نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ٤، شماره ١

ناشر: دانشگاه زابل

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

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

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

هیات دبیران:

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

محمد بکائیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

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

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

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

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

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

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

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

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

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

کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

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

پیشگفتار

به نام خدا

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

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

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه

تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

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

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

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

شیوه نگارش مقاله:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

نحوه رفرنس نویسی:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می‌باشد:

گزارش موردی (CaseReport) باید شامل بخش‌های زیر باشد:

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

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

***بحث**

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

مقاله مروری (Review)

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

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

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

مقاله کوتاه (ShortCommunication)

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

نامه به سردبیر (Letter to Editor)

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

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

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

تعهد نامه

سردبیر محترم مجله تازه ها در میکروب شناسی دامپزشکی

با سلام؛

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

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

امضاء و تاریخ

عنوان مقاله: ----------

مشخصات کلیه نویسندگان مقاله به ترتیب مندرج در مقاله

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

آدرس پستی و الکترونیک نویسنده مسئول:

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

فرم تعارض منافع

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

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

.....

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

.....

عنوان مقاله: ----------

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

امضاء و تاریخ

اثرات عصاره‌ی گل راعی و آلوئه‌ورا بر التیام زخم باز تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در رت

شادی سندگل [١]، محمدرضا آقچه‌لو*[٢]، داریوش سعادتی[٣]، عباس جمشیدیان[٤]

١- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٢- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٣- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٤- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ٢٠ آبان ١٣٩٩، بازنگری: ٢٢ آذر ١٣٩٩، پذیرش نهایی: ٣٠ آذر ١٣٩٩

چکیده

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جزو فلور طبیعی پوست محسوب شده و عامل مهمی در عفونت زخم‌ها در انسان و حیوانات است. دو گیاه گل راعی و آلوئه‌ورا دارای اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قوی هستند و می توانند بر روی التیام زخم تأثیرات مثبتی بگذارند. در این مطالعه تعداد ۴۰ رت به‌صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه شاهد،گروه کنترل مثبت و دو گروه درمانی پماد حاوی دو گیاه یعنی عصاره روغنی گل راعی و عصاره الکلی آلوئه‌ورا که با دو درصد متفاوت ۱ و ۴ درصد ، تحت درمان قرار گرفتند . نتایج بالینی و هیستولوژی با استفاده از آزمون‌های آماری آنوا و کروسکال-والیس با یکدیگر مقایسه شدند. تفاوت آماری معنی‌داری بین درصد التیام زخم در روز ۳ در دو گروه درمان شده با پماد حاوی عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا ۱ و ۴ درصد وجود دارد. در روز ۱۴ بافت پوششی دو گروه درمان بهتر از دو گروه دیگر است. در روز چهاردهم در هر دو گروه پماد حاوی عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا ۱ و ۴ درصد فولیکول‌های مو تشکیل شده بود اما غدد سباسه فقط در گروه عصاره ۴ درصد مشاهده شد و کیفیت تشکیل بافت پوششی نیز در گروه عصاره ۴ درصد بهتر از سه گروه دیگر بود. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که پماد حاوی عصاره روغنی گل راعی و عصاره الکلی آلوئه‌ورا ۴ درصد در زخم تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای اثرات التیام بخشی بهتری از نظر هیستوپاتولوژی و زیبایی است.

واژگان کلیدی: *گل راعی ، عصاره آلوئه‌ورا ، هیستوپاتولوژی ، التیام زخم ، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس*

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

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن شایع و خطرناک است که عفونت‌های مختلفی ایجاد می‌کند. آسیب پوستی مانند زخم و سوختگی می‌تواند باعث کلنیزه شدن این باکتری شده و عفونت زخم ایجاد کند (۱). همچنین این باکتری یک عامل مهم در عفونت زخم در حیوانات خانگی است و آلودگی با استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یک مبحث مهم به علت محدودیت در درمان و زئونوز بودن آن است (۲) و از باکتری‌های مهم و شایع در عفونت زخم‌های مزمن است که با التیام این زخم‌ها تداخل ایجاد می‌کند (۳).

استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین پاتوژن جدا شده از زخم‌های ناشی از سوختگی بوده است (۴). این باکتری یک پاتوژن فرصت طلب است که سهم عمده‌ای در عفونت‌های بیمارستانی دارد (۵) و بر روی پوست و مخاط ۴۰ درصد جمعیت انسانی وجود دارد (۶). امروزه عفونت به استافیلوکوکوس اورئوس یکی از علل در خور توجه در مرگ و میر به‌ویژه پس از جراحی مطرح است (۷). از زمان‌های بسیار قدیم استافیلوکوکوس اورئوس و در سال‌های اخیر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومایسین نقش مهمی در عفونت‌های بعد از عمل جراحی داشته است. در این راستا از داروها و پمادهای متعددی استفاده می‌شود که هرکدام دارای محدودیت‌هایی هستند. برای مثال : مصرف موضعی آنتی‌سپتیک‌ها می‌تواند منجر به تاخیر در روند اپی‌تلیالی شدن در موضع زخم شود. طبق بررسی‌های انجام شده مصرف آنتی‌بیوتیک‌های موضعی نیز که به منظور کاهش عفونت زخم استفاده می‌شود، می‌تواند باعث درماتیت† تماسی شود (۸).

بنابراین، باید از روش‌های درمانی استفاده شود که عوارض جانبی کمتر و اثر ترمیمی بیشتری داشته و در عین حال کم هزینه باشند . یکی از بهترین روش‌هایی که می‌تواند ما را در رسیدن به هدف فوق یاری کند استفاده از مواد گیاهی است (۹).

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماری‌ها در انسان قدمتی طولانی دارد .تخمین زده می‌شود که بیشتر از ۱۰ درصد از هزاران گونه گیاهی شناخته شده کاربرد دارویی دارند (۱۰).

به دلیل پیشنهاد استفاده از گیاهان دارویی توسط سازمان بهداشت جهانی و از سوی دیگر با توجه به عدم معرفی یک داروی مؤثر برای درمان زخم، مطالعه اثر داروهای گیاهی برای ترمیم زخم ضرورت دارد (۱۱).

با این حال به نظر می‌رسد دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک با فعالیت ضد باکتریایی مناسب علیه این باکتری در آینده نزدیک امکان پذیر نخواهند بود. مطالعات آزمایشگاهی مختلفی مشخص نمودند که برخی از عصاره‌های گیاهی اثر باکتری‌کشی قوی بر ضد باکتری‌ها دارند(۱۵-۱۲).

گیاه آلوئه ورا‡ متعلق به خانواده Liliaceae دارای انواع مواد ارزشمند معدنی، ویتامین، آمینواسیدها، آنتراکینونی، امودین§ و آلوئین** با خاصیت ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد روماتیسمی، ضد سرطانی، ضد پیری پوست، ضد عفونی کنندگی، ضد التهابی، تنظیم کنندگی سیستم ایمنی، بهبود دهنده جراحت‌ها می‌باشد(۱۶، ۱۷).

با توجه به خواص دارویی مختلف آلوئه‌ورا در

---

* Staphylococcus aureus

† dermatitis

‡ Aloe vera

§ Emodin

** Aloein

داروسازی، تولید ژل و پماد بهبود دهنده جراحات، دهان شویه و ضد عفونی کننده در دندانپزشکی، استفاده می‌شود (۱۸، ۱۹).

تحقیقات نشان می‌دهد گیاه آلوئه‌ورا سبب سرعت بخشیدن به روند بهبودی زخم‌ها، جلوگیری از عفونت، جلوگیری از بجا ماندن آثار زخم وگوشت‌های اضافی می‌گردد. مکانیسم‌های متعددی برای اثرات بهبود زخم توسط آلوئه‌ورا ارائه شده که شامل نگهداری رطوبت پوست، افزایش سلول‌های اپیتلیال، بلوغ سریع‌تر کلاژن‌ها و کاهش التهاب است (۲۰).

گیاه علف چای یا گل راعی با نام علمی *Hypricum perforatum* گیاهی است علفی و پایا به ارتفاع ۱۱۰-۱۰ سانتی‌متر بدون کرک با گل‌هایی به رنگ زرد درخشان جزء گیاهان دارویی که قسمت‌های مورد استفاده آن سرشاخه‌های گلدار و نیز گل‌های گیاه می‌باشد (۲۱). مطالعات فیتوشیمیایی نشان داده که گیاه راعی سرشار از فلاونوئیدها وآنتوسیانین‌ها بوده و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۲۲).

مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در گیاه کوئرستین و لوتئولین می‌باشند. مقدار فلاونوئیدها درگل‌های گیاه ۱۱/۷ درصد و در برگ و ساقه ۷/۴ درصد می‌باشد (۲۳).

مطالعات نشان داده که اثرات ضد التهابی و ضد دردی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، تغییر نفوذ پذیری مویرگ‌ها، ضد آریتمی، گشادکنندگی عروق کرونر، ضد اسپاسم، تغییر قدرت و سرعت انقباض قلب بیشتر به خاطر فلاونوئیدها و هایپرفورین موجود در گیاه است (۲۴).

با توجه به اینکه درمان زخم یکی از شایع‌ترین و اقتصادی‌ترین مسایل بهبودی در جهان است و تسریع روند ترمیم زخم در دوران ما به عنوان یک اصل در علم درمان مورد توجه می‌باشد که هدف از آن علاوه بر هماهنگی سرعت بهبودی با سرعت زندگی، بهبود زخم‌های بد درمان و مزمن است. هدف از انجام این تحقیق ، بررسی اثرات بالینی و هیستوپاتولوژی عصاره گیاه گل راعی و آلوئه‌ورا در دو غلظت یک و چهار درصد بر روی زخم باز تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در رت است.

مواد و روش‌ها

تهیه پماد عصاره گل راعی و آلوئه‌ورای ۱ و ۴ درصد: برای تهیه عصاره الکلی آلوئه‌ورا ۲۰۰گرم برگ آلوئه‌ورا تهیه، تکه تکه شده و در مرحله اول دو سه روز در سایه و سپس در آون گذاشته شد تا خوب خشک شود و آسیاب گردید . در مرحله بعد ۲۰ گرم از پودر گیاه را داخل ۲۰۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد ریخته و ۲۴ ساعت روی دستگاه شیکر گذاشته تا خوب مخلوط شود سپس عصاره حاصل را به کمک کاغذ صافی جدا کرده و با دستگاه تقطیر در خلأ (روتاری) تا حد امکان تغلیظ شد و ۱۰ سی‌سی عصاره به دست آمد.

برای تهیه پماد ۴ درصد از پایه پماد (وازلین و اوسرین استریل شده) تهیه شده در همان حالت ۱۸/۴ گرم جدا گردید و در ظرف مخصوص نمونه‌گیری ریخته شد و سپس ۰/۸ گرم از هرکدام از عصاره‌های گل راعی (شرکت زرد بند، تهران، ایران) و آلوئه‌ورا به ترکیب فوق اضافه شد . برای تهیه پماد ۱ درصد نیز از پایه پماد تهیه شده در همان حالت ۱۹/۶ گرم جدا گردید و در ظرف مخصوص نمونه‌گیری ریخته شد و سپس ۰/۲ گرم از هرکدام از عصاره‌های گل راعی و آلوئه‌ورا نیز به ترکیب فوق اضافه گردید. پمادهای حاصله به منظور روانتر شدن به مدت ۴-۳ دقیقه در فور قرار گرفت و پس از خروج از دستگاه تا لحظه کامل سرد و بسته شدن با انتهای یک سوآپ استریل هم زده شد

(شکل ۱).

شکل ۱- پمادهای ساخته شده

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس: برای تلقیح باکتری از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس لیوفلیزه شده توسط شرکت مرک آلمان (Enrichment media Staphylococcus) که در محیط نوترینت آگار کشت داده شده بود استفاده گردید (از سویه‌های ATCC 6538 به عنوان کنترل کیفی استفاده شد). بعد از کشت در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت . در این شرایط باکتری کشت شده یکسری کلونی‌های تک ایجاد کرد که چند کلونی برداشته و در یک محیط براس دوباره کشت داده شد در مرحله بعد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گذاشته و بعد از آن با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید . مایع رویی ایجاد شده در اثر سانتریفیوژ با سمپلر کشیده و دور ریخته شد که این عمل به منظور شستشو برای خالص‌سازی باکتری صورت گرفت و تا ۲-۳ دفعه شستشو ادامه پیدا کرد. سری سوم که مایع رویی کشیده و دور ریخته شد به رسوب آن یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد بعد مایع حاصله ورتکس گردید. در مرحله بعد با دستگاه اسپکتوفتومتر OD محلول به دست آمده در طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه شد که تعداد باکتری برابر 10^8 cfu/ml بود در مرحله آخر محلول به دست آمده با این تعداد باکتری ده هزار برابر رقیق شده و بلافاصله بعد از ایجاد زخم، به زخم موش‌ها تلقیح گردید.

حیوانات مورد مطالعه: در این مطالعه از ۴۰ رت نژاد ویستار استفاده شد . تمام موش‌ها نر بوده و وزن آنها بین ۱۸۰-۲۲۰ گرم بود. موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم و در قفس‌های جداگانه مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی قرار داده شدند. محیط نگهداری آنها بدون استرس، تمیز و دارای دمای مناسب بود. موش‌ها با غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی که به صورت پلت بود تغذیه می‌شدند و آب به طور آزادانه در اختیار آنها قرار داده شد. گروه اول یا گروه شاهد (بدون درمان)، گروه دوم یا گروه کنترل مثبت (درمان شده با ترکیب وازلین و اوسرین)، گروه سوم یا گروه درمانی اول (تحت درمان با پماد حاوی عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی ۱ درصد) و گروه چهارم یا گروه درمانی دوم (تحت درمان با پماد حاوی عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی ۴ درصد) بودند.

موش‌ها برای بیهوش کردن از قفس‌ها خارج شدند و روی تخت جراحی قرار گرفتند. سپس با تزریق داخل صفاقی زایلازین ، Xylazine %2) (Holland) ، Woerden ، alfasan با دوز ۵ mg/kg و کتامین ، Ketamin %10) (Holland) ، Woerden ، alfasan با دوز ۱۰mg/kg بیهوش شدند.

موش‌ها پس از بیهوشی به‌صورت شکمی بر روی میز جراحی قرار داده شدند و موهای قسمت پشت حیوان کاملا برداشته شد . سپس ناحیه پشت حیوان

با بتادین تمیز و ضد عفونی شد و با پانچی که قطر آن ۶ میلی‌متر بود زخم ایجاد شد. روز عمل روز صفر در نظر گرفته شد.

درمان محل زخم از روز صفر (روز ایجاد زخم) تا روز ۱۴ به صورت روزانه یک بار انجام می‌شد . قبل از انجام درمان در هر روز به استثنای روز صفر که تلقیح باکتری انجام شد محل زخم با استفاده از یک تامپون و محلول سدیم کلراید ایزوتونیک شستشو می‌شد.

بررسی‌های ماکروسکوپیک: در روزهای صفر، ۳، ۷ و ۱۴ از زخم‌های ایجاد شده عکس‌برداری انجام شد . به این صورت که پس از مقید کردن موش یک خط‌کش مدرج در کنار زخم هم سطح با زخم قرار می‌گرفت و سپس عکس‌برداری با یک زاویه عمود بر زخم انجام می‌شد.

برای انجام اندازه‌گیری‌های ماکروسکوپیک در این مطالعه از نرم‌افزار image tool استفاده شد. با استفاده از این نرم‌افزار در هر تصویر مساحت کلی زخم اندازه‌گیری می‌شد. روش اندازه‌گیری به این صورت بود که پس از انتقال تصاویر به نرم‌افزار ابتدا مقیاس سیستم اندازه‌گیری نرم‌افزار با انتخاب فاصله دو نقطه (از روی خط‌کش مدرج که در هنگام تهیه عکس دیجیتالی در کنار زخم قرار گرفته بود) تعریف شد و سپس با استفاده از ابزاری که نرم‌افزار در اختیار قرار داده بود لبه‌های زخم مشخص شد و سپس مساحت ناحیه انتخاب شده اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه درصد اندازه زخم در هر روز مساحت اندازه‌گیری شده تقسیم بر مساحت زخم در روز صفر شد مطابق با فرمول زیر:

۱۰۰ × (مساحت زخم در روز صفر ÷ مساحت زخم در روز X) = درصد اندازه زخم در روز X

درصد اندازه زخم در روز X – ۱۰۰ = درصد التیام زخم در روز X

بررسی‌های میکروسکوپیک: نمونه‌برداری به‌منظور انجام بررسی‌های میکروسکوپیک در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ انجام شد. به این منظور در روز ۳ از هر گروه به طور تصادفی دو موش انتخاب و با استفاده از اتر یوتانایز شد. در روزهای ۷ و ۱۴ نیز از هر گروه به طور تصادفی ۳ موش انتخاب و یوتانایز شدند. موهای روییده شده در ناحیه زخم قبل از انجام نمونه‌برداری زدوده شدند و سپس با استفاده از یک اسکالپل برشی تمام ضخامت در پوست ایجاد شد و نمونه جهت بررسی آسیب‌شناسی برداشته شد. در هنگام برداشت نمونه هم از بافت پوست سالم و هم از بافت زخم نمونه‌برداری صورت گرفت تا امکان مقایسه بافت سالم و زخم وجود داشته باشد. بعد از برداشت نمونه، بافت زیر جلد از لحاظ حضور چسبندگی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های تهیه شده در ظرف‌های نمونه‌گیری حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شدند و مشخصات هر نمونه بر روی ظرف نمونه‌گیری یادداشت شد. بعد از ۲۴ ساعت فرمالین نمونه‌ها تعویض شد.

لایه‌های پوست به طور جداگانه بررسی شدند. معیارهایی که در قسمت اپیدرم مورد توجه قرار گرفت شامل منظم بودن لایه‌ی بازال، تکثیر و تمایز سلول‌های خاردار، لایه سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیالین، تغییرات کلی اپیدرم از نظر هایپرپلازی، فرورفتگی اپیدرم در درم (Rete ridge) و بالعکس (Rete pegs) می‌باشد.

تغییرات درم در دو ناحیه سطحی و عمقی به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و در هرکدام از نواحی، میزان و جهت رشته‌های کلاژن (موازی بودن رشته‌های کلاژن با هم و با اپیدرم و عمود بودن آنها بر عروق خونی) و همچنین حضور سلول‌های فیبروبلاست، مورد بررسی قرار گرفت.

در هریک از قسمت‌های درم (سطح و عمق درم) رگ‌های خونی از نظر تعداد رگ‌ها و جهت آنها (عمود بودن بر اپیدرم) مورد مطالعه قرار گرفتند.

همچنین از نظر شدت التهاب و نفوذ سلول‌های التهابی مرحله حاد (پلاکت، فیبرین و سلول‌هایی با هسته چند شکلی (PMN))، سلول‌های التهابی مرحله مزمن (سلول‌های تک‌هسته‌ای (MN)) ، شدت پرخونی، وسعت خونریزی و ایجاد ضمایم پوست (فولیکول‌های مو، غدد سبابه و غدد عرق) در محل التیام مورد بررسی قرار گرفتند.

در نهایت به هرکدام از مراحل فوق براساس شدت، امتیازهای ۱ برای حالت خیلی کم، ۲ برای حالت کم، ۳ برای حالت متوسط، ۴ برای حالت زیاد و ۵ برای حالت خیلی زیاد داده شد و اطلاعات به‌دست آمده در جدول برای هر نمونه ثبت شد (۲۵).

روش تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. از آزمون ANOVA و تست تکمیلی Duncan برای مقایسه مساحت زخم و درصد التیام زخم بین تیمارهای مختلف استفاده شد. و از آزمون غیر پارامتریک کروسکال والیس برای مقایسه داده‌های به‌دست آمده از ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک استفاده شد. سطح معنی‌داری P_{value} کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

یافته‌های ماکروسکوپیک: نتایج به‌دست آمده نشان داد در روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ تفاوت میانگین مساحت زخم بین گروه‌های مختلف درمان معنی‌دار نشده است ($P_{value} \rangle 0/05$)

در روز سه مساحت زخم در گروه کنترل مثبت (درمان شده با وازلین و اوسرین) بیشتر از گروه‌های درمانی با پماد عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی ۱ درصد و ۴ درصد وکنترل منفی بود از طرفی در گروه‌های درمان شده با پماد عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی مساحت زخم کمتر از دو گروه دیگر بود اما تفاوت معنی‌داری در مساحت زخم در بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد.

در روز هفت مساحت زخم در گروه یک کمتر از گروه پماد عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا ۱ درصد و ۴ درصد و گروه کنترل مثبت بود و در گروه کنترل مثبت از همه بیشتر بود اما تفاوت معنی‌داری بین این سه گروه مشاهده نشد.

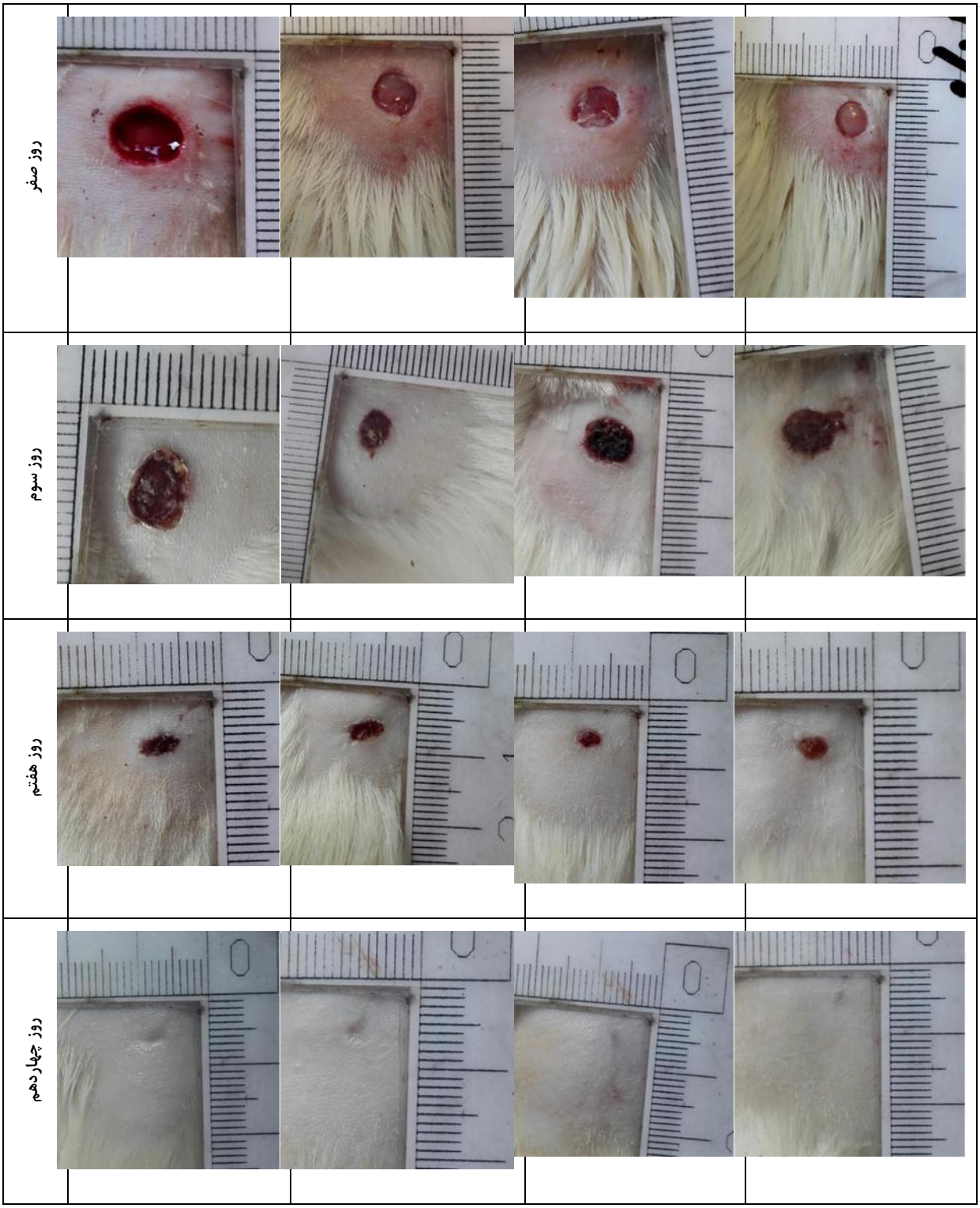
در روز چهارده مساحت زخم در گروه‌های درمانی با پماد کمتر از دو گروه دیگر بود ولی این تفاوت معنی‌دار نشد (جدول ۱).

تغییرات ماکروسکوپی زخم‌ها در روزهای مختلف در شکل ۲ قابل مشاهده است.

نتایج به‌دست آمده نشان داد درصد التیام زخم در روزهای هفت و چهارده در بین گروه‌های درمانی تفاوت آماری معنی‌داری ندارد اما در روز سه، بین گروه‌های درمان شده با پماد حاوی عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی ۱ و ۴ درصد و گروه کنترل مثبت تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد و گروه‌های درمان شده با پماد با هم در یک سطح از لحاظ معنی‌داری قرار دارند.

در روز هفت، درصد التیام زخم در گروه کنترل منفی بیشتر از سایر گروه‌ها بود و همچنین درصد التیام زخم در گروه درمان شده با پماد حاوی عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی یک درصد بیشتر از گروه چهار درصد شد اما هیچ گونه تفاوت آماری معنی‌داری در بین گروه های درمانی وجود نداشت.

در روز چهارده، درصد التیام زخم در گروه‌های درمان شده با پمادهای گیاهی ۱ درصد و ۴ درصد بیشتر از دو گروه دیگر بود و درصد التیام زخم بین دوگروه کنترل منفی و کنترل مثبت نیز برابر بود و هیچ گونه تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه های درمانی وجود نداشت (جدول ۲).



شکل ۲- تغییرات ماکروسکوپی زخم‌ها

جدول ۱- مساحت زخم (میلی‌متر مربع) در تیمارهای مختلف در طول مدت آزمایش، نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار (Mean ±SD) نشان داده شده است.

زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۱٪	عصاره ۴٪	P_{value}
روز ۳	۲۷/۳۱±۴/۶۷	۲۹/۵۷±۴/۷۲	۲۷/۳۹±۳/۲۳	۲۷/۰۴±۳/۷۷	۰,۶۲۹
روز ۷	۱۱/۴۹± ۹/۳۲	۶/۷۴± ۲/۹۷	۷/۰۰± ۱/۹۱	۷/۸۱± ۳/۱۴	۰,۲۶۵
روز ۱۴	۰/۹۹±۰/۸۶	۰/۹۷±۰/۸۳	۰/۰۰± ۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۷	۰,۳۸۱

جدول ۲- درصد التیام زخم (Mean ±SD) در تیمارهای مختلف در طول مدت آزمایش، در ردیف اول حروف انگلیسی متفاوت، تفاوت آماری معنی‌دار را نشان می‌دهند

زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۱٪	عصاره ۴٪	P_{value}
روز ۳	۰/۰۳±۰/۰۲a	۰/۰۷±۰/۰۶ ab	۰/۰۸±۰/۰۳b	۰/۰۸±۰/۰۴b	۰,۰۴۹
روز ۷	۰/۶۳± ۰/۲۶	۰/۷۹± ۰/۰۶	۰/۷۷± ۰/۰۴	۰/۷۴± ۰/۰۷	۰,۱۳۳
روز ۱۴	۰/۹۹±۰/۰۱	۰/۹۷±۰/۰۲	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰±۰/۰۰	۰,۳۱۵

یافته‌های میکروسکوپیک: معیار نظم سلول‌های بازال در روز هفت تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد اما تقسیمات میتوزی سلول‌های بازال هیچ گونه تفاوت آماری معنی‌داری در چهار گروه درمانی نشان نداد. از طرفی پماد ۴ درصد عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا در روز چهاردهم از لحاظ نظم نمره بهتری نسبت به سه گروه دیگر کسب کرد (جدول ۳).

در قسمت مقایسه سلول‌های لایه خاردار نیز از لحاظ تکثیر و تمایز، بخش تمایز سلول‌های خاردار دارای تفاوت آماری معنی‌داری بود اما تکثیر سلول‌های خاردار و همچنین هایپرپلازی اپیدرم هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند اما پماد حاوی عصاره یک درصد در روز هفتم و پماد حاوی عصاره چهار درصد در روز چهاردهم از لحاظ تمایز سلول های خاردار نمره بهتری نسبت به سایر گروه‌ها دریافت کردند.

سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیالین از روز هفتم در سه گروه کنترل مثبت و گروه‌های درمان شده با پمادهای گیاهی و در روز چهاردهم در همه گروه ها قابل مشاهده بودند و این سلول‌ها در روز هفتم تفاوت آماری معنی‌داری نشان دادند همچنین عصاره چهار درصد در روز چهاردهم نمره بهتری از لحاظ حضور سلول‌های دانه دار کسب کرد (جدول ۳).

مورد دیگری که در لایه اپیدرم مورد مقایسه قرار گرفت حضور Rete ridges بود که در روز هفتم در گروه‌های کنترل مثبت و درمان شده با پماد و روز چهاردهم در همه گروه‌ها مشاهده شد اما هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد.

در لایه درم رشته‌های کلاژن از لحاظ تعداد و جهت رشته‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند که میزان رشته های کلاژن در روز هفتم تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد اما گروه عصاره چهار درصد در روز هفتم و گروه‌های کنترل مثبت و عصاره یک درصد در روز چهاردهم نمره بهتری نسبت به سایر گروه‌ها دریافت کردند (جدول ۳).

از لحاظ معیار فیبروبلاست نیز گروه عصاره چهار درصد در روز چهاردهم نمره بهتری نسبت به سه گروه دیگر کسب کرد اما هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در بین امتیازات داده شده به موش‌ها در گروه‌های مختلف مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳- مقادیر (Mean ±SD) امتیازات هیستوپاتولوژی در تیمارهای مختلف در طول مدت آزمایش

معیارهای پاتولوژی	روز	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۱٪	عصاره ٤٪	P_{value}
هایپرپلازی اپیدرم	هفتم	۴/۶۷± ۰/۵۸	----	۴/۶۷± ۰/۵۸	۴/۳۳± ۰/۵۸	۰,۶۷۰
	چهاردهم	۳/۵۰± ۰/۷۱	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۵۰± ۰/۷۱	۰,۳۲۱
نظم سلول‌های بازال	هفتم	۱/۰۰± ۰/۰۰	----	۱/۶۷± ۰/۵۸	۲/۶۷± ۰/۵۸	۰,۰۴۷
	چهاردهم	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۵/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۲
میزان رشته‌های کلاژن	سوم	۲/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۵۰± ۰/۷۱	۰,۱۶۲
	هفتم	۲/۶۷± ۰/۵۸	۲/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۳۱
	چهاردهم	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۵۰± ۰/۷۱	۰,۱۶۲
میزان تشکیل بافت بافت پوششی	سوم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	هفتم	۳/۰۰± ۰,۰۰	۱/۰۰±۰,۰۰	۳/۰۰± ۰,۰۰	۳/۶۷±۰,۵۸	۰,۰۴۰
	چهاردهم	۴,۰۰±۰/۰۰	۳,۰۰±۰/۰۰	۴,۰۰±۰/۰۰	۵,۰۰±۰/۰۰	۰,۰۷۲
فیبروبلاست‌ها	سوم	۲/۵۰± ۰/۷۰	۲/۵۰± ۰/۷۰	۲/۵۰± ۰/۷۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۰,۷۰۶
	هفتم	۲/۶۷± ۰/۵۷	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۳۳± ۰/۵۷	۴/۶۷± ۰/۵۷	۰,۰۵۴
	چهاردهم	۴/۰۰± ۰/۰۰	۴/۵۰± ۰/۷۰	۴/۵۰± ۰/۷۰	۵/۰۰± ۰/۰۰	۰,۳۲۱
فولیکول‌های مو	سوم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	هفتم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	چهاردهم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۲
غدد عرق	سوم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	هفتم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	چهاردهم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
غدد سباسه	سوم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	هفتم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	چهاردهم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۲
عضلات صاف	سوم	۱/۰۰± ۰,۰۰	۱/۰۰ ± ۰,۰۰	۱/۰۰± ۰,۰۰	۱/۰۰± ۰,۰۰	۱,۰۰۰
	هفتم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	چهاردهم	۳/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۲
شدت سلول های التهابی	سوم	۴/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۴/۵۰± ۰/۷۱	۴/۵۰± ۰/۷۱	۰,۵۰۶
	هفتم	۲/۰۰± ۰/۰۰	۳/۵۰± ۰/۷۱	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۱۹
	چهاردهم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
شدت پرخونی	سوم	۳/۵۰± ۰/۷۱	۳/۵۰± ۰/۷۱	۴/۵۰± ۰/۷۱	۴/۰۰± ۰/۰۰	۰,۳۵۱
	هفتم	۲/۰۰± ۰/۰۰	۴/۵۰± ۰/۷۱	۲/۶۷± ۰/۵۸	۲/۳۳± ۰/۵۸	۰,۰۷۳
	چهاردهم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
سلول های دانه دار	هفتم	۳/۰۰± ۰/۰۰	----	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۱۸
	چهاردهم	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۵۰± ۰/۷۱	۴/۰۰± ۰/۰۰	۴/۵۰± ۰/۷۱	۰,۳۲۱
خونریزی	سوم	۲/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰ ± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
	هفتم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۱۹
	چهاردهم	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
جهت رگ‌های خونی	سوم	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۲
	هفتم	۴/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۶۷± ۰/۵۸	۳/۶۷± ۰/۵۸	۰,۶۰۴
	چهاردهم	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۲
جهت رشته‌های کلاژن	سوم	۲/۰۰± ۰,۰۰	۲/۰۰± ۰,۰۰	۲/۰۰± ۰,۰۰	۲/۰۰± ۰,۰۰	۱,۰۰۰
	هفتم	۱/۶۷± ۰/۵۸	۱/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۴
	چهاردهم	۱/۵۰± ۰/۷۱	۱/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۱۶۲
تمایز سلول‌های خاردار	هفتم	۲/۰۰± ۰/۰۰	----	۲/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۱۸
	چهاردهم	۳/۵۰± ۰/۷۱	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۵۰± ۰/۷۱	۴/۵۰± ۰/۷۱	۰,۲۴۶
تکثیر سلول‌های خاردار	هفتم	۴/۶۷± ۰/۵۸	----	۴/۶۷± ۰/۵۸	۴/۳۳± ۰/۵۸	۰,۶۷۰

معیارهای پاتولوژی	روز	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۱٪	عصاره ٤٪	P_{value}
	چهاردهم	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۱,۰۰۰
تقسیمات میتوزی سلول‌های بازال	هفتم	۴/۰۰± ۰/۰۰	----	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۳۳± ۰/۵۸	۰,۱۰۲
	چهاردهم	۳/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۲/۵۰± ۰/۷۱	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۱۶۲
تعداد رگ‌های خونی	سوم	۲/۵۰± ۰/۷۱	۳/۵۰± ۰/۷۱	۴/۰۰± ۰/۰۰	۳/۵۰± ۰/۷۱	۰,۲۴۶
	هفتم	۲/۶۷± ۰/۵۸	۳/۵۰± ۰/۷۱	۳/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۶۰
	چهاردهم	۲/۰۰± ۰/۰۰	۱/۵۰± ۰/۷۱	۲/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۰,۳۹۲
Rete ridges	هفتم	۳/۳۳± ۰/۵۸	----	۳/۶۷±۰/۵۸	۳/۶۷± ۰/۵۸	۰,۶۷۰
	چهاردهم	۳/۰۰± ۰/۰۰	۲/۰۰± ۰/۰۰	۳/۰۰± ۰/۰۰	۴/۰۰± ۰/۰۰	۰,۰۷۲

عضلات صاف از روز چهاردهم در گروه‌های کنترل مثبت، عصاره یک درصد و چهار درصد قابل مشاهده بود اما هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد و گروه عصاره درمانی چهار درصد در روز چهاردهم بهترین امتیاز را در بین گروه ها کسب کرد.

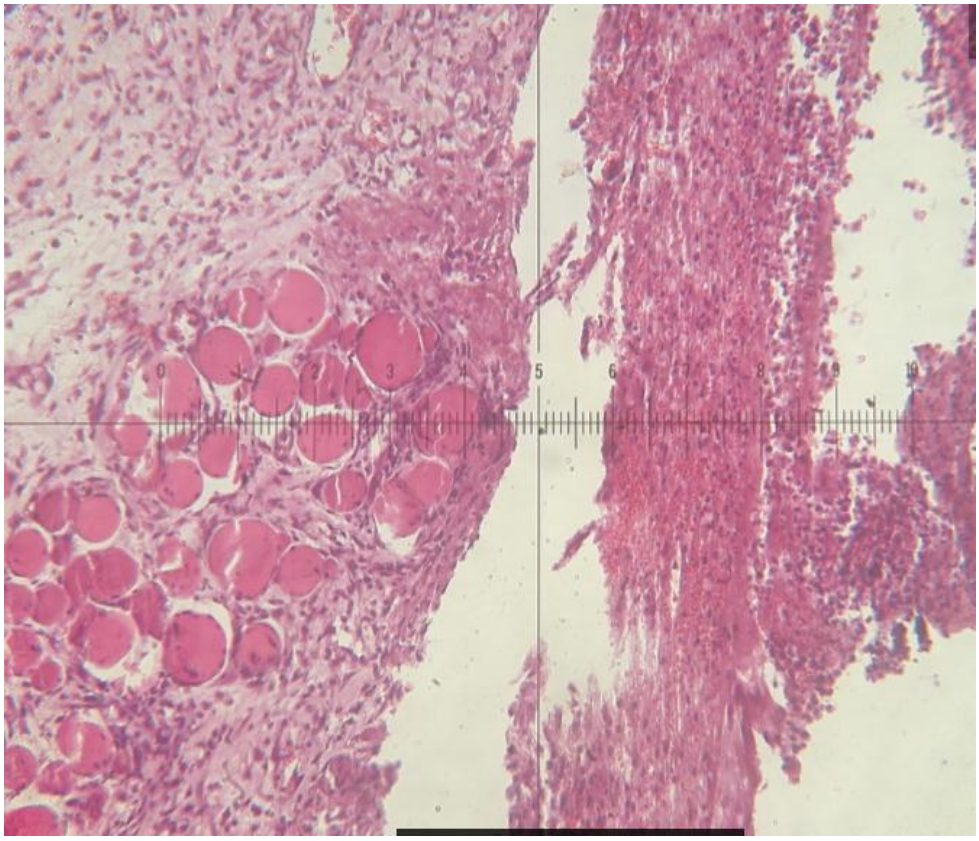
عروق موجود در لایه درم از لحاظ تعداد و جهت مورد مقایسه قرار گرفتند تمامی گروه‌ها از این لحاظ امتیازات خوبی کسب کردند اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

التهاب و سلول‌های اصلی که نوتروفیل‌ها و سلول‌های تک‌هسته‌ای بودند فقط در روز سوم در همه گروه‌ها و روز هفتم در دو گروه کنترل مثبت و منفی قابل مشاهده بودند و همچنین شدت سلول‌های التهابی در روز هفتم تفاوت آماری معنی‌داری ایجاد کرد از طرفی در روز سوم شدت سلول‌های التهابی در همه گروه‌ها برابر بود (شکل ۱۰-۳).

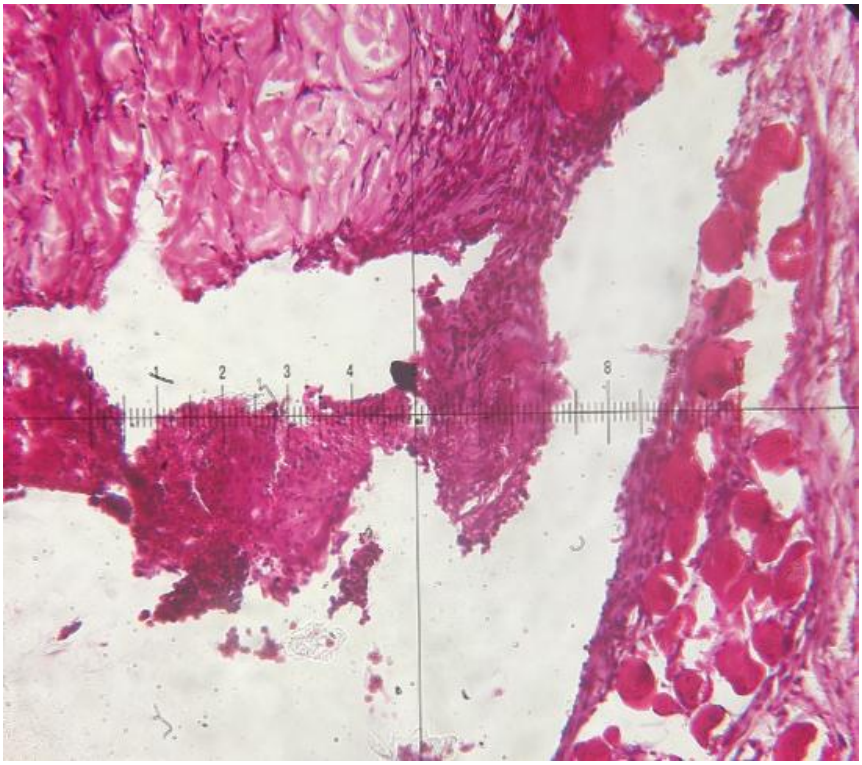
پرخونی در روزهای سوم و هفتم مشاهده می‌شد اما خونریزی فقط در روز سوم و روز هفتم در گروه کنترل منفی دیده می‌شد و همچنین میزان خونریزی در روز هفتم تفاوت آماری معنی‌داری ایجاد کرد (جدول ۳).

مقاطع بافت شناسی در گروه‌های مختلف از لحاظ ضمائم پوست شامل فولیکول‌های مو ، غدد سبابه نیز مورد بررسی قرار گرفتند . فولیکول‌های مو در روز چهاردهم در گروه‌های عصاره یک درصد و چهار درصد مشاهده شد. غدد سباسه نیز در روز چهاردهم فقط در گروه عصاره چهار درصد قابل مشاهده بود اما این سه معیار هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری نشان ندادند (شکل۱۵-۱۱).

