نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ۳، شماره ۲

ناشر: دانشگاه زابل

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

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

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

هیات دبیران:

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

محمد بکائیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

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

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

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

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

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

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

تقی 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

تشخیص مولکولی ویروس تب خونریزی دهنده کریمه-کنگو در گونه‌های کنه جمع‌آوری شده از دام‌های اهلی نوار مرزی ایران-افغانستان

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

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

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

چکیده

بیماری تب خونریزی دهنده کریمه کنگو یک بیماری ویروسی، حاد، تب دار و خونریزی دهنده می‌باشد که باعث مرگ میر قابل توجهی در انسان می‌شود. ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو از گونه های مختلف کنه، از جمله ۲۸ گونه کنه‌ی سخت و دو گونه کنه‌ی نرم جدا شده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر مشخص شدن شیوع ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در کنه‌های جدا شده از دام‌های اهلی روستاهای مرزی منطقه سیستان در شمال استان سیستان و بلوچستان است. در این مطالعه از ۵۴ رأس دام شامل ۵۰ گوسفند، ۳ بز، ۱ گاو در چهار روستای چوتو، نادر علم‌خان، میلک و سنجرانی، از منطقه سیستان نمونه‌برداری صورت گرفت. در ابتدا کنه‌ها تعیین جنس و گونه شدند که شامل *ریپیسفالوس سانگوئینوس*، *ریپیسفالوس (بووفیلوس) آنولاتوس* و *هیالوما آناتولیکوم* بود. سپس نمونه‌ها توسط آزمایش زنجیره‌ای پلمراز معکوس از نظر حضور ژنوم ویروس مورد بررسی قرار گرفتند. حضور ویروس در هیچ نمونه‌ای از ۵۰ نمونه‌ی تست شده به تأیید نرسید. یافته‌های ما نشان‌دهنده عدم گردش *ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو* در کنه‌های روستاهای مرزی سیستان است. با این حال، از آنجا که استان سیستان و بلوچستان یک منطقه اندمیک برای این بیماری است، برای درک بهتر ناقلین کنه‌ای در این منطقه، تحقیقات بیشتری لازم است.

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

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: saadati.dariush@gmail.com

مقدمه

بیماری تب خونریزی دهنده کریمه کنگو یک بیماری ویروسی (متعلق به جنس *Nairovirus* و خانواده *Bunyaviridae*)، حاد، تب‌دار و خونریزی دهنده می‌باشد که باعث مرگ و میر قابل توجهی در انسان می‌شود. میزبان ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو عمدتاً پستانداران و پرندگان وحشی هستند. گرچه در گوسفندان، بزها و گاوها حضور و تکثیر ویروس در خون رخ می‌دهد، اما به بیماری مبتلا نمی‌شوند و هیچ علائمی به جز تب بسیار خفیف ندارند (۱۵، ۱۶). راه‌های انتقال ویروس شامل گزش کنه، تماس با خون یا مایعات بدن حیوانات یا انسان آلوده می‌باشد. این بیماری به عنوان یک عفونت بیمارستانی نیز در نظر گرفته می‌شود و انتقال از بیماران به کادر درمان، خصوصاً در مناطق اندمیک مشاهده شده است(۱۵، ۲۰). ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو از گونه‌های مختلف کنه، از جمله ۲۸ گونه کنه‌ی سخت و دو گونه کنه‌ی نرم جدا شده است با این حال کنه‌های نرم نقش مهمی در گسترش جغرافیایی ویروس ندارند، زیرا ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو نمی‌تواند در مراحل بالغ یا نوچگی این کنه‌ها تکثیر شود. افزایش دما خصوصاً در بهار و تابستان ممکن است باعث فراوانی و افزایش فعالیت کنه‌ها شود که نتیجه آن افزایش ابتلای انسان‌ها به بیماری است (۱۰، ۱۶). جنس *هیالوما* و *ریپیسفالوس* به عنوان ناقلین اصلی ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در ایران مطرح هستند (۱۷). تب خونریزی دهنده کریمه کنگو از آسیا، اروپا و آفریقا گزارش شده است و کشورهای همسایه ایران از جمله عراق، ترکیه، افغانستان و پاکستان به عنوان کانون‌های اندمیک بیماری در نظر گرفته می‌شوند. اولین گزارش ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در ایران به سال ۱۹۷۰ برمی‌گردد. چند سال بعد از اولین گزارش ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو، در سال ۱۹۹۹ طغیان این بیماری در استان چهارمحال و بختیاری، گزارش شد. تا کنون بیماری تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در ۲۷ استان از ۳۱ استان ایران گزارش شده است (۲). آمار منتشر شده توسط مرکز آمار ایران در سال۱۳۹۶، جمعیت نشخوارکنندگان سبک و سنگین سیستان و بلوچستان را به ترتیب ۳۲۳۲۵۴۷ و ۱۷۴۳۵۴ رأس دام برآورد کرد که بیانگر نقش غیر قابل انکار دامداری و دامپروری در اقتصاد و زندگی مردم این منطقه می‌باشد. داشتن کیلومترها مرز مشترک با کشور افغانستان که بیماری‌های زیادی از جمله مالاریا، لشمانیوز، انسفالیت کنه‌ای و تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در آن اندمیک هستند در کنار رواج شیوه‌های سنتی و نیمه سنتی نگهداری و پرورش دام‌ها در این استان، اهمیت مطالعه ناقلین کنه‌ای را دو چندان می‌کند. هدف از مطالعه‌ی حاضر مشخص شدن شیوع ویروس تب خون ریزی دهنده کریمه ی کنگو در کنه‌های جدا شده از دام‌های اهلی روستاهای مرزی منطقه سیستان در شمال استان سیستان و بلوچستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منطقه جغرافیایی و نمونه‌برداری: در این مطالعه از ۵۴ راس دام شامل ۵۰ راس گوسفند، ۳ راس بز، ۱ راس گاو در چهار روستای چوتو، نادر علم‌خان، میلک و سنجرانی، از منطقه سیستان در بازه زمانی تیر ۱۳۹۸، نمونه‌برداری صورت گرفت. استان سیستان و بلوچستان با وسعتی حدود ۱۸۰،۷۲۶ کیلومتر مربع، با قرار گرفتن در بین ۲۵ درجه و ۳ دقیقه تا ۳۱ درجه و ۲۷ دقیقه عرض شمالی از خط استوا و ۵۸ درجه و ۵۰ دقیقه تا ۶۳ درجه و ۲۱ دقیقه طول شرقی از شمال با استان

خراسان جنوبی، از شرق با کشورهای افغانستان و پاکستان، از غرب با کرمان و هرمزگان و از جنوب با دریای عمان هم‌مرز است. سیستان در شمال سیستان و بلوچستان و در طول جغرافیایی ۶۱/۴۹۶۲ و عرض جغرافیایی ۳۱/۰۳۸۵ قرار گرفته است. برای جداسازی کنه‌ها به صورت زنده، از نزدیک ترین مکان ممکن به پوست و با زاویه ۴۵ درجه جداسازی صورت گرفت و کنه‌ها در لوله‌های درب بسته قرار داده شدند. سپس اطلاعات مربوط به نوع دام، سن دام، جنس دام، منطقه جمع‌آوری، صاحب دام و تاریخ جمع‌آوری در جداول از پیش تهیه شده ثبت می‌شد. کنه‌ها در فریزر ۲۰- نگهداری شده و پس از اتمام پروسه‌ی نمونه‌گیری، با حفظ زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه دانشکده بهداشت دانشگاه تهران منتقل شدند. تشخیص بر اساس کلیدهای تشخیصی مورفولوژیک و استریومیکروسکوپ در حد جنس و گونه صورت پذیرفت (۱۹).

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

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون مجذور کای استفاده شد. همچنین سطح اطمینان ۹۵ درصد برای شیوع آلودگی ویروسی با استفاده از توزیع دوجمله‌ای محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ استفاده شد. سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه از ۵۴ راس دام مورد مطالعه، ۲۵۰ عدد کنه سخت جدا سازی شد. تمام دام‌ها به کنه آلوده بودند و به طور متوسط میزان آلودگی به

کنـــه بـــه ازای هـــر راس دام ۴/۶ بـــود. کنـــه‌های جمع‌آوری شـده از لحـاظ تاکسـونومی شـامل ۲ جـنس و ۳ گونـه بودنـد کـه جنس‌هـا شـامل *ریپیسـفالوس* (۴۸ درصـد) و *هیالومـا* (۵۲ درصـد) و گونـه هـا شـامل *ریپیســـفالوس ســـانگوئینوس* (۴۷/۶ درصـــد)، *ریپیســفالوس (بووفیلــوس) آنولاتــوس* (۰/۴ درصـد) و *هیالومـا آنـاتولیکوم* (۵۲ درصـد) بـود. نسـبت کنـه‌های نـر بـه مـاده ۱۵۳:۹۷ تعیـین شـد. جـدول شـماره ۱ فراوانی گونه کنـه جمع‌آوری شـده بـر اسـاس میزبـان را نشان می‌دهد.

جدول ۱. فراوانی گونه کنه بر اساس میزبان

کنه	میزبان			جمع کل
	گاو	بز	گوسفند	
ریپیسفالوس سانگوئینوس	۲	۲	۱۱۵	۱۱۹
ریپیسفالوس آنولاتوس	-	۰	۱	۱
هیالوما آناتولیکوم	-	۳۶	۹۴	۱۳۰
جمع کل	۲	۳۸	۲۱۰	۲۵۰

فراوان‌تـرین گونـه در گـاو و گوسـفند *ریپیسـفالوس سـانگوئینوس* و در بـز *هیالومـا آنـاتولیکوم* بـود. تسـت‌های آمـاری نشـان دادنـد، شـیوع آلـودگی بـه کنه‌های مختلـف در میزبان‌هـای مختلـف از نظـر آمـاری معنی‌دار است ($p<0.001$).

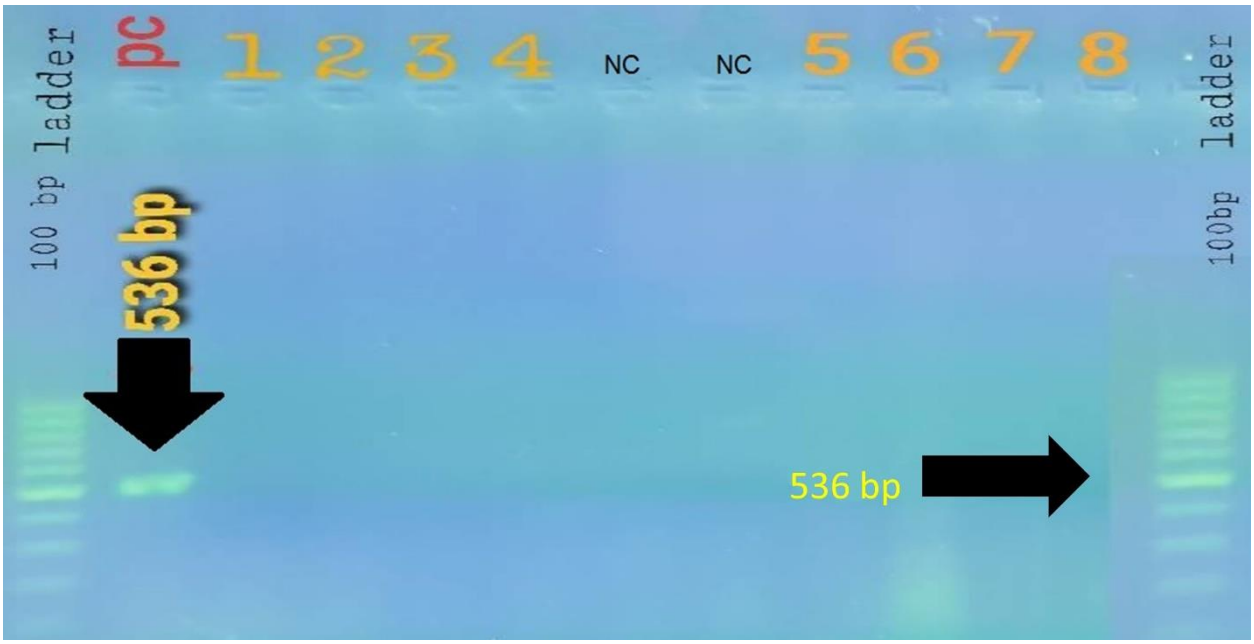
جدول ۲. فراوانی گونه کنه صید شده بر اساس جنسیت میزبان

گونه کنه	جنسیت میزبان		جمع کل
	نر	ماده	
ریپیسفالوس سانگوئینوس	۴۰	۷۹	۱۱۹
.ریپیسفالوس آنولاتوس	-	۱	۱
هیالوما آناتولیکوم	۲۹	۱۰۱	۱۳۰
جمع کل	۶۹	۱۸۱	۲۵۰

همـان‌طور کـه قـبلاً اشـاره گردیـد پـس از اسـتخراج RNA، مراحـل RT-PCR بـا اسـتفاده از کیـت یـک مرحلـه‌ای کیـاژن انجـام پـذیرفت. پـس از اتمـام فرآینـد RT-PCR، محصـولات آن بـر روی ژل الکتروفـورز شناسـایی گردیـد .در ایـن روش، یـک تـوالی ۵۳۶ جفـت بـازی از قطعـه S ویـروس CCHF توسـط دو پرایمـر جلـودار و عقـب‌دار اختصاصـی بـرای تکثیـر انتخـاب شـد. حضـور ویـروس در هـیچ نمونـه‌ای از ۵۰ نمونه‌ی تست شده به تأیید نرسید.

جدول ۳. گونه و منطقه کنه های تست شده توسط آزمایش زنجیره ای پلیمراز معکوس

مجموع	نتایج تست مولکولی		منطقه		
	مثبت	منفی			
۷	-	۷	*ریپیسفالوس سانگوئینوس*	گونه کنه	روستا ی چوتو
۱۳	-	۱۳	*هیالوما آناتولیکوم*		روستا ی نادر علم‌خان
۲۰	-	۲۰	مجموع		
۳۰	-	۳۰	*ریپیسفالوس سانگوئینوس*	گونه کنه	روستا ی میلک
۳۰	-	۳۰	مجموع		روستا ی سنجرانی



شکل ۱. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس، **pc** بیانگر کنترل مثبت و **NC** بیانگر کنترل منفی است

بحث و نتیجه‌گیری

تب خونریزی دهنده کریمه کنگو (CCHF) یک عفونت ویروسی مشترک بین انسان و دام است که بیشتر توسط کنه بین میزبانان مهره‌دار منتقل می‌شود. بیشتر کشورهای همسایه ایران از جمله پاکستان، افغانستان و ترکیه بومی این بیماری هستند و خطر شیوع ویروس، انتقال و تداوم ویروس را در ایران افزایش می‌دهند (۲، ۸). در مطالعه حاضر، نمونه‌های کنه سخت از ۴ منطقه مختلف جغرافیایی (منطقه سیستان، شمال استان سیستان و بلوچستان) از نظر عفونت *CCHFV* غربالگری شدند. ژنوم ویروسی در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد اگرچه سیستان یکی از کانون‌های اندمیک *CCHF*در ایران است و تمام مراحل طبق پروتکل‌های آزمایشگاه مرجع کشور انجام شده است با این حال نتایج حاضر حاکی از عدم حضور ژنوم ویروسی در ناقلین کنه‌ای جمع‌آوری شده بود. نتایج منفی ممکن است به دلایل زیر قابل توضیح باشد: ۱) مورد نیاز بودن حجم نمونه بزرگتر و واحدهای دامی بیشتر. ۲) مخازن اصلی این بیماری در منطقه سیستان دام‌هایی است که در نمونه‌گیری مورد غربالگری قرار نگرفته‌اند مانند شتر (سیستان و

بلوچستان بیشترین تعداد شتر در ایران را دارد.)، پرندگان و حیات وحش (خارپشت گوش دراز و خرگوش به تعداد زیاد در منطقه سیستان یافت می‌شود). ۳) سطح پایین آگاهی و دانش افراد در معرض خطر مانند کشاورزان و دامداران، که با وجود شیوع کم ویروس در کنه‌ها، شیوع بیماری را در انسان افزایش می‌دهد. ۴) پایین بودن میزان عفونت *CCHFV*در میان کنه‌ها در مناطق جنوبی در مقایسه با کنه‌های استان‌های شمالی ایران. ۵) کاهش میزان RNA در نتیجه اشکال در استفاده از زنجیره سرد در هنگام انتقال به آزمایشگاه.

خاکی فیروز و همکاران با بررسی کنه‌های سخت استان کرمان مشخص کردند، *Dermacentor* شایع‌ترین جنس و پس از آن *Hyalomma* ، *Haemaphysalis* و *Rhipicephalus* بودند. گرچه کرمان یک کانون بومی *CCHF* است، اما هیچ ژنوم *CCHFV*شناسایی نشده است که کاملاً مشابه مطالعه‌ی حاضر است (۴). مطالعات دیگر در مورد کنه‌های دام در کشورهای دیگر نیز شیوع کم یا عدم وجود ژنوم ویروس را نشان داده است. در تحقیقی که در سه منطقه سودان انجام شد، شعیب و همکاران گزارش کردند هیچ یک از کنه‌های غربال شده دارای RNA ویروسی نبودند در حالی که ۱۳/۷ درصد برای گونه *Rickettsia* مثبت بود (۹). تکین و همکاران همچنین میزان عفونت کم (۲درصد) ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو از کنه‌های جمع‌آوری شده از مناطق بسیار اندمیک ترکیه را گزارش کردند (۱۲). این یافته‌ها همراه با نتیجه مطالعه حاضر ممکن است حاکی از آن باشد که حتی در بعضی از مناطق بومی گزش کنه مهم‌ترین راه انتقال ویروس به انسان نباشد. با این حال باید خاطر نشان کرد مطالعات مختلف میزان شیوع متفاوتی از ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو را از کنه‌های جمع‌آوری شده نقاط مختلف ایران گزارش می‌کنند. به منظور تشخیص آلودگی کنه‌ها به ویروس تب کریمه کنگو در استان یزد، سلیم آبادی و همکاران اقدام به جمع‌آوری کنه‌ها از دام‌های اهلی نموده و پس از آزمایش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس، ژنوم ویروس در ۵/۷۱ درصد کنه‌ها یافت شد (۲۱). مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ با هدف تعیین فون انگلی منطقه و آلودگی کنه‌های منطقه به ویروس تب خون ریزی دهنده‌ی کریمه کنگو با روش RT-PCR در استان کردستان انجام پذیرفت مشخص کرد ۵/۶ درصد کنه‌ها به ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو آلوده هستند (۳). تلمادره‌ای و همکاران در سال ۲۰۰۷ طی مطالعه‌ی خود در استان همدان اعلام کردند ۱۶/۴ درصد کنه‌های بررسی شده به ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو آلوده هستند (۱۴). از میان ۳۲۸ کنه تست شده از بخش‌های مختلف استان همدان در سال ۲۰۰۷، با تکثیر قطعه اختصاصی S در تست RT-PCR مشخص شد ۱۹ درصد کنه‌ها آلوده به ویروس بودند (۱۶). در سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ نیز تحقیقات دیگری در استان اردبیل توسط تلمادره‌ای و همکاران انجام گرفت که درصد آلودگی نمونه‌ها ۲۸ درصد شرح داده شد. این ویروس در ۹ گونه از کنه‌های سخت و ۲ گونه از کنه‌های نرم جدا سازی شد (۱۵).

صالحی وزیری اذعان داشت که عفونت ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در ایران بیشتر به دلیل تماس مستقیم با خون یا بافت‌های دام آلوده رخ می‌دهد (۷). بعلاوه، گزش کنه در مقایسه با قرار گرفتن در معرض حیوان یا انسان آلوده در ایران در انتقال ویروس کمتر رایج است (۶). نتایج این مطالعات در کنار مطالعه حاضر ممکن است تقویت کننده این مهم باشد که در منطقه سیستان، گزش کنه نقش کمتری نسبت به ارتباط با فراورده‌های دامی و افراد مبتلا، در انتقال ویروس تب خونریزی

دهنده کریمه کنگو بازی می‌کند.

با توجه به اینکه کنه‌های سخت *ریپیسفالوس* و *هیالوما* فون غالب این منطقه هستند و این کنه‌ها از مهم‌ترین ناقلین تب خون ریزی دهنده کریمه کنگو، آناپلاسموز، تیلریوز و بابزیوز به شمار می‌روند، بهتر است اقدامات کنترلی و پیشگیرانه در منطقه سیستان و بلوچستان با جدیت بیشتری دنبال شود. تب خونریزی دهنده کریمه کنگو تهدیدی جدی برای سلامت عمومی انسان و حیوان است (۱۳). اگرچه از بین ۱۰۰ کنه آزمایش شده از ۵ منطقه مختلف منطقه سیستان هیچ ژنوم ویروسی یافت نشد، اما نباید فراموش کرد که استان سیستان و بلوچستان یکی از کانون‌های اندمیک تب کریمه کنگو محسوب می‌شود. در نتیجه، برای روشن شدن و تأیید نتیجه ما، لازم است تحقیقات بیشتری با اندازه نمونه‌های بزرگتر برای ناقلین کنه‌ای انجام شود. با توجه به این فرضیه که نقش تماس مستقیم با دام‌های آلوده در انتقال ویروس بیشتر از گزش کنه در منطقه سیستان است، باید غربالگری سرولوژیک و مولکولی بیشتری روی جمعیت‌های پرخطر مانند کارکنان کشتارگاه، دامداران و دامپزشکان انجام شود. علاوه بر آن نظارت سازمان‌های مرتبط بر کشتار استاندارد و بهداشتی و توزیع محصولات دامی بیشتر شود.

سپاسگزاری

بودجه این پروژه به طور مشترک توسط دانشگاه زابل [شماره گرنت: UOZ-GR-9718-46] و اعضای تیم تحقیقاتی تأمین شد. از مسئولین و کادر بخش آربوویروس‌ها و تب‌های خونریزی دهنده ویروسی انستیتوپاستور نیز برای کمک‌های بی دریغشان کمال تشکر خود را اعلام می‌نمائیم.

Reference

1- Albayrak, H., Ozan, E. and Kurt, M. 2010. Molecular Detection of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus (CCHFV) but not West Nile Virus (WNV) in Hard Ticks from Provinces in Northern Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8): 156–160.

2- Chinikar, S., Ghiasi, S.M., Hewson, R., Moradi, M. and Haeri, A. 2010. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran and neighboring countries. *Journal of Clinical Virology*, 47(2): 110–114.

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

4- Khakifirouz, S. *et al.* 2018. No Detection of Crimean Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) Virus in Ticks from Kerman Province of Iran. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 6(4): 108–111.

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

6- Mostafavi, E., Haghdoost, A., Khakifirouz, S. and Chinikar, S. 2013. Spatial analysis of Crimean Congo hemorrhagic fever in Iran. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(6): 1135–1141.

7- Salehi-Vaziri, M. *et al.* 2016. The first fatal case of Crimean-Congo hemorrhagic fever caused by the AP92-like strain of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 69(4): 344–346.

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

9- Shuaib, Y.A. *et al.* 2020. Ixodid tick species and two tick-borne pathogens in three areas in the Sudan. *Parasitology Research*, 119(2): 385–394.

10- Sofizadeh, A., Akbarzadeh, K., Telmadarraiy, Z. and Gorganli Davaji, A. 2019. Distribution and Biodiversity of Hard Ticks (Acarina: Ixodidae) in Golestan Province. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*, 16(4): 411–424.

11- Tahmasebi, F. *et al.* 2010. Molecular

epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome isolated from ticks of Hamadan province of Iran.

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

13- Telmadarraiy, Z. *et al.* 2007. Determination of rodent ectoparasite fauna in Sarpole-Zahab district, Kermanshah Province, Iran, 2004-2005. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, : 58–62.

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

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

16- Telmadarraiy, Z. *et al.* 2010–b. Hard ticks on domestic ruminants and their seasonal population dynamics in Yazd Province, Iran. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 4(1): 66.

17- Telmadarraiy, Z., Chinikar, S., Vatandoost, H., Faghihi, F. and Hosseini-Chegeni, A. 2015. Vectors of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 9(2): 137.

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

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

20- Yadav, P.D. *et al.* 2016. Nosocomial infection of CCHF among health care workers in Rajasthan, India. *BMC Infectious Diseases*, 16(1): 624.

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

Molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in tick species collected from livestock in the border line of Iran-Afghanistan

Sahar Asadolahizoj[1], Dariush Saadati[*2], Mehdi Rasekh[3], Faezeh Faghihi[4], Mehdi Fazlalipour[5], Sahar Khakifirouz[5], Tahmineh Jalali[5], Zahra Ahmadi[5]

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

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

Summary

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) is a viral, acute, febrile, and hemorrhagic disease that causes significant death in humans. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus has been isolated from different species of ticks, including 28 hard ticks and 2 soft ticks. The aim of this study was to determine the prevalence of CCHF virus in ticks isolated from domestic livestock in border villages of Sistan region in the north of Sistan and Baluchestan province. In this study, 54 livestock including 50 sheep, 3 goats and 1 cow in four villages (Choto, Nader Alamkhan, Millak and Sanjarani) from Sistan region were sampled. After identifying genus and species of ticks, the samples were examined for the presence of the virus genome by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR).Acording to taxonomic ranks 2 genera and 3 species were identified, which include *Rhipicephalus* Sanguineous, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* and *Hyalomma anatolicum*. The presence of the virus was not confirmed in any of the 50 tested samples. Our findings indicate that CCHFV may not circulating in the ticks of Sistan border villages. However, since Sistan and Baluchestan province is an endemic region for CCHF, more research is needed for a better understanding of CCHFV vectors in this region.

Key Words: *Crimean Congo hemorrhagic fever, hard ticks, Sistan, RT-PCR*

بررسی فعالیت ضد میکروبی عطرمایه‌ی زیره سبز، شوید، رازیانه، آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر روی *اشریشیاکلی* جدا شده از مدفوع طیور

بهمن فاضلی‌نسب*[۱]، پانته‌آ رمضان نژاد[۲]، یعثوب شیری[۱]

۱- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.

دریافت مقاله: ۲۷ اردیبهشت ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ خرداد ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۵ مهر ۱۳۹۹

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر عطرمایه‌های آویشن شیرازی، نعناع فلفلی، زیره سبز، شوید و رازیانه بر روی *اشریشیاکلی* جدا شده از مدفوع طیور است. عطرمایه‌ی گیاهان مورد استفاده با دستگاه کلونجر به دست آمد. جدایه‌های *اشریشیاکلی* از نمونه مدفوع طیور، جداسازی و در نهایت حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی با روش میکرودایلوشن تعیین گردید. تمامی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در غلظت، ۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توسط هر دو گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی مهار شده‌اند. کمترین غلظت کشندگی (۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی به ترتیب باعث مهار یک و دو جدایه شده است. تمامی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در غلظت، ۰/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توسط هر سه گیاه زیره سبز، شوید و رازیانه مهار شده‌اند. کمترین غلظت کشندگی (۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای گیاه زیره سبز باعث مهار دو جدایه شده است اما این غلظت برای شوید و رازیانه، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. نتایج نشان داد که به ترتیب عطرمایه‌های زیره سبز، آویشن شیرازی، نعناع فلفلی و سپس رازیانه و شوید با تأکید بر مؤثرتر بودن عطرمایه زیره سبز، می‌توانند به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضد میکروبی برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری *اشریشیاکلی* مفید باشند.

واژگان کلیدی: *آویشن شیرازی، نعناع فلفلی، اشریشیاکلی، زیره سبز، شوید، رازیانه*

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

مقدمه

تاریخچه مصرف گیاهان در امور پزشکی قدمت طولانی دارد (۱). گیاه‌درمانی به دلیل عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیشتر بیماران به این داروها در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است و بر خلاف داروهای سنتتیک که مواد خام آنها از مواد شیمیایی به دست می‌آید گیاهان دارویی به‌طور طبیعی استخراج شده و سبب طبیعی شدن عملکرد فیزیولوژیکی و اصلاح علت اختلال می‌شوند (۲). تخمین زده شده است که بیش از ۱۰ درصد از هزاران گونه گیاهی شناخته شده، کاربرد دارویی دارند. سازمان جهانی بهداشت برآورد کرده است که حدود ۸۰ درصد جمعیت جهان از گیاهان دارویی برای جنبه‌هایی از مراقبت‌های بهداشتی و درمانی استفاده می‌کنند (۳).

گیاهان دارویی به گروهی از گیاهان گفته می‌شود که برای مصارف پزشکی، درمانی و بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند. وجود موادی به نام ترکیبات یا متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از جنبه‌های مختلف سازگاری و بقای گیاهان در برابر شرایط نامناسب محیطی و زیستی، تولید داروهای گیاهی، سموم آفت‌کش و علف‌کش طبیعی، طعم‌دهنده، معطرکننده، نگهداری مواد غذایی و همچنین کمک در بهبود، درمان یا پیشگیری از بیماری‌ها، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (۴).

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 الگوبرداری شده است (۷-۵). تقاضای رو به رشد بازار امروز برای محصولات طبیعی قابل‌تجدید و با در نظر گرفتن گیاهان به‌عنوان کارخانه بالقوه تولیدکننده محصولات بیوشیمیایی، زمینه‌های تحقیقاتی جدیدی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ایجاد شده است (۵، ۸). از نیمه دوم قرن گذشته، تحقیقات وسیعی روی گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای جهان انجام‌گرفته 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 (۹، ۱۰).

تحقیقات نشان داده منبع دریافت فنل‌ها و فلاونوئیدها در نقاط مختلف جهان به نوع رژیم غذایی مردم منطقه وابسته است. برای مثال در کشورهایی همچون ژاپن و چین مصرف چای سبز تأمین‌کننده این ترکیبات مورد نیاز بدن هست در حالی‌که این مواد در کشورهای غربی با مصرف سیب و پیاز و در کشورهای شرقی با مصرف سبزی‌ها و مواد غذایی تخمیری تأمین می‌شوند (۱۱). در کشور ایران به‌طور جامع، نوع خاص استفاده از انواع مواد حاوی آنتی‌اکسیدان وجود ندارد اما با تبلیغات مختلف کارهایی از جمله مصرف سبزی‌ها به‌صورت خام و پخته، برگ گیاهان و درختان مختلف (به‌صورت دمنوش، عرقیات، اسانس(عطرمایه)، عصاره، مربا، شربت، ترشی، مواد شوینده (از جمله سدر) و حتی مصرف به‌صورت 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 (۱۲). با توجه به مواد آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی موجود در آویشن شیرازی و نعناع فلفلی که علاوه بر رویش در ایران، جهت درمان بیماری‌های مختلف نیز به‌طور سنتی از آنها استفاده شده است سعی شد در این تحقیق بر روی *اشریشیاکلی* جدا شده از مدفوع طیور مورد ارزیابی قرار گیرند.

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) از تیره نعناعیان است که در ایران می‌روید و دارای اثرات ضد درد، ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب و ضد انگل است. خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آویشن به دلیل حضور ترکیبات فنلی مخصوصاً تیمول و کارواکرول است (۱۳). تیمول ترکیبی فنلی و مهم‌ترین ماده مؤثره آویشن است که به خوبی در الکل و حلال‌های آلی حل گردیده و اثرات ضد عفونی‌کننده عصاره الکلی آن به اثبات رسیده است (Ebrahimi Nejad et al., 2008). نعناع فلفلی(*Mentha piperita* L) گیاهی است علفی، چند ساله، ریزوم دار، هیبرید (2n=48)، متعلق به راسته *Lamiales* از خانواده نعناعیان و از تلاقی بین گونه *M. Aquatic* و *M. spicata* به وجود آمده است. نعناع فلفلی و اجزای آن برای کاهش اشتها، درمان سرماخوردگی، سرفه، تب، تهوع، سردرد، درمان گرفتگی عضلات، نفخ و سوء هاضمه، دارای خواص ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد تومور و ضد حساسیت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶-۱۴).

زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)، گیاهی علفی یک‌ساله، از خانواده چتریان است که در مناطق مدیترانه‌ای، جنوب غرب و مرکز آسیا می‌روید و جزو گیاهان دارویی مهم و اقتصادی ایران است که در مناطق مختلفی از جمله تبریز، کرمان، یزد و برخی مناطق دیگر کشت می‌شود (۱۷، ۱۸) و جهت درمان بیماری‌های مختلف به‌عنوان ضد تشنج، ضد صرع، تقویت‌کننده معده، ادرارآور، ضد نفخ، ضد دیابت، رفع سوء هاضمه و محرک تعریق مفید است (۱۹). رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill)، گیاهی، علفی و معطر از تیره جعفری است و در طب سنتی از رازیانه به‌عنوان ضد نفخ، آنتی‌سپتیک، خلط‌آور و ضد اسپاسم استفاده می‌گردد (۲۰). شوید (*Anethum graveolens* L.)، گیاهی علفی و یک‌ساله است و به عنوان کاهنده چربی به‌خصوص تری‌گلیسرید خون، پیشگیری و درمان تصلّب شرایین و ناراحتی‌های صفراوی استفاده می‌شود (۲۱).

پرندگان می‌توانند عوامل بیماری‌زای انسانی را در خود جای دهند و در انتقال و گسترش عوامل عفونی مقاوم به دارو به انسان نقش داشته باشند. به‌طوری‌که گزارش شده است که پرندگان، *اشریشیاکلی‌های* مقاوم به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها را در خود جای داده و می‌توانند عامل مهمی در انتقال عفونت‌های مقاوم به دارو از پرندگان به انسان، به‌ویژه کودکان تلقی شوند و خطری بالقوه برای سلامت انسان ایجاد کنند (۲۲). جدایه‌های *اشریشیاکلی*، پاتوژن‌های فرصت‌طلب هستند که عامل برخی عفونت‌ها ازجمله عفونت ادراری، تنفسی، عفونت زخم و اسهال محسوب می‌شوند (۲۳). ضمناً بیماری‌هایی که به‌وسیله *اشریشیاکلی* ایجاد می‌شوند به‌عنوان خسارت مهمی برای انسان و حیوانات مطرح هستند (۲۴). جایگاه اصلی این باکتری، کلون انسان و حیوانات خون گرم است و درصورتی‌که از طریق مدفوعی دهانی منتقل شود، اسهال ایجاد می‌کند (۲۵). با مقاومت دارویی، گسترش وسیعی در بیمارستان‌ها و اجتماع دارند (۲۶) و بر اساس اینکه عوامل ضد میکروبی عمر کوتاهی دارند (۲۷). در نتیجه نیاز به یافتن عوامل ضد میکروبی جدید در برابر جدایه‌های مقاوم افزایش یافته است (۲۸).

مواد و روش‌ها

تهیه عطرمایه: استخراج عطرمایه‌های گیاهی با استفاده از روش تقطیر با بخار و دستگاه کلونجر انجام شد. ۵۰ گرم از پودر خشک گیاه در یک بالن دو لیتری ریخته و حدود دو سوم بالن آب اضافه گردید و بالن‌ها به دستگاه کلونجر متصل شد تا عمل تقطیر به مدت ۴ ساعت انجام شود. پس از

استخراج عطرمایه‌ها، عمل آب‌گیری توسط سولفات سدیم بدون آب انجام شد. عطرمایه‌ها با رقت ۲۰ میلی‌گرم در میکرولیتر در یک سی‌سی DMSO حل شدند. جهت جلوگیری از تجزیه عطرمایه‌ها به‌وسیله‌ی نور و حرارت، از ظرف شیشه‌ای و تیره رنگ به‌منظور نگهداری عطرمایه‌ها استفاده شد. عطرمایه‌های حاصله پس از جمع‌آوری در ظرف یاد شده در یخچال نگهداری شدند (۲۹).

جدایه‌های باکتری: جدایه‌های مختلف *اشریشیاکلی* مورد استفاده در این تحقیق از نمونه‌های مدفوع طیور در شهرستان زابل جداسازی و بر روی محیط‌های کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. جدایه‌های باکتریایی جداشده به‌وسیله تنوعی از واکنش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد (اکسیداز، کاتالاز، حرکت باکتری، آزمون‌های قندی از قبیل: تخمیر لاکتوز، سوکروز، گلوکز) و همچنین آزمون‌های استاندارد از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسید فاست، مورفولوژی و رنگ کلنی قابل شناسایی هستند (۳۰) که در تحقیق حاضر بعد از مشاهده رشد کلونی، از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده کوکسی‌ها و دیپلوکوکسی‌های گرم منفی و همچنین آزمون اکسیداز جهت شناسایی استفاده شد. در مرحله بعد، با استفاده از آزمودن‌های بیوشیمیایی، کشت بر روی مکانکی آگار و انکوباسیون در حرارت‌های ۳۷ درجه و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، آزمودن سیترات، آزمودن حرکت و کشت بر روی محیط OF (تخمیر و اکسیداسیون) حاوی قند گلوکز، تشخیص قطعی باکتری‌ها صورت گرفت.

فعالیت آنتی‌بیوتیکی: ۱۰ جدایه خالص از گونه اشریشیاکلی با روش کربی- بائر (۳۱) تعیین آنتی‌بیوگرام شده و حساسیت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین حساسیت جدایه‌ها با روش آگار دیسک دیفیوژن استاندارد (Kirby-Bauer) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند جنتامایسین(GM)(µg ۱۰)، آزیترومایسین(AZM)(µg ۱۵)، آموکسی‌سیلین کلاوید اسید (AMC)(µg ۳۰)، آمیکاسین(Ak)(µg ۳۰) و سفتازیدیم (CAZ)(µg ۳۰) (پادتن طب- ایران) انجام گرفت (۳۱). بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری گردید و نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به‌عنوان حساس، حد واسط و مقاوم ثبت شد و نتایج آن با جدول استاندارد NCCLS مقایسه گردید (۳۲، ۳۳).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه گیاهان مورد استفاده بر اشریشیاکلی: برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC=Minimum inhibitory Concentration) عطرمایه گیاهان مورد استفاده به روش چشمی، ابتدا میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth)(ساخت شرکت Merk-آلمان) به هر چاهک پلیت میکروتیتر اضافه شد (۳۴، ۳۵) سپس در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۲۰mg/ml عطرمایه اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد به همین ترتیب ساخت رقت‌های دو برابری در سایر چاهک‌ها ادامه یافت. لازم به ذکر است در این حالت، چاهک اول حاوی ۲۰ میلی‌گرم در میکرولیتر عطرمایه بوده و بدین ترتیب در چاهک‌های بعدی این مقدار به نصف چاهک قبلی تقلیل پیدا کرد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی ($cfu=1/5*10^8$ در هر میلی‌لیتر، نیم مک فارلند) به چاهک‌ها اضافه شد. به چاهک شاهد منفی DMSO اضافه شد (بدون عطرمایه) سپس پلیت میکرو تیتر برای ۲۴ ساعت

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. حداقل غلظت مهاری، به‌عنوان پایین‌ترین غلظتی که برای توقف رشد باکتری‌ها در انتهای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری نیاز است، تعریف شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC=Minimum Bactericidal Concentration) ۱۰ میکرولیتر از محتوای چاهک‌ها در انتهای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، روی محیط نوترینت آگار (ساخت شرکتMerk- آلمان) کشت ثانویه داده شد و پلیت‌ها به‌منظور بررسی رشد باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند، پایین‌ترین غلظت عطرمایه که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد ۳۴، ۳۵). تمام آزمایش‌های ضد میکروبی ۳ مرتبه تکرار شدند.

نتایج

نتایج نشان داد که دو جدایه *اشریشیاکلی*، در تمام غلظت‌های عطرمایه آویشن شیرازی مهار شده است. کمترین غلظت مهارکنندگی ۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که یک جدایه در این غلظت مهار شده است و بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که یک جدایه در این غلظت مهار شده است. کمترین غلظت کشندگی برابر با ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که یک جدایه در این غلظت کشته شده است و بیشترین غلظت کشندگی برابر با ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (جدول ۱).

سه جدایه *اشریشیاکلی* در تمام غلظت‌های عطرمایه نعناع فلفلی مهار شده است. کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی برابر با ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که دو جدایه در این غلظت مهار شده است در حالی‌که بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که یک جدایه در این غلظت مهار شده است. کمترین غلظت کشندگی برابر با ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که دو جدایه در این غلظت کشته شده است و بیشترین غلظت کشندگی برابر با ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (جدول ۲).

جدول۱- بررسی فعالیت ضد میکروبی عطرمایه آویشن شیرازی بر روی *اشریشیاکلی* جداشده از طیور(میلی‌گرم/میلی‌لیتر)

جدایه باکتری	شاهد منفی (محیط کشت و عصاره)	شاهد مثبت (محیط کشت و باکتری)	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶
۱	عدم رشد	رشد			عدم رشد		
۲	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۳	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۴	عدم رشد	رشد			عدم رشد		
۵	عدم رشد	رشد	-	-	-	-	+
۶	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++
۷	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++
۸	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۹	عدم رشد	رشد	-	+	++	++	++
۱۰	عدم رشد	رشد	+	++	++	++	++

++ کاملا رشد کرده؛ + حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC)؛ - حداقل غلظت کشندگی(MBC)

جدول۲- بررسی فعالیت ضد میکروبی عطرمایه نعناع فلفلی بر روی *اشریشیاکلی* جداشده از طیور(میلی‌گرم/میلی‌لیتر)

جدایه باکتری	شاهد منفی (محیط کشت و عصاره)	شاهد مثبت (محیط کشت و باکتری)	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶
۱	عدم رشد	رشد			عدم رشد		
۲	عدم رشد	رشد	-	-	-	-	+
۳	عدم رشد	رشد			عدم رشد		
۴	عدم رشد	رشد			عدم رشد		
۵	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۶	عدم رشد	رشد	-	+	++	++	++
۷	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++
۸	عدم رشد	رشد	-	-	-	-	+
۹	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++
۱۰	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++

++ کاملا رشد کرده؛ + حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC)؛ - حداقل غلظت کشندگی(MBC)

کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه زیره سبز برابر با ۰/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که دو جدایه در این غلظت مهار شده است. بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است و یک جدایه در تمام غلظت‌ها رشد کرده است. کمترین غلظت کشندگی برابر با ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (جدول ۳). کمترین غلظت مهارکنندگی شوید برابر با ۰/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که یک جدایه در این غلظت مهار شده است در حالی‌که بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. بیشترین و کمترین غلظت کشندگی برابر با ۱۰ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (جدول ۴). کمترین غلظت مهارکنندگی رازیانه برابر با ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که ۴ جدایه در این غلظت مهار شده است بیشترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که ۴ جدایه در این غلظت مهار شده است. کمترین و بیشترین غلظت کشندگی به ترتیب برابر با ۱/۲۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (جدول ۵).

جدول ۳- حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) عطرمایه زیره سبز بر روی باکتری *اشریشیاکلی*

جدایه باکتری	شاهد منفی (محیط کشت و عصاره)	شاهد مثبت (محیط کشت و باکتری)	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۳
۱	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۲	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۳	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۴	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۵	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++
۶	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++
۷	عدم رشد	رشد	-	-	-	+	++
۸	عدم رشد	رشد	رشد				
۹	عدم رشد	رشد	-	-	-	-	+
۱۰	عدم رشد	رشد	-	-	-	-	+

++ کاملا رشد کرده؛ + حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC)؛ - حداقل غلظت کشندگی(MBC)

جدول ۴- حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) عطرمایه شوید بر روی *اشریشیاکلی*

جدایه باکتری	شاهد منفی (محیط کشت و عصاره)	شاهد مثبت (محیط کشت و باکتری)	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۳
۱	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۲	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۳	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۴	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۵	عدم رشد	رشد	-	+	++	++	++
۶	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۷	عدم رشد	رشد	-	+	++	++	++
۸	عدم رشد	رشد	+	++	++	++	++
۹	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۱۰	عدم رشد	رشد	-	-	-	-	+

++ کاملا رشد کرده؛ + حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC)؛ - حداقل غلظت کشندگی(MBC)

جدول ۵- حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) عطرمایه رازیانه بر روی *اشریشیاکلی*

جدایه باکتری	شاهد منفی (محیط کشت و عصاره)	شاهد مثبت (محیط کشت و باکتری)	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۳
۱	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۲	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۳	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++
۴	عدم رشد	رشد	+	++	++	++	++
۵	عدم رشد	رشد	+	++	++	++	++
۶	عدم رشد	رشد	+	++	++	++	++
۷	عدم رشد	رشد	-	+	++	++	++
۸	عدم رشد	رشد	-	+	++	++	++
۹	عدم رشد	رشد	+	++	++	++	++
۱۰	عدم رشد	رشد	-	-	+	++	++

++ کاملا رشد کرده؛ + حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC)؛ - حداقل غلظت کشندگی(MBC)

جدایه‌های اشریشیاکلی به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم (۸۰ درصد)، جنتامایسین(۲۰ درصد)، آزیترومایسین(۲۰ درصد) و آموکسی کلاو (۱۰ درصد) مقاوم و به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۷۰ درصد)، آموکسی کلاو (۶۰ درصد)، ازیترومایسین(۶۰ درصد) و آمیکاسین (۳۰ درصد) حساس بوده‌اند (جدول۶).

جدول ۶- الگوی مقاومت جدایه‌های *اشریشیاکلی* (درصد) به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

شاخص عمل	ازیترومایسین	جنتامایسین	آمیکاسین	آموکسی کلاو	سفتازیدیم
S	۶۰	۷۰	۳۰	۶۰	۰
I	۲۰	۱۰	۷۰	۳۰	۲۰
R	۲۰	۲۰	۰	۱۰	۸۰

S؛ حساسیت، I؛ میانه، R؛ مقاومت

بحث و نتیجه‌گیری

تمامی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در کمترین غلظت مهار کنندگی (۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای عطرمایه هر دو گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی مهار شده‌اند اما کمترین غلظت کشندگی (۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای عطرمایه گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی به ترتیب باعث مهار

یک و دو جدایه شده است. ضمناً عطرمایه آویشن شیرازی در تمام غلظت‌ها باعث مهار دو جدایه ولی عطرمایه نعناع فلفلی در تمام غلظت‌ها باعث مهار سه جدایه *اشریشیاکلی* شده ست. تمامی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در کمترین غلظت مهارکنندگی (۰/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای هر سه گیاه زیره سبز، شوید و رازیانه مهار شده‌اند. کمترین غلظت کشندگی (۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای گیاه زیره سبز باعث مهار دو جدایه شده است. کمترین غلظت کشندگی با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عطرمایه گیاهان شوید و رازیانه به ترتیب باعث کشته شدن چهار و هفت جدایه *اشریشیاکلی* شده است.

با توجه به سطح مقاومت جدایه‌های اشریشیاکلی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در تحقیق حاضر مانند مقاومت به سفتازیدیم(µg ۳۰)(۸۰ درصد)، حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر آمیکاسین(µg ۳۰)(۳۰درصد)، آموکسی‌سیلین کلاوید اسید(µg ۳۰)، (۶۰ درصد)، ازیترومایسین(µg ۱۵)(۶۰ درصد) و از طرفی کمترین سطح مهارکنندگی گیاهان دارویی مورد استفاده در تحقیق حاضر بر *اشریشیاکلی مانند* آویشن شیرازی و نعناع فلفلی (۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و زیره سبز، شوید و رازیانه (۰/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و همچنین کمترین غلظت کشندگی (۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای گیاه زیره سبز، نشان دهنده توانایی گیاهان دارویی شوید، رازیانه، آویشن شیرازی، نعناع فلفلی و مخصوصاً زیره سبز در درمان عفونت‌های حاصل از *اشریشیاکلی* است.

در مطالعه‌ای اثر عطرمایه آویشن شیرازی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و۰/۰۳ درصد) بر روی رشد باکتری *E.coli* O157:H7 در گوشت چرخ‌کرده، بررسی و به این نتیجه رسیده‌اند که در غلظت ۰/۰۳ درصد اثر ضد باکتریایی قوی به‌دست آمده است. ضمناً ضریب همبستگی غلظت عطرمایه آویشن شیرازی با لگاریتم تعداد باکتری مورد مطالعه، نشان داده شده است که با افزایش غلظت عطرمایه، میزان رشد باکتری در طی دوره نگهداری کاهش یافته است (۳۶). میزان MIC و MBC عطرمایه آویشن شیرازی برای باکتری *اشریشیاکلی* به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۰۶ درصد به دست آمده است (۳۷). در تحقیق حاضر نیز با افزایش غلظت عطرمایه آویشن خاصیت ضد باکتریایی آن بیشتر شده است. ضمناً حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی علیه *اشریشیاکلی برابر با* ۲۵۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر گزارش گردیده است (۳۸). در تحقیق حاضر نیز حداقل غلظت کشندگی عطرمایه آویشن شیرازی علیه یک جدایه *اشریشیاکلی برابر با* ۳۱۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر به دست آمد.

عصاره آبی و الکلی گیاه آویشن شیرازی بر روی جدایه‌های بالینی و استاندارد اشریشیاکلی انتروهموراژیک بررسی و مشخص شده است که عصاره الکلی در غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای اثر مهاری و اثر کشندگی بوده است اما عصاره آبی در هیچ‌کدام از غلظت‌های مورد استفاده بر روی جدایه‌های استاندارد و بالینی مؤثر نبوده است (۳۹). این نتایج متفاوت از نتایج تحقیق حاضر است که از عطرمایه که نوعی عصاره آبی می‌باشد استفاده شده است و باعث مهار و کشندگی باکتری‌ها هم شده گردیده است. هر چند در تحقیقات دیگر با آنکه عصاره آبی کم‌خاصیت‌ترین نوع حلال در استخراج مواد مؤثره بوده است (۴۰) اما مؤثر بوده است به‌طوری که، کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره آبی برابر با ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است که باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسنتری* مهار کرده است (۴۱) و کمترین غلظت مهارکنندگی عطرمایه نعناع فلفلی در برابر

اسینتو باکتر بومانی و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است(۴۲).

نعناع فلفلی فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های شیگلا دیسنتری، کلبسیلا پنومونیه نداشته است (۴۳) اما در برابر سالمونلا تیفی‌موریوم بررسی و مشخص شده است که کمترین غلظت مهارکنندگی برابر با ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که یک جدایه در این غلظت مهار شده است و بیشترین و کمترین غلظت کشندگی به ترتیب برابر با ۴۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۴۴). درصورتی‌که در تحقیق حاضر کمترین غلظت مهار و کشندگی نعناع فلفلی بر اشریشیاکلی به ترتیب ۱/۵۶ و ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.

با بررسی اثرات ضد میکروبی عطرمایه گیاهان نعناع فلفلی، پونه کوهی و زیره سیاه بر روی باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی مشخص شده است که عطرمایه استخراج شده از گیاه نعناع فلفلی بیشترین اثر ضد میکروبی را روی اشریشیاکلی و کمترین را روی *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است (۳۷). همچنین ارزیابی خواص ضد میکروبی عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی، بابونه، بنه، بومادران، زیره سیاه، انشک، آوندول، آویشن وحشی، پونه کوهی، مورد، الوک، رزماری، کلپوره همدانی، زعفران، زوفا، کاکوتی، افسنطین و شاه‌تره بر *اشریشیاکلی* بررسی و مشخص شده است که مؤثرترین عصاره هیدرو الکلی بر قطر هاله عدم رشد *اشریشیاکلی* گیاهان آویشن شیرازی، مورد و رزماری بوده‌اند اما ضعیف‌ترین گیاهان، آوندول، شاه‌تره، زوفا، افسنطین، آویشن کوهی و پونه کوهی بوده‌اند (۱۳) و در بین گیاهان آویشن شیرازی، مورد و رزماری مشخص شده است که عصاره رزماری با میانگین ۱/۶۶ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره مورد با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم اثرترین عصاره بر باکتری *اشریشیاکلی* بوده‌اند (۴۵). در تحقیق حاضر زیره سبز نسبت به شوید، رازیانه، آویشن شیرازی و نعناع فلفلی مؤثرترین بر *اشریشیاکلی* بوده است و بر اساس نتایج ارائه شده تحقیقات قبلی پیشنهاد می‌گردد که مقایسه‌ای نیز بین زیره سبز و رزماری صورت گیرد تا مؤثرترین عصاره بر *اشریشیاکلی* مشخص گردد.

عصاره متانولی زیره سبز باکتری‌های *باسیلوس سابتی لیس*، *اشریشیاکلی* و *پروتئوس* (۴۶) و عطرمایه زیره سبز باکتری *زانتوموناس* را مهار کرده است (۴۷). ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاهان زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، زیره سیاه (*Bunium persicum*) و بخش‌های هوایی آرتمیزیا ترکومانیکا (*Artemisia turcomanica*)، آرتمیزیا خراسانیکا (*Artemisia khorassanica*)، آرتمیزیا سینی فرمیس (*Artemisia ciniformis*) و آرتمیزیا کپه داغنسیس (*Artemisia kopetdaghensis*) علیه باکتری *اشریشیاکلی*(ATCC۲۵۹۲۲) بررسی و مشخص شده است که زیره سبز مؤثرترین حداقل غلظت مهاری داشته است (۴۸). در تحقیق حاضر نیز عطرمایه زیره سبز مؤثرترین عامل بر مهار رشد و عدم فعالیت *اشریشیاکلی* بوده است.

گزارش شده است که عطرمایه رازیانه نسبت به عصاره متانولی و اتانولی، فعالیت ضد میکروبی بیشتری داشته است (۴۹). اثر مهاری عصاره آبی شاخ و برگ گیاه رازیانه بر سه میکروارگانیسم استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلاتیفی بررسی و مشخص شده است بیشترین اثر بر روی استافیلوکوکوس طلایی بوده است (۵۰). در مطالعه دیگری که بر روی عصاره دانه گیاه رازیانه بر روی ۱۵ میکروارگانیسم از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلاتیفی انجام شده بود هیچ‌گونه اثر

مهارکننده رشدی مشاهده نشده است (۵۱). همچنین در بررسی اثر عصاره اتانولی آویشن، جعفری، رازیانه، گشنیز و پونه به روش انتشار و دیسک کاغذی، بر مهار رشد کلبسیلا، اشریشیاکلی و سالمونلا، بیشترین اثر مهار رشد بر روی استافیلوکوکوس توسط عصاره آویشن و کمترین اثر مهاری رشد هم مربوط به عصاره رازیانه بر روی استافیلوکوکوس بود (۵۲). در تحقیق حاضر نیز عطرمایه شاخ و برگ رازیانه و شوید اثر کشندگی کمتری بر باکتری *اشریشیاکلی* نسبت به آویشن شیرازی، نعناع فلفلی و زیره سبز داشته‌اند.

بی‌شک مراجعه و استفاده از گیاهان دارویی کهن‌ترین رهیافت بشر برای درمان بیماری‌ها بوده است و در کشاکش توسعه تمامی تمدن‌های بشری، همواره ارتباطی نزدیک و شانه به شانه‌ای میان آدمی و گیاه وجود داشته است. با توجه به ثابت شدن اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی مختلف در تحقیقات متعدد، مقاومت دارویی ایجاد شده توسط پاتوژن‌ها و عوارض جانبی داروهای ضد میکروبی شیمیایی، رویکرد تحقیقات علمی، به منابع طبیعی در چند دهه اخیر بسیار زیاد شده است (۵۳) از طرفی نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که به ترتیب عطرمایه‌های زیره سبز، آویشن شیرازی، نعناع فلفلی و سپس رازیانه و شوید با تأکید بر مؤثرتر بودن عطرمایه زیره سبز، می‌توانند به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضد میکروبی برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری *اشریشیاکلی* مفید باشند. با این‌حال آزمایش در سیستم زنده برای ارزیابی سمیت احتمالی عطرمایه‌ها مخصوصاً عطرمایه زیره سبز، بررسی (*in vivo*) خواص و اثر آنها و به دست آوردن غلظت‌های مناسب این عطرمایه‌ها برای استفاده در بدن موجود زنده لازم است.

References

1- **Vermani K, Garg S.** Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. J Ethnopharmacol 2002;80(1):49-66. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00009-0

2- Rezaei-Nasab M, Komeili G, Fazeli-Nasab B. Gastroprotective effects of aqueous and hydroalcholic extract of *Scrophularia striata* on ethanol-induced gastric ulcers in rats. Der Pharmacia Lettre 2017;9(5):84-93.

3- Keshavarz R, Majid Mahdiyeh M, Abnosi MH, Amirjani MR. Effect of hydrogen peroxide on induction of secondary metabolites in Periwinkle (*Catharanthus roseus* L) callus. Cell & Tissue Journal 2016;6(3):389-396.

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

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

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

7- 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

8- 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.

9- 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.

10- 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].

11- 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

12- 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.

13- 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.

14- Yeşil M, Öztürk I, Duymuş ZY, Özcan MM. Evaluating The Effect of Some Medicinal Plants (*Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*) on Whitening of the Permanent Teeth. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology 2020;8(1):1-6. https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i1.1-6.2508

15- Sharma M, Sharma M, Salgotra R, et al. Development of an effective protocol for in vitro multiplication of peppermint (*Mentha piperita*). Indian Journal of Agricultural Sciences 2019;89(11):223-226.

16- Yaghini H, Sabzalian MR, Rahimmalek M, et al. Seed set in inter specific crosses of male sterile *Mentha spicata* with *Mentha longifolia*. Euphytica 2020;216(3):1-14. https://doi.org/10.1007/s10681-020-2578-z

17- Roomiani L, Rokni N. Study of inhibition effect of *Cuminum cyminum* essential oil and Nisin on the growth of *Streptococcus iniae* in fillets of Rainbow trout using Hurdle Technology. Journal of Food Science & Technology (2008-8787) 2015;12(48):37-46.

18- Janipour l, Fahmideh l, Fazeli-Nasab B. Genetic evaluation of different population of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) using DNA molecular markers. Journal of Cellular and Molecular Researches 2018;31(1):16-32.

19- Moubarz G, Embaby MA, Doleib NM, Taha MM. Effect of dietary antioxidant supplementation (*Cuminum cyminum*) on bacterial susceptibility of diabetes-induced rats. Central-European journal of immunology 2016;41(2):132-137. PMCID: PMC4967646; PMID: 27536197, https://doi.org/10.5114/ceji.2016.60985

20- Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH. *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. Biomed Res Int 2014;2014(https://doi.org/10.1155/2014/842674

21- Bussmann RW, Batsatsashvili K, Kikvidze Z, et al. Anethum graveolens L. Apiaceae: Ethnobotany of the Mountain Regions of Far Eastern Europe. Ethnobotany of Mountain Regions. Springer, Cham, 2019.

22- Tahmasby H, Barati s, Momtaz H, et al. An Investigation of beta-lactam antibiotics resistance in *Escherichia coli* isolates and molecular detection of *Escherichia coli* O157:H7 in cage birds from Shahrekord, Iran. Biological Journal of Microorganism 2014;3(9):35-44.

23- Ibrahim A-S, Youssef N. Prevalence of CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* isolated from Aleppo University Hospitals, Aleppo, Syria. Archives of Clinical Infectious Diseases 2015;10(2):e22540. https://10.5812/archcid.22540

24- Hosseini A, Salari S, Rashki A, Jahantigh M. Presence of Two Genes Involved in Serum Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Healthy Ostriches in Comparison With Infected Poultry by Colibacillosis. Journal of Veterinary Research 2019;74(1):143-152. https://doi.org/10.22059/jvr.2017.234300.2635

25- Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, et al. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC infectious diseases 2007;7(1):92. https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-92

26- Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. Annals of clinical microbiology and antimicrobials 2007;6(1):4. https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-4

27- Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. Nature reviews Drug discovery 2002;1(11):895-910. https://doi.org/10.1038/nrd940

28- Vahedi A, Baghani A, Baseri Z, Pourmand MR. Frequency and antibiotic resistance patterns of isolated bacteria from positive blood culture of hospitalized patients. Tehran University Medical Journal 2018;75(12):902-912.

29- Ferhat MA, Meklati BY, Smadja J, Chemat F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. Journal of Chromatography A 2006;1112(1-2):121-126. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.030

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

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

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

33- Kiehlbauch JA, Hannett GE, Salfinger M, et al. Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories. Journal of clinical microbiology 2000;38(9):3341-3348.

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

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

36- Noori N, Rokni N, Basti A, A, et al. The antimicrobial effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil against E. coli O157: H7 in minced beef meat during refrigerated storage. Food Hygiene 2011;1(1):1-8.

