-45.

16- Daliri M, Ghorashi SA, Morshedi D, Hajian T, Afshar K. Detection of bovine viral diarrhea virus in bovine semen using nested-PCR. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2007; 5(1): 48-51 [In Persian].

17- Houe H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Anim Pract.* 1995; 11(3): 521-47.

18- Hedayat N, Hajikolaei MRH, Shapouri MRSA, Mashhadi A-RG, Izadnia H, Daghari M. Isolation and identification of bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) from latently infected water buffalo (Bubalus bubalis) from Iran. *Trop Anim Health Prod*. 2020; 52(1): 217-26.

19- Khezri M. Bovine viral diarrhea (BVD): A review emphasizing on Iran perspective. *J Adv Vet Anim Res*. 2015; 2(3): 240-51.

20- Kargar MR, Bokaei S, Akhavizadegan M, Charkhkar S, Meshkot M. Seroepidemological Survey for Antibodies against Infectious Bovine

Rhinotracheitis and Bovine Herpes 4 Viruses among Cattle in Different Provinces of Iran. *Arch Razi Ins.* 2001; 5: 93-102 [In Persian].

21- Dehkordi FS. 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(1): 1-6.

22- Garoussi M, Mehrzad J, Nejati A. Investigation of persistent infection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in Holstein dairy cows. *Trop Anim Health Prod*. 2019; 51(4): 853-8.

23- Badii A, Mousakhani F, Zolfaghari A, Zafari M, Malekan M. Prevalence of BVD in bovine aborted fetuses of dairy cattle herds by rt-pcr in tehran province. *J Vet* clinic Res. 2011; 2 (6): 68-73 [In Persian].

24- Garoussi MT, Haghparast A, Hajenejad M. Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus antibodies among the industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran .*Trop Anim Health Prod*. 2009; 41(4): 663-7.

25- Ghaemmaghami S, Ahmadi M, Deniko A, Mokhberosafa L. Serological study of BVDV and BHV-1 infections in industrial dairy herds of Arak, Iran. *Iran j veterinary sci technol*. 2013; 5(2): 53-61 [In Persian].

26- Bahonar AR, Nekouie Jahromi OA, Omidvarian MJ, Najjar E, Shokri MR, Mirzaie K. Bovine viraldiarrheain qazvin province (iran): aseroprevalence study. *J Vet Res.* 2011; 66(4): 319-23 [In Persian].

27- Khalili M, Molaei MM, Mozaffari AA , Giraei FD, Ehsan N-f. Prevalence of bovine viral diarrhea virus antibodies in dairy cattle herds in the suburb of Kerman, Iran. *Comp Clin Path.* 2012; 21(6): 1183-5 [In Persian].

28- Sakhaei E, Khalili M, Kazeminia S. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran. *Iran J Vet Res.* 2009; 10 (26): 49-53 [In Persian].

29- Kish G, 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: 217–22.

30- Badiei K, Ghane M, Mostaghni K. Prevalence of bovine viral diarrhea vrius antibodies among the industrial dairy cattle herds in suburb of Shiraz, Iran. *Middle East J Sci Res.* 2010; 6(4): 403-7.

31- Fakur S, Hemmatzadeh F. A serological study on bovine viral diarrhea–(bvd) in sanandaj area. *J. Vet Med.* 2007 1(1): 1-9 [In Persian].

32- Haji KM, SEYFIABAD SM. Serological study of bovine viral diarrhoea virus infection of cattle in Ahwaz. 2007 [In Persian].

33- 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 Clin Pathol.* 2011; 5(1): 1067- 73 [In Persian].

34- Rezaeisaber A, Badie AD, Nazeri M. Serum antibody detection against bovine viral diarrhea virus (BVDV) through ELISA method in sarabian dairy cows. *Aust J Basic Appl Sci.* 2011; 5(10): 696-9.

35- Shirvani E, Lotfi M, Kamalzadeh M, Noaman V, Bahriari M, Morovati H, et al. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV–1 ,PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). *Trop Anim Health Prod*. 2012; 44(1): 191-5.