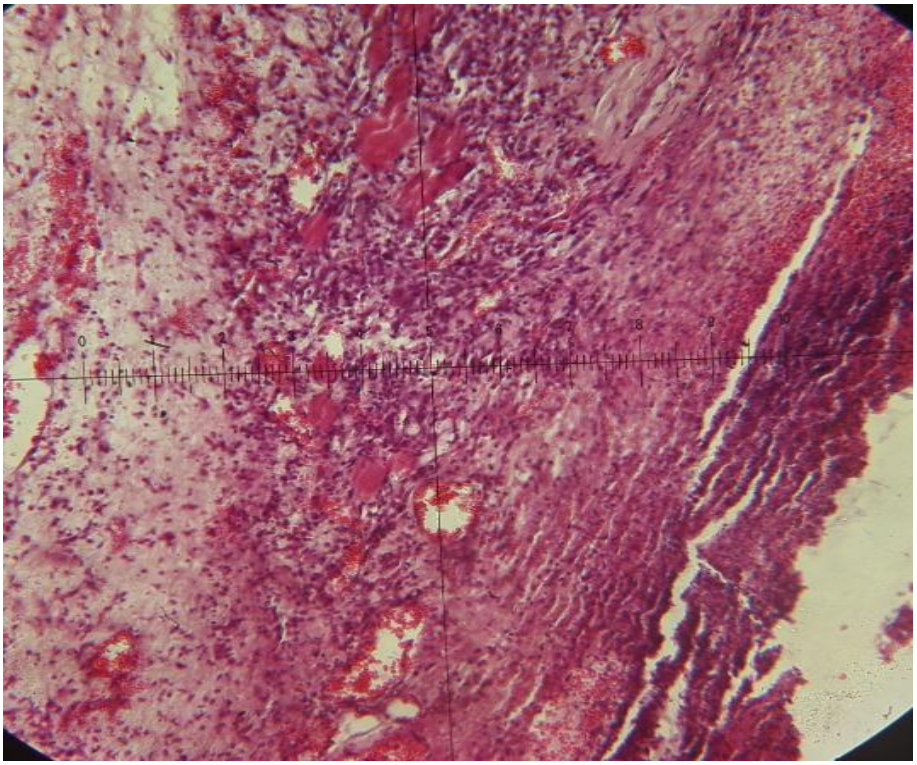
و در آخر میزان تشکیل بافت پوششی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت که در روز هفتم تفاوت آماری معنی‌داری داشت و همچنین گروه عصاره چهار درصد در روز چهاردهم نمره بهتری نسبت به سایر گروه‌ها از لحاظ میزان تشکیل بافت پوششی دریافت کرد (شکل ۱۵-۷).



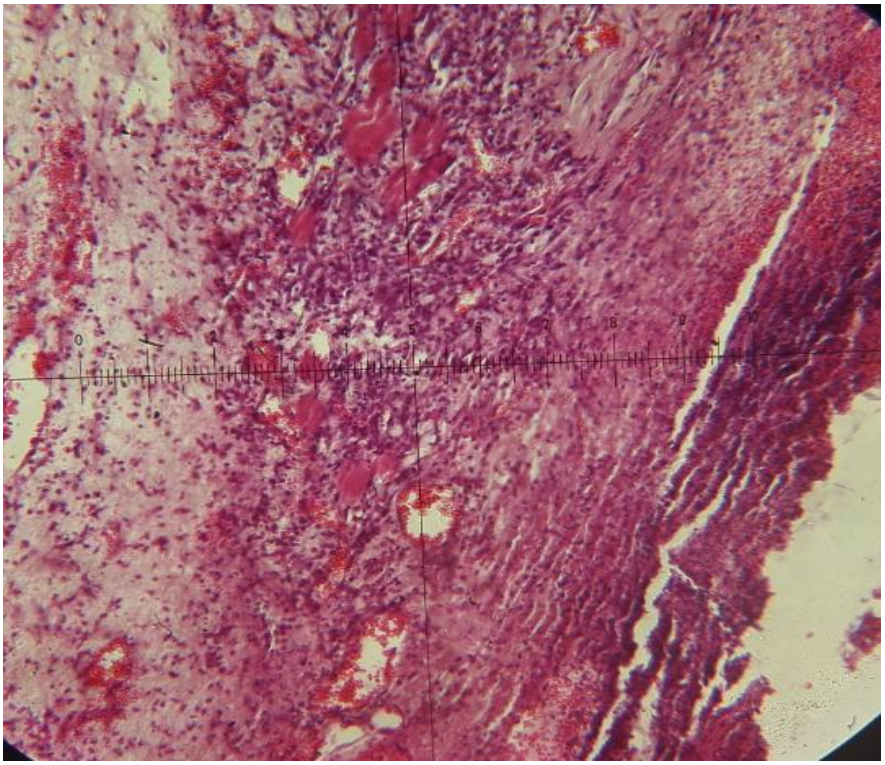
شکل ۳- خونریزی زیاد و داشتن بافت نکروزه مربوط به گروه کنترل منفی در روز ۳ با بزرگ نمایی ۲۰



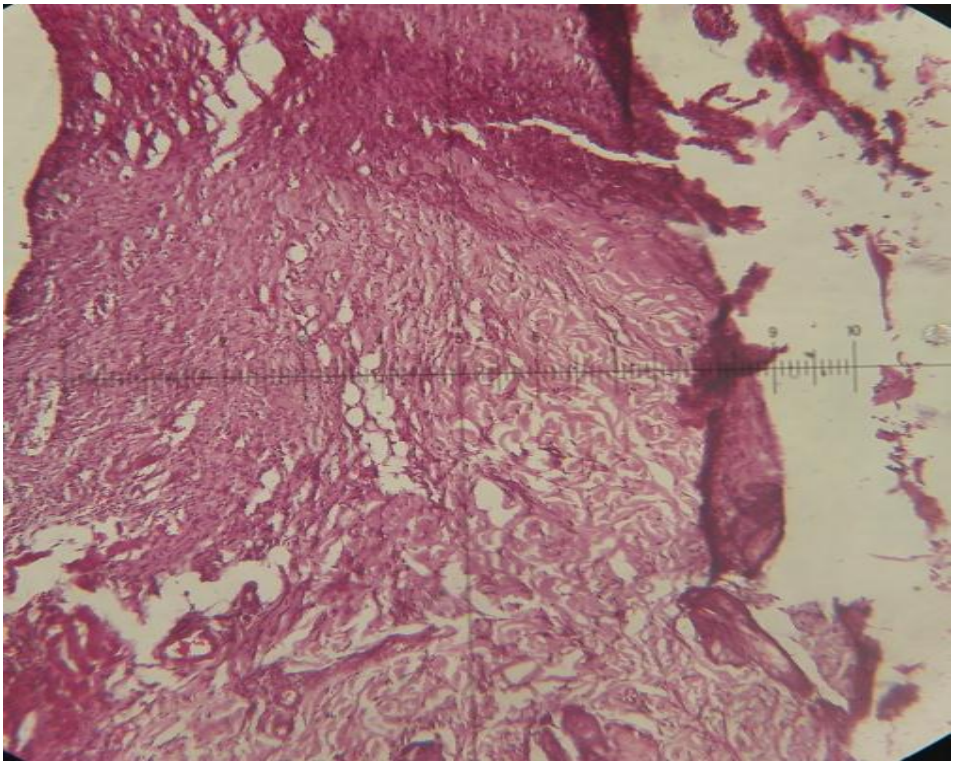
شکل ۴- خونریزی ، بافت نکروزه و ادامه روند تولید بافت همبند در مقطع مربوط به گروه درمان شده با وازلین واوسرین در روز سه با بزرگ نمایی ۲۰



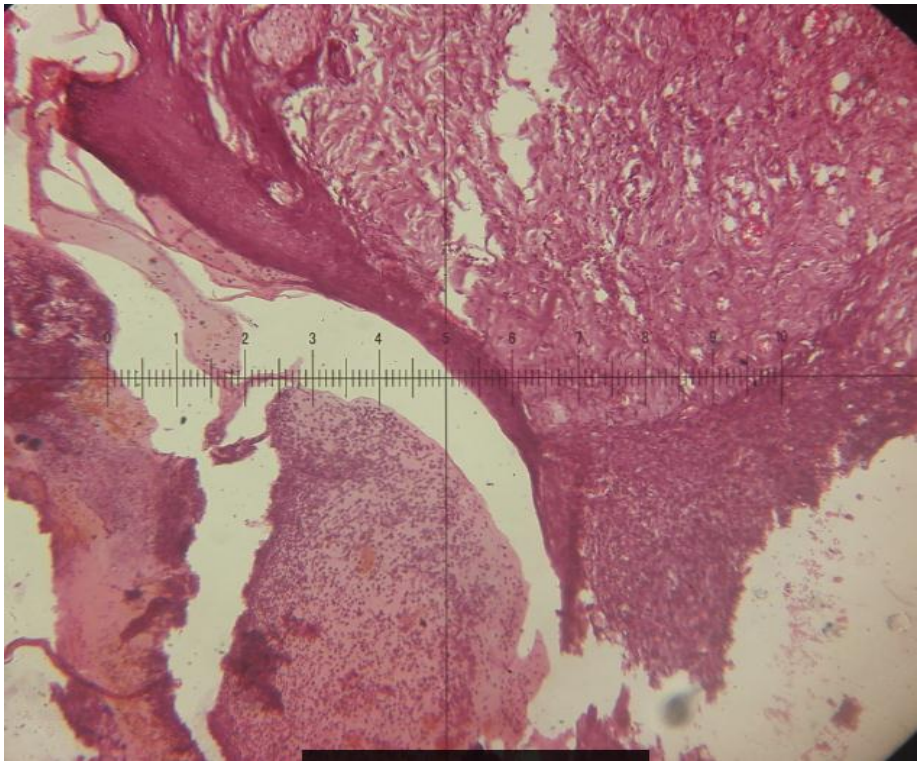
شکل ۵- بافت نکروزه و حضور شدید سلول‌های آماسی در مقطع درمان شده با پماد حاوی عصاره گل راعی و آلوئه‌ورای ۱ درصد در روز سه با بزرگنمایی ۲۰



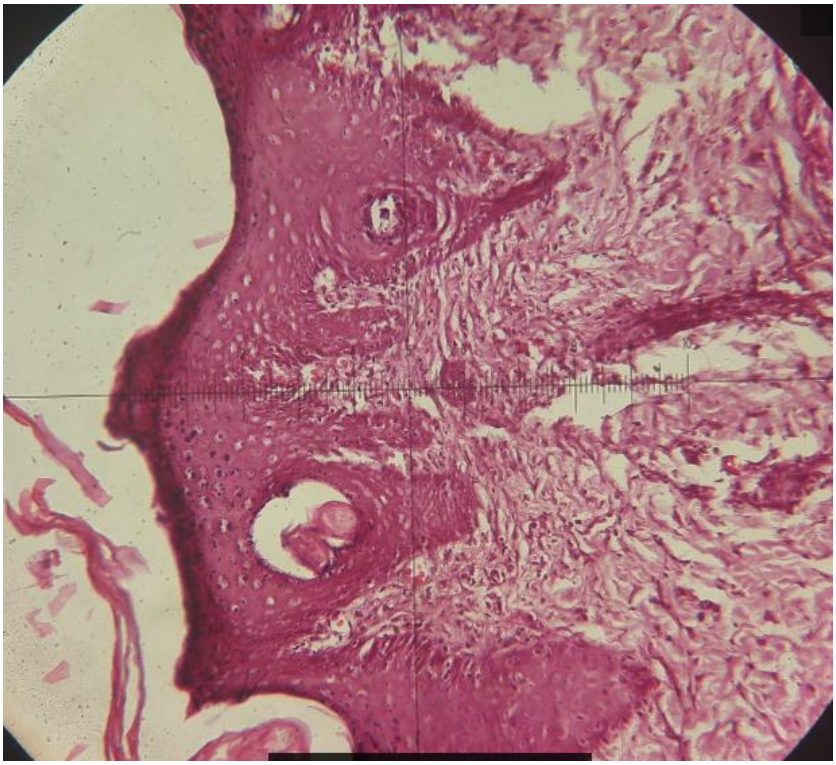
شکل ۶- تشکیل بافت همبند سست و فیبروبلاست در مقطع مربوط به گروه درمان شده با عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی ۴ درصد در روز سه با بزرگ نمایی ۲۰



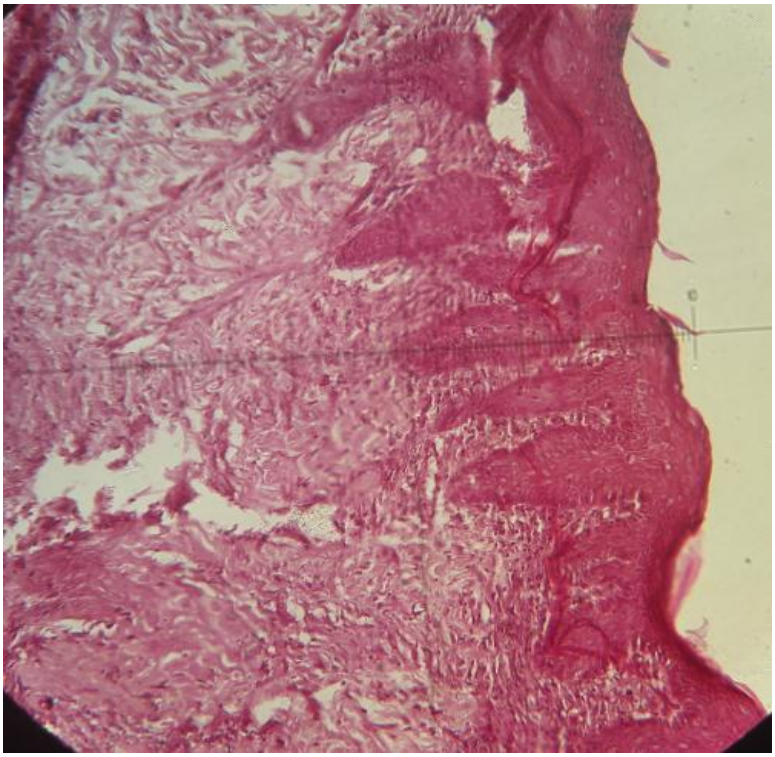
شکل ۷- بافت پوششی در روز هفتم در گروه کنترل منفی تشکیل نشده – عکس با بزرگ نمایی ۱۰



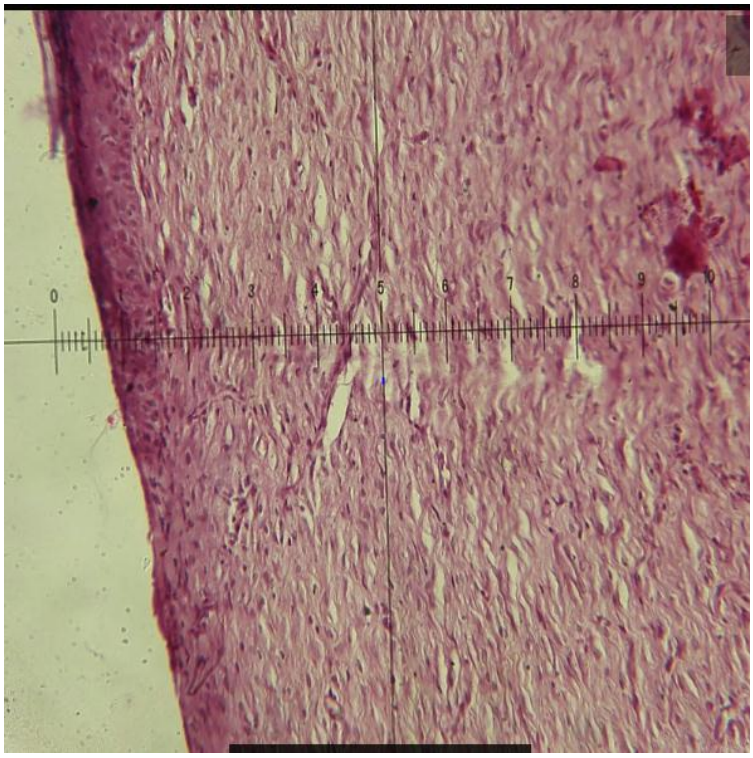
شکل ۸- شروع و ادامه روند تشکیل بافت اپیدرم در مقطع مربوط به گروه درمان شده با وازلین و اوسرین در روز هفت با بزرگ نمایی ۱۰



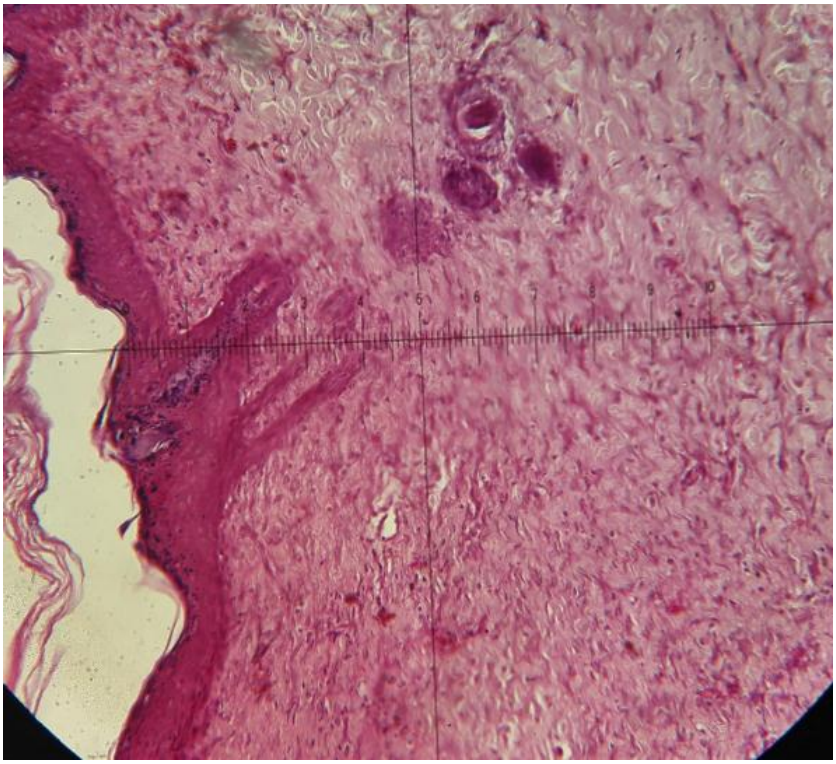
شکل ۹- تشکیل کامل بافت پوششی در گروه درمانی عصاره یک درصد در روز هفت ، عکس با بزرگ نمایی ۲۰



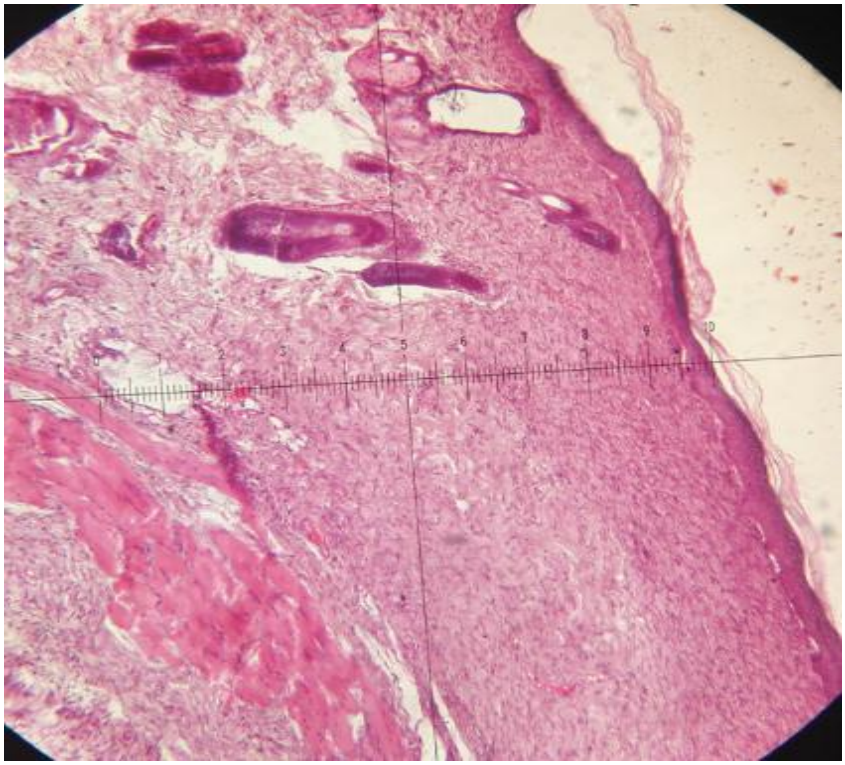
شکل ۱۰- تشکیل کامل بافت پوششی و وجود رشته‌های کلاژن که حالت نامنظم داشته ولی در حال تبدیل به حالت طبیعی است در مقطع مربوط به گروه درمان شده با پماد حاوی عصاره ۴ درصد گل راعی و آلوئه‌ورا در روز هفت با بزرگ نمایی ۲۰



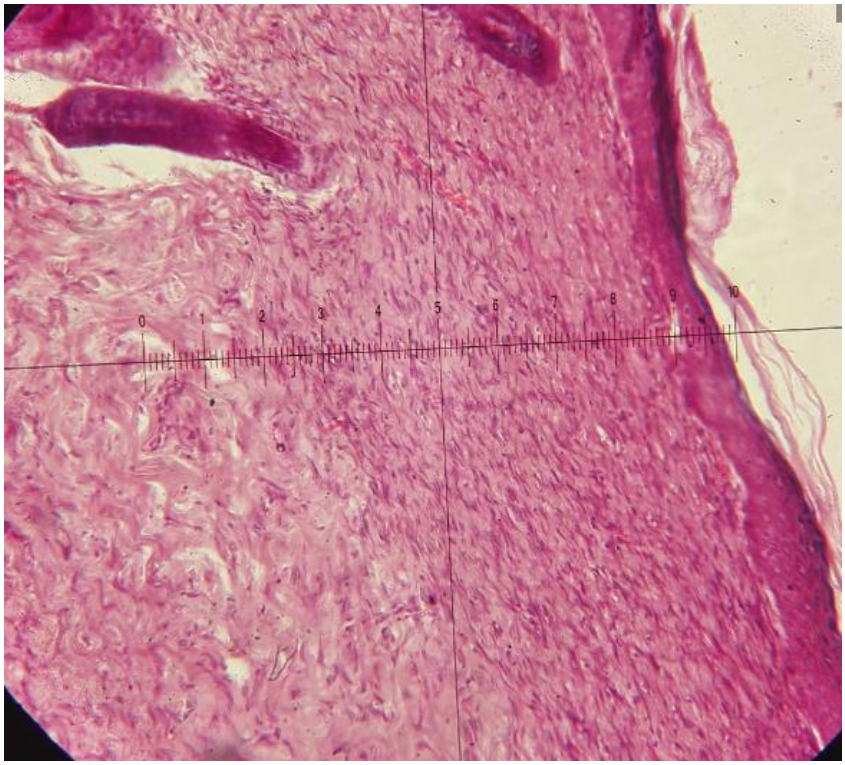
شکل ۱۱- موازی بودن رشته‌ها و اپیدرم ناقص در مقطع مربوط به گروه کنترل منفی در روز چهارده با بزرگ نمایی ۲۰



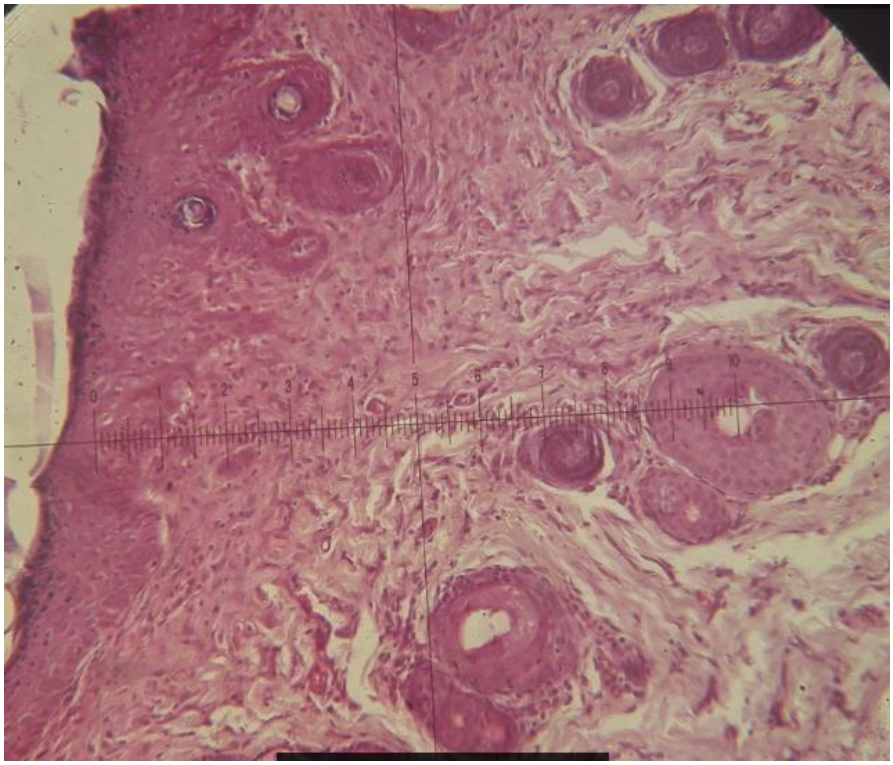
شکل ۱۲- مقایسه بافت سالم (بالای تصویر) و ترمیم شده، تشکیل بافت پوششی بدون ضمائم (پایین تصویر) در مقطع مربوط به گروه کنترل مثبت در روز چهارده با بزرگ نمایی ۲۰



شکل ۱۳- تشکیل عضله در مقطع مربوط به گروه درمان شده با عصاره یک درصد در روز چهارده با بزرگ نمایی ۱۰



شکل ۱۴- بالغ شدن بافت همبند در مقطع مربوط به گروه عصاره یک درصد در روز چهارده با بزرگ نمایی ۲۰



شکل ۱۵- تشکیل فولیکول مو وچربی در مقطع مربوط به گروه درمان شده با پماد حاوی عصاره آلوئه ورا و گل راعی ۴ درصد در روز چهارده با بزرگ نمایی ۲۰

بحث و نتیجه‌گیری

در روز ۳، مساحت زخم از نظر ماکروسکوپیک با تفاوت غیر معنی‌داری در گروه وازلین و اوسرین بیشتر از گروه‌های درمان شده با پماد حاوی عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا ۱ و ۴ درصد و کنترل منفی بود اما هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در مساحت زخم در بین گروه‌های مختلف وجود نداشت. در روز ۱۴، مساحت زخم گروه‌های درمان شده با پماد عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی ۱ و ۴ درصد کمتر از سایر گروه‌ها بود اما بازهم تفاوت آماری معنی‌داری بین این گروه‌ها وجود نداشت این موضوع شاید به علت عدم اثر بخشی درمان با عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا به صورت بالینی و ماکروسکوپی می‌باشد.

در روز سه، نتایج نشان داد درصد التیام زخم در گروه‌های درمان شده با عصاره‌های آلوئه‌ورا و گل راعی بیشتر از گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی بود و همچنین درصد التیام زخم در گروه کنترل منفی ببیشتر از گروه درمان شده با وازلین و اوسرین بود و بین گروه‌های درمان شده با پماد حاوی عصاره آلوئه‌ورا و گل راعی ۱ و ۴ درصد و گروه کنترل مثبت تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت. مساحت زخم در روز صفر بر روی درصد التیام زخم مؤثر است و معمولاً بعد از ایجاد زخم مساحت آن به دلیل کشیده شدن پوست از اطراف کمی افزایش می‌یابد. حال چرا درصد التیام زخم در گروه کنترل مثبت در روز سوم کمتر شده است نیاز به بررسی بیشتر دارد.

مقاطع بافت شناسی نشان داد که میزان رشته‌های کلاژن در گروه عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا یک درصد، چهار درصد و گروه کنترل مثبت با هم برابر بود.

فیبروبلاست در گروه درمان شده با عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا ۴ درصد بیشتر از گروه ۱ درصد، کنترل مثبت و کنترل منفی بود. عضلات صاف نیز در گروه عصاره ۴ درصد بهتر از سه گروه دیگر شکل گرفته بود.

تعداد رگ‌های خونی در روز چهاردهم در گروه‌های درمان شده با عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا ۱ و ۴ درصد و کنترل مثبت برابر بود. از لحاظ شدت سلول‌های التهابی، خونریزی و سلول‌های اصلی که شامل نوتروفیل‌ها و سلول‌های تک‌هسته‌ای بودند در روز ۳ دو گروه پماد ۱ و ۴ درصد امتیاز مشابهی کسب کردند. از لحاظ تشکیل ضمائم پوست در روز چهاردهم در هر دو گروه پماد حاوی عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا ۱ و ۴ درصد فولیکول‌های مو تشکیل شده بود اما غدد سباسه فقط در گروه عصاره ۴ درصد مشاهده شد. و در نهایت میزان تشکیل بافت پوششی نیز در گروه عصاره ۴ درصد گل راعی و آلوئه‌ورا بهتر از سه گروه دیگر بود همگی این نتایج پاتولوژی و میکروسکوپی نشان از اثر بخشی عصاره‌های گل راعی و آلوئه‌ورا در این مطالعه دارد.

در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۴ توسط فرهپور و همکاران انجام شد به بررسی اثر ترکیب ژل آلوئه‌ورا و عصاره هیدرواتانولی شنبلیله بر بهبود روند التیام زخم تمام ضخامت برشی پوست در موش آزمایشگاهی دیابتی پرداختند، در این مطالعه روند ترمیم زخم از نظر میزان ادم، نفوذ سلولی، نوزایش عروقی و میزان کلاژن بین گروه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان انقباض زخم در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) را نشان داد. میزان ادم در هر دو گروه درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، در حالی که نوزایش عروقی، نفوذ فیبروبلاست‌ها وتولید کلاژن افزایش نشان داد، که این افزایش در گروه درمانی با پماد ترکیبی از میزان بالاتری برخوردار بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز موضعی ترکیب ژل آلوئه‌ورا ۵ درصد با عصاره هیدرواتانولی تخم شنبلیله ۵ درصد التیام زخم تمام ضخامت برشی پوست را در موش‌های دیابتی نوع۲ افزایش می‌دهد که نتایج ما نیز اثرات عصاره‌های گل راعی و آلوئه‌ورا را از نظر پاتولوژی تأیید می‌کند. در این مطالعه در روزهای سوم، هفتم و پانزدهم بعد از ایجاد زخم پس از القا بیهوشی عمومی تعدادی از موش‌های هر گروه به روشی بدون درد کشته شده و پارامترهای آسیب شناسی نشان‌دهنده پیشرفت ترمیم زخم بر اساس امتیاز دهی گزارش می‌شد که مشابه مطالعه ما می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط تکزارع و همکاران در سال ۱۳۹۴ انجام شد نیز به بررسی هیستولوژیکی ترمیم‌پذیری زخم باز پوستی پس از مصرف موضعی ژل آلوئه‌ورا پرداختند چون آلوئه‌ورا از گذشته‌های دور در درمان زخم پوستی استفاده شده است. در این تحقیق معیار تعداد فیبروبلاست‌ها و همچنین از نظر ماکروسکوپی مساحت زخم مد نظر بود که نتیجه نشان داد هردو از نظر آماری در گروه تجربی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته و سبب تسریع التیام زخم شد، از لحاظ معیار فیبروبلاست‌ها در مطالعه ما نیز گروه عصاره چهار درصد در روز چهاردهم نمره بهتری نسبت به سه گروه دیگر کسب کرد اما هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در بین امتیازات داده شده مشاهده نشد. در انتهای روزهای ۴، ۷ و ۱۴ موش‌ها با روش استنشاق اتر بیهوش و یک نمونه از بستر زخم برای بررسی هیستولوژیکی و شمارش سلولی در رت تهیه شد که مشابه مطالعه ما می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط ولد بیگی و همکاران در سال ۱۳۹۲ انجام شد اثر ترمیمی عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر زخم آلوده با استافیلوکوکوس اورئوس در موش ویستار مورد بررسی قرار گرفت. عفونت زخم زمانی رخ می‌دهد که شمار باکتری‌ها در زخم از 10^5 در هر گرم بافت فراتر رود. پاسخ میزبان به تهاجم باکتری‌ها با آزادسازی سلول‌های التهابی مثل نوتروفیل‌ها، آنزیم‌های سیتوتوکسیک، رادیکال‌های آزاد اکسیژن

و واسطه‌های التهابی همراه است که این خود باعث آسیب بیشتر به بافت میزبان می‌شود، نتیجه این تحقیق نشان داد که اثر عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس در کاهش اندازه زخم و سرعت بخشیدن به مراحل التیام را می‌توان به فعالیت ضد باکتریایی این ترکیب نسبت داد. نتایج شمارش کلونی کشت‌های میکروبی تهیه شده از سطح زخم نشان داد که افزایش غلظت عصاره باعث افزایش فعالیت ضد باکتریایی شده به طوری که در گروه تحت درمان با پماد ۱۰ درصد در روز هشتم هیچ اثری از باکتری‌ها در سطح زخم یافت نشد. سرنوشت باکتری‌های القا شده در زخم‌ها درمطالعه حاضر مشخص نشد و زخم‌ها روند التیامی خود را بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک ادامه دادند، به نظر می‌رسد باکتری‌های القا شده دارای حدت کافی برای عفونی نمودن زخم نبوده اند.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن مهم می‌باشد که با فعالیت سلول‌های میزبان ایجاد تداخل می‌کند، این تداخل خصوصاً در آلودگی زخم‌ها به این باکتری مشاهده شده است که مانع التیام زخم می‌شود و هنوز مکانیسم آن به روشنی مشخص نیست. پروتئین چسبنده خارج سلولی (extracellular adherence protein) یک ترکیب ضد التهاب و ضد رگ زایی بوده است (۲۹).

در مطالعه‌ای که توسط Yucelو همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد اثر عصاره روغنی گل راعی برای درمان زخم های تحت فشار (زخم بستر) در انسان مورد بررسی قرار گرفت این اولین مطالعه موردی است که درمان زخم‌های تحت فشار با استفاده از عصاره روغنی گل راعی در بخش مراقبت‌های ویژه را گزارش می‌دهد. این عصاره به مدت ۴۰ روز تک دوز برای مراقبت از زخم و درمان مورد استفاده قرار می‌گرفت. وضعیت بهبودی با اندازه‌گیری مساحت زخم در فواصل مشخص و همچنین ارزیابی هیستوپاتولوژیک بخش‌های بافتی بررسی می‌شد. نتایج به‌دست آمده از آزمایشات ماکروسکوپیک و هیستوپاتولوزیک نشان داد که عصاره روغنی گیاه گل راعی برای زخم‌های تحت فشار مؤثر است.

در مطالعه‌ای که توسط Prisacaru و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد به بررسی اثر عصاره روغنی گیاه گل راعی بر روی جراحات پوستی در موش‌های صحرایی نژاد ویستار پرداخته شد. در این تحقیق که به مدت ۲۱ روز درمان به صورت موضعی انجام شد و در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱ موش‌ها با اتر بیهوش و با رعایت اصول اخلاقی کشته شدند و ارزیابی‌های بالینی، ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژیکی صورت گرفت، نتایج نشان داد که پماد حاوی عصاره روغنی گل راعی اثر بسیار خوبی بر روی آسیب‌های پوستی دارد که یافته‌های هیستوپاتولوژی مطالعه حاضر نتایج مطالعه Prisacaru را تأیید می‌کند.

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرگذاری عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا در دو درصد متفاوت (۱ و ۴ درصد) در التیام زخم‌های باز تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که پماد حاوی عصاره روغنی گل راعی و عصاره الکلی آلوئه‌ورا ۴ درصد دارای اثرات التیام بخشی بهتری نسبت به پماد ۱ درصد از نظر هیستوپاتولوژی دارد و بر اساس تشکیل بافت پوششی بهتر و همچنین تشکیل ضمائم پوستی از نظر زیبایی شکل ظاهری بهتری به پوست می‌دهد.

سپاسگزاری

این مقاله پایان‌نامه دانشجویی با شماره ۲۵/۲۲۰۳۸ می‌باشد. نویسندگان از ریاست محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل بابت همکاری بی‌دریغ ایشان سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1- Cheng M, Zhang L, Zhang H, Li X, Wang W, Xia F, *et al.* An Ointment Consisting of the Phage Lysin LysGH15 and Apigenin for Decolonization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Skin Wounds. Viruses. 2018; 10(5): 244.

2- Vincze S, Stamm I, Kopp PA, Hermes J, Adlhoch C, Semmler T, *et al.* Alarming proportions of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010-2012. PLoS One. 2014;9(1): e85656.

3- Price M. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an ongoing challenge for WOC nursing. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2010;37(6):633-8.

4- Grigaite R, Pavilonis A, Rimdeika R, Antusevas A. Resistance of Staphylococcus aureus isolated from burn wounds to antibiotics. Medicina (Kaunas). 2006;42(5):377-83.

5- Alreshidi MM, Dunstan RH, Gottfries J, Macdonald MM, Crompton MJ, Ang C, *et al.* Changes in the Cytoplasmic Composition of Amino Acids and Proteins Observed in Staphylococcus aureus during Growth under Variable Growth Conditions Representative of the Human Wound Site. PLoS One. 2016; 11(7):e0159662.

6- Bagdonas R, Tamelis A, Rimdeika R. Staphylococcus aureus infection in the surgery of burns. Medicina (Kaunas). 2003;39(11):1078-81.

7- Sewall GK, Roberston KM, Conner NP, Heisey DM, Hartig GK. Effect of topical mitomicin on skin wound contraction. Arch. Facia. l Plast. Surg. 2003; 5(1): 59- 62.

8- Nowrouzian I, Azarabad H, Nasirian A, Ghamsari SM. Wound healing in large Animals histopathology and surgical management. Tehran: Tehran University press; 2009, P: 74- 87.

9- Isler H, Bauen A, Hubler M, Oberholzer M. Morphometric assessment of wound healing in rat treated with a pritein-free hemodylisis. J. Burns. 1991; 1(2): 99- 103

10- Moerman, DE. An analysis of the food plants and drug plants of native North. American Journal of Ethnopharmacology. 1996; 52:1-2.

11- Allah Tavakoli M, Khaksari Haddad M, Assar SH. Comparison of topical application of Mummify and phenytoin cream on skin wound healing in rat. J Babol univ Med Sci. 2003;5(2):7-13[In Persian].

12- Bal AM, Gould IM. Antibiotic resistance in Staphylococcus aurous and its relevance in therapy. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2005; 5:761-9.

13- Samy RP, Ignacimuthu S, Sen A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. Journal of Ethnopharmacology. 1998; 62: 173–182.

14- Dupont S, Caffin N, Bhandari B, Dykes GA. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. Food Control. 2006; 17: 929-932.

15- Lin J, Opoku AR, Geheeb-Keller M, Hutchings AD, Terblanche SE, Jager AK, Van Staden J. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 68: 267–274.

16- Gupta, VK, Malhotra S. Pharmacological attribute of Aloe vera: revalidation through experimental and clinical studies. AYU. 2012; 33(2); 193–196.

17- Lee KH, Kim JH, Lim DS, Kim CH. Anti-leukaemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate isolated from Aloe vera Linne. J. Pharm. Pharmacol. 2000; 52(5); 593-8.

18- Beger, RD. Review of applications of metabolomics in cancer. Metabolites. 2013; 3: 552-574.

19- Hudson, JB, Lee MK, Rasoanaivo P. Antiviral activity in plants endemic to Madagascar. Pharmaceutical Biology. 2000; 38(1):36-39.

20- Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. J. Ethnopharmacol. 1999: 68(1-3): 3-37.

21- Samsam-Shariat H, Moatar F. Natural herbs (Materia Medica). Esfahan: Mashal Pub; 1986.

22- Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. in vitro. J Agric Food Chem. 2004;52(16):5032-9.

23- Hammer KD, Hillwig ML, Solco AK, Dixon PM, Delate K, Murphy PA, *et al.* Inhibition of prostaglandin E (2) production by anti-inflammatory hypericum perforatum extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. J Agric Food Chem. 2007;55(18):7323-31.

24- Circus W, Wharf C. European medicines agency, Annual report: medicinal products (HMPC). 2009; United Kingdom: London E14 4HB 129:2335-2337.

25- Ghamsari SM, Aghchelou MR, Dehghan MM, Ashrafihelan J, Sanchol A. Cultured equine autologous Keratinocytes on collagen membrane for limb wound healing. IJVS. 2014; 9(2): 17-26.

26- Farahpour M, Aghaei M. Assessment of the effect of co- administration of Aloe vera gel and Fenugreek seed hydroethanolic extract on the improvement of full-thickness excisional skin wound healing in diabetic mice. Journal of Veterinary Clinical Pathology. 2016; 36: 285-296[In Persian].

27- Takzare N, Hassanzadeh G, Rouini M, Keshtkar A, Manai A, Hajieh Akhoondi A. Histological evaluation of open skin wound repair after topical application of Aloe vera gel. TUMJ. 2015;73(9):660-667[In Persian].

28- Valadbeigi T, Rashki S. Wound Healing Activity of Methanolic Extract of Protoparmeliopsis muralis on Wounds Infected with Staphylococcus aureus in Wistar Rat. Biological Journal of Microorganism.2014; 3(10):65-74[In Persian].

29- Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, *et al.* The extracellular adherence protein (Eap) of Staphylococcus aureus inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. Blood. 2006; 107(7):2720-7.

30- Yücel A, Kan Y, Yesilada E, Akın O. Effect of St.John's wort (Hypericum perforatum) oily extract for the care and treatment of pressure sores; a case report. J Ethnopharmacol. 2017; 196:236-241. doi: 10.1016/j.jep.2016.12.030.

31- Prisăcaru AI, Andritoiu CV, Andriescu C, Havarneanu EC, Popa M, Motoc AGM, Sava A. Evaluation of the wound-healing effect of a novel Hypericum perforatum ointment in skin injury. Rom J Morphol Embryol. 2013; 54(4):1053-9.

Effects of Hypericum perforatum and Aloe vera extracts in rat open wounds inoculated with Staphylococcus aureus: clinical and histopathology aspects

Shadi Sanadgol[1], Mohammad Reza Aghchelou[* 2], Darush Saadati [3], Abbas Jamshidian[4]

1 - Gradated student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2 - Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
3 - Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
4 - Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

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

Summary

Staphylococcus aureus is an important cause of wound infection and found on the skin of normal human and animal population. Hypericum perforatum and Aloe vera have antioxidant, anti-inflammatery and antibacterial effects, so they can affect on wounds positively together. For this purpose, 40 rats were selected and randomly divided into 4 groups: negative and positive control groups and two groups that treated with Hypericum perforatum and Aloe vera ointments that containing 1 and 4 percent extracts. The wounds were pictured on 0, 3,7 and 14 days after wound creation and the wound healing rates was calculated clinically. Histopathologic stadies were performed on samples collecteal from the wounds in 3,7 and 14 days after wound creation. Finally, the data were analyzed by Anova, Kruskal wallis test. The percentage of wound healing in 3th day in two groups treated with ointment containing extract was higher than other groups. on the 14th day the clinically epithelial tissue of the two groups treated with plant extracts was better than the other two groups. Appendices of the skin like hair follicles are formed in two groups contains extracts, but in the extract of %4 was observed more better than the other three groups becase the sebaceous glands were just observed in this group and quality of epithelial tissue was more better. The results show that ointment containing %4 Aloe vera and Hypericum perforatum extracts have better healing effects and skin beauty results than %1 ointment on wounds that inoculated with Staphylococcus aureus.