37- Ataie Kachouei M. Study the antimicrobial effects of the essential oils of Origanum vulgare, Mentha piperita and Carum carvi on the bacteria isolates from food stuffs. Journal of Food Microbiology 2016;3(1):1-10.

38- Masoomi V, Tajik H, Moradi M, et al. Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* boiss. essential oil nanoemulsion against *Escherichia coli* O157: H7. The Journal of Urmia University of Medical Sciences 2016;27(7):608-617.

39- Goudarzi M, Satari M, Najar PS, et al. Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts of Thyme on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. YAFTEH 2006;8(3(29)):63-69.

40- 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)

41- saeidi s, fazeli nasab b. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of various extracts of the Rhazya stricta , Capparis spinosa , cretica Cressa. New Findings in Veterinary Microbiology 2019;2(1):57-66.

42- 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):42-52.

43- Erfandoust Z, Najafi F, Tavakkoli Z, Rashidbaghan A. Comparison of antibacterial properties of *Mentha longifolia* L. hudson var. chlorodictya rech. f. cultivated in Sabzevar and Gorgan. Research in Pharmaceutical Sciences 2012;7(5):S787.

44- Heydari F, Saeedi S, Hassanshahian M. Antibacterial activity of *Mentha longifolia* against *Salmonella typhimurium*. Advanced herbal medicine 2015;1(3):42-47.

45- 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.

46- Soniya M, Kuberan T, Anitha S, Sankareswari P. In vitro antibacterial activity of plant extracts against Gram positive and Gram negative pathogenic bacteria. International Journal of Microbiology and Immunology Research 2013;2(1):1-5.

47- Miri N, Rezaeian-Doloei R, Sadrabadi Haghigh R. The effect of *Cuminum cyminum*, acidity, temperature and inoculums' level on the growth of *Xanthomonas campestris*. Agroecology Journal 2015;11(3):68-57. https://doi.org/10.22034/aej.2015.520861

48- Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M, Zarei Eskikand N. Antibacterial activity of essential oils from *Artemisia* and *Cumin* plants against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences 2011;15(1):6-14.

49- Gulfraz M, Mehmood S, Minhas N, et al. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. African journal of biotechnology 2008;7(24):4364-4368.

50- Arora DS, Kaur GJ. Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. J Nat Med 2007;61(3):313-317. https://doi.org/10.1007/s11418-007-0137-8

51- Sağdıç O, Özcan M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. Food control 2003;14(3):141-143. https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00057-9

52- Mazaher Ghorbani M, Ahmady-Asbchin S. Evaluation of Antibacterial Properties of *Coriander*, *Oregano*, *Fennel*, *Thyme* and *parsley* extracts, on Pathogenic Bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591) , *Escherichia coli* (ATCC 23591) , Klebsiella (ATCC 10031) and *Salmonella Typhimurium*. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2018;25(4):591-598.

53- Saeedi M, Ebrahimzadeh MA, Morteza-Semnani K, et al. Evaluation of antibacterial effect of ethanolic extract of *Foeniculum vulgare* Mill. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2010;20(77):88-91.

Evaluation of antimicrobial activity of *Zataria multiflora* Bioss, *Mentha piperita* L, *Cuminum cyminum* L., *Foeniculum vulgare* Mill and *Anethum graveolens* L. essential oil on *Escherichia coli* isolated from poultry feces

Bahman Fazeli-Nasab[1*]. Pantea Ramazannezhad[2]. Yasoub Shiri[1]

1- Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Receive: May 16, 2020; Revise: June 14, 2020; Accept: October 16, 2020

Summary

The aim of this study was to investigate the effect of thyme, peppermint, cumin, dill, and fennel essential oils on *Escherichia coli* isolated from poultry feces. The essential oil of the plants used was obtained with a Clevenger Apparatus. *Escherichia coli* strains were isolated from poultry feces, and finally the minimum inhibitory concentration and the minimum lethal concentration were determined by fine-grained method. All strains of *Escherichia coli* at concentrations of 1.56 mg/ml were inhibited by both thyme and peppermint. The MBC (3.12 mg / ml) for *Zataria multiflora* and peppermint has inhibited one- and two-way, respectively. All *Escherichia coli* strains at concentrations of 0.63 mg/ml were inhibited by all three cumin, dill, and fennel plants. The MBC (1.25 mg / ml) for cumin has led to double-sided control, but the concentration for dill and fennel was 5 mg/ml. The results showed that cumin, thyme, peppermint and then fennel and dill essential oils, respectively, with emphasis on the effectiveness of cumin essential oil, can be useful alone or in combination with other antimicrobial agents to treat infections caused by *Escherichia coli* bacterium.

Key words: *Thyme, Peppermint, Escherichia coli, cumin, dill, fennel*

مروری سیستماتیک بر پراکنش ویروس اشمالنبرگ در ایران و کشورهای همسایه

سحر اسدالهی زوج[۱]، امیرسجاد جعفری[۱]، امیرمسعود جعفری نوزاد[۲]، مهدی راسخ[۳]، علی سارانی[۳]، حسن بخشی[۴*]

۱- فارغ التحصیل دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشجوی دکتری عمومی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۴- فارغ التحصیل دکتری تخصصی زیست فناوری پزشکی، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ آبان ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۲ آذر ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۳۰ آذر ۱۳۹۹

چکیده

ویروس اشمالنبرگ (SBV) یک ویروس RNA دار تک رشته‌ای نوظهور است که در خانواده پریبونیاویریده و جنس اورتوبونیاویروس طبقه‌بندی می‌شود. SBV یک آربوویروس (ویروس منتقله توسط بندپایان) است که پس از آلوده کردن نشخوارکنندگان آبستن باعث به دنیا آمدن نتاج دارای نواقص مادرزادی مانند اسکولیوزیز، هیدروسفالی، آرتروگریپوز، هیپوپلازی مخچه و بزرگ شدن تیموس می‌شوند. هدف از این مطالعه، مروری سیستماتیک بر مطالعات انجام‌شده در ایران و کشورهای همسایه شامل افغانستان، پاکستان، ترکمنستان، جمهوری آذربایجان، ارمنستان، ترکیه، عراق، روسیه، قزاقستان، امارات، بحرین، عربستان، عمان و قطر می‌باشد. در مطالعه حاضر، ۹ پایگاه داده انگلیسی و فارسی شامل مگیران، ایرانداک، سیویلیکا، مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی، Web of Science، Scopus، Science Direct، Google Scholar و PubMed بررسی شدند. از میان ۵۵ مطالعه‌ی یافت شده، ۱۲ مطالعه معیارهای تعریف شده در هدف پژوهش حاضر را داشتند. نتیجه نشانگر حضور ویروس در تعدادی از دام‌های منطقه از قبیل اسب، گاو، گوسفند، بز و شتر می‌باشد. در ایران تنها یک مطالعه در زمینه شیوع بیماری اشمالنبرگ در جمعیت اسب‌ها به انجام رسیده است که حاکی از آلودگی اسب‌ها به این آربوویروس (۵ درصد) می‌باشد. کشورهای ترکیه و پاکستان بیشترین درصد نمونه‌های مثبت سرمی را به ترتیب در میزبان‌های گاو (۳۹/۸۲ درصد) و شتر (۸۶ درصد) نشان دادند. به دلیل همجواری و تبادلات دامی بین کشور ایران و ترکیه در شمال غرب کشور، و همچنین بین ایران و پاکستان در جنوب شرق، انجام اقدامات احتیاطی توسط مسئولین دامپزشکی توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: *آربوویروس‌ها، ویروس اشمالنبرگ، ایران، خاورمیانه*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: hbakhshi89@gmail.com

مقدمه

ویروس‌ها، مسئول شیوع بسیاری از بیماری‌ها در دام‌های اهلی می‌باشند (۱). این بیماری‌ها، در نهایت به کاهش بازده اقتصادی و حتی مرگ دام منجر می‌گردند. بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدید، عامل نگران کننده‌ای برای سلامت انسان و حیوان در سراسر دنیا هستند. تقریباً ۷۵ درصد این بیماری‌ها از حیات وحش نشأت می‌گیرند (۲). یکی از این بیماری‌های ویروسی در پاییز سال ۱۳۹۰ در نزدیکی شهر اشمالنبرگ آلمان (در مرز هلند و آلمان) مشاهده شد. علائم بالینی غیر اختصاصی شامل تب، اسهال و افت تولید شیر در گاوهای شیری بود. تحقیقات تشخیصی اولیه نتوانست عامل قطعی را شناسایی نماید. به همین دلیل، نمونه‌های خون از حیوانات با علائم بالینی جمع‌آوری و تحت بررسی‌های متاژنومی قرار گرفتند. ویروس جدید Schmallenberg (SBV) (خانواده پریبونیاویریده؛ جنس اورتوبونیاویروس) نام گرفت (۳). در اوایل سال ۱۳۹۱، یک اپیدمی ناهنجاری‌های مادرزادی در نشخوارکنندگان آلمان و هلند به وقوع پیوست (۴، ۵). آزمایش‌های تشخیصی بر روی نمونه‌های بافتی جمع‌آوری شده از بره‌ها و گوساله‌های ناقص‌الخلقه، مجدداً حضور SBV را تأیید کرد. تحقیقات تفصیلی نشان داد که SBV یک ویروس تراتوژن است که پس از آلوده کردن نشخوارکنندگان آبستن باعث به دنیا آمدن نتاج دارای نواقص مادرزادی (اسکولیوزیز، هیدروسفالی، آرتروگریپوز، هیپوپلازی مخچه و بزرگ شدن تیموس) می‌شود. در نوزادان علائمی همچون کوری، ادم در سینه و حفره‌های شکم، فلجی، تورم در بافت زیرپوستی مشاهده می‌شود. چنین نوزادانی، به طور معمول، بلافاصله پس از تولد می‌میرند. درصد مرگ و میر در گله‌های آلوده به ویروس از ۲۰ تا ۵۰ درصد متفاوت است. علاوه بر این در جنین مرده، اسکولیوز، هیدروسفالی، آرتروگریپوز، هیپوپلازی مخچه و بزرگ شدن تیموس مشاهده می شود (۶). SBV می‌تواند به صورت عمودی از مادر به جنین منتقل شود. ناهنجاری‌های مادرزادی مرتبط با حضور SBV در نوزادان گوسفندان، گاوها و بزها مشاهده شده است. انتقال عمودی در گونه‌های دیگر گزارش نشده است (۷). در دام‌های سالمی که در تماس با دام آلوده بودند، حضور ژنوم ویروس و آنتی‌بادی در خون منفی گزارش شد. از این رو انتقال مستقیم SBV از نشخوارکننده آلوده به حیوان سالم در اثر تماس یا از راه دهان و بینی بعید به نظر می‌رسد. گزارش دقیق مبنی بر انتقال از طریق آمیزش جنسی یا تلقیح مصنوعی نیز وجود ندارد هرچند دفع این ویروس در اسپرم گاوها تایید شده است (۶).

مطالعات بعدی ویروس شناسی، عفونت SBV را در طیف وسیعی از بندپایان جنس Culicoides به تایید رساند که این ویروس را در گروه آربوویروس‌های منتقل شونده از طریق بندپایان (ناقل زاد) مطرح نمود (۸، ۹). RNA این ویروس در گونه‌های C. obsoletus ،C. dewulfi و C. chiopterus یافت شده است. همچنین، شواهدی مبنی بر دخالت گونه‌های C. punctatus و C. nubeculosusدر انتقال این ویروس مشاهده شده است (۱۰). این ویروس پوشش‌دار، دارای سه RNA تک رشته‌ای با سوی منفی است (۱۱). تا کنون، این ویروس در گستره‌ای از میزبانان نشخوارکننده و غیر نشخوارکننده یافت شده است. ماده ژنتیک یا آنتی‌بادی علیه ویروس اشمالنبرگ در گاو، گوسفند، بز، گوزن، بوفالو، شتر و گاومیش شناسایی شده است. علاوه بر این، آنتی‌بادی در سگ‌ها و برخی حیوانات حیات وحش مثل گورخر، گراز و فیل نیز گزارش شده است (۳). تحقیقات مولکولی و سرولوژیکی در جمعیت انسانی در معرض خطر، هیچ شواهدی از عفونت SBV را نشان ندادند که بحث

زئونوز بودن این بیماری را رد می‌کنند (۱۲). با توجه به مزیت‌های روش‌های مولکولی از جمله حساسیت بالا، نیاز به زمان کم و امکان غربالگری با بازده بالا تشخیص مستقیم SBV بر اساس تشخیص ژنوم ویروسی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس دقیق‌ترین و بهترین روش است (۳، ۱۳). همچنین، جهت شناسایی این ویروس در بندپایان، امکان استفاده از روش‌های سرولوژیک میسر نیست. تشخیص بر اساس آنتی‌بادی (روش سرولوژیک) در مایعات بدن و شیر نیز ممکن است به‌عنوان ابزاری جایگزین استفاده شود زیرا گاهی ژنوم ویروسی در تمام برهه‌ها یا گوساله‌هایی که مشکوک به آلودگی هستند قابل تشخیص نیست (۱۴).

ظهور ویروس اشمالنبرگ در آلمان و گسترش آن در سراسر اروپا و برخی از دیگر کشورها وآثار مخرب اقتصادی آن بر صنعت دامپروری و دامداری، نشان از اهمیت این بیماری دارد. در ایران و کشورهای همسایه مطالعاتی در زمینه شیوع و یا حضور ویروس در جمعیت‌های مختلف دامی به انجام رسیده است. بررسی این مطالعات در کنار یکدیگر به فهم دقیق‌تر وضعیت این بیماری در منطقه کمک می‌کند و دیدگاه روشنی را از وضع حاضر ارائه می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی جامع و یکپارچه مطالعات انجام شده در ایران و کشورهای همسایه شامل افغانستان، پاکستان، ترکمنستان، جمهوری آذربایجان، ارمنستان، ترکیه، عراق، روسیه، قزاقستان، امارات، بحرین، عربستان، عمان و قطر از زمان ظهور ویروس تا کنون می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۹ پایگاه داده انگلیسی و فارسی شامل مگیران، ایرانداک، سیویلیکا، مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی، Web of Science، Scopus، Science Direct، Google Scholar و PubMed بررسی شدند. هیچ محدوده زمانی برای ورود مقالات به جستجو اعمال نشد. جستجو به دو زبان انگلیسی و فارسی و با الگوهای مختلفی از کلمات کلیدی شامل نام ویروس و کشور مورد نظر انجام شد. مطالعات تکراری، پژوهش‌های مرتبط با کشورهای غیر همسایه یا مطالعاتی که پایه اپیدمیولوژیک نداشتند کنارگذاشته شدند.

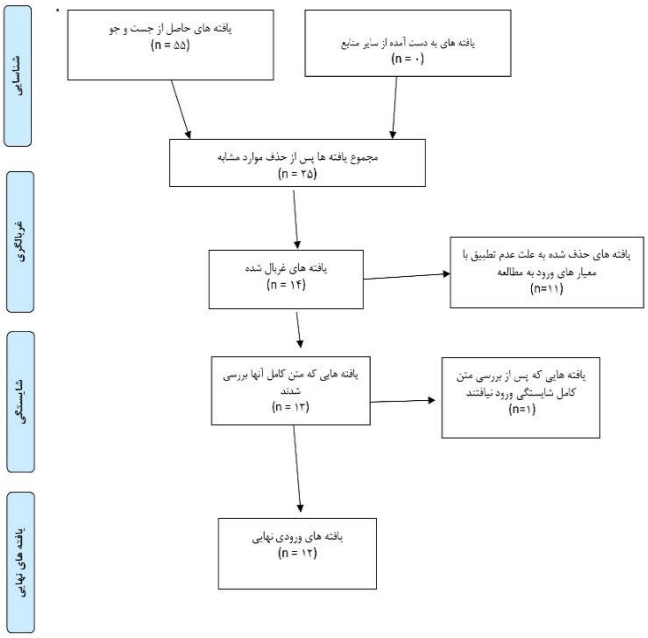
از میان ۵۵ مطالعه باقیمانده، ۱۲ مطالعه معیارهای تعریف شده در هدف پژوهش حاضر را دارا بودند (برخی از معیارهای ورود شامل: ۱- داشتن مرز آبی یا خاکی با ایران ۲- انجام تست سرولوژی یا مولکولی ۳- بررسی پاتوژن در میزبان حیوانی نه بندپایان بود. از طرف دیگر، برخی معیارهای خروج شامل: ۱- قابل استخراج نبودن اطلاعات مورد نیاز مثل تعداد دقیق نمونه‌های مثبت و یا سال انجام مطالعه، از متن کامل مقاله ۲- مطالعات توصیفی ۳- بررسی‌های غیر اپیدمیولوژیک مثل ساخت واکسن یا کشت سلول بود) (تصویر شماره ۱). اطلاعات گردآوری شده شامل نام نویسنده، گونه حیوانی مورد مطالعه، روش شناسایی، تعداد نمونه تست شده، تعداد نمونه مثبت و سال اجرای مطالعه بود.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی ۱۲ مقاله‌ای که شرایط ورود به این مرور سیستماتیک را دارا بودند، در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. از میان ۱۴ همسایه ایران، در ۸ کشور عراق، روسیه، آذربایجان، ترکیه، پاکستان، امارات، عربستان و قزاقستان مطالعاتی در زمینه بررسی اپیدمیولوژیک این ویروس انجام شده است. تا آنجا که بررسی‌های ما نشان می‌دهد، مطالعه چاپ شده‌ای در سایر همسایگانی که با ایران مرز آبی و یا خاکی مشترک دارند (ارمنستان، ترکمنستان، افغانستان، قطر، بحرین و عمان) به انجام نرسیده است. در ایران نیز تنها یک مطالعه در زمینه شیوع بیماری اشمالنبرگ در جمعیت اسب‌های شمال شرق کشور به انجام رسیده است

(جدول شماره ۱).

شکل ۱- نمودار پریزما نشان دهنده نحوه ورود یافته‌ها (مقالات) در مطالعه مروری حاضر می‌باشد. در این مطالعه سیستماتیک، ۵۵ مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت، یافته‌های ورودی نهایی، مربوط به ۱۲ مطالعه بود.



از ۱۱ مطالعه انجام شده، ۹ مطالعه پایه سرولوژیک و ۲ مطالعه پایه مولکولی داشتند. اسب، گاو، گوسفند، بز و شتر میزبانانی هستند که از نظر سرولوژیکی مثبت تشخیص داده شدند. گاو، گوسفند و بز نیز در برخی مطالعات مولکولی مثبت تشخیص داده شدند. از میان میزبانانی که بر روی آنها آزمایش تشخیصی صورت گرفته است، کل سکایی (کَل سَکایی یا سایگا یک نوع بز کوهی است که در مناطقی از اوراسیا که پوشش استپ دارد، زندگی می‌کند.) تنها میزبانی است که هیچ نمونه مثبتی از آن گزارش نشده است. کشورهای ترکیه و پاکستان بیشترین درصد نمونه‌های مثبت سرمی را به ترتیب در میزبان‌های گاو (۳۹/۸۲درصد) و شتر (۸۶ درصد) نشان دادند. کمترین درصد نمونه‌های مثبت سرمی نیز به ترتیب مربوط به کشور قزاقستان و میزبان کل سکایی بود.

بحث و نتیجه‌گیری

در دو دهه‌ی اخیر، بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدید به دلیل تغییرات سریع آب و هوایی، دستکاری‌های صورت گرفته در طبیعت توسط انسان و افزایش سرعت حمل و نقل، به سرعت در حال افزایش است (۲۶). بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدید می‌توانند ناشی از عوامل عفونی که قبلاً کشف نشده یا ناشناخته بوده اند، عوامل شناخته شده‌ای که به مکان‌های جدید جغرافیایی یا جمعیت‌های جدیدی سرایت کرده اند و عوامل شناخته شده قبلی که نقش آنها در بیماری‌های خاص قبلاً شناخته شده نبوده اند، باشند (۲۷، ۲۸). بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدید ناشی از ویروس، باکتری، قارچ و انگل نه تنها در انسان بلکه در دام‌های مختلف از جمله گاو، اسب، پرنده، خوک، گوسفند و شتر باعث مرگ و میر چشمگیری می‌شود (۲۹).

جدول ۱- مطالعات انجام شده بر میزان شیوع ویروس اشمالنبرگ در ایران و کشورهای همسایه

کشور مورد مطالعه	نویسنده	نمونه دامی	روش شناسایی	نمونه تست شده/ نمونه مثبت	درصد نمونه های مثبت	سال اجرای مطالعه	منبع
ایران	راسخ و همکاران	اسب	سرولوژیک	۱۰/۲۰۰	۵	۱۳۹۳	(۱۵)
عراق	طیب عمر البارودی	گوسفند	سرولوژیک	۳۱/۱۹۲	۱۶/۱۴	۱۳۹۴	(۱۶)
		گاو	سرولوژیک	۸۴/۴۰۰	۲۱	۱۳۹۷	(۱۷)
آذربایجان	زینالوا و همکاران	جنین گاو و گوسفند	مولکولی	۷۷/۶۷۱	۱۱/۴۷	۱۳۹۱-۱۳۹۷	(۱۸)
		گاو و گوسفند	سرولوژیک	۵۲۸۰/۴۰۲۵۷	۱۳/۱۱		
ترکیه	آزکور و همکاران	گاو	سرولوژیک	۳۲۵/۸۱۶	۳۹/۸۲	۱۳۹۲-۱۳۸۵	(۱۹)
		گوسفند		۵/۳۰۷	۱/۶۲		
		بز		۳/۱۰۹	۲/۷۵		
		بوفالو		۲/۱۳۰	۱/۵۳		
	ایلماز و همکاران	جنین گوسفند	مولکولی	۲/۶۰	۳/۳۳	۱۳۹۱-۱۳۹۲	(۲۰)
		جنین بز		۰/۱۲	۰		
		جنین گاو		۱/۴۴	۲/۲۷		
	تنباک و همکاران	گاو	سرولوژیک	۸۷/۳۶۰	۲۴/۱۶	۱۳۹۲	(۲۱)
پاکستان	ورنری و همکاران	شتر	سرولوژیک	۴۳/۵۰	۸۶	۱۳۹۲	(۲۲)
امارات	ورنری و همکاران	شتر	سرولوژیک	۱۳/۶۰	۲۱/۶۶	۱۳۹۲	(۲۲)
عربستان	طاها و همکاران	گوسفند	سرولوژیک	۶/۱۵۷	۳/۸۲	۱۳۹۳	(۲۳)
		بز		۱۱/۱۰۳	۱۰/۶۷		
قزاقستان	ارینبایوف و همکاران	کل سکایی	سرولوژیک	۰/۲۸۶	۰	۱۳۹۲-۱۳۹۳	(۲۴)
روسیه	گابنکو و همکاران	گاو	سرولوژیک	۴۴۷۹/۱۶۷۴۹	۲۶/۷۴	۱۳۹۳-۱۳۹۵	(۲۵)

بیماری‌های آربوویروسی بیماری‌هایی هستند که عامل بیماری زا توسط بندپایان به مهره‌داران منتقل می‌گردد (۳۰) این عوامل، ضررهای قابل توجه اقتصادی بر صنعت سلامت (انسان و دام) و دامپروری کشورها وارد می‌کنند (۳۱-۳۳). در تابستان و پاییز ۱۳۹۱، یک بیماری ویروسی نوپدید به نام اشمالنبرگ که در آن برهه ناشناخته بود در گاوهای کشورهای آلمان (نزدیکی منطقه اشمالنبرگ)، هلند و بلژیک گزارش شد و به سرعت در سراسر اروپا گسترش یافت. در مطالعاتی که اخیرا به انجام رسیده است، مشخص شد که این ویروس به کشورهای خارج از قاره اروپا نیز سرایت کرده است. به‌عنوان مثال بلاماسترام و همکاران در یک مطالعه سرولوژیک، حضور ویروس در جمعیت‌های گاو، گوسفند و بز در قاره آفریقا را گزارش کردند (۳۴). در کشور اتیوپی نیز مواردی از ویروس در دام‌ها مشاهده شده است (۳۵). ابیریزک و همکاران نیز حضور ویروس در برخی جمعیت‌های دامی در

کشـــور لبنـــان را گـــزارش داده‌انـــد (۳۶). یکـــی از ویژگی‌هـای ایـن ویـروس کـه بـه گسـترش بیشـتر آن کمک کرده اسـت قابلیـت انتقـال آن از طریـق پشـه‌های جـنس کولیکوئیـدس اسـت کـه جنبـه‌ی دیگـری از اهمیت این بیماری ویروسی را آشکار می‌سازد.

شکل ۲- نقشه شماتیک پراکنش ویروس در ایران و کشورهای همسایه، میزبانان و میانگین نمونه‌های مثبت هر منطقه؛ رنگ نارنجی نشان‌دهنده انجام مطالعات مولکولی در میزبان و رنگ آبی بیانگر آن است که در میزبان مورد نظر هر دو مطالعه مولکولی و سرولوژیک به انجام رسیده است.

در مطالعـه حاضـر کـه بـا هـدف مـروری بـر مقـالات پیشـین در زمینـه شناسـایی سـرولوژیک و مولکـولی ویـروس اشـمالنبرگ در ایـران و کشـورهای همسـایه انجام شـد، مشـخص شـد ایـن بیمـاری بـا میـزان شـیوع بـالا در برخـی از کشـورهای همسـایه ایـران از جملـه ترکیـه (شـمال غـرب) و پاکسـتان (جنـوب شـرق) در گـردش اسـت. براسـاس داده‌هـای مؤسسـه آمـار ترکیـه، ۱/۱ میلیـون گـاو و ۲ میلیـون گوسـفند و بـز از کشـورهای اروپـایی (آلمـان، هلنـد، اتـریش، ایتالیـا و غیـره) و همچنـین ایـالات متحـده، اسـترالیا و برزیـل در سـال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۱ بـه ترکیـه وارد شـده اسـت. این حیوانـات وارداتـی کـه بیشـتر از کشـورهای اروپـایی هسـتند، ممکـن اسـت منشـا آلـودگی SBV در ترکیـه باشـند (۲۱). بـه طریـق مشـابه، واردات دام از کشـورهای مختلـف اروپـایی بـه پاکسـتان نیـز ممکـن است زمینه‌سـاز بـروز درصـد بـالایی از نمونـه‌های مثبـت سـرمی در شـترهای غربـال شـده باشـد (۲۲). ایـن امـر می‌توانـد از آن جهـت مهـم باشـد کـه تبـادلات دامـی میـان کشـورها، خطـر ابـتلا بـه ایـن بیمـاری و رخـداد اپیـدمی‌های مـرتبط را بیشـتر کنـد. همچنـین طبـق بررسـی‌های انجـام شـده در ایـن مطالعـه مـروری سیسـتماتیک، در تعـدادی از همسـایگان ایـران از جملـه ارمنسـتان، ترکمنسـتان، افغانسـتان، قطـر، بحـرین و عمـان، مطالعـه‌ای در زمینـه ایـن بیمـاری یافـت نشـد و در نتیجـه وضـعیت بیمـاری ناشـناخته می‌باشـد. اولـین قـدم در برنامـه‌ریزی بـرای کنتـرل و مبـارزه بـا بیمـاری‌ها، تشـخیص و تعیـین دقیـق عامـل عفـونی اسـت (۳۷). روش‌هـای گونـاگونی از جملـه

تست‌های سرولوژیک و روش‌های مولکولی جهت شناسایی عوامل عفونی به کار می‌رود. روش‌های سرولوژیک دارای معایبی از جمله واکنش متقاطع با عوامل دیگر، عدم حساسیت در تشخیص برخی عفونت‌ها و نبود آزمون اختصاصی در مورد برخی از ارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد (۳۸). از آنجایی که شناسایی دقیق و به موقع عوامل عفونی برای اقدامات بعدی بسیار مهم است، روش‌های مولکولی جدید و پیشرفته جهت تشخیص بیماری‌های میکروبی، جایگزین روش‌های قبلی شده است. در روش‌های مولکولی به وسیله پرایمرهای اختصاصی و در زمانی کم می‌توان با قطعیت نسبتاً بالایی، در جهت تشخیص عوامل بیماری‌زا اقدام کرد (۳۹). قابل ذکر است که حساسیت و ویژگی روش‌های مولکولی بسیار بالاتر از روش‌های سرولوژیک می‌باشد و در زمان کوتاه و با دقتی بالا می‌توان بیماری را تشخیص داد (۳۸، ۴۰). با این حال اکثر مطالعات انجام شده در ایران و کشورهای همسایه در زمینه شناسایی ویروس اشمالنبرگ، پایه سرولوژیک دارند. به نظر می‌رسد جایگزین کردن روش‌های مولکولی در مطالعات آینده در زمینه شناسایی این ویروس در منطقه علاوه بر افزایش دقت و سرعت تشخیص، دروازه‌ای به فیلوژنی و تعیین ژنوم ویروس نیز بگشاید.

بیماری‌هایی که در حیات وحش مخزن داشته یا به نحوی توانایی آلوده کردن حیات وحش را دارند به عنوان مشکل عمده بهداشت، در سطح جهانی مطرح هستند (۴۱). صدها عامل بیماری‌زا و بسیاری از حالت‌های انتقال مختلف در این زمینه وجود داشته و عوامل زیادی در اپیدمیولوژی آنها تأثیر دارند. اهمیت و شناخت حیات وحش به‌عنوان میزبان و مخزن بیماری‌ها امری اجتناب ناپذیر است. به نظر می‌رسد برای رسیدن به درک کامل از اپیدمیولوژی برخی بیماری‌ها، نقش حیات وحش نباید نادیده گرفته شود (۴۲، ۴۳). مطالعات زیادی حضور ویروس اشمالنبرگ را در حیات وحش به اثبات رسانده است. SBV در چندین گونه غیر نشخوارکننده شناسایی شده است. آنتی‌بادی علیه SBV در گرازهای وحشی در بلژیک و آلمان یافت شده است. (۴۴، ۴۵). پس از القای عفونت تجربی SBV، برخی از خوک‌های به طور موقت حضور آنتی‌بادی در خون را نشان دادند اما علائم بالینی از خود نشان ندادند و هیچ RNA ویروسی مشاهده نشد (۴۶). SBV همچنین در سگ‌ها، گرازها و فیل‌ها مشاهده شده است (۴۷-۴۹). برخی حیوانات دیگر نیز آنتی‌بادی علیه این ویروس را نشان دادند هر چند علائمی مشاهده نشده است که اظهار نظر دقیق در این زمینه نیازمند مطالعات تکمیلی می‌باشد. آنچه حائز اهمیت است این است که نقش حیات وحش در چرخه ویروس اشمالنبرگ و همچنین گسترش آن، از اهمیت بالایی برخوردار است (۵۰). با این حال اکثر مطالعاتی که در منطقه مورد نظر مطالعه حاضر به انجام رسیده است در جمعیت نشخوارکنندگان اهلی مثل گاو، گوسفند و بز صورت گرفته است. تنها مطالعه ارینبایوف و همکاران در قزاقستان جمعیتی از کل‌های سکایی را مورد بررسی قرار داده است. در ایران و کشورهای همسایه، بررسی‌های بیشتری در زمینه حضور ویروس اشمالنبرگ در حیات وحش مورد نیاز است.

داده‌های فعلی در ایران و کشورهای همسایه، برای تعیین سیمای کلی بیماری اشمالنبرگ کافی نیست و مطالعات بیشتر در مناطق مختلف و میزبان‌های گسترده‌تر لازم است. همچنین، آزمایش‌های دقیق‌تر مولکولی مانند تست PCR نباید نادیده گرفته شود. همچنین، با توجه به اینکه عامل این بیماری توسط پشه‌های جنس کولیکوئیدس به دام‌ها منتقل می‌گردد، صید گونه‌های این جنس و بررسی آلودگی آنها به این

ویروس، می‌تواند منجر به شناسایی سریع ویروس، قبل از اینکه آلودگی در دام‌ها قابل شناسایی شود گردند. به نظر می‌رسد از آنجایی که اروپا اپیدمی‌های متعددی از این بیماری را تجربه کرده است، بهتر است قبل از رخداد اپیدمی‌های مشابه در ایران و کشورهای همسایه، هر چه سریع‌تر اقدامات لازم در زمینه شناسایی و مطالعه اپیدمیولوژیک در مناطق مختلف کشور به انجام رسیده و در نهایت اقدامات احتیاطی از قبیل شناسایی زود هنگام نمونه‌های مثبت و شناسایی کانون‌های بیماری در دستور کار قرار گیرد.

References

1- Kahrs RF. Viral diseases of cattle. Iowa State University Press; 2001.

2- Bloom DE, Black S, Rappuoli R. Emerging infectious diseases: a proactive approach. Proc Natl Acad Sci. 2017; 114(16): 4055–9.

3- Collins ÁB, Doherty ML, Barrett DJ, Mee JF. Schmallenberg virus: a systematic international literature review (2011-2019) from an Irish perspective. Ir Vet J. 2019; 72(1): 1–22.

4- Garigliany M-M, Bayrou C, Kleijnen D, Cassart D, Jolly S, Linden A, *et al.* Schmallenberg virus: a new Shamonda/Sathuperi-like virus on the rise in Europe. Antiviral Res. 2012; 95(2): 82–7.

5- Mars MH, van der Poel WHM. Epizootic of ovine congenital. Tijdschr Diergeneeskd. 2012; 106: 111.

6- Bayry J. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock. Springer; 2017.

7- Zeynalova S, Omarov A. Biological Characteristics of Schmallenberg Virus-an Overview. Khazar Univ Press. 2020; 4(1).

8- De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Madder M, Geysen D, *et al.* Detection of Schmallenberg virus in different Culicoides spp. by real-time RT-PCR. Transbound Emerg Dis. 2012; 59(6): 471–5.

9- Wernike K, Conraths F, Zanella G, Granzow H, Gache K, Schirrmeier H, *et al.* Schmallenberg virus—two years of experiences. Prev Vet Med. 2014; 116(4): 423–34.

10- Kęsik-Maliszewska J, Larska M, Collins ÁB, Rola J. Post-Epidemic Distribution of Schmallenberg Virus in Culicoides Arbovirus Vectors in Poland. Viruses. 2019; 11(5): 447.

11- Wernike K, Beer M. Schmallenberg virus: a novel virus of veterinary importance. Adv Virus Res. 2017; 99: 39–60.

12- Ducomble T, Wilking H, Stark K, Takla A, Askar M, Schaade L, *et al.* Lack of evidence for Schmallenberg virus infection in highly exposed persons, Germany, 2012. Emerg Infect Dis [Internet]. 2012 Aug; 18(8): 1333–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22840657

13- Golender N, Bumbarov VY, Erster O, Beer M, Khinich Y, Wernike K. Development and validation of a universal S-segment-based real-time RT-PCR assay for the detection of Simbu serogroup viruses. J Virol Methods. 2018; 261: 80–5.

14- De Regge N, van den Berg T, Georges L, Cay B. Diagnosis of Schmallenberg virus infection in malformed lambs and calves and first indications for virus clearance in the fetus. Vet Microbiol. 2013 Mar; 162(2–4): 595–600.

15- Rasekh M, Sarani A, Hashemi SH. Detection of Schmallenberg virus antibody in equine population of Northern and Northeast of Iran. Vet world. 2018; 11(1): 30.

16- AL-Barwary, Omer LT. Serological study for detection of new emerging ectoparasites borne disease (Schmallenberg Virus) in Duhok province-Iraq. Assiut Vet Med J. 2018; 64(159): 39–42.

17- Al-Baroodi SY. Seroprevelance of schmallenberg virus infection as emerging disease in cattle in Iraq. Iraqi J Vet Sci. 2021; 35(3).

18- Zeynalova S, Vatani M, Asarova A, Lange CE. Schmallenberg virus in Azerbaijan 2012–2018. Arch Virol. 2019; 164(7): 1877–81.

19- Azkur AK, Albayrak H, Risvanli A, Pestil Z, Ozan E, Yılmaz O, *et al.* Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. Trop Anim Health Prod. 2013; 45(8): 1825–8.

20- Yilmaz H, Hoffmann B, Turan N, Cizmecigil UY, Richt JA, Van der Poel WHM. Detection and partial sequencing of Schmallenberg virus in cattle and sheep in Turkey. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2014; 14(3): 223–5.

21- TONBAK Ş, AZKUR AK, Pestil Z, Biyikli E, Abayli H, Baydar E, *et al.* Circulation of Schmallenberg virus in Turkey, 2013. Turkish J Vet

Anim Sci. 2016; 40(2): 175–80.

22- Wernery U, Thomas R, Raghavan R, Syriac G. Serological evidence of Epizootic Haemorrhagic Disease and Schmallenberg virus in dromedaries. J Camel Pract Res. 2013; 20(2): 135–7.

23- Taha HA, Shoman SA, Alhadlag NM. Molecular and serological survey of some haemoprotozoan, rickettsial and viral diseases of small ruminants from Al-Madinah Al Munawarah, KSA. Trop Biomed. 2015; 32(3).

24- Orynbayev MB, Beauvais W, Sansyzbay AR, Rystaeva RA, Sultankulova KT, Kerimbaev AA, *et al.* Seroprevalence of infectious diseases in saiga antelope (Saiga tatarica tatarica) in Kazakhstan 2012–2014. Prev Vet Med. 2016; 127: 100–4.

25- Gubenko OG, Bjadovskaya OP, Sprygin A V, Kononova S V, Piskunov A V, Kononov A V. DETECTION OF SCHMALLENBERG VIRUS IN CATTLE IMPORTED INTO THE RUSSIAN FEDERATION. Sel'skokhozyaistvennaya Biol. 2019; 54(6): 1247–56.

26- Bakhshi H, Failloux A-B, Zakeri S, Raz A, Dinparast Djadid N. Mosquito-borne viral diseases and potential transmission blocking vaccine candidates. Infect Genet Evol [Internet]. 2018; 63: 195–203. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134818303150

27- Snowden FM. Emerging and reemerging diseases: a historical perspective. Immunol Rev. 2008; 225(1): 9–26.

28- Cupertino MC, Resende MB, Mayer NAJ, Carvalho LM, Siqueira-Batista R. Emerging and re-emerging human infectious diseases: A systematic review of the role of wild animals with a focus on public health impact. Asian Pac J Trop Med. 2020; 13(3): 99.

29- Bakhshi H, Beck C, Lecollinet S, Monier M, Mousson L, Zakeri S, *et al.* Serological evidence of West Nile virus infection among birds and horses in some geographical locations of Iran. Vet Med Sci. 2021; 7(1): 204–9.

30- Bakhshi H, Fazlalipour M, Dadgar-Pakdel J, Zakeri S, Raz A, Failloux A-B, *et al*. Developing a Vaccine to Block West Nile Virus Transmission: In Silico Studies, Molecular Characterization, Expression, and Blocking Activity of Culex pipiens mosGCTL-1. Pathogens. 2021; 10(2): 218.

31- Castillo-Chavez C, Blower S, Van den Driessche P, Kirschner D, Yakubu A-A. Mathematical approaches for emerging and reemerging infectious diseases: models, methods, and theory. Vol. 126. Springer Science & Business Media; 2002.

32- Dash AP, Bhatia R, Sunyoto T, Mourya DT. Emerging and re-emerging arboviral diseases in Southeast Asia. J Vector Borne Dis. 2013; 50(2): 77.

33- Bakhshi H, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Piorkowski G, Zakeri S, *et al.* Detection of arboviruses in mosquitoes: Evidence of circulation of chikungunya virus in Iran. PLoS Negl Trop Dis. 2020; 14(6).

34- Blomström A, Stenberg H, Scharin I, Figueiredo J, Nhambirre O, Abilio AP, *et al.* Serological screening suggests presence of Schmallenberg virus in cattle, sheep and goat in the Zambezia Province, Mozambique. Transbound Emerg Dis. 2014; 61(4): 289–92.

35- Sibhat B, Ayelet G, Gebremedhin EZ, Skjerve E, Asmare K. Seroprevalence of Schmallenberg virus in dairy cattle in Ethiopia. Acta Trop. 2018; 178: 61–7.

36- Abi-Rizk A, Kanaan T, El Hage J. Seroprevalence of Schmallenberg virus and other Simbu group viruses among the Lebanese sheep. Open Vet J. 2017; 7(3): 290–3.

37- Masuda N, Holme P. Predicting and controlling infectious disease epidemics using temporal networks. F1000Prime Rep. 2013; 5.

38- Maggi RG, Birkenheuer AJ, Hegarty BC, Bradley JM, Levy MG, Breitschwerdt EB. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. Parasit Vectors. 2014; 7(1): 1–9.

39- Nolan T, Bustin SA. PCR technology: current innovations. CRC press; 2013.

40- Kim N. Serology. In: Helicobacter pylori. Springer; 2016. p. 113–8.

41- Bakhshi H, Oshaghi MA, Abai MR, Rassi Y, Akhavan AA, Sheikh Z, *et al.* Molecular detection of Leishmania infection in sand flies in border line of Iran–Turkmenistan: Restricted and permissive vectors. Exp Parasitol. 2013; 135(2): 382–7.

42- Kruse H, kirkemo A-M, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. Emerg Infect Dis [Internet]. 2004 Dec; 10(12): 2067–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15663840

43- Gortázar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, Vicente J. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. Eur J Wildl

Res[Internet]. 2007; 53(4): 241. Available from: https://doi.org/10.1007/s10344-007-0098-y

44- Desmecht D, Garigliany M-M, Beer M, Schirrmeier H, Paternostre J, Volpe R, *et al*. Detection of antibodies against Schmallenberg virus in wild boars, Belgium, 2010-2012. In: 31th Congress of the International Union of Game Biologists. 2013. p. O-TL.

45- Mouchantat S, Wernike K, Lutz W, Hoffmann B, Ulrich RG, Börner K, et al. A broad spectrum screening of Schmallenberg virus antibodies in wildlife animals in Germany. Vet Res. 2015; 46(1): 1–5.

46- Poskin A, Van Campe W, Mostin L, Cay B, De Regge N. Experimental Schmallenberg virus infection of pigs. Vet Microbiol. 2014; 170(3–4): 398–402.

47- Molenaar FM, La Rocca SA, Khatri M, Lopez J, Steinbach F, Dastjerdi A. Exposure of Asian elephants and other exotic ungulates to Schmallenberg virus. PLoS One. 2015; 10(8): e0135532.

48- Kęsik-Maliszewska J, Krzysiak MK, Grochowska M, Lechowski L, Chase C, Larska M. Epidemiology of Schmallenberg virus in European bison (Bison bonasus) in Poland. J Wildl Dis. 2018; 54(2): 272–82.

49- Rossi S, Viarouge C, Faure E, Gilot-Fromont E, Gache K, Gibert P, *et al*. Exposure of wildlife to the Schmallenberg virus in France (2011–2014): Higher, faster, stronger (than bluetongue)! Transbound Emerg Dis. 2017; 64(2): 354–63.

50- Chiari M, Sozzi E, Zanoni M, Alborali LG, Lavazza A, Cordioli P. Serosurvey for Schmallenberg virus in alpine wild ungulates. Transbound Emerg Dis. 2014; 61(1): 1–3.

A systematic review on the spread of Schmallenberg virus (SBV) in Iran and neighboring countries

Sahar Asadolahizoj[1], Amirsajad Jafari[1], Amir Masoud Jafari-Nozad[2], Mehdi Rasekh[3], Ali Sarani[3], Hasan Bakhshi[4*]

1 - Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2 - Student Research Committee, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.
3 - Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
4 - Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran (IPI), Tehran, Iran.

Receive: November 10, 2020; Revise: December 12, 2020; Accept: December 20, 2020

Summary

Schmallenberg virus (SBV) is a single-stranded RNA virus classified in the Prebunyaviridae family and Orthobunyavirus genus. SBV is a teratogenic arbovirus infecting pregnant ruminants, and resulting in offspring with congenital defects such as scoliosis, hydrocephalus, arthrogryposis, cerebellar hypoplasia and enlarged thymus. The purpose of this review was to conduct a systematic review to show the spread of SBV in Iran and neighboring countries including Afghanistan, Pakistan, Turkmenistan, the Republic of Azerbaijan, Armenia, Turkey, Iraq, Russia, Kazakhstan, United Arab Emirates, Bahrain, Saudi Arabia, Oman and Qatar. In this study, 9 English and Persian databases including Magiran, Irandoc, SID, Web of Science, Scopus, Science Direct, Google Scholar and PubMed were reviewed. Of the 55 studies found, 12 studies met the criteria defined in the purpose of this study. The results of the study indicated the presence of SBV in a number of domestic animals such as horses, cows, sheep, goats and camels. In Iran, only one study was found to be conducted on the prevalence of the disease which indicates that horses are infected (5%). Turkey and Pakistan showed the highest percentages of positive serum samples in cattle (39.82%) and camels (86%), respectively. Due to the proximity and livestock exchanges between Iran and Turkey in the northwest of the country, as well as between Iran and Pakistan in the southeast, precautionary measures are recommended by veterinary officials.

Keywords: *Arboviruses; Schmallenberg virus; Iran; Middle East*

مروری بر عوامل ویروسی سقط جنین گاو در ایران

محمد جواد بهزادی شهربابک

استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ بهمن ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۷ بهمن ۱۳۹۹

چکیده

از دست رفتنِ آبستنی یک معضل اقتصادی جدی در مدیریت تولید مثلیِ مزارع پرورش گاو شیری و گوشتی به شمار می‌رود. عوامل مختلفی شامل اختلالات ژنتیکی، کمبودهای تغذیه‌ای، مسمومیت‌ها، صدمات فیزیکی و عفونت‌ها باعث از دست رفتن آبستنی در گاو می‌شوند. عوامل عفونی شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها، تک‌یاخته‌ها و قارچ‌ها نقش قابل توجهی در از دست رفتن آبستنی گاو دارند. شناخت عوامل عفونی سقط جنین در هر منطقه برای کنترل و پیشگیری از سقط جنین ضرورت دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تمام مطالعاتی است که به شناسایی عوامل ویروسی از دست رفتن آبستنی گاو در ایران پرداخته‌اند. بنابراین تمام مقالات فارسی و انگلیسی که در موضوع سقط جنین گاو با منشاء ویروسی و یا هر یک از ویروس‌های عامل سقط جنین گاو بوده است در پایگاه‌های اطلاعاتی شامل Direct Scince، Med Pub، Scopus، Scholar Google، Magiran، Doc Iran جستجو شدند. تمام مطالعات به‌دست آمده برای تحلیل آسان‌تر در قالب جداولی تدوین شدند. اطلاعات حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد اگر چه پژوهش‌های زیادی شیوع بالای عفونت‌های ویروسیِ عامل از دست رفتن آبستنی گاو شامل ویروس BVD و IBR را در ایران نشان می‌دهند، اما مطالعاتی که به نقش آنها در معضل از دست رفتن آبستنی گاو پرداخته باشد، اندک هستند. همین مطالعات محدود حاکی از آن هستند که ویروس BVD و IBR سهم قابل توجهی در ایجاد سقط جنین گاو در ایران دارند.

واژگان کلیدی: *اسهال ویروسی گاوان، سقط ویروسی گاوان، راینوتراکئیت عفونی گاوان، ایران*

مقدمه

پیامدهای اقتصادی از دست رفتن آبستنی در گاو شیری بسیار بالا است. زمان و هزینه زیادی لازم است تا اینکه یک گاو آبستن شود و وقتی آبستنی از دست می رود ممکن است در ادامه، نگهداری آن گاو صرفه اقتصادی نداشته باشد چون بایستی ماه‌ها تا آبستن شدن مجدد و زایمان برای آن گاو با حداقل تولید شیر هزینه شود، بنابراین در لیست حذف از گله قرار می گیرد (۳-۱). عوامل مختلفی از قبیل عوامل ژنتیکی، کمبودهای تغذیه‌ای، مسمومیت‌ها، هورمون‌ها می‌توانند منجر به از دست رفتن آبستنی در گاو شوند اما در این میان عوامل عفونی سهم قابل توجهی در موارد از دست رفتن آبستنی در گاو دارند (۴، ۵). عوامل عفونی که منجر به از دست رفتن آبستنی در گاو می‌شوند شامل عفونت‌های باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی هستند. گله‌های گاو شیری در ایران سالانه زیان اقتصادی بالایی را در اثر از دست رفتن آبستنی متحمل می‌شوند که مسلماً بخش قابل توجهی از آنها منشاء عفونی دارد (۲، ۶، ۷). شناخت عوامل عفونی رایج از دست رفتن آبستنی در کشور ما و مناطق مختلف آن برای کنترل آنها و کاهش خسارت‌های اقتصادی امری لازم است (۸). مطالعات متعددی در کشور ما طی سالیان متمادی اثر عوامل عفونی گوناگون را در از دست رفتن آبستنیِ گاو در منطقه مورد مطالعه‌ی خود بررسی کرده‌اند. در کنار هم گذاشتن نتایج این مطالعات می‌توانند دید جامع‌تری نسبت به پاتوژن‌های متداولِ عامل از دست رفتن آبستنی در کشور و مناطق مختلف آن به دست دهد. البته با توجه به تعدد میکروارگانیسم‌های عامل از دست رفتن آبستنی و فراوانی مطالعات در این زمینه، بررسی همه آنها در قالب یک مطالعه امکان پذیر نیست. علیرغم نتایج حاصل از بررسی‌های مختلف در سراسر دنیا که نشان دهنده سهم قابل توجه عوامل ویروسی در از دست رفتن آبستنی است به نظر می‌رسد در ایران کمتر به نقش ویروس‌های عامل از دست رفتن آبستنی پرداخته شده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی تمام پژوهش‌هایی است که به عوامل ویروسیِ از دست رفتن آبستنیِ گاو در ایران پرداخته اند.

اسهال ویروسی گاوان: ویروس عامل اسهال ویروسی گاوان از جنس پستی ویروس و از خانواده فلاوی ویریده است. این ویروس یکی از عوامل مهم از دست رفتن آبستنی گاو محسوب می‌شود. پیامدهای عفونت گاو آبستن به این ویروس بستگی به مرحله‌ای از آبستنی دارد که ویروس وارد بدن می‌شود. عفونت در یک سوم ابتدایی آبستنی ناباروری، مرگ رویانی، جذب جنینی، مومیایی شدن جنین یا سقط را به دنبال دارد. عفونت با سویه غیر سایتوپاتیک بین ماه‌های ۲ تا ۴ آبستنی می‌تواند تولد گوساله‌های با عفونت پایدار(PI) را در پی داشته باشد که منبع اصلی بقا و انتشار عفونت در گله خواهند بود. عفونت بین روزهای ۱۰۷ تا ۱۸۳ آبستنی می‌تواند منجر به تولد گوساله‌های با نواقص مادرزادی شود ضمن این که سقط جنین ممکن است به دنبال عفونت ویروسی در ماه‌های آخر آبستنی هم دیده شود (۹، ۱۰).

این ویروس در ایران برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ میلادی توسط میرشمسی و همکاران توصیف شد (۱۱). شیوع ویروس BVD بین کشورهای مختلف و حتی بین استان‌های مختلف در یک کشور متفاوت است که دلیل آن می‌تواند تفاوت در مدیریت، تنوع محیطی، اندازه گله و وجود حیوانات با عفونت پایدار در این گله‌ها باشد (۱۲). مطالعات متعددی حاکی از آن است که این ویروس در استان‌های مختلف کشور ایران انتشار دارد. جدول ۱ تمام مطالعاتی که تاکنون میزان شیوع ویروس BVD را در جمعیت گاوی به روش‌های گوناگون در

مناطق مختلف کشور بررسی کرده‌اند نشان می‌دهد. عمدتاً شیوع ویروس به روش سرولوژی مورد بررسی قرار گرفته است. نگاهی به این مطالعات نشان می‌دهد که در بیشتر موارد شیوع سرمی قابل توجهی در گله‌های مناطق مختلف گزارش شده است. با این حال مطالعاتی که رد پای عفونت به ویروس BVD را در موارد سقط جنین گاوی در ایران مورد جستجو قرار داده‌اند چندان زیاد نیستند.

جدول ۲ در بردارنده مطالعاتی است که شیوع ویروس BVD را در ارتباط با از دست رفتن آبستنی گاو در ایران تاکنون بررسی کرده‌اند. اولین مطالعه‌ای که به بررسی میزان وقوع اسهال ویروسی گاوان در ارتباط با سقط جنین در ایران پرداخته است توسط پازوکی و همکاران (۱۳) در سال ۱۳۸۷ در یک مزرعه گاو شیری در اطراف تهران که درگیر با مشکل سقط جنین بوده انجام شده است. در این مطالعه از ۵۰ رأس گاو با سابقه سقط جنین نمونه سرمی اخذ شد که بر اساس آزمون الایزا ۳۲ درصد موارد پادتن ضد ویروس BVD داشتند. اما جستجوی عفونت BVD در جنین سقطیِ گاو برای اولین بار در ایران توسط صفرپور و همکاران (۱۴) در سال ۱۳۸۹ صورت گرفت که در بررسی سرمی و مولکولی ۶۲۰ نمونه شیردان جنین‌های سقطی گاو از چندین استان کشور به ترتیب ۱۷/۹ و ۲۰/۴۸ درصد آلوده به ویروس BVD بودند. همچنین بدیعی و همکاران (۱۵) در سال ۱۳۹۰ با بررسی مولکولی ۲۵۱ جنین سقطی از گاوداری‌های اطراف تهران ۲۵/۲ درصد موارد سقط را ناشی از عفونت BVD یافتند. تنها بررسی هیستوپاتولوژیک در این زمینه توسط معیر و همکاران (۱۶) در سال ۱۳۹۰ انجام شد که در این مطالعه ۳۸ درصد جنین‌های سقط شده در گاوداری‌های اطراف تهران، نشانه‌های هیستوپاتولوژیک اسهال ویروسی گاوان را داشتند.

تاکنون چندین مطالعه (۱۳، ۱۷، ۱۹)، سرواپیدمیولوژیک ویروس BVD را در گاوهای با سابقه سقط جنین بررسی کرده‌اند و عمدتاً درصد شیوع بالایی را گزارش نموده‌اند اما در هیچ یک از این مطالعات در کنار گاوهای با سابقه سقط، گاوهای بدون سابقه سقط به‌عنوان گروه شاهد بررسی نشده‌اند، در صورتی که مقایسه بین این دو گروه می‌تواند تحلیل دقیق‌تری از سهم ویروس BVD در ایجاد سقط جنین گاو به دست دهد. رحیمی اندانی و همکاران (۲۰) در سال ۱۳۹۴ از مغز ۴۳ مورد جنین سقط شده یا مرده از گاوداری‌های استان اصفهان نمونه‌گیری کردند و در ۲۰/۱۲ درصد از نمونه‌ها پادتن ضد ویروس BVD یافتند. در بررسی مولکولی جنین‌های سقطی مربوط به ۸ مجتمع گاو شیری در استان قزوین ویروس BVD عامل ۲۰/۳۱ درصد از موارد سقط جنین بود (۲). ارزیابی وضعیت کلی گله از لحاظ آلودگی به عفونت ویروس BVD را می‌توان با آزمون الایزای شیر مخزن گله انجام داد. بررسی شیر مخزن گله‌های با سابقه سقط جنین از لحاظ تیتر پادتن ضد ویروس BVD در ایران فقط یک مورد ثبت شده است. در این مطالعه خاکپور و همکاران (۲۱) ۲۰ نمونه شیر مخزن از گله‌هایی که مشکل سقط جنین داشتند را به روش الایزا آزمودند و ۴۵ درصد گله‌ها تیتر BVD داشتند. گوساله‌های با عفونت پایدار در بقا و انتشار عفونت در گله نقش اساسی بازی می‌کنند. لذا شناسایی گوساله‌های با عفونت پایدار و حذف آنها از گله اهمیت بسیاری در کنترل و پیشگیری از سقط‌های ناشی از ویروس BVD دارد. اما مرور بر مطالعاتی که در زمینه‌ی این عفونت ویروسی انجام شده‌اند نشان می‌دهد که تاکنون مطالعات چندانی در زمینه شناسایی و انتشار گوساله‌های با عفونت پایدار در ایران انجام نشده است.

جدول۱-مطالعات انجام شده بر میزان شیوع ویروس BVD در مزارع پرورش گاو در ایران

	نویسنده	سال	منطقه	روش	تعداد نمونه	نتایج
۱	قائم مقامی(۱۰)	۲۰۱۳	اراک	الایزا	۸۰۳	٪ ۵۴/۳
۲	نکوئی جهرمی(۹)	۸۷	قزوین	الایزا	۲۲۰۵	٪ ۷۴/۵
۳	عباسی(۲۲)	۲۰۱۶	سیستان	الایزا	۱۸۰	٪ ۶۸/۳۳
۴	خلقی(۲۳)	۹۹	تهران، اصفهان، قزوین	الایزا(آنتی ژن و آنتی بادی)	۵۰۰	۸۰ ٪ دارای آنتی‌بادی و ۱۱٪ دارای آنتی‌ژن
۵	خداکرم تفتی(۲۴)	۲۰۱۶	فارس	پی سی آر	۴۰۰	٪۴
۶	نیک بخت(۲۵)	۲۰۱۵	استان های مختلف	الایزا	۸۸۲	٪ ۶۴/۴
۷	میرشمسی(۱۱)	۱۹۷۰	استان های مختلف	الایزا	۲۳۹۴	٪ ۳۵/۶۷
۸	همت زاده(۱۲)	۸۰	چهارمحال و بختیاری	آزمون خنثی سازی سرم	۱۳۵۷	٪ ۲۳/۳۶
۹	باهنر(۲۶)	۹۰	قزوین	الایزا	۲۲۰۵	٪ ۷۴/۵
۱۰	دواساز تبریزی(۲۷)	۹۰	تبریز	الایزا	۵۰۸	٪ ۱۸/۷
۱۱	صدیقی نژاد(۲۸)	۷۱	تمام کشور	الایزا	۳۰۰۰	٪ ۵۲/۶
۱۲	شیروانی(۲۹)	۲۰۱۲	اصفهان	الایزا	۶۴۲	٪ ۴۹/۲
۱۳	طالب خان گروسی(۳۰)	۲۰۰۸	مشهد	الایزای شیر مخزن	۳۵	٪ ۹۳/۹۸
۱۴	طالب خان گروسی(۳۱)	۲۰۰۹	مشهد	الایزا	۱۴۱	٪ ۷۲/۲۵
۱۵	طالب خان گروسی(۳۲)	۲۰۱۱	مشهد	الایزا(آنتی ژن)	۱۵۷	٪ ۳/۲
۱۶	بدیعی(۳۳)	۲۰۱۰	شیراز	الایزا	۹۹۴	٪ ۵۲/۴۳
۱۷	رضایی صابر(۳۴)	۲۰۱۳	آذربایجان شرقی	الایزا	۱۷۶	٪ ۴۱/۵
۱۸	شیروانی(۲۹)	۲۰۱۱	اصفهان	الایزا	۶۴۲	٪ ۴۹/۲
۱۹	حاجی کلایی(۳۵)	۸۵	اهواز	الایزا	۵۷۲	٪ ۲۸/۵
۲۰	سخایی(۳۶)	۲۰۰۹	استان کرمان	الایزا	۱۸۱	٪ ۷۷/۹

جدول۲- مطالعات انجام شده بر نقش ویروس BVD در از دست رفتن آبستنیِ گاو در ایران

	نویسنده	سال	منطقه	روش آزمایش	تعداد نمونه	درصد موارد مثبت
۱	رحیمی اندانی	۹۴	اصفهان	الایزا	۴۳ نمونه مغز جنین سقط شده یا مرده زا	٪ ۲۰/۱۲
۲	کاوه	۲۰۱۷	قزوین	پی سی آر	۱۲۸ نمونه از جنین سقطی	٪ ۲۰/۳۱
۳	خاکپور	۹۱	تبریز	الایزای تانک شیر	۲۰ نمونه از شیر مخزن گله های با سابقه سقط جنین	٪۴۵
۴	صدری	۹۳	شمال ایران	الایزا	۴۳ نمونه خون گاوهای با سابقه سقط جنین	٪ ۹/۳
۵	بدیعی	۹۰	تهران	پی سی آر	۲۵۱ نمونه از جنین های سقطی	٪ ۲۵/۲
۶	معیر	۹۰	تهران	هیستوپاتولوژی	۲۰۰ نمونه جنین سقطی	٪۳۸
۷	کامکار صالحی	۹۵	فارس	الایزا	۱۸۴ نمونه سرمی از گاوهای با سابقه سقط طی یک سال قبل	٪ ۶۴/۱
۸	نماوری	۲۰۱۲	فارس، خوزستان، کهکیلوئیه و بویراحمد	الایزا	۱۳۵نمونه از گاوهای با سابقه سقط در یک سال قبل	٪ ۵۱/۸۵
۹	صفرپور دهکردی	۲۰۱۱	تهران، اصفهان، کرمان، خراسان	الایزا و پی سی آر	۶۲۰ نمونه شیردان از جنین سقطی	۱۷/۹ ٪ در الایزا و ۲۰/۴۸ ٪ در پی سی آر
۱۰	پازوکی پلاشت	۸۷	تهران	الایزا	۵۰ نمونه سرمی از گاوهای سقط کرده	٪۳۲

راینوتراکئیت عفونی گاوان: عفونت هرپس ویروس ۱ گاوی در همه دنیا وجود دارد و با سقط جنین، التهاب واژن و فرج، التهاب غلاف تناسلی نر، بیماری تنفسی، التهاب ملتحمه و عفونت عمومی کشنده در گوساله ارتباط دارد. این ویروس پس از عفونت حاد ممکن است به صورت خفته درآید (۳۷). ورود عفونت در زمان تلقیح مصنوعی یا جفت‌گیری می‌تواند باعث ناباروری و مرگ رویانی شود در حالی که عفونی شدن گاو آبستنی که قبلاً مواجه نشده باشد یا واکیسنه نشده باشد می‌تواند سقط طوفانی را به دنبال داشته باشد که ۲۵-۶۰ درصد گاوها سقط کنند. سقط ناشی از هرپس ویروس ۱ گاوی در شرایط مزرعه معمولاً در نیمه دوم آبستنی دیده می‌شود. سقط جنین معمولاً ۳-۷ هفته پس از ورود عفونت به بدن مادر دیده می شود (۳۷). برای اولین بار جداسازی و شناسایی ویروس IBR در ایران توسط حضرتی (۳۸) در سال ۱۳۵۱از ترشحات بینی گاوهای آبستن وارداتی که مبتلا به بیماری تنفسی حاد بودند صورت گرفت، در حالی که همین محقق دو سال بعد ویروس IBR را در سه شیوع بیماری تنفسی شدید گاوهای وارداتی در استان‌های تهران و اصفهان جداسازی کرد (۳۸). مطالعات متعدد در دهه‌های بعدی که عمدتاً بررسی سرم شناسی بوده‌اند نشان دهنده شیوع سرمی بالای این ویروس در گله‌های گاو ایران بوده‌اند. جدول ۳ در بردارنده‌ی مطالعاتی است که شیوع IBR را در مناطق مختلف ایران بررسی کرده‌اند. همین طور جدول ۴ مطالعاتی که ارتباط عفونت ویروس IBR را با سقط جنین در ایران بررسی کرده‌اند نشان می‌دهد. در این بین چندین مطالعه سرواپیدمیولوژی IBR را در بین گاوهای با سابقه سقط جنین در استان‌های مختلف کشور بررسی کرده‌اند (۱۳، ۱۷، ۱۹، ۳۹). در تمام این بررسی‌ها شیوع سرمی IBR در بین گاوهای سقط کرده قابل توجه بوده است. یکی از این مطالعات به صورت همزمان شیوع سرمی IBR را در گروه شاهد که سابقه سقط جنین نداشته‌اند بررسی کرده است (۳۹) که نشان‌دهنده شیوع بالاتر IBR در گروه گاوهای سقط کرده به طور کاملاً معنی‌دار بوده است. این مقایسه به خوبی نقش عفونت IBR را در سقط جنین گاو در منطقه مورد مطالعه نشان می دهد.

