

دوره ۴، شماره ۲
ناشر: دانشگاه زابل

سر دبیر:

تقی زهرایی صالحی؛ tsaleh@ut.ac.ir

مدیر مسئول:

داریوش سعادت؛ saadatdariush@uoz.ac.ir

مدیر اجرایی:

احمد راشکی؛ ah_rashki@usal.es



هیات دبیران:

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

زابل



افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران



محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران



محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی زاهدان



تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران



مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده

دامپزشکی، دانشگاه تهران



محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شیراز



محمد جهانتیغ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه زابل



محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهرکرد



سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز



رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد



محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهید باهنر کرمان



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

گرافیسیت: 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: ۰۵۴)۳۱۲۳۲۲۷۱، نمابر: ۰۵۴)۳۱۲۳۲۲۵۱

وبسایت: nfvm.uoz.ac.ir

پست الکترونیک: 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 می باشد. زمینه ی کاری مجله مذکور گستره ی پژوهش های بنیادی، تحقیقات کاربردی، تحقیقات اپیدمیولوژیک و مطالعات بالینی در زمینه ی آخرین تحقیقات میکروب شناسی دامپزشکی می باشد. مقالات در حوزه های مختلف علم میکروبیولوژی از جمله باکتری شناسی، ویروس شناسی، قارچ شناسی، تک یاخته شناسی و ایمنی شناسی و در حوزه های مرتبط با بیماری های عفونی کلیه حیوانات اهلی، پرندگان، آبزیان و حیات وحش قابل پذیرش می باشند.

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 میکروبی‌شناسی دامپزشکی

از آنجایی که هدف نشریه پیوستن به نشریات ISI و ISC 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 میکروبی‌شناسی دامپزشکی، در این 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 غیرمعارف، 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 `low justify` استفاده نشود و ترجیحاً از گزینه `justify Medium` یا `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 راحت تر 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 به صورت 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).

نتایج: متن قسمت نتایج باید مختصر و واضح باشد می‌توان از جداول، اشکال، نمودارهای آماری، گراف‌ها و تصاویر برای تبیین نتایج استفاده کرد. از آوردن جداول و نمودارهایی که اطلاعات و داده‌های آنها در متن مقاله به طور کامل آورده شده است، اجتناب گردد. در جداول و نمودارها نباید اطلاعات یکسانی ارائه شود. اگر تعداد کمی یافته و یا یک نتیجه ساده وجود دارد، بهتر است به جای جدول و نمودار، این یافته در متن آورده شود.

تعداد جداول و نمودارها باید متناسب با حجم مقاله باشد. جدول‌ها بهتر است با استفاده از امکان Table در Microsoft Word طراحی شوند. جداول به صورت عکس ارائه نگردند و شماره‌گذاری متوالی داشته باشند و در متن مقاله به شماره‌ی جداول به صورت متوالی اشاره گردد. در زیرنویس جداول، همه‌ی اختصاری‌های غیراستاندارد استفاده‌شده، توضیح داده شوند. متن جداول فارسی باشد. نمودارها در نرم‌افزار Microsoft-Excel با عناوین مشخص و مجزا طراحی شوند و به صورت تصویر درج نگردد.

عکس‌ها و تصاویر به صورت فایل‌هایی از نوع JPEG و با کیفیت مناسب آورده شود. عکس‌ها باید دقیق و روشن و به نحوی تهیه شوند که از نظر فنی چاپ آن‌ها با کیفیت مطلوب در مجله مقدر باشد. عکس‌ها و تصاویر باید شماره‌گذاری متوالی داشته و ترتیب آن‌ها بر اساس ارجاع به آن‌ها در متن باشد. اگر عکس منتشر شده است، منبع اولیه ذکر شود و اجازه‌ی کتبی آن ارائه گردد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این قسمت ضمن تحلیل نتایج به‌دست آمده از تحقیق، به سایر تحقیقاتی که نتایج تحقیق اخیر را تأیید و یا رد می‌کنند اشاره شود. در مورد تحقیقاتی که نتایج آنها با نتیجه تحقیق اخیر همخوانی ندارد باید در مورد علت ناهمخوانی بحث شود و بیان گردد که تفاوت مذکور از کجا می‌تواند ناشی شده باشد. عباراتی که در مقدمه یا نتایج آورده شده با جزئیات در قسمت بحث و نتیجه‌گیری تکرار نشوند. پاراگراف پایانی به منزله نتیجه‌گیری است. در این پاراگراف روی جنبه‌های مهم و جدید مطالعه تأکید شود.