Keywords: *words: Hypericum perforatum, Aloe vera, histopatology, wound healing, Staphylococcus aureus.*

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی لفاف خوراکی جدید صمغ فارسی به همراه عصاره زعفران و نیسین برروی فیله مرغ تحت شرایط سرد

الهه سراوانی‌پاک[١]، محمدعلی نجفی*[٢]، محمود توکلی[٣]، ناصر سلطانی تهرانی[٤]

١- دانش‌آموخته مقطع کارشناسی ارشد زیست فناوری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٢- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٣- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٤- کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ١٠ تیر ١٤٠٠، بازنگری: ٢٥ مرداد ١٤٠٠، پذیرش نهایی: ٥ شهریور ١٤٠٠

چکیده

امروزه استفاده از لفاف‌های زیست تخریب پذیر به دلیل سازگاری با محیط زیست و قابلیت نگهداری ترکیبات فعال زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این پژوهش برای نخستین بار لفاف زیست تخریب‌پذیر ضد میکروبی بر پایه صمغ فارسی به همراه عصاره متانولی زعفران به تنهایی و یا در ترکیب با نیسین تهیه گردید. در ابتدا، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و غلظت کشندگی (MBC) عصاره زعفران و نیسین به روش میکرودایلوشن و برای لفاف‌ها به روش انتشار دیسک در برابر باکتری‌های بیماری‌زای لیستریا مونوسیتوژنز، پسودوموناس آئروژنز، باسیلوس سرئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم تعیین شد. سپس عصاره زعفران در مقادیر (mg/ml ٣١/٢٥) MIC و (٦٢/٥ mg/ml) MBC و نیسین با مقدار (٠/٢٥٦ mg/ml) MIC به فرمولاسیون لفاف‌ها اضافه گردید. تأثیر لفاف‌ها بر کنترل جمعیت میکروب زنده کل، انتروباکتریاسه، باکتری‌های اسیدلاکتیک، پسودوموناس، کپک و مخمر گوشت سینه مرغ در طی ١٢ روز نگهداری در دمای ١±٤ °C، هر سه روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد نیسین در مقایسه با عصاره زعفران اثر مهارکنندگی بهتری بر کنترل جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا دارد. همچنین افزودن نیسین به فیلم صمغ فارسی حاوی عصاره زعفران، اثر هم‌افزایی (٢٥ درصد) بر مهار رشد میکروب‌ها در گوشت مرغ نشان داد. بر اساس حد مجاز تعداد میکروب کل (کمتر از log CFU/g ٧)، توانایی مهار رشد باکتری‌های هدف و مدت زمان نگهداری (تا ١٢روز)، لفاف صمغ فارسی+ نیسین + زعفران (MBC) مناسب به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *گوشت مرغ، رشد میکروبی، عصاره متانولی*

* ست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: najafi413@yhoo.com

مقدمه

علیرغم پیشرفت‌های چشمگیر علمی در زمینه ایمنی غذایی، هنوز بحث انتقال بیماری‌های میکروبی ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده بسیار رایج است، به‌طوری که هر ساله ۴۲۰۰۰۰ مرگ و میر گزارش می‌گردد (۲۰). یک روش جدید در مهار رشد میکروب‌های بیماری‌زا و افزایش ماندگاری مواد غذایی استفاده از بسته‌بندی‌های ضد میکروبی است. فیلم‌های خوراکی زیست تخریب‌پذیر به دلیل ماهیت غیر سمی و سازگاری با محیط زیست در مقایسه با پلاستیک‌های مصنوعی (سنتزی) مورد توجه هستند (۹). این فیلم‌ها می‌توانند به‌عنوان حامل مواد مغذی، مواد ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان، طعم دهنده‌ها و رنگ دهنده‌ها عمل کنند و از این لحاظ باعث حفظ و بهبود خواص کیفی مواد غذایی گردند (۱۵). در سال‌های اخیر، فیلم‌های خوراکی معمولاً از پلی‌ساکاریدها، لیپیدها، پروتئین‌ها یا مشتقات آنها ساخته شده‌اند. در این بین ترکیبات پلی‌ساکاریدی با دارا بودن استحکام، شفافیت و پایداری مطلوب، همچنین عدم وجود رنگ، بو و طعم از اهمیت بالایی برخوردارند (۲۷). با این حال، منابع مواد اولیه موجود محدودیت‌هایی در خصوص فراوانی، ویژگی‌های عملکردی و هزینه‌های مالی دارند. بنابراین، منابع جدید به‌طور مداوم در حال بررسی هستند تا نیاز لفاف‌های خوراکی را تأمین کنند (۳۰).

صمغ فارسی شیره درخت بادام وحشی (Amygdalus scoparia Spach) است که در آسیای میانه و جنگل‌های مختلف ایران به فراوانی یافت می‌شود. در مقیاس تجاری این صمغ در رنگ‌های سفید، زرد، کهربا و قرمز با رایحه شیرین و قیمت ارزان به راحتی قابل تهیه است (۱). صمغ فارسی در زمینه‌های پزشکی، تغذیه‌ای و صنعتی کاربردهای متنوعی دارد. حدود ۷۰ درصد وزنی آن را ترکیب نامحلول و الباقی را ترکیبات محلول تشکیل می‌دهد. این صمغ یک پلی‌ساکارید آنیونی با ساختار ß-D-galp-(1→3) با توزیع تصادفی واحدهای ß-D-galactopyranosyl-(1→6) و α-L-arabinofuranosyl-(1→3) به‌عنوان زنجیره‌های جانبی می‌باشد (۲۸). در سال‌های اخیر، چندین مطالعه در مورد کاربرد صمغ فارسی در محصولات غذایی مختلف، از جمله تولید ماست پروبیوتیک (۲)، نوشیدنی مخلوط شیر و آب پرتقال (۱۳)، پوشش سطح پرتقال (۱۹) و موز (۳۱) تهیه نوشیدنی کفیر (۶) و همراه با کیتوزان و اسانس سیر در نگهداری ماهی کپور (۲۴) مورد بررسی قرار گرفته است. Saravani-Pak و همکاران در سال ۲۰۲۰، برای نخستین بار از فاز محلول صمغ فارسی لفاف خوراکی شفاف، بی‌رنگ و با خواص مکانیکی، نفوذپذیری اکسیژن و بخار آب مطلوب تهیه نمودند.

اخیراً استفاده از ادویه‌ها به‌صورت پودر، عصاره آبی و یا اسانس‌های گیاهی در فیلم‌های بسته‌بندی مواد غذایی به‌عنوان یک ماده ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته است (۱۲). اما مشکل اساسی کاربرد این ترکیبات ایجاد عطر و طعم ناخوشایند در برخی محصولات غذایی است (۲۳). زعفران تجاری در واقع کلاله‌های خشک شده گل گیاه زعفران (Crocus sativus L.) است که بیشتر از آن به عنوان ادویه، ماده رنگی خوراکی و معطر استفاده می‌شود. زعفران همچنین در داروهای بومی جهت درمان بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت، افسردگی، پارکینسون، تصلب شرائین کاربرد دارد. در زعفران حدود ۱۵۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شده که عمدتاً شامل کاروتنوئیدها، گلیکوزیدها، مونوترپن‌ها، آلدهیدها، پیکروکروسین، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها (ریبوفلاوین و تیامین)، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، نشاسته، مواد معدنی و صمغ‌هاست (۵). گزارش شده عصاره‌های متانولی و اتری کلاله

زعفران دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی در برابر برخی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زاست و از این رو می‌توان از آن در فرمولاسیون‌های دارویی و غذایی استفاده کرد (۵، ۱۷). خاصیت ضد میکروبی عصاره زعفران برحسب روش استخراج، گونه و محل کشت با یکدیگر متفاوت می‌باشد (۲۱).

نیسین ازجمله ترکیبات نگهدارنده مواد غذایی است که توسط برخی از باکتری‌های گرم مثبت، مانند گونه‌های لاکتوکوکوس و استرپتوکوکوس تولید می‌شود (۱۴). سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) و اتحادیه اروپا نیسین را به‌عنوان ترکیب ضد میکروب طبیعی بی‌خطر با قابلیت استفاده در غذاهایی چون لبنیات، سبزیجات و گوشت تأئید نموده‌اند (۱۸). گزارش شده نیسین بر مهار رشد باکتری‌های اشریشیاکلی، لیستریا منوسیتوژنز، سالمونلا تیفی‌موریم، استافیلوکوکوس اورئوس (۲۵) و نیز لیستریا اینوکوا (۱۸) مؤثر است. نیسین با ایجاد تغییرات ساختمانی در غشاء سلولی نفوذپذیری آن را تغییر داده و با مهار فرآیند جوانه‌زنی اسپورها، در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی عمل می‌کند. فعالیت ضد میکروبی نیسین تحت تأثیر عوامل زیادی مانند دما، pH، ترکیبات محیط کشت و گونه‌های تولید کننده قرار دارد (۱۴).

هدف از این مطالعه تهیه فیلم زیست تخریب‌پذیر ضد میکروبی بر پایه صمغ فارسی و در ترکیب با زعفران و نیسین است. در این آزمایش پس از تهیه فیلم‌های ضد میکروبی اثرات ضد میکروبی آن در محیط کشت و گوشت فیله مرغ در شرایط سرد (۴±۱ °C) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره متانولی زعفران: مقدار ۶۰ گرم کلاله زعفران خشک و ارگانیک از پژوهشگاه زعفران، دانشگاه تربت حیدریه (تربت حیدریه، ایران) در کیسه‌های پلاستیکی استریل (۵ گرمی) تهیه و در آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی تحت دمای ۱ ± ۴ °C تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند. عصاره متانولی کلاله مطابق روش مظفری و همکاران (۲۰۱۶)، با برخی اصلاحات انجام شد. بدین منظور پودر کلاله‌های زعفران به نسبت (W/V) ۱:۲ با اتانول ۸۰ درصد مخلوط و برای مدت ۲۰ دقیقه در داخل حمام فراصوت (آستراسون، آلمان) با فرکانس ۳۳ KZ در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به کمک همزن مغناطیسی (فراشرق، ایران) با سرعت RPM ۱۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط مخلوط گردید. در مرحله بعد به کمک دستگاه سانتریفوژ با شتاب g ۱۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه رسوب‌گذاری و فاز بالایی توسط کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر گردید. ml ۴۰۰ از محلول به‌دست آمده را به دستگاه اواپراتور چرخان (تحت دمای °C ۴۶-۴۷، سرعت RPM ۱۵۰) منتقل و تا حجم ml ۵۰ تغلیظ و سپس توسط خشک‌کن انجمادی (آرمفیلد، انگلستان) خشک و تا زمان استفاده در دمای °C ۲۰- نگهداری شد.

تهیه و تکثیر سویه‌های باکتریایی: اثر ضد میکروبی عصاره و لفاف صمغ فارسی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا شامل سه گونه گرم مثبت: لیستریا منوسیتوژنز NCTC 11994، باسیلوس سرئوس ATCC 9634 و استافیلوکوکوس اورئوس Bristol A9596 و سه گونه گرم منفی: پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853، اشریشیاکلی ATCC 25922 و سالمونلا تیفی‌موریوم ATCC 14028 مورد ارزیابی قرار گرفت. سویه‌های هدف از آزمایشگاه گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران در فرم منجمد (°C ۸۰-) تهیه شدند. جهت تکثیر سویه باسیلوس سرئوس به محیط کشت مایع تریپتوسوی

براث (TSB*: سیگما آلدریچ، آمریکا) تلقیح و در دمای ۳۰ °C برای مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سایر سویه‌ها در شرایط مشابه تلقیح و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور (پارس‌آزما، ایران) قرار داده شدند (۳۳). در مرحله بعد سویه‌های مورد نظر به محیط کشت تریپتوسوی آگار (TSA□: سیگما آلدریچ، آمریکا) منتقل و پس از گرمخانه‌گذاری در شرایط مشابه، کلنی‌های خالص جداسازی و جهت تکثیر مجدداً در شرایط ذکر شده، به محیط کشت TSA منتقل گردیدند. پس از گرمخانه‌گذاری مخلوط میکروبی به‌دست آمده در دمای ۴ °C تا زمان استفاده (حداکثر ۲۴ ساعت) نگهداری شدند. سوسپانسیون خالص میکروبی حاوی (10^8 CFU/ml) با استفاده از محلول نمکی استریل و محلول نیم مک فارلند استاندارد تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداکثر غلظت کشندگی (MBC) زعفران و نیسین: مقادیر MIC و MBC عصاره زعفران و نیسین (سیگما-آلدریچ، دورست، انگلستان) به روش میکرودایلوشن و با استفاده از محیط کشت مایع مولر-هینتون و پلیت ۹۶ خانه تعیین گردید (۲۹). بدین منظور محلول آبی نیسین در غلظت (µg/ml) ۱۰۲۳/۰ - ۴/۸ و عصاره زعفران در غلظت (mg/ml) ۱۰۰۰/۰ - ۷/۸ از انحلال عصاره خشک‌شده زعفران در محلول دی‌متیل سولفوکسید (۱۰ درصد) تهیه و پس از فیلتراسیون به کمک فیلتر (۰/۲ µm) آماده شد. به هر چاهک مقدار ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی 10^8 CFU/ml سویه هدف منتقل گردید. سپس به اولین چاهک هر ردیف مقدار ۱۰۰ ml محلول ضد میکروبی اضافه و تا خانه نهم رقیق‌سازی شد. محیط کشت حاوی میکروب بدون ترکیب ضد عفونی کننده به‌عنوان کنترل مثبت و محیط کشت بدون میکروب به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها در شرایط ذکر شده گرمخانه‌گذاری و به لحاظ کدورت سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (سسیل، انگلستان) در طول موج ۶۲۰ نانومتر بررسی گردیدند. تائید نتایج به کمک کشت باکتریایی در محیط کشت مولر هیلتون آگار انجام گرفت.

آماده سازی لفاف‌ها: صمغ فارسی از بازار محلی شهر فسا واقع در استان فارس تهیه گردید. لفاف‌ها با استفاده از تکنیک ریخته‌گری‡ مطابق روش سراوانی پاک و همکاران (۲۰۲۰) ساخته شدند. با هدف تقویت اثر ضد میکروبی زعفران نیسین در غلظت MIC به محلول سازنده لفاف اضافه گردید. لفاف‌ها شامل: صمغ فارسی (بخش محلول فیلم صمغ فارسی)، صمغ فارسی + نیسین ، صمغ فارسی + عصاره زعفران (MIC)، صمغ فارسی + عصاره زعفران (MBC)، صمغ فارسی + نیسین + عصاره زعفران (MIC) و صمغ فارسی + نیسین + عصاره زعفران (MBC) بود. جهت تهیه محلول سازنده لفاف مقدار ۳ g پودر خشک شده فاز محلول آبی صمغ فارسی به ۱۰۰ ml آب مقطر استریل اضافه و برای مدت ۱ ساعت در دمای ۴۰ °C هم‌زده شد. سپس گلیسرول به نسبت ۳۰ درصد وزنی پودر صمغ فارسی، به عنوان نرم کننده به مخلوط اضافه و pH توسط اسید کلریدریک (۰/۱ نرمال) در محدوده ۵/۵۰ ± ۰/۰۵ تنظیم گردید. همگن‌سازی مخلوط سازنده لفاف توسط دستگاه التراتراکس (D12-آلمان) با سرعت ۱۳۵۰۰ RPM به مدت ۴ دقیقه انجام شد. فرآیند حذف میکروب‌های ناخواسته با گرم کردن مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه تا دمای °C

---

* Tryptic Soy Broth

□ Tryptic Soy Agar

‡ Casting

۸۵ و سپس کاهش تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. به‌منظور حذف هوای موجود در مخلوط برای مدت ۳۰ دقیقه تحت فشار ۱۰mbar در دمای اتاق قرار داده شد و متعاقباً، ۱۵ ml از هر محلول به صورت آسپتیک به ظروف پتری‌دیش پلاستیکی استریل (قطر ۹ cm) منتقل گردید. پلیت‌ها به کمک دستگاه آون (پارس‌آزما، ایران) در دمای ۳۵ °C، رطوبت نسبی ۵۲ درصد، برای مدت زمان ۷۲ ساعت خشک شدند. جهت تهیه لفاف‌های ضد میکروبی، ترکیبات مورد نظر در ۵ ml آب مقطر استریل حل و به فاز آبی افزوده شد.

فعالیت ضد میکروبی لفاف‌ها: فعالیت ضد باکتریایی لفاف‌ها در برابر سویه‌های هدف با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مطابق روش ذکر شده توسط اسدی در سال ۲۰۱۶ انجام شد. بدین منظور مقدار ۰/۱ ml از سویه‌های هدف (حاوی تقریباً 10^{4}-10^{5} CFU/ml) به صورت سطحی در پلیت‌های مولر هینتون آگار تلقیح و سپس قطعات فیلم (دایره با قطر ۱۲ mm) در شرایط آسپتیک به سطح پلیت منتقل و تحت شرایط ذکر شده برای هر باکتری گرمخانه‌گذاری گردیدند. قطر کل منطقه فاقد میکروب اندازه‌گیری و از قطر لفاف کسر و به‌عنوان ناحیه مهار رشد گزارش گردید.

بکارگیری لفاف‌ها: اثر ضد باکتریایی لفاف‌ها بر روی گوشت تازه سینه مرغ بدون پوست و استخوان (۲۵۰-۲۸۰ g) بررسی گردید. گوشت‌ها از بازار محلی تهیه و حداکثر ۱ ساعت پس از کشتار و در شرایط سرد به آزمایشگاه دانشگاه زابل منتقل گردیدند. در آزمایشگاه گوشت سینه مرغ به ۱۴۰ قطعه (ابعاد تقریبی ۳ × ۵ × ۴ cm) تبدیل و در ۷ گروه دسته‌بندی شدند. تمامی قطعات تا زمان استفاده در درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و حداکثر برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. فیله بدون هرگونه تیمار بسته‌بندی به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. تمام نمونه‌ها به‌صورت مجزا درون ظروف یک‌بار مصرف استریل منتقل و سپس در شرایط سرد (۴ ± ۱ °C) نگهداری شدند.

آزمون‌های میکروبی گوشت مرغ: نمونه‌های فیله در طی مدت نگهداری به لحاظ جمعیت میکروبی زنده کل (TVC)، انتروباکتریاسه، باکتری‌های اسیدلاکتیک، پسودوموناس، کپک و مخمر مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور مقدار ۱۰g نمونه گوشت مرغ به همراه ۱۰۰ ml آب پپتونه استریل (۰/۱ درصد) تحت شرایط آسپتیک به کیسه هضم مخصوص دستگاه استومیکر (اینترساینس، فرانسه) منتقل و پس از همگن‌سازی، رقت‌های سریالی تهیه گردید. برای TVC از روش کشت سطحی و محیط کشت پلیت کانت آگار استفاده شد. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۳۰ °C برای مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. شمارش باکتری‌های جنس پسودوموناس با استفاده از محیط کشت پسودوموناس آگار (با یک مکمل انتخابی CFC) و شرایط گرمخانه‌گذاری ۲۵ °C برای ۴۸ ساعت صورت پذیرفت. تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه با تلقیح سطحی پلیت حاوی محیط کشت ویولت ردبایل گلوکوز آگار و گرمخانه‌گذاری (۲۴ ساعت، ۳۷ °C) تعیین شد. تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک پس از تلقیح سطحی محیط کشت MRS* و به دنبال آن گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C به مدت ۳ روز تعیین شد. برای شمارش سلول‌های مخمر و کپک، محیط کشت انتخابی رز بنگال کلرامفنیکل آگار تلقیح سطحی شده و به دنبال آن به مدت ۵-۳ روز در دمای ۲۵ °C گرمخانه‌گذاری گردیدند. نتایج شمارش میکروبی در مقیاس log10 (CFU/g) بیان شد (۲۶). آزمون میکروبی فیله‌ها در بازه‌های زمانی ۰، ۳، ۶، ۹ و ۱۲

---

* de Man Rogosa Sharpe

روز نگهداری در شرایط سرد صورت پذیرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج به‌دست آمده با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و تحلیل گردید. تعیین اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده ها و رتبه بندی آنها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با سه تکرار انجام شد.

بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی: نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره زعفران و نیسین در برابر باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، پسودوموناس آئروژنز، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم در جدول ۱ آورده شده است. مقادیر MIC عصاره زعفران برای تمامی باکتری‌های بیماری‌زا (mg/ml) ۳۱/۲۵ و MBCدر محدوده (mg/ml) ۶۲/۵ - ۳۱/۲۵ بود. در بین تمامی سویه‌ها استافیلوکوکوس اورئوس با MBC برابر (mg/ml) ۳۱/۲۵ بالاترین سطح حساسیت مرگ سلولی را نشان داد. حداقل غلظت کشندگی عصاره زعفران در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و پسودوموناس آئروژنوزا با نتایج گزارش شده توسط مظفری و همکاران (۲۰۱۶) متفاوت است که احتمالاً ناشی از تفاوت در سویه‌های باکتریایی، نوع و شیوه‌های قبل از برداشت زعفران بوده است (۳۲). جدول ۱ مقادیر MIC و MBC نیسین در برابر سویه‌های هدف را نشان می‌دهد. MIC نیسین در محدوده (mg/ml) ۰/۲۵۶ – ۰/۰۳۲ قرار داشت که نشان‌دهنده عملکرد بهتر آن در مهار رشد سویه‌های هدف، در مقایسه با عصاره متانولی زعفران است. بیشترین اثر مهارکنندگی نیسین در برابر باکتری‌های لیستریامنوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس با ثبت MIC معادل (mg/mL) ۰/۰۳۲ و کمترین در مقابل سالمونلا تیفی‌موریم با MIC معادل ۰/۲۵۶ دیده شد ($P<0.05$). نتایج نشان می‌دهند نیسین بر مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس) تأثیر بیشتری داشته است. مقادیر MBC نیسین نیز در محدوده (mg/ml) ۰/۵۱۲ – ۰/۰۳۲ تعیین گردید که کمترین و بیشترین آن به‌ترتیب در برابر باکتری‌های لیستریا منوسیتوژنز و سالمونلا تیفی‌موریوم به‌دست آمده است ($P<0.05$). حساسیت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی به دلیل تفاوت در ساختار غشاء سلولی آنهاست. در تحقیقی تأثیر نیسین بر مهار رشد باکتری‌های پاتوژن گزارش شده است (۳۴). نیسین در واقع یک باکتریوسین متعلق به کلاس I می‌باشد که بخش کاتیون آبگریز آن با لیپید II غشاء سلولی پیوند برقرار نموده و موجب تشکیل منافذ در غشاء و همزمان ایجاد وقفه‌هایی در چرخه تولید لایه پپتیدوگلیکان می‌گردد. این در حالی است که غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی مانع خوبی در برابر دسترسی نیسین به غشاء سلولی است (۱۴).

جدول ۱- MIC و MBC عصاره زعفران (mg/ml) و نیسین (mg/ml) در برابر سویه‌های میکروبی

سویه باکتری	عصاره زعفران (mg/ml)		نیسین (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
L. monocytogenes	۳۱/۲۵ B,a	۶۲/۵۰ A,a	۰/۰۳۲ C,d	۰/۰۳۲ C,d
P. aeruginosa	۳۱/۲۵ B,a	۶۲/۵۰ A,a	۰/۰۶۴ D,c	۰/۱۲۸ C,b
B. cereus	۳۱/۲۵ B,a	۶۲/۵۰ A,a	۰/۰۳۲ D,d	۰/۰۶۴ C,c
S. aureus	۳۱/۲۵ A,a	۳۱/۲۵ A,b	۰/۰۳۲ C,d	۰/۰۶۴ B,c
E. coli	۳۱/۲۵ B,a	۶۲/۵۰ A,a	۰/۱۲۸ C,b	۰/۱۲۸ C,b
S. typhimurium	۳۱/۲۵ B,a	۶۲/۵۰ A,a	۰/۲۵۶ D,a	۰/۵۱۲ C,a

حروف بزرگ و کوچک به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و ستون در سطح ۵ درصد می‌باشند

فعالیت ضد میکروبی لفاف‌ها: نتایج فعالیت ضد باکتریایی لفاف‌ها در برابر باکتری‌های انتخابی در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود لفاف‌های تهیه شده از صمغ فارسی، صمغ فارسی+ عصاره زعفران (MIC) و صمغ فارسی + عصاره زعفران (MBC) هیچ گونه فعالیت ضد میکروبی در برابر سویه‌های هدف نشان ندادند. لفاف حاوی نیسین در مقایسه با لفاف تهیه شده با عصاره زعفران، تأثیر مشخصی بر مهار رشد باکتری‌های هدف به جز سالمونلا تیفی‌موریم نشان داد. بیشترین اثر مهارکنندگی لفاف‌ها بر رشد لیستریا منوسیتوژنز (۱۳/۱ mm - ۱۱/۷) و کمترین تأثیرگذاری بر سالمونلا تیفی‌موریم (۷/۲ mm - ۰) مشاهده گردید ($P<0.05$). افزودن نیسین به همراه افزایش غلظت عصاره زعفران باعث تقویت اثرات ضد باکتریایی لفاف شد. به‌طوری که نمونه تهیه شده از صمغ فارسی+ نیسین+ عصاره زعفران (MBC) بالاترین سطح مهار رشد باکتریایی را در برابر تمامی سویه‌های هدف نشان داد ($P<0.05$). بررسی منابع علمی گذشته نشان می‌دهد تاکنون گزارشی در خصوص اثرات ضد میکروبی لفاف صمغ فارسی و یا لفاف حاوی زعفران منتشر نشده است. رئیسی و همکاران در سال ۲۰۱۶ نتایج مشابهی را در خصوص اثر هم‌افزایی نیسین بر خواص میکروبی لفاف آلژینات سدیم حاوی اسانس‌های روغنی دارچین و رزماری گزارش کردند، که با نتایج این تحقیق هماهنگ است. کاهش اثرگذاری ترکیبات ضد میکروبی پس از قرارگیری در درون لفاف احتمالاً ناشی از به دام افتادن ترکیبات ضد باکتریایی در شبکه ژلی فیلم است. برای تأثیرگذاری عوامل ضد میکروبی (به عنوان مثال نیسین، اسیدهای آلی)، ضروریست تا از طریق انتشار به محیط هدف و در غلظت مناسب مهاجرت کنند. سرعت انتشار به اندازه، ساختمان شیمیایی و مقدار مولکول‌های محبوس شده، همراه با خصوصیات شبکه سه بعدی و تعامل احتمالی بین ترکیبات فعال و پلیمر بستگی دارد (۱۰).

آزمون ضد میکروبی گوشت مرغ: عمر نگهداری گوشت مرغ در درجه نخست با شمارش کلی میکروب‌ها تعیین می‌شود. بر اساس اعلام نظر کمیسیون بین‌المللی مشخصات میکروبیولوژیکی مواد غذایی (۱۶) حد مجاز TVC در گوشت خام طیور log CFU/g ۷ است. شکل ۱-الف تغییرات TVCدر تیمارهای مختلف گوشت مرغ را در طی مدت زمان نگهداری در دمای $4\ ^{\circ}C$ نشان می‌دهد. TVC اولیه گوشت مرغ تازه در محدوده log CFU/g

۳/۳-۲/۴ قرار داشت که نشان‌دهنده کیفیت اولیه مناسب فیله‌ها بود. رئیسی و همکاران در سال ۲۰۱۶ وجود TVC اولیه ۳-۴ log CFU/g را در گوشت سینه مرغ قابل پذیرش دانستند. در تمامی تیمارها با گذشت زمان مقدار TVC افزایش یافت. به‌جز در نمونه صمغ فارسی + نیسین که در روز سوم ارزیابی کاهشی معادل ۱/۰۲ CFU/g نشان داد. بیشترین شتاب افزایش در تیمارهای کنترل و صمغ فارسی دیده شد به‌طوری که بعد از روز ششم مقدار TVC بالاتر از ۷ log CFU/g گردید. تیمارهای صمغ فارسی+ عصاره زعفران (MIC)، صمغ فارسی+ عصاره زعفران (MBC) و صمغ فارسی+ نیسین + عصاره زعفران (MBC) حداکثر برای مدت ۹ روز و صمغ فارسی+ نیسین و صمغ فارسی+ نیسین + عصاره زعفران (MBC) برای مدت ۱۲ روز مقدار TVC فیله مرغ را کمتر از حد آستانه (log CFU/g ۷) نگهداری نمودند. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد افزودن نیسین به لفاف حاوی عصاره زعفران (MBC) اثر افزایشی بر کنترل مقدار TVC در نمونه‌های گوشت مرغ دارد.

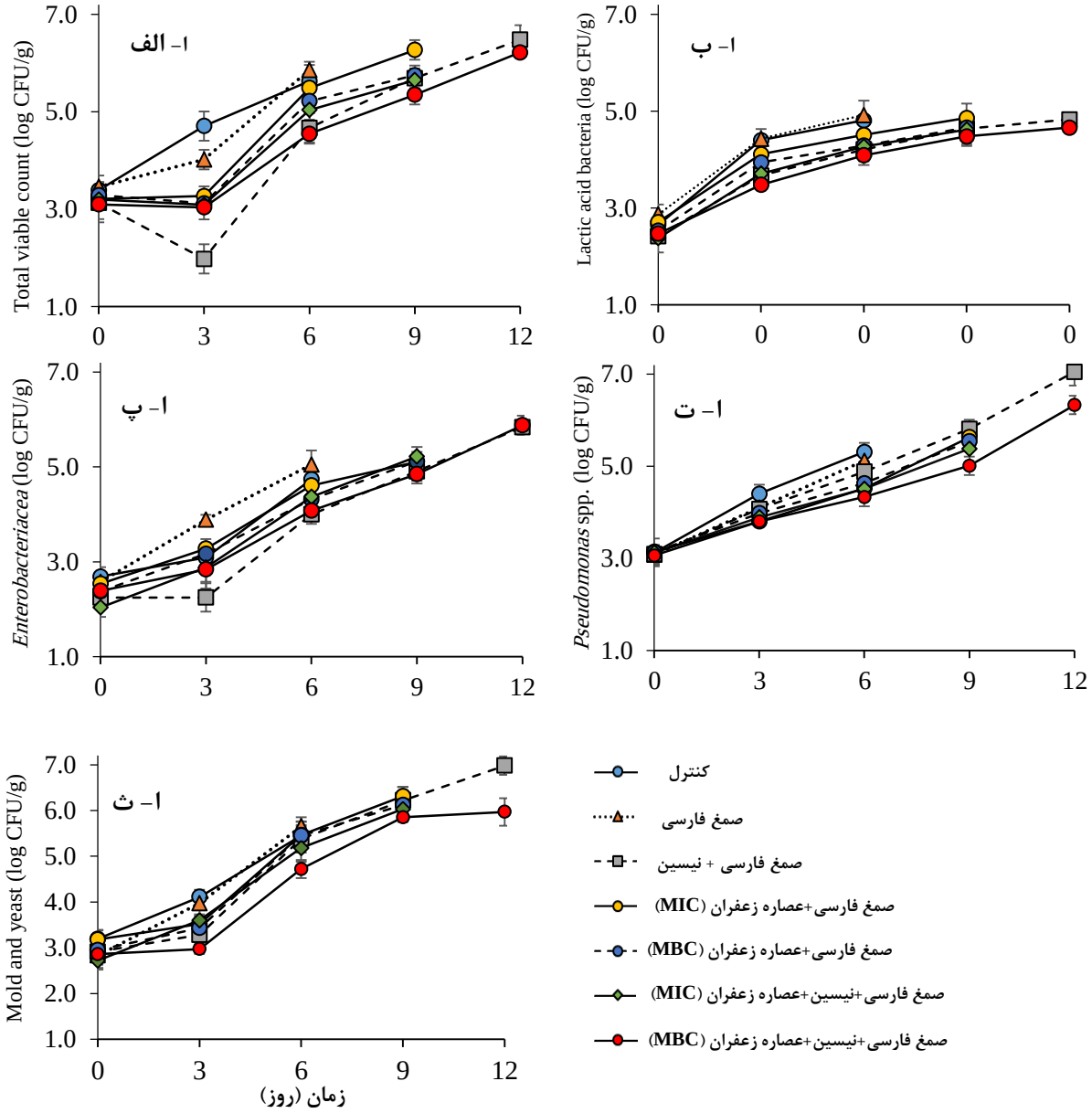
جدول ۲- اثر ضد میکروبی لفاف‌ها بر روی باکتری‌های هدف به روش انتشار دیسک

لفاف	*L. monocytogenes*	*P. aeruginosa*	*B. cereus*	*S. aureus*	*E. coli*	*S. typhimurium*
صمغ فارسی خالص	NE	NE	NE	NE	NE	NE
صمغ فارسی+نیسین (MIC)	۱۱/۷±۰/۶ ^{A,b}	۹/۱±۰/۵ ^{BC,b}	۹/۶±۰/۶ ^{BC,b}	۹/۸±۰/۶ ^{B,b}	۸/۷±۰/۳ ^{C,b}	NE
صمغ فارسی+عصاره زعفران (MIC)	NE	NE	NE	NE	NE	NE
صمغ فارسی+عصاره زعفران (MBC)	NE	NE	NE	NE	NE	NE
صمغ فارسی+نیسین+عصاره زعفران (MIC)	۱۲/۳±۰/۶ ^{A,ab}	۱۰/۳±۰/۷ ^{BC,ab}	۱۰/۵±۰/۹ ^{BC,ab}	۱۰/۹±۰/۵ ^{B,a}	۹/۱±۰/۳ ^{C,bc}	NE
صمغ فارسی+نیسین+عصاره زعفران (MBC)	۱۳/۱±۰/۴ ^{A,a}	۱۰/۵±۰/۷ ^{B,a}	۱۱/۱±۰/۲ ^{B,a}	۱۱/۴±۰/۷ ^{B,a}	۹/۵±۰/۶ ^{C,a}	۷/۲±۰/۴ ^{D,a}

دادها بیان‌کننده میانگین ± انحراف معیار است. حروف بزرگ و کوچک به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و ستون در سطح ۵ درصد می‌باشند
NE: ناحیه بازدارندگی شناسایی نشد

باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان تولیدکننده اسیدهای آلی شناخته می‌شوند که با تغییر pH مواد غذایی بر خصوصیات فیزیک و شیمیایی محصولات گوشتی اثر می‌گذارند (۲۶). شکل ۱- ب تغییرات جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک نمونه‌های فیله گوشت مرغ را در طی نگهداری در شرایط سرد نشان می‌دهد. تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روز نخست ارزیابی ۲/۲-۴/۹ log CFU/g بود. مدت زمان نگهداری باعث افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک گردید هر چند شتاب رشد جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک پس از روز سوم نگهداری اندکی کاهش نشان داد.

بررسی تغییرات جمعیتی نمونه‌های مختلف نشان می‌دهد روند تغییرات جمعیتی باکتری‌های اسیدلاکتیک تقریباً یکسان و اختلاف کمی با یکدیگر دارند. بیشترین تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در گروه کنترل و صمغ فارسی و کمترین مقدار با اختلاف اندک در دو تیمار صمغ فارسی+ نیسین و صمغ فارسی+ نیسین + عصاره زعفران (MBC) ثبت گردید.



شکل ۱- رشد جمعیت میکروبی در نمونه‌های فیله مرغ در مدت ۱۲ روز نگهداری در شرایط سرد. ا- الف: جمعیت میکروبی زنده کل، ا- ب: باکتری‌های اسیدلاکتیک، ا- پ: انتروباکتریاسه، ا- ت: پسودوموناس و ا- ث: کپک و مخمر

باکتری‌های انتروباکتریاسه به‌عنوان شاخص رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی استفاده می‌شوند. بر طبق قوانین اتحادیه اروپا (۱۱) تعداد CFU/cm^2 log ۷/۰-۲/۲ باکتری انتروباکتریاسه در لاشه گاو، گوسفند، بز، اسب و خوک یک محدوده قابل قبول است. در این تحقیق تعداد اولیه انتروباکتریاسه‌ها در گوشت سینه مرغ log CFU/g ۴/۶-۲/۲ بود (شکل ۱- پ) که نشانه بهداشت مناسب فرآیند آماده‌سازی لاشه مرغ است (۲۵). همان‌طور که نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند بیشترین شتاب رشد جمعیتی باکتری‌های انتروباکتریاسه در تیمار صمغ فارسی و کمترین مقدار تا روز سوم در تیمار صمغ فارسی + نیسین و پس از آن در دو تیمار صمغ فارسی + نیسین و صمغ فارسی + نیسین + عصاره زعفران (MBC) ثبت گردید. در تحقیقی مشابه استفاده از لفاف پکتین در بسته‌بندی میگو، باعث افزایش تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه گردید که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق هماهنگ است (۳).

پسودوموناس‌ها باکتری‌های گرم منفی و عامل اصلی فساد گوشت مرغ در شرایط سرد می‌باشند. این گروه از باکتری‌ها دارای فعالیت پروتئولیزی بالایی بوده و زمانی که محتوای گلوکز و گلوکونات گوشت کاهش و تعداد باکتری به حدود log CFU/g ۸-۷ افزایش یابد با تجزیه بافت پروتئینی موجب فساد گوشت می‌گردند (۷). نتایج حاصل از تغییرات جمعیتی باکتری‌های پسودوموناس در فیله گوشت مرغ در شکل ۱- ت آورده شده است. روند تغییرات جمعیت میکروبی در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد تعداد اولیه میکروب‌ها در روز نخست در محدوده ۳/۰ تا ۳/۱ log CFU/g قرار داشت که پس از آن تقریباً به‌صورت خطی اما با شتاب‌های متفاوت رشد نموده است. بیشترین رشد در نمونه کنترل و کمترین در تیمار صمغ فارسی + نیسین + عصاره زعفران (MBC) مشاهده شد. تیمار صمغ فارسی + نیسین در مقایسه با سایر لفاف‌های حاوی ترکیبات ضد میکروبی اثر مهارکنندگی کمتری نشان داد. افزودن نیسین به لفاف‌های حاوی عصاره زعفران باعث تقویت اثر مهارکنندگی رشد گردید.

مخمرها و کپک‌ها جزئی از جامعه میکروبی طبیعی گوشت مرغ تازه هستند (۷). با توجه به نتایج شمارش کپک و مخمر (شکل ۱- ث)، نمونه اولیه حاوی log CFU/g ۶/۱-۲/۳ بود. بالاترین نرخ رشد کپک و مخمر با اختلاف جزئی در دو تیمار کنترل و صمغ فارسی مشاهده شد. سایر تیمارها تا روز سوم نگهداری شتاب رشد جمعیتی کمتری را در مقایسه با روزهای بعد ثبت نمودند. مقایسه میان تیمارهای مختلف نشان داد افزودن عصاره زعفران به لفاف حاوی نیسین اثر هم‌افزایی بر مهار رشد کپک و مخمر دارد و با افزایش غلظت زعفران تأثیرگذاری نیز افزایش می‌یابد. پائین‌ترین مقدار رشد جمعیتی در نمونه صمغ فارسی + نیسین + عصاره زعفران (MBC) با مقدار log CFU/g ۸/۹-۲/۵ مشاهده شد.

از جمله پارامترهای مؤثر بر خواص ضد میکروبی ترکیبات مؤثره می‌توان به پایداری، دسترسی زیستی و انتشار تدریجی انتشار نمود. مهم‌ترین خصوصیت یک لفاف ضد میکروبی، سرعت آزادسازی تدریجی ترکیب ضد میکروبی به سطح ماده غذایی است. آزادسازی ناگهانی ترکیبات ضد باکتریایی در محیط اطراف لفاف می‌تواند باعث مصرف سریع ترکیبات ضد میکروبی شده و در نتیجه پس از آن حداقل غلظت مهار رشد میکروبی حفظ نشود. از سویی دیگر، چنانچه سرعت انتشار ماده ضد میکروبی آهسته‌تر از حد ضروری باشد، فعالیت باکتری‌های مولد فساد به راحتی شروع خواهند شد. بنابراین انتشار کنترل شده ترکیبات ضد میکروبی فعال می‌تواند باعث ماندگاری مواد غذایی بسته‌بندی شده برای مدت زمان طولانی‌تر شود (۹).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر لفاف صمغ فارسی در ترکیب با عصاره زعفران و نیسین بر کنترل رشد میکروبی گوشت سینه مرغ در مدت ۱۲ روز تحت دمای ^{o}C ۱±۴ بررسی گردید. نتایج نشان داد تمامی لفاف‌های تهیه شده بر پایه صمغ فارسی با عصاره زعفران و نیسین رشد میکروبی گوشت مرغ را در مقایسه نمونه کنترل کاهش دادند. ویژگی‌ها و نتایج به‌دست آمده حاکی از کارآیی بالای لفاف‌های تهیه شده در کنترل کیفیت میکروبی گوشت سینه مرغ و افزایش ماندگاری آن در دمای ^{o}C ۴ است. افزودن نیسین به لفاف صمغ فارسی غنی‌شده با عصاره زعفران، اثر هم‌افزایی بر مهار رشد میکروبی نشان داد. در این بین لفاف‌های صمغ فارسی + نیسین + عصاره زعفران (MBC) و صمغ فارسی+ نیسین اثرات ضد میکروبی نیرومندتری را در مقایسه با گروه کنترل و سایر لفاف‌های تهیه شده نشان دادند به‌طوری که توانستند در طی ۱۲ روز نگهداری سرد مقدار بار میکروبی فیله‌ها را کمتر از حد مجاز نگهدارند که این مدت زمان ۲ برابر تیمارهای کنترل و صمغ فارسی بود. بر اساس حد مجاز تعداد میکروب کل (کمتر از ۷ log CFU/g)، دامنه مهار باکتری‌های هدف و مدت زمان نگهداری، لفاف صمغ فارسی+ نیسین + زعفران (MBC) مناسب به نظر می‌رسد. با این وجود، استفاده تجاری از این لفاف‌ها مستلزم انجام تحقیقات بیشتر در خصوص تأثیر این لفاف‌ها بر خواص شیمیایی گوشت، محیط زیست و محاسبات اقتصادی است.

سپاسگزاری

این تحقیق با گرنت شماره IR-UOZ-GR-9955 اجرا شده است. در اینجا لازم است تا از همکاری آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه زابل قدردانی گردد.

References

1- Abbasi S. Persian Gum: A Novel Natural Hydrocolloid. *Nutrition and Food Sciences Research*. 2017; l4: 1-2. [In Persian].

2- Abbasi S, Mohammadi S. Stabilization of Milk–Orange Juice Mixture Using Persian Gum: Efficiency and Mechanism. *Food Biosci*. 2013; 2: 53-60.

3- Alvarez MV, Ortega-Ramirez LA, Gutierrez-Pacheco MM, Bernal-Mercado AT, Rodriguez-Garcia I, Gonzalez-Aguilar GA, *et al*. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Front Microbial*. 2014; 5: 1-7.

4- Asadi M. Antioxidant and antimicrobial activities in the different extracts of Caspian saffron, Crocus caspius Fisch & C. A. Mey. ex Hohen. *Caspian J Environ Sci*. 2016; 14(4): 331-338. [In Persian].

5- Azghandi FA, Es-haghi A, Feizy J, Lakshmipathy R. Antioxidant capacity and chemical composition of different parts of saffron flowers. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*. 2021: 4, 69-74.

6- Beirami SF, Hojjati M, Jooyandeh H. The effect of microbial transglutaminase enzyme and Persian gum on the characteristics of traditional kefir drink. *International Dairy Journal*. 2021; 112: 104843. [In Persian].

7- Bazargani-Gilani B, Aliakbarlu J, Tajik H. Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with Zataria multiflora Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2015; 29: 280-287. [In Persian].

8- Bukhari SI, Manzoor M, Dhar MK. A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. *Biomed Pharmacother*. 2018; 98: 733-745.

9- Daza LD, Homez-Jara A, Solanilla JF, Váquiro HA. Effects of temperature, starch concentration, and plasticizer concentration on the physical properties of ulluco (*Ullucustuberosus Caldas*)-based edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 120: 1834-1845.

10- Dabestani M, Kadkhodaee R, Phillips G, Abbasi S. Persian Gum: A comprehensive review on its physicochemical and functional properties.

Food Hydrocoll. 2018; 78:92-99. [In Persian].

11- EC. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of European Union*. 2005; 338:1-26.

12- Ghani S, Barzegar H, Noshad M, Hojjati M. The preparation, characterization and in vitro application evaluation of soluble soybean polysaccharide films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 112: 197-202. [In Persian].