جدول۳-مطالعات انجام شده بر میزان شیوع ویروس BHV-1 در مزارع پرورش گاو در ایران

نویسنده	سال	منطقه	روش	تعداد	نتایج
کارگر مؤخر(۴۱)	۲۰۰۱	مناطق مختلف ایران	آزمون خنثی سازی	۹۹۶۸	٪ ۳۳/۹۷
حضرتی(۳۸)	۱۹۷۵	تهران و اصفهان	جداسازی ویروس	نمونه ترشحات بینی و ملتحمه	ویروس IBR از سه شیوع بیماری تنفسی شدید جداسازی شد
صدری(۱۷)	۲۰۱۲	مناطق مختلف ایران	الایزا و خنثی سازی سرم	۵۵۸ نمونه سرمی	٪۵۶ الایزا و ٪۵۲ خنثی سازی سرم
شیروانی(۲۹)	۲۰۱۲	اصفهان	الایزا	۶۴۲ نمونه سرمی	٪۷۲
نیک بخت(۲۵)	۲۰۱۵	استان های مختلف	الایزا	۸۸۲	٪ ۳۱/۹
قائم مقامی(۱۰)	۲۰۱۳	اراک	الایزا	۸۰۳	٪ ۳۵/۶
قره خانی(۴۲)	۸۹	ارومیه و باکو	الایزا	۴۴۰ نمونه شیر	٪۲۳
سخایی(۳۶)	۲۰۰۹	کرمان	الایزا	۱۸۱ نمونه سرمی	٪ ۳۰/۳۹

جدول۴-مطالعات انجام شده بر نقش ویروس BHV-1 در از دست رفتن آبستنیِ گاو در ایران

نویسنده	سال	منطقه	روش	تعداد	نتایج
نماوری	۲۰۱۲	فارس، خوزستان، کهکیلویه وبویراحمد	الایزا	۱۳۵نمونه از گاوهای با سابقه سقط در یک سال قبل	٪ ۳۹/۲۶
کامکار صالحی	۹۵	فارس	الایزا	۱۸۴ نمونه سرمی از گاوهای با سابقه سقط طی یک سال قبل	٪ ۹۸/۲
معیر	۹۰	تهران	هیستوپاتولوژی	۲۰۰ نمونه جنین سقطی	٪۸ جنین ها علایم IBR داشتند
صدری	۹۳	شمال ایران	الایزا	۴۳ نمونه خون گاوهای با سابقه سقط جنین	٪ ۶۹/۸
کاوه	۲۰۱۷	قزوین	پی سی آر	۱۲۸ نمونه از جنین سقطی	٪ ۱۳/۲۸
هاشمی تبار	۸۸	مشهد	الایزا	۱۲۰ نمونه سرمی از گاوهای سقط کرده و ۳۰ نمونه از گاوهای سقط نکرده	٪۷۰ سقط کرده‌ها و ۱۶/۶ ٪ گاوهای بدون سابقه سقط تیتر IBR داشتند
پازوکی پلاشت	۸۷	تهران	الایزا	۵۰ نمونه سرمی از گاوهای سقط کرده	٪۹۰
ساسانی	۲۰۱۳	استان های مختلف ایران	پی سی آر	۲۳ نمونه جنین سقط شده	٪ ۱۰۰

تاکنون فقط سه مطالعه عفونت IBR را مستقیماً در جنین‌های سقط شده گاو در ایران دنبال کرده‌اند. معیر و همکاران (۱۶) در سال ۱۳۹۰، تعداد ۲۰۰ جنین سقط شده در گاوداری‌های اطراف تهران را از لحاظ علائم هیستوپاتولوژی بررسی کردند. در این مطالعه ۸ درصد جنین‌ها علائم هیستوپاتولوژی مربوط به عفونت IBR داشتند. در مطالعه مولکولی ساسانی و همکاران (۴۰)، از ۲۳ جنین سقط شده گاو که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بودند همگی (۱۰۰ درصد) آلوده به هرپس ویروس ۱ گاوی بودند. بررسی مولکولی کاوه و همکاران (۲) روی ۱۲۸ جنین سقط شده در گاوداری‌های استان قزوین آلودگی ۱۳/۲۸ درصد آنها به ویروس IBR را تأیید کرد.

بلوتانگ: ویروس بلوتانگ از جنس اوربی ویروس و با توزیع جهانی است. این ویروس توسط حشرات جنس کولی‌کوئیدس انتقال پیدا می کند (۳۷). این ویروس سویه‌های متعددی دارد که از بین آنها فقط سویه‌های معدودی می‌توانند عفونت جنینی ایجاد کنند. پیامد عفونت به ویروس بلوتانگ بسته به مرحله‌ای از آبستنی گاو دارد که عفونت وارد می‌شود. ویروس بلوتانگ تا قبل از روز ۷۰ می‌تواند باعث مرگ جنین و سپس جذب آن و یا سقط شود. از روز ۷۰ تا ۱۳۰ آبستنی عفونت با ویروس بلوتانگ سلول‌های عصبی جنین را هدف قرار می‌دهد و منجر به هیدرانسفالی در جنین می‌شود. از روز ۱۳۰ تا ۱۵۰ آبستنی عفونت به این ویروس پورنسفالی و هیدروسفالوس را در پی دارد و عفونت‌های پس از آن می‌تواند باعث انسفالیت بدون بدشکلی در مغز شود (۳۷). در ایران مطالعات متعددی شیوع عفونت بلوتانگ را در گله‌های گوسفند و بز بررسی کرده‌اند (۴۶-۴۳) اما مطالعات اندکی هستند که به شیوع ویروس بلوتانگ در جمعیت گاوی کشور پرداخته‌اند. جدول ۵ نتایج حاصل از این مطالعات را نشان می‌دهد. همان طور که نتایج حاصل از این مطالعات معدود در جدول ۵ نشان می‌دهد ویروس بلوتانگ در جمعیت گاوی ایران چندان شایع نیست. آخرین مطالعه‌ای که تعداد زیاد نمونه سرمی از گاوهای مناطق مختلف کشور را بررسی کرده است شیوع ۲۷/۶۳ درصد را گزارش کرده است که از نتایج همه‌ی مطالعات قبلی بالاتر بوده است (۴۷). نتایج تنها مطالعه‌ای که شیوع سرمی ویروس زبان آبی را در گاوهای با سابقه سقط در ایران بررسی کرده‌اند هیچ مورد مثبتی را در بر نداشته است.

جدول۵-مطالعات انجام شده بر میزان شیوع ویروس زبان آبی در مزارع پرورش گاو در ایران

نویسنده	سال	منطقه	روش	تعداد	نتایج
مظفری(۴۸)	۲۰۱۲	جنوب شرق ایران	الایزا	۱۸۸ نمونه سرمی	٪ ۲/۱۳
مناویان(۴۹)	۲۰۱۷	جنوب ایران	الایزا	۵۲۱ نمونه سرمی	٪ ۱۹/۷۷
مهاجر(۵۰)	۲۰۱۸	سمنان	الایزا	۱۸۴ نمونه سرمی	صفر
بخشش(۴۷)	۲۰۲۰	مناطق مختلف ایران	الایزا	۷۳۲۴ نمونه سرمی	٪ ۲۷/۶۳
رؤیا صدری(۱۷)	۹۳	شمال ایران	الایزا	۴۳ نمونه خون گاو با سابقه سقط	۰

نتیجه‌گیری

بر اساس اطلاعات به‌دست آمده از مطالعه حاضر، مطالعات متعددی حکایت از شیوع بالای عفونت‌های ویروسی عامل سقط جنین گاو شامل ویروس BVD و IBR در مزارع پرورش گاو ایران دارد. پژوهش‌های معدودی رد پای این ویروس‌ها را در موارد سقط جنین گاو دنبال کرده‌اند که عمدتاً نشان دهنده سهم قابل توجه آنها در وقوع سقط جنین گاو در ایران هستند. برنامه‌ریزی برای مدیریت و کنترل معضل سقط جنین در کشور نیاز به انجام تحقیقات بیشتر برای شناسایی نقش ویروس‌ها در وقوع آن دارد.

References

1- Rafati N, Mehrabani-Yeganeh H, Hanson TE. Risk factors for abortion in dairy cows from commercial Holstein dairy herds in the Tehran region. Prev Vet Med. 2010; 96(3-4): 170-8.

2- Kaveh A, Merat E, Samani S, Danandeh R, Soltannezhad S. Infectious causes of bovine abortion in Qazvin Province, Iran. Arch Razi Inst. 2017; 72(4): 225-30.

3- Gädicke P, Vidal R, Monti G. Economic effect of bovine abortion syndrome in commercial dairy herds in Southern Chile. Prev Vet Med. 2010; 97(1): 9-19.

4- Noakes DE, Parkinson TJ, England GC. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2018.

5- Hopper RM. Bovine reproduction: John Wiley & Sons; 2014.

6- Keshavarzi H, Sadeghi-Sefidmazgi A, Kristensen AR, Stygar AH. Abortion studies in Iranian dairy herds: I. Risk factors for abortion. Livest Sci. 2017; 195: 45-52.

7- Hossein-Zadeh NG, Nejati-Javaremi A, Miraei-Ashtiani S, Kohram H. An observational analysis of twin births, calf stillbirth, calf sex ratio, and abortion in Iranian Holsteins. Journal of Dairy Science. 2008; 91(11): 4198-205.

8- Behzadi Shahrbabak MJ. A review on infectious agents of sheep and goats abortion in Iran. NFVM. 2019; 1(2): 102-13.

9- Nekouie Jahromi OA BA, Omidvarian M, Najjar E, Shokri MR, Mirzaie K. A seroprevalence survey on Bovine Viral Diarrhea in a number of industrial dairy farms of Qazvin province. J Vet Res. 2011; 66(4): 319-23.

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

11- Mir Chamsy H, Shafyi A, Bahrami S. The occurrence of bovine virus diarrhoea/muscosal disease in Iran. Arch Razi Inst. 1970; 22(1): 197-201.

12. Hemmatzadeh F, Kojouri G, Kargar Moakhar R, Rohany M. A serological survey on bovine viral diarrhea virus infection in Chahar Mahal Bakhtiary province, Iran. Iran J Vet Med. 2001; 56(3): 85-92.

13- Pazouki plasht T. Ro, Mohammad Sadegh M., Ghomashchi H. Evaluation of infection rate of animals with a history of abortion with Brucella abortus pathogens, BVD bovine viral diarrhea, IBR herpesvirus type 1 and Neospra caninum. 15th Iran Veterinary Congress; Tehran2008.

14- Safarpoor Dehkordi F. Prevalence study of Bovine viral diarrhea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine,

Ovine, Caprine, Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran. AMB express. 2011; 1(1): 1-6.

15- 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 Clin Res. 2011; 2(2): 68-73.

16- Moayer F, Ataee O, Mosakhani F, Bahonar A. Pathological Findings in Aborted Fetuses of Dairy Herds of Tehran. J Vet Clin Res. 2011; 2(3): 155-66.

17- Sadri R, Fallahi R. Study on prevalence of causative aborted fetus agents in breeding herds In Iran. IJBIO. 2015; 28(2): 180-7.

18- Kamkar Salehi S, Namavari, M. Study of using the triple Dot-ELISA for simultaneous diagnosis of Neospora caninum, IBR and BVDV. VJ. 117(4): 134-40.

19- Namavari M, Hosseini M, Mansourian M, Shams Z, Amrabadi O, Tahamtan Y, et al. Testing for infective abortive agents in cattle in Iran. Onl J Vet Res. 2012; 16(3): 147-53.

20- Rahimi Andani M, Mahdavi A, Rahmani H, Dolatkhah B. Evaluation of some metabolic and pathophysiologic causes of abortion and stillbirth in an Isfahan dairy farm. Anim Sience Res. 2015; 25(1): 37-51.

21- Khakpour M, Ahmadi H, Monadi A, Mosaferi S. Prevalence of antibodies to BVD virus in milk tanks, dairy farms in Tabriz with history of abortions in 90-1389. JVCP. 2012; 6(1): 1471-6.

22- Abbasi J, Sadati D, Jamshidian A, Najimi M, Ghalyanchi Langeroudi A. Comparative prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus antibodies among native and imported cattle in north of Sistan and Baluchistan-Iran. Iran J Virol. 2016; 10(2): 48-52.

23- 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. IJAS. 2020; 51(2): 163-71.

24- Khodakaram-Tafti A, Mohammadi A, Kish GF. Molecular characterization and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea virus in dairy herds of Fars province, Iran. IJVR. 2016; 17(2): 89.

25- Nikbakht G, Tabatabaei S, Lotfollahzadeh S, Nayeri Fasaei B, Bahonar A, Khormali M. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus 1 and bovine leukaemia virus in Iranian cattle and associations among studied agents. J Appl Anim Res. 2015; 43(1): 22-5.

26- Bahonar A, Jahromi ON, Omidvarian MJ, Najjar E, Shokri MR, Mirzaie K. Bovine viral diarrhea in Qazvin Province (Iran): a seroprevalence study. J Vet Res. 2011; 66(4): 319-74.

27- Davasas 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. jvcp. 2011; 5(1): 1067-73.

28- Sedighi nejad S. A Survey on BVD-MD in Iran. Vet Res & Biol Prod. 1996; 9(1): 138-41.

29- 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.

30- Talebkhan Garoussi M, Haghparast A, Estajee H. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bulk tank milk of industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran. Prev Vet Med. 2008; 84(1-2): 171-6.

31- Talebkhan Garoussi M, 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.

32- Talebkhan Garosi M, Haghparast A, Rafati M. The prevalence of bovine viral diarrhea virus in persistently infected cows in industrial dairy herds in suburb of Mashhad-Iran. Int J Vet Sci. 2011; 5(4): 198-203.

33- 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.

34- Rezaeisaber A, Nikniaz H, Badie AD. Comparison of bovine viral diarrhea virus infection between Sarabian and Holstein dairy cows in relation to abortion. Ann Biol Res. 2013; 4(5): 88-91.

35- Haji Haji Koulaei M, Seyfiabad Shapouri M. Serological study of bovine viral diarrhoea virus infection of cattle in Ahwaz. 2007.

36- Sakhaei E, Khalili M, Kazeminia S. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran.

IJVR. 2009; 10(1): 49-53.

37- Njaa BL. Kirkbride's diagnosis of abortion and neonatal loss in animals: John Wiley & Sons; 2011.

38- Hazrati A, Amjadi A. The isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus in Iran. Arch Razi Inst. 1975; 27(1): 21-35.

39- Hashemi Tabar G RM, Naseri Z , Azizzadeh M. Detection of antibodies against glycoprotein E infectious bovine rhinotracheitis in the serum of aborted cows in Mashhad, Iran. 33th Congress of Microbial Ecology in Health and Disease; 2010.

40- Sasani F, Vazirian A, Javanbakht J, Hassan MA. Detection of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion by PCR and histopathology assays. Am J Clin Exp Med. 2013; 1(35): 10.11648.

41- Kargar Moakhar R, 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 Inst. 2001; -(52): 93-102.

42- Gharekhani A, Morshedi A. The study of infection rate to bovine herpes virus-1 (BHV-1) in milk samples of dairy cattle in Urmia and Maku by ELISA method. jvcp. 2010; 4(3): 915-21.

43- Khezri M, Azimi SM. Epidemiological investigation of bluetongue virus antibodies in sheep in Iran. Vet World. 2013; 6(3): 122.

44- Mozaffari AA, Khalili M. The first survey for antibody against bluetongue virus in sheep flocks in southeast of Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2012; 2(3): S1808-S10.

45- 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.

46- Shoorijeh SJ, Ramin A, Maclachlan NJ, Osburn B, Tamadon A, Behzadi M, et al. High seroprevalence of bluetongue virus infection in sheep flocks in West Azerbaijan, Iran. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 2010; 33(3): 243-7.

47- Bakhshesh M, Otarod V, Mehrabadi MHF. Large-scale seroprevalence and risk factors associated with Bluetongue virus in Iran. Prev Vet Med. 2020; 179: 104994.

48- Mozaffari AA, Khalili M, Yahyazadeh F. A serological investigation of bluetongue virus in cattle of south-east Iran. Vet ital. 2012; 48(1): 41-4.

49- Manavian M, Hashemi M, Nikoo D, Tavan F, Hosseini SMH, Bakhshesh M. Seroprevalence of bluetongue virus infection and associated risk factors in domestic ruminants in the south of Iran. THAI J VET MED. 2017; 47(2): 225.

50- Mohajer F, Sheikh Y, Staji H, Keyvanlou M, Hashemzadeh H. Evaluation of the Seroprevalence of AKABANE and Bluetongue viruses using competitive-ELISA in dairy cattle from industrial herds, Semnan suburb, Iran. Iran Vet J. 2019; 15(3): 78-84.

A review on viral agents of cattle abortion in Iran

Mohammad Javad Behzadi Shahrbabak

Assistant professor, Department of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol-Iran.

Receive: January 29, 2021; Revise: February 13, 2021; Accept: February 15, 2021

Summary

Pregnancy wastage is a serious economic problem in the reproductive management of dairy and beef farms. Various agents including genetic disorders, nutritional deficiencies, poisonings, physical injuries and infections cause pregnancy loss in cows. Infectious agents including bacteria, viruses, protozoa and fungi have a significant effect on pregnancy loss of cows. Diagnosis of infectious abortive agents in each region is necessary to control and prevent abortions on farms. The purpose of this study is to review all studies that have investigated viral agents of cattle pregnancy loss in Iran. Therefore, all Persian and English articles on the subject of cattle abortion with viral origin or any of the viruses causing abortion were searched in databases including Science Direct, Pub Med, Scopus, Google Scholar, Magiran and Iran Doc. All the studies found were placed in the tables for easier analysis. The data of present study indicate that although many studies show a high prevalence of viral infections causing pregnancy loss of cattle including BVD and IBR viruses, but studies that investigate their role in pregnancy loss of cattle in Iran are few. These few studies indicate that BVD and IBR viruses have a significant role in causing abortion in cattle in Iran. Only one study has examined the role of Blue tongue virus in bovine abortion in Iran, in which no trace of this virus has been found.

Key words: *Bovine viral abortion, BVD, IBR, Iran*

بررسی شیوع سرمی توکسوپلاسموز درکرمانشاه، یک مطالعه تفکیکی مقطعی

مهرداد پویانمهر*[۱]، عاطفه نیک قلب[۲]، مسعود دارابی[۳]

۱- استادیار ایمنی شناسی،گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، ایران.
۲- دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، ایران.
۳- دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ آبان ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۵ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

توکسوپلاسموز یک بیماری عفونی مشترک (زئونوز) باگسترش جهانی است. عامل آن *توکسوپلاسما* گوندی یک انگل تک سلولی داخل سلولی با توزیع جهانی است. تحقیق حاضر یک مطالعه تفکیکی مقطعی از شیوع توکسوپلاسموز و عوامل خطر مرتبط با آن با هدف بررسی اطلاعات بیشتر مربوط به عفونت *توکسوپلاسما* گوندی در کرمانشاه می‌باشد. در این مطالعه ۲۴۷۰ نمونه سرم از افراد مشکوک مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرجع طی بازه زمانی یک‌ساله (۹۹-۱۳۹۸) بر اساس سن و جنس جمع‌آوری و با استفاده از سنجش سرمی با روش ELISA آنتی‌بادی‌های IgG, IgM اختصاصی ضد *توکسوپلاسما* گوندی ارزیابی شد. تحلیل اطلاعات چند متغیره با استفاده از آزمون آماری مربع کای پیرسون و فیشر به‌وسیله نرم‌افزارSPSS ver.18 با سطوح معنی‌داری P کمتر از ۰/۰۵ انجام شد. شیوع کلی آنتی‌بادی ضد *توکسوپلاسما* گوندی در جمعیت مورد مطالعه ۲۵/۴ درصد بود (P<۰/۰۵). تفاوت قابل توجهی در میزان شیوع در فصول تابستان و زمستان ، با ۳۲/۱ درصد و ۱۷/۲ درصد بود (P<۰/۰۵)، تفاوت در شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما* گوندی بین گروه‌های زن و مرد وجود داشت (P<۰/۰۵ و df=۱). تفاوت معنی‌داری بین افراد در جمعیت روستایی و شهری دیده نشد (P = ۰/۰۰۵۴ و P = ۴/۷۳۵). در سایر ارتباطات ابتلا جمعیت درمتغیرهای دیگر (حرفه، شرایط جسمی، تحصیلی و غیره) به‌عنوان عوامل بالقوه مرتبط با عفونت، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P = ۰/۰۰۴). در جمعیت مورد مطالعه در میزان عفونت عمومی با *توکسوپلاسما* گوندی، ارتباط سن، جنسیت و فصل مشاهده شد، که احتمالاً به دلیل قرار گرفتن بیشتر در معرض منابع عفونی است.

واژگان کلیدی: *توکسوپلاسموز، توکسوپلاسما گوندی، شیوع سرمی، آنتی‌بادی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه:M.pooyanmehr@razi.ac.ir

مقدمه

توکسوپلاسماگوندی (Toxoplasma gondii)، عامل بیماری‌توکسوپلاسموز یک انگل پروتوزوایی با گسترش جهانی است که می‌تواند تقریباً تمام حیوانات خونگرم از جمله انسان را آلوده کند. توکسوپلاسموز در افراد با سیستم ایمنی سالم معمولاً بدون علامت است (۲۶). اگرچه در برخی افراد آلوده با عوارض جدی همراه است (۲۷، ۳۲). تخمین زده شده است که یک سوم جمعیت جهان به *توکسوپلاسما* گوندی آلوده شده‌اند (۱۹). توکسوپلاسموز یک بیماری عفونی مشترک (زئونوز) مهم است. میزان ابتلا با توجه به موقعیت جغرافیایی، تفاوت‌های فرهنگی و بهداشتی متفاوت می‌باشد (۵). راه اصلی آلوده شدن انسان به *توکسوپلاسما* گوندی، بلعیدن گوشت خام یا نیمه پخته شده حاوی کیست‌های بافتی *توکسوپلاسما* گوندی از میزبان‌های میانی است (۳۳).

اهمیت این انگل در امنیت غذا ، بهداشت انسان و دام به خوبی شناخته شده است. انگل توکسوپلاسما گوندی با خوردن مواد غذایی یا آب آلوده به اووسیست‌های ریخته شده توسط گربه‌ها، خوردن گوشت خام یا پخته نشده حاوی کیست بافت و با انتقال مادرزادی به انسان منتقل می‌شود (۳۶،۱۷).آلودگی معمولاً به‌دنبال بلع اووسیت‌های اسپوردار از خاک، آب و مواد غذایی و یا از طریق بلع برادی زوئیت‌های موجود در کیست‌های نسجی از طریق مصرف گوشت و فرآورده‌های گوشتی خام و یا کاملاً پخته نشده ایجاد می‌گردد (۷). عفونت توکسوپلاسما گوندی در افراد معمولاً بدون علامت است، اما سقط جنین، تولد نوزادان نارس یا عوارضی از قبیل هیدروسفالی، میکروسفالی، کم‌هوشی و ناتوانی ذهنی، ناهنجاری‌های شدید مادرزادی، نابینایی دیده می‌شود. توکسوپلاسماگوندی در کودکان مبتلا به عفونت مادرزادی همچنین در بیماران مبتلا به نقص ایمنی مانند ایدز، سرطان و بیماران پیوندی عوارض جدی ایجاد می‌کند (۳۹). کودکان و بزرگسالان همچنین می‌توانند به کوریومننژیت توکسوپلاسمی و حتی با بروز علائم روانی از قبیل اسکیزوفرنی مبتلا شوند که از تظاهرات شایع عفونت مادرزادی یا حاد است (۶، ۱۰).

اگرچه شیوع عفونت *توکسوپلاسما* گوندی در سراسر جهان و ایران گزارش شده است (۲۵، ۳۴)، اما در مورد شیوع عفونت *توکسوپلاسما* گوندی در استان کرمانشاه اطلاعات کمی در دست است (۸). لذا با توجه به خسارت اقتصادی ناشی از آلودگی گوشت دام‌ها با تک‌یاخته *توکسوپلاسما* گوندی، عدم کنترل علمی جمعیت حیوانات ولگرد (گربه‌ها)، افزایش استرس‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی در جوامع انسانی و فقدان اطلاعات کافی درخصوص این بیماری مشترک عفونی، این مطالعه تفکیکی مقطعی با هدف آگاهی از ارزیابی وضعیت میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد *توکسوپلاسما* گوندی و عوامل مرتبط با آن در میان افراد مشکوک مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع کرمانشاه طی سال‌های ۱۳۹۹ -۱۳۹۸ انجام شد.

مواد و روش‌ها

سرم ۲۴۷۰ نفر شامل۲۰۸۶ نفر زن (۸۴/۵ درصد) و ۳۸۴ نفر مرد (۱۵/۵ درصد) از افراد مشکوک به بیماری توکسوپلاسموز با علائم عمومی (تب، سردرد، تورم غده‌های لنفاوی، دردهای‌عضلانی، کوفتگی و ضعف عمومی) مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع شهرستان کرمانشاه طی بازه یک ساله (۱۳۹۹-۱۳۹۸) در دو گروه سنی کوچکسال (<۱۶) و بزرگسال (>۱۶) بررسی شد. آنتی‌بادی‌های IgG و IgM اختصاصی توکسوپلاسما در نمونه سرم افراد با استفاده از روش (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ELISA غیر

مستقیم مورد آزمایش قرار گرفتند.

به‌طور خلاصه اساس سنجش کیت شامل: صفحات میکروالایزا (Micro ELISA- USA) با ۵۰ میکرولیتر (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) در هر چاهک آنتی‌ژن *توکسوپلاسما* گوندی کوت شده (اتصال به سطح چاهک‌ها (Coating)) در ۴ درجه سانتی‌گراد بود. ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم رقیق شده ۱:۵۰ به‌صورت سه‌تایی (Triplicates) درچاهک‌ها اضافه شد. از آنتی‌ایمونوگلوبولین انسانی-بزی، قلیایی-فسفاتازی (Sigma, St.Louis, MO, 1:2000 dilution) و (۴-نیتروفنیل فسفات دی‌سدیم هگزاهیدرات) (Sigma,santlouis MO) برای تشخیص واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی استفاده شد. چاهک‌های کنترل با یک سرم منفی تأیید شده با آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم در نظر گرفته شد. جهت انجام آزمایش ۲ میلی‌لیتر خون افراد مشکوک اخذ و سرم جدا گردید. بر اساس واحد U/ml مقادیر تیتر مثبت آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما IgG به‌ترتیب مقادیر کمتر از ۸ منفی، مشکوک و بیشتر از ۱۱ مثبت در نظر گرفته شد. همچنین مقادیر کمتر از ۰/۸ و بیشتر از ۱/۱ آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما IgM نیز به‌ترتیب منفی و مثبت در نظر گرفته شد.

از خوانش‌گر الایزا (Bioteck- 93- 808) در ۴۰۵ نانومتر استفاده شد و نقطه برش مقادیر دانسیته‌ی نوری (cut-off point values of Optical Density, OD) نمونه مثبت حداقل دو برابر بیشتر از نمونه‌های منفی در هر نقطه رقت در نظر گرفته شد. تمام نمونه‌های مثبت و برخی از نمونه‌های منفی ELISA به‌وسیله آزمون آگلوتیناسیون مستقیم (Direct agglutination test; DAT) با استفاده از کیت تجاری (Toxo-Screen-Bio-Merieux, France) به‌عنوان شاهد آزمایش تأیید شدند (۱۳).

آنالیز داده ها: تفاوت در میزان عفونت در بین گروه‌های نمونه از نظر آماری بر اساس چگالی نوری در ۴۰۵ نانومتر (OD 405) نشان دهنده مقدار آنتی‌بادی خاص ضد توکسوپلاسما در سرم بود. با توجه به اطلاعات شرح حال، افراد در دو زیرگروه کوچکسال (کمتر از ۱۶سال) و بزرگسال (بیشتر از ۱۶سال) تقسیم شدند. تحلیل اطلاعات حاصل از سنجش سرمی ضد توکسوپلاسما در رابطه با فصل، جنسیت، سن و منطقه جغرافیایی جمعیت با استفاده از آزمون آماری Pearson, Chi-Square و ارزیابی سایر ارتباطات ابتلا در جمعیت با استفاده از تحلیل چند متغیره Fisher به‌وسیله نرم افزار *SPSS ver.18* با سطوح معنی‌داری *P* کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

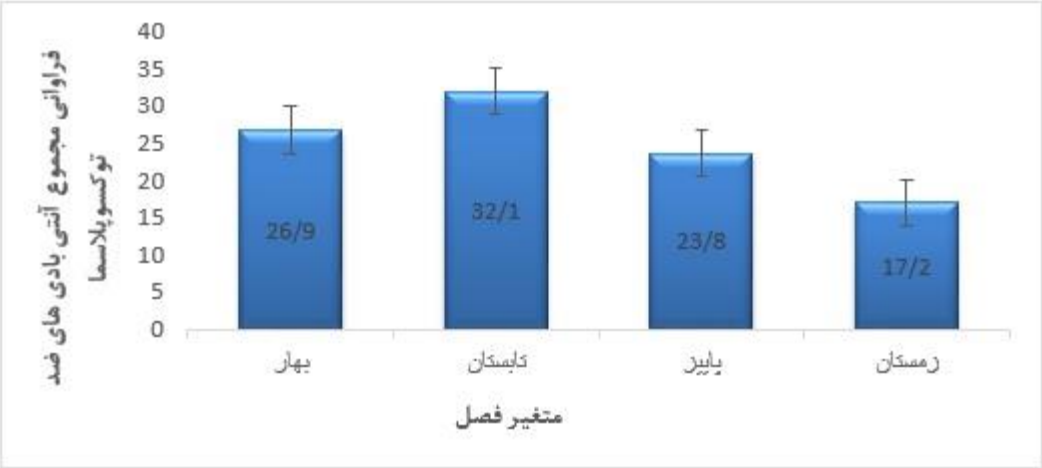
بر اساس نتایج بررسی در جمعیت مورد بررسی ۲۴۷۰ نفر شامل ۲۰۸۶ نفر زن (۸۴/۵ درصد) و ۳۸۴ نفر مرد (۱۵/۵ درصد)، در مجموع ۳۶۱ نفر (۲۵/۴ درصد) مثبت (۳۱۶ مورد زن ، ۴۵ مورد مرد) و ۲۱۰۹ نفر (۷۴/۶ درصد) فاقد آنتی‌بادی علیه تک‌یاخته *توکسوپلاسما گوندی* بودند. شیوع کلی آنتی‌بادی ضد IgG ، *توکسوپلاسما* گوندی در جمعیت مورد مطالعه ۲۵/۴ درصد بود (P<۰/۰۵). تفاوت قابل توجهی در میزان شیوع بین زنان و مردان به‌ترتیب در فصول تابستان و زمستان ، با ۳۲/۱ درصد و ۱۷/۲ درصد بود (P<۰/۰۵)، (شکل۱). شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما* گوندی در دو گروه سنی جمعیت مردان کوچکسال (<۱۶) و بزرگسال (> ۱۶) به‌ترتیب برای IgM ، ۰/۱ و ۰/۲ درصد و برای IgG، ۰/۰۸ و ۱/۵ درصد بود (شکل۲).

همچنین آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما* گوندی در دو گروه سنی جمعیت زنان کوچکسال (<۱۶) و بزرگسال (> ۱۶) به ترتیب برای IgM ، ۰/۰۸ و ۱ درصد و برای IgG، ۱ و ۱۱/۴ درصد بود

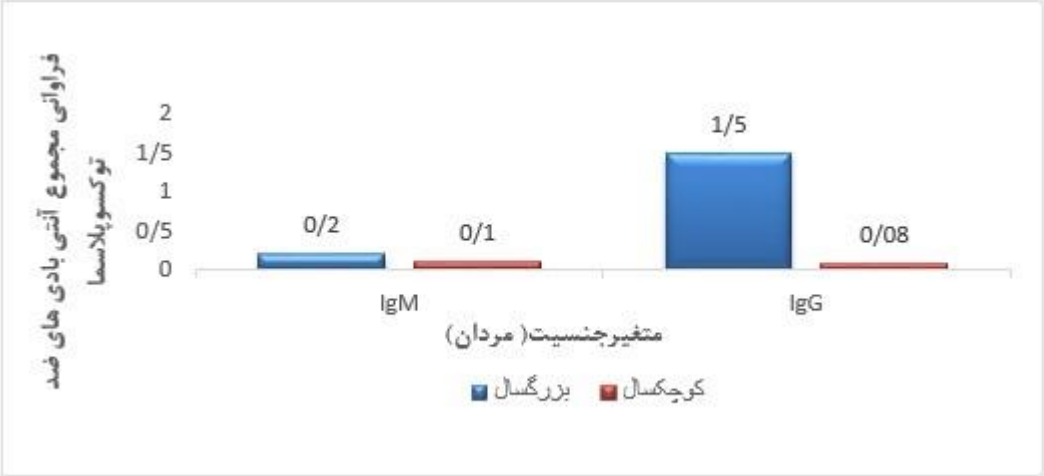
(شکل ۳). یک مشاهده قابل توجه تفاوت در شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما* گوندی بین گروه‌های زن و مرد بود. با مقایسه فراوانی سرم مثبت بودن IgM افراد بین زنان و مردان ارتباط معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵ و df=۱). همچنین در فراوانی مثبت بودن IgG افراد بین زنان و مردان ارتباط معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵ و df=۱). بر این اساس در مردان به‌ترتیب برای IgM ، ۰/۳ درصد و IgG، ۱/۵۸ درصد بود و در زنان به‌ترتیب برای IgM، ۱/۰۸ درصد و IgG، ۱۱/۸ درصد بود (شکل ۴).

نتایج آزمون آماری تفاوت معنی‌داری را بین افراد IgM مثبت و IgG مثبت در جمعیت روستایی و شهری نشان نداد (P = ۰/۰۰۵۴ و P = ۴/۷۳۵). براین اساس شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما* گوندی بین زنان و مردان در جمعیت روستایی و شهری به‌ترتیب برای IgM، ۵۲/۹۴ درصد و ۴۷/۰۶ درصد و IgG، ۵۶/۵۷ درصد و ۴۲/۴۳ درصد بود (جدول ۱).

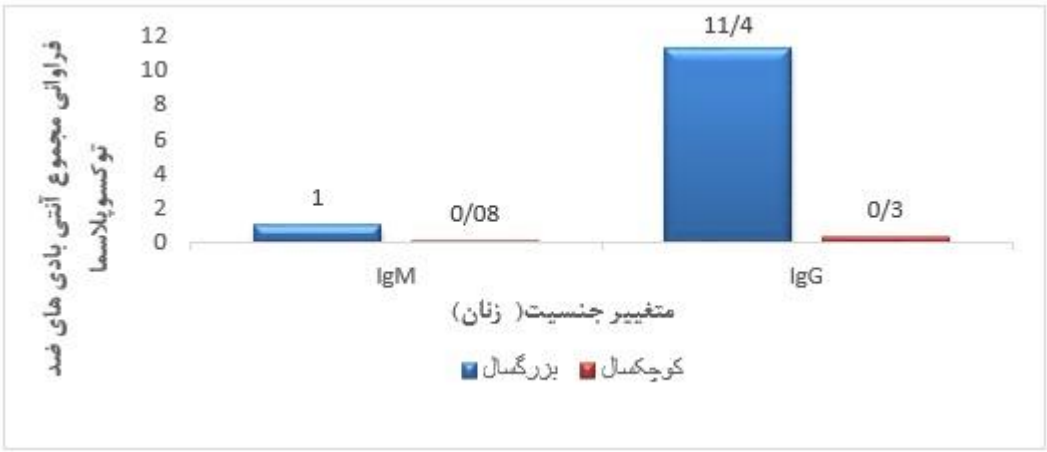
در تجزیه و تحلیل سایر ارتباطات ابتلا در جمعیت با استفاده از تحلیل چند متغیره Fisher در متغیرهای دیگر (با توجه به شرح حال شامل شرایط جسمی، تحصیلات و غیره) به‌عنوان عوامل بالقوه مرتبط با عفونت *توکسوپلاسما* گوندی با توجه به مقادیر میانگین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. گرچه سطح سرمی آنتی‌بادی در افراد بی‌سواد یا کم‌سواد نسبت به افراد با تحصیلات دانشگاهی و کارمند بیشتر بود (P = ۰/۰۰۴) (نتایج نشان داده نشده). همچنین هیچ اختلافی بین روش‌های سنجش الایزا و آگلوتیناسیون مستقیم مشاهده نشد (داده ها نشان داده نشدند).



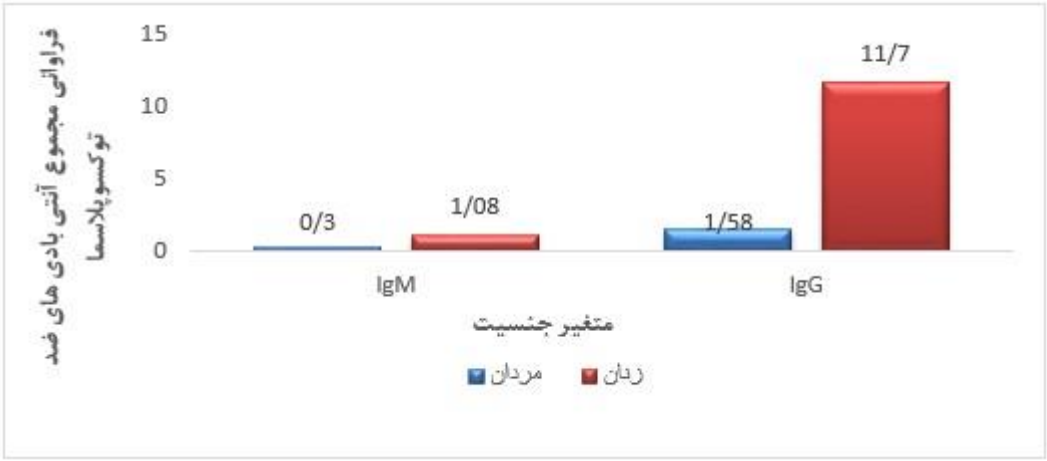
شکل ۱- فراوانی شیوع سرمی آنتی بادی ضد توکسوپلاسما (OD450nm) بر حسب متغیر فصل



شکل ۲- درصد فراوانی آنتی‌بادی‌های IgM و IgG ضد توکسوپلاسما (OD450nm) بر حسب متغیر جنسیت و سن (مردان)



شکل ۳- درصد فراوانی آنتی‌بادی‌های IgM و IgG ضد توکسوپلاسما (OD450nm) بر حسب متغیر جنسیت و سن (زنان)



شکل ۴- درصد فراوانی آنتی‌بادی‌های IgM و IgG ضد توکسوپلاسما (OD450nm) بر حسب متغیر در هر دو جنس

جدول۱- فراوانی مطلق و نسبی شیوع سرمی آنتی بادی ضد توکسوپلاسما(OD450nm) در مناطق شهری و روستایی

جمعیت	تعداد	درصد	IgM		IgG	
			تعداد	درصد	تعداد	درصد
روستایی	۱۲۵۹	۵۰/۹۷	۱۸	۵۲/۹۴	۱۸۵	۵۶/۵۷
شهری	۱۲۱۱	۴۹/۰۳	۱۶	۴۷/۰۶	۱۴۲	۴۳/۴۳
جمع کل	۲۴۷۰	۱۰۰	۳۴	۱۰۰	۳۲۷	۱۰۰

بحث

شیوع سرمی عفونت *توکسوپلاسما* گوندی در انسان و حیوانات یک شاخص بومی بودن انگل است (۳۷). درگیری و آلودگی با این تک‌یاخته با توجه به موقعیت جغرافیایی، تفاوت سطوح و اطلاعات بهداشتی متفاوت می‌باشد (۲۰، ۳۱). در مطالعه حاضر براساس شاخص‌های تفکیکی ۲۴۷۰ نفر از جمعیت شهری و روستایی بر اساس جنسیت و سن در چهار فصل بررسی شد. در جمعیت مورد بررسی در مجموع۲۵/۴ درصد سرم مثبت و ۷۴/۶ درصد سرم منفی بودند. افزایش تیتر IgG یا مقادیر بیش از ۱:۱۰۰۰ توام با افزایش فزاینده تیتر آنتی‌بادی IgM نشان دهنده عفونت توکسوپلاسموز فعال یا حاد می‌باشد. آنتی‌بادی IgM ضد توکسوپلاسما حدود ۱ هفته پس از ورود انگل به بدن میزبان افزایش می‌یابد و ظرف ۱۴روز تا ۱ ماه به حداکثر میزان خود و سپس به سطح غیر قابل سنجشی می‌رسد. اما عدم تشخیص آنتی‌بادیIgM دلیلی بر عدم وجود بیماری توکسوپلاسموز نمی‌باشد. از طرفی آنتی‌بادی IgG ضد توکسوپلاسما علاوه بر این که نشان‌دهنده عفونت گذشته و یا وجود ایمنی در برابر انتقال عفونت حاد است، طی ۲ هفته پس از آلودگی تا ۳-۲ ماه به اوج و سپس کاهش می‌یابد (۲۲). افراد دارای تیتر سرم مثبت از فاکتور IgM در مردان به ترتیب با ۰/۳ درصد و در زنان با ۱/۰۸ درصد تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین تیتر بالای IgG احتمالاً نشانه عفونت حاد طی ۱۲-۳ ماه قبل از آزمایش می‌باشد و تیتر پایین قابل ملاحظه IgG نشانه آلودگی به انگل در گذشته است که موردی در این میان ثبت نشده بود. افراد دارای تیتر سرم مثبت از فاکتور IgG در مردان به‌ترتیب با ۱/۵۸ درصد و در زنان ۱۱/۸ درصد تفاوت معنی‌داری داشت.

نتایج این مطالعه نشان داد تعداد قابل توجهی از سنجش سرمی فاکتور توکسوپلاسموز در میان زنان بیشتر از ۱۶ سال با ۱۲/۴ درصد بود و کمترین با ۰/۳۸ درصد دختران زیر ۱۶ سال بود. این تعداد از زنان بزرگسال در میان کل افراد ارجاعی نشان از اهمیت ویژه و قابل تأمل این گروه می‌باشد، زیرا تعداد کثیری از آنها با احتمال سن باروری در معرض خطر توکسوپلاسموزیس و انتقال انگل از طریق جفت به جنین می‌باشند. عفونت در دوران بارداری تهدیدی برای زندگی جنین و نوزادان است. در یک مطالعه سرمی از زنان باردار چینی، مشخص شد که مراقبت از حیوانات خانگی و مصرف گوشت خام یا نیم پز دو عامل اصلی خطر در ارتباط با عفونت های *توکسوپلاسما* گوندی است و شیوع افراد سرم مثبت بیشتر از نوع آنتی‌بادی IgG و درصد کمتری دارای تیتر مثبت IgM بودند (۱۵). بر این اساس شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما* گوندی به ترتیب در دو گروه سنی جمعیت کوچکسال و بزرگسال مردان و زنان برای IgM با ۱/۰۸-۱/۲ درصد و برای IgG با ۱/۰۸ – ۱۲/۹ درصد تفاوت معنی‌داری داشت. تفاوت قابل توجه در میزان شیوع بین زنان و مردان به‌ترتیب در فصول

تابستان و زمستان ، با ۳۲/۱ و ۱۷/۲ درصد بود. گرچه تفاوت معنی‌داری بین افراد سرم مثبت و سرم منفی در جمعیت روستایی و شهری و متغیرهای دیگر (شامل حرفه، شرایط جسمی و غیره) به‌عنوان عوامل بالقوه مرتبط با عفونت *توکسوپلاسما* گوندی دیده نشد.

میزان کلی عفونت *توکسوپلاسما* گوندی در جمعیت مورد بررسی با مجموع ۲۵/۴ درصد به‌طور کلی کمتر از سایر مناطق کشور بود (۳، ۲۱). بر اساس تحقیقات قبلی شیوع توکسوپلاسما در نقاط مختلف ایران متفاوت می‌باشد. در مطالعه ابراهیم‌زاده و همکاران (زنجان ۱۳۹۱) از ۲۰۰ نمونه خون ۳۶/۵ درصد دارای عیار مثبت IgG و ۷ درصد دارای عیار مثبت IgM علیه توکسوپلاسما بود (۱۱). در مطالعات فلاحت‌پور (غرب ۱۳۹۵) و ارشدی (آذربایجان شرقی ۱۳۹۸) شیوع تیتر سرمی مثبت علیه توکسوپلاسما گوندی به‌ترتیب ۵۰ و ۴۸ درصد برآورد شده است (۴، ۱۲). همچنین در مطالعه رسولی و همکاران (آذربایجان غربی ۱۳۹۴) و داوودی (میانه ۱۳۹۳) میزان شیوع آنتی‌بادی IgG، به‌ترتیب ۳۴/۹ و ۳۲/۸ درصد و برای IgM ۲/۹ و ۳/۷ درصد بود (۹، ۲۹). بر اساس مطالعه متین و همکاران (اردبیل ۱۳۹۵-۱۳۹۳) ۵۳/۵ درصد از زنان (۴ درصد IgM، درصد ۴۳ IgG و ۶/۵ درصد IgM و IgG) از نظر آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما مثبت بودند (۲۳). در مطالعه حاج سلیمانی و همکاران (زنجان ۱۳۹۱) به‌ترتیب تیتر مثبت برای آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما IgM و IgG ۱/۴ درصد و ۳۷/۲ درصد بود. افراد مثبت در افراد < ۳۰ سال بیشتر در مقایسه با زنان جوان (<۲۰ سال) بیشتر مشاهده شد و بین شیوع عفونت *توکسوپلاسما* گوندی و سطح تحصیلات، محل سکونت، سابقه سقط جنین و سن حاملگی رابطه معنی‌داری مشاهده نشد (۱۶). در بررسی رستی (کاشان ۱۳۹۴) میزان عفونت حاد توکسوپلاسما در زنان باردار ۴۲/۷ درصد گزارش شد (۳۰).

همچنین احمدپور و همکاران (۱۳۹۳) شیوع آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما را در بیماران دارای نقص ایمنی ۵۰ درصد گزارش نمودند (۲). عبدی و همکاران نیز شیوع سرمی توکسوپلاسموز در ایلام را ۴۴/۶۶ درصد اعلام کردند (۱). در مطالعه شریفی و همکاران (مازندران ۱۳۹۱) شیوع کلی آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما IgG ۵۵/۵ درصد و IgM ۱۴/۴ درصد با بیشترین میزان (۶/۹ درصد) در افراد بالای ۵۰ سال و کمترین میزان (۴/۹ درصد) در کودکان ۹-۰ ساله بدون اختلاف معنی‌داری شیوع برای جنسیت گزارش شد (۳۴). در این مطالعه نیز همانند نتایج بسیاری از مطالعات‌کشوری رابطه آماری معنی‌داری بین افزایش سن، جنسیت (زنان بیشتر از مردان) و شیوع آنتی‌بادی IgM و IgG مشاهده شد. زیرا با افزایش سن، در طی زمان با یکی از روش‌های اکتسابی احتمالی آلودگی به انگل افزایش می‌یابد. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات دریانی در استان‌های ایران مطابقت دارد (۸).

در مطالعات دیگر بیشترین سطح سرمی آنتی‌بادی‌های ضد توکسوبلاسما در افراد بی‌سواد یا کم‌سواد و کمترین سطح سرمی در افراد با تحصیلات دانشگاهی و کارمند گزارش شده است (۱۴، ۲۸). در این مطالعه با توجه به شرح حال بدون تفاوت معنی‌دار آماری بیشترین سطح سرمی آنتی‌بادی‌ها در افراد بی‌سواد یا کم‌سواد و عموماً کارگر و خانه‌دار بود و کمترین سطح سرمی در افراد با تحصیلات‌دانشگاهی و کارمند مشاهده گردید. بر اساس زندگی شهری و روستایی اختلاف معنی‌داری در میزان عفونت بین افراد وجود نداشت. بررسی نتایج تحقیقات در نقاط مختلف ایران، شیوع متفاوتی از توکسوپلاسموزیس را نشان می‌دهد که

می‌تواند به علت تفاوت در آب و هوا، عادات غذایی، بهداشت فردی و محیطی، همچنین جامعه آماری و روش سرولوژی تشخیصی باشد (۲۲، ۲۴، ۳۵).

یکی از فاکتورهای مهم انتقال ارگانیسم، مصرف گوشت خام یا نیم‌پز است. هر چند با توجه به فرهنگ قومی منطقه نگهداری گربه معمول نیست، اما به‌دلیل تردد زیاد گربه‌های ولگرد مبتلا در اطراف منازل و مزارع و دفع اووسیست‌های مقاوم، احتمال آلودگی گسترده محیط و انتقال آلودگی به مواد غذایی به‌ویژه سبزیجات دور از انتظار نیست. بنابراین طبخ کامل گوشت، دوری از آلودگی مدفوع گربه‌های خانگی و ولگرد اقدامات مهمی در پیشگیری از بیماری است (۱۸).

نتیجه‌گیری

در جمعیت مورد مطالعه تیتر آنتی‌بادی ضد *توکسوپلاسما گوندی* در زنان بالاتر از مردان بود که به‌طور قابل توجهی برای بهداشت عمومی مهم است. پخت و پز یکی از عوامل احتمالی در معرض قرار گرفتن بیشتر زنان نسبت به مردان در برابر گوشت خام می‌باشد. تفاوت معنی‌داری بین جمعیت روستایی و شهری دیده نشد، اما بیشترین سطح سرمی مثبت آنتی‌بادی ضد *توکسوپلاسما* در افراد بی‌سواد یا کم‌سواد و عموماً کارگر و خانه دار بود و کمترین سطح سرمی نیز در افراد با تحصیلات دانشگاهی و کارمند مشاهده گردید. جهت پیشگیری از عوارض *توکسوپلاسموز* مادرزادی پایش بیش از پیش زنان باردار توسط مراکز بهداشت از اهمیت زیادی برخوردار است. همچنین به دلیل عدم واکسیناسیون برای جلوگیری از این عفونت، ارائه آگاهی و اطلاعات مناسب در برنامه‌های بهداشت عمومی به‌ویژه برای گروه‌های پرخطر (زنان) در رعایت اصول بهداشتی در موارد تماس با گوشت خام و نیم‌پز، خاک و گربه، انجماد گوشت در دمای ۱۳درجه سانتی‌گراد و پخت درحرارت بالای ۶۷ درجه سانتی‌گراد در پیشگیری از بیماری مهم است.

سپاسگزاری

بخشی از داده‌های این مطالعه مربوط به پروژه کارشناسی علوم آزمایشگاهی گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی با شماره ۵۱۷ بود. نویسندگان از همکاران محترم کارشناس آزمایشگاه مرجع کمال سپاسگزاری را دارند.

References

1- Abdi, J., Shojaee, S., Mirzaee, A., Keshavarz, H. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Ilam province, Iran. Iranian *Journal of Parasitology*, 2008; 3(2): 34-37 [In Persian].

2- Ahmadpour, E., Daryani, A., Sharif, M., Sarvi, S., Aarabi, M., Mizani, A., Rahimi, M.T. Shokri, A., Toxoplasmosis in immunocompromised patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2014; 8(12): 1503-1510 [In Persian].

3- Anvari, D., Saadati, D., Nabavi, R., Eskandani, M.A. Epidemiology and molecular prevalence of toxoplasma gondii in cattle slaughtered in Zahedan and Zabol Districts, South East of Iran. *Iranian j of parasitology*, 2018; 13(1): 13, 114 [In Persian].

4- Arshadi, M., Akhlaghi, L., Meamar, A.R., Alizadeh Ghavidel, L., Nasiri, K., Mahami-Oskouei, M., Mousavi, F., Rampisheh, Z., Khanmohammadi, M., Razmjou, E. Sero-molecular detection, multi-locus genotyping, and clinical manifestations of ocular toxoplasmosis in patients in northwest Iran. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2019; 113(4): 195-202 [In Persian].

5- Blumenschein, T.M., Friedrich, N., Childs, R.A., Saouros, S., Carpenter, E.P. Atomic resolution insight into host cell recognition by Toxoplasma gondii. *The EMBO journal*, 2007; 26(11): 2808-2820.

6- Brézin, A.P., Thulliez, P., Cisneros, B., Mets, M.B., Saron, M.-F. Lymphocytic choriomeningitis virus chorioretinitis mimicking ocular toxoplasmosis in two otherwise normal children. *American journal of ophthalmology*,.2000; 130(2): 245-247.

7- Dalimi, A., Abdoli, A. Latent toxoplasmosis and human. Iranian journal of parasitology, 2012; 7(1): 1–17 [In Persian].

8- Daryani, A., Sarvi, S., Aarabi, M., Mizani, A., Ahmadpour, E., Shokri, A., Rahimi, M. T., Sharif, M. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in the Iranian general population: a systematic review and meta-analysis. *Acta tropica*, 2014; 137; 185-194 [In Persian].

9- Davoodi, J., Sadagiyan, M., Bahman Shabestari, A., Rasouli, S., Khodadadi, A., Jafary, K. Survey on serologic prevalence of human toxoplasmosis in males and females referred to centeral Medical Laboratory in the Mianeh city by Elisa method. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, 2012; 6(21): 1435-1445 [In Persian].

10- Dickerson, F., Boronow, J., Stallings, C., Origoni, A., Yolken, R. Toxoplasma gondii in individuals with schizophrenia: association with clinical and demographic factors and with mortality. *Schizophrenia bulletin*, 2007; .33(3): 737-740.

11- Ebrahimzadeh, A., Mohammadi, S., Davoodi, T., Salimi Khorashad, A., Jamshidi, A. Seroepidemiology of toxoplasmosis among pregnant women referring to the reference laboratory of Zahedan, Iran (2011). *Medical Laboratory Journal*, 2013; 7: 61-68 [In Persian].

12- Fatollahpour, A., Karbassi, G., Roshani, D., Ramezany, P., Mohammadbeigi, R. Sero epidemiological study of TORCH infection in women of Childbearing age in West of Iran. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2016; 7 (6): 1460-1465 [In Persian].

13- Gharavi, M., Jalali, S., Khademvatan, S., Heydari, S. Detection of IgM and IgG anti-Toxoplasma antibodies in renal transplant recipients using ELFA, ELISA and ISAGA methods: comparison of pre-and post-transplantation status. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2011; 105(5): 367-371 [In Persian].

14- Gollub, E.L., Leroy, V., Gilbert, R., Chêne, G., Wallon, M., Group, E.T.S., Effectiveness of health education on Toxoplasma-related knowledge, behaviour, and risk of seroconversion in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2008; 136(2): 137-145.

15- Gyang, V.P., Akinwale, O.P., Lee, Y. L ,. Chuang, T. W., Orok, A., Ajibaye, O., Liao, C. W., Cheng, P. C., Chou, C. M., Huang, Y. C., Toxoplasma gondii infection: seroprevalence and associated risk factors among primary schoolchildren in Lagos City, Southern Nigeria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2015; 48: 56-63.

16- Hajsoleimani, F., Ataeian, A., Nourian, A., Mazloomzadeh, S. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in pregnant women and bioassay of IgM positive cases in Zanjan, Northwest of Iran. *Iranian journal of parasitology*, 2012; 7(2): 82. [In Persian].

17- Jeannel, D., Niel, G., Costaglioal, D., Danis, M., Traore, B.M., Gentilini, M. Epidemiology of toxoplasmosis among pregnant women in the Paris area. *International Journal of Epidemiology*, 1988; 17(3): 595-602.

18- Jones, J.L., Ogunmodede, F., Scheftel, J., Kirkland, E., Lopez, A., Schulkin, J., Lynfield, R. Toxoplasmosis-related knowledge and practices among pregnant women in the United States. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2003; 11: 139-145.

19- Kano, S.-i., Hodgkinson, C.A., Jones-Brando, L., Eastwood, S., Ishizuka, K., Niwa, M., Choi, E.Y., Chang, D.J., Chen, Y., Velivela, S.D. Host–parasite interaction associated with major mental illness. *Molecular psychiatry*, 2020; 25: 194-205.

20- Khademi, S.Z., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., Davoodian, P., Abdoli, A. Prevalence and risk factors of toxoplasma gondii infection among pregnant women in Hormozgan Province, south of Iran. *Iranian journal of parasitology*, 2019; 14(1): 167 [In Persian].

21- Khademvatan, S., Foroutan, M., Hazrati-Tappeh, K., Dalvand, S., Khalkhali, H., Masoumifard, S., Hedayati-Rad, F. Toxoplasmosis in rodents: a systematic review and meta-analysis in Iran. *Journal of infection and public health*, 2017; 10(5): 487-493 [In Persian].