سپاسگزاری: از کلیه‌ی افراد یا سازمان‌هایی که در فراهم کردن تسهیلات، کمک‌های مالی و یا تکنیکی همکاری نموده‌اند و نام آنها جزء نویسندگان مقاله نیست، تشکر به عمل آید و نیز در صورتی که مقاله برگرفته از پایان‌نامه و یا طرح پژوهشی مصوب است، شماره ثبت پایان‌نامه یا طرح پژوهشی هم ذکر شود.

منابع: کلیه‌ی منابع حتی منابع فارسی به انگلیسی ترجمه و نوشته شوند. در انتهای منابع فارسی به زبان اصلی آن اشاره شود و [In Persian] آورده شود. منابع به ترتیب استفاده در متن شماره‌گذاری و طبق اصول منابع "ونکوور" مرتب شوند، برای ارجاع به مقالات از اعداد ریاضی داخل پرانتز استفاده شود به طور مثال (۱۱). در صورتی که به مراجع پی‌درپی اشاره می‌شود باید بین اولین و آخرین شماره از خط فاصله استفاده کرد، در غیر این صورت از کاما "،" باید سود جست (مثال: ۹-۷ یا ۷، ۵). توصیه می‌شود جهت نوشتن منابع از نرم‌افزار مدیریت منابع از جمله EndNote یا Reference Manager استفاده کنید.

نحوه رفرنس نویسی:

مقاله: نام خانوادگی و حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان (بین نام نویسندگان از کاما "،" استفاده شود). عنوان کامل مقاله. نام کوتاه شده مجله. سال انتشار؛ دوره(شماره مجله): شماره صفحات. در صورتی که تعداد 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 (*cryptosporidium* 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 می باشد:

گزارش موردی (Case Report) باید شامل بخش های 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 نمونه های انسانی کار می کند اسرار بیمار محرمانه بماند و همچنین یک فرم رضایت نامه 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 (Short Communication)

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 میکروبی‌شناسی دامپزشکی، گزارش و نقد گردهمایی‌های آموزش میکروبی‌شناسی 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 می‌بایست تکمیل شود و به همراه فایل های مقاله بارگزاری گردد. اسامی نویسندگان نباید در فایل اصلی مقاله ذکر شود، فایل های مربوطه باید داندود 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 گذاری شود.

تعهد نامه

سر دبیر محترم مجله تازه ها در میکروبی 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 گذاری 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.

✓ لطفاً 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 منافی 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

ردیابی گاما کروناویروس‌ها در بازار پرندگان زنده، تهران، ۱۳۹۹

زهرا ضیافتی کافی^۱، حسین حسینی^۲، آرش قلیان چی لنگرودی^۱، محمد عبدالشاه^۲، عابد میرباقری^۱، علی هژبر راجعونی^۱، ناصر صدری^۱، حمیده نجفی^{۱*}

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمونشناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران.
۳- بخش تشخیص و تحقیقات بیماری‌های طیور، مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ مهر ۱۴۰۰، بازنگری: ۲۵ آذر ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۱ دی ۱۴۰۰