36- Noaman V, Nabinejad AR. Seroprevalence and risk factors assessment of the three main infectious agents associated with abortion in dairy cattle in Isfahan province, Iran. *Trop Anim Health Prod*. 2020; 52(4): 2001-9.

37- Erfani AM, Bakhshesh M, Fallah MH, Hashemi M. Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus and bovine herpes virus-1 in Zanjan Province, Iran. *Trop Anim Health Prod*. 2019; 51(2): 313-9.

38 Hemmatzadeh F, Kojouri G, Kargar Moakhar R, Rohany M. A serological survey on bovine viral diarrhea virus infection in Chahar Mahal Bakhtiary province, Iran. *J Vet Med*. 2001; 56(3): 85-92.

39- Mokhtari A, Mahzonieh M. The first study of bovine immunodeficiency virus (BIV) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) co-infection in industrial herds of cattle in two provinces of Iran. *Iranian* J Vet Med. 2014; 8(1): 27-33 [In Persian].

A review on the disease and prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus in Iran

Seywan Veysi[1], Abolfazl Hajibemani[2]*

1- DVM student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Assistant professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Iran.

Receive: July 10, 2020; Revise: August 20, 2020; Accept: September 5, 2020

Summary

Bovine viral diarrhea (BVD) is an endemic disease in most parts of the world, and major damages of the disease include reduced milk production, reproductive problems such as abortion, weight loss, growth loss and decrease of immune system. High prevalence and rapid transmission among animals are characteristics of this disease so that the importance of control of the disease has increased. Conditions of farms, geographical location of regions and other risk factors, including the presence of other viral and bacterial diseases and management of reproduction and milk production influence on the prevalence of BVD in cows. Many studies have reported the prevalence of this disease in different parts of Iran. The highest prevalence of this disease has been reported in Mashhad, Karaj and Kerman cities, respectively. The average prevalence of BVD in Iran is 47.37% according to studies reported until the end of the year1399 (2020). Results of studies indicate that the prevalence of this disease is higher throughout Iran. Therefore, importance of control and prevention of this disease is high in Iran.

Keywords: *BVD, Prevalence, Iran*

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

حسینعلی عبدی*[۱]، نوید طحان زاده[۱]

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

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

چکیده

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

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

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

مقدمه

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

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۲۵نمونه از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بستری شده در بیمارستان‌های منطقه سیستان و بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های شهر زابل در فاصله زمانی مرداد تا آذر ۹۲ جمع‌آوری گردید. نمونه‌های ادرار در ظرف استریل جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک کانکی آگار وEMB کشت شد وپس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای۳۷درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها شمارش شدند. سپس آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند اکسیداز، تخمیرقندها، حرکت، ایندول، اوره آز، احیای نیترات، MR-VP، H2S و سیمون سیترات انجام شد و نهایتاً تعداد ۱۰۰ نمونه *اشریشیا کلی* تشخیص داده شد.

در این مطالعه جهت استخراج DNA ژنومی از روش جوشاندن استفاده شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای انجام Multiplex-PCR به طور خلاصه، با حجم نهایی۱۶میکرولیتر (۲ میکرولیترDNA، ۱میکرولیتر از هر مخلوط پرایمر(حاوی هر