13- Ghasempour Z, Alizadeh M, Bari MR. Optimization of probiotic yoghurt production containing Zedo gum. *Int J Dairy Technol*. 2012; 65: 118–125. [In Persian].

14- Hasheminya SM, Dehghannya J. A review of the structure, mechanism, and application of bacteriocins in foods as natural preservatives. 2020; 7(4): 19-32. [In Persian].

15- Iamareerat B, Singh M, Sadiq MB, Anal AK. Reinforced cassava starch based edible film incorporated with essential oil and sodium bentonite nanoclay as food packaging material. *J Food Sci Techno*. 2018; 55: 1953-1959.

16- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications (2th ed.). Toronto: University of Toronto Press. 1986. PP: 28-29.

17- Karbasaki FB, Hossenzadeh H, Fazli BBS, Velayatipour H, Ghazvini K, Ajami B. Evaluation of Antimicrobial effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron on Oral Pathogenic Microbes (Streptococcus Mutans, Lactobacillus, *Candida Albicans*). *Journal of Mashhad Dental School*. 2016; 40(3): 203-212. [In Persian].

18- Katherine CM, Cindy S, Gutierrez-Merino J, Madeleine B, Impe JFV, Velliou EG. The impact of food model system structure on the inactivation of *Listeria innocua* by cold atmospheric plasma and nisin combined treatments. *Int J Food Microbiol*. 2021; 337: 1-9.

19- Khorram F, Ramezanian A, Hashem Hosseini M. Shellac, gelatin and Persian gum as alternative coating for orange fruit. *Sci Hortic*. 2017; 225: 22-28. [In Persian].

20- Lee H, Yoon Y. Etiological agents implicated in foodborne illness worldwide. *Food Sci Anim Resour*. 2021; 41: 1-7.

21- Mohammadian A, Kordi S, Mashhadi NA. Antibacterial activity of stigma and petal of different species of saffron (*Crocus* Spp.). *Journal of Molecular and Cellular Researches*. 2016; 29(3): 265-273. [In Persian].

22- Muzaffar S, Sajad A, Zaman Khan RK, Akhter R. Nutritional composition and in-vitro antioxidant properties of two cultivars of Indian saffron. *J Food Meas Charact*. 2016; 10: 185–192. [In Persian].

23- Quirós-Sauceda AE, Ayala-Zavala JF, Olivas GI, González-Aguilar GA. Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *J Food Sci Technol*. 2014; 51: 1674-1685.

24- Raeisi S, Ojagh SM, Bita S. Effects of Persian gum-chitosan and Persian gum-chitosan incorporated with Garlic (*Allium sativum* L.) essential oil edible coatings on quality and sensory properties of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during frozen storage. *Food Science and Technology*. 2019; 15: 207-217.

25- Raeisi M, Tabaraei Aj, Hashemi M, Behnampour N. Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, Cinnamomum zeylanicum, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of Listeria monocytogenes during refrigeration. *Int J Food Microbiol*. 2016; 238: 139-145. [In Persian].

26- Ramezani F, Najafi MA, Rahnama M, Haddadi T. Separate and combined effects of lactic acid, chitosan and modified atmosphere packaging on the shelf life of quail carcass under chilled conditions. *Int J Food Microbiol*. 2019; 289: 215-222. [In Persian].

27- Sadeghi-Varkani A, Emam-Djomeh Z, Askari G. Physicochemical and Microstructural Properties of a Novel Edible Film Synthesized from Balangu Seed Mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 108: 1110-1119. [In Persian].

28- Samari-Khalaj M, Abbasi S. Solubilisation of Persian gum: Chemical modification using acrylamide. *Int J Biol Macromol*. 2017; 101: 187-195. [In Persian].

29- Sanjurjo K, Flores S, Gerschenson L, Jagus R. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Res Int*. 2006; 39: 749 -754.

30- Saravani-Pak E, Najafi-Ghaghelestani S, Najafi MA. Preparation and characterization of a new edible film based on Persian gum with glycerol plasticizer. *J Food Sci Technol*. 2020; 57: 3284-

3294. [In Persian].

31- Shahbazi Y, Shavisi N. Application of active Kurdi gum and Farsi gum-based coatings in banana fruits. *J Food Sci Technol*. 2020; 57: 4236-4246. [In Persian].

32- Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical Applications of Nisin. *J Appl Microbiol*. 2017; 120: 1449-1465.

33- Souza VGL, Pires JRA, Vieira ÉT, Coelhoso IM, Duarte MP, Fernando AL. Shelf life assessment of fresh poultry meat packaged in novel bionanocomposite of Chitosan/Montmorillonite incorporated with Ginger essential oil. *Coatings*. 2018; 8: 1-17.

34- Tippayatum P, Chonhenchob V. Antibacterial activities of Thymol, Eugenol and Nisin against some food spoilage bacteria, Kasetsart J. (Nat. Sci.). 2007; 41: 319-323.

Evaluation antimicrobial effects of new edible film from Persian gum incorporated with Saffron extract and nisin, on chicken fillets under chilled conditions

Elahe Saravani Pak[1], Mohammad Ali Najafi[2]*, Mahmmud Tavakoli[3], Naser Soltani Tehrani[4]

1- Graduate of Biotechnology (MS), Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.
4- MS, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

Receive: July 1, 2021; Revise: August 16, 2021; Accept: August 27, 2021

Summary

Today, the use of biodegradable film is considered due to its environmental friendliness and ability to store biologically active compounds. A novel antimicrobial film was made from the soluble-phase of the Persian gum (SPG) incorporated methanolic extracts of *Croccus sativus* L. stigmas alone or in combination with nisin. Initially, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactricidal concentration (MBC) value of saffron and nisin extracts was determined by micro-dilution method and films by disk diffusion method against *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aerogenesis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Then saffron extract (MIC: 31.25 mg/ml and MBC: 62.5 mg/ml), and nisin (MIC: 0.256mg/ml) was added to the film formulation. The effect of films on the control of total viable count, Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria, *Pseudomonas* spp., mold and yeast of chicken breast during 12 days of storage at 4±1 °C, was studied every three days. The results showed that nisin compared to saffron extract has a better inhibitory effect on controlling the population of pathogenic bacteria. Also, the addition of nisin to the Persian gum film containing saffron extract showed a synergistic effect (%25) on inhibiting the growth of microbes. Based on the acceptable limit for total viable count (<7 log CFU/g) in fresh poultry meat, growth inhibition of target bacteria and shelf life (up to 12 days), Persian gum + nisin + saffron (MBC) film seems appropriate.

Key words: *Poultry meat, Microbial growth, Methanolic extract*

بررسی فراوانی *باکستونلا سولکاتا* در گاوان منطقه قزوین با روش رنگ‌آمیزی و مولکولی

پوریا بقایی[١]، سید رضا حسینی[*٢]، نادیا طایفی نصرآبادی[٣]

١- دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.
٢- استادیار گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
٣- استادیار گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ٧ خرداد ١۴٠٠، بازنگری: ٢٨ تیر ١۴٠٠، پذیرش نهایی: ١٠ مرداد ١۴٠٠

چکیده

بیماری‌های تک‌یاخته‌ای ناشی از *باکستونلا سولکاتا* یکی از چالش‌های همیشگی صنعت دام و دام پروری در تمام دوره‌ها و به‌خصوص در کشورهای در حال پیشرفت مانند کشورهای جهان سوم مثل ایران بوده است. تک‌یاخته‌ی *باکستونلا سولکاتا* یکی از تک‌یاخته‌های مژک‌دار دستگاه گوارش نشخوارکنندگان و به‌خصوص نشخوارکنندگان بزرگ می‌باشد که غالباً سکوم و روده‌ی بزرگ گاوها و گاومیش‌ها را مورد برخورد قرار می‌دهد و از طریق بروز علائم درمانگاهی شامل اسهال باعث آسیب به دستگاه گوارش و کاهش ضریب تبدیل غذایی و نهایتاً باعث کاهش راندمان تولید در دام‌ها می‌شود. در این مطالعه از ٣٨۶ تعداد نمونه مدفوع گوساله از استان قزوین نمونه‌گیری انجام شد. سپس با دو روش مشاهده میکروسکوپیک و رنگ‌آمیزی و همچنین با روش بررسی مولکولی به جستجو و مشاهده انگل پرداختیم. نتایج: در روش مولکولی ٢٧ نمونه حدود ٧درصد و در روش مشاهده مستقیم ١٩ نمونه حدود ۵ درصد آلودگی مشاهده شد. تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار Excel2010 جمع‌آوری و طبقه‌بندی شد و سپس با نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری مربع کای انجام پذیرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده نیاز به توجه بیشتر دامپزشکان به این تک‌یاخته و پیشگیری از آسیب‌های احتمالی لازم می باشد.

واژگان کلیدی: *باکستونلا سولکاتا؛ قزوین؛ روش مولکولی؛ رنگ‌آمیزی*

[*] پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: dr.s.reza@gmail.com

مقدمه

باکستونلا سولکاتا تک‌یاخته‌ای از خانواده پیکونوتریکیده است و تمامی اعضای این خانواده انگل اجباری داخل دستگاه گوارش نشخوارکنندگان می‌باشند (۱۵). در پاییز ۱۹۲۸ ویلیام ریس در شهر جانرت ایالت لوئیزیانا آمریکا اولین مورد ابتلا به *باکستونلا سولکاتا* را گزارش نمود در ابتدا گمان می‌کرد که این انگل *بالانتیدیوم کولای* است ولی اندازه این انگل تقریباً دو برابر *بالانتیدیوم* می‌باشد (۱۷).

چرخه زندگی این انگل شامل دو مرحله تروفوزوئیت رودهای و مرحله کیستی می‌باشد که مرحله کیستی در برابر تنش‌ها مقاوم است. چرخه زندگی این انگل به صورت کامل مشخص نشده است اما به نظر می‌رسد که شباهت زیادی به *بالانتیدیوم کولای* دارد (۶).

محل زندگی این انگل شامل سکوم گاو، گاومیش، بز، گوسفند، آهو، شتر و به ندرت انسان می باشد (۱۸).

بیماری‌زایی این انگل به‌عنوان یک انگل فرصت‌طلب در روده بزرگ نشخوارکنندگان در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند در نوزادان و گاوهای دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد بیماری با علائم بالینی کند و بیشتر در سنین پایین و برای گوساله‌های نوزاد به صورت ایجاد اسهال در کنار سایر پاتوژن‌ها مطرح می‌باشد البته رابطه این انگل با سایر پاتوژن‌های ایجاد کننده اسهال گوساله‌ها باید مورد بررسی دقیق‌تری قرار بگیرد. گوساله‌هایی که کیست این انگل از مدفوع آنها جداسازی شده است دارای اسهال شدیدتری بوده‌اند. این انگل مسئول ایجاد اسهال و حتی مرگ در گوساله‌های نوزاد و جوان است. در گاوهای بالغ شیری به دنبال خوردن این کیست به همراه علوفه یا آب آشامیدنی می‌تواند اختلالاتی مانند لاغری مفرط و نامناسب بودن وضعیت بدنی (بادی کاندیشن اسکور) را به همراه داشته باشد میزان بیماری‌زایی این انگل به عواملی مانند مدیریت، سن، فصل و نوع تغذیه نیز بستگی دارد (۲، ۹، ۱۱).

عفونت در روده بزرگ گاومیش‌ها که توسط *باکستونلا سولکاتا* ایجاد می‌شود شبیه به بالانتیدیازیس در نشخوارکنندگان است که باعث علائمی مانند اسهال، التهاب و ضایعات اولسراتیو می‌شود (۸).

علائم بالینی انگل به‌صورت غیر اختصاصی بوده و شامل علائمی مانند اسهال، کم‌آبی، بی‌اشتهایی، بی‌حالی و افسردگی می‌باشد، اما اصلی‌ترین علامت اسهال است (۸، ۹).

نحوه انتقال این بیماری به صورت کامل شناسایی نشده اما به نظر می‌رسد که با توجه به چرخه ی سایر انگل‌های این خانواده باید وابسته به آب بوده و بیشتر در آب‌های راکد و شیرین از طریق دهان منتقل گردد و به نظر می‌رسد مرداب ها نقش مهمی در انتقال افقی این بیماری دارا می‌باشند. چرا در کنار آبگیرها و زندگی در این مکان و نیز کوچ‌های فصلی در افزایش شانس ابتلا به این انگل مؤثر می‌باشند (۸، ۹، ۱۹).

برای یافتن موارد بالینی و تحت بالینی این بیماری اخذ تاریخچه و معاینه دقیق الزامی می‌باشد. همچنین باید از تست‌های آزمایشگاهی برای تشخیص صحیح و تأیید تشخیص استفاده نمود، برای یافتن موارد بالینی و تحت بالینی این بیماری اخذ تاریخچه و معاینه دقیق الزامی می‌باشد همچنین باید از تست‌های آزمایشگاهی برای تشخیص صحیح و تأیید تشخیص استفاده نمود.

تشخیص تفریقی باید از سایر عوامل ایجاد کننده اسهال در گوساله‌ها مانند *کریپتوسپوریدیوم*، *آیمریا*، *ژیاردیا*، *سالمونلا*، *توکسوکارا* تمیز داده شود، اما مهم‌ترین انگلی که باید از آن تمیز داده شود

بالانتیدیوم کولای می باشد (۲، ۹).

طیف گسترده‌ای از آزمایشات سرولوژی و مولکولی برای تشخیص *باکستونلاسولکاتا* می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. بسته به مرحله بیماری، نحوه نمونه‌گیری و تست مورد استفاده میزان ابتلا حتی در یک جمعیت ثابت نیز می‌تواند متفاوت گزارش گردد. روش رنگ‌آمیزی با توجه به ارزانی و سهولت انجام، روش مناسب در موارد بالینی به نظر می‌رسد از طرفی دقت این روش پایین بوده و وابستگی به فرد انجام دهنده آن دارد. تست PCR با دارا بودن ویژگی و حساسیت بالا از روش‌های مناسب تشخیصی برای انجام تشخیص تفریقی در این بیماری می‌باشد. این تست می‌تواند آلودگی در موارد تحت بالینی و نیز موارد مزمن را به خوبی شناسایی می‌کند (۲، ۱۴).

درمان این بیماری به وسیله اکسی تتراسایکلین به همراه مترونیدازول و یا سولفادیمیدین به همراه مترونیدازول اثربخشی مناسبی را به همراه دارد همچنین انجام درمان حمایتی برای رفع کم‌آبی و کاهش التهابات توصیه می‌گردد (۹).

مواد و روش‌ها

استان قزوین در مرکز کشور و در نزدیکی استان تهران قرار دارد. در این مطالعه ابتدا استان قزوین به چهار منطقه جغرافیایی شمال، جنوب، شرق و غرب تقسیم گردید و از هر منطقه به‌صورت مساوی نمونه جمع‌آوری شد. مجموع ۳۸۶ نمونه جمع‌آوری گردید. نمونه به صورت مستقیم از رکتوم حیوان تهیه شده و داخل ظرف مدفوع قرار گرفت سپس شماره مربوط به هر ظرف در داخل دفترچه و همچنین سن، جنس و اسهال بودن یا نبودن حیوان مورد نظر در دفترچه یادداشت شد.

نمونه‌ها به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه آزاد واحد کرج برای بررسی‌های بیشتر منتقل گردید.

نمونه مدفوع به کمک سوآپ چندین بار به صورت زیگزاگ بر روی لام کشیده شد و بعد از چند دقیقه خشک گردید. سپس گسترش‌های تهیه شده به مدت ۴ دقیقه در متانول و ۹۹ درصد تثبیت گردید و بعد از این که کاملاً خشک شد سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۱۰ درصد رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شد و بعد با آب مقطر شستشو گردید. در نهایت به کمک روغن ایمرسیون توسط میکروسکوپ نوری نیکون و با لنز X100 مورد ارزیابی قرار گرفت.

ابتدا استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت DNA Extraction Kit(Cinagene,Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت.

بررسی حضور DNA تک‌یاخته *باکستونلا سولکاتا* در DNAهای استخراج شده به وسیله پرایمرهای طراحی شده هال و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام پذیرفت.

واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرو لیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR X۱۰، ۱ میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۲ میلی‌مول MgCl2، ۱ واحد آنزیم DNAپلی‌مراز Taq (فرمنتاس-لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سیلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه.

در نهایت محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت

بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder به اندازه ۱۰۰ جفت باز و یک کیلو باز و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار Excel2010 جمع‌آوری و طبقه‌بندی شد و سپس با نرم‌افزار SPSS با شماره ویرایش ۲۵ و با استفاده از آزمون آماری مربع کای انجام پذیرفت.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی و مشخصات پرایمر استفاده شده

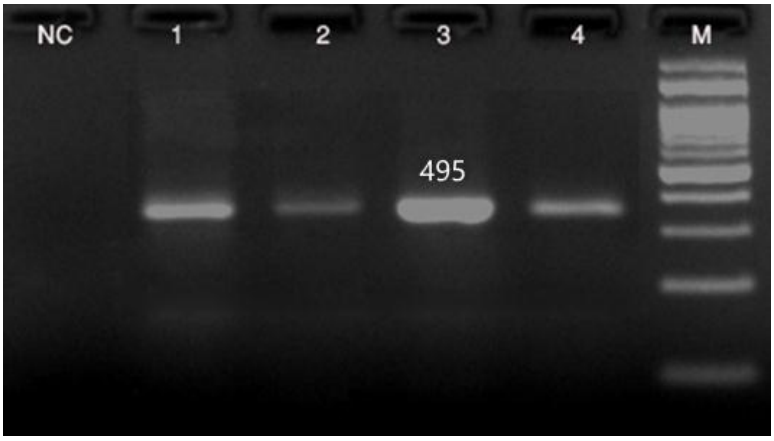
توالی نوکلئوتیدی	اندازه محصول (Bp)	دمای اتصال (C°)	شماره دسترسی (Gene Bank)
Forward:GCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCG Reverse: CTGCAATTCACAATGCGTATCG.′	٤٩٥	56	MW192808.1

نتایج

در روش رنگ‌آمیزی گیمسا تعداد ۱۹ نمونه (۴/۹۲ درصد) از ۳۸۶ نمونه به انگل *باکستونلا سولکاتا* آلوده بودند که از این تعداد ۱۰ نمونه (۶/۲۵ درصد) مربوط به جنس نر و ۹ نمونه (۳/۹۸ درصد) مربوط به جنس ماده بودند. در نتایج حاصل از نمونه‌ها به روش رنگ‌آمیزی گیمسا در مؤلفه جنس ارتباط معناداری در آزمون مربع کای مشاهده نگردید.

از تعداد ۱۹ نمونه (۴/۹۲ درصد) آلوده به انگل *باکستونلا سولکاتا* در روش رنگ‌آمیزی گیمسا بودند، که تعداد ۱۱ نمونه (۴/۶۶ درصد) مربوط به گاوهای بالغ و تعداد ۸ نمونه (۵/۳۳ درصد) مربوط به گوساله بودند. در نتایج حاصل از نمونه‌ها به روش رنگ‌آمیزی گیمسا در مؤلفه سن ارتباط معناداری در آزمون مربع کای مشاهده نگردید. همچنین تعداد ۱۰۵ نمونه از ۳۸۶ نمونه کل مربوط به دام‌های دارای علائم بالینی به خصوص اسهال بودند که در روش رنگ‌آمیزی گیمسا مورد آزمایش قرار گرفتند که در هیچ یک از نمونه‌ها آلودگی به انگل *باکستونلا* در این روش دیده نشد. در نتایج حاصل ازنمونه‌ها به روش رنگ‌آمیزی گیمسا در نمونه‌های دارای علائم بالینی(اسهال) اختلاف معناداری در آزمون مربع کای مشاهده نگردید.

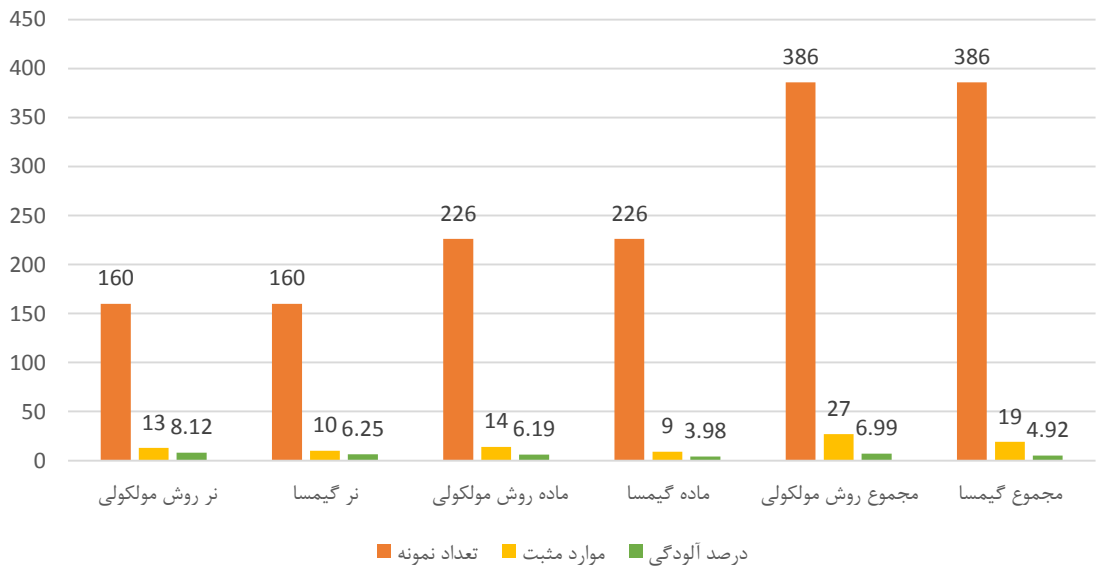
شکل ۱- باند bp ۴۹۵ ایجاد شده در نمونه مثبت در ژل پلی اکریلامید



جدول۲ - میزان آلودگی بر حسب جنسیت به *باکستونلا سولکاتا* در روش مولکولی و گیمسا

ش مولکولی و گیمسا	تعداد نمونه	موارد مثبت	درصد آلودگی
نر روش مولکولی	۱۶۰	۱۳	۸,۱۲
نر روش گیمسا	۱۶۰	۱۰	۶,۲۵
ماده روش مولکولی	۲۲۶	۱۴	۶,۱۹
ماده روش گیمسا	۲۲۶	۹	۳,۹۸
مجموع روش مولکولی	۳۸۶	۲۷	۶,۹۹
مجموع روش گیمسا	۳۸۶	۱۹	۴,۹۲

نمودار ۱- میزان آلودگی در دو روش ملکولی و رنگ‌آمیزی در نمونه‌های نر و ماده

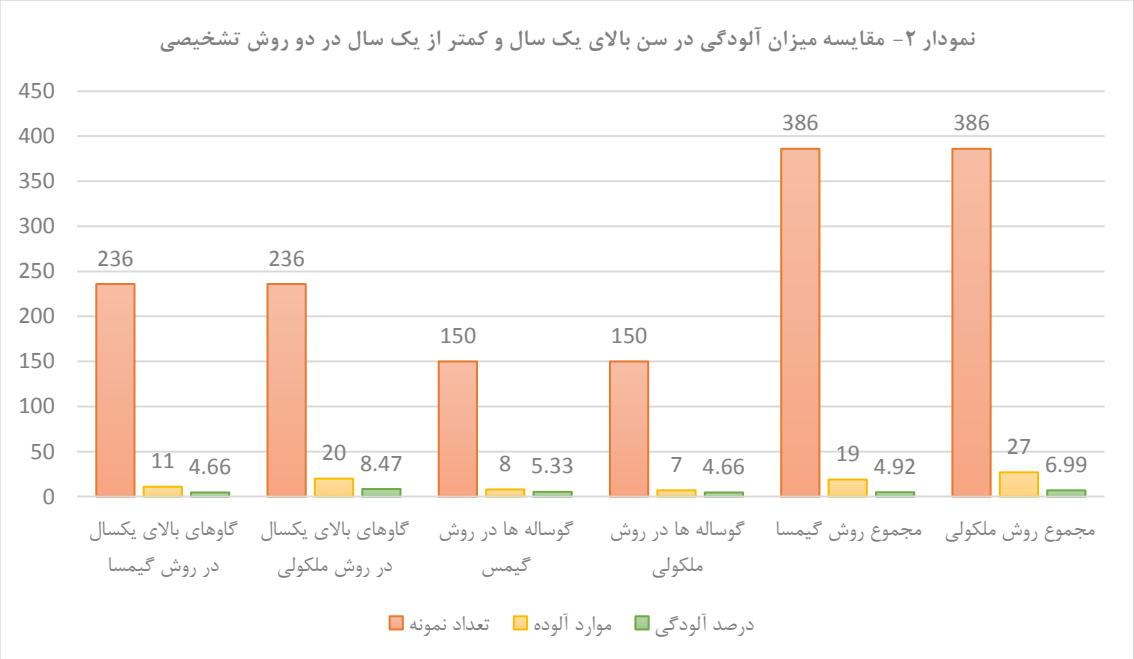


در روش مولکولی (PCR) تعداد ۲۷ نمونه (۶/۹۹ درصد) از ۳۸۶ نمونه به انگل *باکستونلا سولکاتا* آلوده بودند که از این تعداد ۱۳ نمونه (۸/۱۲ درصد) مربوط به جنس نر و ۱۴ نمونه (۶/۱۹ درصد) مربوط به جنس ماده بودند. در نتایج حاصل از نمونه‌ها به روش مولکولی (PCR) ارتباط معناداری بین جنس نر و ماده در آزمون مربع کای مشاهده نگردید. در تصویر زیر باند ایجاد شده در نمونه مثبت در ژل پلی اکریل امید مشاهده می‌شود.

همچنین از این تعداد ۲۷ نمونه (۶/۹۹ درصد) آلوده به انگل *باکستونلا سولکاتا* در روش ملکولی (PCR) تعداد ۲۰ نمونه (۸/۴۷ درصد) مربوط به گاوهای بالغ و تعداد ۷ نمونه (۴/۶۶ درصد) مربوط به گوساله‌ها بودند. در نتایج حاصل از نمونه‌ها به روش ملکولی (PCR) ارتباط معناداری بین سنین مختلف در آزمون مربع کای مشاهده نگردید.

جدول ۳- میزان آلودگی بر حسب سن به *باسکتونلا سولکاتا* در روش مولکولی و گیمسا

	تعداد نمونه	موارد مثبت	درصد آلودگی
نمونه گاو در روش گیمسا	۲۳۶	۱۱	۴,۶۶
نمونه گاو در روش ملکولی	۲۳۶	۲۰	۸,۴۷
نمونه گوساله در روش گیمسا	۱۵۰	۸	۵,۳۳
نمونه گوساله در روش ملکولی	۱۵۰	۷	۴,۶۶
مجموع نمونه در روش گیمسا	۳۸۶	۱۹	۴,۹۲
مجموع نمونه ها در روش ملکولی	۳۸۶	۲۷	۶,۹۹



همچنین تعداد ۱۰۵ نمونه از ۳۸۶ نمونه کل مربوط به دام‌هایی دارای علائم بالینی به‌خصوص اسهال بودند که در روش ملکولی (PCR) مورد آزمایش قرار گرفتند که ۲ نمونه (۱/۹۰ درصد) مثبت و آلوده به انگل *باکستونلا سولکاتا* بودند. در نتایج حاصل ازنمونه‌ها به روش ملکولی (PCR)در نمونه‌های دارای علائم بالینی (اسهال) اختلاف معناداری در آزمون مربع کای مشاهده نگردید.

بحث

تک‌یاخته‌ی *باکستونلا سولکاتا* یکی از تک‌یاخته‌های مژک‌دار دستگاه گوارش نشخوارکنندگان و به‌خصوص نشخوارکنندگان بزرگ می‌باشد که غالباً سکوم و روده‌ی بزرگ گاوها و بوفالوهای آبی را مورد برخورد قرار می‌دهد و از طریق بروز علائم درمانگاهی شامل اسهال باعث ناکارآمدی دستگاه گوارش و کاهش ضریب تبدیل غذایی و نهایتاً باعث کاهش راندمان تولید در دام‌ها می‌شود. تک‌یاخته‌ی *باکستونلا سولکاتا* از نظر ظاهری گرد بوده و پوشیده از مژه است و به مژه‌داران تعلق دارد و دارای شباهت ظاهری با تک‌یاخته‌ی *بالانتیدیوم کولای* در انسان و خوک می‌باشد (۱۶).

در این مطالعه از ۳۸۶ تعداد نمونه مورد بررسی،

۲۷ نمونه (۶/۹۹ درصد) در روش مولکولی مثبت بوده و یک باند مثبت بر روی ژل آگاروز مشاهده شد. همچنین در مشاهده مستقیم ۱۹مورد (۴/۹۲ درصد)مثبت مشاهده گردید. در روش مولکولی (PCR) تعداد ۱۳ نمونه (۸/۱۲ درصد) مربوط به جنس نر و ۱۴ نمونه (۶/۱۹ درصد) مربوط به جنس ماده بودند. همچنین تعداد ۱۰۵ نمونه از ۳۸۶ نمونه کل مربوط به دام‌هایی دارای علائم بالینی به‌خصوص اسهال بودند که در روش مولکولی (PCR) مورد آزمایش قرار گرفتند که ۲ نمونه (۱/۹۰ درصد) مثبت و آلوده به انگل *باکستونلا سولکاتا* بودند. همچنین از این تعداد ۱۹ نمونه (۴/۹۲ درصد) آلوده به انگل *باکستونلا سولکاتا* در روش رنگ‌آمیزی گیمسا بودند که تعداد ۱۱ نمونه (۴/۶۶ درصد) مربوط به گاوهای بالغ و تعداد ۸ نمونه (۵/۳۳ درصد) مربوط به گوساله‌ها بودند. نتایج مربوط به روش مشاهده میکروسکوپیک و رنگ‌آمیزی گیمسا نیز تا حدودی با نتایج مربوط به روش مولکولی همخوانی دارد و کمتر است.

در این مطالعه، سن، جنس و علایم بالینی مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج تفاوت معناداری را در گروه‌های سنی و جنس نر و ماده به تفکیک نشان نمی‌دهد. همچنین تفاوت معناداری بین گاوهای اسهالی و بدون اسهال از نظر آلودگی وجود دارد که احتمالاً مربوط به شکل زندگی انگل و ارتباط آن با میزبان است.

هاشمی‌نسب و همکاران در طول می ۲۰۱۳ تا ژوئن ۲۰۱۴ به مطالعه شیوع انگل *باکستونلا سولکاتا* در گاوهای استان سنندج در ایران پرداختند. در مجموع ۲۱۷ نمونه مدفوع از گاوها با توجه به سن، جنس، سلامت، سیستم مدیریت و فصل به‌طور تصادفی انتخاب شدند. در مجموع ۹۹ راس دام معادل ۶۳/۴۵ درصد آلودگی به انگل *باکستونلا سولکاتا* بود. در بزرگسالان شیوع عفونت *باکستونلا سولکاتا* ۵۱/۶۴ درصد و در گوساله‌ها ۲۸/۵۸ درصد و در گاوهای جوان ۴۰/۵۵ درصد است. شیوع عفونت *باکستونلا سولکاتا* در ماده‌ها ۴۷/۳۲ درصد و در نرها ۳۸/۴۶ درصد بود. عفونت *باکستونلا سولکاتا* در گاوهایی با سلامتی ضعیف (وضعیت بدن و وزن) به‌طور معنی‌داری بالاتر بود و معادل ۷۹/۵۴ درصد بود که در گاوهای سالم ۲۴/۴۷ درصد بود. در فصل تابستان شیوع ۴۴/۱۵ درصد بود، در فصل بارانی ۶۳/۳۸ درصد و در فصل زمستان ۲۸/۹۹ درصد بود. با توجه به نتایج این مطالعه با افزایش سن احتمال ابتلا به انگل *باکستونلا سولکاتا* افزایش می‌یابد و همچنین در فصل‌های پرباران نتایج نشان می‌دهد ریسک احتمال ابتلا به این انگل زیاد می‌شود. در مطالعه ما نمونه‌ها بیشتر در فصل زمستان گرفته شده بود که احتمالاً تفاوت زیاد آن با مطالعه هاشمی‌نسب و همکاران دیده می‌شود (۱۰).

دیاکو و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی شیوع انگل‌های داخلی در گاوهای شیری در کشور یونان با روش مشاهده مستقیم و سرولوژی پرداختند و از مجموع ۱۰۵ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده، ۲۲ مورد معادل ۲۱ درصد به *باکستونلا سولکاتا* آلوده بودند. همچنین نویسندگان این مطالعه به این نتیجه رسیدند که شیوع انگل‌های داخلی پایین می‌باشد و نیاز به درمان ضد انگلی ضرورتی ندارد. نتایج آن با مطالعه حاضر تا حدودی نزدیک است(۴).

جوزف و کاترینا و همکاران در سال ۲۰۱۵ در یک تحقیق دو ساله در مورد عفونت‌های تک‌یاخته‌ای در گاو و گوساله‌ها در منطقه وویوودینا در شمال صربستان پرداختند. این تحقیق در مزارع خانواده‌هایی که پرورش دام با سطوح مختلف بهداشتی داشتند انجام شد. این مطالعه شامل ۲۲۴ نمونه (۷۱ نمونه گوساله، ۴۸ نمونه تلیسه و ۱۰۵ عدد نمونه گاو) بود. از این تعداد ۲۲/۹۱ درصد از

تلیسه‌ها و ۱۵/۲۳ درصد از گاوها به انگل مژه‌دار *باکستونلا سولکاتا* آلوده بودند. در گوساله نیز میزان آلودگی با *باکستونلا سولکاتا* صفر بود. با توجه به نتایج این مطالعه با افزایش سن شانس ابتلا به انگل *باکستونلا سولکاتا* بالا می‌رود. همچنین علائم بالینی اسهال در همه نمونه‌ها ایجاد شده وجود داشت که بیش از ۱۵۰۰ کیست *باکستونلا سولکاتا* در هر گرم مدفوع بود. نتایج این مطالعه با مطالعه ما همخوانی دارد (۱۳).

جاسمین و همکاران در سال ۲۰۱۵ با هدف بررسی شیوع و شدت اثر عفونت *باکستونلا سولکاتا* و نقش آن در اسهال گاوها در منطقه سارایووسایپرز در کشور بوسنی و هرزگوین با روش مشاهده مستقیم و شناورسازی مدفوع به مطالعه پرداختند. در کل ۴۱۲ نمونه مدفوع از گاوهای با سنین مختلف (۱۸۹ نمونه گاو جوان و ۲۲۳ نمونه گاو بالغ) جمع‌آوری شد. میزان عفونت کلی ۲۷/۲ درصد بود. اختلاف معنی‌داری بین آلودگی گاوهای جوان و بالغ بود که ۳۳/۳ درصد گاوهای جوان و در مقابل ۲۱/۹ درصد گاوهای بالغ آلودگی داشتند. در حیوانات آلوده به انگل *باکستونلا سولکاتا* تفاوت معنی‌داری بین اسهال جوان‌ها و بالغین وجود نداشت (۵۷/۱ درصد جوان‌ها و ۵۱ درصد بالغین). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که حیوانات جوان بیشتر در معرض عفونت با انگل *باکستونلا سولکاتا* هستند اما گاوها بدون در نظر گرفتن سن به طور مشابهی به عفونت پاسخ می‌دهند. در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین سنین مختلف مشاهده نشد (۱۲).

ادهیکاری و همکاران در نوامبر سال ۲۰۰۹ با هدف شیوع و بررسی *باکستونلا سولکاتا* در گاومیش‌های آبی و گاوها در دره چیتوان واقع در جنوب نپال با روش مولکولی در ۴ روستا به تحقیق پرداختند. نمونه مدفوع به‌طور تصادفی از ۴۵ گونه گاومیش آبی و ۶۶ گاو جمع‌آوری شد. کیست *باکستونلا سولکاتا* در ۱۲ نمونه از ۴۵ نمونه گرفته شده گاومیش‌های آبی برابر با ۲۷ درصد آلودگی مشاهده شد و نیز ۱۴ مورد از ۶۶ نمونه گاوها برابر با ۲۱ درصد آلودگی مشاهد شد. اختلاف معنی‌داری بین سن، جنس و محل زندگی آنها وجود نداشت. مطالعه حاضر نیز نتایج مشابهی از نظر معنی‌درای ارتباط بین سن و جنس و بیماری را نشان داد (۱).

کومار و همکاران در طول ژانویه ۲۰۱۳ تا دسامبر ۲۰۱۴ به بررسی و شیوع *باکستونلا سولکاتا* در بوفالوهای جعفرآبادی در جنوبی غربی هند در ایالت گجرات با روش مشاهده مستقیم پرداختند. در مجموع ۲۰۶ نمونه مدفوع از رکتوم گاومیش‌ها جمع‌آوری و در آزمایشگاه پردازش کردند. بروز کلی عفونت تک‌یاخته‌ای مژه‌دار ۳۵ درصد بود. بروز عفونت در حیوانات بالغ ۳۳/۳ درصد بود و بالاتر از حیوانات جوان بود که ۱۸/۲ درصد بود. اختلاف قابل ملاحظه‌ای از میزان عفونت *باکستونلا سولکاتا* در نمونه‌های اسهالی ۵۴/۷ درصد و در حیوانات غیر اسهالی ۱۴ درصد ثبت شده است. وقوع بیشترین میزان عفونت *باکستونلا سولکاتا* در فصل زمستان بود که ۴۳/۸ درصد و پس از آن فصل موسمی ۳۱ درصد و در فصل تابستان نیز ۳۱ درصد بود. از نظری آماری اختلاف عفونت در گروه‌های سنی و فصل‌های مختلف قابل توجه نیست. در مطالعه ذکر شده شیوع بالاتر عفونت انگل *باکستونلا سولکاتا* در گاومیش‌هایی که اسهال مکرر داشتند به نسبت غیر اسهالی‌ها در جعفرآباد مشهود است. مطالعه حاضر بر روی گاوها انجام شده که نتایج نزدیکی با این مطالعه دارد (۷).

السفر و همکاران در سال ۲۰۱۳ به مطالعه تشخیصی *باکستونلا سولکاتا* در اراضی شهر موصل عراق و با روش مشاهده مستقیم و غلظت پرداختند. ۱۰۰ نمونه مدفوع از گاومیش‌های مناطق مختلف

شهر موصل جمع‌آوری شد. درصد کلی عفونت با انگل *باکستونلا سولکاتا* ۳۵ درصد بود. تفاوت معنادار و زیادی بین جنس‌ها و سن‌های مختلف پیدا نشد. همچنین تفاوتی بین حیوانات دارای اسهال و بدون اسهال از نظر آلودگی وجود نداشت اما تعداد زیادی کیست در مدفوع حیواناتی که اسهال داشتند دیده شد که برابر ۴۸/۵۷ درصد بود. نتایج مطالعه ما مقادیر کمتری از آلودگی را نشان داد (۵).

آرام در سال ۲۰۲۰ به مطالعه‌ی همگانی انگل‌های دستگاه گوارش در گاوهای شیری در استان سلیمانیه در منطقه اقلیم کردستان عراق با روش‌های مشاهده مستقیم و شناورسازی از طریق آب شکر اشباع شده و روش رسوب برای تشخیص مراحل انگل پرداخت. در مجموع ۱۳۷۶ نمونه تصادفی از مدفوع گاوهای شیری جمع‌آوری شد. نرخ شیوع کلی ۴۶/۶۰ درصد بود. میزان عفونت تک‌یاخته‌ها ۱۴/۵۸ درصد، نماتودها ۱۸/۶۰ درصد، ترماتودها ۱۵/۱۱ درصد و سستودها ۳/۴۸ درصد بود. در میان همه انگل‌ها فراوان‌ترین آن آیمریا با ۲۹/۰۷ درصد بود به دنبال آن *باکستونلا سولکاتا* ۱۸/۶۰ درصد و *استرونژیلوس* ۱۷/۴۴ درصد بود. اختلاف زیاد و معنی‌داری در میزان شیوع نماتودها و تک‌یاخته‌ها در سنین مختلف وجود داشت به‌طوری که میزان آلودگی انگل *باکستونلا سولکاتا* در گوساله‌ها ۱۱/۲۵ درصد و در گاوها ۲۳/۶۵ درصد بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که سیستم‌های با مدیریت مناسب آلودگی کمتری در مقایسه با سیستم‌های نامطلوب داشته است. نتایج این مطالعه به مطالعه ما نزدیک است (۵).

بیش از هر چیز نیاز توجه به این انگل در کنار عوامل دیگر بیماری‌زا و مولد اسهال می‌تواند از نتایج این مطالعه باشد. هر چند که به دلایل محدود بودن زمان انجام این مطالعه بیشتر نمونه‌ها در زمستان گرفته شده است. نتایج به‌دست آمده نشان داد آلودگی قابل توجهی از انگل وجود دارد که نیاز توجه بیشتر همکاران دامپزشک را در مشاهده و درمان این بیماری می‌طلبد.

References

1- Adhikari B, Hari B. Rana Khaled M.I. Sultan, Bhuminand Devkotal. Prevalence of Buxtonella sulcata in water buffaloes and cows in Chitwan Valley, southern Nepal. *Jpn. J. Vet*. Parasitol. 2013; 11(2): 55-61.

2- Al-Bakri H.S, Suliman G.E, Al-Saffar M.T. Prevalence of intestinal ciliate Buxtonella sulcata in cattle in Mosul. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2010; 24(1): 27-30.

3- Al-Saffar T. M, Suliman E. G, Al-Bakri H. S. (2010) Prevalence of intestinal ciliate Buxtonella sulcata in cattle in Mosul. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2010; 24(1): 27-30.

4- Anastasia Diakou, Elias Papadopoulos. Prevalence of gastrointestinal parasites of cattle in Greece January 2018. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2018; 53(4): 304.

5- Aram, A. M. Corological study of gastrointestinal parasites in dariy cattle in Sulaymaniyah province, Kurdistan region, Iraq. *Applied Ecology and Enviromental Resaearch*. 2020; 18(5): 7279-7287.

6- Areán, V. M, Koppisch, E. Balantidiasis: a review and report of cases. *The American journal of pathology*. 1956; 32(6): 1089.

7- Binod K, Biswa R M, Amit P, Joice P. Joseph and Bhavika R. Patel. Incidence of Buxtonella sulcata in Jaffarabadi Buffaloes of South-Western Gujarat, India. *Buffalo Bulletin*. 2017; 36(4).

8- Bürger, H. J, Eckert, J, Kutzer, E, Körting, W, Rommel, M. Veterinärmedizinische Parasitologie. *Georg Thieme Verlag*. 2006.

9- El-Ashram, S, Aboelhadid, S. M, Kamel, A. A, Mahrous, L. N, Abdelwahab, K. H. Diversity of parasitic diarrhea associated with Buxtonella sulcata in cattle and buffalo calves with control of buxtonellosis. *Animals*. 2019; 9(5): 259.

10- Hasheminasab S.S, Moradi P, Talvar

H.M, Wright I, Darbandi M.S. Buxtonella spp. like infection in cattle in Sanandaj province, Iran. *Annals of Parasitology*. 2015; 61(4). 247-251.

11- Hong, K. O, Youn, H. J. Incidence of Buxtonella sulcata from cattle in Kyonggi-do. *The Korean journal of parasitology*, 1995; 33(2): 135-138.

12- Jasmin Omeragic, Cazim Crnkic. (2015). Diarrhoea in cattle caused by Buxtonella sulcata in Sarajevo area. *Veterinaria*. 2015; 64(2): 50-54.