چکیده

ویروس برونشیت عفونی یک گاما کروناویروس است که مسئول خسارات اقتصادی سنگین به صنعت پرورش طیور در سراسر جهان است. ماکیان (*Gallus gallus*) میزبان طبیعی اصلی این ویروس می‌باشند اما کروناویروس‌های مشابه با ویروس برونشیت عفونی در گونه‌های مختلفی از پرندگان یافت می‌شوند. به‌منظور تعیین نقش گونه‌های مختلف پرندگان در همه‌گیرشناسی ویروس برونشیت عفونی، مطالعه حاضر به ردیابی گاما کروناویروس‌ها در بازار پرندگان تهران می‌پردازد. سواب‌های کلواک از سه گونه پرنده شامل ماکیان، اردک و بوقلمون اخذ شد، سپس RNA با استفاده از کیت استخراج CinnaPure استخراج و در نهایت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت RevertAid First strand ساخته شد. آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌منظور تکثیر ژن‌های اسپایک و نوکلئوکپسید گاما کروناویروس‌ها مورد استفاده واقع شد. این واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز موفق به ردیابی ژن اسپایک و ژن نوکلئوکپسید گاما کروناویروس‌ها به ترتیب در ۴۰ درصد از ماکیان و همچنین در ۶۶/۶ درصد از بوقلمون‌ها شد. تحلیل شجره‌شناسی نشان داد گاما کروناویروس‌های یافت شده در بوقلمون‌ها بسیار مشابه تیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی طیور بودند. این مطالعه بیانگر گردش گاما کروناویروس‌ها در گونه‌های مختلف پرندگان در بازار پرندگان می‌باشد که در مطالعات همه‌گیرشناسی آتی حائز اهمیت است، همچنین بر مبنای نتایج به‌دست آمده، ردیابی ژن نوکلئوکپسید نسبت به ژن اسپایک جهت غربالگری گاما کروناویروس‌ها کارآمدتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: اردک، ایران، بوقلمون، ردیابی مولکولی، ویروس‌های شبه کرونا

ژنوم کروناویروس به اندازه تقریبی ۳۰ کیلوباز، بزرگ‌ترین ژنوم در بین RNA ویروس‌ها است. ژنوم، سنس مثبت و دارای کلاهک در انتهای ۵' و دم پلی‌آدنیل در انتهای ۳' است که به آن اجازه می‌دهد به‌عنوان یک mRNA جهت ترجمه پلی‌پروتئین‌های رپلیکاز عمل نماید. ژن رپلیکاز که کدکننده پروتئین‌های غیر ساختاری است دو سوم ژنوم (تقریباً ۲۰ کیلوباز) را اشغال نموده، در حالی که پروتئین‌های ساختمانی و پروتئین‌های فرعی در مجموع ۱۰ کیلوباز از ژنوم را تشکیل می‌دهند. انتهای ۵' ژنوم دارای توالی پیشرو و نواحی غیر قابل ترجمه می‌باشد که ساختارهای حلقه-ساقه مورد نیاز جهت تکثیر RNA و نسخه‌برداری در آن قرار دارند. به علاوه در ابتدای هر ژن ساختمانی یا ژن فرعی، توالی‌های تنظیم‌کننده نسخه‌برداری وجود دارد که برای بیان هر یک از این ژن‌ها لازم است. ناحیه غیر قابل ترجمه ۳' نیز دارای ساختارهای RNA است که جهت تکثیر و سنتز RNA ویروسی مورد نیاز است. ساختار ژنومی کروناویروس‌ها شامل ۵'-پیشرو-ناحیه غیر قابل ترجمه-رپلیکاز-اسپایک (S)-غشا (E)-ممبران (M)-نوکلئوکپسید (N)-ناحیه غیر قابل ترجمه ۳'-دم پلی‌آدنیل و همچنین ژن‌های فرعی قرار گرفته مابین ژن‌های ساختاری در انتهای ۳' ژنوم می‌باشد. ژن‌های فرعی برای تکثیر در کشت سلول ضروری نمی‌باشند، اما برخی از آنها در بیماری‌زایی ویروس نقش اساسی دارند (۱، ۲).

کروناویروس‌ها بر اساس ساختار ژنومی و ترتیب ژنی به چهار جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا کروناویروس تقسیم می‌شوند. ویروس‌هایی که پرندگان را آلوده می‌کنند در دو جنس گاما و دلتا قرار می‌گیرند (۳). ویروس شاخص در جنس گاما کروناویروس ویروس برونشیت عفونی طیور می‌باشد که تا سال ۱۹۵۶