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

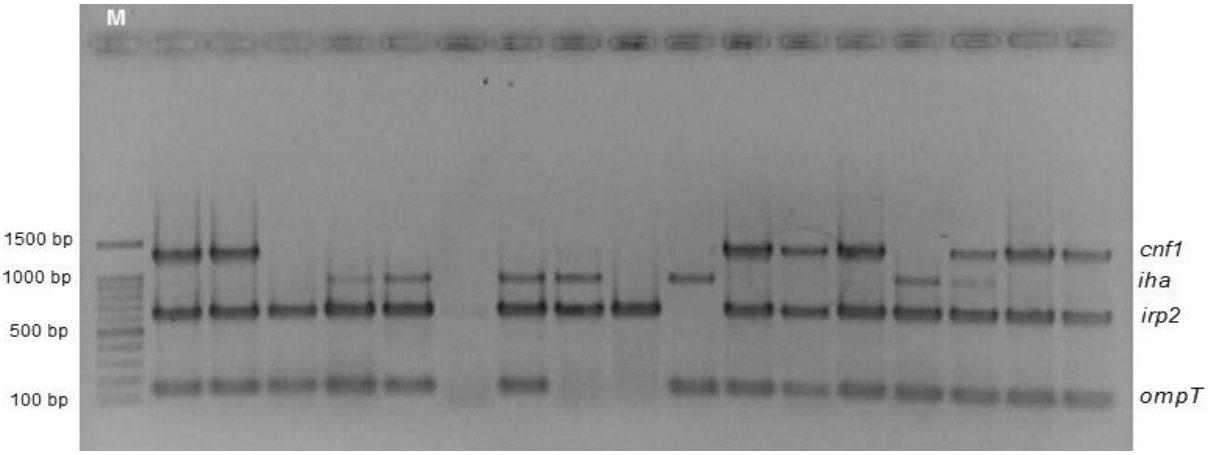
جدول۱- مشخصات پرایمرها برای تکثیر ژن‌های حدت

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

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

نتایج

از ۱۰۰ نمونه *اشریشیا کلی* تعداد ۷۲ نمونه متعلق به گروه‌های فیلوژنتیکی A (۱۷ نمونه) و B2(۵۵ نمونه) بودند. بقیه نمونه‌ها در گروه‌های فیلوژنتیکی B1 و D قرار گرفتند و از این مطالعه حذف شدند. فراوانی ژن‌های حدت cnf1، iha، irp2 و ompT به ترتیب ۳۹، ۲۹، ۹۲ و ۷۸ درصد در بین ۷۲ نمونه دیده شد. شکل ۱ نمونه الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد را برای ژن‌های حدت نشان می‌دهد. تمام نمونه‌های گروه فیلوژنتیکی A فاقد ژن توکسین *cnf1* بودند. بیشترین مقدار ژن‌های حدت در گروه فیلوژنتیکی B2 مشاهده شد. فقط در یک سویه از نمونه‌های فیلوژنتیکیB2 ژن *irp2* دیده نشد. هیچ کدام از سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی A فراوانی ژنی بالاتری نسبت به گروه B2 نداشتند. تفاوت معنی‌داری($P \geq ۰/۰۵$) برای حضور ژن‌های *cnf1* و *ompT* در دو گروه فیلوژنتیکی A و B2 مشاهده شد (جدول ۲).



شکل۱- الکتروفورز در ژل آگارز برای محصولات Multiplex-PCR

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

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

جدول۳ - الگوهای مختلف توزیع ژنی

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

بر اساس نوع الگوی توزیع ژن‌ها در دو گروه فیلوژنتیکی B2 و A تعداد ۱۰ الگو مشاهده شد که با عنوان Ec1 تا Ec10 در جدول ۳ آمده است. دو سویه متعلق به گروه Aفاقد چهار ژن مورد مطالعه بودند و دو سویه متعلق به B2 حاوی تمام ژن‌های مورد مطالعه بودند. ۱۲ سویه فقط حاوی ژن *irp2* بودند که یک سویه متعلق به گروه B2 بود و ۱۱ سویه دیگر متعلق به گروه A بودند. ژن *iha* و *cnf1* برعکس دو ژن دیگر، در هیچ سویه‌ایی به تنهایی دیده نشد و به همراه حداقل یک ژن دیگر بود. در هیچ کدام از ۱۷ سویه A بیش از دو ژن حدت نداشتند.