13- Kocis, J. I, Tamara. B, Zsolt. R, Katarina. Dimitrijević, Sanda. Buxtonellosis and coccidiosis of cattles in Northern Serbia. *Acta Parasitologica*, 2015; 60(1): 158-163.

14- Mahdavi, L. Sarcodina, Mastigophora, Ciliophora, Myxozoa, Ashk Ghalam press. 1385; 23-56 [In Persian].

15- Rees, C. W. Studies on the morphology and behaviour of Buxtonella sulcata from cattle and of Balantidium coli from the pig. *Parasitology*. 1930; 22(3): 314-325.

16- Soulsby, E. J. L. Helrninths Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals 7"'editi 'The English Language Book Society and Bailliere Tindal. 1986.

17- Tanjung, M, Thahira, D. Endoparasites of cattle raised under intensive and semi-intensive system at Klumpang Kebon Village, North Sumatra. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*. 2021; 713(1): p. 012057. IOP Publishing.

18- Taylor, M. A., Coop, R. L, Wall, R. L. Veterinary Parasitology. Blacwell. Science (3rd edn), UK. 2007; 475-484.

19- Tomczuk, K, Kurek, L, Stec, A, Studzinska, M, Mochol, J. Incidence and clinical aspects of colon ciliate Buxtonella sulcata infection in cattle. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2005; 49(1): 29-33.

Prevalence of *Buxtonella sulcata* in cattle of Qazvin region by staining and molecular methods

Pouria Baghaie[1], Seyed Reza Hosseini[2*], Nadia Taiefi Nasrabadi[3]

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.
2- Department of Veterinary Patobiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3- Department of Veterinary Patobiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

Receive: May 28, 2021; Revise: July 19, 2021; Accept: August 1, 2021

Summary

Protozoan diseases caused by *Buxtonella sulcata* have been one of the constant challenges of the livestock industry in all periods and especially in developing countries such as third world countries such as Iran. *Buaxtonella sulcata* protozoan is one of the ciliated protozoa of the gastrointestinal tract of ruminants, especially large ruminants. It converts food and ultimately reduces production efficiency in livestock. In this study, 386 calf fecal samples were sampled from Qazvin province. Then we searched and observed the parasite with two methods of microscopic observation and staining and also with the method of molecular analysis. In the molecular method 27 samples were about 7% and in the direct observation method 19 samples about 5% contamination was observed. Statistical analysis was collected and classified by Excel2010 software and then performed by SPSS software using Chi-square test. According to the results, veterinarians need to pay more attention to this protozoan and prevent possible injuries.

Keywords: *Buxtonella sulcata; Qazvin; staining and molecular methods*

تأثیر اسانس نعناع فلفلی در مقایسه با عصاره‌های الکلی آن بر برخی میکروب‌های مشکل‌ساز مواد غذایی

سید محمد احمدی*[1]، سمیه نیک‌نیا[1]

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

دریافت مقاله: ۱۰ اردیبهشت ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۵ خرداد ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۲۵ تیر ۱۴۰۰

چکیده

اطمینان از سلامت و کیفیت بالای مواد غذایی در طول مراحل تولید، انبارداری و مصرف از جمله دغدغه‌های اصلی تولیدکنندگان می‌باشد. با توجه به وجود نگرانی در خصوص بی‌خطر بودن ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی و خواص سلامتی بخش آنها در صنعت غذا می‌تواند سلامت مصرف‌کننده را تضمین کند. هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه دارویی نعناع فلفلی بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای مواد غذایی شامل *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *لیستریامنوسایتوژنز* و *اشرشیاکلی* بود. اسانس‌گیری از گیاه نعناع فلفلی به روش تقطیر با بخار آب با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد و عصاره‌های اتانولی و متانولی نیز به روش خیساندن تهیه شدند. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش چاهک پلیت اندازه‌گیری شد و متعاقباً حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین گردید. نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهارکنندگی نشان داد که میزان فعالیت ضد میکروبی گیاه نعناع فلفلی به‌طور معنی‌داری به نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد ($p<۰/۰۵$). به‌طوری که بر خلاف عصاره‌های الکی گیاه نعناع فلفلی که در کلیه غلظت‌های مورد استفاده بر باکتری *لیستریامنوسایتوژنز* بی‌اثر بودند (۰ میلی‌متر)، اسانس آن بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی اثر بازدارندگی قوی نشان داد و با ایجاد هاله عدم رشد ۳۹/۳ میلی‌متر بیشترین تأثیر ضد میکروبی معنی‌دار را نیز بر همین میکروب داشت. در بین باکتری‌های مورد بررسی *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس و همچنین عصاره متانولی در این بررسی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای فعالیت ضد میکروبی قوی بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای مواد غذایی می‌باشد. بنابراین می‌توان اسانس نعناع فلفلی را به عنوان یک ترکیب بسیار ارزشمند و نگهدارنده ضد میکروبی در مواد غذایی پیشنهاد کرد.

واژگان کلیدی: *اسانس، عصاره اتانولی، عصاره متانولی، فعالیت ضد میکروبی، نعناع فلفلی*

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

مقدمه

نگهداری غذا به‌صورت سالم و با کیفیت بالا در طول مراحل تولید، انبارداری و مصرف از جمله دغدغه‌های اصلی متخصصان صنایع غذایی و تغذیه می‌باشد چرا که وجود فلور میکروبی طبیعی در مواد غذایی مختلف و همچنین آلودگی‌های ثانویه در طی مراحل تولید می‌تواند سبب مسمومیت‌های غذایی شود (۱). به عنوان مثال اگر چه فرایندهای حرارتی، اغلب میکروب‌های بیماری‌زا را نابود می‌کند اما میکروب‌های ترموفیل متعلق به گونه‌های میکروکوکوس، باسیلوس، کلستریدیوم و گاهی اوقات باکتری‌های میله‌ای‌گرم منفی ممکن است در دمای پاستوریزاسیون زنده بمانند و سبب فساد محصول شوند (۲، ۳). گونه‌های سودوموناس که جزء سایکروتروف‌ها می‌باشند، آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک خارج سلولی تولید می‌کنند که فعالیت باقی‌مانده این آنزیم‌ها می‌تواند کیفیت ارگانولپتیکی و عمر ماندگاری محصولات لبنی فرآوری شده را کاهش دهند (۲). همچنین یکی از میکروب‌هایی که ممکن است به واسطه آلودگی ثانویه وارد مواد غذایی شود، باکتری اشرشیاکلی است که یک میکروب انتروپاتوژن با منشأ غذایی می‌باشد و می‌تواند سبب اسهال و در شرایط حادتر منجر به مرگ شود (۳). در مورد بروز بیماری لیستریوزیس که یک نوع بیماری ناشی از مواد غذایی می‌باشد، گزارشات متعددی وجود دارد. از عوارض این بیماری می‌توان به منتژیت، انسفالیت و عفونت خونی اشاره نمود. این بیماری دارای نرخ مرگ و میر بالا (۲۰ تا ۳۰ درصد) است. در این نوع از بیماری، محصول ممکن است در مراحل بعد از فرایند حرارتی دچار آلودگی شود (۳، ۴).

به دلیل نگرانی در خصوص بی‌خطر بودن ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی، اخیراً تحقیقات در مورد استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاها مورد توجه قرار گرفته است (۵). در واقع می‌توان با استفاده از گیاهان دارویی و خواص سلامتی بخش آنها در صنعت غذا نه تنها سلامت مصرف‌کننده را تضمین کرد، بلکه با وجود ترکیبات معطر در ترکیبات ثانویه گیاه، باعث بهبود عطر و طعم غذا و رضایتمندی مصرف‌کننده شد (۱).

گیاه دارویی نعناع فلفلی برای سالیان طولانی در سرتاسر جهان برای اهداف دارویی و درمانی مختلفی مورد استفاده قرارگرفته و بیشتر برای معطرکردن محصولات لبنی تخمیری استفاده می‌شود (۶). اسانس نعناع فلفلی که حدود ۱ درصد گیاه را تشکیل می‌دهد، کاربردهای مختلفی مانند نگهدارنده غذاهای خام و فرآوری شده، داروسازی، درمان‌های طبیعی و داروهای جایگزین دارد. ترکیبات اسانس این گیاه به ویژه منتول* که ترکیب اصلی آن را تشکیل می‌دهد، دارای فعالیت ضد میکروبی بر طیف وسیعی از میکروب‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است (۷، ۸، ۹). همچنین مطالعات نشان داده است که به‌طور کلی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان دارویی، فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها دارند که این ممکن‌است به حضور ترکیبات فنولیک و پلی‌فنولیک در محلول مرتبط باشد (۱۰). با توجه به اینکه میکروب‌های مختلفی در فساد و بیماری‌زایی مواد غذایی نقش دارند، بنابراین کاربرد عصاره‌های گیاهان دارویی به عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی علاوه بر میزان فعالیت ضد میکروبی آنها مستلزم تأثیر این عصاره‌ها بر تمامی میکروب‌هایی است که در فسادشان نقش دارند. میزان فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی به فاکتورهای مختلفی نظیر نوع گیاه، نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد (۱۱).

*- Menthol

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان دارویی گشنیز و بولاغ اوتی نشان داد که اگر چه عصاره‌های مذکور در برخی غلظت‌ها هاله عدم رشد علیه باکتری‌های گرم مثبت (لیستریامنوسایتوژنز و استافیلوکوکوس‌اورئوس) ایجاد کردند اما هیچ کدام از گیاهان مذکور اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های گرم منفی نداشتند (۱۲) و یا گزارش شده است که عصاره متانولی رزماری دارای اثر ضد میکروبی بر استافیلوکوکوس‌اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد در حالی که بر باسیلوس‌سرئوس بی‌تأثیر است (۱۳).

شرایط محیطی رشد نیز عامل مهم دیگری است که با تأثیر بر کمیت و کیفیت ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی بر فعالیت میکروبی آنها مؤثر است (۱۰، ۱۴). محبوبی و همکاران (۲۰۱۴) دلیل بررسی اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی بر میکروب‌های مختلف را اختلاف در ترکیبات شیمیایی اسانس این گیاه در مناطق مختلف جهان بیان کردند (۱۵). لذا هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه دارویی نعناع فلفلی کشت شده در مزرعه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل بر برخی میکروب‌های مشکل‌ساز در مواد غذایی می‌باشد که نتایج آن بهترین عصاره این گیاه را از نقطه نظر داشتن پتانسیل ضد میکروبی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی معرفی خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، باسیلوس سرئوس (ATCC 11778)، لیستریا منوسایتوژنز (ATCC 19115)، میکروکوکوس لوتئوس (CIPA 270)، و اشرشیاکلی (ATCC 10536) بودند که کشت خالص آنها از کلکسیون میکروبی مؤسسه پژوهش‌های علمی و صنعتی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تهیه شد. گیاه نعناع فلفلی از مزرعه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه گردید. برگ‌های گیاه نعناع فلفلی (Mentha piperita) ابتدا در سایه تحت خشک کردن اولیه قرار گرفتند و پس از آن در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک و سپس پودر شدند.

استخراج اسانس: برای استخراج اسانس گیاه نعناع فلفلی، ابتدا ۴۰ گرم از برگ‌های خشک شده آن در آب خیسانده شد و به‌وسیله دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت اسانس آن استخراج گردید. اسانس به‌دست آمده به‌وسیله سولفات سدیم انهیدرید رطوبت‌گیری و سپس فیلتر گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶، ۱۷).

آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی: برای آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه فوق، ۲۰ گرم از پودر برگ‌های خشک در ۲۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های متانول و اتانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. مایع رویی پس از استخراج به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید و در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای استفاده‌های بعدی عصاره خشک شده در آب مقطر حل گردید (۱۸، ۱۹).

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی: به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس، عصاره‌های متانولی و اتانولی نعناع فلفلی از روش چاهک پلیت* استفاده گردید. از تمامی باکتری‌ها در محیط نوترینت براث سوسپانسیون میکروبی تهیه و این سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

* Agar-well diffusion

سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیون فوق در محیط نوترینت آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌وسیله لوپ استریل چند کلنی از باکتری‌های رشد یافته به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل شدند، کدورت میکروبی لوله‌ها با اضافه‌کردن سرم فیزیولوژی با کدورت شاهد مک فارلند ۰/۵ (معادل $1/5\times10^8$ کلنی در میلی‌لیتر) استاندارد شد (۲۰، ۱۱، ۷، ۲۱).

بعد از تهیه مایه میکروبی، یک سوآپ استریل در لوله حاوی مایه میکروبی فرو برده و در سه جهت روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت شد. سپس به‌وسیله قسمت انتهایی یک پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌لیتر روی محیط کشت ایجاد گردید. محلولی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاهان مورد آزمایش تهیه شد. به منظور حل شدن بهتر عصاره‌ها در آب مقطر استریل از توئین ۸۰ به عنوان کمک حلال استفاده شد و محلول تهیه شده به‌وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استریل گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها، ۰/۱ میلی‌لیتر از اسانس (۱۷) و همچنین محلول‌های الکی تهیه شده در چاهک‌ها ریخته و پلیت‌های تلقیح شده به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره‌های مذکور به خوبی جذب محیط شوند. نهایتاً پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، در نهایت فعالیت ضد میکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. در این تحقیق همچنین کلرامفنیکل به‌عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل حاوی ۱۵ درصد توئین جهت اثبات عدم تأثیر ضد میکروبی آب و توئین ۸۰ به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۲۱، ۸، ۷، ۲۲).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC*)، غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ازعصاره‌های الکی و برای اسانس رقت‌های ۱:۱۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰) در حلال دی متیل سولفوکسید† تهیه و فعالیت ضد میکروبی آنها به روش فوق بررسی شد. پائین‌ترین غلظتی که از رشد میکروب‌ها جلوگیری کرده بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد (۲۱، ۲۲). کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

طرح آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها برای صفات اندازه‌گیری شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. میانگین صفات کمی با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید (۲۳).

نتایج و بحث

نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۱) نشان داد که میزان فعالیت ضد میکروبی گیاه نعناع فلفلی به‌طور معنی‌داری به نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد ($p<0/05$). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود اسانس نعناع فلفلی چه از نظر طیف گستردگی فعالیت ضد میکروبی و همچنین شدت فعالیت میکروبی با عصاره‌های متانولی و اتانولی آن تفاوت معنی‌داری داشت. به‌طوری که بر خلاف عصاره‌های الکی گیاه نعناع فلفلی که در کلیه غلظت‌های مورد استفاده بر باکتری لیستریامنوسایتوژنز بی اثر بودند (۰ میلی‌متر)، اسانس آن بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی اثر بازدارندگی نشان داد. همچنین همان طور که در

* Minimum inhibitory concentration

† Dimethylsulfoxide (DMSO)

[3] Mint timija

شکل ۱ به خوبی قابل مشاهده است، اسانس از فعالیت ضد میکروبی بسیار قوی‌تری در مقایسه با عصاره‌های الکلی مذکور برخوردار بود به‌طوری که نه تنها بر باکتری لیستریا منوسایتوژنز اثر ضد میکروبی نشان داد بلکه با ایجاد هاله عدم رشد ۳۹/۳ میلی‌متر بیشترین تاثیر ضد میکروبی را نیز بر همین میکروب اعمال نمود. ابوحسین تبری و همکاران اثر ضعیف عصاره‌های نعناع را بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش کردند (۲۴).

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) و حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اسانس و عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه نعناع فلفلی بر برخی میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای مواد غذایی

نوع عصاره	نوع میکروب									
	لیستریامونوسایتوژنز		*میکروکوکوس‌لوتئوس*		*باسیلوس‌سرئوس*		*اشرشیاکلی*		*سودوموناس‌آئروژینوزا*	
	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC
اسانس	۳۹/۳ a	۱/۱۰۰	۲۷/۵ c	۱/۲۰۰	۲۹b	/۲۰۰ ۱	۳۳/۵b	۱/۲۰۰	۲۱d	۱/۱۰۰
اتانولی	۰c	†۰	۱۴a	۱۰۰	۹b	۵۰	۱۴/۵a	۵۰	۱۰b	۵۰
متانولی	۰d	†۰	۱۲/۵a	۵۰	۱۳/۵a	۵۰	۱۰b	۵۰	۸c	۱۰۰
کنترل‌مثبت	۵۰		۲۸/۵		۴۰		۳۳/۵		۱۷	
کنترل‌منفی Ψ	-		-		-		-		-	
کنترل منفی*	-		-		-		-		-	

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

کنترل‌مثبت (کلرامفنیکل ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

Ψ کنترل‌منفی (آب مقطر حاوی ۱۵ درصد توئین برای عصاره‌های الکی)

* کنترل‌منفی (دی‌متیل سولفوکسید برای اسانس)

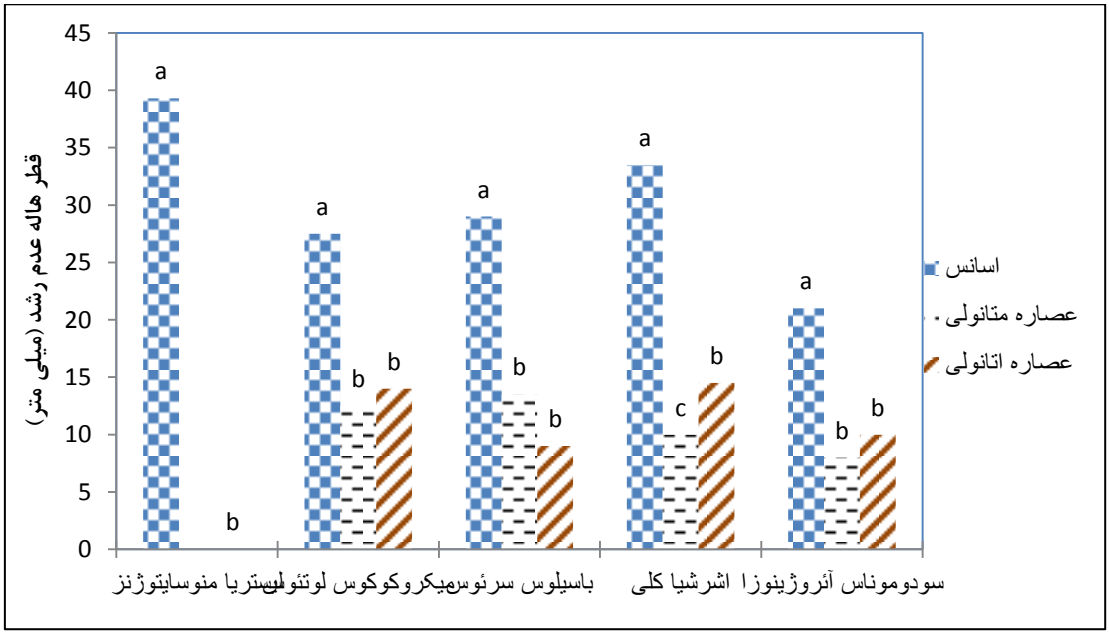
حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، میانگین قطر هاله عدم رشد (DGI)

در مورد نحوه عمل اسانس‌ها در مرگ باکتری‌ها چنین اظهار شده که یکی از ویژگی‌های مهم این مواد و ترکیب‌های آن خاصیت آبگریزی است که سبب می‌شود در بخش‌های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندریایی باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آنها می‌گردد. سپس بخش زیادی از یون‌ها و دیگر محتویات حیاتی سلول به بیرون تراوش می‌نماید که در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌شود (۲۵).

به‌طور کلی عصاره‌های گیاهان دارویی غالباً بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها موثرترند (۲۶، ۴). در این تحقیق هم عصاره‌های الکی نعناع فلفلی به‌خصوص نوع متانولی تأثیر بهتری بر باکتری‌های گرم مثبت اعمال نمودند به‌طوری که باکتری باسیلوس سرئوس با قطر هاله عدم رشد ۱۳/۵ میلی‌متر حساس‌ترین میکروب به این عصاره بود. در مورد اسانس نعناع فلفلی نیز بیشترین فعالیت ضد میکروبی بر لیستریا منوسایتوژنز مشاهده شد (شکل ۱). همچنین در بین باکتری‌های مورد بررسی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس و همچنین عصاره متانولی مورد استفاده در این تحقیق بود.

دلیل مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به عصاره‌های گیاهی می‌تواند به وجود غشای لیپوپلی‌ساکاریدی بیرونی بر دیواره سلولی آنها در مقایسه با ساختار تک لایه دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت داده شود که نفوذ ترکیبات آبگریز را به داخل سلول باکتریایی محدود می‌کند (۲۷).

اگرچه همان طور که می‌توان از شکل ۱ مشاهده نمود، مطلب فوق یک قاعده کلی نیست و نوع میکروب می‌تواند چه گرم مثبت و یا چه گرم منفی عکس‌العمل متفاوتی به عصاره‌های گیاهان دارویی داشته باشد. عدم وجود اثر ضد میکروبی عصاره‌های الکی نعناع فلفلی بر باکتری گرم مثبت لیستریا منوسایتوژنز و اثر بازدارندگی بیشتر اسانس بر باکتری اشرشیاکلی گرم منفی (با قطر هاله عدم رشد ۳۳/۵ میلی‌متر) در مقایسه با باکتری‌های باسیلوس سرئوس و میکروکوکوس لوتئوس با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۲۹ و ۲۷/۵ میلی‌متر این مطلب را تأئید می‌کند. چنین نتایجی قبلاً نیز گزارش شده است پرامیلا و همکاران در تحقیق‌شان پتانسیل ضد میکروبی عصاره متانولی برگ نعناع را بررسی نمودند، آنها مشاهده کردند که باکتری اشرشیاکلی حساس‌تر از باکتری استافیلوکوکوس می‌باشد (۲۸، ۲۹).



شکل ۱- فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های الکی گیاه دارویی نعناع فلفلی بر باکتری‌های مورد بررسی (عصاره‌ها با حروف مشابه برای هر میکروب اختلاف معنی‌داری با هم ندارند)

نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی که میزان حساسیت میکروب‌ها را به عصاره‌های گیاهی نشان می‌دهد، اثبات نمود که مقدار این شاخص بسته به نوع عصاره و میکروب می‌تواند متفاوت از نتایج آزمون قطر هاله عدم رشد باشد. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس (جدول ۱) برای میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی ۱/۲۰۰ (حجمی/حجمی) تعیین شد در حالی که برای لیستریا منوسایتوژنز و سودوموناس آئروژینوزا ۱/۱۰۰ (حجمی/حجمی) به دست آمد. بنابراین لیستریامنوسایتوژنز با دارا بودن بالاترین قطر هاله عدم رشد در میان باکتری‌های مورد بررسی از حداقل غلظت مهارکنندگی بالاتری در مقایسه با اشرشیاکلی و میکروکوس لوتئوس برخوردار بود. در مورد عصاره‌های الکی نعناع فلفلی (جدول ۱) مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های الکی نعناع فلفلی برای باکتری‌های مورد بررسی بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

نتایج این تحقیق و مطالعات قبلی اثبات می‌کند که اسانس نعناع فلفلی یک ترکیب ضد میکروبی مطمئن‌تر از عصاره‌های الکلی و آبی نعناع فلفلی بر ضد طیف گسترده‌ایی از میکروب‌ها می‌باشد. تأثیر اسانس نعناع فلفلی کشت شده در کشور اسلوواکی بر باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه[18]، استافیلوکوس اورئوس، انتروباکتر کولاسه[19]، گونه‌های سالمونلا، استرپتوکوکوس پئوژنز[20] حاکی از آن بوده که اسانس مذکور بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی اثر کشندگی داشته است (۳۰) به طوری که بالاترین خاصیت ضد میکروبی بر باکتری‌های اشرشیاکلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوس اورئوس و کمترین میزان بر کلبسیلا پنومونیه تعیین شده است (۳۰).

محبوبی و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی را بر طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی همچنین کپک و مخمر بررسی کردند (۱۵). آنها دریافتند که اسانس مورد بررسی بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی نظیر سودوموناس آئروژینوزا، انتروکوکوس فیسیوم[21]، استرپتوکوکوس موتان[22]، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سرئوس و همچنین مخمرها مخصوصاً کاندیدا البیکانس[23] اثر ضد میکروبی قوی دارد. آنها دلیل وجود این طیف گسترده اثر ضد میکروبی اسانس را به وجود ترکیبات منتول و منتون[24] به عنوان ترکیبات اصلی اسانس نسبت دادند. آنها باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی را حساس‌ترین و سودوموناس را مقاوم‌ترین میکروب‌ها به اسانس گزارش کردند. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مشابهت داشت. تأثیرپذیری میکروب‌ها به اسانس نعناع فلفلی به میزان ترکیبات خاص در آن و سینرژیسم بین این ترکیبات حتی ترکیباتی که مقدارشان در حداقل است، بستگی دارد (۳۱).

بوپش و همکاران عصاره‌های الکی و آبی نعناع فلفلی را بر باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و سراتیا مارسنس[25] بررسی کردند (۳۲). اگر چه در تحقیق آنها همه عصاره‌ها دارای اثر ضد میکروبی ضعیفی بودند و در بین آنها عصاره‌های اتیل استات و آب از بالاترین تأثیرگذاری برخوردار بودند اما عکس‌العمل هر میکروب به عصاره‌ها متفاوت بود و

[18] - Klebsiella pneumoniae

[19] - Enterobacter cloacae

[20] - Streptococcus pyogenes

[21] Enterococcus faecium

[22] - Streptococcus mutans

[23] - Candida albicans

[24] - Mentone

[25] - *Serratia marcesens*

میکروب‌ها نسبت به برخی عصاره‌ها مقاومت نشان دادند. در بررسی اثر ضد میکروبی نعناع فلفلی شهرستان کنگاور استان کرمانشاه بر قارچ‌های بیماری‌زا، عصاره آبی موثرترین عصاره گزارش شده است در حالی که عصاره‌های متانولی و استونی از تأثیرگذاری کمی برخوردار بودند و حتی بر برخی قارچ‌ها بی اثر بودند (۳۳). در مطالعه‌ای که توسط معصومیان و زندی (۲۰۱۷) انجام شد عصاره هیدروالکی نعناع بر اشرشیاکلی و سودوموناس‌آئروژینوزا بی‌تأثیر بود در حالی که عصاره آبی آن بر اشرشیاکلی و سودوموناس‌آئروژینوزا به ترتیب هاله عدم رشد ۱۷و ۱۵ میلی‌متری ایجاد نمود (۳۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای فعالیت ضد میکروبی قوی بر کلیه باکتری‌های مورد بررسی چه گرم مثبت و چه گرم منفی مشکل‌زا در مواد غذایی از حیث ایجاد فساد و بیماری‌زایی می‌باشد. در صورتی که که عصاره‌های متانولی و اتانولی آن از فعالیت ضد میکروبی ضعیفی برخوردار می‌باشند. دلیل این اختلاف فاحش در فعالیت ضد میکروبی می‌تواند به وجود ترکیبات مختلف موجود در اسانس و عصاره‌ها نسبت داده شود. به‌طوری که اسانس نعناع فلفلی از منوترپن‌ها که عمدتاً منتول و منتون هستند، تشکیل شده است که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی هستند در حالی که عصاره‌های الکی و آبی این گیاه از ترکیباتی نظیر آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، استروئیدها و تانن‌ها تشکیل شده‌اند (۹) و تفاوت در میزان فعالیت ضد میکروبی این عصاره‌ها هم با اختلاف میزان این ترکیبات مرتبط می‌باشد (۹). بنابراین نتایج این بررسی اسانس نعناع فلفلی را به‌عنوان یک نگهدارنده مناسب در مواد غذایی مخصوصاً مواد غذایی لبنی پیشنهاد می‌کند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی تحت پژوهانه به شماره UOZ-GR-8232 توسط دانشگاه زابل اجرا شده است. از دانشگاه زابل بابت حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

References

1- Gharenaghadeh S, Forghani S, Gharehnaghadeh S, Sowti M. Evaluation of Antimicrobial Properties of Methanolic Extract, Essential Oil and Nanolipozom of Mentha piperita. *J food science and technology*. 2017; 68(14): 93-102 [In Persian].

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

3- Valik L, Goerner F, Laukova D. Growth dynamics of Bacillus cereus and shelf-life of pasteurised milk. *Czech J Food Sciences*. 2003; 21(6): 195-202.

4- Lunden J, Tolvanen R, Korkeala H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Science*. 2004; 87: E6-E12.

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

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

7- Ehsan B, Vital A, Bipinraj N. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of Bryonopsis laciniosa leaf, stem, fruit and seed. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8(15): 3565-3567.

8- Erturk O. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice

plants. *J Biologia*. 2006; 61(3): 275-278.

9- Sujana P, Sridhar TM, Josthna P, Naidu CV. Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Mentha piperita L. (Peppermint)- An Important Multipurpose Medicinal Plant. *American Journal of Plant Sciences*. 2013; 4: 77-83.

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

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

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

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

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

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

16- Duarte MCT, Leme Delarmelina C, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. *J Ethnopharmacol*. 2007; 111(2):197-201.

17- Badar N, Arshad M, Farooq U. Characteristics of Anethum graveolens (umbelliferae) seed oil: extraction, composition andantimicrobial activity. Int. *J. Agri. Biol*. 2008; 10: 329–32.

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

19- Olaleye M, Bello-Michael C. Comparative antimicrobial activities of Aloe vera gel and leaf. *African Journal of Biotechnology*. 2005; 4(12): 1413-1414.

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

21- Dildar, A., Muhammad, M., Abdul, H., Muhammad, B., Nazia, B. Antibacterial activity of Ballota limbata against potential multidrug resistant human pathogens (running head: antibacterial activity of B. limbata against potential Mdr pathogens). *Journal of Applied Sciences Research*. 2009; 5(10): 1611-1614.

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

23- Khusniati T, Yantyati W. Antibacterial Effects of Aromatic Materials Produced in Indonesia on the Preservation of Skimmed and Whole Milk in Storage. *International Food Research Journal*. 2008; 15(2): 109-118.

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

25- Saharkhiz M, Sattari M, Goodarzi Gh, Omidbaigi R. Assessment of antibacterial properties of Tanacetum parthenium L. essential oil. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2008; 24(1): 47-55 [In Persian].

26- Wei LS, Musa N, Sengm CT, Wee W, Shazili NAM. Antimicrobial properties of tropical plants against 12 pathogenic bacteria isolated from aquatic organisms. *African Journal of Biotechnology*. 2008; 7(13): 2275-2278.

27- Ghalem BR, Mohamed B. Essential oil from gum of Pistacia atlantica Desf.: Screening of antimicrobial activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009; 3(3): 087-091.

28- Nandagopal S, Ranjitha Kumari BD. Phytochemical and Antibacterial Studies of Chicory (Cichorium intybus L.)-A Multipurpose Medicinal Plant. *Advances in Biological Research*. 2007; 1 (1-2): 17-21.

29- Pramila DM, Xavier R, Marimuthu K,

Kathiresan S, Khoo ML, Senthilkumar M, *et al.* Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (Mentha piperita: Lamiaceae). *J Medicinal Plants Research*. 2012; 6(2): 331-335.

30- Pluchtovaa M, Gervasib T, Benameurc Q, Pellizzerib V, Grulovaa D, Camponed L, *et al.* Antimicrobial Activity of two Mentha Species Essential Oil and its Dependence on Different Origin and Chemical Diversity. *J Natural Product Communications*. 2018; 13(8): 1051-1054.

31- Muntean D, Licker M, Alexa E, Popescu I, Jianu C, Buda V, *et al.* Evaluation of essential oil obtained from Mentha piperita L. against multidrug-resistant Strains. *J Infection and Drug Resistance*. 2019; 12: 2905-2914.

32- Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshkumar A, Sureshkumar P, Saravana Murali K. Antibacterial activity of Mentha piperita L. (peppermint) from leaf extracts–a medicinal plant. *J Acta agriculturae Slovenica*. 2007; 89 (1): 73-79.

33- Abdolmaleki M, Bahraminejad S, Salari M, Abbasi S, Panjeke N. Antifungal Activity of Peppermint (Mentha piperita L.) on Phytopathogenic Fungi. *J. Med. Plants*. 2011; 10(38) :26-34 [In Persian].

34- Masoumian M, Zandi M. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*. 2017; 1 (11): e10080.

The effect of Mentha piperita L. essential oil in comparison with its alcoholic extracts against some food problematic microorganisms

Seyed Mohammad Ahmadi[1]*, Somayeh Niknia[1]

1- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.

Receive: April 30, 2021; Revise: June 5, 2021; Accept: July 16, 2021

Summary

One of the main challenges for food producers is to ensure the health and high quality of food during the production, storage and consumption stages. Due to the concern about the safety of chemical antimicrobial compounds, the use of medicinal plants and their health properties in the food industry can ensure the health of consumers. So, the objective of this study was to evaluate antimicrobial activity of essential oil, ethanolic and methanolic extracts of Mentha piperita L cultivated in Medicinal plants farm of agricultural research institute of zabol university, against spoilage and pathogenic microorganisms in food products including *Pseudomonas aeruginosa*, Bacillus cereus, *Micrococcus luteus*, *listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. The essential oil was obtained by water-distillation using a Clevenger-type system and ethanolic and methanolic extracts were obtained by wet method. Antimicrobial activity of the extracts was measured by agar well diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) was subsequently determined. The results of diameter of inhibition zone and MIC values indicate that antibacterial activity of the extracts of Mentha piperita L was related to the type of extract and the type of microorganism. Unlike methanolic and ethanolic extracts of Mentha piperita L, which were ineffective in all concentrations against *Listeria monocytogenes* (0 mm), its essential oil had a strong inhibitory effect on all studied bacteria and with diameter of inhibition zone of 39.3 mm showed the highest significant antimicrobial activity on the same microorganism. In this study, Pseudomonas aeruginosa was the most resistant bacteria to the essential oil and methanolic extracts. The findings of this study indicated that *Mentha piperita L* essential oil has a strong antimicrobial activity on spoilage and pathogenic microorganisms associated with food. Therefore, the mentioned compound can be suggested as a very valuable antimicrobial preservative in food.

***Key words**: Essential oil, Ethanolic extract, methanolic extract, Antibacterial activity, Mentha piperita L.*

بررسی آلودگی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH مؤسسه رازی به باکتری استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس عامل بیماری تب گازگرفتگی موش

روزبه فلاحی*

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

دریافت مقاله: ۱۷ فروردین ۱۴۰۰، بازنگری: ۳۰ تیر ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۲ مرداد ۱۴۰۰

چکیده

یکی از بیماری‌های مهم و خطرناک باکتریایی در کلنی موش‌های آزمایشگاهی تب گاز گرفتگی موش است. این بیماری قابل انتقال به انسان می‌باشد. بر طبق استانداردهای بین‌المللی، در صورت مواجه شدن با آن، بایستی اقدامات کنترلی، مبارزه و احیاناً ریشه‌کنی و حذف کلنی صورت گیرد. عامل بیماری، باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* است. از علائم بیماری در انسان می‌توان به تب شدید، لرز، پلی‌آرتریت و التهابات پوستی اشاره کرد. تاکنون استانداردهای بین‌المللی در مورد تعیین آلودگی حیوانات آزمایشگاهی به این عامل عفونی در ایران انجام نگرفته است. در این تحقیق میزان شیوع این باکتری در کلنی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH مؤسسه رازی در سال ۱۳۹۸ مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۶۶ سر موش پرورشی به‌صورت تصادفی از یک کلنی پرورشی انتخاب و با روش PCR از نظر وجود این باکتری، مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد هیچ‌گونه مورد مثبتی مشاهده نگردید. با توجه به دستورالعمل به‌کار برده شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که با اطمینان ۹۹/۹ درصد، آلودگی به باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* در سالن‌های پرورشی، وجود نداشته است. نتیجه این بررسی، نشان‌دهنده این است که رعایت موارد بهداشتی در این مرکز به خوبی انجام می‌گیرد. گرچه باید پایش‌های دوره‌ای و مستمر در مورد این باکتری و سایر عوامل عفونی مهم صورت گیرد.

کلمات کلیدی: *آلودگی، استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس، تب گازگرفتگی، موش NIH*

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

مقدمه

یکی از مهم‌ترین توصیه‌های سازمان‌ها و انجمن‌های بین‌المللی در رابطه با حیوانات آزمایشگاهی، استفاده از حیوانات تعریف شده می‌باشد، چرا که نتایج کار بایستی قابل تکرار، قابل اطمینان و قابل تعمیم باشد. براساس توصیه فدراسیون انجمن‌های علوم حیوانات آزمایشگاهی اروپا (FELASA)، پایش بهداشتی (Health Monitoring) حیوانات، جهت صدور گواهی سلامت آنها که مورد درخواست سیستم‌های کیفیت و کنترل کیفی مؤسسات تولیدی و تحقیقاتی می‌باشد، الزامی است. همچنین بسیاری از آلودگی‌های باکتریایی، مایکوپلاسمایی و ویروسی باعث ایجاد واکنش‌های متقاطع می‌شوند که در آزمایش‌های کنترلی مداخله می‌کنند. بر طبق استانداردهای FELASA، باید در مورد بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا در هر کلنی پرورشی، در خصوص تعیین پاک و یا آلوده بودن حیوانات آزمایشگاهی حتماً به‌صورت دوره‌ای بررسی صورت گیرد. از باکتری‌های مهم که توسط FELASA توصیه شده است، *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* (*Streptobacillus moniliformis*) می‌باشد (۳-۱). این باکتری متعلق به خانواده لپتوتریشیاسه (Leptotrichiaceae) بوده و گرم منفی میله‌ای و چندشکلی، کاتالاز منفی، بی‌هوازی اختیاری و اکسیداز منفی می‌باشد. این باکتری موجب بیماری تب گازگرفتگی رت (Rat bite fever) یا تب هاورهیل (Haverhill fever) در انسان می‌شود. بیماری تب گازگرفتگی رت اولین بار در آمریکا در سال ۱۸۳۹ گزارش شده است. باکتری بیشتر به دو فرم میله‌ای و L فرم وجود دارد. فرم میله‌ای شکل این باکتری، بیماری‌زایی شدیدتری نسبت به فرم L در موش ایجاد می‌کند. باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* موجب آلودگی گونه‌های مختلف حیوانات آزمایشگاهی نظیر رت، موش و خوکچه هندی می‌شود. رت به‌عنوان میزبان اصلی این باکتری شناخته شده است و باکتری به‌صورت فلور طبیعی در بزاق، ترشحات چشمی، بینی و دستگاه فوقانی تنفسی رت وجود دارد (۴، ۵، ۶). انسان از طریق آب آلوده، ادرار، گاز گرفتگی یا خراش حیوانات نامبرده می‌تواند آلوده شود و علائم بالینی به‌صورت التهاب اطراف زخم، تب، لرز، سردرد، آبریزش بینی، در ۷۰ درصد موارد کهیر، استفراغ، درد عضلانی و درد مفاصل، بروز می‌نماید (شکل ۱) (۷، ۸). در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع تجویز پنی‌سیلین، بیمار، مبتلا به مننژیت، اندوکاردیت و پریکاردیت خواهد شد. میزان مرگ و میر در انسان حدود ۱۳-۷ درصد با علائم پیچیده و ۵۳ درصد با علائم اندوکاردیدیت همراه بوده است. همچنین از جداسازی این باکتری از مایع مفصلی که در بیماران همراه با تب، راش و افزایش پلی‌مورفونوکلئرها بوده، گزارش شده است (۹، ۱۰). این باکتری در موش، در موارد حاد، تورم غدد لنفاوی گردنی و سپتی‌سمی کشنده ایجاد می‌کند. در بیماری مزمن، آرتریت در نواحی پشتی پاها و دم ایجاد می‌شود. آبسه و سقط هم ممکن است دیده شود. در موش ممکن است حساسیت‌های ژنتیکی دخیل باشند (۴، ۵، ۱۱، ۱۲). در کلنی موش‌های آزمایشگاهی در عفونت‌های تحت بالینی و بدون علائم، در صورت وجود عوامل استرس‌زا نظیر تراکم بالا، افزایش درجه حرارت سالن پرورش، افزایش رطوبت و تغذیه نامناسب و تضعیف سیستم ایمنی به دلایل متفاوت، موجب بروز بیماری و تلفات می‌گردد (۱۲، ۱۳). موش‌های آلوده با گاز گرفتن انسان موجب عفونت در آن می‌شوند. تشخیص بیماری بر اساس کشت خون، چرک، غدد لنفاوی یا جراحات مفصلی و جدا سازی باکتری در محیط کشت غنی شده با خون یا سرم صورت می‌گیرد. همچنین می‌توان بیماری را به وسیله آزمایش

سروآگلوتیناسیون تشخیص داد (۴). کنترل جمعیت موش‌های صحرایی، اقدام اولیه جلوگیری از بیماری می‌باشد. دیگر اقدامات مهم شامل پاستوریزه کردن شیر و محافظت مواد غذایی در مقابل جوندگان می‌باشد. موش‌های آزمایشگاهی و دیگر حیوانات آزمایشگاهی بایستی در سالن‌های مجزا نگهداری شوند (۱۲، ۱۳). روش PCR به‌عنوان Golden test از سوی FELASA جهت بررسی آلودگی به این باکتری معرفی گردیده است. با پایش بهداشتی، نوع آلودگی تعیین و شدت و میزان آن مشخص و در صورت مواجهه با عوامل بیماری‌زای خاص، اقدامات کنترلی به‌صورت جدی بایستی انجام گیرد. بر اساس استانداردهای FELASA، پایش بهداشتی عوامل بیماری‌زای باکتریایی، مایکوپلاسمایی، انگلی و ویروسی به ویژه عواملی که باعث ایجاد بیماری‌های خطرناک در انسان می‌شوند، در فواصل معین باید صورت گیرد. ضمن این که بسیاری از عوامل عفونت‌زا علاوه بر ایجاد بیماری در انسان و حیوانات، باعث آلودگی در فرآورده‌های بیولوژیک نظیر سرم و رده‌های سلولی به‌دست آمده از حیوانات می‌شوند.

حیوانات آزمایشگاهی بایستی برای گروه خاصی از عوامل بیماری‌زا پایش شوند. این عوامل یا بر اساس توصیه‌های انجمن بین‌المللی FELASA و یا بر اساس نوع محصول تولیدی در هر بخش، مشخص می‌شوند. چرا که میکروارگانیسم‌های مداخله‌گر در آزمایش‌های کنترل سرولوژیکی هر محصول، با محصولات دیگر ممکن است متفاوت باشد (۱، ۱۴، ۱۵). از آنجایی که تاکنون هیچ‌گونه تحقیقی بر روی این باکتری در حیوانات آزمایشگاهی ایران گزارش نشده است، لذا نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند به‌عنوان الگویی در تشخیص این باکتری برای پایش بهداشتی حیوانات آزمایشگاهی مراکز پرورشی مؤثر باشد. از آنجا که تاکنون استانداردهای بین‌المللی در مورد تعیین آلودگی حیوانات آزمایشگاهی در ایران صورت نگرفته است. در این تحقیق به بررسی آلودگی کلنی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH مؤسسه رازی به این باکتری پرداخته شده است. این نژاد از موش، بیشترین مصرف را در کارهای تحقیقاتی به خود اختصاص داده است.