فقط سویه ماساچوست آن شناخته شده بود، اما امروزه واریانت‌های فراوانی از این ویروس در سراسر جهان وجود دارد. کروناویروس دیگری که طیور را آلوده می‌سازد کروناویروس بوقلمون است که در سال ۱۹۷۱ به‌عنوان عامل ایجاد "انتریت بوقلمون" یا بیماری "تاج آبی" شناخته شد. کروناویروس بوقلمون در جنس گاما کروناویروس از خانواده کروناویروس و راسته نیدوویرالز قرار دارد. طول ژنوم کروناویروس بوقلمون تقریباً ۲۷,۶۳۲ نوکلئوتید، به اضافه دم پلی‌آدنیل ۳' می‌باشد. ژنوم دارای دو قالب قرائت باز هم‌پوشان در دو سوم انتهای ۵' و تعدادی قالب قرائت در یک سوم انتهای ۳' می‌باشد. نواحی غیر قابل ترجمه در هر دو انتهای ژنوم وجود دارند. ژنوم کروناویروس بوقلمون از لحاظ ظرفیت کد کردن و ساختار ژنومی مشابه سایر کروناویروس‌هاست. ۱۱ قالب قرائت باز در این ژنوم دیده می‌شود. ژن ۱ کدکننده رپلیکاز ویروس بوده حاوی دو قالب قرائت باز 1a و 1b است. این ژن دارای موتیف‌هایی است که بین تمام کروناویروس‌ها مشترک است و حاوی توالی‌های تغییر قالب ریبوزومی می‌باشد. ژن‌های معمول ساختاری کروناویروس‌ها شامل ژن‌های کدکننده اسپایک (S)، غشایی کوچک (E یا 3c)، ممبران (M) و نوکلئوکپسید (N)، در ادامه ژن ۱ قرار دارند. ژنوم کروناویروس بوقلمون دارای ژن‌های پلی‌سیسترونیک ۳ و ۵ است که به ترتیب مابین ژن‌های S و E، و مابین ژن‌های M و N قرار می‌گیرند. در ژنوم ویروس برونشیت عفونی ژن ۳ تری سیسترونی و شامل 3a، 3b و 3c است که ژن 3c کدکننده پروتئین E است. ژن ۵ کدکننده دو محصول 5a و 5b که عملکرد آنها نامشخص است می‌باشد. قالب قرائت باز سوم بین ژن M و ژن 5a قرار داشته و با نام ORF X شناخته می‌شود. این قالب قرائت حاوی توالی‌های تنظیم‌کننده نسخه‌برداری است. به صورت

خلاصه ساختار ژنومی در کرونا ویروس بوقلمون بدین شرح می‌باشد (۴):

5'UTR-Gene 1(ORF 1a-1b)-S- Gene 3(ORFs 3a,3b, E)-M-Gene 5 (ORFs X, 5b,5c)-N-UTR3'

با وجود دهه‌ها تحقیق، محققین به تازگی به بررسی کرونا ویروس‌ها در جمعیت پرندگان وحشی پرداخته‌اند و چه بسا جمعیت متنوعی از کرونا ویروس‌ها در پرندگان وحشی بدون هیچ علامت بالینی حضور داشته باشند. این ویروس‌ها همگی متعلق به جنس‌های گاما و دلتا کرونا ویروس‌ها می‌باشند (۵). با توجه به اهمیت فراوان و خسارات اقتصادی سنگین ویروس برونشیت عفونی طیور در ایران و همچنین عدم وجود اطلاعات کافی در مورد حضور ویروس‌های مشابه این ویروس در گونه‌های مختلف پرندگان در ایران، تحقیق حاضر به بررسی حضور گاما کرونا ویروس‌ها در سه گونه از پرندگان بازار پرندگان تهران می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: در این مطالعه تعداد ۲۲ سواب کلواک از سه گونه پرند شامل ماکیان، اردک و بوقلمون از پرندگان واقع در بازار پرندگان تهران اخذ گردید. نمونه‌ها شامل ۱۰ نمونه از ماکیان، ۶ نمونه از اردک‌ها و ۶ نمونه از بوقلمون‌ها بود و به صورت تصادفی از پرندگان فاقد علامت بالینی اخذ شد. حجم نمونه بر اساس میزان جمعیت و مطالعات فراوانی قبلی به دست آمد.

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل: RNA با استفاده از کیت استخراج CinnaPure (سیناکلون، ایران) از نمونه‌های سواب استخراج گردید. خلوص RNA استخراج شده توسط خوانش نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی در حین استخراج استفاده گردید. ساخت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت RevertAid First strand (ترموفیشر، امریکا) انجام شد.