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه بر روی جدایه‌های *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از عفونت‌های ادراری در دو گروه فیلوژنتیکیA و B2

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

در این مطالعه معلوم شد که در بین ایزوله‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک فراوانی سویه‌های B2 خیلی بیشتر از سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی A می‌باشد. اطلاعات مطالعه ما در این مورد با اکثر مطالعات قبلی همخوانی دارد (۱۲- ۸). رژیم غذایی به عنوان عامل کلیدی در تعیین فراوانی گروه‌های فیلوژنتیکی *اشریشیاکلی* در پستانداران گزارش شده است (۱۳)، علاوه براین موقعیت جغرافیایی جمعیت‌های انسانی نقش مهمی را در ساختاربندی جمعیت‌های *اشریشیا کلی* دارد و پیشنهاد می‌شود که سطح بهداشت می‌تواند به عنوان عامل مؤثر در تنوع ایزوله‌های بومی هر منطقه، خصوصاً در مناطق گرمسیری نقش داشته باشد (۱۴).در پژوهش حاضر بر اساس توزیع ژن‌های حدتی مورد مطالعه در بین ۷۲ ایزوله *اشریشیا کلی*، ۱۰ الگوی توزیع ژنی منحصر به فرد مشاهده شد (جدول۳). دو سویه حامل تمام ژن‌های حدت مورد مطالعه بود که آن هم به گروه فیلوژنتیکی B2 تعلق داشت. در دو سویه هیچ یک از ژن‌های حدت مورد مطالعه مشاهده نگردید که این ایزوله متعلق به گروه فیلوژنتیکی A بود. نتایج این مطالعه با پژوهش انجام شده در رومانی همخوانی دارد (۱). با توجه به توزیع ژنی در دو گروه B2 و A بیشترین توزیع ژن‌های حدت در ایزوله‌های گروه B2 و کمترین در گروه A مشاهده شد، مطالعات قبلی نیز این نوع توزیع ژنی را تأیید می‌کند (۱۱،۱۰، ۸). در یک مطالعه در تهران که توسط کریمیان و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی سویه‌های یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری انجام شد نتایج متفاوتی گزارش شد. این گروه فراوانی ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* را به ترتیب ۵۰، ۵، ۱۸ و ۱۱ درصد گزارش کردند (۱۵). علت تفاوت در نتایج می‌تواند ناشی از تفاوت در منطقه جغرافیایی یا تفاوت آب و هوایی باشد. در پژوهش دیگر نویسنده بر روی ۱۰۰ سویه *اشریشیا کلی* خارج روده‌ایی ایجاد کننده عفونت تناسلی زنانه مقدار ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و*ompT* به ترتیب به میزان ۱۰، ۸، ۶۳ و ۴۵ درصد گزارش شد (۱۶). این نتایج به نتایج مطالعه حاضر نزدیک است و احتمالاً دلیل تفاوت جزئی با نتایج مطالعه حاضر می‌تواند در نوع متفاوت سویه‌های *اشریشیا کلی* و یا جامعه آماری بزرگتر نسبت به این مطالعه باشد . همچنین در این مطالعه از مجموع ۱۳۲ ایزوله *اشریشیاکلی* ۱۴ و۶۰ درصد به ترتیب در گروه‌های فیلوژنتیکی Aو B2 قرار گرفتند و بیشترین میزان توزیع ژن‌های حدت در گروه B2 قرار داشت. این میزان زیاد توزیع ژن‌های حدت در گروه B2 کاملاً با نتایج تحقیق اخیر مطابقت دارد. همچنین در تحقیق دیگر نویسنده روی ۹۴ نمونه *اشریشیا کلی* مدفوعی، فراوانی ژنی ۸ ژن بررسی گردید که فراوانی ژنی ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و*ompT* به ترتیب به میزان ۴، ۲۶، ۹۲ و ۶۷ درصد بودند (۱۷). به علت اینکه سویه‌های *اشریشیا کلی* مدفوعی می‌توانند منبع خوبی برای ایجاد عفونت ادراری خصوصاً در زنان باشند. این نتایج به جز فراوانی ژنی *cnf1* با نتایج ما مطابقت نزدیکی دارد و دلیل تفاوت فراوانی ژنی ژن *cnf1* می‌تواند به علت تفاوت در نوع سویه‌های *اشریشیا کلی* باشد.