22- Lau, Y.L., Meganathan, P., Sonaimuthu, P., Thiruvengadam, G., Nissapatorn, V. ,Chen, Y. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. *Journal of clinical microbiology*, 2010; 48(10): 3698-3702.

23 Matin, S., Shahbazi, G., Namin, S.T., Moradpour, R., Feizi, F., Piri-Dogahe, H Comparison of placenta PCR and maternal serology of aborted women for detection of Toxoplasma gondii in Ardabil, Iran. *The Korean journal of parasitology*,2016; 55(6): 607 [In Persian].

24- Mizani, A., Alipour, A., Sharif, M., Sarvi, S., Amouei, A., Shokri, A., Rahimi, M.-T., Hosseini, S.A., Daryani, A. Toxoplasmosis seroprevalence in Iranian women and risk factors of the disease: a systematic review and meta-analysis. *Tropical medicine and health*, 2017; 45(7): 1-13 [In Persian].

25- Montazeri, M., Galeh, T.M., Moosazadeh, M., Sarvi, S., Dodangeh, S., Javidnia, J., Sharif, M., Daryani, A. The global serological prevalence of Toxoplasma gondii in felids during the last five decades (1967–2017): a systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors*, 2020; 13(82): 1-10 [In Persian].

26- Mustafa, M., Fathy, F., Mirghani, A.,

Mohamed, M.A., Muneer, M.S., Ahmed, A.E., Ali, M.S., Omer, R.A., Siddig, E.E., Mohamed, N.S. Prevalence and risk factors profile of seropositive Toxoplasmosis gondii infection among apparently immunocompetent Sudanese women. *BMC research notes*, 2019; 12(27):, 1-6.

27- Paquet, C., Yudin, M.H., Allen, V.M., Bouchard, C., Boucher, M., Caddy, S., Castillo, E., Money, D.M., Murphy, K.E., Ogilvie, G. Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*, 2013; 35(1): 78-79.

28- Pawlowski, Z.S., Gromadecka-Sutkiewicz, M., Skommer, J., Paul, M., Rokossowski, H., Suchocka, E., Schantz, P. Impact of health education on knowledge and prevention behavior for congenital toxoplasmosis: the experience in Poznań, Poland. *Health Education Research*, 2001; 16(4): 493-502.

29- Rasouli, S., Sadaghian, M., Jafari, R. Prevalence of human toxoplasmosis and related risk factors using Electrochemiluminescence (ECLIA) method in West Azarbaijan Province, Iran, 2010. *Int J Biosci*, 2014; 4(8): 124-130 [In Persian].

30- Rasti, S., Hooshyar, H., Arbabi, M., Fatahian, A., Behrashi, M., Talebian, A., Bandehpour, M., Gholamabbas Mousavi, S. Frequency of Toxoplasma infection among pregnant women and their newborn in Kashan, Iran. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 2015; 17(6): 114-119 [In Persian].

31- Rostami, A., Riahi, S.M., Contopoulos-Ioannidis, D.G., Gamble, H.R., Fakhri, Y., Shiadeh, M.N., Foroutan, M., Behniafar, H., Taghipour ,A., Maldonado, Y.A. Acute Toxoplasma infection in pregnant women worldwide: a systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases, e0007807*. 2019; 13(10): 1-9 [In Persian].

32- Saad, M.Y., Temsah, K.A., Abdel Daym, M., Soliman, W., Abu Albas, M. Immunoblot assay for toxoplasmosis in schizophrenic patients. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2016; 3(12): 685-689.

33- Salman, D., Pumidonming, W., Oohashi, E., Igarashi, M. Prevalence of Toxoplasma gondii and other intestinal parasites in cats in Tokachi sub-prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2018; 80(6): 960-967.

34- Sharif, M., Daryani, A., Ebrahimnejad, Z., Gholami, S., Ahmadpour, E., Borhani, S., Lamsechi, N. Seroprevalence of anti-Toxoplasma IgG and IgM among individuals who were referred to medical laboratories in Mazandaran province, northern Iran. *Journal of infection and public health*, 2016; 9(1): 75-80 [In Persian].

35- Sharif, M., Sarvi, S., Shokri, A., Teshnizi, S.H., Rahimi, M., Mizani, A., Ahmadpour, E., Daryani, A. Toxoplasma gondii infection among sheep and goats in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology research*, 2015; 114(8): 1-16 [In Persian].

36- Singh, S. Congenital toxoplasmosis: Clinical features, outcomes, treatment, and prevention. *Tropical parasitology*, 2016; 6(2): 113-122.

37- Tonouhewa, A.B.N ,.Akpo, Y., Sherasiya, A., Sessou, P., Adinci, J.M., Aplogan, G.L., Youssao, I., Assogba, M.N., Farougou, S. A serological survey of Toxoplasma gondii infection in sheep and goat from Benin, West-Africa. *Journal of parasitic diseases*, 2019; 43(12): 343-349.

38- Yad, M.J.Y., Jomehzadeh, N., Sameri, M.J., Noorshahi, N. Seroprevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies among pregnant woman in South Khuzestan, Iran. *Jundishapur journal of microbiology, e9998*, 2014; 7(5): 1-4.

39- Zhou, N., Zhang, X., Li, Y., Wang, L., Wang, L., Cong ,W. Seroprevalence and risk factors of Toxoplasma gondii infection in oral cancer patients in China: a case control prospective study. Epidemiology & Infection, 2018; 146(15): 1891-1895.

Seroprevalence of toxoplasmosis in Kermanshah, A cross-sectional study

Mehrdad Pooyanmehr*[1], Atefeh Nik Ghalb[2], Masoud Darabi[3]

1- Assistant Professor of Immunology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Iran.
2- graduate student in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Iran.
3- Undergraduate student of Laboratory Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Iran.

Receive: October 31, 2020; Revise: February 13, 2021; Accept: February 23, 2021

Summary

Toxoplasmosis is a common infectious disease (zoonosis) with worldwide spread. It is caused by *Toxoplasma gondii*, an intracellular protozoan with global distribution. The present study was a cross-sectional study of the prevalence of Toxoplasmosis and its associated risk factors with the aim of investigating more information related to *T. gondii* infection in Kermanshah. In this study, 2470 serum samples were collected from suspects referred to the reference laboratory during a period of one year (2019-2020) and evaluated in terms of anti *T. gondii*, IgG IgM antibodies by using ELISA&DAT method. Multivariate data analysis was performed using Chi-Square Pearson and Fisher statistical tests by SPSS ver.18 software with significant P levels less than 0.05. The overall prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in the study population was 25.4% (P <0.05). There was a significant difference in prevalence in summer and winter with 32.1% and 17.2% (P <0.05). Also, there was a difference in the serum prevalence of *T. gondii* antibodies between male and female groups (P <0.05 and df = 1), but there was no significant difference between individuals in rural and urban population (P = 0.0054 and P = 4.735). In other population-related relationships, no significant difference was observed in other variables (occupation, physical condition, education, etc.) as potential factors associated with infection (P = 0.004). In the study population, the relationship between age, sex and season was observed in the rate of general infection with *T. gondii*, which is probably because of more exposure to infectious sources.

Keywords: *Toxoplasmosis, Toxoplasma gondii, Serum prevalence, Antibody*

اثر مکمل فایتوژنیک برجمعیت میکروبی، برخی فراسنجه‌های خونی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی

احمدعلی ثابتان شیرازی[1*]، مسعود عابدی[2]، غزال رئوفت[3]

۱- استادیار گروه کشاورزی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران.
۲- مربی گروه دامپزشکی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران.
۳- کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهان دارویی، کارشناس جهاد کشاورزی استان فارس، شیراز، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ دی ۱۳۹۹، بازنگری: ۱۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

هدف ازاین مطالعه بررسی اثر مکمل فایتوژیک بر برخی فراسنجه‌های خونی، جمعیت میکروبی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی است. این پژوهش با تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک‌روزه کاب ۵۰۰ در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار، سه تکرار و ۲۰ قطعه جوجه در هر تکرار انجام شد. تیمارها شامل گروه شاهد (بدون افزودنی) و تغذیه شده با ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم درکیلوگرم مکمل فایتوژیک در جیره غذایی بودند. جیره‌های آزمایشی در سن ۲۵ تا۴۲ روزگی و تحت شرایط تنش حرارتی ۳۲ درجه سانتی‌گراد به صورت دوره‌ای مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فایتوژنیک کاهش معنی‌داری را در میزان تری‌گلیسرید نسبت به تیمار شاهد اعمال کرد (P<۰/۰۵). تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فایتوژنیک میزان گلوکز را به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش داد (P<۰/۰۵). تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فایتوژنیک کاهش معنی‌داری را در میزان اشیرشیاکلی و افزایش معنی‌داری را در میزان لاکتوباسیل ایجاد کرد (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوزنیک در کاهش لیپید خون و افزایش باکتری‌های مفید و کاهش باکتری‌های مضر در شرایط تنش گرمایی می‌تواند موثر باشد.

واژگان کلیدی: *تری‌گلیسرید، تنش گرمایی، جمعیت میکروبی، جوجه‌های گوشتی، مکمل فایتوژنیک*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: sedarat2003@yahoo.com

مقدمه

تنش گرمایی به‌عنوان یکی از نگرانی‌های عمده توسعه صنعت طیور در کشورهای دارای شرایط آب و هوای گرم می‌باشد. بیشترمناطق ایران دارای شرایط آب و هوای گرم وخشک می‌باشند، لذا احتمال بروز تنش گرمایی بالاست. یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش تولید طیور تنش گرمایی است که موجب افزایش تلفات، کاهش رشد و کاهش قدرت سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود (۱).

تنش گرمایی باعث کاهش تعداد گلبول سفید، کاهش تیتر آنتی بادی و حداقل شدن فعالیت لنفوسیت‌ها (۲)، افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت (۳) می‌شود. گزارش شده است درجه حرارت بالای محیطی در سالن‌های پرورش طیور سبب کاهش غلظت پروتئین‌های پلاسما، افزایش محسوس غلظت‌های گلوکز و کلسترول خون شده است (۴). درجه حرارت‌های بالای محیطی همچنین بر بهبود پاسخ ایمنی اختصاصی جوجه‌های گوشتی اثرگذار است (۵). تنش حرارتی، تولید رادیکال‌های آزاد مشتق شده از اکسیژن را در ماهیچه سینه افزایش می‌دهد (۶). در واقع، تنش اکسیداتیو میزان گلوتاتیون احیا و ضد اکسیدان‌هایی مانند رنگدانه‌ها و ویتامین‌ها را در سلول‌ها کاهش داده و باعث افزایش احتمال اکسیداسیون غشاهای سلولی می‌شود (۷). افزودنی‌های گیاهی و فرآورده‌های فرعی آنها بر عملکرد طیور مؤثرند. مخصوصاً زمانی که طیور در شرایط نامساعد پرورشی نظیر تنش گرمایی، قابلیت هضم پایین جیره وجود بیماری و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در گله قرار بگیرند (۸). بنابراین در شرایط تنش دستکاری جیره بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد (۹). در این راستا برای مقابله با تنش گرمایی می‌توان از مواد آنتی‌اکسیدانی استفاده کرد (۱۰).

امروزه افزودنی‌های با منشأ گیاهی به منظور جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها از اهمیت زیادی برخوردار شده‌اند. با توجه به تاریخچه و گستردگی گیاهان دارویی در ایران، استفاده از این منبع عظیم خدادادی و طبیعی که فاقد هر گونه آثار سوئی می‌باشد باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد. امروزه بهره‌گیری از دانش و فن‌آوری روز در صنعت گیاهان دارویی باعث تنوع تولید این فرآورده‌ها شده است و انتظار می‌رود با تهیه انواع محصولات گیاهی با کاربردهای تخصصی در زمینه‌های مختلف پزشکی، دامپزشکی و دامپروری، در حذف مواد شیمیایی نامطلوب و کاهش ناهنجاری‌ها و داشتن طبیعتی سالم، گام‌های مؤثری برداشته شود. تجربه چند دهه اخیر نشان داده که داروهای شیمیایی با تمام کارآیی، اثرات نامطلوب فراوانی به همراه دارند و کمتر ماده خالصی وجود دارد که دارای اثرات زیانبار نباشد. در مقابل، مواد موثر موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردارند. بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند و از این رو امتیاز و برتری قابل توجهی نسبت به داروهای شیمیایی دارند و به صورت سنتی برای درمان وکنترل بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱).

تحقیقات نشان داده است که افزودن گیاهان دارویی به رژیم غذایی پرندگان، میکروفلور روده‌ای آنان را تعدیل می‌نماید (۱۲). همچنین ثابت شده است که برخی از اسانس‌های گیاهی دارای اثرات آنتی‌سپتیک و ضد میکروبی (۱۳) و اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی متعددی هستند (۱۴). مکانیسم عمل محصولات گیاهان دارویی به خوبی مشخص نشده است، ولی احتمال داده می‌شود که آنها نفوذپذیری غشاهای سلولی را تغییر داده و باعث نابودی باکتری‌های بیماری‌زا شوند (۱۵). گیاهان دارویی سیستم ایمنی را طریق فلاوونوئیدها،

ویتامین C و کاروتنوئیدها تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۶). گیاهان حاوی ترکیبات فلاوونوئید و ترپنی مثل آویشن با افزایش فعالیت ویتامین C و اثرات ضد باکتریایی خود باعث افزایش عملکرد سیستم ایمنی در حیوانات می شوند (۱۷).

در زمینه استفاده از گیاهان دارویی یا روغن‌های ضروری آنها در تغذیه طیور گوشتی و تخم‌گذار مطالعاتی انجام شده است. از آن جمله، بکارگیری آویشن در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال تیمول و کارواکرول موجب کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌های مضر دستگاه گوارش شده است (۱۸) . اثر سودمند مکمل فایتوژنیک حاوی کارواکرول، کاپسایسین و سینمالدئید در تغذیه جوجه‌های گوشتی با افزایش معنی‌دار در وزن بدن و بهبود ضریب تبدیل خوراک گزارش شد (۱۹) . استفاده از عصاره فلفل قرمز (حاوی ۷۰ درصد کاپسایسین) در جیره مرغان تخم‌گذار رنگ زرده تخم‌مرغ را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (۲۰). ترکیبات شیمیایی اسانس‌های گیاهی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش و بهبود وضعیت سلامت پرنده هستند (۲۱) به طور مثال دارچین با افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و شمار لنفوسیت‌های T جوجه‌های گوشتی نقش مهمی در سیستم ایمنی دارد (۲۲). افزودن سینمالدئید به جیره مرغان تخم‌گذار باعث کاهش غلظت باکتری سالمونلا در سکوم و همچنین کاهش آلودگی پوسته تخم‌مرغ و زرده تخم‌مرغ نسبت به تیمار شاهد شد (۲۳). .همچنین مشخص شده است سینمالدئید و کارواکرول ترشح موسین را تحریک کرده و بدین ترتیب از استقرار عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات موجود در مرزنجوش، فلفل و آویشن دارای خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری کلستریدیوم هستند (۲۴).

اعمال تغییرات در جیره غذایی یکی از روش‌های مورد استفاده برای حذف یا تعدیل اثرات تنش گرمایی بر عملکردجوجه‌های گوشتی می‌باشد (۲۵). در حال حاضر تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی حاصل از گیاهان دارویی به ویژه در تغذیه طیور در حال افزایش است. مکمل فایتوژنیک XTRACT 6930 حاوی سینمالدئید (۳ درصد)، کاپسایسین (۲ درصد) و کارواکرول (۵ درصد) است. کارواکرول ماده‌ای است که در گیاهان دارویی مانند آویشن یافت می‌شود (۲۶) و خاصیت ضد میکروبی این گیاهان به کارواکرول نسبت داده می‌شود (۲۷). در این راستا نشان داده شده است که کارواکرول رشد سالمونلا در جوجه‌های گوشتی را مهار می‌کند (۲۸). سینمالدهید از ترکیبات موجود در دارچین است. اثر ضد باکتریایی قوی سینمالدهید علیه اشرشیاکلی ، سودوموناس ایروجینوزا ، انتروکوکوس، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و ویبریو پاراهمولیتیکوس ثابت شده است (۲۹). کاپسایسین حاصل از عصاره فلفل دارای فعالیت ضد باکتریایی و موثر در درمان بیماری‌های معده است (۲۰).

با توجه به اثرات مختلف و متنوع ترکیبات گیاهان دارویی در بهبود وضعیت سلامت طیور ضرورت مطالعه جهت دستیابی به نتایج قابل اطمینان وجود دارد. پژوهش حاضر جهت تعیین میزان تاثیر سطوح مختلف مکمل فایتوژنیک XTRACT 6930 بر جمعیت میکروبی و برخی فراسنجه‌های خونی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی انجام گردید.

مواد و روش کار

این پژوهش با تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک‌روزه کاب ۵۰۰ در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار، سه تکرار و ۲۰ قطعه جوجه در هر تکرار و با میانگین وزن مشابه انجام گرفت. جوجه‌ها

در طول ۴۲ روز بر روی بستر پوشال پرورش یافتند و در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. برنامه نوری به صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی اجرا شد. درجه حرارت سالن پرورش در روز اول ۲±۳۳ درجه سانتی‌گراد و تا پایان هفته اول دما به ۳۲ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد. سپس به ازای هر هفته افزایش سن جوجه‌ها تا ۲۵ روزگی، به میزان سه درجه سانتی‌گراد از دمای سالن کاسته شد. تنش گرمایی ۱±۳۲ درجه سانتی‌گراد به صورت دوره‌ای (۸ ساعت در شبانه روز و از ساعت ۹ صبح تا ۵ بعد از ظهر) از سن ۲۵ روزگی تا ۴۲ روزگی اعمال گردید. جوجه‌ها جیره‌های پایه را بدون هیچ افزودنی از یک تا ۲۵ روزگی دریافت کردند. تیمارهای مختلف آزمایشی(جیره‌های آزمایشی و تنش گرمایی) از سن ۲۵ تا ۴۲ روزگی اعمال گردید. تیمارهای آزمایشی شامل گروه تنش گرمایی (پرورش تحت شرایط تنش گرمایی و بدون افزودنی) و تیمارهای تحت تنش گرمایی تغذیه شده با مکمل فایتوژنیک در سه سطح: ۱۰۰، ۱۵۰و۲۰۰ میلی‌گرم درکیلوگرم بود. مکمل XTRACT 6930 مخلوطی از سینمالدئید (۳ درصد)، کاپسایسین (۲ درصد) و کارواکرول (۵ درصد) بود که به‌صورت سرک به جیره پایه اضافه شد. جیره‌ها به گونه‌ای تنظیم گردیدند که کلیه احتیاجات جوجه‌ها بر اساس توصیه شرکت کاب ۵۰۰ تأمین شدند. تمام جیره‌ها از نظر انرژی قابل متابولیسم، پروتئین خام و سایر مواد مغذی یکسان‌سازی شدند (جدول ۱).

در پایان آزمایش (سن ۴۲ روزگی)، دو پرنده از هر تکرار که وزنشان نزدیک به میانگین وزنی همان پن بود انتخاب و با برش گردن از بین مهره اول و دوم گردنی ذبح شده، پرکنی شدند. برای ارزیابی جمعیت میکروبی، محتویات ایلئومی از هر دو پرنده ذبح شده جمع‌آوری شدند. یک گرم از محتویات ایلئوم هر تکرار در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و پس از تصفیه این محتوی رقیق شده، آن را کاملاً هم زده تا همگن شد. دو رقت (۱-۱۰ و سپس ۲-۱۰) از این محلول همگن تهیه و هر رقت بر روی محیط کشت مخصوص خود کشت شد. برای شمارش لاکتوباسیلوس و اشرشیاکلی، رقت‌های تهیه شده از آنها به ترتیب بر روی محیط کشت مخصوص خود یعنی محیط کشت MRS و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ در شرایط بی‌هوازی و محیط کشت MC و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ در شرایط هوازی قرار گرفت (۳۰).

نمونه‌های خونی در هنگام کشتار جمع‌آوری شد و نمونه‌ها سریعاً به لوله‌های حاوی مواد ضد انعقادی اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید(EDTA) انتقال داده شدند. پلاسمای این نمونه‌های خونی(جهت بررسی فراسنجه‌های خونی) به‌وسیله دستگاه سانتریوفیوژ در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جدا و تا اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد- نگهداری شدند. برخی از فراسنجه‌های خونی مانند گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و HDLاندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی هومورال پرندگان در برابر آنتی‌ژن گوسفندی (SRBC: Sheep Red Blood Cell) از دو راس گوسفند ۲۰ سی‌سی خون گرفته و در شیشه حاوی EDTA ریخته شد. گلبول‌های قرمز سه بار با بافرفسفات سالین شسته شده و در نهایت یک محلول ۷ درصد از گلبول قرمز در بافر فسفات سالین تهیه گردید. لازم به ذکر است تمام مراحل فوق در شرایط استریل انجام شد. ابتدا در سن ۲۱ روزگی ۰/۵ میلی‌لیتر SRBC ۷ درصد در ورید زیر بال تزریق و هفت روز پس از تزریق (در سن ۲۸ روزگی)، از این دو پرنده مجدداً ۳ میلی‌لیتر خون جهت تعیین پاسخ آنتی بادی اولیه گرفته شد. سپس ۱۴ روز پس از اولین تزریق، در سن ۳۵

روزگی دوباره تزریق SRBC انجام گرفته و ۷ روز بعد یعنی در سن ۴۲ روزگی نمونه‌های خون جهت تعیین پاسخ‌های آنتی‌بادی ثانویه تهیه شد. پس از خونگیری و لخته شدن نمونه خون، آن را سانتریفیوژ و سرم جدا شد. سرم جمع‌آوری شده برای نیم ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری تیتر آنتی‌SRBC کل قرار داده شد (۳۱).

داده‌های این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار و ۲۰ جوجه در هر تکرار با استفاده از رویه مدل خطی(GLM) و نرم‌افزار SASمورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. مقایسات میانگین در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت.

جدول ۱- درصد اجزا و مواد مغذی جیره‌های دوره آغازین، رشد و پایانی

اجزای جیره (درصد)	آغازین (۱۰-۱ روزگی)	رشد (۲۱-۱۱ روزگی)	پایانی (۴۲-۲۲ روزگی)
ذرت	۵۶/۶۱	۶۲/۳۳	۶۵/۱۵
کنجاله سویا (۴۴٪)	۳۶/۰۰	۳۰/۱۵	۲۷/۲۰
روغن آفتابگردان	۳/۰۰	۳/۲۲	۳/۵۱
دی کلسیم فسفات	۱/۸۹	۱/۸۵	۱/۷۴
پوسته صدف	۱/۲۰	۱/۱۶	۱/۱۱
نمک طعام	۰/۳۹	۰/۳۳	۰/۳۰
دی ال- متیونین	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۴
ال – لیزین هیدروکلرید	۰/۰۸	۰/۱۳	۰/۱۵
مکمل معدنی و ویتامینی[†]	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰
جوش شیرین	۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۱۰
ترکیبات (محاسبه شده)			
انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری(کیلوکالری/کیلوگرم)	۲۹۷۳/۹۹	۲۹۷۳/۹۹	۳۱۱۱/۹۵
پروتئین خام (درصد)	۲۰/۹۲	۲۰/۹۲	۱۷/۸۶
فیبر خام (درصد)	۳/۷۶	۳/۴۸	۳/۳۳
کلسیم (درصد)	۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۰
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۴۵
متیونین (درصد)	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۴۸
متیونین+ سیستین (درصد)	۰/۸۴	۰/۸۴	۰/۷۶
لیزین (درصد)	۱/۲۰	۱/۲۰	۱/۰۵
سدیم (درصد)	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۱۶

[†] هر کیلوگرم از جیره، مواد مغذی زیر را تأمین می‌کرد: ویتامین A، ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ کوله کلسیفرول، ۲۳۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۱۲۱ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K3، ۲ میلی‌گرم؛ ویتامین B12، ۰/۰۲ میلی‌گرم؛ تیامین،۴ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین؛ ۴ میلی‌گرم؛ اسید فولیک، ۱ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۰۳ میلی‌گرم؛ پیریدوکسین، ۴ میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۸۴۰ میلی‌گرم؛ اتوکسی کوئین، ۰/۱۲۵ میلی‌گرم؛ سولفات منگنز، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ سلنیوم، ۰/۲ میلی‌گرم؛ ید، ۱ میلی‌گرم؛ مس، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۵۰ میلی‌گرم.

نتایج

فراسنجه‌های خونی: اثر مکمل فایتوژنیک در جیره پایه بر برخی فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی در معرض تنش گرمایی در جدول ۲ نشان داده شده است. سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک کاهش معنی‌داری را در میزان تری‌گلیسرید نسبت به تیمار شاهد اعمال کرد ($P<0/05$). البته بین تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک تفاوت معنی‌داری

تری‌گلیسرید وجود نداشت. کمترین میزان تری‌گلیسرید در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک بود. تیمارهای آزمایشی نتوانستند تفاوت معنی‌داری در میزان کلسترول، LDL، HDL نسبت به شاهد ایجاد کنند. روند کاهشی عددی کلسترول و LDL در تیمارهای آزمایشی نسبت به شاهد وجود داشت. در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک کلسترول و LDL کمترین مقدار را نشان داد. تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک کاهش معنی‌داری را در میزان گلوکز نسبت به تیمار شاهد اعمال کرد (P<۰/۰۵). روند کاهش عددی میزان گلوکز در تیمارهای آزمایشی نسبت به شاهد وجود داشت.

جدول ۲- اثر مکمل فایتوژنیک در جیره پایه بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی در معرض تنش گرمایی

تیمارهای غذایی	فراسنجه‌های خونی				
	تری‌گلیسیرید	کلسترول	LDL	HDL	گلوگز
	میلی گرم در دسی لیتر				
جیره پایه	۶۵/۶۷ a	۱۳۱/۰۰	۲/۶۷ ۲	۶۰/۳۳	۲۷۲/۱۰ a
۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۶۵/۳۳ a	۱۳۰/۳۳	۲/۳۳ ۱	۶۰/۰۰	۲۷۰/۰۸ a
۱۵۰میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۵۷/۶۶ b	۱۲۹/۳۳	۲/۳۳ ۱	۶۱/۰۰	۲۶۹/۴۲ a
۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۵۹/۶۷ b	۱۲۹/۷۶	۲/۰۰ ۱	۶۰/۶۷	۲۵۹/۶۲ b
SEM	۰/۶۰	۰/۲۵	/۳۵	۰/۳۱	۰/۶۰
P.value	۰/۰۰۳۱	۰/۱۷	۰/۴۱	۰/۷۱	۰/۰۰۳۹

a-b : میانگین‌های هر ردیف که دارای حرف مشترک نمی‌باشند دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

جمعیت میکروبی: اثر تیمارهای مختلف بر جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی تحت تنش در جدول ۳ آورده شده است. تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک کاهش معنی‌داری را در میزان اشیرشیاکلی و افزایش معنی‌داری را در میزان لاکتوباسیل ایجاد کرد (P<۰/۰۵). روند عددی میانگین لگاریتمی لاکتوباسیل در سطوح مختلف تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد، افزایشی بود. بیشترین میانگین لگاریتمی لاکتوباسیل در تیمار آزمایشی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک بود. همچنین روند عددی میانگین لگاریتمی اشرشیاکلی در سطوح مختلف تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد، کاهشی بود. کمترین میانگین لگاریتمی لاکتوباسیل در تیمار آزمایشی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک وجود داشت.

جدول ۳- اثر تیمارهای مختلف بر جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی((log CFU/g)

جیره های آزمایشی	لاکتوباسیل	اشرشیاکولی
جیره پایه	۶/۷۱[a]	۷/۷۰[a]
۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۶/۷۵[a]	۷/۷۱[a]
۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۷/۴۲[b]	۷/۱۴[b]
۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۷/۸۰[b]	۶/۹۱[b]
SEM	۰/۰۷	۰/۰۵
P.value	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۰۹

[a-b]: میانگین‌های هر ردیف که دارای حرف مشترک نمی‌باشند دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

سیستم ایمنی: تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی بر پاسخ‌های ایمنی در جدول ۴ نشان داده شده است. هیچ کدام از تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری را در نتایج تست SRBC ایجاد نکردند. روند افزایش عددی در پاسخ اولیه و ثانویه در سطوح مختلف تیمار آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد دیده شد.

جدول ۴-.تأثیر افزودن تیمارهای مختلف به جیره پایه بر تیتر اولیه و ثانویه تولید آنتی‌بادی تام در پاسخ به تزریق SRBC(بر حسب Log 2)

صفات مورد بررسی	تیمارهای غذایی				مولفه‌های آماری	
	جیره پایه	۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل فایتوژنیک	SEM	P.value
	پاسخ اولیه (۳۵ روزگی)					
آنتی‌بادی تام	۵/۳۵	۵/۳۳	۵/۳۸	۵/۳۶	۰/۰۱	۰/۴۶
	پاسخ ثانویه (۴۲ روزگی)					
آنتی‌بادی تام	۶/۱۹	۶/۲۱	۶/۵۴	۶/۴۹	۰/۰۵	۰/۰۱

بحث و نتیجه‌گیری

فراسنجه‌های خونی: گزارش‌هایی مبنی بر افزایش تری‌گلیسرید در اثر ترشح کورتیکوسترونیدها تنش گرمایی وجود دارد (۳۲). در تحقیق حاضر کاهش معنی‌دار تری‌گلیسرید نشان‌دهنده تأثیر ترکیبات مکمل فایتوژنیک در تعدیل این فراسنجه لیپیدی خون است. این نتایج با سایر پژوهش‌های دیگر هم‌خوانی دارد. گزارش شده است که غلظت تری‌گلیسرید سرم خون با استفاده از اسانس آویشن، رزماری و مریم گلی در جیره مرغ‌های تخم‌گذار کاهش یافته است (۳۳). در پژوهشی که در آن از ppm۱۵۰ تیمول و کارواکرول استفاده شد کاهش میزان کلسترول و تری‌گلیسرید در سرم مرغ‌های لگهورن مشاهده شد (۳۴). در پژوهشی مکمل تحقیق حاضر را در مرغان تخم‌گذار در سطوح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌کار بردند و تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر میزان گلوکز، کلسترول، تری‌گلسیرید سرم خون نشان ندادند. علت عدم معنی‌داری فراسنجه‌های خونی را این‌گونه توضیح دادند که وقتی عملکرد در بالاترین حد خود قرار دارد و پرنده در شرایط تنش، بیماری یا تراکم قرار نداشته باشد مجالی برای بروز اثرات بهبودی در نتیجه استفاده از افزودنی‌ها وجود نخواهد داشت (۱۸).

گزارش گردیده است تنش گرمایی سبب افزایش گلوکز در جوجه‌های گوشتی شده است (۳۵). در پژوهش حاضر میزان گلوگز در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مکمل فایتوژنیک کاهش معنی‌داری داشته است و در تیمارهای دیگر نیز کاهش عددی نسبت به شاهد نشان داد. این کاهش گلوکز می‌تواند به خاطر اثر کاهنده مکمل فایتوژنیک بر میزان قند خون، افزایش انسولین و افزایش جذب گلوکز خون باشد. این نتیجه با پژوهشی که در آن دارچین در جوجه گوشتی به میزان ۰/۵درصد در شرایط تنش به‌کاربرده شد هم‌خوانی دارد (۱). در همین راستا گزارش گردیده است که سینمآلدید در موش‌های نر دیابتی سبب کاهش گلوکز و افزایش انسولین پلاسما شده است (۳۶). در تحقیق حاضر روند عددی میزان کلسترول تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی نسبت به شاهد کاهشی بود. احتمال کاهش گلوکز در ارتباط با کاهش کلسترول نیز وجود دارد. کاهش گلوکز منجر به کاهش تولید پیرووات و کاهش استیل‌کوآ به‌عنوان پیش ساز کلسترول می‌شود. بنابراین استیل‌کوآ مورد نیاز برای سنتز کلسترول به مقدار کافی وجود نخواهد داشت (۱). این احتمال وجود دارد که مواد مؤثره در مکمل فایتوژنیک آنزیم مسیر سنتز کلسترول یعنی ۳-هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل‌کوآ را مهار کند و با مهار این آنزیم سنتز کلسترول کاهش یافته و در نتیجه باعث کاهش کلسترول پلاسما گردیده است.

جمعیت میکروبی: نتایج پژوهش حاضر با مطالعات مختلفی هم‌خوانی دارد. در مطالعه‌ای که ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل گیاهی حاوی کارواکرول، سینمالدئید و کاپسایسین در جوجه‌های گوشتی استفاده شد، تعداد باکتری‌های اشرشیاکلی کاهش و تعداد باکتری‌های لاکتوباسیل روده کوچک افزایش پیدا کرد (۳۹). درپژوهش دیگری مکمل فایتوژنیک به میزان ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم استفاده و توانست جمعیت میکروبی لاکتوباسیل را به‌طور معنی‌داری افزایش داده و روند عددی کاهشی در شمار کلنی‌های اشرشیاکلی دیده شد (۱۸). در مطالعه دیگری مخلوطی از کاپسایسین، سینمالدئید و کاراکرول تعداد اشرشیاکلی و کلستریدیوم پرفریجنس را در روده کور کاهش داد (۴۰). مطالعات نشان داده گیاهان دارویی که مواد مؤثره همچون کاپسایسین دارند در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای خوراکی، موثر بوده و به‌طور انتخابی می‌توانند فعالیت ضد میکروبی قوی در مقابل عوامل بیماری‌زای روده داشته باشند. در حالی که اثر مضری روی باکتری‌های مفید نظیر بیفیدوباکترها و لاکتوباسیل‌ها نداشته باشند (۳۷). این احتمال وجود دارد که ترکیبات فعال موجود در مکمل فایتوژنیک میزان اسیدیته دستگاه گوارش را کاهش می‌دهند. بنابراین این ترکیبات می‌توانند مانع از رشد باکتری‌های پاتوژن مانند اشرشیاکلی و تحریک کننده رشد باکتری‌های مفید همچون لاکتوباسیلوس شوند. همچنین ترکیبات مؤثره گیاهی از راه تغییر ویژگی‌های غشاء سلول عمل کرده و باعث نشت یون‌ها شده و در نتیجه باعث کاهش میکروب‌ها می‌شوند (۱۶). کارواکرول موجب از هم پاشیدن غشا باکتر ی وآزاد شدن محتویات غشایی می‌شود. در واقع ترپنوییدها و فنیل پروپنوییدها به غشاء باکتری نفوذ می‌کنند و به بخش‌های درونی‌تر باکتری می‌رسند و این فرآیند به دلیل خاصیت چربی دوستی آنها است .گزارشاتی مبنی بر تأثیر سینمالدئید بر ایجاد اختلال در تولید آنزیم‌های سازنده دیواره سلولی وجود دارد (۴۱).

سیستم ایمنی: تأثیر گیاهان دارویی و مشتقات آنها بر سیستم ایمنی طیور، اغلب در قالب عیار پادتن مورد ارزیابی قرار گرفته است. SRBC یک آنتی‌ژن است که هنگام وارد شدن به بدن باعث تولید

آنتی‌بادی می‌شود. گیاهان دارویی و عصاره‌های آنها آنتی‌اکسیدان‌های قوی بوده و از طریق افزایش فعالیت ویتامین C و فاگوسیت‌ها پاسخ ایمنی بدن را افزایش می‌دهند (۴۲). در مطالعه حاضر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ‌های اولیه ثانویه تاثیر معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان نداد. روند افزایش عددی در پاسخ اولیه و ثانویه در سطوح مختلف تیمار آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد دیده شد.

نتایج تحقیق حاضر با مطالعات مختلفی هم‌خوانی دارد. در پژوهشی مکمل فایتوژنیک در سطوح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به‌کار برده شد و پاسخ معنی‌داری مشاهده نگردید (۱۸). در مطالعه‌ای به میزان ۱و ۲ درصد پودر خرفه به‌کار برده شد و تأثیر معنی‌داری بر پاسخ ایمنی مشاهده نگردید (۴۳). در مطالعه‌ی دیگری ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره آویشن به همراه نعناع فلفلی و ویتامین E به‌کار برده شد و بر پاسخ اولیه و ثانویه بی‌تأثیر بود (۴۴). در پژوهشی اسانس دارچین در سطح ۲۰۰ ppm بر تیتر آنتی‌بادی بر علیه نیوکاسل تفاوت معنی‌داری نشان نداد (۴۵). البته تحقیقات دیگری هم انجام شده است که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی ندارد. در مطالعه‌ای وقتی ۰/۱ درصد پودر دارچین در جوجه‌های گوشتی به‌کاربرده شد، تنها ایمنوگلوبین‌های G در عیار پاتن اولیه و ثانویه در پاسخ به آنتی‌ژن SRBC تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (۴۶). همچنین زمانی که از پودر دارچین استفاده شده بود باعث افزایش آنتی‌بادی تام شد و علت آن را تکثیر فراوان سلول‌های ایمنی در اندام‌های ایمنی طیور دانستند (۴۷).

نتیجه‌گیری

مکمل فایتوژنیک در سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم توانست در شرایط تنش گرمایی کاهش معنی‌داری در میزان تری‌گلیسیرید خون ایجاد کند و باکتری‌های مفید لاکتوباسیل را افزایش و باکتری‌های مضر اشرشیاکلی را کاهش دهد. بنابراین سطوح مکمل فایتوژنیک اعمال شده درکاهش تأثیرات منفی تنش گرمایی بر سلامت جوجه‌های گوشتی می‌تواند مؤثر واقع شود.

References

1- Baghban Kanani P, Daeshyar M, Najafi R. Effects of cinnamon and turmeric powders supplementation on performance, carcass characteristics and some serum parameters of broiler chickens under heat stress condition. *J. Anim. Sci. Res.* 2017; 26(1):.64-75 [In Persian].

2- Mashaly, MM, Hendricks GL, Kalama MA, Gehad AE, Abbas AO, Patterson PH. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci*. 2004; 83: 889-894.

3- Mogenet, LY, Youbicier-Simo BJ. Determination of reliable biochemical parameters of heat stress, and application to the evaluation of medications: example of erythromycin E, 541 in Proceedings of 10th European Poultry Conference, Jerusalem, *Israel.* 1998; 538.

4- Sahin K, Kucuk O. .Effects of vitamin C and vitamin E on performance, digestion of nutrients and carcass characteristics of Japanese **quails** reared under chronic heat stress (34 degrees C). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutri.* 2001; 85: 335-341.

5- Thaxton P, Siegel HS. Depression of secondary immunity by high environmental temperature. *Poult. Sci.* 1972; 51: 1519-1526.

6- Mujahid A, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poult. Sci.* 2006; 85:1259-1265.

7- Malayoğlu HB, Özkan1 S, Koçtürk S, Oktay G, Ergül M. Dietary vitamin E (α-tocopheryl acetate) and organic selenium supplementation: performance and antioxidant ststus of broilers fed n-3 PUFA-enriched feeds. S. Afr. *J. Anim. Sci.* 2009; 39: 274-285.

8- Barreto MSR, Menten JFM, Racanicci AMC, Pereira PWZ, Rizzo P. Plant extracts used as growth promoters in broilers. Brazil. *J. Poult. Sci.* 2008; 2:109-115.

9- Sahin KN, Sahin M, Onderci MF, Gursu Issi M. Vitamin C and E can alleviate negative effects of heat stress in Japanese quails. *J. Food Agric. Environ.* 2003; 2: 244-249.

10- Borazjanizadeh M, Bojarpor M, Fayazi J, Chachi M. Evaluation of antioxidant effect of clove and oregano on blood parameters of broilers in Khuzestan climate. Conference: Fourth Regional Conference on Agricultural Research Findings (Western Iran). 2010; 1194-1197.

11- Francis C, Janky DM, Arafa AS, Harms H..Interrelationship of Lactobacillus and Zinc Bacitracin in the Diets of Turkey. *Poults. Poult. Sci.* 1978; 57: 1687-9.

12- Young HJ, Noh, JW. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against Elimeria tenella. *Vet. Parasit.* 2001; 96: 257-263.

13- Sharifi D, Khorsandi S, Khadem A, Salehi A, Moslehi, H. The effect of four medicinal plants on the performance, blood biochemical traits and ileal microfora of broiler chicks. *Vet. ARHIV.* 2013; 83(1): 69-80.

14- Alagawany M, Abd EL-Hach M, Ragab Farag M. Biological Effects and Modes of Action of Carvacrol in Animal and Poultry Production and Health - A Review. *Advances in Anim. Vet. Sci.* 2015; 3:73-85.

15- Skandamis PN, Nychas GJE. Effect of oregano essential oil on microbiological and physicohemical attributes of minced meat stored in air and modified atmos pheres. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91:1011-1022.

16- Frankic T, Voijc M, Salobir J, Rezar V. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agri. Slovenica.* 2009; 94(2): 95-102.

17- Samman S, Cook NC. Flavonoids chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996; 7:66-76.

18- Shahitavi M, Salari, S, Ghorbani M, Aghayi A. Effect of Phytogenic Additive (XTRACT 6930) on Performance, Egg Quality and Some Physiological Parameters of Laying Hens. *Iranian J. Anim. Sci. Res.* 2021; 13(1): 137-149.

19- Pirgozliev V, Mansbridge SC, Rose SP, Mackenzie AM, Beccaccia A, Karadas F, *et al.*,
Dietary essential oils improve feed efficiency and hepatic antioxidant content of broiler chickens. *Anim. Sci.* 2019; 13(3):502-508.

20- Moraleco DD, Valentim JK, Silva LG, Lima HHDA, Bitencourtt TM, Dallago GM. Egg quality of laying hens fed diets with plant extracts. *Acta Scientiarum. Anim. Sci.* 2019; 41-54.

21- Tatli O, Nikerel IE, Ozdemir BS. Evaluation of metabolite extraction protocols and determination of physiological response to drought stress via reporter metabolites in model plant Brachypodium distachyon. *Turkish J. Botan.* 2015; 39(6): 1042-1050.

22- Tamam S, Abdel Hamid MS, Samah MH, Marwa AN. The anti-viral and immunomodulatory activity of cinnamon zeylanicum against" NDV" newcastle disease virus in chickens. *Inter. J. Sci.: Basic and Applied Research.* 2017; 32(2): 251-262.

23- Upadhyaya I, Upadhyay A, Kollanoor-Johny A, Mooyottu S, Baskaran SA, Yin HB, *et al.*, In feed supplementation of trans-cinnamaldehyde reduces layer chicken egg borne transmission of Salmonella enterica serovar enteritidis. *Appl. Enviro. Micro.* 2015; 81(9): 2985-2994.

24- Hashemipor H, Kermanshahi H, Golian A, Raji A, Van Krimpen MM. Effect of thymol and carvacrol by next enhance 150 ® on intestinal development of broiler chickens fed CMC containing diet. *Iranian J. Appli. Anim. Sci.* 2013; 3 (3): 567-576.

25- Debski B, Zalewski W, Gralak MA and Kosla T. Choromium yeast supplementation of broiler in an industrial farming system. *J. Trace Elements in Med. Biolog*. 2004; 18: 47-51.

26- De Vincenzi M, Stammati A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. Fitoterapia. 2004, 75(7-8):801-804.

27- Veldhuizen EJ, Tjeerdsma-van Bokhoven JL, Zweijtzer C, Burt SA, Haagsman HP. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54(5):1874-1879.

28- Burt SA, Vlielander R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against Escherichia coli O157:H7 by addition of food stabilizers. *J. Food Prot.* 2005; 68(5): 919-926.

29- Chang ST, Chen PF, Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from Cinnamomum osmophloeum. *J. Ethnopharmacol*. 2001; 77(1): 123-127.

30- Guban J, Korver DR, Allison GE, Tannock GW. Relationship of dietary antimicrobial drug administration with broiler performance, decreased population levels of Lactobacillus salivarius, and reduced bile salt deconjugation in the ileum of broiler chickens. *Poulty Sci*. 2006; 85: 2186-2194.

31- Cheema MA, Qureshi MA, Havenstein GB. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 random bred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.* 2003; 82: 1519-1529.

32- Al-Azraqi AA. Pattern of leptin secretion and oxidative markers in heat-stressed pigeons. *International J. Poult. Sci.* 2008; 7: 1174-1176.

33- Bolukbasi SC, Erhan MK, Kaynar O. The effect of feeding thyme, sage and rosemary oil on laying hen performance, cholesterol and some proteins ratio of egg yolk and E. coli count in feces. *Arch. Fu. Gef.* 2008; 72: 231-237.

34- Case GL, He L, Mo H, Elson CE. Induction of geranyl pyrophosphate pyrophosphatase activity by cholesterol-suppressive isoprenoids. *Lipids.* 1995; 30: 357-359.

35- Hashemi R., Dastar B, Hassani S, Jafari Ahangari Y. Effect of Dietary Protein Level and Feed Restriction on Performance and Body Temperature of Broilers Subjected to Heat Stress. *J. Sci. Tech. Agri. Natural Res.* 2007; 11 (1): 451-460 [In Persian].

36- Subash Babu P, Prabuseenivasan S, Ignacimuthu S. Cinnamaldehyde_A potential antidiaetic agent. Phytomedicine. 2007; 14: 15-22.

37- Ahmadi nejad SF, Afsharmanesh M, Salarmoini M, Ebrahimnejad H. Effect of different levels red pepper powder Alternative With flavavophpspholipol antibiotics, on performance, intestinal morphology and microbial population in broiler chicks. *Iranian J. Anim. Sci. Res.* 2019; 11(2): 195-206 [In Persian].

38- Frankiv T, Voljc M, Salobir J, Rezar V. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Argi. Slovenica.* 2009; 94(2): 95-102.

39- Jamroz D, Orda J, Kamel C, Wiliczkiewlcz A, Wertelecki T, Skorupinska J. The influence of phytogenic extract on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. *J. Anim. Feed Sci.* 2003; 12 (2): 583-596.

40- Garcia V, Catala-Gregori P, Hernandaz F, Megias MD, Madrid J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestin mucosa morphology, and meat yield of broilers. *Applied Poult. Res.* 2007; 16: 555-562.

41- Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Wouterse H, Frehner A, Beynen AC. Cinnamanaldehyde, but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose induced growth depression in female broiler chickens. *Inte. J. Poult. Sci.* 2004; 3(9): 608-612.

42- Cook NC, Samman S. Flavonoidschemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996; 7: 66-76.

43- Ghorbani MR, Bojarpur M, Mayahi M, Fayazi J, Tabatabaei RF, Tabatabaei S. Effect of purslane (Portulaca oleracea L.) on blood lipid concentration and antioxidant status of broiler chickens. *Online J. Vet. Res.* 2013; 17(2): 54-63.

44- Bahrami M, Shariatmadari F, Karimi TM. Effect of dietary extract of thyme and peppermint and vitamin E supplementation on immune responses of laying hen in heat stress and content of peroxidation egg during storage. *Iranian J. Med. Aroma. Plants.* 2011; 27: 326-337 [In Persian].

45- Najafi P, Torki M. Performance, blood metabolites and immunocompetaence of broiler chicks fed diets included essential oils of medicinal herbs. *J. Anim. Vet. Advanced,* 2010; 9(7): 1164-1168.

46-Behrooz Lak MA, Hassan Abadi A, Nasiri Moghadam H, Kermanshahi H. Effect of different levels of Cinnamon Powder, with Antibiotic and Probiotic on Performance and Carcass characteristics of Broiler Chickens. *Res. Anim. Prod.* 2014; 5: 25-35 [In Persian].

47-Park SO, Ryo CM, Park BS, Hwangbo J. The meat quality and growth performance in broiler chickens fed diet with cinnamon powder. *J. environmental biology.* 2013; 34: 127-133.

Effect of Phytogenic Additiv on Some Blood Parameters, Microbial Population and Antibody Response of Broiler Chickens under Heat Stress Condition

Ahmad Ali Sabetan Shirazi[1*], Masood Abedi[2], Ghazal Raoofat[3]

1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran.
2- Instructor, Department of Veterinary, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.
3- Master of Medicinal Plant Physiology, Expert of Agriculture Jahad Fars Province, shiraz, Iran.

Receive: January 14, 2021; Revise: February 3, 2021; Accept: February 28, 2021

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*

بررسی سرولوژیکی نئوسپوراکانینوم در بزهای مرغز ماده سقز، کردستان

حامد موسوی[۱]، غزاله ادهمی[۲*]

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه ای، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.
۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ آذر ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۵ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

نئوسپورا کانینوم (Neospora caninum) نوعی انگل تک‌یاخته‌ای دامی است که در گوسفند و بز منجر به صدمات تولید مثلی می‌شود. آلودگی به نئوسپورا کانینوم یک عارضه طولانی‌مدت بوده و میزبان برای تمام عمر آلوده باقی خواهد ماند. سقط جنین ناشی از نئوسپورا کانینوم به دنبال هر آبستنی متعاقب آلودگی ممکن است اتفاق بیفتد. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع سرمی نئوسپورا کنینوم در بزهای مرغز ماده شهرستان سقز بود. بدین منظور، تعداد ۱۸۰ نمونه سرم به روش الایزا آزمایش شد، که از این تعداد ۴ نمونه از سرم‌ها (۲/۲ درصد) مثبت بودند. از مجموع ۶۹ بز مرغز زیر ۱ سال، ۱ مورد (۱/۴۴ درصد) و از مجموع ۱۱۱ بز مرغز بالای ۱ سال، ۳ مورد (۲/۷ درصد) از نظر آلودگی به نئوسپورا مثبت بودند. در بررسی‌های آماری، ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی و گروه‌های سنی دیده نشد ($p>0.05$). آنالیزهای آماری همچنین نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار بین میزان آلودگی در گوسفندان و سابقه سقط جنین بود ($p<0.05$). نتایج این مطالعه حاکی از مواجهه محیطی اندک بزهای منطقه با انگل نئوسپورا کانینوم است. اگر چه شیوع نئوسپورا کانینوم در این مطالعه پائین بوده است اما بایستی به سیاست‌های کنترلی برای اجتناب از خطر گسترش آلودگی توجه نمود. همچنین مطالعات بیشتر برای ارزیابی بهتر میزان شیوع در این حیوانات ضروری است.

کلمات کلیدی: *نئوسپورا کانینوم، الایزا، بز مرغز، سقز، کردستان*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: g.adhami@iausdj.ac.ir

مقدمه

درکشورهای غرب آسیا پرورش گوسفند و بز هم از نظر تشکیل جمعیت دامی و هم از نظر ارزش محصولات تولیدی حائز اهمیت است. قدرت سازش در شرایط مختلف اقلیمی، مصرف کم خوراک، توانائی راه‌پیمائی بالا و ارزش محصولات تولیدی گوسفند و بز در تأمین محصولات پروتئینی از ویژگی‌های مطلوب این گروه از دام‌ها می‌باشد. سقط جنین از مهم‌ترین عوامل خسارت اقتصادی در پرورش گوسفند و بز در تمام دنیا محسوب می‌شود. سقط جنین علاوه بر کاهش میزان تولد بره و بزغاله، موجب کاهش تولید شیر و عوارض ثانویه تولید مثلی می‌شود (۱).

نئوسپوروزیس بیماری تک‌یاخته‌ای با انتشار جهانی است که به وسیله نئوسپورا کانینوم یک انگل داخل سلولی ایجادکننده کیست از خانواده سارکوسیستیده ایجاد می‌شود (۲). در تحقیقات به عمل آمده طی دهه گذشته میزان شیوع سرمی نئوسپورا در گله‌های گوسفند نقاط مختلف جهان با تکنیک‌های مختلف تشخیصی متفاوت بوده است (۳). نئوسپوروزیس از جمله بیماری‌هایی است که باعث تحمیل خسارات سنگین اقتصادی می‌شود به گونه‌ای که فقط میزان خسارات اقتصادی مربوط به سقط جنین ناشی از آن در گله‌های گاو شیری سرتاسر دنیا بالغ بر ۸۴۳ میلیون دلار تخمین زده شده است (۴).

میزبان نهائی نئوسپورا کانینوم، سگ، گرگ و روباه بوده (۵) وسگ‌ها به‌عنوان میزبان نهائی، عامل اصلی انتقال نئوسپورا هستند (۶). میزبان واسط این تک‌یاخته طیف وسیعی از گونه‌های اهلی است (۴). درسیر تکاملی نئوسپورا، سه فرم عفونی وجود دارد. تاکی زوآیت و برادی زوآیت در کیست‌های بافتی و اسپوروزوآیت در آووسیست دیده می‌شود. میزبان واسط با خوردن آب یا غذای آلوده به آووسیست اسپوریله و سگ از طریق خوردن کیست‌های داخل عضلانی میزبان واسط یا خوردن آب یا غذای آلوده به آووسیست اسپوریله آلوده می‌شود (۷). به علاوه، جنین‌های سقط شده، جفت و رحم دام آلوده، مهم‌ترین منبع آلودگی برای میزبان نهائی هستند (۷). این تک‌یاخته می‌تواند از طریق جفت هم منتقل شود (۸). نئوسپورا کانینوم همچنین از طریق شیر از مادر به نوزاد منتقل می‌شود (۲).

سقط جنین ناشی از نئوسپوروزیس به دنبال هر آبستنی متعاقب آلودگی ممکن است اتفاق بیفتد (۹). بزها میزبان واسط نئوسپورا کانینوم هستند و نئوسپورا می‌تواند باعث سقط جنین، مرده‌زائی، اختلالات جنینی، و کاهش بازده در گله‌های بز شود (۹). علیرغم نقش نئوسپورا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل سقط در گله‌های گاو، اهمیت این تک‌یاخته به‌عنوان عامل اختلالات تولید مثلی در بز همچنان مبهم است. اگرچه در منابع به سقط جنین و مرگ و میر نوزادان اشاره شده است (۱۲). نقش این تک‌یاخته در ایجاد عوارض و ضایعات ایجاد شده در گله‌های بز در ایران هنوز مبهم است. سقط جنین ناشی از نئوسپورا کانینوم در بزهای کالیفرنیا و پنسیلوانیا توصیف شده و ضایعات توصیف شده مشابه ضایعات ایجاد شده در توکسوپلاسما گوندی است. درحیواناتی که آلودگی تجربی در آنها صورت گرفته است، سقط جنین، مرگ جنینی، و مرده‌زائی دیده شده است. نئوسپورا به‌عنوان عامل ضایعات ایجاد شده در جفت گوسفندان تلقیح شده جداسازی شده است (۱۰). میزان بهره‌وری گله‌های نشخوارکنندگان کوچک عمدتاً بستگی به کارآئی تولید مثلی آنها دارد. سقط جنین یکی از مهم‌ترین خسارات اقتصادی در صنایع پرورش دام‌های اهلی به دلیل شیوع بالای آن است. در یک طغیان سقط جنین، تعیین دقیق عامل مسبب سقط به دلیل دامنه وسیع عوامل دخیل در آن امکان پذیر نیست.

اگرچه عوامل مختلفی ممکن است در روند سقط جنین مؤثر باشند اما در این میان به نظر می‌رسد نقش عوامل عفونی در گوسفند و بز پررنگ‌تر است (۱۳). امروزه، تکنیک‌های هیستوپاتولوژی، ایمونولوژی، روش‌های مولکولی، و بیواسی جهت جداسازی نئوسپورا کانینوم در حیوانات در دسترس است. در میان این تکنیک‌ها، روش‌های سرولوژی نظیر الایزا، IFAT، آگلوتیناسیون مستقیم، و ایمونوبلات جهت جداسازی آنتی بادی‌های نئوسپورا توصیه می‌شود. در میان روش‌های سرولوژیک الایزا در تعیین تیتر آنتی‌بادی ضد نئوسپورا کانینوم قابل اعتماد و سریع بوده و بیشترین کاربرد را برای مطالعات سرو اپیدمیولوژیک دارد (۱۱).

تشخیص عامل عفونی سقط جنین اغلب دشوار بوده و فقط در آزمایشگاه‌های تخصصی دامپزشکی امکان‌پذیر است و حتی در صورت فراهم بودن چنین شرایطی، عامل درصد بالایی از موارد سقط جنین ناشناخته باقی خواهند ماند. در بهترین حالت، در آزمایشگاه‌های پیشرفته تشخیص نهائی بین ۴۰-۶۲ درصد خواهد بود (۱۳).

در سراسر دنیا شیوع سرمی نئوسپورا کانینوم از صفر تا صد درصد در گونه‌های مختلف حیوانی گزارش شده است. مطالعات سرولوژیکی که در ایران منتشر شده است، شیوع سرمی نئوسپورا را در گوسفند ۱/۵ تا ۵/۷ درصد، در بز ۶/۲ درصد، در گاو ۱۵/۸ تا ۴۶ درصد، در سگ‌ها ۱۰/۶ تا ۳۳ درصد، و در اسب‌ها ۲۸ تا ۴۰/۸ درصد گزارش کرده اند (۱۱). بز مرغز یک نژاد بومی ساکن استان‌های کردستان و آذربایجان غربی است. این بزها کوچک جثه و دارای پوششی با طیف رنگی قهوه‌ای، سفید و مشکی هستند. این طیف رنگی وسیع مشخصه منحصر به فرد این نژاد در میان بزهای سراسر دنیا می‌باشد (۱۴). لذا به دلیل اهمیت نئوسپوروزیس به‌عنوان عامل اختلالات تولید مثلی، هدف از این مطالعه بررسی شیوع سرمی نئوسپورا کانینوم در بزهای مرغز شهرستان سقز است.

مواد و روش‌ها

پس از مقید کردن و ثبت سن و سابقه سقط جنین در ۱۸۰ راس بز مرغز، از ورید وداج آنها خون‌گیری به عمل آمده و کلیه نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد سنندج منتقل شدند. نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و سرم جدا شده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۱). جهت تعیین شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد نئوسپورا کانینوم از کیت تجاری الایزا (N. caninum antibody ELISA kits, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) استفاده شد. حساسیت و ویژگی کیت به‌ترتیب ۹۸/۶ درصد و ۹۸/۳ درصد بود. کلیه مراحل آزمایش طبق دستورالعمل شرکت سازنده دنبال شد. سپس جذب نوری نمونه‌ها درطول موج ۴۵۰ قرائت شده، جذب نوری هر نمونه به همراه جذب نوری کنترل‌های مثبت و منفی قرائت شده و نتایج مطابق فرمول زیر محاسبه شد.

S/P% = (جذب نوری کنترل منفی – جذب نوری کنترل کیفیت / جذب نوری کنترل منفی- جذب نوری نمونه) ×۱۰۰ (۱)

نهایتاً نتایج کمتر از ۴۰ درصد به‌عنوان منفی، نتایج بین ۴۰-۵۰ درصد مشکوک و نتایج بالاتر از ۵۰ درصد مثبت در نظر گرفته شدند. آنالیز داده‌ها بااستفاده از آزمون غیر پارامتریک مربع کای x_2 در نرم‌افزار spss (ورژن۲۱) انجام و سطوح ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

از مجموع ۱۸۰سرم بررسی شده در این مطالعه، ۴ سرم با استفاده از تکنیک الایزا از نظر آلودگی به

نئوسپورا کانینوم مثبت تشخیص داده شد که در مجموع میزان آلودگی بزهای مورد مطالعه ۲/۲درصد بود.