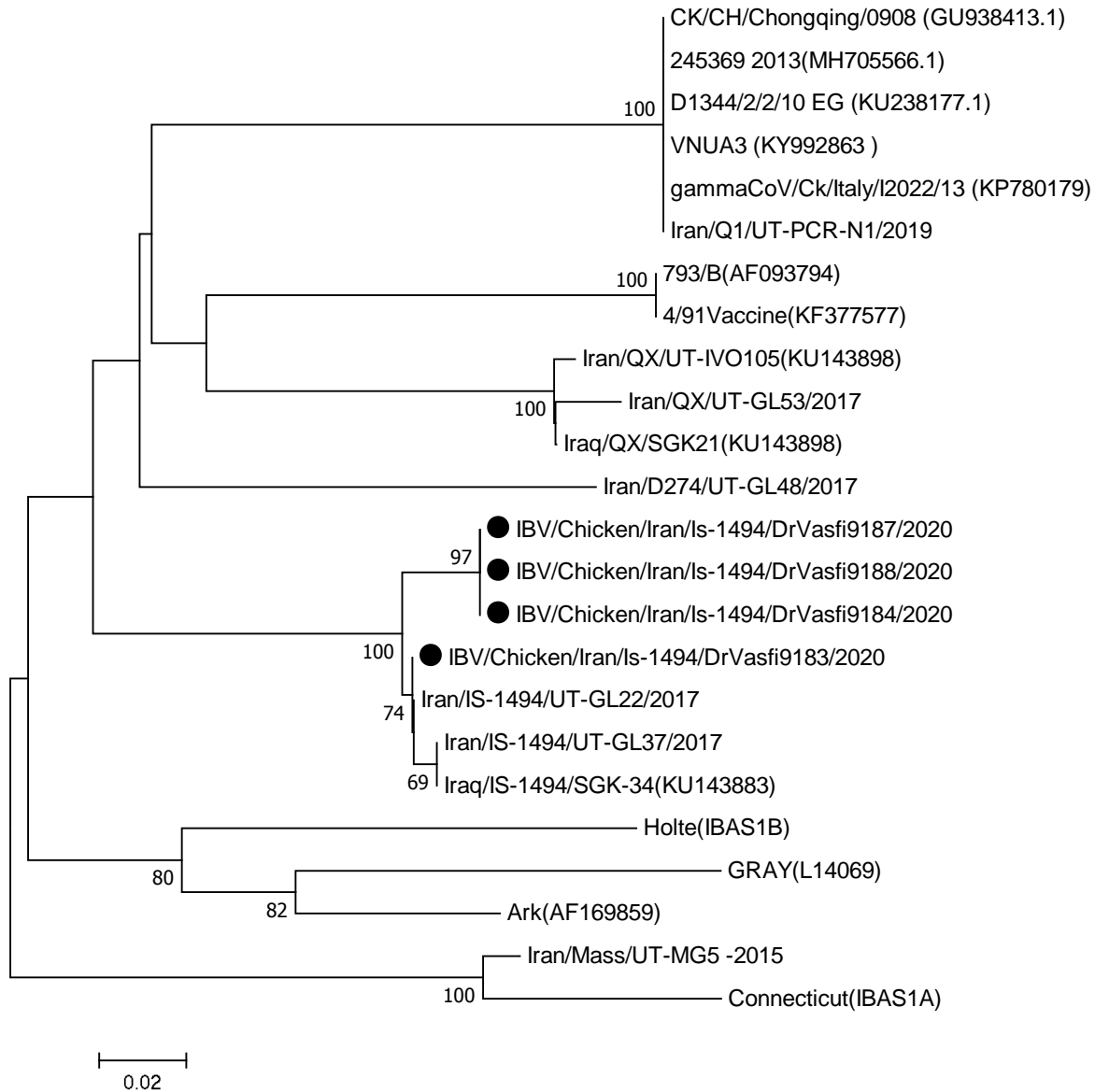
آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر ژن نوکلئوکپسید: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن نوکلئوکپسید عبارتند: از پرایمر فوروارد (CCT GAT GGT AAT TTC CGT TGG G معکوس (ACG CCC ATC CTT AAT ACC TTC) (CTC). چرخه حرارتی دستگاه به منظور انجام آزمون زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۴۰ چرخه واسرشت در دمای ۹۴^oC به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در ۵۸^oC به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲^oC به مدت ۴۵ ثانیه بود (۶).