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Summary

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

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

مروری بر عوامل عفونی سقط جنین گوسفند و بز در ایران

محمد جواد بهزادی شهربابک*

۱۱۶

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

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

چکیده

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

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

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

مقدمه

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

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

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

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

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

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

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

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

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

عوامل باکتریایی

بروسلا: دو گونه‌ی *بروسلا اویس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* می‌توانند در گوسفند و بز آلودگی ایجاد کنند و منجر به سقط جنین شوند (۵، ۶). به نظر می‌رسد بزها به صورت جهانی مستعد ابتلا به *بروسلا ملی‌تنسیس* هستند در صورتی که ابتلای گوسفندان به این ارگانیسم بر اساس نژاد متفاوت است (۷). برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۲۸ *بروسلا ملی‌تنسیس* از شیر یک بز سقط کرده جدا شد و ۲ سال بعد مطالعاتی نقش آن را در ایجاد سقط گوسفند و بز در گله‌های اطراف اصفهان نشان داد و هم اکنون در تمام مناطق کشور اندمیک است. میزان شیوع بروسلوز در جمعیت گوسفند و بز روستایی ۲/۱ درصد برآورد گردیده است. بیوتایپ 1 *بروسلا ملی‌تنسیس* در گوسفند، بز و انسان به عنوان بیوتایپ غالب و بومی کشور بوده است (۸، ۹). در مطالعه حملی و همکاران در گله‌های گوسفند اطراف تبریز تست سرولوژیک روی ۱۰۰ میش سقط کرده ۱۲ درصد

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

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

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

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

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

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

مطالعاتی که در کشورهای اروپایی صورت گرفته، نشان می‌دهد اهمیت *کلامیدوفیلا* در موارد سقط جنین بز به اندازه آنچه در مورد گوسفند مشاهده شد نیست (۶). با توجه به اینکه ردیابی *کلامیدوفیلا* از طریق کشت امکان پذیر نیست و آزمایش‌های مولکولی معمول نیز در این زمینه چندان موفق نیستند، استفاده از nested PCR برای پیدا کردن DNA کلامیدیا توصیه شده است (۳). همین مسأله می‌تواند نشان دهد که سهم کلامیدیا از آنچه در مطالعات ذکر شده بیان شد احتمالاً بالاتر باشد.

کمپیلوباکتر: *کمپیلوباکتر فتوس* زیرگونه‌ی فتوس از عوامل شایع سقط جنین گوسفند در دنیا محسوب می‌شود (۶). در ایران نیز نقش این عامل در سقط جنین مورد مطالعه بیشتری نسبت به سایر عوامل قرار گرفته است. بیشترین درصد آلودگی به *کمپیلوباکتر* در بین این مطالعات توسط هرکی نژاد و همکاران گزارش شده است که از ۱۲۹ سوآپ مهبلی میش‌های افشاری استان زنجان با سابقه سقط با روش PCR میزان آلودگی ۵۱/۹ درصد به کمپیلوباکتر

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

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

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

لیستریا: دو گونه‌ی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *لیستریا ایوانووی* عامل سقط جنین گوسفند و بز هستند. لیستریا توزیع جهانی دارد و عامل حدود ۲ درصد از سقط‌های گوسفندی در بریتانیا است (۶). همان‌طور که از اطلاعات جدول ۱ مشخص است، در ایران بررسی چندانی در تعیین سهم لیستریا در موارد سقط جنین گوسفندی صورت نگرفته است. تنها در مطالعه‌ی صادقی و همکاران در استان مرکزی از ۲/۸ درصد جنین‌های سقطی گوسفند و بز لیستریا جدا شده است (۲۷). در بعضی از معدود مطالعات انجام شده اثری از این باکتری در جنین‌های سقط شده یافت نشده است بنابراین به نظر می‌رسد این ارگانیسم سهم چندانی در ایجاد سقط در ایران نداشته باشد. البته لازم است مطالعاتی به طور ویژه این باکتری را در جنین‌های سقطی مناطق مختلف کشور مورد بررسی قرار دهند.