میزان شیوع سرمی نئوسپوراکانینوم بر حسب سن: از مجموع ۱۸۰ سرم مورد بررسی در این مطالعه، ۶۹ نمونه سرم مربوط به گروه سنی زیر ۱ سال و ۱۱۱ نمونه سرم متعلق به گروه سنی بالای ۱ سال بودند. از مجموع ۶۹ بز مرغز زیر ۱ سال، ۱ مورد (۱/۴۴درصد) و از مجموع ۱۱۱ بز مرغز بالای ۱ سال، ۳ مورد (۲/۷ درصد) از نظر آلودگی به نئوسپورا مثبت بودند (جدول۱). علیرغم بیشتر بودن تعداد موارد مثبت سرمی در گروه سنی بالای یک سال در بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی و گروه‌های سنی دیده نشد ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱- فراوانی شیوع آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در گروه‌های سنی مختلف

	تعداد کل نمونه سرم	تعدادسرم مثبت(درصد)	*P value*
زیر ۱ سال	۶۹	۱(۱/۴۴)	
بالای ۱ سال	۱۱۱	۳(۲/۷)	۰/۰۵>
مجموع	۱۸۰	۴(۲/۲)	

میزان شیوع سرمی نئوسپوراکانینوم بر حسب سابقه سقط جنین: چهار مورد (۷/۶۹ درصد) از ۵۲ راس بز مرغز با سابقه سقط جنین، از نظر آلودگی به نئوسپورا مثبت بوده و هیچ موردی از ۱۲۸ رأس بز مرغز بدون سابقه سقط جنین، از نظر آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* مثبت نبود (جدول۲). تمامی موارد مثبت سرمی در بزهای با سابقه سقط جنین بوده و در بررسی‌های آماری، ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی و سابقه سقط جنین دیده شد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲- فراوانی شیوع آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* بر حسب سابقه سقط جنین

	تعداد کل نمونه سرم	تعداد سرم مثبت(درصد)	*P value*
سابقه سقط جنین	۵۲	(۷/۶۹)۴	
بدون سابقه سقط جنین	۱۲۸	۰	<۰/۰۵
مجموع	۱۸۰	(۲/۲)۴	

بحث و نتیجه‌گیری

نئوسپورا کانینوم بیماری مرتبط با سقط جنین، مرگ و میر جنینی و علایم بالینی در بزهای بالغ است (۵). تا زمانی که مطالعات در زمینه شیوع نئوسپوروزیس دراین گونه حیوانی محدود باشد، اهمیت اقتصادی، کلینیکی، و اپیدمیولوژیکی این

تک‌یاخته همچنان مبهم خواهد بود (۵). اطلاعات در زمینه شیوع نئوسپوروزیس در بزها برای اجرای برنامه‌های کنترلی مؤثر حائز اهمیت است (۱۵). هدف از مطالعه حاضر، تعیین شیوع سرمی نئوسپورا کانینوم در بزهای مرغز ماده سقز بود. از مجموع ۱۸۰سرم بررسی شده در این مطالعه، ۴ سرم با استفاده از روش الایزا از نظرآلودگی به نئوسپورا کانینوم مثبت تشخیص داده شدند که در مجموع میزان آلودگی بزهای مورد مطالعه ۲/۲ درصد بود و این نشان‌دهنده تماس پائین بزهای مورد مطالعه با تک‌یاخته مورد نظر بوده است. شیوع تک‌یاخته در برخی نقاط جهان نظیر عراق (۶/ ۵درصد)، جمهوری چک (۶ درصد)، کاستاریکا (۶/۱ درصد)، برزیل (۶/۴ درصد)، و آرژانتین (۶/۶ درصد)، پائین‌تر از کشورهایی نظیر تایلند (۲۳/۶ درصد) و ترکیه (۲۵/۹) بوده است (۱۵). تفاوت شیوع سرمی بیماری در نقاط مختلف ممکن است به دلیل فاکتورهای متنوعی نظیر تکنیک‌های نمونه‌گیری و تشخیصی، مدیریت فارم، نحوه نگهداری و ذخیره سازی مواد غذائی ، تماس با سگ‌سانان، شرایط جغرافیائی و دمایی تأثیرگذار بر ماندگاری و اسپوریلاسیون نئوسپورا کانینوم باشد (۲).

میزان شیوع آنتی‌بادی‌های ضد نئوسپورا کانینوم در ارزیابی به روش الایزا در مطالعه Jung و همکاران در سال ۲۰۱۴، در بزهای بومی کره ۰/۹ درصد (۱۶)، در مطالعه Villagra و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بزهای استان هسه آلمان ۲/۴ درصد (۱۷)، در مطالعه Kyaw و همکاران در سال ۲۰۱۸ در بزهای منطقه کلانتان مالزی ۰/۳۲ درصد (۶)، در مطالعه Lovu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بزهای رومانی ۲/۳ درصد (۱۸)، در مطالعه قره‌خانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در بزهای همدان ۶/۲ درصد (۱۵)، در مطالعه Moor و همکاران درسال ۲۰۰۷ در بزهای استان ریوجا آرژانتین به روش IFAT ۶/۶ درصد (۱۹)، در مطالعه Gos و همکاران در سال ۲۰۱۷ در بزهای دو استان آرژانتین به روش IFAT ۵/۵ درصد بوده است (۲۰).

همچنین میزان شیوع آنتی‌بادی‌های نئوسپورا کانینوم در آزمون الایزا در مطالعه Ghattof و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بزهای استان واسط عراق ۵/۶ درصد (۲۱)، در مطالعه Rodriguez و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بزهای جزایر قناری ۵/۵۵ درصد (۲۲)، در مطالعه Gazzonis و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بزهای شمال شرقی ایتالیا ۵/۷ درصد (۲۳)، در مطالعه Bartova و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بزهای جمهوری چک ۶ درصد (۲۴)، در مطالعه Liu و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بزهای جمهوری چک ۷/۲۳ درصد (۲۵) و در مطالعه قره‌خانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ در بزهای شمال غرب ایران ۱۰/۸ درصد (۲) و بر اساس آزمون IFAT در مطالعه Figliuolo و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بزهای سائوپائولو برزیل ۶/۴ درصد (۱۰) بود. مقادیر بالاتر شیوع سرمی نئوسپورا کانینوم در مطالعه Uzeda و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بزهای استان باهیا برزیل به روش IFAT ۱۵ درصد (۲۶) و در مطالعه Braz و همکاران در سال ۲۰۱۸ در بزهای شمال شرقی برزیل به روش IFAT ۲۶/۱۱ درصد بود (۲۷).

پائین بودن شیوع سرمی نئوسپوروزیس در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از فراهم نبودن شرایط آلودگی آب یا مواد غذائی به مدفوع میزبان نهائی باشد. به عبارت دیگر، فراوانی سگ‌های ولگردی که با گله در ارتباط بوده اند بسیار اندک بوده است، یا اینکه سگ‌های مذکور فاقد آلودگی بوده اند (۶). از مجموع ۶۹ بز مرغز زیر ۱ سال، ۱/۴۴درصد و از مجموع ۱۱۱ بز مرغز بالای ۱ سال ۲/۷ درصد از نظر آلودگی به نئوسپورا مثبت بودند، اما در بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری بین میزان

آلودگی و گروه‌های سنی دیده نشد ($p>0.05$). این یافته با نتایج مطالعه Ghattof در سال ۲۰۱۵ در کشور عراق که فراوانی آلودگی در گروه سنی بالای یک سال بیشتر از گروه سنی زیر یک سال بود و نیز مطالعه Cayvaz and Karatepe در سال ۲۰۱۱ که فراوانی آلودگی در گروه سنی بالای سه سال بیشتر از گروه سنی زیر سه سال بود همخوانی ندارد (۲۸)، همچنین با نتایج قره‌خانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ و ۲۰۱۹ همخوانی دارد (۱۱). همچنین در مطالعات Moor و همکاران در سال ۲۰۰۷ در آرژانتین (۱۹)، Gazzonis و همکاران در سال ۲۰۱۶ در ایتالیا (۲۳) و Uzeda و همکاران در سال ۲۰۰۷ در برزیل (۲۶) نیز مشابه مطالعه حاضر سن فاکتور مستعد کننده نبوده است.

از مجموع ۵۲ بز مرغز با سابقه سقط جنین ۷/۶۹ درصد از نظر آلودگی به نئوسپورا مثبت بودند در حالی‌که از مجموع ۱۲۸ بز مرغز بدون سابقه سقط جنین، هیچ کدام مثبت نبودند. در بررسی‌های آماری، ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی و سابقه سقط جنین دیده شد ($p<0.05$). در منابع منتشر شده محدودی به نقش این تک‌یاخته در ایجاد خسارات اقتصادی ناشی از سقط جنین در بز اشاره شده است. Altbuch و همکاران در سال ۲۰۰۷ شیوع سرمی ۱۵ درصد را در بزهای با سابقه سقط جنین و مرده‌زائی گزارش کردند (۲۹). بیشتر بزهای سرم مثبت در این مطالعه واجد سابقه سقط جنین بودند که این ارتباط از نظر آماری معنی‌دار بود و این یافته با مطالعه قره‌خانی و همکاران نیز همخوانی دارد (۱۵). در مطالعات مورنو و همکاران نیز این احتمال که نئوسپورا کانینوم می‌تواند عامل مهم سقط جنین در نشخوارکنندگان کوچک باشد، مطرح شده است. در مطالعات صورت گرفته روی جنین سقط شده بز در کشور ایتالیا ۸/۶ درصد از ۲۳جنین سقط شده و در اسپانیا ۸/۳ درصد از ۱۲ جنین سقط شده آلوده به نئوسپورا کانینوم بودند (۱۳). این مطالعه اولین بررسی جداسازی آنتی‌بادی‌های نئوسپوراکانینوم در بزهای مرغز بود. نتایج مطالعه نشان دادند که نئوسپورا کانینوم می‌تواند عامل سقط جنین و خسارات اقتصادی ناشی از آن در منطقه مورد مطالعه باشد. بدین ترتیب، مطالعات مولکولی و بیواسی در بزهای مبتلا به نئوسپوروزیس می‌تواند اطلاعات بیشتری را در مورد اثرات اقتصادی این انگل به دست دهد که در تدوین برنامه‌های کنترلی مفید خواهد بود (۱۵).

در رابطه با نئوسپوروزیس می‌توانیم احتمال دهیم اگرچه در حال حاضر شیوع در حد پائینی است اما امکان افزایش آن وجود دارد. همچنین این نکته بایستی در نظر گرفته شود که اگر چنانچه در بزها نیز مشابه گاوان آلودگی در چندین آبستنی انتقال یابد، تمایل به افزایش خسارات در آینده ایجاد خواهد شد (۹). اگرچه نئوسپورا کانینوم در این مطالعه شیوع پائینی داشته است اما بایستی به سیاست‌های کنترلی جهت اجتناب از خطر گسترش آلودگی توجه نمود. همچنین مطالعات بیشتر جهت ارزیابی بهتر میزان شیوع در این حیوانات ضروری است.

References

1- Behzadi shahr babak M. Areview on Infectious Agent of Sheep and Goats Abortion in Iran. *NFVM*. 2019: 2(1): 102-113 [In Persion].

2- Gharekhani J, Yakhchali M, Esmaeilnejad B, Mardani K, Majidi G, Sohrabei A, *et al.* Seroprevalence and Risk Factors of Neosporacaninum and Toxoplasma gondii in Small Ruminants in Southwest of Iran. *Arch. Razi Inst*. 2018; 73(4): 305-310.

3- Villagra-Blanco R, Barrantes-Granados O, Montero-Caballero D, Romero-Zúñiga JJ, Dolz

G. Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neosporacaninum infections and associated factors in sheep from Costa Rica. *Parasite Epidemiol. Control*. 2019; 4(1): 1-7.

4- Nicolino RR, Capanema RO, Oliveira CSFD, Pastrana MEO, Lopes LB, Haddad JPA. Estimating the abortion risk difference in Neosporacaninum seropositive dairy cattle in Brazil. *Cienc. Rural*. 2015; 45(9): 1629-1633.

5- Anastasia D, Elias P, Nikolaos P, Charilaos K, Nektarios G. Toxoplasma gondii and Neosporacaninumseroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. *Vet parasitol*. 2013; 198(3-4): 387-390.

6- Kyaw T, Mokhtar AM, Ong BL, Hoe CH, Aziz AR, Aklilu E, *et al*. 2018. Seroprevalence of NeosporaCaninum in Sheep and Goats of GuaMusang District in Kelantan, Malaysia. *JTAS*. 2018; 41(1): 15-27.

7- Gökçe G, Mor N, Kırmizigul A, Bozukluhan K, Erkılıc E. The first report of seropositivity for Neosporacaninum in sheep from Turkey. *Isr. J. Vet. Med*. 2015; 70: 40-44.

8- Pinto AP, Bacha FB, Santos BS, Driemeier D, Antoniassi NA, Ribas NL, *et al*. Sheep abortion associated with Neosporacaninum in MatoGrosso do Sul, Brazil. *Pesqui. Vet*. 2012; 32(8): 739-742.

9- Silva MS, Uzêda RS, Costa KS, Santos SL, Macedo AC, Abe-Sandes K, *et al*. Detection of Hammondiaheydorni and related coccidia (Neosporacaninum and Toxoplasma gondii) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. *Vet parasitol*. 2009; 162(1-2): 156-159.

10- Figliuolo LPC, Rodrigues AAR, Viana RB, Aguiar DMD, Kasai N, Gennari SM. Prevalence of anti-Toxoplasma gondii and anti-Neosporacaninum antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. *Small Rumin. Res*. 2004; 55(1-3): 29-32.

11- Gharekhani J, Yakhchali M. Neosporacaninum infection in dairy farms with history of abortion in west of Iran. *Vet. Anim. Sci*. 2019; 8: 100071.

12- da Silva Andrade G, Bruhn FRP, Rocha CMBM, de SáGuimarães A, Gouveia AMG, Guimarães AM. Seroprevalence for Neosporacaninum in goats of Minas Gerais state, Brazil. *Res in Vet Sci*. 2013; 94(3): 584-586.

13- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. Occurrence of Neosporacaninum and Toxoplasma gondii infections in ovine and caprine abortions.*Vet Parasitol.* 2012; 187(1-2): 312-318.

14- Latifi M, Razmkabir M. Estimation of genetic trends for body weight traits in Markhoz goat at different ages.Spanish. *journal of agricultural research*. 2019; 17(1): 12-19.

15- Gharekhani J, Esmaeilnejad B, Rezaei H, Yakhchali M, Heidari H, Azhari M. Prevalence of anti-Neosporacaninum antibodies in Iranian goats. *Annals of parasitology*. 2016; 62(2): 71-82.

16- Jung B, Lee S, Kwak D. Evidence of Neosporacaninum exposure among native Korean goats (Capra hircuscoreanae). *Veterinarni Medicina*. 2014; 59(12): 637-640.

17- Villagra-Blanco R, Wagner H, Dolz G, Romero-Zúñiga JJ, Taubert A, Wehrend A, *et al*. First report on the seroprevalence of Neosporacaninum in goats from the Federal State of Hesse, Germany.Berl. *Munch. Tierarztl. Wschr*. 2017; 130(1): 517-522.

18- Iovu A, Györke A, Mircean V, Gavrea R, Cozma V. Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neosporacaninum in dairy goats from Romania. *Vet Parasitol*. 2012; 186(3-4): 470-474.

19- Moore DP, De Yaniz MG, Odeón AC, Cano D, Leunda MR, Späth EAJ, *et al*. Serological evidence of Neosporacaninum infections in goats from La Rioja Province, Argentina. *Small Rumin. Res*. 2007; 73(1-3): 256-258.

20- Gos ML, Manazza JA, Späth EJ, Pardini L, Fiorentino MA, Unzaga JM, *et al*. Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neosporacaninum infections in goats from two Argentinean provinces. *Open J. Vet*. 2017; 7(4): 319-322.

21- Ghattof HH, Faraj AA. Seroprevalence of Neosporacaninum in goats in Wasit province, Iraq. *Int. j. curr. microbiol*. 2015; 4: 182-191.

22- Rodriguez-Ponce E, Conde M, Corbera JA, Jaber JR, Ventura MR, Gutiérrez C. Serological survey of antibodies to Toxoplasma gondii and Neosporacaninium in goat population in Canary Islands (Macaronesia Archipelago, Spain). *Small Rumin. Res*. 2017; 147: 73-76.

23- Gazzonis AL, Garcia GA, Zanzani SA, Mora LMO, Invernizzi A, Manfredi MT. Neosporacaninum infection in sheep and goats from northeastern Italy and associated risk factors. *Small Rumin. Res*. 2016; 140: 7-12.

24- Bartova E, Sedlak K. Toxoplasma gondii and Neosporacaninum antibodies in goats in the Czech Republic. *Vet. Med*. 2012; 57: 111-114.

25- Liu ZK, Li JY, Pan H. Seroprevalence and risk factors of Toxoplasma gondii and Neosporacaninum infections in small ruminants in China.

Prev. Vet. Med. 2015; 118(4): 488-492.

26- Uzêda RS, Pinheiro AM, Fernández SY, Ayres MCC, Gondim LFP, Almeida MAOD. Seroprevalence of Neosporacaninum in dairy goats from Bahia, Brazil. *Small Rumin. Res*. 2007; 70(2-3): 257-259.

27- Braz BMA, Valente JDM, Villalobos EMC, Lara MCCSH, Machado CAL, Barbosa IC, *et al*. Seroepidemiology of Neosporacaninum among goats (Capra hircus) in the state of Paraíba, northeastern Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2018; 70(1): 147-152.

28- Cayvaz M, Karatepe M. Seroprevalence of Neosporacaninum in goats in Niğde province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2011; 17(6): 935-939.

29- Altbuch JA, Schofield MJ, Porter CA, Gavin WG. Neosporacaninum: A successful testing and eradication program in a dairy goat herd. *Small Rumin. Res*. 2012; 105(1-3): 341-344.

Serological survey of *Neospora caninum* in female Markhoz goats of Saqqez district , Kurdistan

Hamed Moosawi[1], Ghazaaleh Adhami[2*]

1- Veterinary graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Veterinary Pathobiology, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj, Iran.

Receive December 11, 2020; Revise: February 13, 2021; Accept: March 5, 2021

Summary

Neospora caninum is a livestock protozoan parasite that causes reproductive damages in sheep and goats. *Neospora caninum* infection is a long-term complication and the host will be lifelong infected, and abortions caused by *Neospora caninum* may occur after any pregnancy after infection. The present study aimed to investigate the seroprevalence of *Neospora caninum* in female Markhoz goats of Saqqez County. To this end, we tested 180 serum samples by ELISA. Among them, 4 serum samples (2.2%) were positive. One (1.44%) out of 69 Markhoz goats under 1 years old and 3 (2.7%) out of 111 Markhoz goats over 1 years old were positive in terms of infection with *Neospora caninum*. The statistical examination indicated no significant relationship between the rate of infection and age groups ($p>0.05$). The statistical analyses also indicated a significant relationship between the rate of infection in sheep and history of abortion ($p<0.05$). The research results found the low environmental exposure of native goats to *Neospora caninum*. Despite the low prevalence of *Neospora caninum* in the present study, great attention should be paid to control strategies to avoid the risk of infection. Furthermore, more studies should be conducted to better evaluate its prevalence in these animals.

Key words: *Neospora caninum , ELISA , Markhoz , Saqqez, Kurdistan*

تعیین خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به ونکومایسین جدا شده از شیر خام گاو

حمید آدیم[۱]، راضیه پرتوی*[۱]، حمیدرضا کاظمینی[۱]، راحم خوشبخت[۲]، مریم عزیزخانی[۱]

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل، آمل، ایران.
۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل، آمل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۵ بهمن ۱۳۹۹، بازنگری: ۲ اسفند ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس عامل اصلی اندوکاردیت، سپسیس و مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی حساسیت به اریترومایسین در ۵۰ سویه استافلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین (VRSA) و حساس به ونکومایسین (VSSA) جدا شده از شیر خام گاو و نیز تعیین انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌ها می‌باشد. براث مایکرودایلوشن به منظور تعیین مقاومت به ونکومایسین و تعیین حداقل غلظت مهار رشد اریترومایسین مورد استفاده قرار گرفت. حضور ژن‌های ermA، ermB، ermC و msrA کدکننده مقاومت به اریترومایسین از طریق PCR مورد بررسی قرار گرفت. ۸۴ درصد از جدایه‌ها حساس و ۱۶ درصد مقاوم به ونکومایسین بودند. یک جدایه نسبت به اریترومایسین حساس بود و هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشت. ۹۰ درصد جدایه‌ها نسبت به اریترومایسین مقاوم بودند که از این تعداد ۲۴/۴ درصد هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشتند، در حالی که ۵۱/۱ درصد از نظر ژن ermB مثبت بودند. ermA در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد. حضور همزمان ژن‌های مقاومت در ۸ جدایه مشاهده شد. هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و MIC اریترومایسین مشاهده نشد. ۳۷/۵ درصد از جدایه‌های VRSA هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند، در حالی که ۲۵ درصد دارای دو ژن مقاومت بودند. میانگین MIC اریترومایسین در جدایه‌های VRSA بالاتر از جدایه‌های VSSA بود. تمام جدایه‌های VRSA نسبت به اریترومایسین نیز مقاوم بودند. هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و حساسیت به ونکومایسین مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: *اریترومایسین، استافیلوکوکوس اورئوس، ژن مقاومت به اریترومایسین، شیر خام، ونکومایسین*

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

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری پاتوژن فرصت‌طلب می‌باشد که به میزان زیادی در محیط پراکنده بوده و مسئول ایجاد عفونت‌هایی چون سلولیت، اندوکاردیت، پیودرم، پنومونی، استئومیلیت، عوارض مربوط به زخم‌های جراحی و سپسیس می‌باشد. این باکتری همچنین عامل ایجاد آبسه‌ها، ورم پستان و سندوم شک سمی در گاوها می‌باشد (۵-۱). سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده انتروتوکسین‌های مقاوم به دما موجب مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌شوند که یک سوم سندروم‌های گاستروانتریت غذازاد را در برمی‌گیرد (۳، ۶، ۷). یک ویژگی نامطلوب سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم بودن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل تولید یک سد اگزوپلی ساکارید و ایجاد محافظت از طریق مایکروآبسه‌ها و دریافت مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک از طریق فاکتورهای ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها و یا ترانس پوزون‌ها می‌باشد (۹-۷). برخی از مطالعات نشان دادند که اغلب سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مواد غذایی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند (۱۰-۸).

گلیکوپپتید ونکومایسین نقش بسیار مهمی در درمان عفونت‌های مرتبط با استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین دارد. استفاده بیش از حد یا استفاده نادرست از این آنتی‌بیوتیک موجب ایجاد استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به ونکومایسین (VRSA) در جهان می‌شود (۱۳-۱۱). بر اساس سازمان بهداشت جهانی، VRSA و استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت متوسط به ونکومایسین (VISA) به‌عنوان اولویت‌های اصلی "پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک" در نظر گرفته می‌شوند که آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای آنها به صورت اضطراری مورد نیاز است (۱۴).

ماکرولیدها مانند اریترومایسین برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس‌های مقاوم به چندین دارو به طور وسیعی استفاده می‌شوند (۱۵، ۱۶). اثر ضد میکروبی اریترومایسین بر ضد استافیلوکووس اپیدرمیدیس مقاوم به ونکومایسین قبلاً گزارش شده است (۱۷). اگرچه، تجویز بیش از حد و طولانی مدت این آنتی‌بیوتیک موجب افزایش سویه‌های مقاوم در پاتوژن‌های انسانی و حیوانات مزرعه شده است (۱۵، ۱۶). چندین مطالعه در رابطه با پایه ژنتیکی مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از طیور، سگ سانان و نمونه‌های بالینی قبلاً گزارش شده است (۱۵، ۱۶، ۱۸). شایع‌ترین مکانیسم‌های مربوط به مقاومت اریترومایسین تولید متیلاز ریبوزومال و سیستم افلاکس کد شده به ترتیب توسط ژن‌های erm و msr می‌باشد (۱۹، ۲۰).

غذا می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی را از طریق انتقال پاتوژن‌های مقاوم غذازاد یا فاکتورهای مقاومت از میکروفلور غذا به پاتوژن‌ها در بدن انسان منتقل کند (۷). علاوه بر این، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان یا پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی در حیوانات تولیدکننده غذا مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در سویه‌های مختلف باکتریایی ایجاد می‌کند (۸). استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان فلور نرمال بینی، پوست و موی انسان و حیوانات بوده و به راحتی از طریق افراد در تماس با غذا به غذا منتقل می‌شود (۳).

مطالعاتی در رابطه با مقاومت به ونکومایسین و اریترومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد (۱۰، ۲۱، ۲۲). همچنین، تعدادی از نویسندگان حساسیت آنتی‌بیوتیکی را در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام در ایران گزارش کرده اند (۲۳،۲۴). اگرچه اطلاعات

محدودی در رابطه با خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های VRSA و VSSA جدا شده از شیر خام در ایران وجود دارد. مطالعه حاضر به ارزیابی حساسیت به اریترومایسین در سویه‌های VRSA و VSSA جدا شده از شیر خام و تعیین انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان این جدایه‌ها می‌پردازد.

مواد و روش کار

جدایه‌های باکتریایی: پنجاه سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو از خرده فروشی‌های استان مازندران در بازه زمانی دسامبر ۲۰۱۷ تا فوریه ۲۰۱۸ جمع‌آوری شد و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (۳۲). این جدایه‌ها در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران نگهداری شدند. جدایه‌ها در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز (BHI broth) دوبار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای یک دوره ۱۸ ساعته کشت داده شدند (Merck, Darmstadt, Germany).

تست حساسیت به ونکومایسین: سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به منظور ارزیابی حساسیت به ونکومایسین با استفاده از روش براس مایکرودایلوشن و بر اساس روش CLSI بررسی شدند (۳۳). جدایه‌های با MIC بیشتر مساوی ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان VRSA و جدایه‌های با MIC کمتر مساوی ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان VSSA طبقه‌بندی شدند.

تعیین حداقل غلظت مهاری رشد اریترومایسین: روش براس مایکرودایلوشن در محیط کشت مولر هینتون براس به منظور تعیین MIC اریترومایسین (Sigma, Steinheim, Germany) در رنج ۰/۰۳۲ تا ۶۷/۱۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر طبق روش CLSI انجام شد (۳۳). میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استریل برای این تست مورد استفاده قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به میکروپلیت منتقل شد و سپس ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر اضافه شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، MIC که همان کمترین غلظت اریترومایسین بدون رشد قابل مشاهده است، تعیین گردید. شاخص‌های زیر برای اریترومایسین مورد استفاده قرار گرفت: MIC بیشتر مساوی ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر سویه مقاوم، MIC برابر با ۱ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سویه حد وسط و MIC کمتر مساوی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر سویه حساس می‌باشد.

جستجوی ژن‌های کدکننده مقاومت به اریترومایسین: حضور ژن‌های ermA، ermB، ermC و msrA که مسئول ایجاد مقاومت به اریترومایسین هستند در جدایه‌های استافیلوکوکس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. کلونی‌های خالص سویه‌های جدا شده در محیط BHI در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و به منظور استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. کیت استخراج DNA باکتریایی و براساس دستورات شرکت سازنده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت (Gene Transfer Pioneers, Tehran, Iran). پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. دستگاه PCR ترمال سایکلر به ترتیب زیر تنظیم شد: دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل از دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۱ درجه سانتی‌گراد (برای msrA در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، و تکثیر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در ادامه تکثیر محصولات ناکامل به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه

سانتی‌گراد. تست PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر PCR 1×، $MgCl_2$ ۲ میلی‌مولار (CinnaGen, Tehran, Iran)، dntp ۰/۲ میلی‌مولار (CinnaGen, Tehran, Iran)، هریک از پرایمرها به میزان ۱۰ پیکومولار (CinnaGen, Tehran, Iran)، DNA پلیمراز ۱ واحد (CinnaGen, Tehran, Iran) و نمونه DNA ۲ میکرولیتر و به میزان کافی از آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر می‌باشد. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد (وزنی/حجمی) در بافر تریس استات EDTA (۸۰ دقیقه، ۹۲ ولت) شناسایی شد. محصولات PCR با استفاده از اتیدیوم بروماید (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) رنگ شدند و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت UV (Technogen, Tehran, Iran) مشاهده شدند. سایز بخش‌های تکثیر شده با مقایسه با مارکر استاندارد با باندهای ۱۰۰ جفت بازی (CinnaGen, Tehran, Iran) تعیین شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده به منظور جستجوی ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام گاو

نام پرایمر	توالی پرایمر (´۵ به ´۳)	ژن هدف	سایز محصول (جفت باز)	منبع
ermA-F	TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT	*ermA*	۱۳۹	۱۹
ermA-R	CTACACTTGGCTTAGGATGAAA			
ermB-F	CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT	*ermB*	۱۴۲	۱۹
ermB-R	GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA			
ermC-F	AATCGTCAATTCCTGCATGT	*ermC*	۳۰۰	۳۴
ermC-R	TAATCGTGGAATACGGGTTTG			
msrA-F	GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG	*msrA*	۹۴۰	۳۵
msrA-R	AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT			

آنالیز آماری: تست غیر پارامتریک من ویتنی یو تست به منظور ارزیابی داده‌های کمی مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های کیفی با استفاده از تست دقیق فیشر آنالیز شد و به‌صورت میزان بروز دقیق و نسبی نشان داده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۵ مورد بررسی قرار گرفت. برای تمام آنالیزها، $P<0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

تعداد ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌ها براساس حساسیت نسبت به ونکومایسین ارزیابی شدند و به دو گروه VRSA و VSSA طبقه‌بندی شدند. از ۵۰ جدایه مورد بررسی،

۴۲ مورد (۸۴ درصد) حساس به ونکومایسین بودند. مقاومت به ونکومایسین در ۸ جدایه (۱۶ درصد) مشاهده گردید.

جدول ۲- حساسیت به اریترومایسین و انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام گاو

فنوتیپ مقاومت	MIC (µg/ml)	*ermA* (%)	*ermB* (%)	*ermC* (%)	*msrA* (%)	*ermB/ermC* (%)	*ermB/msrA* (%)	فاقد ژن مقاومت	تعداد سویه‌ها (٪)
حساس	۰/۲۶۲	-	-	-	-	-	-	۱ (۲)	۱ (۲)
حد واسط	۱/۰۴۸	-	۱ (۲)	-	-	-	-	۱ (۲)	۲ (۴)
	۲/۰۹۷	-	۱ (۲)	-	-	-	-	۱ (۲)	۲(۴)
مقاوم	۴/۱۹۴	-	۵ (۱۰)	-	-	-	-	۳ (۶)	۸ (۱۶)
	۸/۳۸۸	-	۳ (۶)	۱ (۲)	-	۱ (۲)	۲ (۴)	۱ (۲)	۸ (۱۶)
	۱۶/۷۷۷	-	۴ (۸)	۱ (۲)	-	۳ (۶)	-	-	۸ (۱۶)
	۳۳/۵۵۴	-	۸ (۱۶)	-	۱ (۲)	۱ (۲)	۱ (۲)	۷ (۱۴)	۱۸ (۳۶)
	۶۷/۱۰۸	-	۳ (۶)	-	-	-	-	-	۳ (۶)
تعداد سویه‌ها (٪)	-	-	۲۵ (۵۰)	۲ (۴)	۱ (۲)	۵ (۱۰)	۳ (۶)	۱۴ (۲۸)	۵۰ (۱۰۰)

حساسیت ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو نسبت به اریترومایسین و انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. رنج MIC اریترومایسین در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۲۶۲ تا ۶۷/۱۰۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. تنها یک جدایه با MIC ۰/۲۶۲ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد که نسبت به اریترومایسین حساس گزارش گردید و هیچ یک از ژن های مقاومت به اریترومایسن را نداشت. چهار جدایه از نظر مقاومت به اریترومایسین حد وسط بودند. درصد بسیار بالایی از جدایه‌ها (۹۰درصد) نسبت به اریترومایسین مقاوم بودند که از این تعداد، ۲۴/۴ درصد هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشتند و ۵۱/۱ درصد دارای ژن ermB بودند. ۱۷/۸ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین (ERSA) دو ژن مقاومت به اریترومایسین را حمل می‌کردند. شایع‌ترین ژن مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌ها ermB بود که در ۵۰ درصد جدایه‌ها وجود داشت. ژن ermC در دو جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد، در حالی که یک جدایه دارای ژن msrA بود. ErmA در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد. حضور همزمان ژن‌های مقاومت در ۸ جدایه (۱۶ درصد) مشاهده شد، در حالی که ۵ جدایه دارای ژن‌های ermB و ermC بودند و ۳ جدایه نیز دارای ermB و msrA بودند. ۱۴ جدایه (۲۸ درصد) هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند. MIC اریترومایسین در تمام ۸ جدایه که حضور همزمان ژن‌های مقاومت را نشان دادند،

مساوی یا بیشتر از ۸/۳۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. براساس تست دقیق فیشر، هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و MIC اریترومایسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۳- بروز (تعداد و درصد) حساسیت به اریترومایسین و ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌های VRSA و VSSA از شیر خام گاو

	VSSA (۴۲)	VRSA (۸)	P-value
ermA	۰	۰	-
ermB	۲۳ (٪ ۵۴/۷۶)	۲ (٪۲۵)	۰/۲
ermC	۲ (٪ ۴/۷۶)	۰	۰/۷
msrA	۰	۱ (٪ ۱۲/۵)	۰/۱
ermB/ermC	۴ (٪ ۹/۵۲)	۱ (٪ ۱۲/۵)	۰/۵
ermB/msrA	۲ (٪ ۴/۷۶)	۱ (٪ ۱۲/۵)	۰/۴
فاقد ژن مقاومت	۱۱ (٪ ۲۶/۱۹)	۳ (٪ ۳۷/۵)	۰/۶
MIC ± SD	۱۸/۱۴ ± ۱۹/۷۲	۱۱/۶۴ ± ۲۷/۲۶	۰/۱
فنوتیپ مقاومت:			
ESSA			
EISA	۱ (٪ ۲/۳۸)	۰	
ERSA	۴ (٪ ۹/۵۲)	۰	
	۳۷ (٪۸۸)	۸ (٪۱۰۰)	

استافیلوکوکوس اورئوس حساس به اریترومایسین=ESSA
استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت حد واسط به اریترومایسین=EISA
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین=ERSA

بروز حساسیت به اریترومایسین و ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس VRSA و VSSA در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. ErmB به‌ترتیب در ۵۴/۷۶ درصد و ۲۵ درصد از VSSA و VRSA ها یافت شد. ۳۷/۵ درصد از جدایه‌های VRSA هیچ

یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند، در حالی که ۲۵ درصد دارای دو ژن مقاومت بودند. میانگین MIC اریترومایسین در جدایه‌های VRSA بالاتر از جدایه‌های VSSA بود، اما این تفاوت معنادار نبود ($P = 0.1$). ذکر این نکته جالب به نظر می‌رسد که تمام جدایه‌های VRSA (۱۶ درصد) نسبت به اریترومایسین نیز مقاوم بودند. در میان این جدایه‌ها، دو جدایه دارای ermB بودند، یک جدایه ermB و ermC داشت و یک جدایه ermB و msrA و یک جدایه نیز msrA داشت. سه جدایه VRSA و ERSA هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند. بر اساس تست دقیق فیشر، هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و حساسیت به ونکومایسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

درصد بالایی (۸۴ درصد) از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه حاضر نسبت به ونکومایسین حساس بودند، در حالی که ۱۶ درصد مقاوم بودند. ونکومایسین یک آنتی‌بیوتیک با اثر منحصر به فرد علیه عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد (۱۱). تمام جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی در ترکیه، عفونت‌های جوجه‌های گوشتی در دانمارک، شیر خام در الجزایر و غذاهای عرضه شده در فروشگاه‌ها در چین نسبت به ونکومایسین حساس بودند (۱۰، ۱۸، ۲۵، ۲۶). این یافته‌ها مطابق با نتایج مطالعه السايد و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۱۸ می‌باشد که نشان دادند ۱۳/۸ درصد از جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند. گون و همکاران (۳) در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای که روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از محصولات گوشت و شیر در ترکیه انجام دادند، نشان دادند که شیوع مقاومت به ونکومایسین ۲۱/۷ درصد گزارش شد. در یک مطالعه در جنوب اتیوپی، ۲۳/۵ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ظروف انتقال شیر نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند که مطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۲). میزان شیوع بالا برای مقاومت به ونکومایسین (۵۰ درصد) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با منشأ آب‌های مناطق تفریحی و شن‌های ساحلی گزارش شد (۹). فاکتورهایی مانند استفاده بیش از حد یا استفاده نادرست از این آنتی‌بیوتیک که موجب ایجاد فشار انتخابی می‌شود، درمان طولانی بیماران با عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و عفونت با انتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین و نیز در دسترس بودن ونکومایسین در داروخانه‌ها بدون نیاز به تجویز پزشک موجب ایجاد سویه‌های VRSA در سراسر جهان شده است (۱۱، ۲۷). مقاومت به ونکومایسین می‌تواند به دلیل تغییر در سنتز پپتیدوگلایکان با افزایش باقیمانده دی‌آلانین و ضخیم شدن دیواره سلولی باشد (۱۱، ۲۷). مصرف شیر خام دارای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک اثرات درمان با آنتی‌بیوتیک را در موارد عفونت در مصرف‌کننده ضعیف می‌کند (۲۶).

تنها یکی از ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام نسبت به اریترومایسین حساس بود، ۸ درصد حد وسط بوده، در حالی که درصد خیلی زیادی از استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به اریترومایسین (۹۰ درصد) در این مطالعه گزارش شدند. مقاومت به اریترومایسین در مطالعه حاضر بالاتر از موارد گزارش شده توسط داکا و همکاران (۲) در سال ۲۰۱۲، ماتالا و همکاران (۲۶) در سال ۲۰۱۹و شلگلوا و همکاران (۲۹) در سال ۲۰۰۸ بود، در حالی که کمتر از میزان گزارش شده

توسط زمانتار و همکاران (۵) در سال ۲۰۱۳ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از بیمارستان‌ها در لیبی بود. این تفاوت را می‌توان به این مسئله نسبت داد که جدایه‌های بالینی نسبت به جدایه‌های مواد غذایی مقاومت بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۸). این تفاوت‌ها در میزان مقاومت به اریترومایسین را می‌توان به استفاده متنوع از این آنتی‌بیوتیک در کشورهای مختلف، برنامه‌های کنترل عفونت توسط دولت‌ها، سیاست‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک و اثر تفاوت‌های جغرافیایی نسبت داد (۱۲، ۱۶، ۱۹). شیوع مقاومت به اریترومایسین در این مطالعه قابل مقایسه با مورد گزارش شده در آفریقای جنوبی می‌باشد (۹). ۷۶ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در لهستان به اریترومایسین مقاوم و ۲۴ درصد حد وسط بودند (۲۰). انتقال جدایه‌های مقاوم از انسان‌های بیمار به مرتع یا محیط، شیردوشی دستی حیوانات، عدم رعایت اصول بهداشتی قبل و بعد از شیردوشی، استفاده بیش از حد از برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور درمان عفونت‌های حیوانات و نیز استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد در غذای حیوانات دلایل افزایش میزان مقاومت در استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱،۷،۲۶).

ژن ermB فاکتور اصلی مقاومت به اریترومایسین (۵۰ درصد) و سپس ermC (۴ درصد) و msrA (۲ درصد) بوده است. ErmA در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد. ۱۶ درصد از جدایه‌ها دارای دو ژن مقاومت به طور همزمان بودند، در حالی که ۲۸ درصد هیچ یک از ژن‌ها را نداشتند. مشابه نتایج مطالعه حاضر، آکانبی و همکاران (۹) در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که ژن ermB در ۷۱/۴ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از آب‌ها و سواحل یافت شد، در حالی که ermA و ermC وجود ندشت. ErmA در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از غذا، بیمارستان‌ها و جوامع در الجزایر یافت نشد (۸). از طرف دیگر، ermA شایع‌ترین ژن یافت شده در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از طیور در دانمارک، عفونت‌های انسانی در ایالات متحده امریکا و جدایه‌های بالینی در ترکیه بوده است (۱۶، ۱۸، ۲۸). این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل منشأ متفاوت جدایه‌ها باشد. ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌توانند از طریق ترانس‌پوزون‌ها، پلاسمیدها و انتگرون‌ها از انسان‌ها به حیوانات یا شیر منتقل شود (۷، ۹، ۱۰، ۲۱). تمام استافیلوکوکوس‌های مقاوم به اریترمایسین جدا شده از غذا حداقل دارای یکی از ژن‌های مقاومت می‌باشند (۲۹)، در حالی که در مطالعه حاضر، ۲۴/۴ درصد از جدایه‌های ERSA هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشتند. این نتایج با نتایج پیاتکوسکا و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۲ مطابقت دارد. ۴۲ از ERSA در لیبی هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند (۵). این مسأله را می‌توان به سایر ژن‌های مقاومت به اریترومایسین مانند A-B Ere و mef در جدایه‌ها، موتاسیون‌های نقطه‌ای، سنتز و فعالیت آنزیم‌های غیر فعال کننده ماکرولید و تولید بیوفیلم نسبت داد (۱۶، ۲۰، ۲۱). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه ستین و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۰ مغایرت دارد که نشان دادند که ترکیب مکانیسم‌های مقاومت به اریترومایسین در میان استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از بیمارستان‌ها در ترکیه نادر است. حضور همزمان دو ژن erm در استافیلوکوکوس‌ها قبلاً گزارش شده است (۲۹، ۳۰). MIC هر ۸ جدایه که به صورت همزمان دو ژن مقاومت را داشتند، مساوی یا بزرگتر از ۸/۳۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. پیاتکوسکا و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که جدایه‌های با حضور همزمان دو متیلاز ریبوزومال متفاوت میزان MIC بیشتر از ۱۰۲۴

میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند.

تمام جدایه‌های VRSA در این مطالعه نسبت به اریترومایسین مقاوم بودند. میانگین MIC اریترومایسین در جدایه‌های VRSA بالاتر از جدایه‌های VSSA بود. الساید و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که ۸۱/۸ درصد از جدایه‌های VRSA مقاوم به اریترومایسین بودند. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، تحقیقات گذشته نشان داد که جدایه‌های VRSA از شیر گاو و بز و نیز یک بیمارستان به انواع متنوعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند (۱، ۳۱). رحیمی پور و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۱۸ نیز گزارش کردند که اغلب جدایه‌های VRSA همچنین نسبت به متی‌سیلین مقاوم بودند و مقاومت نسبت به سایر مواد ضد میکروبی نیز نشان دادند.

در مجموع، میزان مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام نه نگران کننده و نه قابل اغماض است. اگرچه میزان مقاومت به اریترومایسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام در ایران هشدار دهنده است. تمام جدایه‌های VRSA نسبت به اریترومایسین نیز مقاوم بودند که نشان‌دهنده پتانسیل بالای خطر برای مصرف‌کننده است. جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام ناقلین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین به ویژه ermB هستند. بنابراین نیاز اضطراری برای ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در غذا، حیوانات تولید کننده غذا و انسان و نیز نظارت بر رعایت اصول بهداشتی در طی شیردوشی و انتقال شیر خام وجود دارد. یک مطالعه در مقیاس بزرگ در آینده به منظور ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و اساس ژنتیکی آها به منظور درک دقیق و عمیق از موضوع لازم می‌باشد.

سپاسگزاری

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه‌ی پژوهشی (گرنت) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردیده است.

References

1- Bhattacharyya D, Banerjee J, Bandyopadhyay S, Mondal B, Nanda PK, Samanta I, Mahanti A, Das AK, Das G, Dandapat P, Bandyopadhyay S. First report on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microb Drug Resist*. 2016; 22(8): 675-681.

2- Daka D, G/silassie S, Yihdego D. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012; 11: 26-32.

3- Guven K, Mutlu MB, Gulbandilar A, Cakir P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. *J Food Saf*. 2010; 30: 196–212.

4- Mohammed J, Ziwa MH, Hounmanou YMG, Kisanga A, Tuntufye HN. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tanzania. *Hindawi Int J Microbiol*. 2018; 2018: 1-6.

5- Zmantar T, Bekir K, Elgarsadi SI, Hadad O, Bakhrouf A. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity in pediatric service. *Afr J Microbiol Res.* 2013; 7: 4414-4421.

6- Long SS, Prober CG, Fischer M. Principles and practice of pediatric infectious diseases. *Philadelphia, Elsevier*; 2018.

7- Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol*. 2009; 26(3): 278–282.

8- Achek R, Hotzel H, Cantekin Z, Nabi I, Hamdi TM, Neubauer H, El-Adawy H. Emerging

of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. *BMC Res Notes*. 2018; 11(1): 663-670.

9- Akanbi OE, Njom HA, Fri J, Otigbu AC, Clarke AM. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from recreational waters and beach sand in Eastern Cape province of South Africa. *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14(9): 1001-1016.

10- Wang W, Baloch Z, Jiang T, Zhang C, Peng Z, Li F, Fanning S, Ma A, Xu J. Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China. Front Microbiol. 2017; 8: 2256-2267.

11- Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(Suppl 1): 16–23.

12- ElSayed N, Ashour M, Amine AEK. Vancomycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in a rural setting, Egypt. *Germs.* 2018; 8(3): 134-139.

13- Huang SH, Chen YC, Chuang YC, Chiu SK, Fung CP. Prevalence of VISA and heterogenous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin MICs in Taiwan: *A multicenter surveillance study*. 2012-2013. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015; 49(5): 701-707.

14- World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *Washington, WA, USA: WHO*. 2007.

15- Boerlin P, Burnens AP, Frey J, Kuhnert P, Nicolet J. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Vet Microbiol*. 2001;79(2):155-169.

16- Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical Staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010; 43(6): 524–529.

17- Sanyal D, Johnson AP, George RC, Cookson BD, Williams AJ. Peritonitis due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet*. 1991; 337(8732): 54.

18- Aarestrup FM, Agersù Y, Ahrens P, Jùrgensen JCE, Madsen M, Jensen LB. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet Microbiol*. 2000; 74(4): 353-364.

19- Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 44(2): 231–238.

20- Piatkowska E, Piatkowski J, Przondo-Mordarska A. The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin in caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2012; 17(4): 633-645.

21- Pekana A, Green E. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from meat carcasses and bovine milk in abattoirs and dairy farms of the Eastern Cape, South Africa. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15: 2223-2234.

22- Rahimipour F, Ghazvini K, Youssefi M. Reports of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from Middle East countries. *Arch Clin Infect Dis*. 2018; 13(2): e59522.

23- Khodadadi P, Bijanzadeh M, Najafi A, Zarinpour V, Moshfe A, Ansari H. Antibiotic resistance and detection of femA gene in *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk. *Med Lab J*. 2016; 10(4): 40-45.

24- Sahebekhtiari N, Nochi Z, Eslampour MA, Dabiri H, Bolfion M. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiol Imm H*. 2011; 58(2): 113–121.

25- Aydin, N., Gultekyn, B., Eyygor, M., & Gurel, M. The Antibiotic resistance of Staphylococci isolated of clinical specimens. *Meandros Med Dent*. 2001; 2(3): 21-26.

26- Matallah AM, Bouayad L, Boudjellaba S, Mebkhout F, Hamdi TM, Ramdani-Bouguessa, N. *Staphylococcus aureus* isolated from selected dairies of Algeria: prevalence and susceptibility to antibiotics. *Vet World*. 2019; 12(2): 205-210.

27- Park JW, Lee H, Kim JW, Kim B. Characterization of infections with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility in South *Korea. Sci Rep*. 2019; 9: 6236-6245.

28- Nicola FG, Mcdougal LK, Biddle JW, Tenover FC. Characterization of erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* recovered in the United States from 1958 through 1969. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(11): 3024-3027.

29- Schlegelova J, Vlkova H, Babak V, Holasova M, Jaglic Z, Stosova T, Sauer P. Resistance to erythromycin of Staphylococcus spp. isolates from the food chain. *Veterinarni Medicina*. 2008; 53(6): 307-314.

30- Luthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(5): 966–969.

31- Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 1): 72-79.

32- Mahdavi F, Zaboli F, Khoshbakht R. Characteristics of erythromycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Int J Enteric Pathog*. 2019; 7(4): 121-125.

33- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. *Wayne, PA, USA: CLSI*; 2017.

34- Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. Erm (C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(5): 814-817.

35- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(9): 4089-4094.

Characterzation of erythromycin resistance phenotypes and genotypes among vancomycin sensitive and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk

Hamid Adim[1], Razieh Partovi[*1], Hamidreza Kazemeini[1], Rahem Khoshbakht[2], Maryam Azizkhani[1]

1- Assistant professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
2- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Receive: February 3, 2021; Revise: February 20, 2021; Accept: February 28, 2021

Summary

Staphylococcus aureus is the causing agent of endocarditis, sepsis and Staphylococcal food poisoning. The purpose of this study was to assess erythromycin sensitivity in 50 Vancomycin Resistant *S. aureus* (VRSA) and Vancomycin Sensitive *S. aureus* (VSSA) isolates from bovine raw milk and also to determine the distribution of erythromycin resistance genes among the isolates. Broth microdilution method was used to determine vancomycin resistance and minimum inhibitory concentration of erythromycin. The presence of the *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes encoding erythromycin resistance was examined by PCR. 84% of the isolates were susceptible while 16% were resistant to vancomycin. A single isolate of *S. aureus* was sensitive to erythromycin and did not possess any of the erythromycin resistance genes. 90% of the isolates were resistant to erythromycin, of which, no resistance gene were found in 24.4% and 51.1% were *ermB* positive. *ErmA* was not found in any of the isolates. Simultaneous presence of resistance genes was detected in eight isolates. There was not any significant relationship between erythromycin resistance genes and MIC_E. 37.5% of VRSA isolates contained none of the erythromycin resistance genes while 25% contained two resistance genes. Mean MIC_E of VRSA was higher than VSSA isolates. All of the VRSA isolates were also erythromycin resistant. There was no significant relationship between erythromycin resistance genes and vancomycin sensitivity.

Key words: *Erythromycin, S. aureus, Erythromycin-resistance gene, Raw milk, Vancomycin*

ردیابی آنتی‌بادی علیه تحت تیپ H5 آنفلوانزای پرندگان در زرده تخم اردک‌های بومی استان گیلان، ۱۳۹۹

محمدحسین فلاح مهرآبادی[۱]، حمیده نجفی[۲]، پوریا معتمد چابکی[۲]، حسین حسینی[۳]، عباس برین[۲]، زهرا ضیافتی کافی[۲]، علی هژبر راجعونی[۲]، ایرج اشرافی تمای[۲]، ناصر صدری[۲]، آرش قلیان‌چی لنگرودی[۲*]

۱- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ دی ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۷ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۵ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

آنفلوانزای پرندگان یکی از بیماری‌های مهم واگیر پرندگان می‌باشد که می‌تواند گونه‌های مختلفی از پرندگان صنعتی و بومی را درگیر نماید. در سال‌های اخیر گزارشات متعددی از شیوع تحت تیپ H5 آنفلوانزای فوق حاد پرندگان در طیور صنعتی بومی در کشور وجود داشته است. اردک‌سانان به‌عنوان مهم‌ترین مخزن این ویروس، نقش مهمی در همه‌گیرشناسی بیماری دارند. هدف از این مطالعه ردیابی آنتی‌بادی علیه ویروس‌های تحت تیپ H5 در زرده تخم اردک بومی می‌باشد. تعداد ۷۰ عدد تخم اردک از شهرستان‌های مختلف استان گیلان (رشت، انزلی، صومعه‌سرا، فومن، آستانه اشرفیه، لنگرود، و چابکسر) طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. فاز آبی تخم‌ها جدا گردید و سپس با آنتی‌ژن اختصاصی H5 و روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) استاندارد OIE مورد بررسی قرار گرفت. ۱۱/۴۳ درصد از نمونه‌ها دارای آنتی‌بادی علیه تحت تیپ H5 بودند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده چرخش ویروس‌های تحت تیپ H5 در جمعیت اردک‌های بومی شمال کشور می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *آنفلوانزای پرندگان، H5، شیوع، زرده، پاسخ سرمی، ممانعت از هماگلوتیناسیون*

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

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان توسط ویروس‌های تیپ آ آنفلوانزا متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده ایجاد می‌شود. تقسیم‌بندی تحت تیپ‌های ویروس‌های آنفلوانزا بر اساس دو آنتی‌ژن هماگلوتینین و نورآمینیداز می‌باشد. تا امروز ۱۶ تحت تیپ HA و ۹ تحت تیپ NA شناسایی شده که ۱۴۴ (۱۶*۹) تحت تیپ مختلف را ایجاد می‌کند (۱). آنفلوانزای پرندگان از دو جنبه دارای اهمیت می‌باشد: اول از جنبه بهداشت عمومی و قابلیت انتقال آن به انسان و دوم از جنبه اقتصادی و خسارت‌های ناشی از بیماری‌زایی و مرگ و میر که در پرندگان ایجاد می‌کند. سازمان بهداشت جهانی دام (OIE)، ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان را بر اساس بیماری‌زایی در پرندگان به دو پاتوتیپ تقسیم می‌کند. ویروس‌های با بیماری‌زایی پایین (LPAI) و ویروس‌های با بیماری‌زایی بالا (HPAI) که تحت عنوان آنفلوانزای فوق حاد بیان می‌شود. تا به امروز کلیه ویروس‌های با بیماری‌زایی بالا متعلق به دو تحت تیپ H5 و H7 می‌باشد، اما تمام تحت تیپ‌های H5 و H7 فوق حاد نیستند و برخی از آنها بیماری‌زایی پایینی دارند. تمامی تحت تیپ‌های H5 و H7 تحت عنوان آنفلوانزای اخطارکردنی بیان می‌شوند (۲). ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به‌طور طبیعی تعداد زیادی از پرندگان وحشی و اهلی، علی‌الخصوص پرندگان آبزی آزادپرواز را درگیر می‌نماید. این ویروس‌ها از بیش از ۹۰ گونه از پرندگان آزادپرواز موجود در ۱۳ راسته مختلف جدا شده‌اند. دو راسته غازسانان (اردک‌ها، غازها، و قوها) و سلیمسانان مثل پرندگان ساحلی (shorebirds) به‌عنوان مخازن اصلی ویروس‌های آنفلوانزا مطرح هستند. بیشتر عفونت‌های آنفلوآنزای پرندگان، در پرندگان مهاجر آبزی بیماری قابل تشخیص ایجاد نمی‌کنند؛ البته ویروس‌های فوق حاد H5N1 در این زمینه استثناء هستند.

در استان‌های شمالی کشور و به‌خصوص گیلان و مازندران، پرورش طیور بومی و به‌خصوص اردک به‌عنوان یکی از راه‌های کسب درآمد خانوارها بوده و بسیاری از خانوارها از این طریق کسب درآمد می‌کنند. در طی سال‌های گذشته رخدادهای آنفلوانزا در طیور بومی و صنعتی این استان موارد بالایی داشته است. با توجه به انتقال عمودی ویروس‌های آنفلوانزا از طریق تخم پرندگان، در این مطالعه به بررسی میزان شیوع آنفلوانزای H5 در تخم اردک‌های بومی استان گیلان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش: مطالعه مقطعی حاضر در بهار و تابستان سال ۱۳۹۹ و در استان گیلان انجام گرفت. محدوده جغرافیایی مورد بررسی در این مطالعه، شهرستان‌های استان گیلان (رشت، انزلی، صومعه‌سرا، فومن، آستانه اشرفیه، لنگرود و چابکسر) به مساحت ۱۴۰۴۴ کیلومتر مربع بود. در این مناطق بازارهای محلی بسیاری برای داد و ستد طیور بومی و محلی وجود دارد و به دلیل شرایط آب و هوایی هر ساله محل ورود و اقامت بسیاری از پرندگان مهاجر هم می‌باشد. ۷۰ عدد تخم اردک از ۷ شهرستان و از هر شهرستان ۱۰ عدد تخم اردک جمع‌آوری گردید. این ۱۰ تخم اردک از ۱۰ شخص مختلف از بازار خریداری شد.

استخراج از زرده و آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI): ابتدا هر دو انتهای تخم اردک با بتادین ۱۰ درصد استریل شده سپس با پنس استریل در کنار شعله در دو انتها سوراخ شدند و سفیده آنها به‌طور کامل از زرده آنها جدا شده و زرده در داخل فالکون استریل ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس به هر زرده معادل حجم آن سرم

فیزیولوژی استریل اضافه گردید. بعد از همگن شدن کامل زرده با سرم فیزیولوژی، از هر زرده ۰/۵ میلی‌لیتر برداشت و به درون دو میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. هر نمونه به خوبی ورتکس شده یکی از آنها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از انجام سانتریفیوژ فاز بالای آنها جداسازی شده، به میکروتیوب جدیدی منتقل و جهت نگهداری تا زمان آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آزمون HI با استفاده آنتی‌ژن H5 بر اساس دستورالعمل سازمان دامپزشکی انجام شد. ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین به هر گوده از میکروپلیت اضافه و سپس ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر سرم به گوده اول اضافه نموده و بر اساس log2 رقت‌سازی انجام شد. میزان ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن با تیتر ۴ واحد هماگلوتینین به هر گوده افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در آخر گلبول‌های قرمز به هر گوده افزوده و مجدداً انکوبه شد. تیتر آنتی‌بادی محاسبه و نمونه‌های بالای تیتر ۴ مثبت در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Office Excel مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

تعداد ۸ زرده از مجموع ۷۰ زرده بررسی شده (شیوع برابر ۱۱/۴۳ درصد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر ۱/۵-۳/۲۱ درصد) در آزمایشات سرم مثبت بودند و آنتی‌بادی علیه H5 در زرده تخم اردک یافت گردید. بیشترین موارد سرم مثبت در شهرستان انزلی با ۳۰ درصد موارد (۳ مورد از ۱۰ مورد) یافت گردید و در دو شهرستان فومن و آستانه اشرفیه، آنتی‌بادی در زرده تخم اردک جمع‌آوری شده ردیابی نگردید.

جدول ۱- موارد مثبت میزان حضور آنتی‌بادی علیه H5 زرده تخم اردک در استان گیلان

نام شهرستان	نمونه مثبت (از ۱۰ عدد)	درصد نمونه‌های مثبت
رشت	۲	۲۰
انزلی	۳	۳۰
فومن	۰	۰
صومعه سرا	۱	۱۰
آستانه اشرفیه	-	۰
لنگرود	۱	۱۰
چابکسر	۱	۱۰
جمع کل	۸	۱۱/۴۳

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات سرو اپیدمیولوژیک با هدف قرار دادن آنتی‌بادی خاص علیه ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان معمولاً برای جمع‌آوری شواهدی از عفونت یا ارزیابی

اثرات واکسیناسیون و بررسی ابتدایی همه‌گیر شناسی استفاده می‌شود (۳). اردک‌ها حاملین بدون علامت نگران‌کننده‌ای برای آنفلوانزا با حدت کم و آنفلوانزای فوق حاد هستند (۴). بنابراین اردک‌ها در انتقال ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان نقش مهمی دارند. نتایج این مطالعه علاوه بر روش جدید در پایش آنتی‌بادی علیه ویروس H5 نشان داد که حدود ۱۱/۴۳ درصد نمونه‌ها دارای تیتر علیه این تحت تیپ بودند . این اولین و جدیدترین اطلاعات در حوزه اردک‌سانان و پایش سرمی در کشور می‌باشد.

اخیراً ویروس‌های مختلف AI از جمله زیرگروه‌های H3N2، H3N8، H4N6، H5N1، H5N2، H6N1، H9N2، H9N3، H9N6، H11N3 و H11N9 از اردک‌ها در ویتنام جدا شده‌اند، (۷-۵). برای کنترل ویروس‌های HPAI و نظارت بر تولید ویروس‌های جدید ، در کشورهایی که سویه‌های H5N1 در گردش هستند، نظارت بر ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در طیور را الزامی می‌کند. از نظر رفاه حیوانات و همچنین ملاحظات اقتصادی، استفاده از آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ به جای سرم برای نظارت در بین مرغ‌ها و اردک‌ها کافی است. Hotta و همکاران در سال ۲۰۱۳، ردیابی ویروس آنفلوانزا با استفاده از روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) بر روی زرده تخم اردک‌ها انجام شد. در این مطالعه ساب تایپ‌های H3، H6 و H9 در نوامبر ۲۰۱۰ حدود ۲۹ درصد، در اکتبر و نوامبر ۲۰۱۰ حدود ۵۰ درصد و در ژوئن ۲۰۱۱ حدود ۱۲ درصد مثبت بودند. نتایج آزمایش HI برای H5N1 نشان داد که واکنش آنتی‌بادی غالب HI از clade 2.3.4 clade H5N1 به 2.3.2.1 clade تغییر کرده است (۸). Qi و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای نظارت بر شیوع آنتی‌بادی‌های خاص ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در زیرگروه‌های مختلف، ۱۷۰۵ تخم‌مرغ اردک وحشی از شش تالاب شمال شرقی چین برای ارزیابی آنتی‌بادی‌های H1 ، H3، H5 و H7 توسط آزمایشات c-ELISA و HI از ژانویه ۲۰۱۷ تا دسامبر ۲۰۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیب چند نوع آنتی‌بادی آنفلوانزا به‌ترتیب H1(۱۲/۳۲ درصد)، H3 (۸/۱۵)، H5 (۲/۰۵ درصد)، و H7 (۳/۴۶ درصد)، بود. بنابراین، تجزیه و تحلیل دقیق توزیع جغرافیایی آنفلوانزاها در چین و عوامل خطر برای عفونت انسان از اهمیت حیاتی برخوردار است (۹). در مطالعه پولسون و همکاران (۲۰۲۱) بر روی میزان شیوع آنفلوانزای تیپ A در اردک (Whistling Ducks) در ایالات متحده میزان ردیابی مولکولی حدود ۰/۶ درصد و میزان شیوع سرمی ۱۰ درصد بود. در این مطالعه یک متا آنالیز بر روی سایر مطالعات ردیابی آنفلوانزای پرندگان در اردک‌سانان انجام دادند که محدوده شیوع و ردیابی عامل ۵/۵ درصد و بررسی سرمی بین ۰ تا ۴۲ درصد بود (۱۰).