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای جهت تکثیر ژن اسپایک: ژن هدف شامل بخش فوق‌العاده متغیر ژن اسپایک بود. هر واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که شامل ۲ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای SX1 و SX2، ۳ میکرولیتر از cDNA و ۱۳ میکرولیتر از مسترمیکس 2x سیناکلون بود. چرخه حرارتی شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۴^oC به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه دناتورسازی در دمای ۹۴^oC به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸^oC به مدت ۳۰ ثانیه، و طویل‌سازی در دمای ۷۲^oC به مدت ۳۰ ثانیه بود. طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲^oC و زمان ده دقیقه انجام شد. مرحله دوم این آزمون با استفاده از یک میکرولیتر از رقت یک صدم از محصول مرحله اول و با استفاده از پرایمرهای SX3 و SX4 در چرخه حرارتی مشابه با مرحله اول انجام شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، در بافر TBE و با رنگ RedSafe با استفاده از اشعه فرابنفش مورد مشاهده واقع شدند.

تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی: محصولات به دست آمده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز توسط کیت AccuPrep (شرکت بیونیر، کره جنوبی) خالص‌سازی و به منظور تعیین توالی ارسال گشتند (شرکت بیونیر، کره جنوبی). سپس کروماتوگرام‌ها با نرم‌افزار CromasPro مورد تحلیل قرار گرفتند. توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های نوکلئوکپسید

شجره‌شناسی با استفاده از الگوریتم Neighnor-Joining رسم شد.

و اسپایک نمونه‌ها با سایر توالی‌های مرتبط که در بانک ژنی موجود بود مقایسه و فواصل ژنتیکی با استفاده از مدل کایمورا در نرم‌افزار MEGA محاسبه گشتند. درخت



شکل ۱- درخت شجره‌شناسی بر مبنای آنالیز بخشی از ژن اسپایک گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در ماکیان بازار پرندگان تهران. از نسخه ۷ نرم افزار MEGA و روش neighbor-joining جهت ترسیم درخت استفاده شد. فواصل تکاملی با استفاده از روش کایمورا محاسبه گردید. ویروس‌های ردیابی شده در این مطالعه با علامت دایره مشکی نمایش داده شده‌اند.

ژن اسپایک بودند. از بین ۶ عدد نمونه اخذ شده از بوقلمون‌ها ۴ عدد (۶۶/۶ درصد) دارای نتیجه مثبت در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با هدف تکثیر ژن نوکلئوکپسید بودند و از ۶ نمونه اخذ شده از

نتایج

از بین ۱۰ عدد نمونه اخذ شده از ماکیان، ۴ نمونه (۴۰ درصد) دارای نتیجه مثبت در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با هدف تکثیر

۲۰۱۷ از ایران و ۲۰۱۵ از عراق گزارش شدند (۷)، (جدول ۱ و شکل ۱). نمونه‌های مثبتی که در بوقلمون‌ها یافت شدند بیشترین میزان از شباهت را به یکدیگر و سپس به ژنوتیپ ۴/۹۱ و همچنین ژن نوکلئوکسپید سویه‌ای از کرونا ویروس بوقلمون که در سال ۲۰۰۸ در فرانسه جدا شد داشتند (۹) (جدول ۲ و شکل ۲).