شکل ۱- راش‌های پوستی و کهیر، متعاقب بیماری تب گازگرفتگی موش (۶)

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه: از آنجا که تاکنون هیچ‌گونه بررسی در مورد این باکتری در این مرکز صورت نگرفته است و با توجه به دستورالعمل FELASA، جهت بیشترین تعداد نمونه‌برداری، کمترین احتمال حضور باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* در کلنی، و احتساب ۱۰ درصد شیوع آلودگی در کلنی حیوانات در نظر گرفته شد. بر اساس بالاترین سطح اطمینان

(۹۹/۹ درصد)، به تعداد ۶۶ نمونه از مجموع ۱۲۵۰ حیوان موجود در کلنی پرورشی احتیاج است. در این تحقیق، این تعداد نمونه از کلنی موش آزمایشگاهی نژاد NIH، از هر دو جنس و به‌صورت تصادفی انتخاب گردید و مورد پایش این باکتری قرار گرفتند (جدول ۱) (۱). موش‌ها از نظر ظاهری سالم و در آزمایشات انگل‌های خارجی منفی بوده و بیماری خاصی نداشتند. حیوانات از غذای فشرده (پلت) استاندارد موش‌های آزمایشگاهی (۱۹/۵ درصد پروتئین، ۱۳۶۵ Kcal/lb انرژی، ۴/۵ درصد چربی، ۳/۸ درصد فیبر خام، ۱/۲ درصد کلسیم، ۰/۴ درصد فسفر، ۱۷/۸ IU/kg ویتامین E و mg/kg ۱۴/۵ ویتامین A) و آب به میزان دلخواه استفاده می‌کردند (۱۶). سیستم پرورش موش‌ها از نوع متعارفی (Conventional) و در قفس‌های جعبه کفشی (Shoe box) تیپ ۲ از جنس پلی‌کربنات و در هر قفس دو سر موش ماده و یک سر نر نگه‌داری می‌شدند. بعد از زایمان و پس از دوره شیرواری ۲۱ روزه، نوزادان جدا و پس از تعیین جنسیت به قفس‌های دیگر منتقل می‌شدند. از تراشه (پوشال) استریل چوب درخت سپیدار به‌عنوان بستر استفاده می‌گردید. تعویض قفس و پوشال دو مرتبه در هفته صورت می‌گرفت. درجه حرارت سالن پرورشی ^{o}C ۲۴-۲۲، میزان رطوبت ۵۵-۴۵ درصد ، میزان تهویه هوا ۱۰-۸ مرتبه سه دقیقه‌ای در ساعت و دوره روشنایی/ تاریکی به‌صورت ۱۲:۱۲ ساعت در شبانه روز و میزان شدت نور کمتر از ۳۲۵ Lux بود (۲، ۳).

جدول ۱- فرمول محاسبه تعداد حیوان بر طبق دستورالعمل FELASA (۷)

$$\text{تعداد نمونه} = \frac{Log\ 0.05}{Log\ N}$$

N= درصد حیوانات غیر آلوده

ضریب اطمینان ۹۵ ٪ = ۰/۰۵

میزان شیوع احتمالی (٪)	تعداد نمونه‌های مورد نیاز با در نظر گرفتن درصد اطمینان مختلف		
	٪ ۹۵	٪ ۹۹	٪ ۹۹/۹
۱۰	۲۹	۴۴	۶۶
۲۰	۱۴	۲۱	۳۱
۳۰	۱۰	۱۳	۲۰
۴۰	۶	۱۰	۱۴
۵۰	۵	۷	۱۰

آماده‌سازی نمونه‌ها: با رعایت کامل اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی، پس از بیهوش نمودن موش‌ها با ترکیب کتامین (Ketamine) به میزان ۷۵mg/kg و زایلازین (Xylazine) به میزان ۱۰mg/kg انجام گردید. نمونه‌ها از ترشحات نازوفارنکس تک‌تک موش‌ها با سواب استریل به‌صورت جداگانه تهیه و به‌طور مستقیم در داخل میکروتیوپ قرار داده شده و تا زمان آزمایش در تانک ازت مایع نگهداری شدند (۲، ۳، ۴، ۱۷، ۱۸). روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گردید. جهت رعایت کامل موارد استریلیتی، تمام کارهای نمونه‌برداری و انجام روش PCR، در زیر دستگاه لامینار فلو انجام گردید (۱۴، ۱۵).

طراحی و تهیه نمونه جهت کنترل مثبت: طراحی توالی مناسب و محافظت شده از باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* جهت شناسایی

تمامی گونه‌های موجود در بانک ژن صورت گرفت. جهت طراحی پرایمر، از کلون توالی ژن 16SrRNA موجود در بانک ژن NCBI و نرم افزار Kalign، استفاده گردید. جهت تهیه کنترل مثبت از قطعه bp ۲۹۶ و Primer F:´5-GCT TAA CAC ATG Primer R:´5-AGT AAG و CAA ATC TAT-´3 GGC CGT ATC TCA-´3 به داخل پلاسمید pGEM-T easy vector و تکثیر آن با ترانسفورمیشن در باکتری *E.coli* استفاده شده است (۱۴، ۱۵). از سویه باکتری لیوفیلیزه *E.coli* 2163 GM که در محیط LBB، کشت و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد، استفاده گردید و طبق پروتکل، Competent cell از آن تهیه گردید (۱۴، ۱۵، ۱۹، ۲۰). سنتز ژن و کلون آن در پلاسمید توسط شرکت سیناکلون انجام شد. استخراج پلاسمید توسط کیت Accuprep® Nano-Plasmid Extraction Plus Mini کمپانی Bioneer خریداری شده از شرکت سینا کلون طبق دستورالعمل ذیل صورت گرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA از نمونه‌های تهیه شده بر طبق پروتکل کیت Dyna Bio تکاپوزیست صورت گرفت.

انجام PCR: انجام PCR در دستگاه Thermocycler gradiant Eppendorf انجام گرفت. واکنش با یک حجم نهایی ۲۵µl انجام گردید و محلول‌های به‌کار رفته و غلظت آنها مطابق جدول ۲ بود. بعد از انجام PCR، تخلیص محصول انجام گرفت. جهت تعیین توالی، به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. پس از بهینه‌سازی شرایط مطلوب برای PCR، بهترین شرایط به شرح ذیل به‌دست آمد: Initial Denaturation با دمای ^{o}C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل بعدی به‌صورت: Denaturation با دمای ^{o}C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، Annealing با دمای ^{o}C ۵۲ به مدت ۱ دقیقه، Extending با دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و Final Extending با دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه.

الکتروفورز: جهت تعیین باند محصول PCR، الکتروفورز انجام شد. از DNA marker، ۱۰۰ bp استفاده گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری، به خوبی مخلوط و به داخل چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد حاوی رنگ Sybr safe ریخته شد. حجم ژل ۱۰۰ میلی‌لیتر و میزان رنگ ۲ میکرولیتر بود. نهایتاً الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه انجام گرفت. پس از پایان زمان الکتروفورز، ژل بر روی دستگاه UV–Transilluminator قرار داده شد و مورد بررسی و عکس‌برداری قرار گرفت (۲۱).

جدول ۲- اجزای مختلف PCR (۲۱)

غلظت نهایی	حجم بکار رفته	غلظت مواد بکار رفته
۱ X	۲/۵ µl	PCR buffer $_{10\ X}$
۰/۲ Mm	۰/۵ ml	dNTP mix (۱۰mM)
۰/۴ µM	۱ ml	F- Primer (۱۰µM)
۰/۴ µM	۱ ml	R- Primer (۱۰ µM)
-	۰/۱۲۵ µl	Taq (۱U)
۲ mM	۲ µl	$MgCl_2$ (۲۵mM)
-	۱ µl	Template DNA
-	۱۶/۸۷۵ µl	آب مقطر دو بار تقطیر
-	۲۵ µl	مقدار کل

نتایج

از تعداد ۶۶ نمونه نازوفارنکس اخذ شده برای

بررسی آلودگی به باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس*، هیچ نمونه مثبتی به دست نیامد (شکل‌های ۲ و ۳).

شکل ۲- نتایج PCR پایش موش‌های NIH برای باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس*.
(L: Ladder 100bp, C-: Negatie Control, C+: Positive Control, S_1-S_{17}: Samples)

شکل ۳- نتایج PCR پایش موش‌های NIH برای باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس*.
(L: Ladder 100bp, C-: Negatie Control, C+: Positive Control, S_{52}-S_{66}:Samples)

بحث

موش‌ها به دلیل اینکه می‌توانند مخزن و یا حامل بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی باشند، نقش مهمی در بهداشت عمومی دارند. از جمله بیماری‌هایی که توسط موش و از طریق ایجاد آلودگی مواد غذایی، آبی یا منابع دیگر قابل انتقال به انسان می‌باشند می‌توان از سالمونلوز، لپتوسپیروز، تب گازگرفتگی موش، پنومونی و بیماری‌هایی نظیر طاعون و یا تیفوس را نام برد. انتقال عوامل این بیماری‌ها به انسان می‌تواند از طریق تماس مستقیم، تماس با ادرار و مدفوع آلوده موش و یا از طریق نیش حشرات و بندپایان و نیز گازگرفتگی صورت گیرد. موش‌های صحرایی و وحشی به‌عنوان مخزن طبیعی باکتری

استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس، مطرح می‌باشند. پایداری این باکتری در موش‌های آزمایشگاهی در گزارشات مختلف، محدوده ۶-۰ ماه را نشان می‌دهد. موش‌های وحشی می‌توانند باعث آلودگی محیط و مواد غذایی انسان شوند و بهداشت عمومی را به خطر اندازند. بنابراین کنترل منظم جوندگان ضروری می‌باشد (۷، ۸، ۱۳). در مورد شیوع تب گازگرفتگی موش در کشورهای غربی، گزارشات زیادی وجود دارد. Abdulaziz و همکاران در سال۲۰۱۶ از یک خانم مبتلا به پلی‌آرتریت، باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* را از طریق کشت جدا کردند و در همین گزارش آمده است که میزان مرگ و میر حدود ۱۳-۷ درصد با علائم پیچیده و ۵۳ درصد با علائم اندوکاردیت همراه بوده است. همچنین از جداسازی این باکتری از مایع مفصلی که در بیماران همراه با تب، راش و افزایش پلی مورفونوکلئرها بوده، گزارش شده است (۲۲). از آن جایی که جدا سازی و شناسایی باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* با روش‌های کلاسیک باکتریولوژی بسیار دشوار گزارش شده است، لذا جهت تشخیص می‌توان از روش PCR و الایزا استفاده کرد (۴، ۱۴، ۱۵). امروزه در مراکز بزرگ تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، نظیر Taconicو Charles River، انجام آزمایش تشخیص باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* به روش PCR هر شش هفته انجام می‌شود. در ایران تا کنون هیچ‌گونه تحقیقی بر روی این باکتری و بیماری تب گازگرفتگی انجام نشده است (۳، ۱۲). McKee و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی فردی که دچار تب‌های مکرر و آرتریت شدید شده بود تحقیقاتی انجام دادند. آنها با کشت باکتری از نمونه‌های خون بیمار متوجه وجود باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* شدند و برای درمان بیمار از پنی‌سیلین G استفاده کردند (۶). Eisenberg و همکاران در سال ۲۰۱۶ تب گازگرفتگی را از طریق کشت و جداسازی باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس*، انجام آزمایش‌های هماگلوتینیشن، ایمنوفلورسانس و PCR تشخیص دادند (۲۳). Nei و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی بیماری عفونی ناشی از *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* تحقیقی انجام دادند. آنها بر روی بیمارانی که به صورت ظاهری هیچ‌گونه سابقه گازگرفتگی توسط موش‌ها نداشتند ولی علائم آرتروز و روماتوئید را نشان می‌دادند، بررسی انجام دادند. آنها به این نتیجه رسیدند، افرادی که در معرض گازگرفتگی موش‌ها و دیگر جوندگان قرار می‌گیرند به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم احتمال ابتلا به بیماری آرتریت روماتوئید را دارند (۱۰). Hansen و Nielsen در سال ۲۰۱۵ در بررسی‌های باکتریولوژیکی بر روی حیوانات آزمایشگاهی به نقش عوامل محیطی در بروز عفونت‌ها به نتایج مهمی دست یافتند. از جمله این‌که استرس‌های محیطی مانند افزایش میزان آمونیاک محیط یا کاهش ویتامین A و یا E که باعث بیماری‌های تنفسی با منشأ مایکوپلاسماها در رت‌ها می‌شوند، در بروز بیماری‌های عفونی دخیلند (۴، ۲۴). تهویه هوا در سالن‌های پرورش حیوانات آزمایشگاهی نقش بسیار اساسی دارد. تهویه کم ممکن است باعث بیماری‌های تنفسی با عفونت‌های باکتریایی گوناگون خصوصاً در حیوانات با سیستم ایمنی کاهش‌یافته گردد (۱، ۲، ۴، ۱۳). در این تحقیق آلودگی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH به باکتری *استرپتوباسیلوس مونیلی‌فورمیس* مورد بررسی قرار گرفت که تمام نتایج منفی بودند و نشان‌دهنده این است که شرایط نگهداری، پرورش و تولید موش‌های آزمایشگاهی این مرکز مطابق با استانداردهای معتبر نظیر FELASA می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی با عنوان

پـایش بهداشـتی مـوش‌هـای آزمایشـگاهی تولیـدی مؤسسـه رازی بـه عوامـل باکتریـایی، مایکوپلاسـمایی، ویروسـی و انگلـی بـا کـد مصـوب ۹۴۵۴-۱۸-۱۸-۰۱ مـی‌باشـد و بـدین‌وسـیله از کلیـه همکـاران بخـش‌هـای تولیـد و پـرورش حیوانـات آزمایشـگاهی و تحقیقـات بیماری های زنبـور عسـل، کـرم ابریشـم و حیـات وحـش مؤسسـه تحقیقـات واکسـن و سـرم‌سـازی رازی تشـکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, *et al.* FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim*. 2014; 48:178-192.

2- Fallahi R, Mansouri MA. Biology, Breeding, Diseases and Principles of Working to Laboratory Animals. *First edition, Razi Vaccine and Serum Research Institute Publication*. 2015, P: 44-49 [In Persian].

3- Fallahi R, Mansouri, MA. Health monitoring of Razi Institute laboratory mice (NIH strain) to *Clostridium piliforme* in 1395. *Vet. Res. and Biol. Prod*. 2017; 117:78-84 [In Persian].

4- Hansen AK, Nielsen DS. Handbook of laboratory animal bacteriology, 2nd edition, 2015; CRC Press.

5- Elliott SP. Rat Bite Fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin. Microbial. Rev*. 2007; 20(1): 13–22.

6- McKee G, Pewarchuk J. Rat-bite fever. 2013; Can. Med. Ass. J. 185(15): 1346.

7- Suzuki K, Hirai Y, Morita F, Nakamura A, Uehara Y, Naito T. *Streptobacillus moniliformis* bacteremia in a pet shop employee: Case report and literature review. *Open Forum Infec*. Dis. 2017; 1-3.

8- Zhang WW, Hu YB, He GX, Zhou Y, Hong L, Ding JG. Rat bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis* infection in a Chinese patient. *BMC Infec. Dis*. 2019; 19(637): 1-5.

9- Balakrishnan N, Menon T, Shanmugasundaram S, Alagesan R. *Streptobacillus moniliformis* endocarditis. *Emerg. Infect. Dis*. 2006; 12(6): 1037-1038.

10- Nei T, Sato A, Sonobe K, Miura Y, Takahashi K, Saito R. *Streptobacillus moniliformis* bacteremia in a rheumatoid arthritis patient without a rat bite: a case report. BMC Res. *Notes*. 2015; 8(694): 1-5.

11- DORA. (Diseases of Research Animals), Mice diseases, Comparative Medicine Program and IDEXX-BioAnalytics. 2020; University of Missouri.

12- Fox JG, Anderson LC, Low FM, Quimby FW. Laboratory Animal Medicine. 2ed, 2002; Academic Press.

13- Hubrecht R., Kirkwood J. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. 8th ed, 2010; The Universities Federation for Animal Welfare; Wiley-Blackwell; Hoboken, NJ, USA.

14- Andre JM, Freydiere AM, Benito Y, Rousson A, Lansiaux S, Kodjo A, *et al.* Rat bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis* in a child: human infection and rat carriage diagnosed by PCR. *J. Clin. Pathol*. 2005; 58:1215–1216.

15- Boot R, Oosterhuis A, Thuis HCW. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab. Anim*. 2002; 36: 200–208.

16- NRC. (National Research Council, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture), Nutrient Requirements of Laboratory Animals. *Fourth Revised Edition*. 1995; National Academy Press Washington, D.C.

17- Nuffield Council on Bioethics. Ethics of research involving animals. 2005; 28 Bedford Square London, WC1B 3JS.

18- Fish RRE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. Second Edition, 2008; American College of Laboratory Animal Medicine.

19- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA. Current Protocols in molecular biology. 2003; John Wiley and Sons, Inc.

20- Seidman CE, Stuhl K, Sheen J, Jessen T. Introduction of plasmid DNA into Cells, Plasma DNA into cells. *Current protocols in Molecular Biology*. 1997; 37: 1.8.1-1.8.10.

21- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

22- Abdulaziz H, Touchie C, Toye B, Karsh J. Haverhill fever with spine involvement. *J. Rheumatol*. 2006; 33(7):1409-1410.

23- Eisenberg T, Ewers D, Rau J, Akimkin V, Nicklas, W. Approved and novel strategies in diagnostics of rat bite fever and other streptobacillus infections in humans and animals. *Virulence*. 2016; 7(6): 630–648.

24- Piasecki T, Chrzastek K, Kasprzykowska U. Mycoplasma pulmonis of rodents as a possible human pathogen. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2017; 17(7): 275-477.

Survey of Razi Institute NIH Laboratory mice to *Streptobacillus moniliformis*, the causative agent of rat bite fever

Roozbeh Fallahi

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

Receive: April 6, 2021; Revise: July 21, 2021; Accept: August 3, 2021

Summary

One of the most important and dangerous bacterial diseases in colonies of mice is rat bite fever. This disease can be transmitted to humans. According to international standards, in the event of a confrontation, control measures, combat and possibly eradication and remove the colony should be taken. The disease caused by Streptobacillus moniliformis bacteria. Symptoms of the disease in humans include high fever, chills, polyarthritis, and skin inflammation. So far, international standards for determining the infection of laboratory animals with this infectious agent have not been performed in Iran. In this study, the prevalence of this bacterium, in the colony of Razi Institute NIH Laboratory mice was studied in 1398. Number of 66 mice from a breeding colony were randomly selected and were examined by PCR method for presence of this bacterium. No positive samples were observed. According to the instructions used, it can be concluded that with 99.9% confidence, there was no infection with Streptobacillus monilioformis in breeding facilities. The result of this study shows that the observance of hygiene items in this center is done well. However, periodic and continuous monitoring of this bacterium and other important infectious agents should be performed.

Key words: *Infection, NIH mouse, Rat bite fever, Streptobacillus moniliformis*

سنتز نانوذرات تیتانیوم با استفاده از عصاره گیاه مرزه به روش فراصوت؛ اثرات ضد میکروبی بر ضد پاتوژن‌های غذازاد و سمیت سلولی بر سلول‌های نرمال و سرطانی

راضیه پرتوی[۱]، فتانه نارچین*[۲]، عاطفه عراقی[۳]

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۲- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۶ تیر ۱۴۰۰، بازنگری: ۷ شهریور ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۴۰۰

چکیده

سنتز سبز نانوذرات مزایایی دارد که می‌توان به اجتناب از مواد شیمیایی خطرناک، پروسه تمیز، غیر سمی، دوستدار محیط زیست، آماده سازی آسان، به صرفه بودن و کنترل بر اندازه و شکل ذرات اشاره کرد. در این مطالعه ابتدا عصاره آبی گیاه مرزه ریشنگری تهیه شد و نانوذرات تیتانیوم به روش سبز و فراصوت تولید شد. سپس به منظور شناسایی نانوذرات از آنالیز UV، طیف سنجی تفکیک انرژی EDS و آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی استفاده گردید. سپس MIC و MBC نانوذرات بر ضد پاتوژن‌های *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا منوسیتوژنز* و سمیت سلولی نانوذرات در رقت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT-29) و سلول‌های نرمال (HEK-293) ارزیابی شد. محلول حاوی نانوذرات با جذب در ناحیه ۳۵۲ نانومتر نشان‌دهنده سنتز نانوذرات تیتانیوم توسط عصاره آبی گیاه مرزه بود. در محلول کلوئیدی نانوذرات، اشکال نانوذرات کروی مشاهده شد که از نظر اندازه از ۳۷/۴ تا ۴۹/۶ نانومتر بودند. نانوذرات در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب مهار رشد *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشرشیاکلی* شد. نانوذرات تیتانیوم سنتز شده در این مطالعه اثرات سمی بر سلول‌های نرمال نداشت، در حالی که در غلظت ۱۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر مانع رشد حدود ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی شد. نتایج این مطالعه، نگرانی‌ها بابت خطرات استفاده از نانوذرات تیتانیوم را کم کرده و زمینه را برای استفاده بیشتر این ماده در بسته‌بندی مواد غذایی به منظور افزایش مدت ماندگاری فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: *سمیت سلولی، سنتز سبز، ضد میکروبی، نانوذرات تیتانیوم، مرزه*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: fa.narchin@yahoo.com

مقدمه

اخیراً نگرانی‌ها در رابطه با بیماری‌های غذازاد افزایش یافته و این موضوع را به یک معضل بهداشت عمومی تبدیل کرده است. علیرغم تمام پیشرفت‌ها در تکنیک‌های بهداشت و سیستم‌های نظارتی و توسعه زنجیره سرد، آلودگی مواد غذایی با میکروارگانیسم‌های نامطلوب یک خطر بالقوه در حین فرآوری، ذخیره سازی و توزیع مواد غذایی می‌باشد (۱).

نانوذرات به دلیل داشتن ویژگی‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد سرطانی و نیز دارا بودن کاربردهایی در کشاورزی، غذا، درمان و مواد آرایشی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. از نانوذرات در زمینه‌هایی مانند تصحیح ژن‌های معیوب (۲)، ممانعت از تکثیر ژنوم ویروسی (۳)، مرگ سلول سرطانی (۴) و ترمیم متابولیسم سلولی (۵) بهره گرفته می‌شود. نانوذرات با اندازه‌ها، مورفولوژی و اجزای سازنده و بار سطحی متفاوت، ویژگی‌های ضد میکروبی متفاوتی دارند که به توانایی آنها در تولید گونه‌های اکسیژن فعال و آزادسازی یون‌ها از نانوذرات بر می‌گردد (۶). این وقایع موجب آسیب اکسیداتیو به ساختار سلول می‌شود (۷). چندین روش سنتز نانوذرات مانند روش‌های احیای سونوکمیکال (۸)، نابودی حرارتی (۹)، احیای شیمیایی (۱۰) و روش‌هایی با استفاده از امواج مایکروویو (۱۱) شناخته شده است. معایب این روش‌ها شامل تولید کم محصول، استفاده از مواد شیمیایی سمی و تولید محصولات خطرناک می‌باشد. جوامع پیشرفته‌تر ترجیح می‌دهند که غذاهای بدون مواد سنتتیک افزوده مصرف کنند (۱۲). بنابراین محققان بر سنتز سبز نانوذرات تأکید کرده‌اند. سنتز سبز مزایایی دارد که می‌توان به اجتناب از مواد شیمیایی خطرناک، پروسه تمیز، غیر سمی، دوستدار محیط زیست، آماده‌سازی آسان، به صرفه بودن و کنترل بر اندازه و شکل ذرات اشاره کرد (۱۳). در سال‌های اخیر استفاده از عصاره گیاهان برای تهیه‌ی نانوذرات فلزی به‌عنوان یک جایگزین آسان و مناسب برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است. گیاهان زیادی وجود دارند که قابلیت ساخت نانوذرات و استفاده در چنین صنعت ارزشمند و گران‌بهایی را دارند، ولی هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند. با استفاده از عصاره گیاهان، نانوذرات در یک واکنش یک مرحله‌ای و بدون نیاز به سورفاکتانت و سایر مواد تثبیت کننده و متابولیت‌های شیمیایی مؤثر تولید می‌شوند و نیز به محافظت از محیط زیست و کاهش خطر برای انسان، طبیعت، هوا و اکوسیستم کمک می‌کند (۱۴، ۱۵).

گیاه مرزه (Satureja) متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشد که در منطقه مدیترانه پراکنده می‌باشد. در ایران، ۱۴ گونه از این گیاه در شمال، شمال غرب و نواحی غربی کشور یافت می‌شود. Satureja rechingeri یک گونه جدید در ایران است که ارتباط آن با S. khuzistanica و S. edmondi و S. macrantha قبلاً گزارش شده است. روغن این گیاه خصوصیات درمانی زیادی دارد که به دلیل میزان بالای کارواکرول در آن می‌باشد (۱۶). این گیاه یک گونه نادر و بومی در ایران است. این گیاه چندساله، انبوه و معطر بوده که تا ۵۰ سانتی‌متر ارتفاع پیدا می‌کند و دارای گل‌های زرد رنگ می‌باشد. این گیاه دارای متابولیت‌های ثانویه مانند روغن‌های فرار، ترکیبات فنولیک، تانن‌ها، قندها و اسیدهای چرب می‌باشد. بخش‌های هوایی این گیاه به‌طور وسیع در غذاها و دمنوش‌ها به‌عنوان ماده طعم‌دهنده و نیز در درمان گرفتگی عضلات، دردهای عضلانی، تهوع، سوء هاضمه، اسهال و بیماری‌های عفونی کاربرد دارد (۱۷). کارواکرول به عنوان ترکیب اصلی موجود در عصاره مرزه می‌تواند

محل‌های اتصال را شلاته کند و یون‌های فلزی را احیا کند که موجب تولید ایمن نانوذرات نقره از طریق سنتز سبز می‌شود که می‌تواند به‌عنوان یک ماده ضد میکروب ایمن استفاده شود (۱۸). کواکبی و همکاران (۲۰۲۱) فیلم نانوذرات نقره را با استفاده از پلی وینیل الکل و عصاره مرزه به منظور بسته‌بندی مواد غذایی ساختند و تازگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بسته‌بندی شده با این فیلم را در مدت ۱۴ روز در دمای یخچالی بررسی کردند. این محققین نشان دادند که نانوذرات سنتز شده به روش اولتراسوند و فیتوکمیکال توانستند تعداد باکتری‌های مزوفیل را در فیله ماهی در روز ۷ به ترتیب در ۲/۱ و ۲ log cfu/g حفظ کنند (۱۸). شیری پور و همکاران (۲۰۲۰) سنتز سبز نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره آبی گیاه مرزه انجام داده و نتایج تحقیق نشان داد که این نانوذرات می‌توانند به‌عنوان یک داروی ضد سرطان برای درمان سرطان معده مورد استفاده قرار گیرد (۱۵).

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم کاربردهای وسیعی از جمله کاهش سمیت رنگ‌ها و داروها، تصفیه فاضلاب، تولید مثل کرم ابریشم، کاربردهایی در زمینه فضا، صنعت غذا و ... دارد (۱۹). نانوساختارهای تیتانیوم به‌عنوان سیستم‌های عرضه موضعی دارو در رابطه با داروهای استئوپروز، ضد سرطان و آنتی‌بیوتیک‌ها کاربرد دارد. علاوه بر این، این نانوذرات و مشتقات آن به‌عنوان مواد ضد میکروبی نوظهور بر ضد پاتوژن‌های انسانی کاربرد دارد (۲۰). انواع متنوعی از گیاهان و بخش‌های مختلف آنها به منظور تولید نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مورد استفاده قرار گرفته است که از جمله این گیاهان می‌توان به ریشه‌های *آکانتوفیلوم لاکسیوسکولوم*، برگ‌های آلوئه ورا، پوست *آنونا اسکوآموسا*، گل *کالوتروپیس ژیگانتیا* و دانه نخود اشاره کرد (۲۱).

براساس دانش نویسندگان، تاکنون مطالعه ای در رابطه با سنتز نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با استفاده از عصاره گیاه *S. rechingeri Jamzad* انجام نشده است. هدف از اجرای طرح حاضر ارزیابی اثرات ضد میکروبی نانوذرات تیتانیوم سنتز شده به روش سبز از عصاره مرزه بر ضد پاتوژن‌های غذازاد و نیز بررسی اثرات سمیت سلولی این ترکیبات به منظور استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی و افزایش مدت ماندگاری غذا و دارو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره مرزه: اندام‌های هوایی در مرحله گلدهی از گیاه مرزه ریشنگری (*Saturaja rechengri Jamzad*) از منطقه خرمان در استان لرستان جمع‌آوری گردید. پس از خشک کردن، گیاه در سایه به پودر تبدیل شد. برای تهیه عصاره آبی مقدار ۵ گرم از پودر گیاه توزین شد و پس از حل کردن در ۸۰ میلی‌لیتر آب دوبار یونیزه شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با کاغذ صافی واتمن شماره دو صاف شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه نانوذرات تیتانیوم: سنتز نانوذرات تیتانیوم با استفاده از اصول شیمی سبز انجام شد. در این روش نمک تیتانیوم (IV) اکسید (TiO_2) (مرک، آلمان) با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار تهیه شد: مخلوط ۱ به ۴ از عصاره و محلول تیتانیوم (IV) اکسید مخلوط شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تابش فراصوت با شدت ۴۰Hz و بدون نور قرار داده شد. تغییر رنگ از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای نشان‌دهنده سنتز نانو ذرات تیتانیوم بود. رسوب حاصل از برهمکنش عصاره آبی گیاه و یون تیتانیوم، سه بار و با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ گردید و در هر

مرحله با آب دیونیزه شستشو شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌های شناسایی نانوذرات تیتانیوم

آنالیز UV: با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (V-670, Spectrophotometer JASCO) در دامنه ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر به دلیل جذب تیتانیوم در این محدوده، طیف‌های جذبی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (۱۴).

طیف سنجی تفکیک انرژی SDE: آنالیز تفکیک انرژی نیز برای تعیین ترکیب درصد نانو ذرات سنتز شده مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی: از میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقال الکترونی (SEM-TEM) که راه‌هایی برای مشاهده مستقیم نانوذرات هستند، جهت بررسی اندازه و همچنین ریخت‌شناسی سطحی نانوذرات تیتانیوم استفاده شد. برای این منظور، یک لایه از رسوب بر روی شبکه فیلم کربن قرار داده شد و توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) در دمای اتاق عکس‌برداری شد. علاوه بر این، برای تعیین شکل و اندازه نانوذرات، لایه نازکی از رسوب، بر روی ورق طلا قرار داده شد و تحت فشار خلأ (۸-۵ Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (XL30, Philips, Japan) عکس‌برداری شد (۱۴).

سویه‌های میکروبی و آماده‌سازی دوز تلقیح باکتری‌ها: کشت‌های لیوفیلیزه شده از باکتری‌های *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا منوسیتوژنز* از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. کشت اولیه باکتری‌ها به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI براس تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. همین پروسه یک بار دیگر تکرار شد. یک لوپ از باکتری‌ها از کشت دوم در محیط BHI براس دیگری کشت داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت، سوسپانسیون باکتری به جذب نوری یک دهم در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسانده شد. سپس آن کشت میکروبی را در محیط BHI آگار کشت داده و شمارش گردید (۲۲).

تعیین حداقل غلظت مهاری رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری: برای تعیین MIC و MBC از روش میکرودایلوشن استفاده شد (۲۳). میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استریل برای این منظور مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور حل شدن مواد از ۰/۰۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید استفاده گردید. رقت‌سازی سریالی با استفاده از محیط BHI براس انجام شد. رقت‌سازی از ۵ تا ۰/۰۰۲ درصد انجام شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌ها را به میکروپلیت‌ها اضافه کرده و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری که به تعداد 1×10^5 cfu/ml رسیده است اضافه شد. به منظور بررسی صحت انجام کار چاهک‌های کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از ماده که بتواند موجب مهار رشد باکتری مذکور گردد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. کمترین غلظت کشنده باکتری براساس روش سلیکتاس و همکاران (۲۰۰۷) به‌دست آمد (۲۴). از تمام خانه‌هایی که مهار رشد از خود نشان داده بودند، ۱۰ میکرولیتر برداشته شد و در محیط BHI آگار پخش شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. کمترین غلظت ماده که هیچ باکتری در محیط کشت رشد نکرده باشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسی سمیت سلولی (Microculture Tetrazolium Test): بررسی سمّیت سلولی نانوذرات تیتانیوم با روش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide) انجام شد (۲۵). به‌طور خلاصه، تعداد ۵ هزار سلول در هر چاهک ۹۶ تایی پلیت سلولی اضافه شد و رقت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات در زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT-29) و سلول‌های نرمال (HEK-293) افزوده شد. رده‌های سلولی از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. بعد از گذشت مدت زمان مورد نظر، محلول رویی محیط کشت دور ریخته شد و سلول‌ها با محلول رنگ MTT ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS به مدت ۴ ساعت تحت شرایط دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از محلول‌سازی فرمازان با ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه قرائت‌خوان الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika) خوانده شد. سپس رنگ MTTجداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده باسلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شدند. در نهایت، میزان بقای سلول به‌کمک فرمول زیر محاسبه گردید:

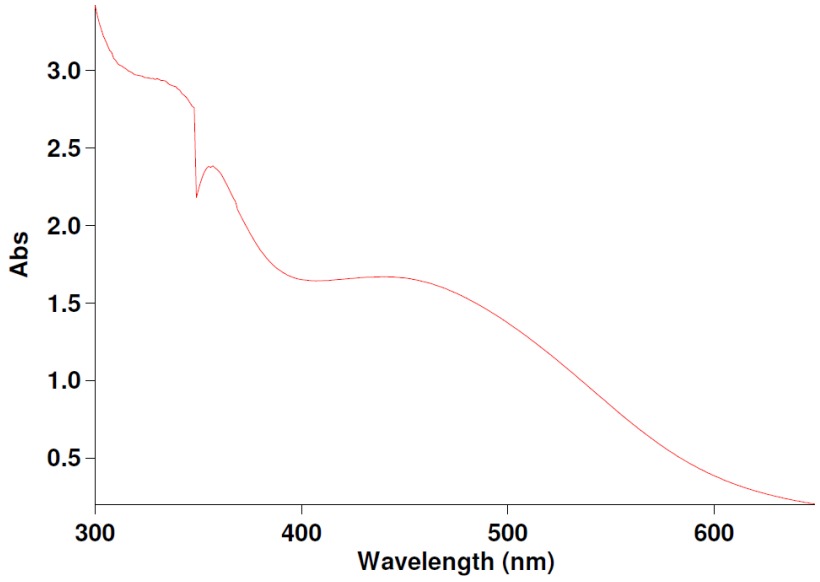
(جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری سلول‌های تیمار شده) = میزان بقای سلولی ×100

سپس میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC50) نیز محاسبه شد.

آنالیز آماری: IC_{50} با آنالیز رگرسیون با استفاده از نرم‌افزار Prism-6 (Graphpad software Inc, Ca, US) به‌دست آمد.

نتایج

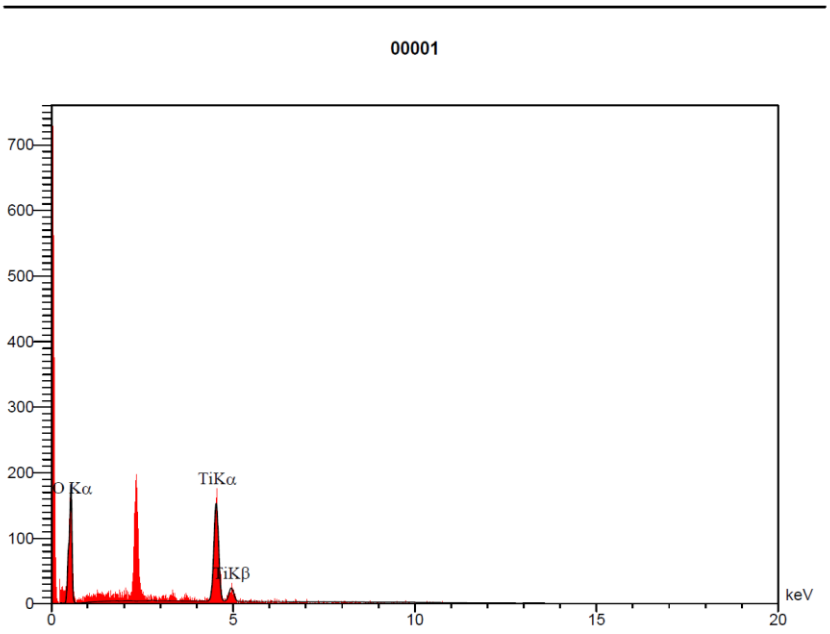
آنالیز UV: به منظور اندازه‌گیری جذب تیتانیوم از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد. در شرایط فراصوت تغییر رنگ نمونه مشاهده گردید که این تغییر رنگ در شرایط استرینگ بسیار سریع و واضح بود. محلول حاوی نانوذرات سنتز شده با جذب در ناحیه ۳۵۲ نانومتر نشان از سنتز نانوذرات تیتانیوم توسط عصاره آبی گیاه مرزه بود (شکل ۱).



شکل ۱- طیف جذب UV برای نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

طیف سنجی تفکیک انرژی SDE: طیف SDE برای نمونه حاوی نانوذرات تیتانیوم انجام

گرفت و حضور عناصری مانند تیتانیوم و اکسیژن را نشان داد که فلز تیتانیوم دارای ۳۳/۳ درصد تولید بود (شکل ۲).



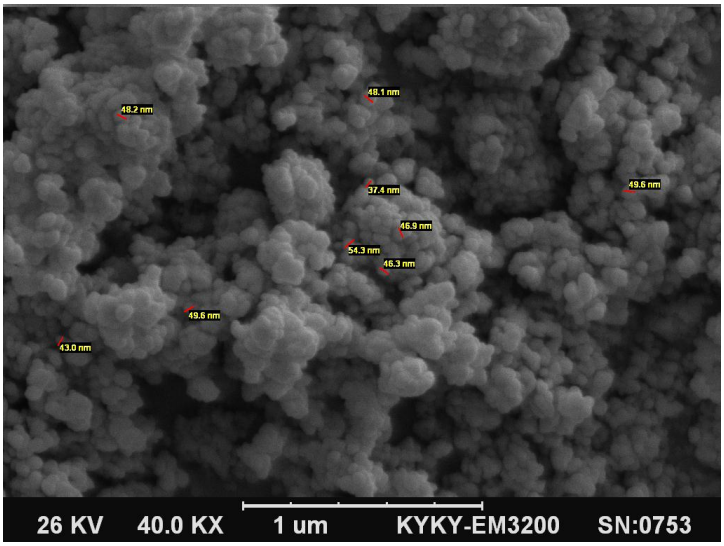
Quantitative Results

Elt	Line	Int	Error	K	Kr	W%	A%	ZAF	Formula	Ox%	Cat#
O	Ka	40.8	7.3249	0.3717	0.1682	66.70	85.71	0.2520		0.00	0.00
Ti	Ka	77.1	1.0364	0.6283	0.2842	33.30	14.29	0.8532		0.00	0.00
				1.0000	0.4524	100.00	100.00			0.00	0.00

شکل ۲- طیف EDS به منظور تعیین ترکیب درصد فلز تیتانیوم

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی: بررسی ساختار و مورفولوژی نانوذرات و همچنین اندازه و ریخت‌شناسی سطحی آنها، توسط دستگاه میکروسکوپ MET و MES انجام شد. در محلول کلویدی نانوذرات سنتز شده با تکنیک فراصوت، اشکال نانوذرات کروی مشاهده شد که از نظر اندازه ذرات در این روش از ۳۷/۴ تا ۴۹/۶ و به طور میانگین ۴۳/۵ می‌باشد (شکل ۳). به‌علاوه، تصاویر MET شکل و اندازه نانو ذرات را تأیید می‌کند (شکل ۴).

اثر ضد میکروبی نانوذرات: نانوذرات تیتانیوم سنتز شده به روش فراصوت دارای اثرات ضد میکروبی بسیار قوی بر ضد پاتوژن‌های *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا منوسیتوژنز* می‌باشند که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، نانوذره تیتانیوم سنتز شده به روش فراصوت در کمترین غلظت مورد بررسی (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) توانست موجب مهار رشد *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی* شود.



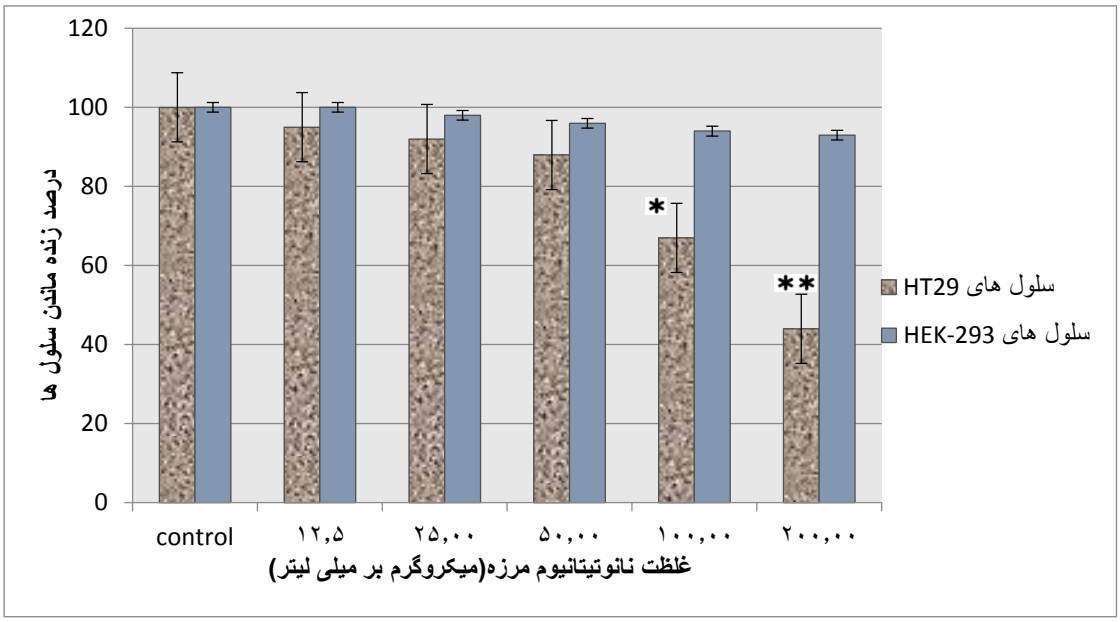
شکل ۳- تصویر میکروسکوپ روبشی SEM از نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

شکل ۴- تصویر میکروسکوپ انتقالی TEM از نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

جدول ۱- بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

روش تهیه نانوذره	*لیستریا منوسیتوژنز*		*اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
فراصوت	۲۰	۲۰	۲۰	۶۰

سمیت سلولی نانوذرات: میزان سمیت نانوتیتانیوم مرزه فراصوت بر روی رده سلولی سلول‌های نرمال (HEK-293) و سرطانی کولون (HT29)با روش MTT مورد ارزیابی قرارگرفت. شکل ۵ میزان بقای سلول‌های نرمال (HEK-293) و سلول‌های سرطانی کولون (HT-29) را در مواجه با غلظت‌های مختلف نانوتیتانیوم مرزه فراصوت نشان می‌دهد. مقدار IC_{50} برای رده سلولی HT29 ، حدود ۱۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.