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

گزارش شده است (۳۹-۳۵)، جا دارد مطالعات دقیق‌تری نقش این ارگانیسم را در ایجاد سقط جنین تعیین کند.

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

عوامل باکتریایی غیر اصلی

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

عوامل تک یاخته‌ای

توکسوپلاسما: *توکسوپلاسما گوندی* یکی از رایج‌ترین عوامل سقط جنین میش و بز در بسیاری از کشورهای دنیا است. این تک یاخته توزیع جهانی دارد (۵). این تک یاخته در بعضی کشورها از جمله انگلیس و نیوزلند پس از کلامیدوفیلا دومین عامل متداول سقط گوسفندی به شمار می‌رود (۶). در ایران مطالعات متعددی به جستجوی *توکسوپلاسما* در موارد سقط گوسفندی پرداخته‌اند. حمیدی‌نژاد و همکاران میش‌های با سابقه سقط اخیر و میش‌های بدون سابقه سقط را در منطقه اهواز از نظر آلودگی به *توکسوپلاسما* مورد مقایسه سرولوژیک قرار دادند و میش‌های سقط کرده به طور قابل ملاحظه ای نسبت به میش‌های بدون سابقه سقط آلوده‌تر بودند (۴۴). مطالعه‌ی مشابه دیگری نیز همبستگی شدید بین سابقه سقط در میش‌های استان همدان و عفونت *توکسوپلاسمایی* آن‌ها را تأیید کرد (۴۵). مطالعاتی که با روش PCR به جستجوی *توکسوپلاسما* در مغز جنین سقط شده پرداخته‌اند میزان آلودگی ۷ درصد در لرستان (۴۶)، ۶۶ درصد در قزوین (۴۷)، ۱۶/۰۷ درصد در خراسان رضوی (۴۸) و در سیستان ۱۶ درصد (۴۹) را گزارش کرده‌اند. در یک بررسی مولکولی روی ۷۵ جنین سقطی در منطقه اردبیل آلودگی به *توکسوپلاسما* یافت نشد (۵۰). بررسی سرم‌شناسی مایعات جنین‌های سقطی آلودگی ۵/۲ درصد را در مشهد نشان داد (۵۱). مطالعات دیگری نیز نقش *توکسوپلاسما* را در ایجاد سقط جنین در گله‌های گوسفند و گاو ایران نشان داده‌اند (۵۲، ۵۳). نقش عفونت *توکسوپلاسمایی* در موارد سقط جنین انسانی کشور در مطالعات کم رنگ نشان داده شده است (۵۶-۵۴). مطالعات متعددی میزان شیوع بالای *توکسوپلاسموزیس* را در جمعیت گوسفند، بز، گاو استان‌های مختلف کشور تأیید کرده‌اند (۶۰-۵۷).

نئوسپورا: عفونت *نئوسپورایی* اگر چه در مورد گاو شایع است و در ایران نیز به عنوان عامل سقط جنین در مزارع پرورش گاو مطرح شده اما در گوسفند و بز نادر است. با این حال گزارش‌هایی مبنی بر نقش این تک یاخته در ایجاد سقط جنین گوسفندان قزل و ماکویی شمال غرب ایران (۶۱) و میش‌های استان همدان (۵۳) وجود دارد. البته

مطالعه‌ی دیگری در غرب کشور تفاوت قابل ملاحظه‌ای در شیوع سرولوژیک *نئوسپورا* بین میش‌های سقط کرده و میش‌های بدون سابقه سقط نیافته است و به این ترتیب نقش *نئوسپورا* را در سقط جنین میش‌های منطقه رد کرده است (۶۲). قطعاً با توجه به شیوع این تک یاخته در گله‌های گوسفند و بز ایران (۶۳، ۶۴) انجام مطالعات بیشتر برای ردیابی *نئوسپورا* در سقط جنین گوسفند و بز در کشور لازم است.