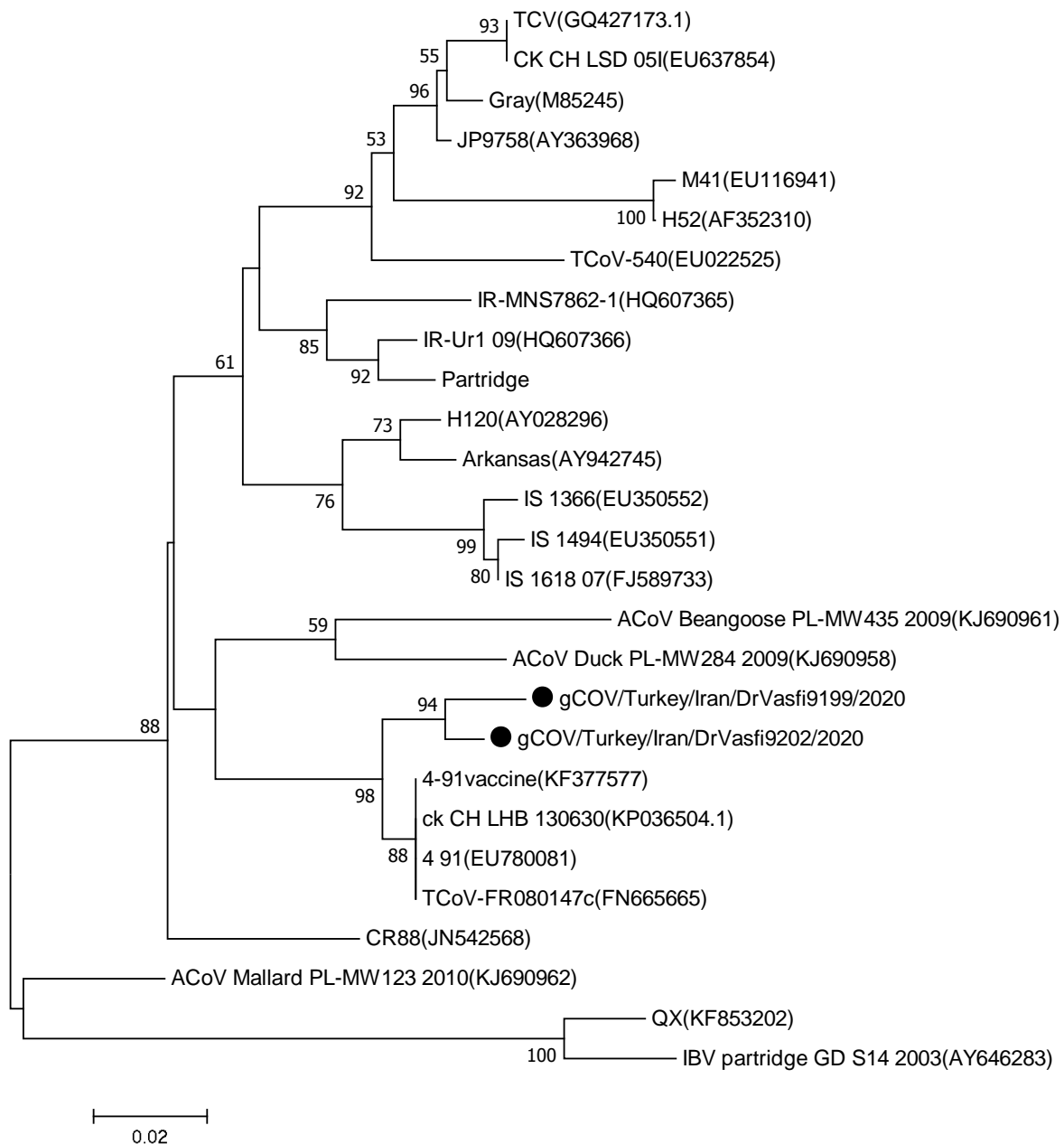
اردک‌ها مورد مثبتی در هیچ کدام از آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دیده نشد. از بین نمونه‌های مثبتی که از ماکیان گزارش شد ۳ نمونه دارای شباهت ۱۰۰ درصد با یکدیگر و شباهت ۹۷/۹۸ درصد با نمونه چهارم بودند. هر ۴ نمونه متعلق به واریانت ۲ (IS-1494) ویروس برونشیت عفونی پرندگان و دارای تشابه نوکلئوتیدی بسیار بالا با سویه‌هایی از واریانت ۲ بودند که در سال‌های

جدول ۱- درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن اسپایک گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در ماکیان بازار پرندگان تهران با ویروس‌های برونشیت عفونی مرتبط