شکل ۵- درصد زنده ماندن سلول‌های HEK-293 و HT-29 در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم مرزه فراصوت پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با کنترل

* ($P<0.05$) معنی‌داری نسبت به گروه کنترل

** ($P<0.01$) معنی‌داری نسبت به گروه کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

فناوری نانو امروزه شاهد پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه ساخت نانومواد و استفاده از روش‌ها و مواد جدید بوده است. با توسعه مواد و روش‌های جدید، نگرانی از آلودگی محیط زیست توسط نانوذرات تولید شده از روش‌های شیمیایی و تولید محصولات جانبی خطرناک دوچندان شده است. روش‌های زیستی بی‌خطر را می‌توان به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های شیمیایی مرسوم در تهیه نانوذرات در نظر گرفت (۲۶، ۲۷). این مطالعه، به سنتز نانوذرات تیتانیوم از عصاره گیاه مرزه، با تکنیک فراصوت پرداخته است که یک روش اقتصادی و دوست‌دار محیط زیست می‌باشد. فرایند سنتز نانوذرات تیتانیوم با تکنیک فراصوت، دارای بازده بالایی است که از مزایای این روش می‌باشد. بنابراین استفاده از پتانسیل عظیم طبیعت می‌تواند در سنتز نانو ذرات، بدون آسیب رساندن به محیط زیست بکار گرفته شود. اندازه نانوذرات یک فاکتور مهم و تأثیرگذار بر روی مکانیسم‌های سلولی مانند جذب، پراکندگی سلولی، فرایند متابولیسمی و ترشحی است (۲۸). فاکتورهای وابسته دیگر در رابطه با اثرات جانبی نانوذرات بر عملکرد سلولی، شکل یا مورفولوژی است. بر اساس مطالعات مشخص شده است که شکل نانوذرات در میزان

جذب تأثیر زیادی دارد. به‌عنوان مثال نانوذرات کروی از نانوذرات طنابی و مکعبی جذب بالاتری دارند (۲۹). شاهین لفته و همکاران در سال ۲۰۲۰ به سنتز نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید با استفاده از گیاه حرا و فعالیت ضد باکتری آن پرداختند و نشان دادند باکتری‌های گرم منفی در برابر نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه حرا، مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهد (۳۰).

نانوذره تیتانیوم سنتز شده به روش فراصوت در کمترین غلظت مورد بررسی (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) توانست موجب مهار رشد *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی* شود. تاکور و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره برگ *Azadirachta indica* بر ضد پاتوژن‌هایی مانند *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سالمونلا تیفی* و *کلبسیلا پنومونیه* اثرات ضد میکروبی نشان دادند. این ذرات کمترین MIC را بر ضد *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* نشان دادند (۱۰/۴۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، درحالی که کمترین MBC را برضد *کلبسیلا پنومونیه* (۸۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از خود نشان داد (۳۱).

سانتوش کومار و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره *Psidium guajava* بیشترین ناحیه مهار رشد را بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۵ میلی‌متر) و اشریشیاکلی (۲۳ میلی‌متر) نشان داد (۳۲). ایزا و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که نانوذرات تیتانیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره دانه لوپین اثرات ضد میکروبی قوی بر ضد انتروکوکوس و *اشریشیاکلی* نشان داد (۳۳). کمترین MIC نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره بره موم بر ضد *سالمونلا انتریتیدیس* (۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و بیشترین MIC بر ضد *سودوموناس وولگاریس* (۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) نشان داده شد (۳۴). حسنیان و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حساسیت زیادی نسبت به نانوذرات سنتز شده به روش سبز در غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند. این محققین گزارش کردند که نانوذرات مس می‌تواند جایگزین خوبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد به‌طوری که اثر نانوذرات مس از آنتی‌بیوتیک یفیپیم نیز بیشتر بود و اثر ضد میکروبی وسیع‌الطیفی داشت (۳۵). جایارامبو و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که نانوذرات مس سنتز شده به روش سبز اثرات ضد میکروبی عالی بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند (۳۶). نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز از عصاره برگ بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) در تمام غلظت‌های مورد مطالعه اثر مهاری بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* از خود نشان دادند. فعالیت فتوکاتالیتیک فیلم‌های نانوکامپوزیت بر پایه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم موجب کاهش بیان ژن‌ها/پروتئین‌های مخصوص تنظیم، سیگنال‌دهی، عملکرد رشد با اثرات انتخابی بر هموستاز یون‌ها، تنفس غیر وابسته به کوآنزیم‌ها و ساختار دیواره سلولی می‌شود (۳۷). نانوذرات تیتانیوم توانایی تجزیه غشای بیرونی باکتری‌ها را از طریق گونه‌های اکسیژن فعال به ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل دارند که موجب پراکسیداسیون فسفولیپیدها و در نهایت مرگ سلول می‌شود. همچنین این نانوذرات به دلیل تعامل بار منفی موجود در سطح خود با بار مثبت در سطح دیواره باکتری‌ها اثرات ضد میکروبی را اعمال می‌کنند (۳۸).

نانوذرات تیتانیوم سنتز شده در این مطالعه اثرات سمی بر سلول‌های نرمال ندارند. نانوذرات تیتانیوم سنتز شده در این مطالعه حتی در بالاترین

غلظت مورد مطالعه که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده سمیت غیر معناداری بر روی سلول‌های نرمال غیرسرطانی جنینی کلیه (HEK-293) داشتند که با مطالعه الشبیب و همکاران در سال ۲۰۲۰ که نانوتیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره ریشه گیاه بوزیدان (*Withania somnifera*) را با سلول‌های نرمال جنینی کلیه (HEK-293) مواجه کردند که تا دوز ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدون سمیت بود، هم راستا می‌باشد. همچنین مقدار IC_{50} را بر روی سلول‌های HepG2 را ۸۳/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد کردند (۲۱). در مطالعه حاضر نانوذرات تیتانیوم در غلظت ۱۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر مانع رشد حدود ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی کولون (HT-29) شد، این در حالی است که آمانولا و همکاران در سال ۲۰۱۹ نانوتیتانیوم سبز با استفاده از عصاره پوست پرتقال را سنتز کردند که مقدار IC_{50} برای رده سلول سرطانی A549 ، حدود ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد و اثرات نانوتیتانیوم سنتز شده بر روی رده نرمال بررسی نشد (۳۹). نارایانان و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که نانوتیتانیوم سنتز شده توسط عصاره گونه‌ای از نعناع (*Coleus aromatic*) بر روی رده سلولی سرطانی (HeLa) در دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، حدود ۹۳ درصد مهار رشد داشته است (۴۰). ماتا و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه *Abution indicum* بر ضد سلول‌های سرطانی اثرات سمیت وابسته به دوز دارد (۴۱). در مطالعه‌ای مشابه، نارچین و همکاران (۲۰۱۸) نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه مرزه به دو روش نور و فراصوت تولید کردند و نشان دادند که در روش فراصوت اندازه ذرات کوچک‌تر بوده و توزیع بهتری دارند. این نانوذرات بیشترین اثر سمی را در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر سلول‌های سرطانی کلون (HT-29) داشتند و کمترین سمیت را برای سلول‌های سالم (HEK-293) در شرایط مشابه نشان دادند (۱۴).

نانوذرات فلزی سنتز شده به روش سبز به‌عنوان آفت‌کش‌های نانو، قارچ‌کش‌های نانو، سنسورهای زیستی نانو و کودهای نانو در کشاورزی کاربرد دارند. این نانوذرات به افزایش میزان و کیفیت محصولات کشاورزی کمک کرده و موجب کاهش آلودگی‌های شیمیایی شده و از محصولات کشاورزی در برابر فشارهای محیطی محافظت می‌کنند (۴۲). با استفاده از نانوذرات به‌عنوان حمل‌کننده، می‌توان چربی‌ها، طعم‌دهنده‌ها، مواد ضد میکروبی، مواد آنتی اکسیدانی و ویتامین‌ها را انکپسوله کرد. این نانوذرات موجب بهبود خصوصیات مکانیکی و مقاومت به گرما در مواد بسته‌بندی مواد غذایی می‌شوند که به دلیل انتشار مناسب رطوبت، بخار آب و گازها موجب افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی می‌شوند (۴۳).

نانوتیتانیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره مرزه اثر سمی روی سلول‌های نرمال نداشت ضمن این که مانع رشد سلول‌های سرطانی کولون شد و در پایین‌ترین غلظت مورد استفاده مانع رشد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *لیستریا منوسیتوژنز* شده است. بدین ترتیب نگرانی‌ها بابت خطر این ترکیب را کم کرده و زمینه را برای استفاده بیشتر این ماده فراهم می‌کند. با توجه به معضلات مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد می‌شود از این نانوذرات در بسته‌بندی مواد غذایی به منظور افزایش مدت ماندگاری استفاده گردد.

سپاسگزاری

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

References

1- **Silveira SMD, Júnior AC, Scheuermann GN, Secchi FL, Vieira CRW.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Cienc Rural*. 2012; 42: 1300-1306.

2- Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, Iyer E, *et al.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*. 2015; 12(4): 326-328.

3- Griffin J, Singh AK, Senapati D, Lee E, Gaylor K, Jones-Boone J, *et al.* Sequence-specific HCV RNA quantification using the size-dependent nonlinear optical properties of gold nanoparticles. *Small*. 2009; 5(7): 839-845.

4- Han Y, Li S, Cao X, Yuan L, Wang Y, Yin Y, *et al.* Different inhibitory effect and mechanism of hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Rep*. 2014; 4: 7134.

5- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci*. 2005; 88(2): 412-419.

6- Xiong L, Tong ZH, Chen JJ, Li LL, Yu HQ. Morphology-dependent antimicrobial activity of Cu/CuxO nanoparticles. *Ecotoxicol*. 2015; 24: 2067-2072.

7- Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Amal R. Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano*. 2011; 5: 7214-7225.

8- Zia R, Riaz M, Farooq N, Qamar A, Anjum S. Antibacterial activity of Ag and Cu nanoparticles synthesized by chemical reduction method: a comparative analysis. *Mater. Res. Express*. 2018; 5: 075012.

9- Harne S, Sharma A, Dhaygude M, Joglekar S, Kodam K, Hudlikar M. Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Calotropis procera* L. latex and their cytotoxicity on tumor cells. *Colloids Surf*. 2012; 95: 284-288.

10- Giannousi K, Avramidis I, Samara CD. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. *RSC Adv*. 2013; 43: 21743–21752.

11- Mahavinod Angrasan JKV, Subbaiya R. Biosynthesis of copper nanoparticles by *Vitis vinifera* leaf aqueous extract and its antibacterial activity. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2014; 3: 768-774.

12- Celikel N, Kavas G. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci*. 2008; 26: 174–181.

13- Salvadori MR, Ando RA, Nascimento CAO, Corea B. Bioremediation from wastewater and extracellular synthesis of copper nanoparticles by the fungus *Trichoderma koningiopsis*. *J. Env. Sci. Health*. 2014; 49: 1286–1295.

14- Narchin F, Larijani K, Rustaiyan A, Ebrahimi SN, Tafvizi F. Phytochemical synthesis of silver nanoparticles by two techniques using *Saturaja rechengri* Jamzad extract: identifying and comparing *in vitro* anti-proliferative activities. *Adv. Pharm. Bull*. 2018; 8(2): 235-244.

15- Shiripoure R, Ketab G, Tafvizi F, Khodarahmi P. Biosynthesis and chemical characterization of silver nanoparticles using *Satureja rechingeri* Jamzad and their apoptotic effects on AGS gastric cancer cells. *J. Clust. Sci*. 2020; 32: 1389-1399.

16- Alizadeh, A. Essential oil composition, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activity of cultivated *Satureja rechingeri* Jamzad at different phenological stage. Z. *Naturforsch*. 2015; 70(3-4) c: 51–58.

17- Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z, Ahmadi S. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chem*. 2007; 100: 1054–1058.

18- Kavakebi E, Anvar AA, Ahari H, Motalebi AA. Green biosynthesized *Satureja rechingeri* Jamzad-Ag/poly vinyl alcohol film: quality improvement of *Oncorhynchus mykiss* fillet during refrigerated storage. *Food Sci. Technol. Campinas*. 2021; 41(1): 267-278.

19- Waghmode MS, Gunjal AB, Mulla JA, Patil NN, Nawani NN. Studies on the titanium dioxide nanoparticles: biosynthesis, applications and remediation. *SN. Appl. Sci*. 2019; 1: 310.

20- Jafari S, Mahyad B, Hashemzadeh H, Janfaza S, Gholikhani T, Tayebi L. Biomedical applications of TiO2 nanostructures: Recent advances. *Int. J. Nanomedicine*. 2020; 15: 3447–3470.

21- Al-Shabib NA, Husain FM, Qais FA, Ahmad N, Khan A, Alyousef AA, *et al.* Phyto-

mediated synthesis of porous titanium dioxide nanoparticles from *Withania somnifera* root extract: broad-spectrum attenuation of biofilm and cytotoxic properties against HepG2 cell lines. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 1680.

22- Partovi R, Talebi F, Boluki Z, Sharifzadeh A. Evaluation of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil alone and in combination with *Origanum majorana* and *Caryophyllus aromaticus* essential oils against some foodborne bacteria. *Int J Enteric Pathog*. 2019; 7(2): 60-67.

23- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-M07-A06, 10.ed, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

24- Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 2007; 100: 553-559.

25- Violet Mary J, Pragathiswaran C, Anusuya N. Photocatalytic, degradation, sensing of Pb^{2+} using titanium nanoparticles synthesized via plant extract of Cissusquadrangularis: *In vitro* analysis of microbial and anti-cancer activities. *J. Mol. Struct*. 2021; 1236: 130144.

26- Shankar SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nat Mater*. 2004; 3: 482–488.

27- Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, *et al.* Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett.* 2001; 1: 515–519.

28- Li Y, Chen DH, Yan J, Chen Y, Mittelstaedt RA, Zhang Y, *et al.* Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2012; 14(2): 4-10.

29- Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TG, *et al.* Nano genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009; 30(23): 3891-3914.

30- Shahin Lefteh M, Sourinejad I, Ghasemi Z. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles from the Mangrove (*Avicennia marina*) and investigation of its antibacterial activity. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2020; 30(186): 15-27.

31- Thakur BK, Kumar A, Kumar D. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity. *South African J Botany*. 2019; 124: 223–227.

32- Santhoshkumar T, Rahuman AA, Jayaseelan C, Rajakumar G, Marimuthu S, Kirthi AV, *et al.* Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. *Asian Pac.J. Trop. Med.* 2014; 7(12): 968-976.

33- Eisa NE, Almansour S, Alnaim IA, Ali AM, Algrafy E, Ortashi KM, *et al.* Eco-synthesis and characterization of titanium nanoparticles: Testing its cytotoxicity and antibacterial effects. *Green Process Synth*. 2020; 9: 462–468.

34- Subhapriya S, Gomathipriya P. Green synthesis of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties. *Microb. Pathog*. 2018; 116: 215–220.

35- Hassanien R, Husein DZ, Al-Hakkani MF. Biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous Tilia extract: antimicrobial and anticancer activities. *Heliyon.* 2018; 4(12): e01077.

36- Jayarambabu N, Akshaykranth A, Venkatappa Rao T, Venkateswara Rao K, Rakesh Kumar R. Green synthesis of Cu nanoparticles using *Curcuma longa* extract and their application in antimicrobial activity. *Mater Lett.* 2020; 259(15): 126813.

37- Hamed MT, Bakr BA, Shahin YH, Elwakil BH, Abu-Serie MM, Aljohani FS, *et al.* Novel synthesis of titanium oxide nanoparticles: Biological activity and acute toxicity study. *Bioinorg Chem Appl*. 2021; 2021: 8171786.

38- Kubacka A, Diez MS, Rojo D, Bargiela R, Ciordia S, Zapico I, *et al.* Understanding the antimicrobial mechanism of TiO2-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium. *Sci Rep.* 2014; 4(1): 4134

39- Mobeen Amanulla A, Sundara R. Green synthesis of TiO2 nanoparticles using orange peel extract for antibacterial, cytotoxicity and humidity sensor applications. *Mater Today Proc.* 2019; 8: 323–331.

40- Narayanana M, Vigneshwarib P, Natarajanb D, Kandasamyc S, Alsehlid M, Elfasakhanyd A, *et al.* Synthesis and characterization of

TiO2 NPs by aqueous leaf extract of *Coleus aromaticus* and assess their antibacterial, larvicidal, and anticancer potential. *Environ Res*. 2021; 200: 111335

41- Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abution indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects *in vitro*. *Colloids Surf B.* 2015; 128: 276-86.

42- Bahrulolum H, Nooraei S, Javanshir N, Tarrahimofrad H, Mirbagheri VS, Easton AJ, *et al*. Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agri-food sector. *J Nanobiotechnol*. 2021; 86: 19.

43- Prakash J, Vignesh K, Anusuya T, Kalaivani T, Ramachandran C, Sudha Rani R, *et al*. Application of nanoparticles in food preservation and food processing. *J Food Hyg Saf*. 2019; 34: 317-324.

Extraction of titanium nanoparticles of *Saturaja rechengri* Jamzad using ultrasound techniques; the antimicrobial effect against food-borne pathogens and its cytotoxicity against normal and cancer cell lines

Razieh Partovi[1], Fataneh Narchin[*2], Atefeh Araghi[3]

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
2- Associate Professor, Department of Chemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Receive: July 17, 2021; Revise: August 29, 2021; Accept: September 6, 2021

Summary

Green synthesis of nanoparticles has some advantages including the commitments to avoid harmful chemicals, clean process, eco-friendly, easy preparation, economical and control on size and shape of particles. In this study, water extract of *Saturaja rechengri* Jamzad was prepared and titanium nanoparticles produced using green and ultrasound techniques. Then, in order to characterize the nanoparticles, UV analysis, energy dispersive x-ray spectroscopy and TEM and SEM analysis were performed. MIC and MBC of nanoparticles against *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* and cytotoxicity in 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/ml on HT-29 and HEK-293 cell lines were also determined. Nanoparticles had absorption at 352 nm which showed synthesis of titanium nanoparticles using *Saturaja rechengri* Jamzad extract. Spherical shape of nanoparticles was detected in colloidal solution with 37.4 to 49.6 nm. Titanium nanoparticles could stop the growth of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* at 20 µg/ml. The nanoparticles did not revealany cytotoxic effect on the normal cells, while it was stop the growth of 50% of cancer cells at 183 µg/ml. The results of this study decreased the anxiety of using titanium nanoparticles and increased the potential of using this nanoparticle in food packaging to finally extend shelf life of food.

Key words: *Cytotoxicity, Green synthesis, Antimicrobial effect, Titanium nanoparticles, Saturaja rechengri Jamzad*

مروری نظام‌مند بر آلودگی آب‌میوه‌های سنتی ایران به اشریشیاکلی

محمد امین حیدرزادی*

دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، ایران.

دریافت مقاله: ۷ مرداد ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۲ شهریور ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۴۰۰

چکیده

میوه‌ها و آب‌میوه‌های حاصل از آنها به‌عنوان ارکان اصلی تأمین احتیاجات غذایی بشر، اهمیت ویژه‌ای داشته و از مطلوب‌ترین نوشیدنی‌هایی است که با داشتن املاح، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، بخش قابل توجهی از نیازهای بدن را تأمین می‌کنند، با این حال عدم رعایت بهداشت می‌تواند زمینه ایجاد آلودگی آب‌میوه‌ها را به باکتری‌های بیماری‌زا فراهم کند. اشریشیاکلی شاخص آلودگی به مدفوع بوده و وجود آن نشان‌دهنده عدم رعایت بهداشت در تهیه، تولید و نگهداری ماده غذایی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان آلودگی آب‌میوه‌های سنتی به اشریشیاکلی در ایران است. جهت دریافت مطالعات انجام شده، بانک‌های اطلاعاتی Medline، Science Direct، Scopus، Springer، PubMed، Wailly، Elsevier و scholar Google و همچنین پایگاه‌های داخلی کشور شامل: مگیران، ایران‌داک، سیویلیکا، مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) را ملاک جستجو قرار داده و سپس با استفاده از کلید واژه‌های مرتبط با عنوان از سال ۱۳۸۰ تا ۱۴۰۱ (۲۰۲۲-۲۰۰۰) جستجو شد که ۱۹ مقاله مرتبط با موضوع تحقیق حاضر یافت شد. طبق بررسی‌های به عمل آمده، آلودگی آب‌میوه‌های سنتی به باکتری اشریشیاکلی در تمامی پژوهش‌های صورت گرفته، مثبت بوده و بیشتر از استاندارد ملی ایران، اروپا و آمریکا می‌باشد. با توجه به بالا بودن بار میکروبی و عدم رعایت بهداشت در آب‌میوه‌های سنتی، ضروری است که تولید و عرضه این محصولات، با آموزش اجباری متصدیان همراه باشد و از ادامه فعالیت مراکزی که معیارهای بهداشتی را رعایت نمی‌کنند، جلوگیری به عمل آید.

واژه‌های کلیدی: *آب‌میوه‌های سنتی، اشریشیاکلی، ایران*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: heidarzadi1373@gmail.com

مقدمه

میوه و فرآورده‌های حاصل از آن، به‌عنوان ارکان اصلی تأمین احتیاجات غذایی بشر، اهمیت ویژه‌ای دارند. آب‌میوه‌ها جایگزینی بسیار مناسب برای آب و املاح از دست رفته بدن می‌باشند. قسمت اعظم مواد جامد میوه‌ها را کربوهیدرات‌ها و میزان اندکی چربی و پروتئین، که به‌طور عمده در دیواره‌های سلولی و لایه‌های سیتوپلاسمی وجود دارند تشکیل می‌دهند. میوه‌ها همچنین تأمین کننده میکروالمنت‌ها و ویتامین‌های مورد نیاز بدن و آنتی‌اکسیدان‌ها هستند (۱، ۲). آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که بدن را در مقابل خطرات ناشی از تأثیر رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات فنلی، گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین و ... می‌باشند که سبب افزایش مقاومت بدن در برابر انواع تخریب‌کننده‌های داخلی و عوامل خارجی مانند تأثیرات ناشی از حملات باکتری‌ها می‌شوند. امروزه آب‌میوه‌های غیر پاستوریزه (سنتی) به دلیل طعم مطلوبی که دارند توسط مصرف‌کنندگان بیشتر از آب‌میوه‌های پاستوریزه، جهت مصرف ترجیح داده می‌شوند. با وجود دلپذیر بودن آب‌میوه‌ها، توجه به این نکته ضروری است که در صورت عدم رعایت استانداردهای بهداشتی در تهیه و توزیع آنها، این نوشیدنی‌های غیر پاستوریزه قادرند به‌عنوان منابع بالقوه‌ای از آلودگی عمل کنند؛ چنان که میوه تازه به‌طور نرمال در سطح خود ساپروفیت‌های خاک را حمل می‌کند، در زمان تولید آب‌میوه‌های سنتی به دلیل عدم اعمال دمای مناسب بر روی مخلوط اولیه، عدم شستشوی مناسب میوه‌ها، آلوده بودن ظروف تهیه، نحوه توزیع و نگهداری و به‌طور کلی عدم رعایت الزامات بهداشت فردی و محیطی، زمینه بروز آلودگی‌های میکروبی مختلفی در این محصول می‌شود (۵-۳).

ایمنی مواد غذایی از بخش‌های مهم سلامت هر جامعه‌ای می‌باشد و امروزه دولت‌ها به خاطر افزایش مشکلات ناشی از آن و به منظور ارتقای سطح اطلاعات مصرف‌کنندگان، در تلاش برای آگاهی‌بخشی آنها در این حوزه هستند (۶). در سال‌های اخیر با وجود پیشرفت‌های شگرفی که در زمینه فرآوری و نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها حاصل شده، هنوز جهان شاهد بروز انواع همه‌گیری‌ها و برخی بیماری‌های کشنده ناشی از مصرف میوه و سبزی و آب میوه آلوده است. برداشت محصول در زمان مناسب و نگهداری آن در شرایط کنترل شده، به محدود کردن رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد کمک می‌کند. بنابراین برای تولیدکنندگان میوه و سبزی آگاهی از شرایط بهداشتی نگهداری میوه اهمیت بالایی دارد، زیرا بیش از نیمی از آلودگی‌های با منشأ باکتریایی در میوه و سبزی دیده می‌شوند (۴، ۵، ۷، ۸).

میزان وقوع بیماری‌های با منشأ غذایی حتی در کشورهای پیشرفته روند رو به رشدی داشته است. در کشورهای در حال توسعه نظیر ایران اگرچه آمار دقیقی در خصوص میزان وقوع عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی وجود ندارد، اما بدون تردید به دلیل شرایط نامناسب تولید، نگهداری، توزیع و مصرف مواد غذایی که اغلب بدون کنترل مناسب سازمان‌های مسئول بوده و به علت پایین‌بودن سطح آموزش بهداشت عمومی، شیوع عفونت‌های غذایی به مراتب بیشتر از کشورهای پیشرفته است. در بسیاری از کشورها به مردم توصیه می‌شود که در رژیم غذایی خود حداقل روزی پنج نوبت از سبزیجات و میوه‌های تازه استفاده کنند، اما از طرفی بیماری‌های میکروبی ناشی از مصرف مواد غذایی نیز همواره یکی از عمده‌ترین بیماری‌های جهان محسوب می‌گردند (۴، ۹، ۱۰).

انتروباکتریاسه‌ها گروه بزرگی از باکتری‌های مرکب از باسیل‌های گرم منفی، میله‌ای شکل، فاقد اسپور می‌باشند که زیستگاه آنها در حالت طبیعی، روده انسان و حیوانات است. مهم‌ترین جنس‌های این خانواده اشریشیاکلی، سالمونلا، شیگلا، کلبسیلا و ... است. اشریشیاکلی به علت حضور در دستگاه گوارش، منشأ مدفوعی داشته و به آسانی می‌تواند از طریق انسان و حیوانات منتشر شود.

اشریشیاکلی جزو باکتری‌های کلی‌فرمی است که یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده گاستروانتریت و شاخص بهداشتی آلودگی آب و مواد غذایی هستند. وجود اشریشیاکلی در آب آشامیدنی و مواد غذایی و هر ماده‌ای که به‌طور مستقیم به مصرف انسان می‌رسد، نشان‌دهنده آلودگی آنها به سایر پاتوژن‌های روده‌ای نیز می‌باشد (۱۳-۱۱).

جدول ۱- وضعیت کلی مطالعات شامل محل نمونه‌گیری، وضعیت آب‌میوه‌ها، درصد نمونه‌های آلوده و وضعیت آلودگی

شماره	پژوهشگران	سال انجام مطالعه	محل نمونه‌گیری	نوع نمونه	تعداد نمونه	درصد آلودگی
۱	مختاری و مختاری (۱۸)	۱۳۹۷	تهران	سنتی (غیر پاستوریزه)	۵۰	۵۴ درصد
۲	ابراهیمیان و همکاران (۱۹)	۱۳۹۲	اهواز	سنتی (غیر پاستوریزه)	۶۰	۹۵/۶ درصد
۳	جزایری و همکاران (۲۰)	۱۳۸۱	تهران	سنتی (غیر پاستوریزه)	۹۴	۹۱/۵۰ درصد
۴	کلاته و همکاران (۲۱)	۱۳۸۷	مشهد	سنتی (غیر پاستوریزه)	۴۰	۵۷/۵ درصد
۵	نعیم‌آبادی و همکاران(۲۲)	۱۳۸۷-۱۳۸۶	بجنورد	سنتی (غیر پاستوریزه)	۲۰	۷۰ درصد
۶	عسکری و همکاران (۲۳)	۱۳۸۹	ایلام	سنتی (غیر پاستوریزه)	۳۰	۶۰ درصد
۷	شمس خرم‌آبادی و جهانبانی (۲۴)	۱۳۸۱	خرم‌آباد	سنتی (غیر پاستوریزه)	۱۰۴	۶۰ درصد
۸	مبرا و همکاران (۲۵)	۱۳۸۴	مشهد	سنتی (غیر پاستوریزه)	۲۵	۸۴ درصد
۹	علیپور و همکاران (۲۶)	۱۳۸۹	بندرعباس	سنتی (غیر پاستوریزه)	۱۴۶	۵۷ درصد
۱۰	حیدری و همکاران (۲۷)	۱۳۸۸	گرگان	سنتی (غیر پاستوریزه)	۱۰۰	۱۷ درصد
۱۱	مسیحا و همکاران(۲۸)	۱۳۹۳	گیلان	سنتی (غیر پاستوریزه)	۶۷	۱۵ درصد
۱۲	ملایی‌توانی (۲۹)	۱۳۹۴-۱۳۹۳	شاهرود	سنتی (غیر پاستوریزه)	۳۱	۲۲/۵۸ درصد
۱۳	افشاری و پاهپن (۳۰)	۱۳۹۲	شوشتر	سنتی (غیر پاستوریزه)	۸	۱۰۰ درصد
۱۴	محمودآبادی و همکاران (۳۱)	۱۳۹۶	یزد	سنتی (غیر پاستوریزه)	۳۴	۶ درصد
۱۵	منگلی‌زاده و همکاران (۳۲)	۱۳۹۱	گرگان	سنتی (غیر پاستوریزه)	۷۳۵	۱۷/۲ درصد
۱۶	اسدی و خانی (۳۳)	۱۳۹۱	اراک	سنتی (غیر پاستوریزه)	۴۰	۷۰ درصد
۱۷	سلطان‌دلال و همکاران (۳۴)	۹۸-۱۳۹۷	تهران	سنتی (غیر پاستوریزه)	۵۶۰	۲۵ درصد
۱۸	فرامرزی و همکاران (۳۵)	۱۳۹۰	تهران	سنتی (غیر پاستوریزه)	۸۷	۱۶/۰۹ درصد
۱۹	پزشک و همکاران (۳۶)	۱۳۸۵	مشهد	سنتی (غیر پاستوریزه)	۱۲۳	۶۶ درصد

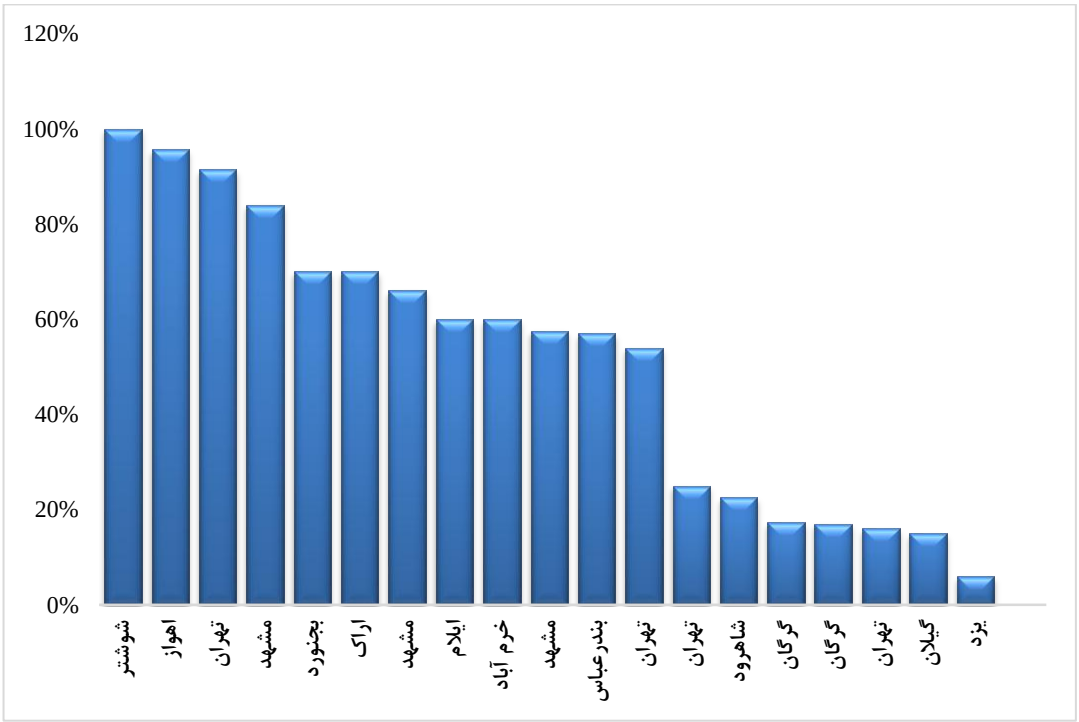
سویه‌های اشریشیاکلی *انتروهموراژیک* (*EHEC*) مانند اشریشیاکلی $O_{157}H_7$ از مهم‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای است و عوارضی مانند کولیت‌هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک و علی‌الخصوص، نارسایی حاد کلیوی، دیالیز و سرانجام مرگ را برای شخص به ارمغان می‌آورد. این سویه اشریشیاکلی می‌تواند از طریق مصرف آب و مواد غذایی آلوده و از فردی به فرد دیگر از طریق مدفوعی- دهانی منتقل شود. انتقال باکتری از حیوان به انسان از راه مستقیم، تماس با آب، خاک و فضولات نشخوارکنندگان و همچنین مصرف مواد غذایی آلوده مانند شیر، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت چرخ شده، ساندویچ‌های گوشتی، سبزیجات و آب‌میوه‌ها امکان‌پذیر است. از طرفی، اشریشیاکلی $O_{157}H_7$ در کنار سایر عوامل میکروبی همانند *سالمونلا انتریکا* و *شیگلا دیسنتری* از مهم‌ترین عوامل بیولوژیک

تهدیدکننده منتقل شونده از طریق آب و مواد غذایی می‌باشد (۱۷-۱۴).

با توجه به این که اشریشیاکلی جزء عوامل مهم در عفونت‌های غذایی به حساب می‌آید و به دلیل مصرف بالای آب‌میوه‌های سنتی در فصول گرم سال (۱۷)، لذا این مطالعه با هدف بررسی میزان آلودگی آب‌میوه‌های سنتی در ایران از سال ۱۳۸۰ تا ۱۴۰۱ (۲۰۲۲-۲۰۰۰) انجام شده تا بتواند راهگشای برنامه‌ریزی و مداخله‌های مناسب در سطح عرضه مواد غذایی برای کاهش میزان آلودگی باشد و همراه با مداخله‌های دیگر منجر به بهبود بهداشت و ایمنی غذائی و سرانجام افزایش سلامت مصرف‌کنندگان شود.

در گام نخست، جهت دریافت مقالات مرتبط، در بانک‌های اطلاعاتی Medline، Science Direct، Scopus، Springer، PubMed، Wailly و Elsevier و Google scholar و همچنین پایگاه‌های داخلی کشور شامل: مگیران، ایران‌داک، سیویلیکا، مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) را ملاک جستجو قرار داده و سپس با استفاده از کلید واژه‌های مرتبط فارسی: آلودگی آب‌میوه، آب‌میوه، آب‌میوه‌های سنتی، آلودگی به اشریشیاکلی و در پایگاه‌های خارجی با کلید واژه‌های: Contamination fruit juice، of fruit juice to E.coli Contamination of از سال ۱۳۸۰ تا ۱۴۰۱ (۲۰۲۲-۲۰۰۰) جستجو شد که ۱۹ مقاله مرتبط با موضوع تحقیق حاضر بود.

نمودار ۱- وضعیت آلودگی آب‌میوه‌های سنتی به اشریشیاکلی در شهرستان‌های مختلف ایران



بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات نشان می‌دهد که بیشترین آلودگی آب هویج مربوط به شوشتر با ۱۰۰٪ آلودگی و کمترین میزان آلودگی مربوط به یکی از مطالعات انجام شده در استان یزد با ۶ درصد بوده است. متفاوت بودن آمار شیوع اشریشیاکلی در هر سال، در شهرهای مشترک می‌تواند دلایلی از جمله: فصل نمونه‌گیری متفاوت، محیط‌های نمونه‌گیری مختلف، عدم رعایت بهداشت فردی در هر محل نمونه‌گیری و دقت در اندازه‌گیری داشته باشد. بر اساس استاندارد ایران در یک میلی‌لیتر آب‌میوه نباید هیچ‌گونه آلودگی مثبتی به اشریشیاکلی وجود داشته باشد و بر همین مبنا، در یک میلی‌لیتر آب‌میوه تعداد باکتری‌های هوازی نباید از 5^{10} بیشتر باشد (۵۰). نتایج حاکی از آن است که میزان آلودگی به اشریشیاکلی در آب میوه‌های سنتی عرضه شده در ایران بیشتر از حد مجاز جهانی و از استانداردهای ملی هم فراتر می‌باشد. اگرچه بالانبودن سطح بهداشتی در یک منطقه و انتقال میکروارگانیسم‌های مختلف از طریق مواد غذایی آلوده، میزان ایمنی اکتسابی افراد را در برابر بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌دهد، ولی کودکان، افراد مسن، افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و برخی دیگر از افراد آسیب‌پذیر جامعه، همواره در برابر بروز بیماری‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌ها حساسیت بیشتری دارند. گذشته از کودکان و اقشار آسیب‌پذیر جامعه، گردشگران نیز به دلیل عدم مواجهه قبلی با برخی از سویه‌های میکروبی موجود در مواد غذایی و فقدان مقاومت اکتسابی بالا نسبت به این سویه‌ها، در برابر بروز عفونت‌ها و مسمومیت غذایی حساسیت بالاتری دارند.

سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی در انسان به شش گروه تقسیم می‌شوند. آنها شامل: سویه‌های بیماری‌زای روده‌ای (*EPEC*)، سویه‌های مسمومیت‌زای روده‌ای (*ETEC*)، سویه‌های مهاجم روده‌ای (*EIEC*)، سویه‌های توده‌ای روده‌ای(*EAEC*)، سویه‌های چسبنده روده‌ای(*AEEC*)، سویه‌های خونریزی‌دهنده روده‌ای (*EHEC*)، سویه‌های وروتوکسیژنیک (*VETEC*) و در نهایت سویه‌های تولیدکننده سموم شیگا (*STEC*) هستند (۱۳).

همچنین، در سال ۲۰۱۱، آلمان یکی از بالاترین شیوع *EAEC O104* را به ثبت رساند که بالغ بر ۲۲۲۰ مورد بود. در اکتبر ۲۰۰۶، مطالعه‌ای در ۲۶ ایالت در ایالات متحده و کانادا در مورد شیوع اشریشیاکلی انجام شد که مشخص شد با مصرف آب اسفناج مرتبط است. از ۱۹۹ فرد آلوده به پاتوژن ذکرشده، ۳ مورد مرگ ثبت و به مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری (CDC) گزارش شد و از موارد گزارش شده، حدود ۱۶ درصد به نارسایی حاد کلیه مبتلا شدند و ۵۱ درصد موارد مذکور در بیمارستان بستری بودند. در این تحقیق ثابت شد که تمام مطالعات انجام گرفته در خصوص ارزیابی اشریشیاکلی در آب‌میوه‌های سنتی تمام آنها به باکتری اشریشیاکلی آلوده هستند. شیوع دیگری از *E. coli* که جهان را مبهوت کرد، منجر به مرگ ۵۰ نفر و بستری شدن حدود ۴۰۰۰ بیمار در حدود ۱۶ کشور شد (۳۹-۳۷).

چهار راه برای انتقال این سویه‌ها به انسان تعریف شده است: انتقال غذا زاد، انتقال از طریق آب، تماس با حیوانات و انتقال شخص به شخص. گوشت گاو، شیر و فراورده‌های آن، سوسیس، آب‌میوه و غذاهای آماده مانند انواع سالاد از جمله مهم‌ترین مواد غذایی هستند که در انتقال این سویه‌ها به انسان نقش دارند. بر اساس توانایی تولید سموم سویه‌ها تحت عنوان *وروتوکسینژنیک* اشریشیاکلی (*VETEC*) یا تولیدکننده سموم *شیگا* (*STEC*) نامگذاری شده که همه آنها جزء سویه‌های

خونریزی‌دهنده روده‌ای محسوب می‌شوند. این سویه‌ها دو نوع سم تولید می‌کنند که با سم تولیدشده از باکتری *شیگلا دیزانتریه* تیپ ۱ قرابت دارد (۴۲-۴۰).

انتقال انسان به انسان در شرایط عادی متداول نیست، اما در موارد طغیان یا اپیدمی عفونت ممکن است باکتری از فردی به فرد دیگر منتقل شود. باکتری به تعداد کم نیز باعث بیماری در انسان می‌شود به‌طوری که ذکر شده است تعداد ۱۰ تا ۱۰۰ باکتری قادر به ایجاد عفونت در انسان می‌شود. مواد غذایی مانند سبزیجات آلوده به‌خصوص کاهو، اسفناج، سبزی‌های خوراکی، خیار و آب‌میوه‌های غیر پاستوریزه نیز در انتقال باکتری به انسان نقش داشته‌اند (۴۳). آب‌های آلوده به مدفوع که برای آبیاری مزارع مورد استفاده قرار می‌گیرند منبع مهم آلودگی مواد غذایی گیاهی هستند. باکتری بر روی برگ گیاهان و یا میوه آنها چسبیده و برای مدتی بقای خود را حفظ می‌کند. مطالعات نشانگر این است که سروتیپ *O157H7* قادر است در بافت گیاهان نفوذ کرده و به دنبال شستشوی سبزیجات به راحتی حذف نشده و در گیاه باقی می‌ماند، این سروتیپ در مواد غذایی نیز برای مدت طولانی زنده می‌ماند، همچنین نسبت به شرایط اسیدی مقاوم بوده و در غذاهای اسیدی مانند سس مایونز، آب‌میوه‌های اسیدی، پنیر چدار و شیر برای چند هفته تا چند ماه زنده می‌ماند. حداقل PH قابل تحمل برای باکتری ۴/۷ می‌باشد اما بعضی از مطالعات نشان داده که برخی از سویه‌های باکتری اشریشیاکلی در مواد غذایی اسیدی قادر به تحمل PH حدود ۴/۳ نیز می‌باشد (۴۴).

در تولید آب‌میوه در صنعت از میوه‌های درجه دو و سه استفاده می‌شود. میوه‌های درجه یک به علت گرانی قیمت برای تازه‌خوری مناسب هستند و لذا به این ترتیب برای هیچ تولیدکننده‌ای تولید آب‌میوه از میوه‌های درجه یک مقرون به صرفه نخواهد بود. در ایران مصرف سرانه آب‌میوه در حدود ۶ لیتر بوده که نسبت به کشورهای صنعتی و حتی کشور قبرس که بیشترین مصرف سرانه آب‌میوه را در میان کشورهای جهان با حدود ۴۳ لیتر در اختیار دارد، بسیار کمتر است. در ایران سالیانه ۲۰ هزار تن آب پرتقال، ۴ تا ۵ هزار تن آب آلبالو، بین ۶۰۰ تا ۷۰۰ میلیون عدد آب‌میوه یک لیتری و ۱/۵ میلیارد عدد آبمیوه CC ۲۰۰ تولید می‌شود. به موازات افزایش میزان آگاهی بهداشت عمومی و اهمیت یافتن مسأله حفظ سلامت، به‌ویژه در جوامع صنعتی، مصرف سرانه انواع آب‌میوه طبیعی نیز به‌طور مرتب افزایش یافته است (۴۳).