Yeo و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل را در تخم‌مرغ، سرم مرغ و سرم جوجه‌ها بررسی کردند و دریافتند که میزان تیتر آنتی‌بادی در زرده با تیتر سرم جوجه و مرغ از رابطه‌ای خطی پیروی می‌کند و پیشنهاد دادند که این روش می‌تواند زمان واکسیناسیون مناسب را تعیین نموده و اثرگذاری واکسن را نیز بررسی نمایند (۱۱). Saliva و همکاران نشان دادند که زرده تخم‌مرغ می‌تواند جایگزینی برای سرم برای نظارت سرولوژیکی گله در برابر عفونت‌های آنفلوانزای پرندگان با حدت پایین باشد، و سه روش (AGID، HI و ELISA) نتایج مشابهی را برای ۴۲ روز اول پس از عفونت به دست می‌دهند ، اگرچه AGID ممکن است زودتر پاسخ مثبت بدهد (۱۲). سیستم ایمنی ذاتی به‌طور کارآمد در جنین وجود دارد ولی سیستم ایمنی اکتسابی در جنین به

صورت غیر بالغ حضور دارد و آنتی‌بادی مادری از طریق زده به جنین منتقل می‌شود. این پدیده اولین بار به‌وسیله فلیکس کلمپرر در سال ۱۸۹۳ مشاهد شد جایی که نشان داد در پرندگان ایمنی علیه باکتری تتانوس از طریق کیسه زرده به جنین منتقل می‌شود. این مشاهدات نشان داد که ایمنی مادری در داخل زرده ذخیره می‌شود و به‌طور پیوسته به‌وسیله جنین در حال رشد جذب می‌شود (۱۳). تخم در واقع منبع غنی از مواد مغذی و آنتی‌بادی می‌باشد که آنتی‌بادی IgY در زرده و آنتی‌بادی‌های IgM و IgA در سفیده به مقدار فراوان یافت می‌شوند (۱۴). استفاده از زرده تخم به جای سرم باعث می‌شود تعداد بیشتری نمونه گرفته شود و پایش پرندگان به‌صورت اقتصادی انجام شود همچین عملیات خون‌گیری یک عمل دردناک برای حیوانات می‌باشد. از طرفی هر مرغ می‌تواند در هر هفته شش تخم بگذارد که تقریباً ۱۵ میلی‌لیتر آنها را زرده تشکیل می‌دهد که غلظت آنتی‌بادی در آن بسیار بیشتر از سرم می‌باشد. به‌طور کلی در یک هفته هر مرغ با زرده تخم‌مرغ می‌تواند به اندازه ۹۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم یا ۱۸۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر خون کامل آنتی‌بادی تولید کند. خود زرده تخم به تنهایی می‌تواند به‌عنوان منبع آنتی‌بادی استفاده شود ولی لیپید موجود در زرده ممکن است با فعالیت آنتی‌بادی تداخل ایجاد کند. آنتی‌بادی زرده بر خلاف برخی از نظرات مطرح شده برای کار در زمان طولانی مناسب می‌باشد و مطالعات پایداری ده ساله آنتی‌بادی زرده را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثابت کرده است (۱۵). پیلا و همکاران در سال ۱۹۸۴ نشان دادند که زرده‌ای که با استفاده از کلروفرم و سانتریفیوژ با سرعت پایین مهیا شده بود می‌تواند یک جایگزین مناسب به جای سرم در آزمون ممانعت از هماگلوتئین برای ویروس بیماری نیوکاسل باشد (۱۶). بار جوزف و همکاران ۱۹۸۰ در مطالعه‌ای دو نوع ویروس گیاهی را به مرغ تزریق کردند و با استفاده از الایزای ساندویچ در زرده و سرم میزان آنتی‌بادی را اندازه گرفتند نتایج نشان داد که آنتی‌بادی در زرده برای اولین بار در روز هفت بعد از تزریق نمایان می‌شود و در روزهای ۹ تا ۱۱ به بیشترین مقدار خود رسیده و به مدت ۶ تا ۱۲ روز در بیشترین مقدار خود باقی می‌ماند (۱۷). بک و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای استفاده از سرم و کیسه زرده را برای مشخص کردن وضعیت آنفلوانزای پرندگان مورد مقایسه قرار دادند. مرغ‌های لگهورن عاری از پاتوژن با استفاده از ویروس‌های زنده H7N2 و یا ویروس کشته H7N2 تلقیح شدند. سطح آنتی‌بادی با استفاده از روش‌های الایزا (ELISA)، ایمونودیفیوژن ژل اگار (AGID) و HI مورد مقایسه قرار گرفتند. آنتی‌بادی‌های ضد آنفلوانزا در سرم جوجه‌هایی که ویروس زنده دریافت کرده بودند بعدا از هفت روز از تلقیح به‌وسیله الایزا و AGID شناسایی شد ولی در زرده با تأخیر شناسایی شدند و در روز ۱۴ همه نمونه‌ها از نظر آنتی‌بادی مثبت بودند. سرم همه جوجه‌ها بدون در نظر گرفتن زنده یاکشته بودن ویروس در روز ۱۴ مثبت بود ولی در زرده این زمان ۱۸ روز بعد از دریافت ویروس بود. از طرفی آزمون HI نسبت به الایزا و AGID حساسیت کمتری برای تشخیص آنتی‌بادی ضد آنفلوانزا داشت (۱۸).

خون‌گیری و نمونه‌برداری از اردک‌ها جهت ردیابی آنتی‌بادی علیه ویروس در سرم اردک‌ها می‌تواند باعث ایجاد استرس و کاهش تولید تخم در آنها شود و از طرفی دسترسی به تخم پرندگان و نمونه‌برداری راحت‌تر و سریع‌تر انجام می‌گیرد و به همین دلیل ردیابی آنتی‌بادی در تخم اردک می‌تواند روش جایگزینی مناسبی باشد. مشاهده تحت تیپ‌های مشترک آنفلوانزا در اردک‌های وحشی می‌تواند بیانگر نقش حیاتی آنها در تکامل و بازآرایی

انواع آنفلوانزا باشد. این پرندگان به علت ارتباط با پرندگان مهاجر و طیور اهلی روستایی می‌توانند ساب تایپ‌های مختلف ویروس در حال گردش و یا ویروس‌های بازآرایی شده در خود را به راحتی منتقل نموده و باعث ایجاد اپیدمی‌های شدید و شکست واکسیناسیون در مناطق مختلف پرورش طیور صنعتی شوند. حضور ویروس‌های فوق حاد در اردک به دلیل عدم داشتن تظاهرات و علائم بالینی و رديابی آنها در زمان محدودی بعد از عفونت می‌تواند آنها را به ناقلینی برای گونه‌های حساس تبدیل نماید. رديابی آنتی‌بادی علیه ساب تایپ‌های این ویروس در اردک (از سرم و زرده) می‌تواند راهی مؤثر برای پایش بیماری در این پرندگان به‌عنوان مخزن و میزبانان بدون علامت در نظر داشت و بر اساس نتایج، برنامه‌ریزی برای کنترل و پیشگیری از گسترش ویروس‌های فوق حاد در جمعیت طیور بومی و صنعتی انجام گیرد.

این مطالعه نشان داد که ویروس H5 در جمعیت اردک‌سانان استان گیلان در حال چرخش می‌باشد. با توجه به اینکه اردک‌ها به‌عنوان مخازن بیماری بوده و از طرفی با توجه به قرار گرفتن مزارع صنعتی بزرگ در استان‌های شمالی، این موضوع از نظر همه‌گیرشناسی و اقتصادی بیماری دارای اهمیت زیادی می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده موارد ذیل قابل توصیه می‌باشد تا نقشه اپیدمیولوژی این بیماری حساس و اقتصادی و مشترک کامل‌تر گردد: ۱- پایش مولکولی ویروس آنفلوانزا در جمعیت بازار پرندگان و روستایی در شمال کشور جهت پایش غیر فعال. ۲- رديابی سرمی در گونه‌های مختلف پرندگان. ۳ – توسعه جغرافیایی مطالعه به استان‌های شمالی و حتی جنوبی مانند خوزستان که دارای مناطق آبی گسترده برای پرندگان مهاجر و ورودی ویروس به کشور هستند. ۴- مطالعه سرمی و مولکولی بر روی ساب تایپ H7 به‌عنوان یکی دیگر از ویروس‌های فوق حاد پرندگان در پایش سرمی و مولکولی. ۵- گونه اردک در مطالعات بعدی مشخص گردد.

سپاسگزاری

از سرکار خانم سعیده عباسیان و جناب آقای مهندس بهروز اسدی در آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی تهران، به جهت کمک به انجام این طرح تحقیقاتی تشکر می‌گردد.

References

1- Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. Diseases of Poultry. 13th ed. Iowa: Blackwell Publishing Ltd; 2013.

2- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines. Office international des épizooties, 2015.

3- Silim A, Venne D. Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired field samples. Avian Dis. 1989; 33(4): 643-8.

4- Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, *et al.* The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. Proc Natl Acad Sci. 2004; 101(28): 10452-7.

5- Hotta K, Takakuwa H, Le QM, Phuong SL, Murase T, Ono E, *et al.* Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian influenza viruses from Ducks in Hanoi, Vietnam. Virus Res. 2012; 163(2): 448-53.

6- Nguyen T, Rivailler P, Davis CT, Balish A, Dang NH, Jones J, *et al.* Evolution of highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus populations in Vietnam between 2007 and 2010. Virology. 2012; 432(2): 405-16.

7- Nomura N, Sakoda Y, Endo M, Yoshida H, Yamamoto N, Okamatsu M, *et al.* Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010. Arch Virol. 2012; 157(2): 247-57.

8- Hotta K, Takakuwa H, Yabuta T, Ung TT, Usui T, Nguyen HL, *et al.* Antibody survey on avian influenza viruses using egg yolks of ducks in Hanoi between 2010 and 2012. Vet Microbiol. 2013; 166(1-2): 179-83.

9- Qi Y, Wang H, Guo W, Liu C, Zhao L, Gu

Y, *et al*. Surveillance of multiple subtype specific antibodies against avian influenza viruses among egg yolk in wild ducks from northeast China, 2017–2019. Microb Pathog. 2021; 152: 104618.

10- Carter DL, Link P, Tan G, Stallknecht DE, Poulson RL. Influenza A Viruses in Whistling Ducks (Subfamily Dendrocygninae). Viruses. 2021; 13(2): 192..

11- Yeo S, Nagy E, Krell PJ. Indirect method for prediction of hemagglutination inhibition antibody titers to Newcastle disease virus in chickens by titration of antibodies in egg yolk. J Vet Diag Invest. 2003; 15(2): 184-7.

12- Sá e Silva M, Swayne DE. Serum and egg yolk antibody detection in chickens infected with low pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 2012; 56(3): 601-4.

13- Härtle S, Magor KE, Göbel TW, Davison F, Kaspers B. Avian immunology. 2nd ed. London: Academic Press. 2014, P: 103-120.

14- Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. Annu Rev Food Sci Technol. 2012; 3: 163-82.

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

16- Piela TH, Gulka CM, Yates VJ, Chang PW. Use of egg yolk in serological tests (ELISA and HI) to detect antibody to Newcastle disease, infectious bronchitis, and Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis. 1984; 28(4): 877-83.

17- Bar-Joseph M, Malkinson M. Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. J Virol Methods. 1980; 1(3): 179-83.

18- Beck JR, Swayne DE, Davison S, Casavant S, Gutierrez C. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. Avian Dis. 2003; 47(s3): 1196-9.

Detection of antibodies against H5 subtype of Avian influenza in the egg yolks of native ducks in Gilan province, Iran, 2020.

Mohammad Hosein Fallah MehrAbadi[1], Hamideh Najafi[2], Pooria Motamed Chaboki[2], Hosein Hoseini[3], Abas Barin[2], Zahra Ziafati Kafi[2], Ali Hajhir Rajeouni[2], Iraj Ashrafi Tamai[2], Naser Sadri[2], Arash Ghalyanchi Langroudi[2*]

1- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Karaj, Karaj, Iran.

Receive: January 9, 2021; Revise: February 15, 2021; Accept: March 5, 2021

Summary

Avian influenza disease is one of the most significant contagious diseases that can infect many birds, either in commercial farms or in indigenous birds. There have been many reports on the highly pathogenic H5 subtype of avian influenza outbreaks from Iran's industrial poultry farms in recent years. Anseriformes, as the main reservoir of the virus, play a critical role in the epidemiology of the disease. This study was conducted to detect antibodies against the H5 subtype of avian influenza viruses in the yolk of native ducks. Seventy duck eggs were collected from different cities of Gilan Province (Rasht, Anzali, SoomeSara, Fuman, Astaneh Ashrafie, Langroud und Chaboksar) from April to September of 2020. The aquatic phase of eggs was separated and subjected to the OIE approved HI standard test using H5 specific antigen. 11.43% of tested samples showed antibodies against the H5 subtype of influenza virus. This study demonstrates the circulation of the H5 subtype viruses among the native duck population of the north of Iran.

Keywords: *Avian Influenza, H5, Outbreak, Yolk, Inhibition of hemagglutination*

رفع باکتریمی ناشی از *مایکوپلاسما هموفلیس* متعاقب درمان دوگانه با داکسی‌سایکلین و سیپروفلوکساسین

رضا آذرگون*[۱]، وحید محمدی[۱]، محمود محمودی[۲]، شاهین احتشام‌فر[۲]

۱- استادیار، گروه بیماری‌های درونی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- کارشناس ارشد، گروه بیماری‌های درونی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ آذر ۱۳۹۹، بازنگری: ۴ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

مایکوپلاسما هموفلیس یک باکتری کوچک بدون دیواره با شیوع جهانی است که گلبول‌های قرمز را آلوده می‌کند و بدون درمان مؤثر ممکن است باعث مرگ شود. عدم موفقیت بیشتر پروتکل‌های درمانی آنتی‌بیوتیکی در از بین بردن این عامل بالقوه مشترک بین انسان و دام ضرورت تعیین یک درمان بهینه را برجسته می‌کند. یک گربه موکوتاه خانگی دو ساله با علائم بی‌حالی، تب، زردی و کم‌خونی به بیمارستان دامپزشکی دانشگاه ارومیه ارجاع داده شد. یافته‌های بالینی، نتایج بررسی گسترش خون رنگ‌آمیزی‌شده به روش گیمسا و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژن 16S rRNA عفونت ناشی از مایکوپلاسما هموفلیس را تأیید کردند. داکسی‌سایکلین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراکی هر ۲۴ ساعت) به مدت ۴ هفته تجویز شد. با این حال، بهبودی بالینی حاصل نشد و در بررسی سیتولوژی تداوم آلودگی با مایکوپلاسما هموفلیس رؤیت گردید. پس از شروع درمان دوگانه با افزودن سیپروفلوکساسین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراکی هر ۲۴ ساعت) به مدت دو هفته، رفع باکتریمی با بررسی مجدد سیتولوژی و نتیجه منفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌عنوان روش تشخیصی ارجح، مورد تأیید قرار گرفت. طبق اطلاعات نویسندگان، این اولین گزارش رفع باکتریمی ناشی از مایکوپلاسما هموفلیس با استفاده از درمان دوگانه با داکسی‌سایکلین و سیپروفلوکساسین است. پیشنهاد می‌شود این پروتکل برای بیماران گربه‌سان بیشتری امتحان شود.

واژه‌های کلیدی: *داکسی‌سایکلین، سیپروفلوکساسین، گربه، مایکوپلاسما هموفلیس*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: R.azargoun@urmia.ac.ir

مقدمه

مایکوپلاسموز گربه‌سانان که به‌عنوان کم‌خونی عفونی گربه‌سانان نیز شناخته می‌شود، یک بیماری بالینی خطرناک در گربه‌ها بوده و به طور بالقوه می‌تواند زئونوز نیز باشد (۱). این باکتری‌ها به سطح گلبول‌های قرمز متصل شده و باعث تغییر شکل شدید سلولی و کم‌خونی همولیتیک می‌شوند (۲). تاکنون سه گونه مایکوپلاسما که قادر به ایجاد آلودگی در گربه‌ها بوده شناخته شده و شامل مایکوپلاسما هموفلیس، کاندیداتوس مایکوپلاسما هومومینتوم و کاندیداتوس مایکوپلاسما توریسنسیس می‌باشند (۳). به‌طور معمول مایکوپلاسما هموفلیس بیماری‌زاترین و همچنین شایع‌ترین گونه در گربه‌های ایران محسوب می‌گردد (۴). دو گونه دیگر معمولاً با کم‌خونی یا ناهنجاری‌های بالینی مرتبط نیستند، مگر اینکه بیماری دیگری به صورت همزمان وجود داشته باشد. اگرچه انتقال از طریق ناقلین بندپا پیشنهاد شده است، اما آلودگی می‌تواند از طریق رفتارهای تهاجمی و حین انتقال خون نیز گسترش یابد (۲، ۳).

آنتی‌بیوتیک درمانی باید برای گربه‌هایی در نظر گرفته شود که دارای علائم بالینی و ناهنجاری‌های کلینیکال پاتولوژی مطابق با مایکوپلاسما هموفلیس می‌باشند (۵). پروتکل‌های درمانی فعلی در کاهش میزان آلودگی خون با مایکوپلاسما هموفلیس مؤثر هستند، اما رفع باکتریمی به‌ندرت حاصل می‌شود. تتراسایکلین‌ها یا فلوروکینولون‌ها اغلب برای درمان عفونت ناشی از مایکوپلاسما هموفلیس گزارش می‌شوند (۶). با این حال ممکن است برای بعضی بیماران که در برابر تک درمانی با تتراسایکلین‌ها یا فلوروکینولون‌ها از خود مقاومت نشان می‌دهند، توصیه گردد که یک داروی دیگر نیز در نظر گرفته شود (۷).

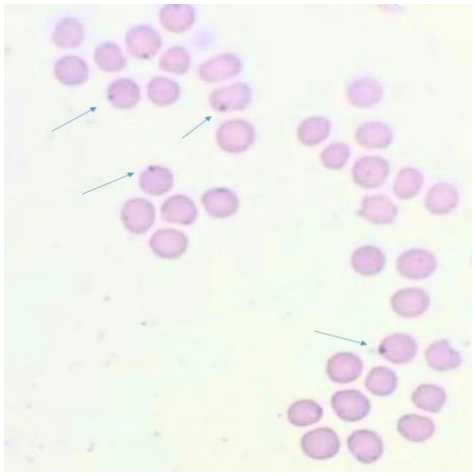
معرفی بیمار: یک گربه موکوتاه خانگی دو ساله نر و عقیم نشده با علائم بی‌حالی و کم‌اشتهایی در ۳ روز گذشته، به بیمارستان دامپزشکی دانشگاه ارومیه ارجاع داده شد. صاحب حیوان ادعا کرد که دوره کامل واکسیناسیون و انگل‌زدایی انجام شده و گربه امکان پرسه زدن آزادانه در بیرون از منزل را داشته است. در معاینه بدنی لاغری، ضعف و پوشش مویی ضعیف مشخص شد. بر اساس یافته‌های بالینی، حیوان دچار کم‌آبی، تب (۳۹/۹ درجه سانتی‌گراد) و زردی خفیف بود (شکل ۱). با استفاده از یک کیت تشخیصی تجاری (تست سریع ترکیبی FIV Ab + FeLV Ag، کوئیکینگ بیوتک، چین) تأیید شد که بیمار فاقد ویروس لوسمی گربه‌سانان و ویروس نقص ایمنی گربه‌سانان می‌باشد. یافته‌های آزمایشگاهی نشان‌دهنده کم‌خونی، آنیزوسیتوز و هماتوکریت پایین (۱۸ درصد) بودند (جدول ۱). پس از بررسی گسترش خونی رنگ‌آمیزی شده به روش گیمسا توسط یک کلینیکال پاتولوژیست دارای مدرک بورد تخصصی، ارگانیسم‌های کوچک کروی در حاشیه گلبول‌های قرمز مشاهده شدند که مؤید مایکوپلاسما هموفلیس بودند (شکل ۲).

شکل ۱- زردی خفیف در مخاط محوطه دهانی گربه مبتلا به *مایکوپلاسما هموفلیس*

جدول ۱- پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم گربه مبتلا به *مایکوپلاسما هموفلیس*

پارامتر	مقدار	محدوده مرجع
گلبول‌های سفید (میلی‌لیتر/10^{-3})	۱۳/۷	۴/۰۴-۱۸/۷۰
لنفوسیت (میلی‌لیتر/10^{-3})	۲/۱	۰/۸-۶/۱
مونوسیت (میلی‌لیتر/10^{-3})	۰/۵	۰/۰-۰/۷
ائوزینوفیل (میلی‌لیتر/10^{-3})	۰/۶	۰/۰-۱/۵
بازوفیل (میلی‌لیتر/10^{-3})	۰/۰	۰/۰-۰/۱
گلبول‌های قرمز (میکرولیتر/10^{-6})	*۴/۵	۶/۵۶-۱۱/۲۰
هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)	*۸/۲	۱۰/۶-۱۵/۶
هماتوکریت (درصد)	❋۱۸	۳۱/۷-۴۸
میانگین حجم گلبول‌های قرمز (فمتولیتر)	*۵۳/۹	۳۶/۷-۵۳/۷
میانگین هموگلوبین گلبول‌های قرمز (پیکوگرم)	❋۱۲	۱۲/۳-۱۷/۳
میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (گرم/دسی‌لیتر)	*۲۹/۶	۳۰/۱-۳۵/۶
پلاکت (میلی‌لیتر/10^{-3})	۳۷۶/۱	۱۷۵-۵۰۰
آلکالین فسفاتاز (واحد/لیتر)	۵۲/۷	۲۲-۸۷
آلانین آمینوترانسفراز (واحد/لیتر)	*۱۵۵/۴	۳۳-۱۵۲
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد/لیتر)	*۳۹/۱	۱-۳۷
پروتئین (گرم/دسی‌لیتر)	۸/۳	۶/۰-۸/۶
آلبومین (گرم/دسی‌لیتر)	۳/۵	۲/۴-۳/۸
نیتروژن اوره (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	*۳۶/۳	۱۵-۳۲
کراتینین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	*۲/۲	۱-۲
گلوکز (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۷۴/۹	۶۷-۱۶۸

❋ خارج از محدوده مرجع

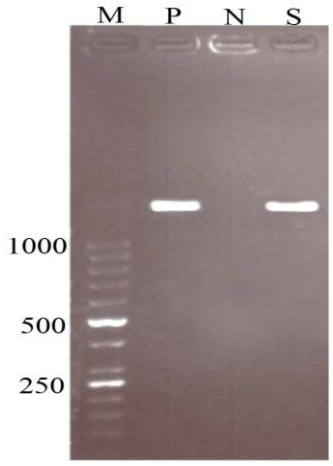


شکل ۲- کوکسی‌های کوچک آبی رنگ نشان‌دهنده آلودگی با *مایکوپلاسما هموفلیس* (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰)

به منظور تشخیص قطعی، ژنوم استخراج شده از نمونه خون بیمار با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) طبق روشی که قبلا توسط ویلی و همکاران در سال ۲۰۰۶ ارائه شده بود، مورد بررسی قرار گرفت (۸). پروتکل و توالی آغازگر PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. با الکتروفورز محصول نهایی روی ژل آگارز و بررسی آن با اتیدیوم بروماید آلودگی با مایکوپلاسما هموفلیس تأیید گردید (شکل ۳).

جدول ۲- پروتکل و توالی‌های آغازگر PCR جهت شناسایی *مایکوپلاسما هموفلیس*

ژن هدف	کنترل مثبت (bp)	توالی‌های آغازگر	برنامه PCR
16S rRNA *M. haemofelis*	۱۳۰۹	F: 5′-TCG AAC GGA YYT TGG TTT CG-3′ R: 5′-CAA ATG AAT GTA TTT TTA AAT GCC CAC-3′	98 °C, 3 min; 35 cycles [98 °C, 10 s; 68 °C, 30 s; 72 °C, 1 min]; 72 °C, 10 min



شکل ۳- نتیجه PCR نمونه خون گربه مبتلا به *مایکوپلاسما هموفلیس* (M: مارکر مولکولی، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی و S: نمونه)

آنتی‌بیوتیک درمانی با داکسی‌سایکلین (داکسی‌سایکلین، رازک، تهران، ایران) (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هر ۲۴ ساعت به صورت خوراکی) به‌عنوان اولین انتخاب برای درمان مایکوپلاسما هموفلیس به مدت ۴ هفته آغاز شد (۶). با این حال پس از یک ماه مصرف داکسی‌سایکلین، بهبود بالینی قابل ملاحظه‌ای در بیمار مشاهده نشد و طی بررسی سیتولوژی نمونه‌های خون محیطی، باکتریمی پایدار بود. بنابراین سیپروفلوکساسین (سیپروفلوکساسین، رزاک، تهران، ایران) (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هر ۲۴ ساعت به صورت خوراکی) به پروتکل درمانی اضافه شد و آنتی‌بیوتیک درمانی به صورت دوگانه برای دو هفته دیگر تداوم یافت.

هنگامی که پروتکل جدید درمانی آغاز شد وضعیت بالینی بیمار به تدریج بهبود یافت و در پایان دوره درمان، به‌طور شگفت‌آوری هیچ باکتری در سیتولوژی نمونه‌های خون محیطی مشاهده نشد. به منظور تأیید رفع مؤثر باکتریمی، یک هفته پس از خاتمه پروتکل درمانی جدید، مجدداً آزمایش PCR انجام شد و در پایان هیچ محصولی در راستای باند کنترل مثبت تکثیر نگردید.

بحث و نتیجه‌گیری

مایکوپلاسما هومولیس که قبلاً به نام هموبارتونلا فلیس شناخته می‌شد، یک باکتری گرم منفی و غیر اسید فست بوده که علی‌رغم تلاش‌های فراوان، کشت آن روی محیط‌های مصنوعی ناموفق بوده است (۱). سیتولوژی گسترش خون از روش‌های مرسوم تشخیص مایکوپلاسما هومولیس بوده که در صورت وجود بیماری، کوکسی‌های آبی رنگ با قطر ۰/۳ تا ۰/۸ میکرومتر بر سطح گلبول‌های آلوده در نمای میکروسکوپی قابل مشاهده خواهد بود. اما اخیراً، بررسی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به دلیل حساسیت و ویژگی بالاتر، به‌عنوان روش منتخب برای تشخیص مایکوپلاسما هومولیس معرفی شده است (۷). با استفاده از روش حساس و دقیق PCR قاضی سعیدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ شیوع مایکوپلاسماهای هموتروپیک را در ایران حدود ۲۲ درصد در جمعیت گربه‌های موکوتاه ایرانی گزارش نمودند که از این میزان شیوع مایکوپلاسما هومولیس، کاندیداتوس مایکوپلاسما هومینتوم و کاندیداتوس مایکوپلاسما تورینسیس به ترتیب ۶۳/۶۳ درصد، ۵۴/۵۴ درصد و ۱۸/۱۸ درصد بوده است (۴).

رفع مؤثر باکتریمی ناشی از مایکوپلاسما هومولیس برای گربه‌های بیماری که در کنار گربه‌های سالم زندگی می‌کنند، برای گربه‌های دارای نقص ایمنی، برای گربه‌های اهدا کننده خون، برای گربه‌هایی که با انسان‌های مبتلا به ایدز یا لوپوس اریتماتوز سیستمیک زندگی می‌کنند به دلیل پتانسیل مشترک بودن بیماری بین انسان و حیوان، می‌تواند حیاتی باشد (۶). پروتکل‌های مختلفی برای درمان مایکوپلاسموز گربه‌سانان ارزیابی شده‌اند. اکثر این پروتکل‌ها به صورت تک درمانی بوده و هیچ یک از آنها به طور قابل اعتماد آلودگی مایکوپلاسما هومولیس را از بین نمی‌برند. از آنجا که مایکوپلاسماهای گربه‌سانان جزء باکتری‌های فاقد دیواره محسوب می‌شوند، آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در درمان این عوامل مؤثر نمی‌باشند (۷). در گذشته برای کنترل آلودگی‌های ناشی از مایکوپلاسما هومولیس کلرامفنیکل تجویز می‌گردید، اما امروزه مصرف این دارو به دلیل ایجاد هیپوپلازی اریتروئید وابسته به دوز در مغز استخوان گربه‌ها توصیه نمی‌شود. همچنین آزیترومایسین یا ایمیدوکارب دی‌پروپیونات نیز در درمان آلودگی ناشی از مایکوپلاسماهای هموتروپیک در گربه‌ها مؤثر نشان داده نشده‌اند. امروزه تتراسایکلین‌ها (مثل داکسی‌سایکلین) یا فلوروکینولون‌ها (مثل ماربوفلوکساسین) به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های ارجح در نظر گرفته می‌شوند (۹).

داکسی‌سایکلین اغلب به‌عنوان خط اول درمان، به مدت ۴ هفته تجویز می‌شود (۲). با این حال در مطالعه Novacco و همکاران در سال ۲۰۱۸، تک درمانی با داکسی‌سایکلین منجر به رفع باکتریمی در تمام گربه‌های آلوده به مایکوپلاسما هومولیس نگردید. این امکان وجود دارد که گونه‌های مختلف مایکوپلاسما، پاسخی متفاوت به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی نشان دهند. اخیراً یک مطالعه نشان داد که مایکوپلاسما سوئیس قادر است به درون گلبول‌های قرمز خون خوک نفوذ نماید، که با مقاومت قابل توجه در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی ارتباط دارد (۷). برخی دامپزشکان برای افزایش احتمال رفع باکتریمی، دوره‌های طولانی‌تر آنتی‌بیوتیک درمانی (مثلاً ۸ هفته) را پیشنهاد می‌کنند. اما دوره‌های طولانی‌تر آنتی‌بیوتیک درمانی تضمین‌کننده رفع باکتریمی نبوده و ممکن است منجر به بروز عوارض جانبی و مقاومت دارویی در حیوانات تحت درمان شود (۶).

فلوروکینولون‌ها مانند ماربوفلوکساسین، پرادوفلوکساسین و اوربیفلوکساسین توسط برخی از

محققین به‌عنوان خط دوم درمانی توصیه شده‌اند (۱۲-۱۰). انروفلوکساسین به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای داکسی‌سایکلین، با موفقیت در کنترل علائم ناشی از مایکوپلاسما همولیس استفاده شده است. اگرچه در برخی از گربه‌ها مسمویت دائمی شبکیه و کوری ناگهانی متعاقب مصرف این دارو گزارش شده است (۵). سیپروفلوکساسین متابولیت انروفلوکساسین بوده که می‌تواند به دلیل طیف فعالیت مشابه، به‌عنوان جایگزین برای انروفلوکساسین تجویز گردد. برجسته‌ترین مزیت سیپروفلوکساسین عدم احتمال رتینوتوکسیکوز است که به دلیل خاصیت لیپوفیلیک کمتر نسبت به انروفلوکساسین می‌باشد (۹).

بر اساس اطلاعات نویسندگان، تاکنون از سیپروفلوکساسین برای درمان آلودگی با مایکوپلاسما همولیس استفاده نشده بود و این اولین گزارش رفع باکتریمی ناشی از مایکوپلاسما همولیس با داکسی‌سایکلین و سیپروفلوکساسین به صورت درمان دوگانه است. با این حال توصیه می‌شود که این پروتکل برای تعداد بیشتری از بیماران و همچنین برای گربه‌های مبتلا به عفونت‌های چند گونه‌ای با مایکوپلاسما آزمایش شود.

References

1- Hicks CA, Willi B, Riond B, Novacco M, Meli ML, Stokes CR, *et al.* Protective immunity against infection with Mycoplasma haemofelis. *Clin Vaccine Immunol*. 2015; 22(1): 108–18.

2- Ameldev P, Tresamol PV. Molecular detection and therapeutic management of feline mycoplasmosis. *Iosr-Javs*. 2017; 10(2): 83-6.

3- Hawley J, Yaaran T, Maurice S, Lappin MR. Amplification of Mycoplasma haemofelis DNA by a PCR for point-of-care use. *J Vet Diagn Investig*. 2018; 30(1): 140-43.

4- Ghazisaeedi F, Atyabi N, Zahrai Salehi T, Gentilini F, Ashrafi Tamai I, Akbarein H, *et al.* A molecular study of hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in cats in Iran. *Vet Clin Pathol*. 2014; 43(3): 381-86.

5- Sykes JE. Feline hemotropic mycoplasmas. *Vet Clin Small Anim*. 2010; 20(1): 62-9.

6- Novacco M, Sugiarto S, Willi B, Baumann J, Spiri A, Oestmann A, *et al.* Consecutive antibiotic treatment with doxycycline and marbofloxacin clears bacteremia in Mycoplasma haemofelis-infected cats. *Vet Microbiol*. 2018; 217: 112-20.

7- Tasker S, Hofmann-Lehmann R, Belák S, Frymus T, Addie D, Grazia Pennisi M, *et al.* Haemoplasmosis in Cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2018; 20(3): 256-61.

8- Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, *et al.* Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(3): 961-69.

9- Greene CE, Calpin J. Antimicrobial Drug Formulary. In: Greene CE, editor. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th ed. *Elsevier Missouri*. 2012, P: 1234-235.

10- Ishak AM, Dowers KL, Cavanaugh MT, Powell CC, Hawley JR, Radecki SV, *et al.* Marbofloxacin for the treatment of experimentally induced Mycoplasma haemofelis infection in cats. *J Vet Intern Med*. 2008. 22(2): 288-92.

11- Dowers KL, Tasker S, Radecki SV, Lappin MR. Use of pradofloxacin to treat experimentally induced Mycoplasma haemofelis infection in cats. *Am J Vet Res*. 2009; 70(1): 105-11.

12- Lappin M, Miller W, Sellins K. Effect of doxycycline or orbifloxacin administration on Bartonella spp and Hemoplasma assay results in naturally exposed cats. *Int J Appl Res Vet M*. 2012; 10(3): 225-33.

Elimination of bacteremia caused by *Mycoplasma haemofelis* following dual therapy with doxycycline and ciprofloxacin

Reza Azargoun[*1], Vahid Mohammadi[1], Mahmoud Mahmoudi[2], Shahin Ehteshamfa[2]

1- Assistant Professor, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Master of Science, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Receive: December 8, 2020; Revise: January 23, 2021; Accept: March 10, 2021

Summary

Mycoplasma haemofelis is a small wall-less bacterium with worldwide prevalence that infects erythrocytes and without effective treatment may cause death. The failure of most antibiotic therapy protocols to effectively eliminate this potentially zoonotic agent highlights the necessity to determine an optimal treatment. A two-year-old domestic shorthair cat was referred to veterinary hospital of Urmia University with symptoms of lethargy, fever, jaundice and anemia. Clinical findings, the results of Giemsa stained blood smear and polymerase chain reaction on 16S rRNA, confirmed the infection caused by *M. haemofelis*. Doxycycline (10 mg/kg PO q24h) was administered for 4 weeks. However, no clinical improvement was achieved and persistence of *M. haemofelis* infection was observed on cytology. After starting dual therapy with the addition of ciprofloxacin (20 mg/kg PO q24h) for two weeks, elimination of bacteremia was confirmed by cytological re-examination and negative result of polymerase chain reaction as the preferred diagnostic method. According to the authors' knowledge, this is the first report of bacteremia elimination caused by *M. haemofelis* using dual treatment with doxycycline and ciprofloxacin. It is suggested that this protocol be tried for more feline patients.

Keywords: *Doxycycline, Ciprofloxacin, Cat, Mycoplasma haemofelis*

مقایسه‌ی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده و پوست نزدیک به پرینه در سگ‌های استان اصفهان

فهیمه نگین تاجی زردک[۱]، سام ترکان[۲*]

۱- دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۵ بهمن ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۰ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

سالمونلا و اشریشیاکلی از عوامل مهم عفونت‌های روده‌ای و اسهال می‌باشند. افزایش مقاومت سالمونلا و اشریشیاکلی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به‌عنوان یک مشکل جهانی مطرح است. از آنجایی‌که سگ‌های خانگی به‌عنوان منابع بالقوه‌ی این دو باکتری مطرح می‌باشند، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده و پوست نزدیک به پرینه در سگ‌های استان اصفهان انجام شد. سواب‌های رکتال و پوستی اخذ شده از ۱۰۰ سگ ارجاعی به کلینیک‌های حیوانات خانگی در شهر اصفهان کشت داده شدند. پس از کشت میکروبی و تائید مولکولی جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی، حضور شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این جدایه‌ها به روش PCR و الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک ارزیابی شدند. تمام جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده به جنتامایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین و تری متوپریم-سولفامتوکسازول مقاوم بودند. همچنین همه جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از محتویات روده نسبت به تتراسایکلین مقاومت نشان دادند. در تمام جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده ژن dfrA1 ردیابی شد. شایع‌ترین ژن ردیابی شده در جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از محتویات روده tetB و dfrA1، (۸۰ درصد) بودند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه در این جدایه‌ها نشان‌دهنده استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و لزوم انجام آنتی‌بیوگرام جهت انتخاب مؤثرترین آنتی‌بیوتیک در درمان بیماری‌ها را بیش از پیش نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سالمونلا تیفی‌موریوم، اشریشیاکلی، سگ، اصفهان*

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

مقدمه

اشریشیاکلی یک باسیل گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده‌ی جانوران خون‌گرم وجود دارد (۱، ۲). بیشتر سویه‌های اشریشیاکلی بی‌آزار هستند اما برخی از سروتیپ‌های آن می‌توانند مسمومیت‌های غذایی در میزبان‌هایشان ایجاد کنند (۳، ۴). اشریشیاکلی و سایر باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، ۰/۱ درصد فلور روده را به خود اختصاص داده است. راه انتقال این باکتری مدفوعی-دهانی است (۵).

سالمونلا یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، بدون اسپور و بی‌هوازی اختیاری از خانواده‌ی انتروباکتریاسه می‌باشد. دو گونه‌ی اصلی سالمونلا شامل سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری هستند که سروتیپ‌های خاصی از آنها ایجاد بیماری می‌کند (۶، ۷).

سالمونلوز در انسان توسط سویه‌های غیر تیفوییدی سالمونلا ایجاد شده و معمولاً منجر به یک اسهال خود محدود شونده که به درمان آنتی‌بیوتیکی نیاز ندارد می‌شود.

سویه‌هایی از سالمونلا انتریکا که به طیف گسترده‌ای از داروهای ضد میکروبی مقاومند، ظهور یافته که امروزه به یکی از پراهمیت‌ترین مسائل بهداشت عمومی در سراسر جهان تبدیل‌شده است. حیوانات همراه به‌عنوان منابع بالقوه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلا مطرح‌شده‌اند (۸).

در طب حیوانات کوچک، برای درمان عفونت از عوامل ضد میکروبی که در انسان مورد مصرف قرار می‌گیرند و اهمیت اولیه در عفونت‌های انسانی دارند، استفاده می‌شود و همواره هنگام انتخاب آنتی‌بیوتیک کشت باکتریایی و تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام نمی‌شود، که این امر موجب درمان‌های تجربی نامناسب می‌شود. دامپزشکان ممکن است آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف یا نسل‌های جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها را به‌عنوان خط اول درمان دارویی تجویز کنند. چنین استفاده غیر محتاطانه‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها، مشابه آنچه در انسان‌ها دیده شده است می‌تواند در حیوانات همراه، باکتری‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک، شامل سالمونلای مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک را ایجاد کند.

اخیراً ارزیابی تأثیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط با حیوانات کوچک روی سلامت عمومی، به دلیل دسترسی محدود به داده‌ها دشوار است. در اغلب کشورها مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حیوانات خانگی مرتباً نظارت نمی‌شود و داده‌های موجود کاملاً پراکنده‌اند. علاوه بر این، شرح ارتباطات بین ژن‌های مقاومت و حدت در ایزوله‌های سالمونلای جداشده از حیوانات خانگی گزارش نشده است. این شکاف‌های دانش نیاز به مطالعات بیشتر را درباره‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حیوانات کوچک نشان می‌دهد (۹).

به این ترتیب این مطالعه، باهدف بررسی الگوی ژنوتیپی و فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی جداشده از مدفوع و پوست نزدیک پرینه سگ‌ها در استان اصفهان انجام شد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، از ۱۰۰ سگ ارجاعی به کلینیک‌های حیوانات خانگی در شهر اصفهان، در فاصله زمانی تیرماه ۱۳۹۸ تا تیرماه ۱۳۹۹، تعداد ۱۰۰ نمونه از پوست نزدیک به پرینه و ۱۰۰ نمونه از محتویات روده تهیه شد. نمونه‌های مدفوع و پوست به روش سواب گیری استریل از سگ‌ها اخذ شد.

برای قرار دادن نمونه محتویات روده در محیط انتقالی، ابتدا سواب پنبه‌ای سالم در محیط انتقال استریل (سرم فیزیولوژی) مرطوب گردید، سپس به اندازه‌ی۳-۲ سانتی‌متر داخل اسفنکتر رکتوم فرو

برده شد، به آرامی چرخانده و سپس سواب خارج شده تا عمق لوله محیط انتقالی وارد گردید.

به همین ترتیب سواب مرطوب سالم، به‌صورت چرخشی روی سطح پوست نزدیک به پرینه چرخانده شد و سپس تا عمق لوله محیط انتقالی وارد گردید.

نمونه‌های جمع‌آوری شده در لوله‌های حاوی ۲ سی‌سی سرم فیزیولوژی در اسرع وقت به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید.

جداسازی باکتری: جهت جداسازی اشریشیاکلی، سواب‌های حاوی نمونه آغشته به سرم فیزیولوژی در محیط مایع آبگوشت مغذی (Nutrient broth) (مرک، آلمان) تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از غنی‌سازی، باکتری در سطح محیط EMB (مرک، آلمان) به‌صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. پرگنه‌های لاکتوز مثبت واجد جلای سبز فلزی، انتخاب و جهت تائید وجود اشریشیاکلی در آنها، روی محیط سه قندی آهن‌دار (TSI) (مرک، آلمان) کشت و همزمان تست IMViC روی آها انجام شد (۱۰).

در خصوص جداسازی باکتری سالمونلا، پس از غنی‌سازی اولیه در محیط آبگوشت مغذی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه از این محیط برداشته و در محیط سلنیت براث (مرک، آلمان) تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۴۳ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. باکتری غنی‌شده به‌صورت خطی در محیط XLD (مرک، آلمان) کشت و پرگنه‌های لاکتوز منفی با مرکز سیاه انتخاب و جهت تائید وجود سالمونلا در آنها، روی محیط سه قندی آهن‌دار (TSI) کشت و همزمان تست IMViC روی آنها انجام شد. جهت تفریق سالمونلا از پروتئوس آزمایش هیدرولیز اوره روی پرگنه‌های مشکوک انجام شد (۱۱).

تائید مولکولی جدایه‌ها: به‌منظور استخراج DNA از باکتری‌های مورد مطالعه از روش جوشاندن استفاده شد. برای این منظور ۲۵ میکرولیتر از کشت یک شبه باکتری در محیط مایع قلب مغز (BHI)(مرک، آلمان) با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه، مایع رویی به‌عنوان منبع DNA استفاده شد. آزمایش PCR جهت شناسایی باکتری‌های جنس سالمونلا و ردیابی سروتیپ سالمونلا تیفی‌موریوم در قالب PCR چندگانه‌ای مطابق روش ارائه شده توسط جمشیدی و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت (۱۲).

به‌منظور تأیید جدایه‌های احتمالی اشریشیاکلی تکثیر ژن 16srRNA با روش PCR انجام گردید (۱۰).

در هر مرحله، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator (UK ،UviTech) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder (سیناژن، ایران) به اندازه ۱۰۰ جفت باز و ۱ کیلو باز و از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC25922 به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی به روش استاندارد Kirby-Bauer و بر اساس استاندارد CLSI انجام شد (۷۲). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت پادتن طب ایران تهیه شدند. پس از تهیه غلظتی از پرگنه‌ها معادل غلظت استاندارد نیم مک‌فارلند، باکتری‌ها به روش کشت متراکم

روی محیط مولرهینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. دیسک‌ها در پلیت قرار داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد، مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

به‌منظور ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های aac(3)-IV، qnr، tetA، tetB، sul1، dfrA1 و blaSHV از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ با شرایط PCR ذکر شده در جدول ۲ در قالب PCR چندگانه (multiplex PCR) انجام شد. سپس الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد محلول رنگی DNA safe stain (سیناژن، ایران) در حضور مارکرهای ۵۰ و ۱۰۰۰ جفت بازی با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت صورت گرفت. ژل مورد نظر با استفاده از دستگاه ترانس لومینار UV بررسی گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی (۱۰)

مقاومت آنتی بیوتیکی	نام ژن	توالی پرایمر	جفت باز
جنتامایسین	aac(3)-IV	(F) CTTCAGGATGGCAAGTTGGT (R) TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	۲۸۶
سفوتاکسیم (سفالوسپورین)	blaSHV	(F) TCGCCTGTGTATTATCTCCC (R) CGCAGATAAATCACCACAATG	۷۶۸
تتراسایکلین	tetA	(F) GGTTCACTCGAACGACGTCA (R) CTGTCCGACAAGTTGCATGA	۵۷۷
تتراسایکلین	tetB	(F) CCTCAGCTTCTCAACGCGTG (R) GCACCTTGCTGATGACTCTT	۶۳۴
تری متوپریم-سولفامتوکسازول	dfrA1	(F) GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC (R) GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	۳۶۷
تری متوپریم-سولفامتوکسازول	Sul1	(F) TTCGGCATTCTGAATCTCAC (R) ATGATCTAACCCTCGGTCT	۸۲۲
سیپروفلوکساسین (فلوروکوئینولون)	qnr	(F) GGGTATGGATATTATTGATAAAG (R) CTAATCCGGCAGCACTATTTA	۶۷۰
سفتازیدیم (سفالوسپورین)	bla_{SHV}	(F) TCGCCTGTGTATTATCTCCC (R) CGCAGATAAATCACCACAATG	۷۶۸

نتایج

مطالعه‌ی حاضر به‌منظور ارزیابی میزان شیوع، الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی جداشده از نمونه‌های محتویات روده و پوست نزدیک به پرینه در سگ انجام شد.

نمونه‌های پوستی به‌منظور ارزیابی امکان انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به محیط زندگی از طریق پلاسمیدها اخذ شد.

در این مطالعه در کل از ۱۰۰ سگ، تعداد ۱۰۰ نمونه از محتویات روده و ۱۰۰ نمونه از پوست نزدیک به پرینه اخذ و برای بررسی میزان شیوع باکتری‌های اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم، بررسی الگوی مقاومت و ژن‌های کدکننده مقاومت مربوط به آنها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۲- شرایط PCR چندگانه مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی

ژن	برنامه PCR	حجم PCR (۵۰ میکرولیتر)
Sul1, aac(3)-IV, tetB, dfrA1	۱چرخه ۹۴ درجه.....۸ دقیقه ۳۲ چرخه ۹۵ درجه.....۶۰ ثانیه ۵۵ درجه.....۷۰ ثانیه ۷۲ درجه.....۲ دقیقه ۱چرخه ۷۲ درجه.....۸ دقیقه	۵میکرولیتر=PCR buffer 10x ۲/۵ میلی‌مول=Mgcl2 ۲۰۰میکرومول=dNTP(Fermentas) ۰/۵ میلی‌مول= primers F&R ۲ واحد= Taq DNA polymerase(fermentas) ۳ میکرولیتر=DNA template
blaSHV, tetA, qnr	۱چرخه ۹۴ درجه.....۸ دقیقه ۳۲ چرخه ۹۵ درجه.....۶۰ ثانیه ۵۵ درجه.....۷۰ ثانیه ۷۲ درجه.....۲ دقیقه ۱ چرخه ۷۲ درجه.....۸ دقیقه	۵میکرولیتر=PCR buffer 10x ۲/۵ میلی‌مول=Mgcl2 ۲۰۰میکرومول=dNTP(Fermentas) ۰/۵ میلی‌مول= primers F&R ۲ واحد= Taq DNA polymerase(fermentas) ۳ میکرولیتر=DNA template

نتایج به این صورت بود که، ۱۰ نمونه از ۱۰۰ نمونه محتویات روده (۱۰ درصد) اخذ شده از سگ‌ها آلوده به اشریشیاکلی بودند. همچنین، ۱۰ نمونه از ۱۰۰ نمونه محتویات روده (۱۰ درصد) آلوده به سالمونلا تیفی‌موریوم بودند.

۲۲ نمونه از ۱۰۰ نمونه پوست نزدیک به پرینه (۲۲ درصد) اخذ شده از سگ‌ها آلوده به اشریشیاکلی و ۲ نمونه از ۱۰۰ نمونه پوست نزدیک به پرینه (۲ درصد) آلوده به سالمونلا تیفی‌موریوم بودند.

شایان ذکر است تمام جدایه‌های جداشده در محیط کشت، در آزمایش PCR با ردیابی ژن‌های STM0159 و 16srRNA ازنظر حضور باکتری‌های اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم تائید گردیدند.

برای ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی به روش استاندارد Kirby-Bauer و بر اساس استاندارد CLSI، دیسک گذاری انجام شد. نتایج الگوی مقاومت به دست آمده برای جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده شامل جنتامایسین (۱۰۰ درصد)، تتراسایکلین (۱۰۰ درصد)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۱۰۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۱۰۰ درصد)، سفوتاکسیم (۸۰ درصد) و سفتازیدیم (۶۰ درصد) و برای جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از پوست نزدیک به پرینه شامل جنتامایسین (۵۹/۵۹ درصد)، تتراسایکلین (۱۰۰ درصد)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۱۰۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۷۲/۷۲ درصد)، سفوتاکسیم (۴۵/۴۵ درصد) و سفتازیدیم (۴۵/۴۵ درصد) می‌باشد. نتایج نشان داد که در جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده، کمترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به سفتازیدیم (۶ درصد) و سفوتاکسیم (۸ درصد) بوده و همه ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و تری متوپریم-سولفامتوکسازول مقاوم بودند. در خصوص جدایه‌های ایزوله شده از پوست نزدیک

پرینه کمترین میزان مقاومت متعلق به سفوتاکسیم و سفتازیدیم (۱۰ درصد) بوده و تمامی ایزوله‌ها به تتراسایکلین و تری متوپریم-سولفامتوکسازول مقاوم بودند.

نتایج الگوی مقاومت به‌دست آمده برای جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از محتویات روده شامل جنتامایسین (۸۰ درصد)، تتراسایکلین (۱۰۰ درصد)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۸۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۰ درصد)، سفوتاکسیم (۸۰ درصد) وسفتازیدیم (۸۰ درصد) و جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از پوست نزدیک به پرینه به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به میزان ۱۰۰ درصد مقاومت نشان دادند.

به‌منظور ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های aac(3)-IV، qnr، tetA، tetB، sul1، dfrA1 وblaSHV، PCR چندگانه (multiplex PCR) انجام شد.

توزیع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده شامل dfrA1 (۱۰۰ درصد)، tetA (۶۰ درصد)، Sul1، qnr و aac(3)-IV (۲۰ درصد) و tetB و bla_{SHV} (۰ درصد) و در جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از پوست نزدیک به پرینه شامل sul1 (۸۱/۸۱ درصد)، tetA (۷۲/۷۲ درصد)، dfrA1 (۶۳/۶۳ درصد)، qnr و aac(3)-IV (۳۶/۳۶ درصد)، tetB (۱۸/۱۸ درصد) و bla_{SHV} (۹/۰۹ درصد) بود.

حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از محتویات روده شامل tetB و dfrA1 (۸۰ درصد)، tetA و aac(3)-IV (۶۰ درصد)، sul1 و qnr (۲۰ درصد) و bla_{SHV} (۰ درصد) بود و در همه جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از پوست نزدیک به پرینه تنها ژن tetA (۱۰۰ درصد) ردیابی شد.

همان‌طور که از اطلاعات فوق‌الذکر مشخص است، مقایسه الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده نشان می‌دهد که ژن‌های کاندید مورد مطالعه در بخشی از موارد مقاوم ردیابی شدند.

بحث و نتیجه‌گیری

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و حیوانات (خونگرم و خونسرد) است که به واسطه سروتیپ‌های مختلف باکتری سالمونلا ایجاد می‌شود. این باکتری میزبان‌های بسیار گسترده‌ای دارد. سگ‌سانان اهلی و وحشی آلوده فاقد علائم بالینی ممکن است تا ۱۰۰ روز سروتیپ‌های مختلف سالمونلا را در مدفوع خود دفع کنند (۱۴).

اشریشیاکلی رایج‌ترین باکتری پاتوژن گرم منفی است که باعث ایجاد چالش‌های بالینی و اپیدمیولوژیکی می‌شود. در دهه گذشته سویه‌های مقاوم در برابر چند دارو، مانند E. coli ST131 ظاهرشده‌اند (۱۵).

از طرفی برای اطمینان از موفقیت در درمان آنتی‌بیوتیکی، دامپزشکان به‌طور مکرر تمایل دارند از داروهای جدیدتر و یا طیف گسترده مانند فلوروکینولون‌ها یا سفالوسپورین‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های خط اول درمان، در درمان عفونت‌های خاص در حیوانات خانگی استفاده کنند. در نتیجه مقاومت در برابر این داروها در باکتری‌های بیماری‌زای حیوانات خانگی مثل اشریشیاکلی، سالمونلا و پسودوموناس آئروژینوزا و همچنین در باکتری‌های همزیست مثل گونه‌های انتروکوکوس ظاهر شده است. اگرچه به نظر می‌رسد مقاومت به فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌ها بسیار نادر است، اما چنین آنتی‌بیوتیک‌هایی باید به‌عنوان خط آخر درمان باشند و استفاده از آنها باید به مواردی محدود شوند که در آن نمی‌توان از سایر داروهای

ضد میکروبی استفاده کرد. این اقدامات پیشگیرانه می‌تواند اثر این داروهای مهم را در طب انسانی و همچنین در دامپزشکی حفظ کند، در صورتی که استفاده از آنها برای ریشه‌کن کردن عفونت‌های ناشی از سویه‌های چند مقاومتی ضروری است (۱۶).

برخی مطالعات حاکی از ارتباط احتمالی بین مصرف آنتی‌بیوتیک و ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حیوانات خانگی است. به‌عنوان مثال افزایش استفاده از لینکوزامیدها در سوئد طی ۱۹۹۰-۱۹۹۸ با افزایش موازی مقاومت به لینکوزامید در بین ایزوله‌های استافیلوکوکی جداشده از پیودرم سگ مطابقت داشت (۱۷).

مطالعه Cooke و همکاران نشان داد که مقاومت در برابر ماکرولیدها، لینکوزامیدها، اسید فوزیدیک، تتراسایکلین و استرپتومایسین در ایزوله‌های جداشده از مبتلایان با عفونت مجدد، نسبت به موارد اول شایع‌تر است. این اختلافات احتمالاً به دلیل فشار انتخابی اعمال شده توسط درمان ضد میکروبی قبلی در موارد عودکننده‌ی پیودرم بود (۱۸).

Prescott و همکاران (۷۷) نوسانات در سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت جداشده در یک بیمارستان آموزشی دامپزشکی در کانادا را طی سال‌های ۱۹۹۸-۱۹۸۴ نشان دادند. نتایج آنها نشان داد که این موارد منعکس‌کننده‌ی استفاده از طبقات مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان است. آنها همچنین افزایش شیوع گونه‌های انتروکوک مقاوم به چند داروی مرتبط با عفونت ادراری را نشان دادند (۱۹).

عفونت‌های بیمارستانی با باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو مانند اسینتوباکتر بومانی و اشریشیاکلی و سروارهای سالمونلا انتریکا به تازگی در سگ‌های بستری در بیمارستان، به‌ویژه در بخش‌های مراقبت ویژه شناخته شده‌اند. ظهور پاتوژن‌های بیمارستانی مقاوم در برابر چند دارو در سگ‌ها، احتمالاً منعکس‌کننده استفاده فراوان از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در بخش‌های مراقبت ویژه در بیمارستان‌های دامپزشکی است (۲۰).

در مطالعه‌ی حاضر میزان شیوع اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از محتویات روده به ترتیب ۱۰ و ۱۰ درصد بود. با توجه به اینکه سالمونلا تیفی‌موریوم یک پاتوژن روده‌ای می‌باشد، به احتمال زیاد جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده، از سگ‌های مبتلا به اسهال جدا شده‌اند و سالمونلا عامل ایجاد اسهال در آنها بوده است. در غیر این صورت، اگر سگ‌ها فاقد علائم بالینی بوده‌اند، دفع سالمونلا از مدفوع نشان‌دهنده ناقل بودن آنها می‌باشد.

مطالعات مشابه انجام شده در ایران محدود می‌باشد و نتایج فراوانی آلودگی به سالمونلا در جمعیت سگ‌ها متفاوت گزارش شده است. اولین مطالعه صورت گرفته توسط شیمی و همکاران در سال ۱۳۳۵، آلودگی سگ‌های ولگرد تهران به سروتیپ‌های سالمونلا دربی و سالمونلا نیوپورت را ۱۵/۸ درصد بیان کرد (۲۱).

در مطالعه جلالی و همکاران (۲۰۱۰)، باکتری سالمونلا از ۱۲/۵ درصد سگ‌های مبتلا به انتریت هموراژیک ارجاعی به درمانگاه‌های دامپزشکی شهرستان رشت جدا شد (۲۲).

نمرودی و همکاران (۱۴) در سال ۲۰۱۶ طی مطالعه‌ای، از ۲۱۰ سگ روستایی به ظاهر سالم نمونه گرفته و باکتری سالمونلا در ۴۰ نمونه از ۲۱۰ نمونه (۱۹/۰۴ درصد) مورد بررسی شناسایی شد. سه سروتیپ شناسایی شده در این تحقیق شامل سالمونلا اینترتیدیس (۵۰ درصد)، سالمونلا تیفی‌موریوم (۳۵ درصد) و سالمونلا دابلین (۱۵ درصد) بود. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، نئومایسین و پنی‌سیلین بود.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ بر روی سگ‌های چوپان در گرمسار، همه‌ی سویه‌های جداشده به استرپتومایسین، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول، پنی‌سیلین و اریترومایسین مقاوم بودند (۲۳).

طی مطالعات اولیه صورت گرفته در آمریکا آلودگی به سروتیپ‌های سالمونلا با غالبیت سروتیپ‌های تیفی‌موریوم، آناتوم، پاناما و کرفلد در سگ‌ها گزارش شده است (۲۴).