عوامل ویروسی

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

28. Fallah S, Hamali H, Jafari Joozani R, Zare P, Norsaadat G. A molecular (PCR) survey on abortions caused by Campylobacter spp. in sheep flocks located on the suburb of Tabriz. IJVST. 2014; 6(1): 23-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

43. Khalili M, Diali HG, Mirza HN, Mosavi SM. Detection of Coxiella burnetii by PCR in bulk tank milk samples from dairy caprine herds in southeast of Iran. Asian Pac J Trop Dis. 2015; 5(2):

119-22.

44. Hamidinejat H, Goraninejad S, Ghorbanpoor M, Nabavi L, Akbarnejad F. Role of Toxoplasma gondii in abortion of ewes in Ahvaz (South-West Iran). Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52(10): 369-71.

45. Heidari H, Gharekhani J, Tavoosidana G. Role of toxoplasmosis in abortion of ewes in western Iran: a serological study. Sci Parasitol. 2013; 14(2): 99-103.

46. Nourmohammadi M, Hamidinejat H, Tabandeh M, Goraninejad S, Bahrami S. Genotyping of zoonotic toxoplasm gondii isolated from aborted fetuses of ewes of Lorestan province based on SAG2, SAG3 and GRA6 molecular markers. JAUMS. 2017; 17(3): 343-52. [In Persion]

47. Habibi G, Imani A, Gholami M, Hablolvarid M, Behroozikhah A, Lotfi M, et al. Detection and identification of Toxoplasma gondii type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin Province of Iran. Iran J Parasitol. 2012; 7(3): 64.

48. Danehchin L, Razmi G, Naghibi A. Molecular detection of Toxoplasma gondii infection in aborted fetuses in sheep in Khorasan Razavi province, Iran. Int J Vet Res. 2017; 11(2): 147-54.

49. sanjarani g. A study on the prevalence of *toxoplasma gondi* infection in aborted Baluchi sheep 2015(10): 1-4.

55. Matin S, Shahbazi G. Study on abortion associated with *Toxoplasma gondii* in women based on PCR detection of aborted placenta and maternal serology in Ardabil, International Conference on

Medical and Clinical Microbiology; 3-4 July 2017; Bangkok, Thailand: P: 2.

56. Ghasemi FS, Rasti S, Piroozmand A, Bandehpour M, Kazemi B, Mousavi SGA, et al. Toxoplasmosis-associated abortion and stillbirth in Tehran, Iran. J Matern-Fetal Neonatal Med. 2016; 29(2): 248-51.

57. Movassaghi AR, Rassouli M, Fazaeli A, Salimi-Bejestani MR. Outbreak of ovine congenital toxoplasmosis in Iran, confirmed by different diagnostic methods. J Parasit Dis. 2016; 40(1): 152-6.

58. Hashemi-Fesharki R. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goats in Iran. Vet Parasitol. 1996; 61(1-2): 1-3.

59. Hashemzadeh Farhang H, Nowzari N, Moazzeni F. Evaluation of seroprevalence of Toxoplasmosis in sheep and goats in Tabriz by ELISA method. Vet Clin Pathol(Veterinary Journal Tabriz). 4(1): 753-7. [In Persion]

60. Sharif M, Sarvi S, Shokri A, Teshnizi SH, Rahimi M, Mizani A, et al. *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in Iran: a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res. 2015; 114(1): 1-16.

61. Asadpour R, Jafari-Joozani R, Salehi N. Detection of *Neospora caninum* in ovine abortion in Iran. J Parasit Dis. 2013; 37(1): 105-9.

fetuses in Sistan district using PCR method: Veterinary Faculty, University of Zabol; 2017. [In Persion]

50. Shahbazi G, Hoghughi Rad N, Madani R, Shjaie S. Evaluation of gene GRA6 IN subtraction of *Toxoplasma gondii* genotypes using PCR-RFLP method in aborted fetuses of Ardabil region. J C P. 2013; 10(3): 1027-32. [In Persion]

51. Razmi GR, Ghezi K, Mahooti A, Naseri Z. A serological study and subsequent isolation of *Toxoplasma gondii* from aborted ovine fetuses in Mashhad area, Iran. J Parasitol. 2010; 96(4): 812-4.