طبق تخمین سازمان جهانی بهداشت، موارد واقعی بیماری‌های ناشی از آلودگی غذایی ۳۵۰-۳۰۰ برابر موارد ثبت شده است. در این ارتباط، مطالعاتی در کشورهای لیبی، ایران و بنگلادش انجام گرفته است که در تمام این مطالعات آلودگی میکروبی در آب‌میوه مشاهده گردید (۶). از سویی دیگر، بهداشت فردی و ساختمانی دو فاکتور مهم تاثیرگذار در آلودگی میکروبی مواد غذایی هستند. بهداشت شخصی ضعیف کارکنان و دست‌اندرکاران دخیل در تهیه فرآورده و عدم شستشوی دست‌ها یا عدم استفاده از مواد پاک‌کننده در شستشوی میوه‌ها و نیز تماس دست‌ها با دهان، بینی و موها حین تهیه فرآورده، در انتقال عوامل باکتریایی مختلف از جمله اشریشیاکلی به آب‌میوه نقش به‌سزایی دارد (۴۵). علاوه بر اهمیت موضوع از دیدگاه فردی، با توجه به اینکه استانداردهای موجود در هر جامعه از شاخص‌های بهداشتی آن جامعه هستند و از طرفی درصد بالایی از آب‌میوه‌های سنتی توزیع شده از نظر کیفیت بهداشتی منطبق با استانداردهای موجود در جامعه نبوده، می‌بایست در جهت ارتقاء سطح بهداشتی و رساندن کیفیت

بهداشتی آنها به استانداردهای موجود تلاش نمود. در این راستا، به‌منظور کنترل آلودگی‌های اولیه و نیز ارتقا سطح فرهنگی تولیدکنندگان فرآورده در زمینه‌ی رعایت اصول بهداشتی در کلیه مراحل تولید و توزیع آن به‌منظور کاهش بروز آلودگی ثانویه، از جمله راه‌های افزایش دهنده سطح بهداشتی این فرآورده می‌باشد. با توجه به مقایسه پارامترهای کیفی باکتریولوژیک آب‌میوه‌های مورد مطالعه در شهرهای مختلف و مقایسه آن با استانداردها، نشان‌دهنده این است که آلودگی در تمامی مراکز نمونه‌برداری شده، بالاتر از سطح استاندارد قرار داشته که ناشی از عدم رعایت اصول و موازین بهداشت فردی، بهداشت مواد غذایی و بهسازی محیطی این مراکز است، لذا تأکید بر مدیریت بهداشت مواد غذایی در تمامی مراحل آماده‌سازی، آب‌گیری، نگهداری و توزیع ضروری است (۴۶).

برای جلوگیری از آلودگی انسانی به باکتری‌های بیماری‌زا بهترین گزینه، رعایت بهداشت فردی و مواد غذایی است. شستن مرتب دست‌ها به‌خصوص افرادی که به نوعی با حیوانات و تولیدات آنها در ارتباط هستند راهکار مؤثری است. محافظت از کودکان در هنگام بازدید از باغ وحش یا مزارع پرورش حیوانات، دور نگداشتن لباس، کفش و ابزار مورد استفاده در دامداری‌ها از افراد و به‌خصوص کودکان از دیگر راه‌های جلوگیری از انتقال باکتری ذکر شده است. برای جلوگیری از آلودگی متقاطع بین مواد غذایی خام و مواد غذایی آماده مصرف باید آموزش‌های لازم به افراد به‌خصوص کارکنان آشپزخانه‌ها و افراد توزیع‌کننده مواد غذایی داده شود. شستشوی مداوم دست‌ها، چاقو، میز کار و سایر وسایل در کاهش انتقال باکتری به سایر مواد غذایی بسیار مؤثر است. پخت مناسب و یا پاستوریزاسیون گوشت و شیر موجب مرگ باکتری و جلوگیری از انتقال به انسان خواهد شد. ضد عفونی و تصفیه مناسب آب برای مصرف انسان و یا استفاده در کارخانجات فراوری مواد غذایی از انتقال سویه‌های وروتوکسیژن باکتری اشریشیاکلی به انسان جلوگیری می‌کند (۴۷، ۴۸). علاوه بر این باید از نگهداری حیوانات در نزدیکی منابع آب شرب انسان خودداری کرد (۴۹).

از مصرف میوه و سبزیجات نشسته و ضد عفونی نشده خودداری گردد، میوه‌ها و سبزیجات را می‌توان با ترکیبات کلره رقیق ضد عفونی کرد. این کار تراکم باکتری را کاهش می‌دهد ولی مطالعات نشان داده است که برخی از سروتیپ‌ها ممکن است در بافت میوه‌ها نفوذ کرده و به دنبال شستشو یا ضد عفونی کردن از بین نروند. بنابراین توصیه می‌شود میوه‌های زخمی به خوبی اصلاح شده و سپس مصرف شوند. در مورد سبزیجات توصیه می‌شود ابتدا آنها را پخته و سپس مصرف کرد (۵۰). شستن مناسب دست‌ها با آب و صابون پس از اجابت مزاج به‌خصوص در افرادی که با مواد غذایی در ارتباط هستند به میزان زیادی از انتقال باکتری از انسان به انسان جلوگیری می‌کند. تعویض و شستشوی مداوم ملحفه، پتو و سایر وسایل شخصی بیماران مبتلا به سندرم کولیت خونریزی‌دهنده به‌طور جداگانه از دیگر راه‌های انتقال فرد به فرد است (۴۴). در کارخانجات مواد غذایی و در مراحل مختلف مراقبت‌های لازم از مواد خام تا تولید محصول نهایی باید صورت گیرد و کلیه دستورالعمل‌های مربوط به سیستم HACCP در ارتباط با محیط تولید محصول رعایت گردد. در کشتارگاه‌ها رعایت بهداشت دام به‌خصوص رعایت بهداشت پوست دام در جهت کاهش مقدار مدفوع چسبیده به پوست گاو به میزان زیاد از آلودگی متقاطع گوشت جلوگیری می‌کند. استقرار سیستم HACCPدر کارخانه‌های فراورده‌های لبنی و تولید آب‌میوه‌ها و پاستوریزاسیون مناسب این مواد غذایی

از انتقال سروتیپ‌های وروتوکسیژن به مصرف‌کنندگان جلوگیری خواهد کرد. استقرار و توسعه سیستم تولید محصول خوب بهداشتی (Good Hygiene Practice) از طریق کنترل میکروبیولوژیک می‌تواند سلامت فرآورده‌های تولیدی را تضمین نموده و از به خطر افتادن بهداشت عمومی ممانعت نماید.

References

1- Li F, Zhao C, Zhang W, Cui S, Meng J, Wu J, *et al.* Use of ramification amplification assay for detection of Escherichia coli O157: H7 and other E. coli Shiga toxin-producing strains. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(12): 6086-90.

2- Mayer A-MB, Trenchard L, Rayns F. Historical changes in the mineral content of fruit and vegetables in the UK from 1940 to 2019: A concern for human nutrition and agriculture. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2022; 73(3): 315-26.

3- Shanks CB, Izumi B, Parks CA, Yaroch AL. Measurement of Fruit and Vegetable Intake Incorporating a Diversity, Equity, and Inclusion Lens. Comment on Di Noia, J.; Gellermann, W. Use of the Spectroscopy-Based Veggie Meter® to Objectively Assess Fruit and Vegetable Intake in Low-Income Adults. Nutrients 2021, 13, 2270. *Nutrients*. 2022; 14(4): 809.

4- Mengistu DA, Mulugeta Y, Mekbib D, Baraki N, Gobena T. Bacteriological Quality of Locally Prepared Fresh Fruit Juice Sold in Juice Houses of Eastern Ethiopia. *Environmental Health Insights*. 2022; 16: 11786302211072949.

5- Mohebbi A, Nemati M, Farajzadeh MA, Mogaddam MRA, Lotfipour F. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of patulin and ochratoxin a in commercial fruit juices after their extraction with a green synthesized metal organic framework-based dispersive micro solid phase extraction procedure. *Microchemical Journal*. 2022; 179: 107558. [In Persian]

6- Okafor P, Ogbonna U. Nitrate and nitrite contamination of water sources and fruit juices marketed in South-Eastern Nigeria. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003; 16(2): 213-8.

7- Gerrish RS, Lee JE, Reed J, Williams J, Farrell LD, Spiegel KM, *et al.* PCR versus hybridization for detecting virulence genes of enterohemorrhagic Escherichia coli. *Emerging infectious diseases*. 2007; 13(8): 1253.

8- Attanzio A, Garcia-Llatas G, Cilla A. Fruit Juices: Technology, Chemistry, and Nutrition 2.0. MDPI; 2022. p. 26.

9- Oduori DO, Kwoba E, Thomas L, Grace D, Mutua F. Assessment of Foodborne Disease Hazards in Beverages Consumed in Nigeria: A Systematic Literature Review. *Foodborne pathogens and disease*. 2022; 19(1): 1-18.

10- Al Banna MH, Kundu S, Brazendale K, Ahinkorah BO, Disu TR, Seidu A-A, *et al.* Knowledge and awareness about food safety, foodborne diseases, and microbial hazards: A cross-sectional study among Bangladeshi consumers of street-vended foods. *Food Control*. 2022; 134: 108718.

11- Heidarzadi M, Rahnama M, Alipoureskandani M, Saadati D, Afsharimoghadam A. Salmonella and Escherichia coli contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Food Hygiene*. 2021; 11(2): 42. [In Persian]

12- Meagher KD. Policy responses to foodborne disease outbreaks in the United States and Germany. *Agriculture and Human Values*. 2022; 39(1): 233-48.

13- Lee S, Han A, Yoon J-H, Lee S-Y. Growth evaluation of Escherichia coli O157: H7, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes in fresh fruit and vegetable juices via predictive modeling. *LWT*. 2022; 162: 113485.

14- Maguire M, Kase JA, Roberson D, Muruvanda T, Brown EW, Allard M, *et al.* Precision long-read metagenomics sequencing for food safety by detection and assembly of Shiga toxin-producing Escherichia coli in irrigation water. *PloS one*. 2021; 16(1): e0245172.

15- Ge H, Wang Y, Zhao X. Research on the drug resistance mechanism of foodborne pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2022; 162: 105306.

16- Daghi MM, Nemati M, Abbasalizadeh A,

Farajzadeh MA, Mogaddam MRA, Mohebbi A. Combination of dispersive solid phase extraction using MIL–88A as a sorbent and deep eutectic solvent–based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of some pesticides from fruit juices before their determination by GC–MS. *Microchemical Journal*. 2022; 183: 107984. [In Persian]

17- Nordhagen S. Food safety perspectives and practices of consumers and vendors in Nigeria: A review. *Food Control*. 2022; 134: 108693.

18- Mokhtari A, Mokhtari M. Investigating the microbial contamination of non-factory juices offered in Tehran. *SIVILICA*. 2016. [In Persian]

19 -Ebrahimian S, Siavash M, Ghafari S, *et al.* Bacteriological study of traditional supply juice sales in Ahwaz City in the summer of 1384. manual Proceedings of the Ninth Conference of Environmental Health in Isfahan; 2007. [In Persian]

20- Djazayery A, Sadeghipour H, Effatpanah M, Nazarineia A, Mohseni M. DETERMINATION OF Microbial Contamination IN Traditionally Manufactured Ice-Creams & Handmade Fruit Juices (Carrot Juice and Coconut Milk) in Tehran. 2003.

21- Kalateh M, Vodudi Yazdi Z, QarayanMorshed M. Traditional juices offered in fruit shops under the auspices of Health Center No. 1 in 2010. *North Khorasan University of Medical Sciences*. 2011; 5(1): 1-8. [In Persian]

22- Naiemabadi A, Mirzaiee R, Yazdani A, Armat M, Betalbeluie M, Yarahmadi M. Microbial evaluation of traditional ice cream and homemade fruit juices and fruit juice sales in the confectionary trade units Bojnurd. *North Khorasan Univesity of Medical Sciences Journal*. 2009; 2(2): 3. [In Persian]

23- Asgari E, Nourmoradi H, Delpisheh A, Karimi Z. Investigating the microbial quality of the fresh fruit juices in Ilam shopping centers. 2011. [In Persian]

24- ShamsKhoramabadi q, jahanbani N. Microbial quality of juice and ice cream in Khorramabad. *YAFTEH*. 2002; 4(15): 11-6. [In Persian]

25- Mobara M, Arabnezhad M, Erfanian A, EmamVardizadeh H. The role of health education (hygiene of work equipment and tools, raw materials, disinfection, etc.) in reducing the contamination of traditional juice and banana milk sold in juice shops in the area covered by Health Center No. 3 of Mashhad city National Environmental Health Conference. 2005; 8: 11-8. [In Persian]

26- Alipour V, Rezaei L, Moalemi K, Eghbali M. Microbial quality of hand-made fresh fruit juice in Bandar Abbas Shopping Centers, Iran. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2011; 4(1): 115-24. [In Persian]

27- Haidari M, SHahryari A, GHods Mofidi E, Tabarsa H. Determination of microbial contamination of hand made unpasteurized carrot and cantaloupe juices in juice shops, Gorgan, Iran. *Journal of Health System Research*. 2011; 7(6): 909-15. [In Persian]

28- Massiha A, Khoshkholgh M, Iessazadeh K, Asadi F. Evaluation of microbial quality of some food samples collected in the east region of gilan. 2015. [In Persian]

29- MollaieTavani S, Dehghanifard E, Mehrali A, SharifiArab GA, Dehmanesh A. Survey the Bacteriological Quality of Juice in the Juice Shop of Shahrood City and its Relationship with Food Safety Knowledge and Performance of Vendors in 2013-2014: A Case Study. *Journal of Environmental Health Enginering*. 2017; 4(3): 196-85. [In Persian]

30- Afshari K, Pahpan M. Investigating the type and amount of carrot juice contamination in ice creams in Shushtar city. *CIVILICA*. 2012; 2(5): 1-4. [In Persian]

31- Mousavi S, R My. Microbial quality of handmade juices in Yazd. *Iranian Journal of Infectious Diseases*. 2017; 24(84): 14-1.

32- Mangalizadeh N, Khatiri Pour J, Naseri H, ghasemi S. Evaluation of microbial food consumption in Gorgan in 1391. *16th National Conference on Health, Tabriz, Tabriz University of Medical Sciences, Faculty of Health.* 2013; 2(12): 24-31. [In Persian]

33- Asadi S, Khani P. Investigation of microbial contamination of hand-made juices offered in Arak city, 2013. *21st National Congress of Food Science and Industry*. 1392. [In Persian]

34- Soltan DM, Abrishamchian LS, Pourmoradian M, Asadpour S. Frequency Distribution of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolated from Foods on Sale in the South of Tehran, Iran in 2018-19. 2020. [In Persian]

35- Faramarzi T, Jonidi Jafari A, Dehghani S, Mirzabeygi M, Naseh M, Rahbar Arasteh H. A survey on Bacterial Contamination of Food

Supply in the West of Tehran. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2012; 2(1): 11-8. [In Persian]

36- YA P, SM E, A S. Microbiological quality of traditional fruit juices in Mashhad city in 2004. *CIVILICA*. 2005; 5(2): 4-12.

37- Dominguez-Gonzalez KG, Aguilar-Chairez S, Cerna-Cortes J, Soria-Herrera RJ, Cerna-Cortes JF. Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in fresh-squeezed orange juice samples purchased from street vendors and hygienic practices in Morelia, Mexico. *Food Science and Technology*. 2022; 42.

38- Barkindo HM, Bashir US. Determination of Some Virulence Factors and Antibiogram of Gram-Positive Bacteria Isolated from Vegetables (Spinach, Lettuce, Sorrel). *African Journal of Agricultural Science and Food Research*. 2022; 4(1): 66-72.

39- Jimma FI, Mohammed A, Adzaworlu EG, Nzeh J, Quansah L, Dufailu OA. Microbial Quality and Antimicrobial Residue of Local and Industrial Processed Fruit Juice Sold in Tamale, Ghana. 2022.

40- Rock CM, Brassill N, Dery JL, Carr D, McLain JE, Bright KR, *et al.* Review of water quality criteria for water reuse and risk-based implications for irrigated produce under the FDA Food Safety Modernization Act, produce safety rule. *Environmental research*. 2019; 172: 616-29.

41- Osman KM, Kappell AD, Elhadidy M, ElMougy F, El-Ghany WAA, Orabi A, *et al.* Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant Escherichia coli: A risk to public health and food safety. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 1-14.

42- Brown E, Dessai U, McGarry S, Gerner-Smidt P. Use of whole-genome sequencing for food safety and public health in the United States. *Foodborne pathogens and disease*. 2019; 16(7): 441-50.

43- Nowroozi H, Dowlatshahi S, Rajabizadeh A. The Contamination Rate of Industrial Fruit Juices Supplied in Kerman City with Gram-Positive Cocci Bacteria in 2015: A Short Report. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences.* 2019; 18(3): 313-22. [In Persian]

44- Scott ME, Mbandi E, Buchanan S, Abdelmajid N, Gonzalez-Rivera C, Hale KR, *et al.* Salmonella and Shiga toxin–producing Escherichia coli in products sampled in the food safety and inspection service raw pork baseline study. *Journal of food protection*. 2020; 83(3): 552-9.

45- Osopale BA, Adewumi GA, Witthuhn RC, Kuloyo OO, Oguntoyinbo FA. A review of innovative techniques for rapid detection and enrichment of Alicyclobacillus during industrial processing of fruit juices and concentrates. *Food Control*. 2019; 99: 146-57.

46- Bulti KF, Melkam DL. Microbiological quality of fruit juices sold in cafes and restaurants of Shewarobit town, Amhara, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research.* 2018; 12(26): 623-8.

47- Machado Moreira B, Richards K, Brennan F, Abram F, Burgess CM. Microbial contamination of fresh produce: What, where, and how? Comprehensive reviews in food science and food safety. 2019; 18(6): 1727-50.

48- de Souza Comapa S, Carvalho LMS, Lamarão CV, Souza FdCdA, Aguiar JPL, da Silva LS, *et al.* Microwave processing of camu-camu juices: Physicochemical and microbiological parameters. *Journal of Food Processing and Preservation.* 2019; 43(7):e13989.

49- Kebede H, Hadush H, Gebrecherkos T, Chaithanya KK. Public health risks and bacterial safety of fruit juices prepared in Axum town, north Ethiopia. *J Pharm Res*. 2018; 12: 509.

50- Collier SA, Deng L, Adam EA, Benedict KM, Beshearse EM, Blackstock AJ, *et al.* Estimate of burden and direct healthcare cost of infectious waterborne disease in the United States. *Emerging infectious diseases*. 2021; 27(1): 140.

A systematic review on the contamination of traditional Iranian fruit juices with Escherichia coli

Mohammad-Amin Heidarzadi*

PhD Student, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahr Kord, Shahr Kord, Iran.

Receive: July 29, 2021; Revise: September 3, 2021; Accept: September 6, 2021

Summary

Fruits and juices obtained from them are of special importance as the main pillars of providing human nutritional needs and are among the most desirable drinks that contain salts, vitamins and antioxidants. They provide a significant part of the body's needs; however, lack of hygiene can provide the basis for contamination of fruit juices with pathogenic bacteria. Escherichia coli is an indicator of feces contamination and its presence indicates lack of hygiene in the preparation, production and storage of food. The purpose of the present study is to investigate the level of Escherichia coli contamination of traditional fruit juices in Iran. In order to receive the studies conducted, the databases Medline, Science Direct, Scopus, Springer, PubMed, Wiley, Elsevier and Google scholar, as well as the domestic databases of the country including: Magiran, Irandoc, Civilica, and Academic Jihad Scientific Information Center (SID) was used as the search criteria and then searched using keywords with the title from 1380 to 1401 (2000-2022) and 19 articles related to the subject of this research were found. According to the investigations, the contamination of traditional fruit juice with Escherichia coli bacteria in all of the studies was positive and it is more than the national standard of Iran, Europe and the United States. Considering the high microbial load and the lack of hygiene in traditional fruit juices, it is necessary that the production and supply of these products is accompanied by mandatory training of operators and to prevent the continuation of the activities of centers that do not comply with health standards.

Key words: *Traditional fruit juices, Escherichia coli, Iran*

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

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

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

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

چکیده

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

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

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

مقدمه

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

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

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

مواد و روش‌ها

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

جدول ۱- خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده برای Multiplex-PCR

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

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

نتایج

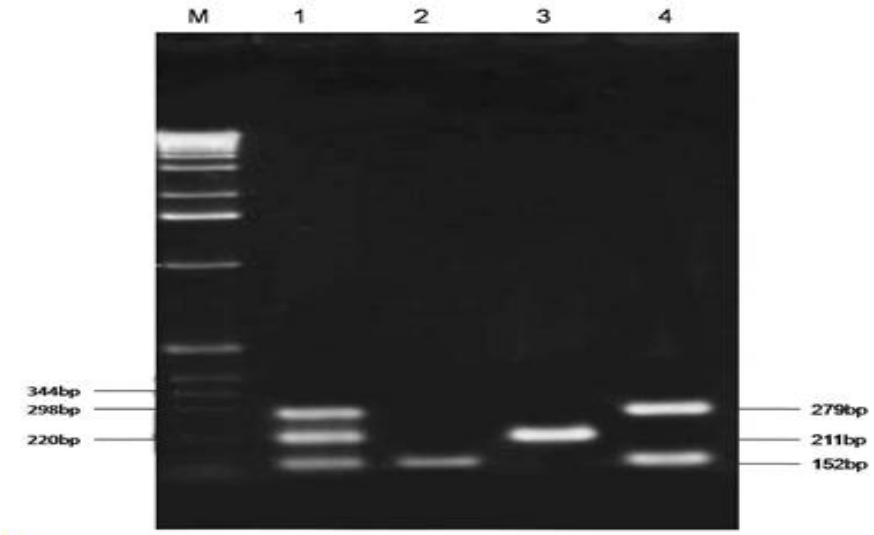
از تعداد ۸۰ نمونه سواب اخذ شده ۲۱ (۲۶/۲۵ درصد) نمونه پس از انجام مراحل رنگ‌آمیزی، کشت و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی شدند. با استفاده از روش Multiplex -PCR 21 جدایه‌ها جهت تعیین گروه فیلوژنتیک مورد بررسی قرار گرفتند.

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

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

بحث و نتیجه‌گیری

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



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

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

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Kariyawasam S, Scaccianoce JA, Nolan LK. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. BMC Microbiol. 2007;7: 81.

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

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

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

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

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

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

Summary

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

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

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

حسینعلی عبدی*[۱]، نوید طحان زاده[۱]

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

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

چکیده

اشریشیا کلی به عنوان فراوان‌ترین باکتری ایجاد کننده عفونت ادراری معرفی شده است. سویه‌های *اشریشیا کلی* ایجاد کننده عفونت ادراری که به عنوان "یوروپاتوژنتیک" شناخته می‌شوند، حاوی فاکتورهای حدت متنوع می‌باشند. بر اساس مطالعات قبلی سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 به عنوان مهم‌ترین سویه، درحالی که سویه‌های گروه A به عنوان کم‌اثرترین سویه در ایجاد عفونت ادراری مطرح هستند. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی تأیید شد. پس از استخراج DNA ژنومی با روش Triplex-PCR تعداد ۷۲ سویه (۵۵ سویه متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 و ۱۷ نمونه متعلق به گروه A) برای تعیین میزان توزیع ژن‌های حدت انتخاب شدند. فراوانی ژن‌های *cnf1*، *irp2*، *iha* و*ompT* به ترتیب به میزان ۳۹، ۲۹، ۹۲ و ۷۸ درصد مشاهده شد. میزان فراوانی این ژن‌ها در گروه فیلوژنتیکی B2 به مراتب از گروه A بیشتر بود. تفاوت معنی‌داری در میزان توزیع ژن‌های *cnf1* و *irp2* در دو گروه فیلوژنتیکی B2 و A مشاهده شد ($P \geq 0/05$). از نظر الگوی توزیع ژنی ۱۰ الگوی منحصر به فرد (Ec1-Ec10) برای این دو گروه مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های B2 حاوی ژن‌های حدت بیشتری نسبت به سویه‌های A هستند و احتمالاً نقش مهم‌تری در ایجاد عفونت ادراری دارند.

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

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

مقدمه

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

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

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

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

در این مطالعه جهت استخراج DNA ژنومی از روش جوشاندن استفاده شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای انجام Multiplex-PCR به طور خلاصه، با حجم نهایی۱۶میکرولیتر (۲ میکرولیترDNA، ۱میکرولیتر از هر مخلوط پرایمر(حاوی هر چهار پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۸ میکرولیتر Master Mix RED 2× (شرکت پیشگام، ایران)، ۴ میکرولیتر آب دیونیزه) و با برنامه دمایی: واسرشتگی (denaturation) اولیه: ۱ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۴ دقیقه، واسرشتگی: ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها (annealing) برای ۴۵ ثانیه در C59º، طویل شدن (extension) برای ۱ دقیقه، در C°72 و طویل شدن نهایی (final extension) یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، انجام شد. جدایه‌ها بر اساس داشتن یا فقدان انواع ژن‌های حدت الگوبندی شدند. برای تعیین گروه‌های فیلوژنی از روش Triplex-PCR که در سال ۲۰۰۰ توسط Clermont و همکاران توصیف شد استفاده گردید (۷). در این روش ژن‌های مارکر *chuA, yjaA* و TspE4.C2 با پرایمرهای جدول ۲ تکثیر گردید. گروه‌بندی فیلوژنتیکی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای تکثیری ژن‌های فوق تعیین شد. ژن‌های بیماری‌زای مورد نظر با استفاده از فرایند Multiplex-PCR با آنزیم TaqDNAPolymerase تکثیر گردید. بررسی محصول Triplex-PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد و Multiplex-PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و سایز مارکر ۱۰۰bp صورت گرفت. از سویه *E.coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و از آب مقطر استریل به جای DNA به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده برای این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول۱- مشخصات پرایمرها برای تکثیر ژن‌های حدت

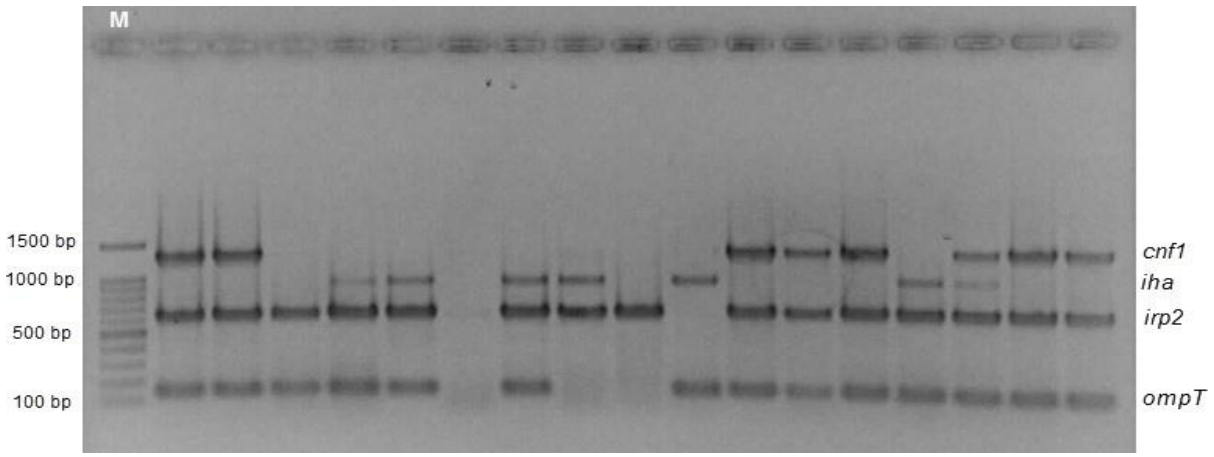
ژن		توالی پرایمرها(3′-5′)	اندازه (bp)
cnf1	F	AGGCAGGAATAAACCAGGAGGT	۱۲۸۶
	R	ACGAGCAGAATTTGACACACGA	
iha	F	CTGGAAGTCAGCATTCGTGGAA	۹۳۴
	R	GATGCCACTCATCCTCAGCAAA	
irp2	F	AGCATCGCCTGCTAAAACTGAA	۶۲۳
	R	CAGACGATGCAGGGCGTTATTA	
ompT	F	TGCGATCAGCTCTTTTGCTTCT	۱۴۴
	R	AGTTGACTGACTTTTCGGCCTC	

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

نتایج

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

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



شکل۱- الکتروفورز در ژل آگارز برای محصولات Multiplex-PCR

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

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

جدول۳ - الگوهای مختلف توزیع ژنی

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

بر اساس نوع الگوی توزیع ژن‌ها در دو گروه فیلوژنتیکی B2 و A تعداد ۱۰ الگو مشاهده شد که با عنوان Ec1 تا Ec10 در جدول ۳ آمده است. دو سویه متعلق به گروه A فاقد چهار ژن مورد مطالعه بودند و دو سویه متعلق به B2 حاوی تمام ژن‌های مورد مطالعه بودند. ۱۲ سویه فقط حاوی ژن *irp2*

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

بحث و نتیجه‌گیری

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

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

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Summary

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

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

مروری بر عوامل عفونی سقط جنین گوسفند و بز در ایران

محمد جواد بهزادی شهربابک*

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

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

چکیده

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

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

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: comdvm.behzadi@gmail.

مقدمه

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

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

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

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

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

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

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

		سال	منطقه	گونه	روش آزمایش	تعداد نمونه	میکروب‌های شناسایی شده
۱	شریف زاده	۲۰۰۹	شهرکرد	گوسفند	پی سی آر	۳۸	۱۳/۱٪ بروسلا، ۵۰٪ *سالمونلا آبورتوس*، ۱۰/۶٪ بروسلا و سالمونلا توأماً، ۲۶/۳٪ شناسایی نشده
۲	هاشمی	۲۰۱۲	چهارمحال و بختیاری	گوسفند	پی سی آر	۳۸	۲۳/۶۸٪ سالمونلا
۳	شریف زاده	۲۰۰۶	چهارمحال و بختیاری	گوسفند	پی سی آر	۵۴	۴۴/۴٪ سالمونلا آبورتوس اویس، ۱۸/۶٪ بروسلا، ۱۱/۱٪ توأم سالمونلا و بروسلا، ۲۵/۹٪ هیچکدام از این دو
۴	صابری	۲۰۱۱	تبریز	گوسفند	پی سی آر و الایزا	۱۰۰	۱۲٪ *بروسلا ملی‌تنسیس*
۵	تاجبخش	۱۹۹۶-۱۹۹۸	اصفهان	گوسفند	کشت	۸۵	۰/۶-۱۳/۳٪ *کمپیلوباکتر فتوس* در گله های درگیر
۶	زهرائی صالحی	۱۹۹۹	تهران	گوسفند	کشت	۸	۱۰۰٪ *کمپیلوباکتر فتوس فتوس*
۷	فیروزی	۲۰۰۳	شیراز	گوسفند	جداسازی	۱۹۸	۱۱/۱٪ بروسلا، ۱۰/۶٪ سالمونلا، ۴٪ کمپیلوباکتر، ۱۴/۱٪ اِ. کلای
۸	قره خانی	۲۰۱۲	همدان	گوسفند	جداسازی	۲۲۶	۵/۳٪ بروسلا، ۰/۴۴٪ کمپیلوباکتر، ۱۶/۳۷٪ *اِ. کلای*
۹	ملک شاهی	۲۰۱۶	لرستان	گوسفند	پی سی آر	۵۰	۴٪ *بروسلا ملی‌تنسیس*، ۸٪ *سالمونلا آبورتوس*، ۴٪ کلامیدوفیلا، *کمپیلوباکتر فتوس* و *لپتوسپیرا اینتروگانس* یافت نشد
۱۰	راد	-	-	گوسفند	پی سی آر	۵۴	در مواردی کلامیدوفیلا یافت شد.
۱۱	صفرپور	۲۰۱۴-۲۰۱۵	چهار محال و بختیاری، اصفهان و خراسان رضوی	گوسفند	پی سی آر	۱۰۰	۲۰٪ کلامیدوفیلا در روش real time و ۹٪ در پی سی آر معمولی
۱۲	محزونیه	۲۰۱۱-۲۰۱۲	چهار محال و بختیاری	گوسفند	پی سی آر nested	۴۸	۵۲٪ کلامیدوفیلا
۱۳	کبیری	۲۰۱۳-۲۰۱۴	چهار محال و بختیاری، اصفهان و خراسان رضوی	گوسفند	پی سی آر	۹۸	۴/۹٪ *کمپیلوباکتر فتوس*، آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* یافت نشد
۱۴	صادقی	-	مرکزی	گوسفند و بز	جداسازی	۷۰	فقط از ۲۲ مورد باکتری جدا شد که ۲/۸٪ لیستریا، ۱/۴٪ کمپیلوباکتر، ۷/۱٪ باسیلوس، ۵/۷٪ *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱/۴ استرپتوکوکوس، ۴/۳ ٪ اِ. کلای، ۵/۷٪ اولیگلا، ۱/۴٪ انتروکوکوس، ۱/۴٪ آئروموناس بودند.
۱۵	براتی	۲۰۱۴-۲۰۱۷	شهرکرد و باغ ملک	گوسفند و گاو	پی سی آر	۱۱۷	۵۶/۴۱٪ کلامیدوفیلا
۱۶	عالم	۲۰۱۱-۲۰۱۲	تبریز	گوسفند	پی سی آر	۵۰	۲۶٪ *کلامیدوفیلا آبورتوس*
۱۷	فروتنی	۲۰۱۰-۲۰۱۱	تبریز	گوسفند	سرولوژی و پی سی آر	۷۰	۸/۵٪ در سرولوژی لپتوسپیرا ۱۰٪ در پی سی آر لپتوسپیرا
۱۸	حملی	۲۰۱۰-۲۰۱۱	تبریز	گوسفند	پی سی آر	۱۳۲	۹/۰۹٪ *کمپیلوباکتر فتوس* و ۱/۵٪ *کمپیلوباکتر ژژنی*؛ *کمپیلوباکتر کولای* یافت نشد
۱۹	سعادتی	۲۰۱۵-۲۰۱۶	سیستان	گوسفند	پی سی آر	۷۸	۱۹/۲٪ *بروسلا ملی‌تنسیس*، ۱۶/۶٪ *کوکسیلا بورنتی*، ۱/۳٪ *سالمونلا آبورتوس اویس*، ۷/۷٪ کمپیلوباکتر
۲۰	هرکی نژاد	۲۰۱۰	زنجان	گوسفند	پی سی آر	۱۲۹	۵۱/۵۲٪ کمپیلوباکتر

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

عوامل باکتریایی

بروسلا: دو گونه‌ی *بروسلا اویس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* می‌توانند در گوسفند و بز آلودگی ایجاد کنند و منجر به سقط جنین شوند (۵، ۶). به نظر می‌رسد بزها به صورت جهانی مستعد ابتلا به *بروسلا ملی‌تنسیس* هستند در صورتی که ابتلای گوسفندان به این ارگانیسم بر اساس نژاد متفاوت است (۷). برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۲۸ *بروسلا ملی‌تنسیس* از شیر یک بز سقط کرده جدا شد و ۲ سال بعد مطالعاتی نقش آن را در ایجاد سقط گوسفند و بز در گله‌های اطراف اصفهان نشان داد و هم اکنون در تمام مناطق کشور اندمیک است. میزان شیوع بروسلوز در جمعیت گوسفند و بز روستایی ۲/۱ درصد برآورد گردیده است. بیوتایپ 1 *بروسلا ملی‌تنسیس* در گوسفند، بز و انسان به عنوان بیوتایپ غالب و بومی کشور بوده است (۸، ۹). در

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

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

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

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

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

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

مطالعاتی که در کشورهای اروپایی صورت گرفته، نشان می‌دهد اهمیت *کلامیدوفیلا* در موارد سقط جنین بز به اندازه آنچه در مورد گوسفند مشاهده شد نیست (۶). با توجه به اینکه ردیابی *کلامیدوفیلا* از طریق کشت امکان پذیر نیست و آزمایش‌های مولکولی معمول نیز در این زمینه چندان موفق نیستند، استفاده از nested PCR برای

پیدا کردن DNA کلامیدیا توصیه شده است (۳). همین مسأله می‌تواند نشان دهد که سهم کلامیدیا از آنچه در مطالعات ذکر شده بیان شد احتمالاً بالاتر باشد.

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

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

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

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

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

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

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

عوامل باکتریایی غیر اصلی

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

عوامل تک یاخته‌ای

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

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

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

عوامل ویروسی

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

28. Fallah S, Hamali H, Jafari Joozani R,

Zare P, Norsaadat G. A molecular (PCR) survey on abortions caused by Campylobacter spp. in sheep flocks located on the suburb of Tabriz. IJVST. 2014; 6(1): 23-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

43. Khalili M, Diali HG, Mirza HN, Mosavi SM. Detection of Coxiella burnetii by PCR in bulk tank milk samples from dairy caprine herds in southeast of Iran. Asian Pac J Trop Dis. 2015; 5(2): 119-22.

44. Hamidinejat H, Goraninejad S, Ghorbanpoor M, Nabavi L, Akbarnejad F. Role of Toxoplasma gondii in abortion of ewes in Ahvaz (South-West Iran). Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52(10): 369-71.

45. Heidari H, Gharekhani J, Tavoosidana G. Role of toxoplasmosis in abortion of ewes in western Iran: a serological study. Sci Parasitol. 2013; 14(2): 99-103.

46. Nourmohammadi M, Hamidinejat H, Tabandeh M, Goraninejad S, Bahrami S. Genotyping of zoonotic toxoplasm gondii isolated from aborted fetuses of ewes of Lorestan province based on SAG2, SAG3 and GRA6 molecular markers. JAUMS. 2017; 17(3): 343-52. [In Persion]

47. Habibi G, Imani A, Gholami M, Hablolvarid M, Behroozikhah A, Lotfi M, et al. Detection and identification of Toxoplasma gondii type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin Province of Iran. Iran J Parasitol. 2012; 7(3): 64.

48. Danehchin L, Razmi G, Naghibi A. Molecular detection of Toxoplasma gondii infection in aborted fetuses in sheep in Khorasan Razavi province, Iran. Int J Vet Res. 2017; 11(2): 147-54.

49. sanjarani g. A study on the prevalence of *toxoplasma gondi* infection in aborted Baluchi sheep fetuses in Sistan district using PCR method: Veterinary Faculty, University of Zabol; 2017. [In Persion]

50. Shahbazi G, Hoghughi Rad N, Madani R, Shjaie S. Evaluation of gene GRA6 IN subtraction of *Toxoplasma gondii* genotypes using PCR-RFLP method in aborted fetuses of Ardabil region. J C P. 2013; 10(3): 1027-32. [In Persion]

51. Razmi GR, Ghezi K, Mahooti A, Naseri Z. A serological study and subsequent isolation of *Toxoplasma gondii* from aborted ovine fetuses in Mashhad area, Iran. J Parasitol. 2010; 96(4): 812-4.

52. Rasuli M, Movasseghi AR, Sami M. Confirmation of the prevalence of Toxoplasmic abortion in a sheep herd with different laboratory methods, The 2nd National Congress Of Veterinary Laboratory Sciences; 12-13 December 2012; Semnan University-Iran: p: 122. [In Persion]

53. Gharekhani J. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in aborted cattle in Hamedan, Iran. JAVAR. 2014; 1(2): 32-5.

54. Saki J, Mohammadpour N, Moramezi F, Khademvatan S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women who have aborted in comparison 2015(10): 1-4.

55. Matin S, Shahbazi G. Study on abortion associated with *Toxoplasma gondii* in women based on PCR detection of aborted placenta and maternal serology in Ardabil, International Conference on

Medical and Clinical Microbiology; 3-4 July 2017; Bangkok, Thailand: P: 2.

56. Ghasemi FS, Rasti S, Piroozmand A, Bandehpour M, Kazemi B, Mousavi SGA, et al. Toxoplasmosis-associated abortion and stillbirth in Tehran, Iran. J Matern-Fetal Neonatal Med. 2016; 29(2): 248-51.

57. Movassaghi AR, Rassouli M, Fazaeli A, Salimi-Bejestani MR. Outbreak of ovine congenital toxoplasmosis in Iran, confirmed by different diagnostic methods. J Parasit Dis. 2016; 40(1): 152-6.

58. Hashemi-Fesharki R. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goats in Iran. Vet Parasitol. 1996; 61(1-2): 1-3.

59. Hashemzadeh Farhang H, Nowzari N, Moazzeni F. Evaluation of seroprevalence of Toxoplasmosis in sheep and goats in Tabriz by ELISA method. Vet Clin Pathol(Veterinary Journal Tabriz). 4(1): 753-7. [In Persion]

60. Sharif M, Sarvi S, Shokri A, Teshnizi SH, Rahimi M, Mizani A, et al. *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in Iran: a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res. 2015; 114(1): 1-16.

61. Asadpour R, Jafari-Joozani R, Salehi N. Detection of *Neospora caninum* in ovine abortion in Iran. J Parasit Dis. 2013; 37(1): 105-9.

with the women with normal delivery in Ahvaz, southwest of Iran. ScientificWorldJournal. 2015;

62. Ezatpour B, Alirezaei M, Hassanvand A, Zibaei M, Azadpour M, Ebrahimzadeh F. The first report of *Neospora caninum* prevalence in aborted and healthy sheep from west of Iran. Comp Clin Path. 2015; 24(1): 19-22.

63. Gharekhani J, Esmaeilnejad B, Rezaei H, Yakhchali M, Heidari H, Azhari M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Iranian goats. Ann Parasitol. 2016; 62(2): 111-4.

64. Vajdi Hokm Abad R, Khan Mohammadi M, Moniri Sarabi MR. Evaluation of the Prevalence of *Neospora Caninum* in sheep in Mianeh by competitive ELIZA and indirect immunofluorescence. VMJ. 2014; 7(1): 59-66. [In Persion]

65. Sasani F, Vazirian A, Javanbakht J, Aghamohammd Hassan M. Detection of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion by PCR and histopathology assays. AJCEM. 2013; 1(2): 35-9.

66. Mozaffari AA, Khalili M, Sabahi S. High seroprevalence of Bluetongue virus antibodies in goats in southeast Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2014; 4: S275-S8.

67. Najarnezhad V, Rajae M. Seroepidemiology of Bluetongue disease in small ruminants of north-east of Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(6): 492-5.

68. Imandar M, Hasanpour A, Hasanzadeh M, Mousakhani F, Pourbakhsh SA. Evaluation of Bluetongue Virus Infection in Sheep in Khoy city using the competitive ELIZA method. J C P. 2014; 11(1): 1135-42.

A Review on Infectious Agents of Sheep and Goats Abortion in Iran

Mohammad javad behzadi shahrbabak*

Assistant Professor, Depertment of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, Zabol university, Zabol,Iran.

Receive: February 10, 2019; Revise: March 3, 2019; Accept: March 4, 2019

Summary

Abortion is one of the problems of sheep and goats breeders in Iran and imposes significant economic losses on farmers. Infectious agents are the most common reason for abortion in sheep and goats. Some of these agents, such as Brucella and Toxoplasma, result in zoonotic diseases. Regarding the important role of sheep and goat breeding in livelihood of the people, it is very important in terms of economics and public health to accurately know the abortive infectious agents in sheep and goat flocks. The purpose of this study was to investigate all the literature which attempts to diagnose bacterial, viral and protozoan agents of sheep and goat abortion in Iran. Therefore, all articles related to abortion of sheep and goats, individual infectious agents and their prevalence in the geographical area of Iran or neighboring countries in databases including Science Direct, Pub Med, Scopus, Google scholar, Magiran and Iran doc were searched. Of the English and Persian studies found, 36 studies were conducted on abortion of sheep and goats that their results were inserted in a table for better evaluation. Based on studies that examined the causes of abortion of sheep and goats in different provinces of Iran; Brucella, Toxoplasma, Chlamydophila, Campylobacter and Salmonella are the most common causes of abortion in the country. No study has tracked the viral agents in abortion of sheep and goats in Iran.

Key words: *Iran, Abortion, Infectious agents, Sheep and goat*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 4, No. 1, Spring & Summer 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