پورمیربلوک جلالی و همکاران (۲۵) طی مطالعه‌ای از ۸۰ قلاده سگ مبتلا به انتریت هموراژیک که آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند نمونه مدفوع گرفتند. پس از بررسی باکتریولوژیک ۴ باکتری اشریشیاکلی، کلستریدیوم، کمپیلوباکتر و سالمونلا از نمونه‌ها جدا گردید. از مجموع ۸۰ قلاده سگ ۲۱/۲۵ درصد مبتلا به سالمونلا، ۸/۷۵ درصد مبتلا به کلستریدیوم، ۲۶/۲۵ درصد مبتلا به کمپیلوباکتر و ۴۳/۷۵ درصد مبتلا به اشریشیاکلی بودند. جدایه‌های اشریشیاکلی نسبت به سفتریاکسون و سفیکسیم حساسیت خوبی نشان دادند. سایر باکتری‌ها نیز در نمونه‌های بعدی نسبت به این دو دارو حساسیت خوبی نشان دادند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد، ایزوله‌های اشریشیاکلی به دو ترکیب سفالوسپورینی مورد مطالعه نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت بهتری نشان دادند.

یوسفی و همکاران در یک مطالعه در سال ۲۰۱۷، ۴۵۰ نمونه ادرار سگ را کشت دادند. ۲۰۰ نمونه (۴۴/۴ درصد) از نظر حضور اشریشیاکلی مثبت بودند. شیوع اشریشیاکلی در سگ‌های سالم و سگ‌های مبتلا به عفونت ادراری به ترتیب ۲۸ و ۶۵ درصد برآورد شد. سویه‌های UPEC بیشترین درصد مقاومت را به جنتامایسین (۹۵ درصد) نشان دادند. میزان مقاومت به تریمتوپریم-سولفامتوکسازول ۶۵ درصد بود. نتایج این مطالعه حضور ژن‌های ردیابی شده کدکننده مقاومت را به‌ترتیب aac(3)-IV (۷۷ درصد)، CI.TM (۵۲/۵ درصد)، tetA (۴۶/۵ درصد) و sul1 (۴۰ درصد) بیان کرد (۲۶). در نتایج مطالعه‌ی حاضر فراوانی هر سه ژن Sul1، qnr و aac(3)-IV ردیابی شده کدکننده مقاومت، ۲۰ درصد گزارش شده است.

کاروالو و همکاران در سال ۲۰۱۶ برای مشخص کردن الگوی مقاومت، سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از ۱۳۴ سگ و ۱۳۴ صاحبان آنها و ۴۴ نفر به‌عنوان کنترل که ادعا داشتند با سگ‌ها هیچ ارتباطی نداشتند را بررسی کردند. سویه‌های اشریشیاکلی مقاوم به چند دارو از ۴۲ (۳۱/۳ درصد) نمونه مدفوع سگ‌ها و صاحبانشان و از ۱۹(۴۳/۱ درصد) نمونه کنترل جدا شدند. سویه‌ها سطح بالایی از مقاومت به تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول را نشان دادند. در همه‌ی گروه‌ها ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M} و bla_{SHV} شناسایی شد. در این مطالعه سگ‌های خانگی به‌عنوان منبع بالقوه‌ی سویه‌های اشریشیاکلی چند مقاومتی مشخص شدند (۲۷).

ترکان و همکاران در سال ۲۰۱۶ طی مطالعه‌ای از ۷۰ سگ نمونه سواب رکتال تهیه کردند. از ۷۰ سواب کشت داده شده ۳۳ (۴۷/۱ درصد) نمونه از لحاظ حضور اشریشیاکلی مثبت بودند. از ۷۰ نمونه ۱۴ نمونه برای ردیابی ژن‌های کدکننده عوامل حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. از ۱۴ ایزوله بررسی شده، ۹ (۶۴/۳ درصد) مورد مثبت برای ژن stx(1)، ۵ (۳۵/۷ درصد) مورد مثبت برای ژن stx(2)، ۷ (۵۰ درصد) مورد مثبت برای ژن eae، ۱ (۷/۱ درصد) مورد مثبت برای ژن cnf(1)، ۶ (۴۲/۹ درصد) مورد مثبت برای ژن‌های aad(A1) و bla_{SHV}، ۵ (۳۵/۷ درصد) مورد مثبت برای ژن‌های tetA و dfr(A1)، ۴ (۲۸/۶ درصد) مورد مثبت برای ژن aac(3)-IV و ۳ (۲۱/۴ درصد)

مورد مثبت برای ژن‌های tetB و sul1 ردیابی شد (۲۸). در مطالعه‌ی حاضر همه‌ی ایزوله‌ها از نظر حضور ژن dfrA1 مثبت بودند (۱۰۰ درصد) و ژن‌های tetB و bla_{SHV} در هیچ ایزوله‌ای یافت نشد (۰ درصد).

سریسانگا و همکاران (۲۹) در سال ۲۰۱۷، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های حدت سالمونلا انتریکا جداشده از سگ و گربه‌های خانگی را به صورت ژنوتیپی و فنوتیپی مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق از محتویات رکتوم ۵۰ گربه و ۲۵۰ سگ نمونه‌برداری شد. ۱۲۲ ایزوله سالمونلا انتریکا از ۱۳۳ سگ و ۹ گربه جدا شد که سروارهای weltevreden (۱۵/۶ درصد) و تیفی‌موریوم (۱۳/۹ درصد) رایج‌ترین سروارها بودند. این میزان در مقایسه با نتایج حاصل از بررسی ما بیشتر است. نتایج آنها نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به ژن‌های aadA2 و dfrA12 بود. میزان مقاومت به ژن qnr، ۴/۹ درصد بود که این میزان با نتایج حاصل از بررسی ما مطابقت دارد. در مطالعه حاضر نیز بیشترین ژن مقاومت ردیابی شده در جدایه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از محتویات روده مربوط به tetB (۸۰ درصد) و dfrA (۸۰ درصد) است.

در مقایسه با نتایج تحقیقات گذشته، میزان شیوع اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده به دست آمده از تحقیق حاضر، کمتر (۱۰ درصد) گزارش شده است. احتمالاً یکی از دلایل این موضوع استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در طب حیوانات خانگی بوده است. از طرفی، به دلیل مصرف گوشت در این حیوانات و از آنجایی‌که مطالعات مختلف حضور بقایای آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی با منشأ دامی و طیور را تائید کرده است، احتمالاً یکی دیگر از دلایل پایین بودن درصد شیوع اشریشیاکلی جداشده از محتویات روده گزارش شده در این تحقیق مربوط به این موضوع می‌باشد.

در راستای این موضوع، طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت، در تمام ۸۰ لاشه طیور گوشتی کشتار شده بقایای آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین یافت شد (۳۰).

در بررسی که در سال ۲۰۰۶ در تهران انجام شد، در نمونه‌های به دست آمده از ۲۷۰ قطعه طیور میزان بقایای آنتی‌بیوتیک در بافته‌ای مختلف بالاتر از حد مجاز به دست آمد (۳۱).

تفاوت در شیوع مقاومت همان‌طور که در مطالعات مختلف مشاهده شده است می‌تواند ناشی از استفاده از روش‌های مختلف برای تست حساسیت و نقطه نظرات متفاوت برای ارزیابی نتایج باشد (۴۵). همچنین به نظر می‌رسد که الگوی مقاومت دارویی در هر منطقه بستگی به میزان، نوع و تداوم مصرف داروهای آنتی‌باکتریال در آن منطقه داشته است (۳۲).

تماس تنگاتنگ بین حیوانات خانگی و انسان‌ها، شرایط مساعدی را برای انتقال باکتری‌ها از طریق تماس مستقیم (نوازش کردن، لیس زدن، صدمات فیزیکی و...) یا از طریق محیط داخلی (آلودگی غذا، اثاثیه و ...) فراهم می‌کند. کودکان به دلیل تماس فیزیکی نزدیک‌تر با گربه‌ها و سگ‌ها و همچنین با محیط‌هایی از خانه که توسط حیوانات خانگی آلوده است، (کف، فرش و ...) نسبت به بزرگسالان بیشتر در معرض خطر قرار دارند.

همچنین در مطالعه حاضر، میزان شیوع اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از پوست نزدیک به پرینه به ترتیب ۲۲ و ۲ درصد برآورد شده است. نمونه‌های پوستی به منظور ارزیابی امکان انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به محیط زندگی از طریق پلاسمیدها اخذ شد. نتایج ما به این صورت بود که از ۱۰۰ نمونه پوستی اخذ شده، ۲ نمونه از نظر حضور سالمونلا مثبت بودند در صورتی

که با بررسی نمونه مدفوع سگ‌های مورد نظر، سالمونلا در مدفوع آنها یافت نشد. بنابراین با توجه به این موضوع و با اشاره به این‌که سالمونلا یک باکتری پاتوژن روده‌ای می‌باشد، می‌توان احتمال داد که منبع سالمونلاهای جدا شده از پوست، محیط بوده است. در راستای این موضوع اخیراً، بروز سروارهای سالمونلا در تشویقی‌های سگ نشان داده شده است (۸). مطالعات نشان داده‌اند که تشویقی‌های مشتق شده از حیوانات می‌تواند یک منبع بالقوه عفونت با سالمونلا در حیوانات و انسان باشد، که شامل سالمونلا تیفی‌موریوم DT104 مقاوم به چند دارو می‌باشند.

انتقال افقی ژن‌های مقاومت ممکن است در خلاف جهت انتقال باکتری‌ها اتفاق بیفتد. برای مثال، باکتری‌های انسانی منتقل شده به حیوانات اهلی ممکن است ژن‌های مقاومت از فلور همزیست حیوانات خانگی را به دست آورند و ممکن است توسط درمان ضد میکروبی در این حیوانات انتخاب شوند.

علاوه بر این، حتی در مورد انتقال باکتری‌ها از انسان به حیوانات خانگی، حیوانات خانگی به انتشار باکتری‌های مقاوم به‌دست آمده از طریق مدفوع کردن کمک می‌کنند، بنابراین باعث افزایش شیوع آن در جمعیت انسانی و محیط می‌شوند.

برخلاف بسیاری از بیماری‌ها، مقاومت ضد میکروبی با وجود تعداد کم باکتری‌ها از یک میزبان به میزبان دیگر منتقل می‌شود. در تئوری حتی یک سلول باکتریایی واحد ممکن است قادر به انتقال ژن‌های مقاومت در فلور باکتریایی میزبان گیرنده باشد. انتقال ژن مقاومت بین باکتری‌های حیوانات خانگی و منشأ انسانی ممکن است از طریق حیوانات خانگی، انسان یا محیط انجام شود.

بیشتر اطلاعات موجود در مقالات علمی در مورد انتقال باکتری‌ها بین حیوانات خانگی و انسان، مربوط به باکتری‌های بیماری‌زای انسان است. زخم‌های ناشی از گزش در انسان، فرصت انتقال ارگانیسم‌های مقاوم را از سگ‌ها و گربه‌ها به انسان فراهم می‌کنند و می‌توانند عواقب جدی داشته باشند، مگر اینکه حساسیت ارگانیسم‌ها مشخص و درمان مناسب انجام گیرد. حداقل ۱ درصد از موارد سالمونلوز که سالانه در ایالات متحده گزارش می‌شود مربوط به حیوانات همراه است (۳۳).

در این راستا، انتقال سالمونلا ویرشوو از دو سگ خانگی به نوزاد با استفاده از روش پالسفیلد ژل الکتروفورز (PFGE) تائید شد (۳۴).

در سال ۲۰۰۱ شیوع سالمونلا تیفی‌موریوم با مقاومت چندگانه که مرتبط با تجهیزات دامپزشکی حیوانات خانگی بود در واشنگتن گزارش شد (۳۵).

تخمین زده می‌شود که تقریباً ۶ درصد کمپیلوباکتریوز روده از حیوانات خانگی منتقل می‌شود (۳۶).

در یک مطالعه (۳۷) مشخص شد که یک دختربچه ۲ ساله و سگش سویه مشابه مقاومت به فلوروکینولون را به اشتراک گذاشته‌اند. هیچ یک از آنها تاکنون تحت درمان با فلوروکینولون‌ها نبودند، که این نشان می‌داد این سویه با قرار گرفتن قبلی این دو فرد در معرض کینولون‌ها انتخاب نشده است، بلکه از یک منبع خارجی حاصل شده است. حتی اگر این سگ با یک رژیم غذایی تجاری تغذیه می‌شد، کسب آن از یک منبع غذایی معمولی هم ممکن بود، زیرا گاهاً به این سگ‌ها ضایعات مواد غذایی انسان داده می‌شد.

گونه‌های E.coli که باعث عفونت مجاری ادراری در سگ‌ها می‌شوند، از نظر فیلوژنیک با E.coli بیماری‌زای خارج روده انسانی (EXPEC) مرتبط هستند و ژن‌های حدتی را نشان می‌دهند که مشخصه ایزوله‌های بالینی انسانی است (۳۸، ۳۹).

اثبات انتقال ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی از حیوان

خانگی به انسان، نسبت به انتقال باکتری‌های مقاوم از حیوان خانگی به انسان دشوارتر است. در حالی که در حالت دوم، تایپ کردن مولکولی سویه‌های مورد نظر اطلاعات ارزشمندی را برای تائید یا رد رابطه نزدیک بین سویه‌های مقاوم جداشده از حیوانات خانگی و انسان ارائه می‌دهد، تشخیص همان ژن مقاومت در باکتری‌ها از هر دو منبع می‌تواند به‌عنوان یک نشانه در نظر گرفته شود. برای مثال، ژن‌های مقاومت به سولفانامید؛ sul1 و sul2، ژن‌های مقاومت به استرپتومایسین؛ strA، strB و aadA2 و ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین؛ tetA و tetB نشان داده شده که در سویه‌های E.coli جداشده از عفونت دستگاه ادراری وجود داشته است (۴۰).

با این حال تمام این ژن‌ها با عناصر ژنتیکی متحرک مانند ترانسپوزون‌ها، اینتگرون‌ها یا پلاسمیدها همراه هستند. بنابراین جای تعجب نیست که همان ژن‌های مقاومت در سویه‌های E.coli از انسان و سایر حیوانات و همچنین در سایر باکتری‌های روده‌ای مانند سالمونلا تیفی‌موریوم نیز یافت شود (۴۲-۴۰).

از طرف دیگر، در مطالعه حاضر از نمونه‌های پوستی ۱۰۰ قلاده سگ مورد بررسی، ۲۲ مورد از نظر حضور باکتری E.coli مثبت بودند، که تنها در ۲ قلاده سگ باکتری E.coli در مدفوع نیز مشاهده گردید. پس با توجه به موارد بحث شده می‌توان نتیجه گرفت که امکان انتقال ژن‌های مقاومت به واسطه‌ی اشریشیاکلی پوست به سایر باکتری‌های پوست یا روده یا حتی به محیط وجود دارد.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه مشخص کرد که اکثر سویه‌های اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم جداشده از محتویات روده، واجد مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بوده که این خود ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان و حیوانات همراه است، لذا این موضوع اهمیت بررسی آنتی‌بیوگرام قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک در درمان بیماری‌های دامی و انسانی را آشکار و خطر بالقوه بروز سالمونلوز را به‌خصوص در کودکان و سالخوردگان که عملکرد سیستم ایمنی ضعیف دارند، یادآوری می‌کند. بنابراین خطر انتقال باکتری‌های مقاوم و یا ژن‌های مقاومت از حیوانات خانگی به انسان‌ها وجود دارد که شامل گونه‌های باکتریایی و ژنوتیپ‌های مقاومتی است که در حوزه‌ی بالینی وجود دارند.

مطالعات مشخص کرده‌اند که یک عامل مؤثر در شیوع ژن‌های مقاومت در جمعیت باکتری‌ها و میزبان، موقعیت بسیاری از این ژن‌ها در عناصر متحرک می‌باشد.

همچنین، انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی با این واقعیت که تقریباً کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی مشابهی در طب انسان و حیوانات کوچک در حال استفاده است، احتمالاً با تماس فیزیکی نزدیک حیوانات خانگی و انسان‌ها افزایش می‌یابد. با این حال کمیت این خطر از آنجایی‌که داده‌های کلیدی در مورد مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در طب حیوانات خانگی و در مورد حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شیوع و تحرک ژن‌های مقاومت در بین پاتوژن‌های باکتریایی در حیوانات خانگی در حال حاضر در دسترس نیست، بسیار مشکل‌ساز است.

در نتیجه نقش حیوانات خانگی به‌عنوان مخازن مقاومت باکتریایی به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد و از آنجایی‌که تقریباً تمام داده‌های مربوط به شیوع ژن‌های مقاومت در باکتری‌ها از مطالعات منتخب تهیه شده و اغلب به جمعیت آزمایشی کوچک و متوسط مراجعه شده، نیاز است که مطالعات مشابه گسترده‌تری در این زمینه انجام پذیرد.

از طرفی پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی ارتباط فیلوژنتیکی بین باکتری‌های رکتوم و سطح

پوســـت حیوانـــات خـــانگی بـــا باکتری‌هـــای روده‌ای صاحبان آنها، نمونـه‌گیری از صـاحبان حیوانـات خـانگی نیـز انجـام شـود کـه ایـن امـر در نهایـت احتمـالاً بـه اصـــلاح الگـــوی مصـــرف آنتی‌بیوتیک‌هـــا در انســـان و حیوانات خانگی خواهد انجامید.

References

1- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature reviews microbiology*. 2010; 8(3): 207-17.

2- Singleton P, Mazliak P. Bacteria, in Biology, Biotechnology and Medicine. *Annee Biologique*. 1997; 36(3): 212.

3- Vogt RL, Dippold L. Escherichia coli O157: H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002. *Public health reports*. 2005; 120(2): 174-8.

4- Centers for Disease Control and Prevention. National center for emerging and zoonotic divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/technical. html. Accessed Jan. 2014 May.

5- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. science. 2005; 308(5728): 1635-8.

6- Su L, Chiu C. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*. 2007; 30(3): 210

7- Fàbrega A, Vila J. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*. 2013; 26(2): 308-41.

8- White DG, Datta A, McDermott P, Friedman S, Qaiyumi S, Ayers S, English L, McDermott S, Wagner DD, Zhao S. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of Salmonella serovars isolated from animal-derived dog treats in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52(5): 860-3.

9- Srisanga S, Angkititrakul S, Sringam P, Le Ho PT, Vo AT, Chuanchuen R. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes of Salmonella enterica isolated from pet dogs and cats. *Journal of veterinary science*. 2017; 18(3): 273-81.

10- Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2013; 12(1): 1-2.

11- Mumtaz H, Qaed Amini M, Momeni M. Detection of virulence genes in Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis serotypes isolated from chicken meat in Chaharmahal and Bakhtiari province. *Journal of Food Microbiology*. 2014; Pages 22-17 [In Persian].

12- Jamshidi AE, Basami M, Afshari NS. Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran.

13- Nakadomari GH, Charalo AC, Pavan AC, Vignoto VK, Sfaciotte RA, Wosiacki SR. MULTIPLEX-PCR FOR DETECTION OF β-LACTAM RESISTANCE IN Staphylococcus spp. *Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública*. 2019; 6(2): 262-75.

14- Namroodi S, Estaji H, Dehmordeh M. Frequency and antimicrobial resistance pattern of Salmonella Spp in asymptomatic rural dogs. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2016; 26(135): 153-7.

15- Paitan Y. Current trends in antimicrobial resistance of Escherichia coli. Escherichia coli, a Versatile Pathogen. *Current Topical Microbiology and Immunology*. 2018; 416: 181-211

16- Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004; 54(2): 321-32.

17- Holm BR, Petersson U, Mörner A, Bergström K, Franklin A, Greko C. Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. *Veterinary Record*. 2002; 151(20): 600-5.

18- Cooke CL, Singer RS, Jang SS, Hirsh DC. Enrofloxacin resistance in Escherichia coli isolated from dogs with urinary tract infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2002 1; 220(2): 190-2.

19- Prescott JF, Hanna WB, Reid-Smith R, Drost K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *The Canadian veterinary journal*. 2002; 43(2): 107.

20- Current trends in antimicrobial resistance of Escherichia coli. Escherichia coli, a Versatile Pathogen. *Current Topical Microbiology and Immunology*. 2018; 416: 181-211.

21- Shimi A, Keyhani M, Bolurchi M. Salmonellosis in apparently healthy dogs. *The Veterinary record*. 1976; 98(6): 110-1.

22- Jalali PA, Beygi MD, Asadpoor L. Isolation and antibiotic resistance of Salmonella from dogs with hemorrhagic enteritis. *J Azad University*. 2010; 9(3): 12-7.

23- Salehi TZ, Badouei MA, Madadgar O, Ghiasi SR, Tamai IA. Shepherd dogs as a common source for Salmonella enterica serovar Reading in Garmsar, Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2013; 37(1): 102-5.

24- Morse EV, Duncan MA. Canine salmonellosis: prevalence, epizootiology, signs, and public health significance. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1975; 167(9): 817-20.

25- Pourmirblouk Je, Dadash Bm, Asadpour L. Investigation On The Bacterial Of Dog's Hemorrhagic Enteritis And Determining Their Antibiotic Resistance In Rasht Veterinary Clinics.

26- Yousefi A, Torkan S. Uropathogenic Escherichia coli in the urine samples of Iranian dogs: antimicrobial resistance pattern and distribution of antibiotic resistance genes. *BioMed research international*. 2017 Oct; 2017.

27- Carvalho AC, Barbosa AV, Arais LR, Ribeiro PF, Carneiro VC, Cerqueira AM. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of Escherichia coli from dogs and owners. *brazilian journal of microbiology*. 2016; 47: 150-8.

28- Torkan S, Bahadoranian MA, Khamesipourc F, Anyanwu MU. Detection of virulence and antimicrobial resistance genes in Escherichia coli isolates from diarrhoiec dogs in Iran. *Austral Journal of Veterinary Sciences.* 2016; 48(2): 181-90.

29- Srisanga S, Angkititrakul S, Sringam P, Le Ho PT, Vo AT, Chuanchuen R. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes of Salmonella enterica isolated from pet dogs and cats. *Journal of veterinary science*. 2017; 18(3): 273-81.

30- Ghasemi F, Fathi B, Jamshidi A. Detection of antibiotic residues in poultry carcasses in Mashhad poultry abattoir. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. 2014; 6(1): 30-6.

31- Salehzadeh F, Madani R, Salehzadeh A, Rokni N, Golchinefar F. Oxytetracycline residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2006; 5(4): 377-81.

32- Emadi CS, Hasanzadeh M, Bozorg MM, Mirzaei S. Characterization of the Salmonella isolates from backyard chickens in north of Iran, by serotyping, multiplex PCR and antibiotic resistance analysis.

33- Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004; 54(2): 321-32.

34- Sato Y, Mori T, Koyama T, Nagase H. Salmonella Virchow infection in an infant transmitted by household dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2000; 62(7): 767-9.

35- Saeed AM, Harris NV, DiGiacomo RF. The role of exposure to animals in the etiology of Campylobacter jejuni/coli enteritis. *American journal of epidemiology*. 1993; 137(1): 108-14.

36- Damborg P, Olsen KE, Møller Nielsen E, Guardabassi L. Occurrence of Campylobacter jejuni in pets living with human patients infected with C. jejuni. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(3): 1363-4.

37- Johnson JR, Stell AL, Delavari P, Murray AC, Kuskowski M, Gaastra W. Phylogenetic and pathotypic similarities between Escherichia coli isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *The Journal of infectious diseases*. 2001; 183(6): 897-906.

38- Starčič M, Johnson JR, Stell AL, Van Der Goot J, Hendriks HG, Van Vorstenbosch C, Van Dijk L, Gaastra W. Haemolytic Escherichia coli isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains. *Veterinary microbiology*. 2002; 85(4): 361-77.

39- Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology*. 2003; 91(1): 73-84.

40- Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology*. 2003; 91(1): 73-84.

41- Sørum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary research*. 2001; 32(3-4): 227-41.

The comparison of Antibiotic Resistance Patterns of Salmonella typhimurium isolates and Escherchia coli separated from intestinal contents and the skin close to the perineum in dogs in Esfahan province.

Fahimeh NeginTaji Zardak[1] , Saam Torkan*[2]

1 - Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahr Kord, Shahr Kord, Iran.
2 - Assistant professor, Department of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahr Kord, Shahr Kord, Iran.

Accept: February 28, 2021 Receive: January 24, 2021; Revise: February 8, 2021;

Summary

Salmonella and Escherichia coli are important bacteria that cause intestinal infections and diarrhea. The increment of salmonella and E.coli antibiotic resistance is considered as a major global problem. Since indoor dogs are known as potential reservoirs for these two bacteria, this study was designed for investigation of antibiotic resistance pattern of salmonella typhimurium and Escherichia coli isolated from rectal and perineal region skin swabs of these dogs in Isfahan Province. Skin and rectal swabs obtained from 100 dogs referred to veterinary clinics were cultured for bacterial isolation. After bacterial culture and isolation, salmonella and E.coli positive colonies were confirmed using Polymerase chain reaction. Then the presence of the most prevalent antibiotic resistance genes were investigated using PCR method and phenotypic patterns were determined using disc diffusion method. All of the E.coli bacteria isolated from rectal samples were resistant to gentamycin, tetracycline, ciprofloxacin, and trimethoprim- sulfamethoxazole. Furthermore, all of the salmonella rectal isolates were resistant to tetracycline. DfrA1 gene was detected in all of the E.coli bacteria isolated from rectal swabs. Tet B and dfrA1 were the most detected genes in salmonella typhimurium bacteria isolated from rectal swabs. Multiple antibiotic resistance in these isolates shows extra usage of antibiotics and to overcome this problem, antibiogram test is suggested to choose the best antibiotic for the treatment of infectious diseases.

Keywords: *Antibiotic Resistance, Salmonella typhimurium, Escherchia coli , dogs.*

بررسی مولکولی میزان ابتلا به بیماری برونشیت عفونی در گله‌های طیور گوشتی

نجمه معتمد[1*]، محسن بشاشتی[2]، محمدحسین فلاح مهرآبادی[2]

۱- استادیار، بخش تحقیق و تولید واکسن‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ، ایران.
۲- استادیار، بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۲ دی ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

از بیماری‌های مهم در صنعت پرورش طیور بیماری برونشیت عفونی است که علی‌رغم واکسیناسیون گسترده گله‌های صنعتی سالیانه خسارات اقتصادی سنگینی را بر این صنعت در کشور و دنیا تحمیل می‌کند. هدف از این مطالعه شناسایی میزان ابتلا به بیماری برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی تجاری دارای علائم تنفسی و تلفات بود. از تعداد ۳۵ مزرعه مرغ گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی در مناطق مرکزی و جنوب ایران در سال ۱۳۹۸ نمونه‌های بافت نای و کلیه تهیه و برای بررسی حضور ویروس برونشیت عفونی با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای معکوس ارزیابی شدند. فراوانی شناسایی ویروس برونشیت عفونی در مجموع از ۳۵ مزرعه ۱۵ مورد (۴۲/۸۵ درصد) بود. برای تعیین ژنوتیپ ویروس‌های برونشیت از توالی‌یابی پارشیال ژن پروتئین اسپایک۱ استفاده شد که نتایج منجر به شناسایی دو ژنوتیپ ماساچوست و واریانت ۲ گردید. بر اساس آنالیز فیلوژنی ویروس‌های واریانت ۲ در دودمان GI- ۲۳ قرار می‌گیرند که فراوانی آن در کشور طی سال‌های اخیر رو به افزایش است. ویروس‌های ماساچوست جدا شده از لحاظ فیلوژنی با ویروس‌های واکسن سروتیپ ماساچوست در یک کلاستر قرار نداشتند تعیین بیماری‌زایی این جدایه‌ها نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. نتایج مطالعه حاضر بیانگر این است که در کشور علی‌رغم واکسیناسیون گسترده علیه بیماری برونشیت عفونی همچنان ویروس می‌تواند منجر به بیماری حتی در گله‌های واکسینه شود.

واژگان کلیدی: *برونشیت عفونی، سندروم تنفسی، واکنش زنجیره پلی‌مراز، گله گوشتی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: motamed62@yahoo.com

مقدمه

برونشیت عفونی یک بیماری عفونی حاد و بسیار واگیر ماکیان با گستردگی جهانی است که از نظر اقتصادی اهمیت زیادی داشته و از جمله عوامل ایجاد کننده کمپلکس تنفسی در ماکیان محسوب می‌گردد. تولید صنعتی و متراکم طیور باعث افزایش سرعت انتقال بیماری و تشدید آن شده و علی‌رغم واکسیناسیون گسترده هنوز طغیان‌های بیماری در گله‌های تجاری رخ می‌دهد و این بیماری را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین چالش‌های صنعت طیور حتی در کشورهای پیشرفته بدل کرده است. ارگان هدف ویروس سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه تنفسی و ادراری-تناسلی ماکیان بوده و نشانه‌های بیماری بسته به سویه ویروس ممکن است شامل درگیری دستگاه تنفس، عطسه، سرفه، دیسترس تنفسی، رال تنفسی و افزایش ضریب تبدیل خوراک، ضایعات کلیوی و در گله‌های تخم‌گذار و مادر افت تولید تخم و دفرمیتی و کاهش کیفیت داخلی و خارجی تخم‌مرغ‌ها متغیر باشد. واگیری بیماری تا ۱۰۰ درصد و تلفات تا بیش از ۵۰ درصد در صورت همراه شدن با عوامل پاتوژن ثانویه از جمله کلی‌باسیلوز گزارش شده است (۱). ویروس بیماری برونشیت عفونی یک RNA ویروس از جنس گاما کرونا ویروس است و ژنوم ۲۷/۶kb آن ۴ پروتئین ساختاری (M, E, S و N) را کد می‌کند. گلیکوپروتئین S توسط آنزیم پروتئاز سلولی به دو تحت واحد S1 و S2 شکسته می‌شود که تحت واحد S1 محرک تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و حاوی اپی‌توپ‌های تعیین سروتیپ ویروس و عامل اتصال به رسپتور سلول میزبان است. مهم‌ترین راه کنترل بیماری واکسیناسیون با واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته و یا کشته است که همیشه با موفقیت ۱۰۰ درصد همراه نیست. یکی از مهم‌ترین دلایل شکست واکسیناسیون عدم وجود ایمنی متقاطع بین سویه‌های مختلف ویروس با سویه واکسن است (۲) چرا که ویروس برونشیت عفونی از لحاظ ژنتیکی بسیار متغیر بوده و از طریق موتاسیون یا نوترکیبی مرتباً در حال تغییر و تحول و تولید واریانت‌های جدید ژنتیکی و آنتی‌ژنیکی است. مانیتورینگ مستمر ویروس‌های برونشیت عفونی در مناطق مختلف جغرافیایی به منظور تهیه نقشه تنوع ژنتیکی (genetic diversity) و شناسایی منشأ و گستردگی ژنوتیپ‌های ویروس اهمیت دارد، همچنین آنالیز ژنتیکی در تعیین بهترین برنامه واکسیناسیون با واکسن‌های رایج (زنده یا غیر فعال) کاربرد دارد. معمولاً آنالیز coding region ژن S1 به منظور تعیین ژنوتیپ، مطالعه ارتباط فیلوژنی و اپیدمیولوژیک جدایه‌های برونشیت انجام می‌شود (۳). هدف از مطالعه حاضر ردیابی و تعیین ژنوتیپ ویروس‌های برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی تجاری دارای نشانه‌های تنفسی و با سابقه واکسیناسیون در ایران می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی از ابتدای سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. جمعیت هدف مزارع طیور گوشتی تجاری با نشانه‌های درگیری تنفسی و تلفات بودند. مجموعاً از ۳۵ مزرعه مشکوک در استان‌های مرکزی، یزد، اصفهان و بوشهر نمونه‌برداری انجام شد. تمامی گله‌ها سابقه واکسیناسیون علیه بیماری برونشیت عفونی را داشتند.

نمونه‌برداری: در هر مزرعه از حداقل ۱۰ پرنده تازه تلف شده یا مبتلا با نشانه درگیری تنفسی، بافت‌های نای و کلیه و لوزه سکومی به صورت تجمیع شده نمونه‌گیری و به آزمایشگاه منتقل شدند. از نمونه‌های بافت پس از هموژن شدن در بافر فسفات سالین (۲/ ۷ =pH) حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین استرپتومایسین+ آمفوتریسین)

سوسپانسیون ۲۰ درصد (W/V) تهیه شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: سوسپانسیون بافتی با دور g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و ۲۰۰ میکرولیترمایع رویی برای استخراج RNA با استفاده از کیت Viral RNA Extraction Kit شرکت Roche آلمان طبق پروتکل توصیه شده کارخانه سازنده استفاده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده درفریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت (x-۲step RT-PCR Pre-Mix(Taq),Bio Fact ™) و پرایمر Random hexamers و آنزیم M-MLV RTase در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (RNA ۹ میکرولیتر، Random Hexamer ۱ میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر XRT mix ۲)و برنامه دمایی ۱۰ دقیقه ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ دقیقه ۵۰ درجه و ۵ دقیقه ۸۵ درجه انجام شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در تشخیص و شناسایی ویروس برونشیت عفونی

پرایمر	محل توالی	توالی پرایمر ('۳- '۵)	طول محصول PCR/ رفرانس
-F۱۰۳N -R۱۰۲N	۴۶۴-۴۴۵ ۷۸۲-۸۰۱	CCTGATGGTAATTTCCGTTG ACGCCCATCCTTAATACCTT	(۱۲)/۳۵۷bp
+۱SX _۲SX +۳SX _۴SX	۶۷۸-۶۹۸ ۱۱۴۸-۱۱۶۸ ۷۰۵-۷۲۵ ۱۰۷۵-۱۰۹۶	CACCTAGAGGTTTG T/C T A/T GCAT TCCACCTCTATAAACACC C/T TT TAATACTGG C/T AATTTTTCAGA AATACAGATTGCTTACAACCACC	(۱۹)/۴۹۰bp ۳۹۰bp

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس(RT-PCR) و تعیین توالی ژن: کلیه نمونه‌های مشکوک به برونشیت ابتدا با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی مربوط به توالی حفاظت شده ژن نوکلئوکپسید (N) ویروس بیماری برونشیت عفونی ارزیابی شدند (۴). در ادامه از نمونه‌هایی که در ردیابی ژن N مثبت شده بودند در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای و با استفاده از دو جفت پرایمر (SX_{1-} SX_4) یک بخش به طول ۳۹۰ جفت باز از ژن گلیکوپروتئین اسپایک۱ برای تعیین ژنوتیپ ویروس و آنالیز فیلوژنیک تکثیر و توالی‌یابی گردید (۵، ۶). واکنش زنجیره پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰ ،MgCl2 ۱/۵میکرولیتر، ۰/۸ میکرولیتر dNTPs, ۰/۸میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۲میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۱۷/۱میکرولیتر آب، ۲میکرولیتر cDNA) انجام شد در هر واکنش ویروس برونشیت عفونی واکسن H۱۲۰ به‌عنوان کنترل مثبت و آب عاری از نوکلئاز به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها در جدول ۱ و برنامه دمایی واکنش در جدول ۲ نمایش داده شده است. نمونه‌هایی که در واکنش PCR تکثیر نشدند حداقل ۵-۳ نوبت متوالی در تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۱-۹ روزه SPF پاساژ داده شدند و از لحاظ بروز علایم اختصاصی ویروس برونشیت عفونی از جمله کوتولگی و کاهش رشد جنین بررسی شدند.

توالی‌های تکثیر شده ژن S1 با استفاده از کیت استخراج محصول PCR (High Pure PCR Product Purification Kit , Roche, Germany) تخلیص و به همراه پرایمرهای پیشرو و معکوس (SX۳ و SX۴) برای تعیین توالی ژن دو طرفی به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی S1 ارسال شده ابتدا Blast شده و پس از Align شدن توالی‌ها در نرم افزار Clustal W با توالی‌های رفرانس مشابه به‌دست آمده در NCBI GenBank database مقایسه شدند. با استفاده از نرم‌افزار Mega.۷ آنالیز توالی‌ها انجام و سپس درخت فیلوژنی با روش Neighbor-Joining و Bootstrap ۱۰۰۰ رسم شد.

جدول ۲- سیکل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

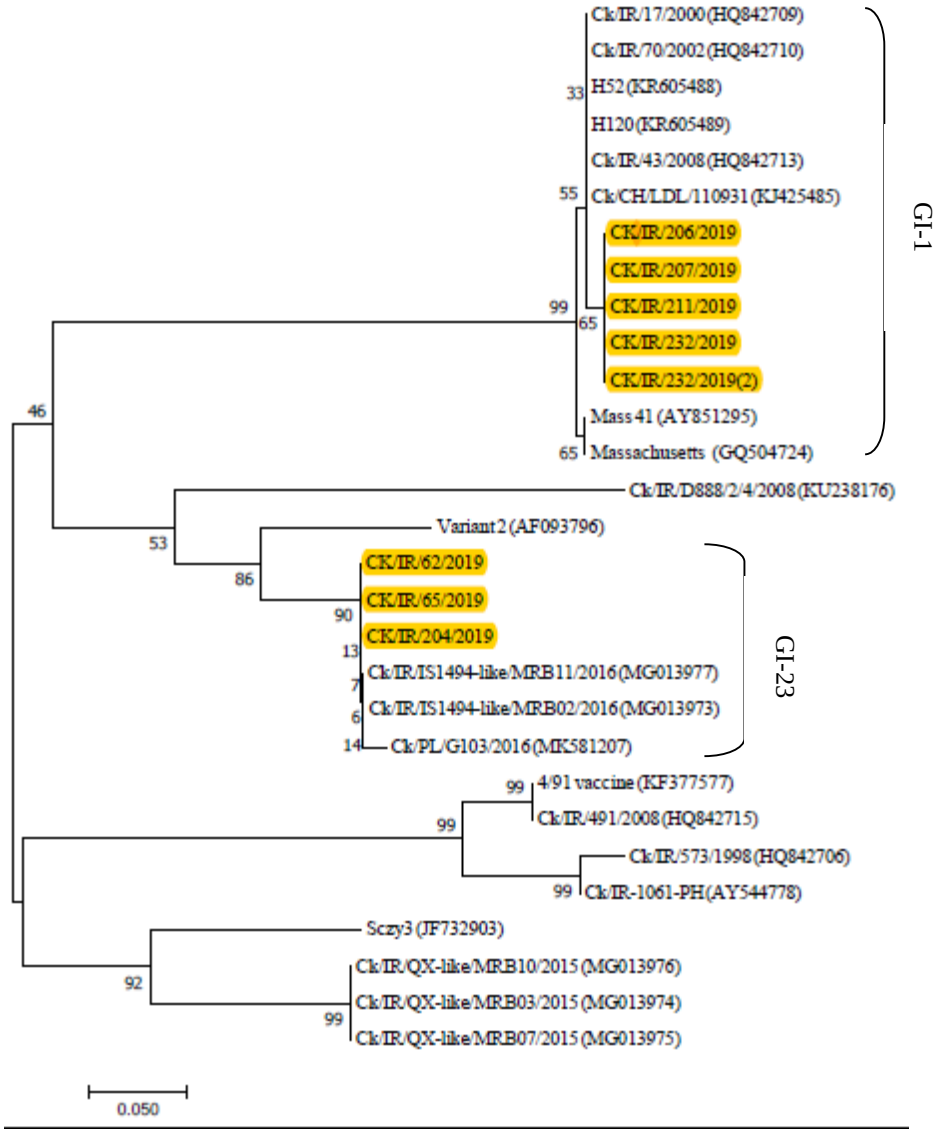
مرحله	دما(درجه سانتی‌گراد)	تعداد سیکل	زمان
واسرشت سازی اولیه	۹۴	۱	۲دقیقه
واسرشت سازی	۹۴		۳۰ ثانیه
اتصال پرایمر	۵۰	۳۵	۶۰ ثانیه
افزایش طول	۷۲		۶۰ ثانیه
افزایش طول	۷۲	۱	۷ دقیقه

نتایج

از مجموع ۳۵ مزرعه مرغ گوشتی تجاری با نشانه‌های تنفسی تعداد ۱۵ مزرعه بر اساس ردیابی ژن نوکلئوکپسید ویروس به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مثبت شدند. به عبارتی شیوع ویروس برونشیت عفونی در کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی ۴۲/۸۵درصد بود. بر اساس طبقه‌بندی Valastro و همکاران (۲۰۱۶) پس از آنالیز فیلوژنی توالی قسمتی از ژن پروتئین اسپایک۱؛ جدایه‌های این مطالعه در دو دودمان (Lineage) از ژنوتیپ۱(GI) ویروس برونشیت عفونی پرندگان قرار می‌گیرند:

۱- سه جدایه متعلق به GI-۲۳ است که ویروس‌های IS/۱۴۹۴ like ، یا به بیان دیگر ویروس‌های واریانت ۲ را شامل می‌شدند. از نظر توالی نوکلئوتیدی پارشیال پروتئین اسپایک۱، این سه جدایه با ویروس‌های گزارش شده قبلی دودمان GI-۲۳ از ایران با کد دسترسی بانک ژن : MG_۰۱۳۹۷۷ و MG_۰۱۳۹۷۳ (خراسان رضوی، سال ۲۰۱۶ (unpublished data)) قرابت ۱۰۰ درصدی داشته و در یک کلاستر قرار گرفتند، همچنین با ویروس واریانت ۲ گزارش شده از هلند در سال ۲۰۲۰ با کد دسترسی ۵۸۱۲۰۷ MKشباهت ۹۸/۴۶درصدی داشتند.

۲- پنج جدایه هم به دودمان GI-1 یا همان ویروس‌های Massachusetts like تعلق داشتند (شکل ۱). که با جدایه‌های ماساچوست ایران و همچنین ویروس‌های واکسن H۵۲ و H۱۲۰ و ویروس ماساچوست M۴۱ فیلدی استخراج شده از بانک ژن (NCBI) شباهت داشته اما در یک کلاستر قرار نگرفتند (شکل۱).



شکل ۱- آنالیز فیلوژنتیک قسمتی از ژن S1 جدایه‌های IBV با سایر ویروس‌های استخراج شده از بانک ژنی. جدایه‌های این مطالعه هایلات شده اند. خطوط عمودی سروتیپ‌های شایع در ایران را نشان می‌دهند. خطوط افقی تعداد جایگزین نوکلئوتید را به ازای هر موقعیت نشان می‌دهد. درخت فیلوژنتیک بر اساس روش آماری Neighbor joining و مدل Maximum Composite Likelihood با نرم‌افزار MEGA ۷ رسم شده است. بررسی درخت فیلوژنتیک با تکرار بوت‌استرپ ۱۰۰۰ انجام گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از دلایل شکست واکسیناسیون و بروز بیماری با نشانه‌های تنفسی در گله‌های گوشتی تجاری طیور ظهور واریانت‌های جدید برونشیت است که از لحاظ آنتی‌ژنیکی با واکسن‌های رایج تفاوت دارند لذا پایش مداوم و تعیین ژنوتیپ ویروس‌های در گردش علاوه بر کمک به فهم روند تحول (evolution) ویروس در تعیین استراتژی کنترلی و برنامه مناسب واکسیناسیون کمک کننده است. در مطالعه حاضر ویروس‌های برونشیت عفونی شناسایی شده در موارد درگیری تنفسی به ژنوتیپ‌های like/۱۴۹۴/IS و Mass type تعلق داشتند. سروتیپ ماساچوست که انواع مختلفی از آن در کشور به‌عنوان واکسن برای کنترل بیماری استفاده می‌شود، جزو سروتیپ‌هایی است که برخلاف برخی از ویروس‌های برونشیت عفونی توزیع

جغرافیایی وسیعی در تمام دنیا دارد و همچنان از موارد بیماری در کشور جدا می‌شود (۷، ۸ و ۹). با توجه به این که تا همین چند وقت اخیر واکسن سویه واریانت ۲ در کشور استفاده نمی‌شد می‌توان موارد جدا شده را مستقیماً به ویروس‌های فیلدی نسبت داد اما ویروس‌های ماساچوست شناسایی شده در این پژوهش از موارد بیماری تنفسی جدا شده‌اند، تفکیک ویروس واکسن از ویروس وحشی نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. به علاوه در موارد درگیری تنفسی سایر پاتوژن‌ها از جمله نیوکاسل، آنفلوانزا و مایکوپلاسما نیز باید در تشخیص تفریقی مد نظر قرار گیرند. ویروس IS/۱۴۹۴/like اولین بار توسط Callison و همکاران در سال ۲۰۰۱ در فلسطین اشغالی گزارش شد و پس از آن در نقاط مختلف دنیا از جمله مصر، ترکیه، لیبی، افغانستان، عراق و ایران (۵، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳) گسترش پیدا کرد. در ایران اولین بار ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ در سال ۲۰۱۰ از سوی Hosseini و همکاران گزارش شد. در آن زمان شایع‌ترین ژنوتیپ 793/B بود (۹). با توجه به مطالعات گذشته به نظر می‌آید از سال ۲۰۱۴ به بعد شیوع ژنوتیپ IS/ ۱۴۹۴ در کشور روند صعودی داشته تا جایی که در سال‌های اخیر به شایع‌ترین جدایه در کشور مبدل شده بود. Najafi و همکاران در سال ۲۰۱۶ شایع‌ترین ویروس (۳۴درصد) را در سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۵ از گله‌های گوشتی ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ گزارش کردند (۱۱) در حالی که در فاصله سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۴ Hosseini و همکاران (۲۰۱۵) ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ را دومین ویروس شایع در طیور صنعتی کشور گزارش کرده بودند (۹). Gholami و همکاران در سال ۲۰۱۷ شیوع ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ در کشور را ۶۶/۶۷ درصد (۹) اما Modiri و همکاران فراوانی این ویروس در ۸ استان کشور، در فاصله سال‌های ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۷ را ۷۰/۳۴ درصد گزارش کردند (۱۴) در هر دو مطالعه شیوع سروتیپ ماساچوست کمتر از واریانت‌ها و به‌ترتیب ۲/۷۵ و ۴/۴۴ درصد بود. ویروس‌های جدا شده در مطالعه Saadat و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ۱۵ گله گوشتی دارای علایم تنفسی در استان بوشهر متعلق به سروتیپ ماساچوست و واریانت ۲ بود (۱۵). مطالعات مولکولی و ژنوتایپینگ بیانگر شیوع بالای ویروس برونشیت عفونی و چرخش جدایه‌های مشابه در صنعت طیور منطقه است. به دلیل مناسبات تجاری بین کشورهای همسایه و شاید قاچاق غیر قانونی بین آنها ویروس‌های در حال گردش در یک منطقه مشابه هم هستند نقش انتقال ویروس‌های مختلف توسط پرندگان وحشی (۱۶) نیز در اپیدمیولوژی ویروس در کشورهای همسایه در یک منطقه نیز باید مد نظر باشد. Yilmaz و همکاران در ۲۰۱۶ شباهت ویروس‌های جدا شده ترکیه به ویروس‌های ایران، چین و هند را بیان می‌دارد (۱۳). Sadri و همکاران (۲۰۱۹) در افغانستان شیوع بالای ویروس‌های برونشیت ژنوتیپ LX-like viruses (GI-I) و (GI-۲۳) IS/۱۴۹۴ را گزارش و شباهت ایزوله‌های IS/۱۴۹۴ جدا شده به ویروس‌های ایران و عراق بیان کردند. در مطالعات گذشته در کشور نیز توالی ویروس‌های برونشیت IS/۱۴۹۴ با ایزوله‌های عراق و ترکیه و اسرائیل شباهت زیادی داشت (۹، ۱۱) این امر می‌تواند بیانگر منشأ یکسان این ویروس باشد (۱۷).

De Wit در سال ۲۰۰۰ بیان می‌دارد که ایمنی متقاطع بین سروتیپ‌های مختلف ویروس وجود ندارد، اما برخی سویه‌ها هستند که در صورت استفاده به صورت واکسن می‌توانند ایمنی متقاطع علیه سایر سروتیپ‌ها ایجاد کنند که به آنها protectotype گفته می‌شود (۲). با توجه به این‌که مهم‌ترین راه کنترل بیماری واکسیناسیون است نشان داده شده که واکسیناسیون با دو نوع واکسن زنده تخفیف حدت یافته متفاوت از لحاظ

آنتی‌ژنیکی می‌تواند ایمنی مناسبی علیه تیپ‌های مختلف IBV ایجاد کند (۳). تا حدود بیست سال قبل تنها واکسن مورد استفاده در کشور از سروتیپ ماساچوست بود اما به تدریج با شیوع واریته‌های جدید واکسیناسیون با واکسن زنده تخفیف حدت یافته سروتیپ B/۷۹۳ نیز انجام شد. شاید بتوان کاهش جداسازی ژنوتیپ QX در مطالعات سال‌های۲۰۱۷ و ۲۰۱۵ به ۴/۴ و ۷/۵ درصد را تأثیر واکسیناسیون با دو نوع تیپ متفاوت از لحاظ آنتی‌ژنی و بروز ایمنی متقاطع مناسب علیه این ژنوتیپ دانست (۱۴).پس از شناسایی سروتیپ B ۷۹۳ توسط بزرگمهری‌فرد و وصفی مرندی در سال ۱۹۹۸ واکسیناسیون علیه برونشیت عفونی به منظور افزایش دامنه و وسعت حفاظت پرندگان در مقابل سروتیپ‌های شایع، معمولاً دو یا چند نوبت واکسن برونشیت با سویه‌های مختلف سروتیپ Massو B ۷۹۳در ایران صورت می‌گیرد (۲۰). با توجه به استراتژی واکسن در کشور و استفاده از واکسن‌های ماساچوست وB ۷۹۳ است و با در نظر گرفتن این نکته که واکسن ژنوتیپ (GI-۲۳) IS/۱۴۹۴ به صورت تجاری وجود ندارد احتمالاً واکسیناسیون رایج بر این ژنوتیپ چندان مؤثر نبوده و نتوانسته شیوع آن را کنترل کند و همچنان این ژنوتیپ از موارد طغیان بیماری جدا می‌گردد، البته در اثرگذاری واکسیناسیون تنها نوع سویه ویروس مطرح نبوده و فاکتورهایی مثل روش استفاده و تهویه هم می‌توانند بر میزان تأثیر واکسن اثر سوء بگذارند (۳).

براساس نتایج مطالعه حاضر ویروس بیماری برونشیت عفونی با وجود واکسیناسیون گسترده در گله‌های تجاری گوشتی همچنان یکی از مهم‌ترین عوامل خسارات اقتصادی در صنعت طیور و وقوع بیماری‌های تنفسی چندعاملی در کشور محسوب می‌شود. لذا پایش مداوم گله‌ها و شناسایی سویه یا ژنوتیپ‌های غالب در گردش در شناسایی روند تحول ویروس و به دنبال آن تعیین شیوهنامه واکسیناسیون و یا حتی تغییر واکسن‌های استفاده شده جایگاه مهمی دارد.

References

1- Jackwood M.W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Dis*. 2012; 56: 634-641.

2- De Wit J. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol*. 2000; 29: 71-93.

3- De Wit J, Cook J. K. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol*. 2014; 43: 485-497.

4- Loa C, Lin T, Wu C, Bryan T, Hooper T. Schrader D. Differential detection of turkey coronavirus, infectious bronchitis virus, and bovine coronavirus by a multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Meth*. 2006; 131: 86-91.

5- Seger W, Ghalyanchilangeroudi A, Madadgar O, Vasfi Marandi M, Hashemzadeh M. Genotyping of infectious bronchitis viruses from broiler farms in Iraq during 2014-2015. *Arch virol*. 2016; 161: 34-38.

6- Selim K, Arafa A, Ahmed H, El-Sanousi A. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler and layer chicken farms in Egypt during 2012. *Int J Vet Sci Med*. 2013.

7- Bochkov YA, Batchenko GV, Shcherbakova LO, Borisov AV, Drygin VV. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol*. 2006; 35: 379-393.

8- De Wit J, Cook JK, Van der Heijden HM. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol*. 2011; 40: 223-235.

9- Sadri, N., Ghalyanchilangeroudi, A., Fallah Mehrabadi, M. H., Hosseini, H., Shayeganmehr, A., Sediqian, M. S., Mousavi, F. S. Genotyping of avian infectious bronchitis virus in Afghanistan (2016-2017): the first report. *Iran J Vet Res*. 2019; 20(1): 60-63 [In Persian].

10- Awad F, Baylis M, Ganapathy K. Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler

flocks in Libya. *I J Vet Sci Med*. 2014; 2: 78-82.

11- Gholami F, Karimi V, Ghalyanchi Langeroudi A, Hashemzadeh M, Vasfi Marandi, M. Genotyping of Infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran during 2015-2016. *I J Vet Med*. 2018; 12: 9-17 [In Persian].

12- Najafi H, Langeroudi AG, Hashemzadeh M, Karimi V, Madadgar O, Ghafouri SA, Farahani RK. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015. *Arch Virol*. 2016; 161: 53-62 [In Persian].

13- Yilmaz H, Altan E, Cizmecigil UY, Gurel A, Ozturk GY, Bamac OE, Turan N. Phylogeny and S1 Gene Variation of Infectious Bronchitis Virus Detected in Broilers and Layers in Turkey. *Avian Dis*. 2016; 60(3), 596-602.

14- Modiri Hamadan A, Ghalyanchilangeroudi A, Hashemzadeh M, Hosseini H, Karimi V, Yahyaraeyat R, Najafi H. Genotyping of Avian infectious bronchitis viruses in Iran (2015-2017) reveals domination of IS-1494 like virus. *Virus Res*. 2017; 240: 101-106 [In Persian].

15- Saadat Y, Bozorgmehri Fard MH, Charkhkar S, Hosseini H, Shaikhi N, Akbarpour B. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler flocks in Bushehr province, Iran: 2014 - 2015. *Vet Res Forum*. 2017; 8(3): 195-201 [In Persian].

16- De Wit J, Swart WA, Fabri THF. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the α-IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. *Avian Pathol*. 2010; 39: 123-131.

17- Ghalyanchi-Langeroudi A, Karimi V, Jannat A, Hashemzadeh M, Fallah MH, Gholami F, Heidarzadeh M. Genotyping of Infectious Bronchitis Viruses in the East of Iran, 2015. *I J Virol*. 2015; 9: 31-35 [In Persian].

18- Hosseini H. Fard MHB, Charkhkar S, Morshed R. Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010-2014). *Avian Dis*. 2015; 59: 431-435 [In Persian].

19- Worthington K, Currie R, Jones RC. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol*. 2008; 37: 247-257.

20- Gholami-Ahangaran M , Shoushtari AH, Doosti A, Fathi Hafshejani E, Zia-Jahromi N. Detection of Infectious Bronchitis Virus (4/91 type) in Broiler Chickens in Chahrmahal-va-bakhtiyari Province .*Vet. J. of Islamic Azad Uni*. 2012; 6(2): 1543-1547 [In Persian].

Molecular detection of Infectious Bronchitis virus in broiler chicken flocks

Najmeh Motamed[*1], Mohsen Bashashati[۲], Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi[۲]

1- Assistant Professor, Department of poultry vaccines research and production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural research, Education and Extension organization, Karaj,Iran.
2- Assistant Professor, Department of Avian diseases research and diognostic, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural research, Education and Extension organization, Karaj,Iran.

Receive: January 1, 2021; Revise: February 13, 2021; Accept: February 28, 2021

Summary

Infectious bronchitis disease is one the most important diseases in poultry industry worldwide. Despite vast vaccination with different vaccines, the virus causes major economic losses in commercial poultry production. The main objective of this study was to detect infectious bronchitis virus infection in respiratory complex in broiler chicken flocks. Tissue samples from 35 flocks in central and south regions of Iran in 2018 and 2019 were collected and investigated by RT-PCR reaction. For phylogenetic analysis, Nucleotide sequence of partial S1 gene was amplified then evaluated. Totally from 35 flocks with vaccination history against IBV and suffering from respiratory problems15 flocks were positive for IBV infection (42/85 percent). Two genotypes were detected including GI-23 Is/1494 like (variant2) and Mass type ones. IS/1494 like viruses isolated in this study were clustered with other Variant2 viruses reported from Iran which have had increasing trend in recent years. Massachusetts viruses were not clustered with Iranian mass type viruses including vaccinal strains and had some differences. Thereafter, results of this study indicate that even with frequent vaccination, IBVs can cause outbreaks and severe problems in vaccinated chicken flocks.

Key words: *Infectious Bronchitis, respiratory Syndrome, PCR, Broiler flocks*

ردیابی مولکولی عوامل ویروسی نیوکاسل، برونشیت عفونی پرندگان و آنفلوانزای پرندگان (H_9) در نمونه‌های کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی استان گلستان در سال ۱۳۹۸

محمد منتظری[۱]، آرش قلیانچی لنگرودی*[۲]، ناصر صدری[۳]، زهرا ضیافتی کافی[۳]، مهدی وصفی مرندی[۴]

۱- دانشجوی دکترای بهداشت و بیماری‌های پرندگان، گروه بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- دانشجوی دکترای تخصصی ویروس شناسی، گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴- استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ آذر ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۲ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

گسترش صنعت طیور و پرورش متراکم پرندگان در فضای بسته و محدود باعث به وجود آمدن عفونت‌های تنفسی با منشأ عوامل عفونی مختلف، خصوصاً عوامل ویروسی آنفلوانزای پرندگان (AI)، بیماری نیوکاسل (ND) و برونشیت عفونی شده است. شواهد نشان می‌دهد که این عوامل در گله‌های درگیر، به‌صورت هم افزایی عمل می‌کنند. تعداد ۲۰ گله گوشتی درگیر عفونت تنفسی در استان گلستان در سال ۱۳۹۸ انتخاب شد. نمونه‌های نای و کلیه به آزمایشگاه منتقل شد و به‌منظور ردیابی ویروس‌های نیوکاسل، برونشیت عفونی و آنفلوانزای (H9)، روش PCR مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج، گله‌ها بیشتر درگیر برونشیت عفونی (۲۰ درصد) بودند و پس از آن، به‌ترتیب بیماری‌های نیوکاسل (۱۵ درصد) و آنفلوانزای پرندگان (H9) (۱۰ درصد) شیوع داشتند. همچنین در بین عفونت‌های کمپلکس، ترکیب برونشیت عفونی با عوامل نیوکاسل (۲۰ درصد) و آنفلوانزای پرندگان (۲۰ درصد)، بیشترین فراوانی را داشت. بر اساس نتیجه‌گیری این مطالعه ویروس برونشیت عفونی مهم‌ترین نقش را در ایجاد کمپلکس‌های تنفسی داشت و عفونت همزمان با ویروس عامل نیوکاسل و آنفلانزای H9 نیز باعث شدید شدن علائم و تلفات در گله می‌شود. توصیه می‌شود برای اطلاع از شیوع فاکتورهای خطر این بیماری و ارزیابی واکسن‌ها در گله‌ها، هر سال مطالعات اپیدمیولوژیکی دقیقی صورت گیرد. این اولین مطالعه جامع بر روی کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی در استان گلستان، یکی از قطب‌های تولید گوشت مرغ در کشور، می‌باشد.

واژگان کلیدی: *کمپلکس تنفسی، نیوکاسل، برونشیت عفونی پرندگان، آنفلوانزای H9، استان گلستان*

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

مقدمه

هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع و تعیین سهم هر یک از سه عامل ویروسی مهم (نیوکاسل، برونشیت عفونی پرندگان و آنفلوانزای پرندگان H9) در ایجاد کمپلکس‌های تنفسی در گله‌های گوشتی استان گلستان در سال ۱۳۹۸ می‌باشد. در سال‌های اخیر، بیماری‌های تنفسی به‌ویژه با منشأ ویروسی به دلیل خسارت‌های اقتصادی قابل توجه، یکی از مشکلات اصلی صنعت طیور ایران بوده است. استان گلستان با دارا بودن ۹۱۱ واحد پرورش جوجه گوشتی و ظرفیت بیش از ۲۹ میلیون قطعه جوجه گوشتی در هر دوره، یکی از قطب‌های تولید گوشت مرغ در کشور به شمار می‌رود. بر اساس آمار منتشر شده از سازمان دامپزشکی کشور، بیشترین خسارت اقتصادی در گله‌های گوشتی ناشی از درگیری با مشکلات تنفسی بوده است. کمپلکس تنفسی اصطلاحی متداول است که برای توضیح مشکلات و علایم تنفسی رایج، به‌خصوص در گله‌های مرغ گوشتی، مورد استفاده قرار می‌گیرد و از آنجا که مشکلات تنفسی طیور در غالب موارد تحت تأثیر بیش از یک عامل است، از آنها با عنوان کمپلکس بیماری‌های تنفسی یاد می‌شود. این کمپلکس‌ها که بیشتر در فصول سرد سال پدیدار می‌شوند، عموماً نشانه‌هایی مانند رال‌های تنفسی، عطسه، سرفه و تورم سر و صورت را ایجاد می‌کنند. در کالبدگشایی نیز جراحاتی از قبیل پرخونی و وجود چرک در نای و ریه به چشم می‌خورد. از جمله بیماری‌های ویروسی که چنین نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی را ایجاد می‌کنند می‌توان به نیوکاسل، برونشیت عفونی و آنفلوانزای پرندگان (H9) اشاره کرد. عوامل هر سه بیماری از راه تنفس وارد بدن پرنده می‌شوند. ویروس‌های به وجود آورنده این سه بیماری دارای پوشش بوده و به بسیاری از ضد عفونی کننده‌ها حساس هستند و به راحتی از بین می‌روند. راه اصلی انتقال هر سه ویروس نیز به صورت افقی مستقیم و غیر مستقیم می‌باشد (۱، ۲).