52. Rasuli M, Movasseghi AR, Sami M. Confirmation of the prevalence of Toxoplasmic abortion in a sheep herd with different laboratory methods, The 2nd National Congress Of Veterinary Laboratory Sciences; 12-13 December 2012; Semnan University-Iran: p: 122. [In Persion]

53. Gharekhani J. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in aborted cattle in Hamedan, Iran. JAVAR. 2014; 1(2): 32-5.

54. Saki J, Mohammadpour N, Moramezi F, Khademvatan S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women who have aborted in comparison with the women with normal delivery in Ahvaz, southwest of Iran. ScientificWorldJournal. 2015;

62. Ezatpour B, Alirezaei M, Hassanvand A, Zibaei M, Azadpour M, Ebrahimzadeh F. The first report of *Neospora caninum* prevalence in aborted and healthy sheep from west of Iran. Comp Clin Path. 2015; 24(1): 19-22.

63. Gharekhani J, Esmaeilnejad B, Rezaei H, Yakhchali M, Heidari H, Azhari M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Iranian goats. Ann Parasitol. 2016; 62(2): 111-4.

64. Vajdi Hokm Abad R, Khan Mohammadi M, Moniri Sarabi MR. Evaluation of the Prevalence of *Neospora Caninum* in sheep in Mianeh by competitive ELIZA and indirect immunofluorescence. VMJ. 2014; 7(1): 59-66. [In Persion]

65. Sasani F, Vazirian A, Javanbakht J, Aghamohammd Hassan M. Detection of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion by PCR and histopathology assays. AJCEM. 2013; 1(2): 35-9.

66. Mozaffari AA, Khalili M, Sabahi S. High seroprevalence of Bluetongue virus antibodies in goats in southeast Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2014; 4: S275-S8.

67. Najarnezhad V, Rajae M. Seroepidemiology of Bluetongue disease in small ruminants of north-east of Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(6): 492-5.

68. Imandar M, Hasanpour A, Hasanzadeh M, Mousakhani F, Pourbakhsh SA. Evaluation of Bluetongue Virus Infection in Sheep in Khoy city using the competitive ELIZA method. J C P. 2014;

11(1): 1135-42.

A Review on Infectious Agents of Sheep and Goats Abortion in Iran

Mohammad javad behzadi shahrbabak*

Assistant Professor, Depertment of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, Zabol university, Zabol,Iran.

Receive: February 10, 2019; Revise: March 3, 2019; Accept: March 4, 2019

Summary

Abortion is one of the problems of sheep and goats breeders in Iran and imposes significant economic losses on farmers. Infectious agents are the most common reason for abortion in sheep and goats. Some of these agents, such as Brucella and Toxoplasma, result in zoonotic diseases. Regarding the important role of sheep and goat breeding in livelihood of the people, it is very important in terms of economics and public health to accurately know the abortive infectious agents in sheep and goat flocks. The purpose of this study was to investigate all the literature which attempts to diagnose bacterial, viral and protozoan agents of sheep and goat abortion in Iran. Therefore, all articles related to abortion of sheep and goats, individual infectious agents and their prevalence in the geographical area of Iran or neighboring countries in databases including Science Direct, Pub Med, Scopus, Google scholar, Magiran and Iran doc were searched. Of the English and Persian studies found, 36 studies were conducted on abortion of sheep and goats that their results were inserted in a table for better evaluation. Based on studies that examined the causes of abortion of sheep and goats in different provinces of Iran; Brucella, Toxoplasma, Chlamydophila, Campylobacter and Salmonella are the most common causes of abortion in the country. No study has tracked the viral agents in abortion of sheep and goats in Iran.

Key words: *Iran, Abortion, Infectious agents, Sheep and goat*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 3, No. 1, Spring & Summer 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