برونشیت عفونی یک بیماری تنفسی بسیار واگیردار است که به واسطه نشانه‌های دستگاه تنفسی فوقانی از قبیل رال، سرفه و عطسه مشخص می‌گردد. این بیماری گسترش جهانی دارد و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی صنعت طیور است. ویروس عامل برونشیت عفونی، پروتوتیپ گاماکروناویرس بوده و ژنوتیپ و سروتیپ‌های زیادی دارد که حاصل جهش‌های متعدد در ژنوم (RNA) این ویروس می‌باشد. این سروتیپ‌ها ایمنی متقاطع ایجاد نمی‌کنند، بدین معنی که ایجاد ایمنی با یک نوع سروتیپ، نمی‌تواند پرنده را در مقابل سروتیپ‌های دیگر به طور کامل محافظت کند (۲). برای کنترل این بیماری در مزارع پرورش جوجه گوشتی در کشور، از واکسن‌های زنده حاوی سروتیپ‌های ماساچوست و 793/B استفاده می‌شود که معمولاً به‌صورت اسپری در هچری و سالن در روز یک، و حداقل هفت روز بعد تکرار آن صورت می‌گیرد.

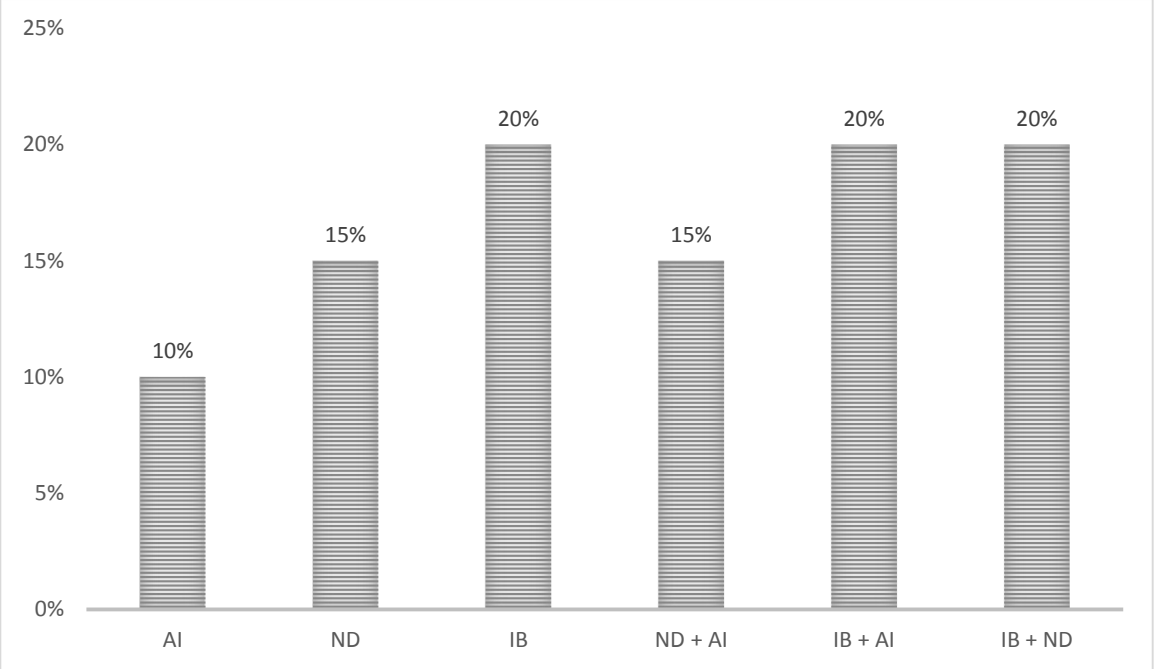
بیماری نیوکاسل در سراسر دنیا پرندگان وحشی و صنعتی را آلوده و خسارات فراوانی به صنعت وارد می‌کند. عامل آن یک پارامیکسوویروس است و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای دارد. این بیماری بسیار مسری است و بدون استراتژی کنترلی مناسب، منجر به واگیری و تلفات بالا در جوجه‌های غیرواکسینه یا جوجه‌هایی که به درستی در آنها واکسیناسیون صورت نگرفته می‌شود. این بیماری، خصوصاً در فرم‌های حاد، توسط OIE یک بیماری خطرناک قلمداد شده و وقوع آن حتماً باید گزارش شود (۱). در ایران برای کنترل بیماری نیوکاسل در گله‌های گوشتی، از برنامه‌های متنوع واکسن‌های کشته و زنده استفاده می‌شود. سویه‌های متداول مورد استفاده شامل لاسوتا و B1، VG/GA می‌باشد.

بیماری آنفلوانزای پرندگان یکی از مهم‌ترین

بیماری‌های ویروسی طیور است که منجر به ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های بدون نشانه تا نشانه‌های شدید تنفسی به همراه عفونت حاد سیستمیک با تلفات تقریباً ۱۰۰ درصدی و خسارات سنگین اقتصادی می‌شود. عامل این بیماری ارتومیکسوویروس بوده که دارای ژنوم RNA هشت قطعه‌ای می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزا به چهار تیپ A، B، C و D تقسیم می‌شوند. تمامی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان متعلق به تیپ A هستند. به‌طور کلی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به دو پاتوتیپ HP با تلفات گاهی در حدود ۱۰۰ درصد و LP با بیماری ملایم به صورت علایم تنفسی و دپرس با تلفات کم (۵ درصد) تا شدید (۹۷ درصد) در صورت همراهی با سایر عوامل بیماری‌زا تقسیم می‌شوند (۳). H9N2 و H5Nx در کشور ما بومی هستند. ویروس‌های H5N1 در برخی از کشورهای خاور دور مثل چین، ویتنام، بنگلادش و اندونزی و همچنین مصر به شکل اندمیک وجود دارد. در ایران این ویروس همچنان در طیور روستایی و همچنین پرندگان وحشی در گردش است و هرلحظه امکان ورود H5N1 از طیور بومی و روستایی استان‌های شمالی و استان‌هایی که سابقه درگیری دارند به‌طور صنعتی وجود دارد. تحت تیپ H5N8 در آسیا و اروپا و خاور میانه وجود دارد و در کشور ما نیز ۱۵ استان درگیر شده‌اند. این تحت تیپ در حال حاضر می‌تواند در اردک، غاز و قو تلفات ایجاد کند و در عین حال وارد جمعیت صنعتی شود. مدفوع عامل اصلی انتقال بین مزارع است (۳). در ایران برای کنترل این بیماری در گله‌های گوشتی، از واکسن کشته (H9N2) در سن یک روزگی یا هفت روزگی استفاده می‌شود که گاهی به همراه بیماری نیوکاسل، به‌صورت دوگانه تزریق می‌شود، البته برخی از گله‌های گوشتی از واکسن آنفلوانزا استفاده نمی‌کنند.

جدول ۱- انواع پرایمرهای استفاده شده به همراه توالی پرایمر و اندازه محصول

ویروس	ژن هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول(bp)
Avian Influenza virus	M	MF	CTYCACACAGARCACAATGG	۲۴۴
		MR	GTCACACTTGTTGTTGTRTC	
Infectious Bronchitis virus	UTR	UTR41	AGT TCT ATC GCC AGG GAA AT GTC	۴۰۵
		UTR11	GCTCTAACTCTATAC TAG CCTA	
Newcastle Disease virus	F	NDCreF	GGTGAGTCTATCCGGARGATACAAG	۲۰۳
		NDCreR	TCATTGGTTGCRGCAATGCTCT	



نمودار ۱- فراوانی عوامل ویروسی مختلف در گله‌های گوشتی استان گلستان

مواد و روش‌ها

اخذ و حمل نمونه‌ها: ۲۰ مزرعه گوشتی با نشانه‌های تنفسی در استان گلستان برای شرکت در این آزمایش انتخاب شد. تمامی مزارع از نظر هر سه بیماری واکسینه بودند. از تلفات هر مزرعه، پنج نمونه نای و پنج نمونه کلیه جمع‌آوری شد. قطعات بافتی نای و کلیه در ظروف جداگانه استریل قرار گرفت و سپس تا زمان ارسال به آزمایشگاه، در فریزر قرار گرفت. سپس در مجاورت یخ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

استخراج RNA: برای استخراج RNA از کیت استخراج CinnaPure (شرکت سیناکلون، ایران) استفاده شد. کلیه مراحل استخراج مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده کیت و با رعایت نکات بهداشتی و زیست محیطی انجام گرفته است. در هر استخراج نیز، کنترل منفی مورد استفاده قرار می‌گرفت.

آزمون RT-PCR: برای ردیابی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان (H9)، برونشیت عفونی و نیوکاسل، به‌ترتیب از پرایمرهای ژن M، UTR و F (شرکت سیناکلون، ایران) استفاده شد. توالی پرایمر و اندازه محصول در جدول ۱ آمده است. مواد و برنامه دمایی مورد نیاز برای تکثیر ژن‌های F (۴)، M (۵) و UTR (۶) در منابع ذکر شده است. پس از اتمام کار واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصولات در ژل الکتروفورز ۱ درصد قرار داده شد تا در صورت حضور DNA، باند مورد نظر نمایان شود.

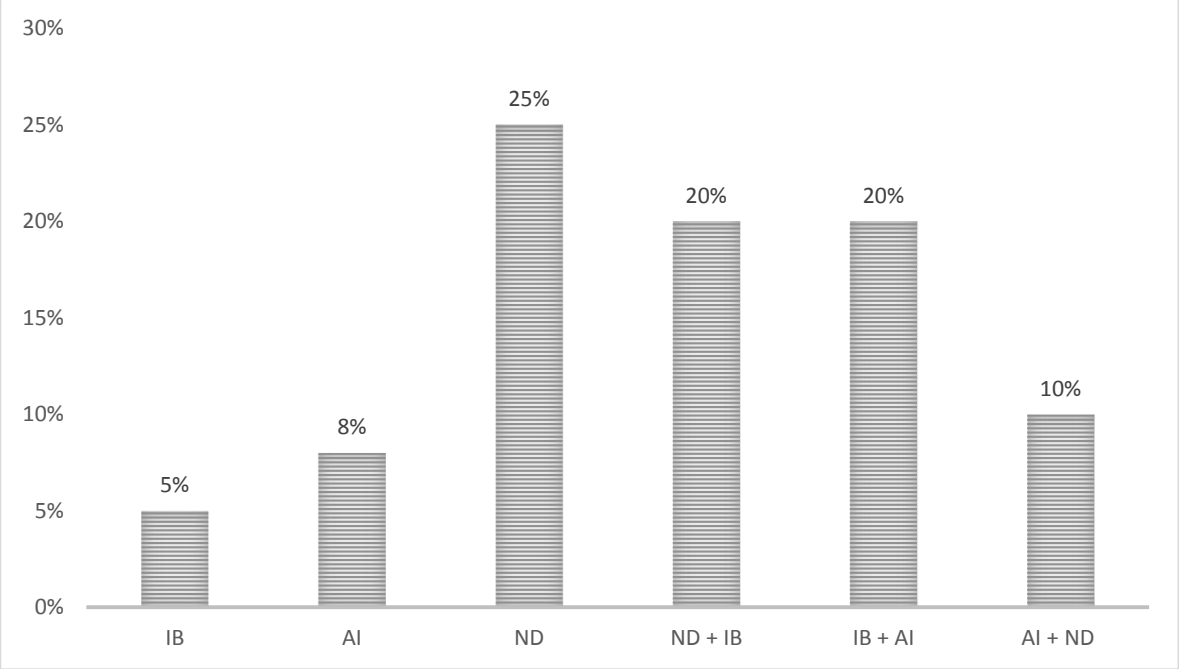
نتایج

درصد فراوانی عوامل ویروسی تشخیص داده شده در ۲۰ گله مورد آزمایش در نمودار ۱ قابل مشاهده است. با توجه به این نتایج، بیشترین درگیری مربوط به بیماری برونشیت عفونی به تنهایی و ترکیب آن با عوامل نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) بوده است. در مجموع، ۶۰ درصد گله‌ها آلوده به ویروس برونشیت عفونی، ۵۰ درصد گله‌ها آلوده به ویروس نیوکاسل و ۴۵ درصد گله‌ها آلوده به ویروس آنفلوانزای پرندگان (H9) بودند. هیچ گله‌ای از نظر

هر سه بیماری به طور همزمان مثبت نشد در جدول ۲، اطلاعات ثبت شده از نوع ویروس تشخیص داده شده از گله‌های درگیر بیماری تنفسی آمده است. همان‌طور که در این جدول مشخص است، به طور کلی بیماری برونشیت عفونی پرندگان در سنین پایین‌تری شناسایی شد. پس از این بیماری، به‌ترتیب نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) در سنین بالاتری درگیری ایجاد کرده‌اند. این موضوع احتمالاً نشان‌دهنده این است که بیماری برونشیت عفونی به تنهایی زودتر از دو عامل دیگر وارد گله می‌شود. تلفات حاصل از این سندرم تنفسی در گله‌ها در نمودار ۲ قابل مشاهده می‌باشد. معمولاً عفونت همزمان در گله توسط دو عامل، تلفات بیشتری را به همراه داشته است.

جدول ۲- اطلاعات ثبت شده از نوع ویروس تشخیص داده شده از گله‌های درگیر بیماری تنفسی

شماره مزرعه	سن (روز)	برونشیت عفونی	نیوکاسل	آنفلوانزای H9
۱	۳۰	+	+	-
۲	۲۵	+	-	-
۳	۳۱	+	+	-
۴	۲۴	+	-	-
۵	۳۳	+	-	+
۶	۳۴	+	-	+
۷	۲۹	+	+	-
۸	۳۴	+	-	+
۹	۳۶	-	+	+
۱۰	۲۹	-	+	-
۱۱	۳۳	-	+	+
۱۲	۲۶	+	+	-
۱۳	۲۸	-	+	-
۱۴	۳۲	+	-	+
۱۵	۳۵	-	-	+
۱۶	۳۴	-	+	+
۱۷	۳۶	-	-	+
۱۸	۲۹	-	+	-
۱۹	۲۴	+	-	-
۲۰	۲۵	+	-	-



نمودار ۲- درصد تلفات ناشی از هر بیماری در گله‌های درگیر با سندرم تنفسی در استان گلستان

بحث

در سال‌های اخیر، بیماری‌های تنفسی یک از مشکلات اساسی گله‌های گوشتی در سراسر دنیا بوده است. در این میان، برونشیت عفونی، بیماری نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) در ایران نقش مهم‌تری در ایجاد این مشکل داشته‌اند (۱۵-۷). در سال ۲۰۱۱، هادی‌پور و همکاران با بررسی نمونه‌های حاصل از گله‌های گوشتی درگیر مشکلات تنفسی در ایران، به نقش مهم بیماری برونشیت عفونی در ایجاد این نشانه‌ها در گله‌ها پی بردند (۷). در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که بیماری برونشیت عفونی، متداول‌ترین عامل جدا شده از گله‌های مبتلا به علائم تنفسی در ایران بوده است. در این مطالعه بیشترین درگیری تنفسی مربوط به ویروس برونشیت عفونی در ۶۰ مزرعه و ترکیب آن با سایر عوامل در ۱۱۰ مزرعه بود. از آنجا که ویروس‌ها و سویه‌های غالب دائماً در حال تغییر هستند، گله‌ها به طور پی در پی درگیر عفونت‌های جدید ویروسی خواهند شد. (۱۶). چالش اصلی در کنترل بیماری برونشیت عفونی، چرخش ژنوتیپ‌های متنوع این ویروس در مناطق و بازه‌های زمانی گوناگون بوده است. علاوه بر این، هیچ واکسنی برای بیماری برونشیت عفونی وجود ندارد که بتواند با ایجاد ایمنی متقاطع، علیه تمامی سروتیپ‌های شناخته شده مقاومت ایجاد کند. در مطالعه ما نیز همانند مطالعه آقاخان و همکاران (۱۷)، برخی گله‌ها که واکسن برونشیت عفونی پرندگان دریافت کرده بودند، از نظر بیماری مثبت شدند. بنابراین لازم است با بررسی توالی نوکلئوتیدی ویروس‌های در گردش و تعیین سروتیپ‌های غالب، ارزیابی دقیقی از شباهت سویه‌های موجود در واکسن‌های مورد استفاده با سویه‌های وحشی صورت گیرد. مراقبت و بررسی مداوم ویروس‌های در گردش و استفاده از واکسن‌های مشابه سویه‌های در گردش، در کنار رعایت اصول امنیت زیستی، استراتژی‌هایی هستند که می‌توانند در کاهش درگیری با بیماری برونشیت عفونی به کار گرفته شوند. در مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که جدایه‌های استان گلستان،

شباهت زیادی با سویه QX ایران و عراق داشته‌اند (۱۸).

بیماری نیوکاسل نیز یکی از بیماری‌های مهم در ایجاد مشکلات تنفسی در گله‌های گوشتی ایران است. نیوکاسل ولوژن در ایران اندمیک می‌باشد و به رغم واکسیناسیون گسترده علیه آن، هر ساله شاهد طغیان‌هایی از این بیماری هستیم (۹). در بسیاری از کشورها، طیور خانگی مخزن عامل بیماری نیوکاسل ولوژن هستند و این نقش مهمی در انتقال آلودگی به گله‌های صنعتی دارد (۱۹). در ایران نیز طیور خانگی خصوصاً در استان‌های شمالی جمعیت زیادی را تشکیل می‌دهند و خطر انتقال آلودگی به مزارع صنعتی وجود دارد. طبق بررسی ما در استان گلستان، به رغم واکسیناسیون گسترده در اغلب مزارع پرورشی، این بیماری یکی از مشکلات مهم در صنعت طیور گوشتی است که می‌تواند به دلایل مختلفی نظیر عدم رعایت امنیت زیستی و برنامه نامناسب واکسیناسیون در برخی گله‌ها باشد. مراقبت مداوم از گله‌ها به‌منظور پی بردن به جهش در ویروس، بررسی برنامه واکسیناسیون و افزایش سطح بهداشت در مرغداری‌ها از روش‌های بسیار پر اهمیت در کنترل بیماری نیوکاسل می‌باشد. طبق تحقیقات سواین و همکاران، بیماری نیوکاسل نقش بیشتری نسبت به بیماری آنفلوانزای پرندگان (H9) در ایجاد بیماری‌های تنفسی ویروسی دارند (۲۰). در مطالعه دیگری، ویروس بیماری نیوکاسل با درصدی بالا در کمپلکس تنفسی جوجه‌های گوشتی جدا شد. از میان آنها نتیجه‌گیری شد که جدایه‌های لنتوژن و سویه‌های واکسینال نیز موجب تشدید کمپلکس تنفسی می‌شوند (۲۱). همچنین با روش‌های سرمی توانسته‌اند شیوع ویروس نیوکاسل را در استان‌های شمالی بررسی کنند که مشخص شد در گله‌های خانگی، این ویروس شیوع بالایی دارد و می‌تواند به گله‌های صنعتی وارد شود (۲۲).

بیماری آنفلوانزای پرندگان (H9) نیز یکی از عوامل مهم و مؤثر در ایجاد مشکلات تنفسی در گله‌های گوشتی است. این بیماری در کشور ایران اندمیک است و برخلاف حدت پایین این ویروس، همراهی آن با ویروس نیوکاسل یا برونشیت عفونی می‌تواند واگیری و تلفات بالا و در نتیجه خسارات جبران ناپذیری در گله گوشتی ایجاد کند (۱۰، ۲۳). در ایران واکسیناسیون علیه این بیماری در گله‌های مادر، تخم‌گذار و تعداد زیادی از گله‌های گوشتی انجام می‌شود اما با این وجود، این بیماری اثرات مخرب خود را در گله‌ها ایجاد می‌کند. در مطالعه ما، در گله‌هایی که بیش از یک عامل در ایجاد سندرم تنفسی نقش داشت، تلفات بیشتر به ثبت رسید. برخی بررسی‌ها نیز نشان داد که تلفات حاصل از برونشیت عفونی و آنفلوانزای پرندگان (H9) بیشتر از تلفات به هنگام درگیری با برونشیت عفونی به تنهایی بوده است (۱۲، ۲۴). این نتایج، اهمیت ترکیب شدن چند عامل را در ایجاد تلفات شدیدتر نشان می‌دهد. به طرز جالبی، عفونت همزمان با عوامل نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) منجر به تلفات زیادی نشد. این اتفاق در بررسی دیگری نیز رخ داده است که دلیل احتمالی آن را ایمنی سلولی برانگیخته شده علیه پروتئین‌های مشابه این دو ویروس و همچنین تداخل ایجاد شده در بین این دو ویروس می‌دانند (۲۴). با آزمایش‌های سرمی نیز شیوع ویروس آنفلوانزا را ارزیابی کرده‌اند، در مقاله‌ای، مشخص شد ویروس آنفلوانزای H9N2 شیوع بالایی در پرندگان بومی استان‌های شمالی کشور دارد که می‌تواند خطر جدی برای صنعت باشد (۲۵).

همچنین در مطالعاتی به وجود کم‌خونی عفونی در گله‌های گوشتی درگیر کمپلکس تنفسی اشاره شده است که می‌تواند زمینه مطالعات بیشتر در استان گلستان باشد. در این مطالعه، مشخص شده

است که ۵۰ درصد گله‌های گوشتی درگیر کمپلکس تنفسی، دارای آثار پاتولوژیک کم‌خونی عفونی ماکیان بوده‌اند (۲۶). علاوه بر این، مشخص شده که باکتری‌ها نیز می‌توانند در ایجاد کمپلکس‌های تنفسی نقش داشته باشند. یکی از آنها باکتری اونیتوباکتریوم رینوتراکئاله است. در یک مطالعه این باکتری در ۳۵ درصد از نمونه‌های کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی ردیابی شد (۲۷). در بررسی‌های دیگری، به نقش متاپنومو‌ویروس در ایجاد کمپلکس تنفسی در گله‌های گوشتی پرداخته شده است که نقش بسیار قابل توجهی (۳۵ درصد) را شامل می‌شود (۲۸).

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های تنفسی در استان گلستان در سال گذشته، ویروس برونشیت عفونی به تنهایی، و ترکیب آن با عوامل نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) بوده است. علاوه بر این، بیماری‌های نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) نیز نقش مهمی در ایجاد این سندرم داشته‌اند و عفونت همزمان آنها در گله منجر به شدیدتر شدن علائم و تلفات در گله شده است. بنابراین باید به صورت دائم این‌گونه مطالعات با جزئیات بیشتر به همراه توالی‌یابی و تعیین سروتیپ‌ها و سویه‌های غالب منطقه صورت گیرد و میزان شباهت سویه‌های وحشی با سویه‌های واکسن مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد تا علت شیوع بالای یک عامل عفونی در منطقه مشخص شود. شناخت الگوی بیماری‌ها در هر سال می‌تواند به درک بهتر دینامیک آلودگی منطقه و این که چه عواملی در رأس ایجاد بیماری‌ها هستند کمک کند. با استفاده از این الگوها می‌توان راه‌های مناسب‌تری برای مقابله با بیماری‌ها مثلاً بررسی برنامه‌های واکسیناسیون در گذشته و ایجاد تغییر در آنها انتخاب کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که این پروژه را تحت شماره گرنت ۳۸۶۴ مورد حمایت مالی قرار دادند، تشکر می‌نماییم. همچنین به پاس قدردانی از زحمات استاد گرانقدرمان، مرحوم دکتر مهدی وصفی مرندی که در این پژوهش ما را یاری کردند، این مقاله را به روح ایشان تقدیم می‌کنیم.

References

1- Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, *et al.* Diseases of poultry. 14th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2020; P: 109-66.

2- Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, *et al.* Diseases of poultry. 14th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2020; P: 167-88.

3- Authority EFS. Avian influenza overview February–May 2020. *EFSA J.* 2020; 18(6): 6194.

4- Creelan JL, Graham DA, McCullough SJ. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 2002; 31(5): 493-9.

5- Lee M-S, Chang P-C, Shien J-H, Cheng M-C, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods.* 2001; 97(1-2): 13-22.

6- Mousavi FS, Ghalyanchilangeroudi A, Hosseini H, Fasaei BN, Ghafouri SA, Abdollahi H, *et al.* Complete genome analysis of Iranian IS-1494 like avian infectious bronchitis virus. *Virus Dis.* 2018; 29(3): 390-4.

7- Hadipour M, Golchin P. Serosurvey of H9N2 avian influenza virus during respiratory disease outbreaks in broiler flocks in Dezful, southern Iran. *Bulg J Vet Med.* 2011; 14(1): 62-5.

8- Hosseini H, Fard MHB, Charkhkar S, Morshed R. Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010–2014). *Avian Dis.* 2015; 59(3): 431-5.

9- Hosseini H, Langeroudi AG, Torabi R. Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease viruses isolated in Iran, 2010–

2012. *Avian Dis.* 2014; 58(3): 373-6.

10- Pourbakhsh S, Momayez R, Toroghi R R, Shoushtari A. Ninetythree B type, the Predominant Circulating Type of Avian Infectious Bronchitis Viruses 1999-2004 in Iran: a retrospective study. *Arch Razi Instit.* 2008; 63(1): 1-5.

11- Sabouri F, Vasfi Marandi M, Bashashati M. Characterization of a novel VIIl sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathol.* 2018; 47(1): 90-9.

12- Seifi S, Asasi K, Mohammadi A. Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms. *Veterinarski Arhiv.* 2010; 80(2): 269-81 [In Persian].

13- Boroomand Z, Miahi M, Seif abadi M, Gharbyani M. Detection and isolation of infectious bronchitis in respiratory complexes of Iranian broiler herds. The Second International Conference on New Technologies in Science: March 13, 2019; Amol, Iran, Amol University of Special Modern Technologies. 2019, P: 100 [In Persian].

14- Fallah Mehrabadi MH, Motamed N, Ghalyanchilangeroudi A, Ghafouri SA, Tehrani F. Newcastle Disease and Avian Influenza H9N2 Outbreaks in Backyard Chickens, Iran, 2014-2015. *J Vet Res.* 2021; 76(1): 75-82.

15- Fallah Mehrabadi MH, Shoushtari A, Tehrani F, Motamed N, Haerian B, Ghalyanchilangeroudi A, *et al.* Serological and Molecular Survey of Avian Influenza H9N2 Subtype in Live Birds Markets- 2016. *J Vet Res.* 2021; 75(4): 399-406.

16- Haji-Abdolvahab H, Ghalyanchilangeroudi A, Bahonar A, Ghafouri SA, Marandi MV, Mehrabadi MHF, *et al.* Prevalence of avian influenza, Newcastle disease, and infectious bronchitis viruses in broiler flocks infected with multifactorial respiratory diseases in Iran, 2015–2016. *Trop Anim Health Prod.* 2019; 51(3): 689-95.

17- Aghakhan S, Abshar N, Fereidouni SRN, Marunesi C, Khodashenas M. Studies on avian viral infections in Iran. *Arch Razi Instit.* 1994(44/45): 1-10.

18- Gharbiani M, Boroomand Z, Mayahi M, Shapouri SA. The role of infectious bronchitis virus in respiratory complexes of broiler flocks in East Azarbaijan and Golestan provinces. *J Vet Microbiol.* 16(1): 53-64.

19- Awan MA, Otte M, James A. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. *Avian Pathol.* 1994; 23(3): 405-23.

20- Swayne DE, King DJ. Avian influenza and Newcastle disease. *J Am Vet Medical Assoc.* 2003; 222(11): 1534-40.

21- Behashtian B, Haghighi khoshkho P, Akbari Azad G, Hoseini H. Phylogenetic study and study of Newcastle disease virus in multifactorial respiratory diseases in broiler flocks of Qazvin province, 2014-2015. *Iran J Vet Med.* 2020; 14(2): 135-45.

22- Alamian A, Pourbakhsh A, Shushtari A, Keivanfar H. Seroprevalence Investigation of Newcastle Disease in Rural Poultries of the Northern Provinces (Golestan, Gilan, and Mazandaran) of Iran. *Arch Razi Instit.* 2019; 74(4): 365-73 [In Persian].

23- Nili H, Asasi K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol.* 2002; 31(3): 247-52.

24- Hassan KE, Shany SA, Ali A, Dahshan A-HM, Azza A, El-Kady MF. Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. *Poult Sci.* 2016; 95(6): 1271-80.

25- Ebrahimi, Mohammad, Grigurian, Samuel, Mehrabadi F, Hosein M, *et al.* Serological survey of H9N2 influenza viruses in rural chicken of Northern provinces, Iran Vet Res Biol Prod. 2021; 34(1): 15-25 [In Persian].

26- Mahdavi Asl M, Soltani Alvar M, Pedram B. Survey of Simultaneous Contamination with Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV) and Respiratory Complex Disease in Broiler Chicken of Shoushtar and Bavi City. *Vet Histol.* 2019; 7(3): 41-50 [In Persian].

27- Zamani Moghaddam A, Tahmasebi H, Hashemi Babaheidari H, Khosravi Farsani M, Kiani Salmi A. molecular detection of ornithobacterium rhinotracheale in broiler chickens with respiratory infection in Shahrekord. *Vete Res Biol prod.* 2012; 25(3): 41-4 [In Persian].

28- Darebaghi A, Emadi Chashmi H, Kafshdoozan H, Hoseini K. Molecular detection of avian metapenomovirus in Semnan broiler flocks by RT-PCR. *Iran J Anim Med.* 2021; 15(1): 27-34.

Molecular Detection of Newcastle, Infectious Bronchitis, and Influenza (H9) viruses in Respiratory Complex Samples in Broiler Flocks of Golestan Province, 2019-2020

Mohammad Montazeri[1], Arash Ghalyanchilangroudi[*2], Naser Sadri[3], Zahra Ziafati Kafi[3], Mehdi Vasfi Marandi[4]

1- DVSc Student, Department of Avian Health and Diseases, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of microbiology and immunology, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Ph.D. Student, Department of microbiology and immunology, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
4- Professor, Department of Avian Health and Diseases, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: December 8, 2020; Revise: February 13, 2021; Accept: March 2, 2021

Summary

The expansion of the poultry industry and the intensive breeding of birds indoors have led to respiratory infections of several different infectious agents, especially avian influenza (AI), Newcastle disease (ND) and infectious bronchitis. Evidence suggest that these agents act synergistically with each other in affected flocks. Twenty broiler flocks with respiratory infection in Golestan Province were selected. Trachea and kidney samples were transferred to the laboratory, and PCR was carried out to detect ND, IB, and H9 influenza viruses. According to the results, flocks were more involved with IB infection (20%), and then ND (15%) and H9 influenza (10%) were more prevalent, respectively. Also, among these respiratory complex infections, the co-infection of IB with ND (20%) and AI (20%) viruses was the most common. According to the conclusions of this study, infectious bronchitis virus played the most crucial role in the development of respiratory complexes, and co-infection with Newcastle disease virus and Influenza H9 also causes severe symptoms and mortality in the flocks. It is recommended that accurate epidemiological studies be conducted each year to determine the prevalence of risk factors of this disease and vaccines' efficiency in flocks. This is the first comprehensive study on the respiratory complex of broiler herds in Golestan Province, one of the centers of chicken meat production in the country.

Keywords: *Respiratory complex, Newcastle Disease, Infectious bronchitis, Avian Influenza (H9), Golestan province*

بررسی اثر مهاری نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما و نقره بر بیوفیلم‌های باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی

سمیرا کدوغنی ثانی[۱]، حمید رضا فرزین[۲]، مجید جمشیدیان مجاور*[۳]، محدثه امیری[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار، سبزوار، ایران.
۲و۳- استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، مشهد، ایران.
۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ دی ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۴ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۴ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

به‌طور کلی عفونت‌های بیمارستانی به آن دسته از عفونت‌هایی اطلاق می‌شود که به‌صورت محدود یا منتشر و در اثر واکنش‌های بیماری‌زای مرتبط با خود عامل عفونی یا سموم آن در بیمارستان ایجاد می‌شود به شرطی که حداقل ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از پذیرش بیمار در بیمارستان ایجاد شود و در زمان پذیرش، فرد نباید علائم آشکار عفونت مربوطه را داشته باشد و یا در دوره نهفتگی بیماری خود نباشد بدین منظور در این مطالعه به بررسی اثر مهاری نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما و نقره بر بیوفیلم‌های باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی پرداخته شده است. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل سوش‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 14028)، *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC 6538) و *استرپتوکوکوس پایوژنز* (ATCC 19606) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) بودند. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش به محیط‌های اختصاصی خود شامل مک کانکی آگار (سودوموناس آئروژینوزا)، بردپارکر آگار (*استافیلوکوکوس اورئوس*)، بلادآگار (*استرپتوکوکوس پایوژنز*) و شکلات آگار (*اسینتوباکتر بومانی*) انتقال داده شدند. جهت اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانوذرات نقره از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده گردید. همچنین جهت بررسی ترکیبات آلی احتمالی که در سنتز نانوذرات امکان دخالت داشتند آنالیز طیف سنجی مادون قرمز انجام شد. جهت پی‌بردن به تأثیر نانوکمپلکس قارچ و نقره در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش از روش میکروپلیت استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش بیانگر این بود که ارتباط معناداری بین تشکیل بیوفیلم در حضور نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما و نقره وجود دارد، که در این بین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بیوفیلم ضعیف، *اسینتوباکتر بومانی* فاقد تشکیل بیوفیلم، *سودوموناس آئروژینوزا* دارای بیوفیلم ضعیف و *استرپتوکوکوس پایوژنز* دارای بیوفیلم قوی بودند. نانو کمپلکس قارچ و نقره دارای فعالیت آنتی‌باکتریال در غلظت‌های گوناگون بوده و همچنین این کمپلکس دارای غلظت مهارکنندگی رشد و نیز دارای توانایی مهار تشکیل بیوفیلم می‌باشد. با توجه به فعالیت خوب آنتی‌باکتریال این ترکیب می‌توان از این ترکیب در کاربرد گوناگون پزشکی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *بیوفیلم، عفونت بیمارستانی، گانودرما، نقره، نانوذره*

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

مقدمه

عفونت بیمارستانی به عفونتی گفته می‌شود که بیمار در زمان بستری دچار آن عفونت نبوده و حتی در دوره نهفتگی آن عفونت هم نبوده باشد. عفونت‌های بیمارستانی یک معضل بزرگ و جدی و یکی از عوامل مرگ و میر در مراکز بهداشتی درمانی می‌باشند و سالانه هزینه‌های هنگفتی را به بیماران بستری شده و مراکز بهداشتی درمانی وارد می‌نماید. امروزه میزان این عفونت‌ها در کشورهای پیشرفته، در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه رؤیت می‌گردد که میزان فراوانی عفونت‌های بیمارستانی در کشورهای در حال توسعه سهم بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد (۱، ۲). دستگاه ادراری، دستگاه تنفسی و سیستم گردش خون را می‌توان به‌عنوان سه محل اصلی برای ایجاد عفونت‌های بیمارستانی نام برد. عفونت‌های ایجاد شده در محل‌های ذکر شده شامل پنومونی، عفونت سیستم ادراری و سپتی‌سمی می‌باشد (۲). میکروارگانیسم‌های گوناگونی باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌گردند. از مهم‌ترین باکتری‌های ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی می‌توان به *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسینتوبمانی* و غیره اشاره نمود (۳، ۴).

بیوفیلم، ساختاری متشکل از جمعیت باکتریایی است که به‌وسیلهٔ ماتریکس پلی‌ساکاریدی باکتری‌ها محصور شده است و به علت داشتن ویژگی‌های خاص فیزیولوژی و ساختاری، باعث مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و مکانیسم‌های دفاعی میزبان می‌شود (۵، ۶).

نانوذرات از طریق واکنش الکترواستاتیکی به غشای باکتری‌ها متصل می‌گردند و با ایجاد اختلال در غشاء سبب تخریب غشاء باکتری‌ها به‌طور کامل می‌شوند (۷). از مکانیسم‌های ضد میکروبی نانوذرات، می‌توان واکنش آمین و گروه‌های کربوکسیل با پپتیدوگلیگان دیوارهٔ باکتری‌ها را نام برد که واکنش فوق سبب آسیب دیدن دیوارهٔ سلولی آنها می‌شود (۸).

نانوذرات معمولاً دارای خواص و عملکرد بهتری از نمونه همان عنصر را از خود بروز می‌دهند، به دلیل این‌که نانوذرات دارای سطح ویژه بالاتری نسبت به ذرات درشت‌تر هستند. در مورد نانوذرات ضد باکتری نقره نیز این موضوع صدق می‌کند و مقدار کمی از این مواد، تأثیرات ضد باکتری زیادی دارند. نانوذرات نقره در غلظت پایین به‌عنوان ابزار درمانی برای عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌ها به‌شمار می‌آیند و در حوزه‌ی درمانی حائز اهمیت می باشند (۹). گانودرما لوسیدم یک قارچ با خواص دارویی است. گانودریک اسید مهم‌ترین ماده و دارای خواص مهم و فواید زیادی است که توسط این قارچ تولید می‌شود و دارای اثرات مهمی در زمینه دارویی است (۱۰). در سال‌های اخیر، مشخص شده است که برخی از محصولات طبیعی جدا شده از قارچ‌های جنس *گانودرما* دارای اثرات ضد تومور، محافظت از کبد، ضد التهاب، تنظیم ایمنی، ضد اکسیداسیون، ضد ویروسی، ضد قند خون و ضد چربی خون هستند (۱۱).

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر مهاری نانو کمپلکس عصاره قارچ گانودرما و نقره بر بیوفیلم‌های باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی قارچ گانودرما: جهت تهیه عصاره‌ی آبی قارچ گانودرما میزان ۲۵ گرم قارچ *گانودرما* توسط هاون چینی خرد شد سپس به میزان ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر به آن اضافه شد محلول فوق به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از طی این مدت جهت صاف نمودن محلول از کاغذ صافی عبور داده شد. همچنین جهت استریل نمودن محلول از فیلتر استفاده شد (۱۲).

سنتز نانوذره نقره و قارچ گانودرما: جهت تهیه عصاره قارچ نقره ۰/۸۳ گرم از نیترات نقره با ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط شد و مقدار ۰/۵ سی‌سی از نقره را با ۹/۵ سی‌سی عصاره آبی قارچ به مدت ۲۴ ساعت رو شیکر قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ (اپندورف-آلمان) شد و پس از چند بار شستشو از رسوب حاصل برای انجام تست‌های تعیین حساسیت استفاده گردید. به منظور تأیید تولید نانوذره نقره و اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانوذرات نقره از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (ساخت کشور چک) و همچنین از دستگاه FTIR (ساخت کشور آلمان) استفاده شد (۱۲).

بررسی اثر مهاری نانوکمپلکس قارچ و نقره بر تشکیل بیوفیلم: باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل سوش‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC14028) ، *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC 6538) و *استرپتوکوکوس پایوژنز* (ATCC 19606) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) بودند. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش به محیط‌های اختصاصی خود شامل مک کانکی آگار (سودوموناس آئروژینوزا)، برد پارکر آگار (*استافیلوکوکوس اورئوس*)، بلادآگار (*استرپتوکوکوس پایوژنز*) و شکلات آگار (*اسینتوباکتر بومانی*) انتقال داده شدند.

برای پی بردن به تأثیر نانوکمپلکس قارچ و نقره در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش از روش صفحه کشت بافت استفاده گردید. بدین منظور باکتری‌های موردِ استفاده در محیط کشت مایع TSB (مرک-آلمان) کشت شدند و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند.

جهت پی بردن به تأثیر نانوکمپلکس قارچ و نقره در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش از روش رقت سازی سریالی به صورت سه مرتبه تکرار صورت پذیرفت.

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB (مرک-آلمان) داخل یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد سپس به اولین چاهک به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بالاترین غلظت محلول ترکیب نقره و قارچ اضافه گردید و به خوبی مخلوط شد، از چاهک اول به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول برداشته شد و به چاهک بعدی که فقط دارای ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود اضافه گردید این روند از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک دهم ادامه پیدا کرد تا تمامی غلظت‌های مورد نظر ساخته شوند، پس از تهیه‌ی رقت‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های ۱ تا ۱۰ از سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. همچنین از چاهک یازدهم به‌عنوان کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و عصاره ی نقره و قارچ و از چاهک دوازدهم به‌عنوان کنترل منفی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از طی مدت زمان انکوباسیون میکروپلیت‌ها برگردانده شدند تا محیط کشت موجود در تمامی چاهک‌ها خالی شود، سپس چاهک‌ها سه بار با بافر فسفات استریل شسته شدند تا باکتری‌هایی که بیوفیلم تشکیل نداده‌اند، از میکروپلیت خارج شوند. پس از آن میکروپلیت‌ها به صورت وارونه به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند تا خشک شوند. پس از خشک شدن میکروپلیت ۲۰۰ ماکرولیتر از محلول کریستال ویوله ۰/۲ درصد به تمامی چاهک‌ها افزوده گردید و میکروپلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد پس از طی مدت زمان مذکور رنگ درون میکروپلیت‌ها خالی گردید و چاهک‌ها با بافر فسفات شستشو داده شدند. پس از خشک شدن میکروپلیت به هر چاهک به میزان ۲۰۰ میکرولیتر محلول سی درصد اسید استیک اضافه گردید تا رنگ باند شده با باکتری‌های تشکیل دهنده‌ی بیوفیلم نمایان شود. جذب نوری میکروپلیت در طول موج

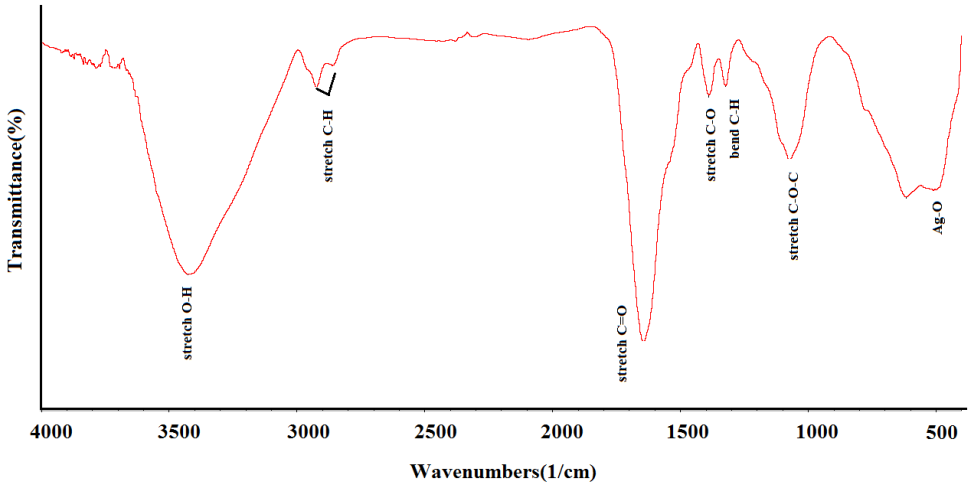
۵۹۵ نـــانومتر توســـط دســـتگاه قرائـــت‌گر الایـــزا (Biotek.USA) قرائـت شـد و نتـایج حاصـل براسـاس جدول شماره ۱ آنالیز شد.

جدول ۱- طبقه‌بندی توانایی تولید بیوفیلم به وسیله روش میکروتیتر پلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان تولید بیوفیلم	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نوری OD
قوی	OD>۴*ODC	OD>۰/۳۳۲
متوسط	۲*ODC<OD<=۴*ODC	۰/۱۶۶<OD<=۰/۳۳۲
ضعیف	ODC<OD<=۲*ODC	۰/۰۸۳<OD<=۰/۱۶۶
عدم اتصال	OD<=۰/۰۸۳	OD<=۰/۰۸۳

نتایج

نتایج آنالیز FT-IR: آنالیز FT-IR به منظور بررسی گروه‌های عاملی در ساختار و بررسی تغییرات پس از اصلاح ساختار انجام می‌گیرد. طیف IR نمونه عصاره قارچ گانودرما/ذرات نقره در شکل ۱ نشان داده شده است. پیک پهن در ناحیه ۳۴۲۲ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی O-H می‌باشد. پیک مشاهده شده در ناحیه ۲۹۲۴ cm^{-1} ناشی از ارتعاشات کششی C-H می‌باشد. پیک‌های موجود در ناحیه ۱۷۰۰-۱۵۰۰ cm^{-1} از نمونه قارچ گانودرما به ارتعاشات پیوند آمیدی اشاره دارد که ناشی از ساختار پروتئینی است. باند مشاهده شده در ناحیه ۱۶۴۴ cm^{-1} و ۱۵۳۸ به ارتعاشات کششی C=O و نیز ارتعاشات خمشی N-H مربوط است. پیک‌های دوتایی مشاهده شده در ناحیه ۹۰۰-۴۰۰ به ساختار کربوهیدراتی نمونه برمی‌گردد. پیک در ناحیه ۱۳۸۹ cm^{-1} و ۱۳۲۲ و ۱۰۷۲ به ترتیب به ارتعاش کششی C-O و ارتعاش خمشی C-H و ارتعاش کششی C-O-C اشاره دارد. مشاهدات تأیید می‌کند که گروه‌های عاملی C=O و O-H مسئول تولید نانوذرات نقره هستند. پیک تیز در ناحیه ۴۵۰-۵۵۰ cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی Ag-O می‌باشد.

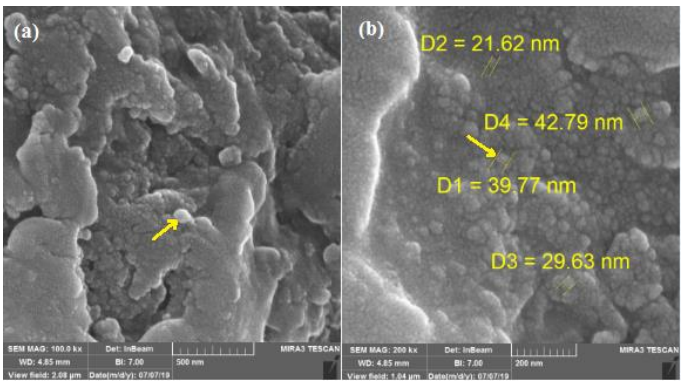


شکل ۱_ آنالیز FT-IR

نتایج میکروســـکوپ الکترونی روبشـــی FE-SEM : تصاویر SEM از نمونه سنتزی در شکل ۲ نشان داده شده اســـت. تصـــاویر ۲a نانوذرات نقره را با مورفولوژی ذره‌ای نشان می‌دهد که در تصویر با فلش زرد رنگ مشخص شده و در میان گونه زیستی با مورفولوژی صفحه‌ای قرار گرفته ا ست. نتایج حا صل از ت صاویر SEM در شکل ۲b ن شان

می‌دهد که ذرات نقره ســـنتزی دارای اندازه در محدوده ۴۵-۲۰ نانومتر می‌باشد.

نتایج بیوفیلم: نتایج حاصل از تشکیل بیوفیلم به روش بیوفیلم نمایانگر این بود که سویه‌های مورد مطالعه دارای بیوفیلم قوی و ضعیف می‌باشند.



شکل ۲_ میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM

جدول ۲- نتایج تست بیوفیلم

باکتری	قدرت تشکیل بیوفیلم
استافیلوکوکوس اورئوس	ضعیف
استرپتوکوکوس پایوژنز	قوی
اسینتوباکتر بومانی	عدم اتصال
سودوموناس آئروژینوزا	ضعیف

مهار تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف نانو کمپلکس قارچ و نقره: مهار تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلفِ نانوکمپلکس قارچ و نقره در جدول زیر نشان داده شده است.

جدول ۳- مهار تشکیل بیوفیلم باکتریه ی مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره عصاره قارچ +نقره در رقت‌های گوناگون

سویه	کنترل منفی	کنترل مثبت	غلظت نانوذره						
			۱۷۵۰	۸۷۵	٤۳۷/۵	۲۱۸/۷۵	۱۰۹/۳۷۵	٥٤/٦۸	۲۷/۳٤	۱۳/٦۷
استرپتوکوکوس پایوژنز	۰/۱۷٦ ± ۰/۰۲٤	۰/۲۳۸ ± ۰/۰۱۸	۰/۱۸۰ ± ۰/۰۲٦	۰/۲۱۳ ± ۰/۰۰۹	۰/۲۱۵ ± ۰/۰۱۰	۰/۱٤٤ ± ۰/۰۸٦	۰/۱٥٥ ± ۰/۰٥٤	۰/۱٤۳ ± ۰/۰٥٦	۰/۱٤۲ ± ۰/۰۰۲	۰/۱۲٥ ± ۰/۰۳۷
اسینتوباکتر بومانی	۰/۱٤٤ ± ۰/۰۱٤	۰/۱٤۱ ± ۰/۰۰٤	۰/۱٦۸ ± ۰/۰۲٦	۰/۱٦۱ ± ۰/۰۲۱	۰/۱٤٥ ± ۰/۰۱۳	۰/۱۳۸ ± ۰/۰۰٦	۰/۱٦۲ ± ۰/۰۲۱	۰/۱۳۰ ± ۰/۰۰٥	۰/۱۲۸ ± ۰/۰۱۹	۰/۱۲۲ ± ۰/۰۲۲
سودوموناس آئروژینوزا	۰/٤٥۹ ± ۰/۰۳۰	۰/۲۲۷ ± ۰/۰۱٦	۰/۲۷۸ ± ۰/۰۲٤	۰/۲۸۷ ± ۰/۰۰٥	۰/۲٤۳ ± ۰/۰۰۷	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۱۲	۰/۲۱۸ ± ۰/۰۰۱	۰/۲۰٦ ± ۰/۰۱۸	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۲۳	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۳۱
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/٤٤۲ ± ۰/۰۲٤	۰/۲٥۱ ± ۰/۰۱۸	۰/۲۹۲ ± ۰/۰۲٦	۰/۳۲۱ ± ۰/۰۰۹	۰/٤۰۱ ± ۰/۰۱۰	۰/۳۷۳ ± ۰/۰۸٦	۰/۳۹۷ ± ۰/۰٥٤	۰/۳۲٦ ± ۰/۰٥٦	۰/۳۳۷ ± ۰/۰۰۲	۰/۳۷٥ ± ۰/۰۳۷

بحث

عفونت بیمارستانی یکی از رایج‌ترین و عمده‌ترین مشکلات درمانی در تمام بیمارستان‌ها و همچنین یکی از عفونت‌های رایج در میان بیماران بستری در مراکز درمانی می‌باشد. میکروارگانیسم‌هایی که باعث عفونت بیمارستانی می‌شوند با توجه به محل عفونت و بروز بیماری متفاوت بوده و عوامل گوناگونی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مؤثر می‌باشند (۱۳). بیوفیلم باکتری‌ها دارای نقش به‌سزایی در ایجاد بیماری‌های عفونی مخصوصاً بیماری‌های مزمن در بدن میزبان‌های گوناگون می‌باشند. میزان شدت بسیاری از عفونت‌ها در بدن دارای ارتباط مستقیم با تشکیل بیوفیلم در بدن بیماران می‌باشد حدود ۸۰ درصد بیماری‌های عفونی ناشی از تشکیل بیوفیلم در میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۱۴).

نصرتی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تهران به بررسی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *یورپاتوژن اشریشیاکلی* به سه روش صفحه کشت بافت، کنگورد آگار و لوله پرداختند. نتایج حاصل از این پژوهش در روش صفحه کشت بافت (میکروپلیت) بیانگر این بود که ۴۰ درصد جدایه‌ها دارای بیوفیلم قوی، ۲۲ درصد دارای بیوفیلم متوسط و ۲۰ درصد دارای بیوفیلم ضعیف بودند (۱۵).

عباس والی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در شهرکرد به بررسی اثر مهاری نانوذرهٔ اکسید روی در تشکیل بیوفیلمِ برخی باکتری‌های بیماری‌زا پرداختند. در این پژوهش اثر نانوذرهٔ اکسید روی در تشکیل بیوفیلمِ بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *باسیلوس سرئوس* به روش میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری *اشریشیاکلی* دارای بیوفیلم متوسط، *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بیوفیلم ضعیف، *سالمونلا تیفی موریوم* دارای بیوفیلم ضعیف و *باسیلوس سرئوس* دارای بیوفیلم ضعیف بودند (۱۶).

نیکبخت و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ در شاهرود انجام دادند به بررسی تولید زیستی و اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره تولید شده به وسیله عصاره آبی و متانولی گیاه عناب پرداختند. نتایج حاصل از پژوهش نیکبخت بیانگر ان بود که نانوذرات تولید شده اثر مناسبی بر روی چهار باکتری (*اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*) مورد آزمایش آنان داشته است. نانوذرات حاصله در مقایسه با محلول شاهد و نیز عصاره خالص گیاهان خواص ضد میکروبی بهبود یافته‌ای را دارا بودند و به نظر می‌رسد که تولید زیستی نانوذرات با استفاده از عصاره گیاهان می‌تواند به افزایش خواص دارویی آنها کمک کند (۱۷).

حبیبی و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی فعالیت ضد قارچی نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید مس علیه گونه‌های مختلف آسپرژیلوس (آسپرژیلوس فلاووس، فومیگاتوس، نیجر و پارازیتیکوس) در شیراز پرداختند. در پژوهش حبیبی نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید مس به روش شیمیایی تولید شدند و مورفولوژی و اندازه آنها توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری و همچنین روبشی، پراش اشعه ایکس و زتاسایزر بررسی شد. نتایج حاصل از پژوهش حبیبی نشان داد که اندازه نانوذرات بین ۱۰ الی ۶۰ نانومتر بوده و بیشترین خاصیت ممانعت کنندگی و کشندگی این نانوذرات به ترتیب بر روی آسپرژیلوس نیجر و فومیگاتوس بود (۱۸).

References

1- Kadoughani Sani, S., Jamshidian-Mojaver, M., Farzin, H., Amiri, M. Investigation of the effect of fungal and copper nanocomplexes on bacteria causing nosocomial infections. New Findings in Veterinary Microbiology, 2020; 3(1): 39-46.

2- World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide (2011).

3- Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, *et al*. Prevalence of Class 1 Integron among Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii in Tabriz, Northwest of Iran. Pol J Microbiol 2012; 61(1):57-60

5- Besharati S, Owlia P. Evaluation of biofilm production capacity in salmonella isolated from chicken meat in Tehran municipally daily fruit and vegetable markets. Daneshvar Medicine. 2020; 28(1):62-72.

6- Ciofu O, Mandsberg LF, Wang H, Høiby N. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012; 65(2): 215-25.

7- Schneider G, Schweitzer B, Steinbach A, Pertics BZ, Cox A, Kőrösi L. Antimicrobial Efficacy and Spectrum of Phosphorous-Fluorine Co-Doped TiO2 Nanoparticles on the Foodborne Pathogenic Bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterohaemorrhagic E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella putrefaciens*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Foods. 2021;10 (8):1786.

8- Bogdanović U, Lazić V, Vodnik V, Budimir M, Marković Z, Dimitrijević S. Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. Mater Lett 2014; 12(8): 75-8.

9- Humberto HL, Garzatrevino EN, Ixtepanturrent L, Singh DK. Silver nanoparticles are broad spectrum bactericidal and virucidal compounds. J Nanobiotechnol 2011; 9: 1-8.

10- Mayzumi F, Okamoto H & Mizuno T. Cultivation of Reishi (*Ganoderma lucidum*). Food Rev. Int. 1997; 13: 365 - 82.

11- Cao Y, Xu X, Liu S, Huang L, Gu J. Ganoderma: a cancer immunotherapy review. Frontiers in pharmacology. 2018; 9(5):1217.

12- Kadoughani Sani S, Jamshidian-Mojaver M, Farzin H, Amiri M. Investigation of the effect of fungal and copper nanocomplexes on bacte-ria causing nosocomial infections. New Findings in Veterinary Microbiology. 2020; 3(1):39-46.

13- Mehrabi Tavana A. Nosocomial infections: A global problem. Hakim Health Sys Res. 2016;19(2):100-02.

14- Mamishi S, Pourakbari B, Teymuri M, Babamahmoodi A, Mahmoudi S. Management of hospital infection control in Iran: a need for implementation of multidisciplinary approach. Osong public health and research perspectives. 2014;5(4):179-86.

15- Nosrati N, Honarmand Jahromy S, Zare Karizi S. Comparison of Tissue Culture Plate, Congo red Agar and Tube Methods for Evaluation of Biofilm Formation among *Uropathogenic E. coli* Isolates. Iran J Med Microbiol.2017;11(3):49-58.

16- Abbasvali M, Ebrahimi Kahrizsangi A, shahriyari F. Evaluation of the Inhibitory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Biofilm Formation of Some Foodborne Bacterial Pathogens. Iran J Med Microbiol. 2017; 11(5):115-124.

17- Nikbakht M, Pourali P. Survey of biological and antibacterial effects of silver nanoparticles of aqueous and methanol extracts of Berberis Vulgaris. MEDICAL SCIENCES. 2015; 25 (2) :112-118.

18- Habibi N, Gheisari H, Aminlari M, Sedaghati F. The study of antifungal activities of magnesium oxide and copper oxide nanoparticles against different species of Aspergillus. JABS. 2017; 7 (3) :317-327.

The Inhibitory Effect of Nanocomplex of Ganoderma and Silver Fungus Extract on Biofilms of Bacteria that Cause Nosocomial Infections

Samira Kadoughani Sani[1], Hamidreza Farzin[2], Majid Jamshidian-Mojaver[3*], Mohadeseh Amiri[4]

1- Master of Microbiology, Department of Biotechcology, Sabzevar Branch, Islamic AzadUniversity of Sabzevar, Sabzevar, Iran.
2,3- Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, iran.
4- Master of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University ofKerman, Kerman, Iran.

Receive: December 30, 2020; Revise: February 12, 2021; Accept: March 4, 2021

Summary

In general, nosocomial infections are those infections that are limited or diffuse and are caused by pathogenic reactions related to the infectious agent or its toxins in the hospital, provided that they occur at least 48 to 72 hours after admission, the patient should be hospitalized and at the time of admission, the person should not have obvious signs of infection or be in the latent period of the disease. The causes of nosocomial infections are discussed. The bacteria used in this study included standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 14028), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 6538) and *Streptococcus pyogenes* (19606 ATCC) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The bacteria used in this study were transferred to their specific media including McConkey agar (*Pseudomonas aeruginosa*), Parker agar board (*Staphylococcus aureus*), blood agar (*Streptococcus pyogenes*) and chocolate agar (*Acinetobacter baumannii*). Scanning electron microscope was used to measure the dimensions and shape of silver nanoparticles. Infrared spectroscopy was also performed to investigate possible organic compounds that could be involved in the synthesis of nanoparticles. Microplate method was used to investigate the effect of fungal and silver nanocomplexes in inhibiting the biofilm formation of bacteria used in this study. The results showed that there was a significant relationship between biofilm formation in the presence of nano-complex of *Ganoderma* and silver extracts; among them, *Staphylococcus aureus* had a weak biofilm, *Acinetobacter baumannii* had no biofilm, *Pseudomonas aeruginosa* had a weak biofilm and *Streptococcus pyogenes* had a strong biofilm. Fungal and silver nanocomplexes have antibacterial activity in various concentrations and also this complex has a growth inhibitory concentration and also has the ability to inhibit biofilm formation. Due to the good antibacterial activity of this compound, it can be used in various medical applications.

Keywords: *Biofilm, Nosocomial infection, Ganoderma and silver and nanoparticles*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 3, No. 2, Autumn & Winter 2021

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