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|----|---|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9183/2020 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9184/2020 | 97.98 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9187/2020 | 97.98 | 100.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9188/2020 | 97.98 | 100.00 | 100.00 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Iran/IS-1494/UT-GL22/2017 | 100.00 | 97.98 | 97.98 | 97.98 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Iran/IS-1494/UT-GL37/2017 | 99.50 | 97.46 | 97.46 | 97.46 | 99.50 | | | | | | | | | | | |
| 7 | Iran/Q1/UT-PCR-N1/2019 | 79.77 | 77.76 | 77.76 | 77.76 | 79.77 | 79.04 | | | | | | | | | | |
| 8 | Iraq/IS-1494/SGK-34(KU143883) | 99.50 | 97.46 | 97.46 | 97.46 | 99.50 | 100.00 | 79.04 | | | | | | | | | |
| 9 | Iran/D274/UT-GL48/2017 | 81.34 | 79.33 | 79.33 | 79.33 | 81.34 | 80.67 | 77.33 | 80.67 | | | | | | | | |
| 10 | Iran/QX/UT-IVO105(KU143898) | 81.96 | 79.95 | 79.95 | 79.95 | 81.96 | 81.29 | 76.71 | 81.29 | 77.41 | | | | | | | |
| 11 | Iran/QX/UT-GL53/2017 | 80.63 | 78.57 | 78.57 | 78.57 | 80.63 | 79.94 | 75.32 | 79.94 | 76.73 | 97.96 | | | | | | |
| 12 | Iraq/QX/SGK21(KU143898) | 82.60 | 80.63 | 80.63 | 80.63 | 82.60 | 81.95 | 76.71 | 81.95 | 78.09 | 99.50 | 98.48 | | | | | |
| 13 | Iran/Mass/UT-MG5_2015 | 80.04 | 79.33 | 79.33 | 79.33 | 80.04 | 79.36 | 72.24 | 79.36 | 76.56 | 73.15 | 72.42 | 73.88 | | | | |
| 14 | D1344/2/2/10_EG_(KU238177.1) | 79.77 | 77.76 | 77.76 | 77.76 | 79.77 | 79.04 | 100.00 | 79.04 | 77.33 | 76.71 | 75.32 | 76.71 | 72.24 | | | |
| 15 | CK/CH/Chongqing/0908_(GU938413.1) | 79.77 | 77.76 | 77.76 | 77.76 | 79.77 | 79.04 | 100.00 | 79.04 | 77.33 | 76.71 | 75.32 | 76.71 | 72.24 | 100.00 | | |
| 16 | 245369_2013(MH705566.1) | 79.77 | 77.76 | 77.76 | 77.76 | 79.77 | 79.04 | 100.00 | 79.04 | 77.33 | 76.71 | 75.32 | 76.71 | 72.24 | 100.00 | 100.00 | |
| 17 | 4/91Vaccine(KF377577) | 79.86 | 77.72 | 77.72 | 77.72 | 79.86 | 79.14 | 78.67 | 79.14 | 79.93 | 81.22 | 80.55 | 81.22 | 69.12 | 78.67 | 78.67 | 78.67 |

جدول ۲- درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن نوکلئوکسپید گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در بوقلمون‌های بازار پرندگان تهران با ویروس‌های برونشیت عفونی مرتبط

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
| 1 | gCOV/Turkey/Iran/DrVasfi9199/2020 | | | | | | | | | | |
| 2 | gCOV/Turkey/Iran/DrVasfi9202/2020 | 97.90 | | | | | | | | | |
| 3 | TCV(GQ427173.1) | 87.91 | 88.88 | | | | | | | | |
| 4 | H120(AY028296) | 88.31 | 89.30 | 93.51 | | | | | | | |
| 5 | IS_1494(EU350551) | 87.81 | 88.81 | 90.68 | 96.14 | | | | | | |
| 6 | CR88(JN542568) | 90.76 | 92.17 | 89.83 | 91.66 | 91.66 | | | | | |
| 7 | 4-91vaccine(KF377577) | 97.05 | 97.48 | 89.83 | 90.21 | 89.72 | 93.07 | | | | |
| 8 | QX(KF853202) | 77.36 | 79.09 | 79.03 | 80.65 | 82.84 | 81.17 | 80.12 | | | |
| 9 | 4_91(EU780081) | 97.05 | 97.48 | 89.83 | 90.21 | 89.72 | 93.07 | 100.00 | 80.12 | | |
| 10 | TCoV-540(EU022525) | 87.91 | 88.40 | 93.48 | 91.20 | 89.26 | 88.86 | 89.83 | 80.16 | 89.83 | |
| 11 | TCoV-FR080147c(FN665665) | 97.05 | 97.48 | 89.83 | 90.21 | 89.72 | 93.07 | 100.00 | 80.12 | 100.00 | 89.83 |



شکل ۲- درخت شجره شناسی بر مبنای آنالیز بخشی از ژن نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در بوقلمون‌های بازار پرندگان تهران. از نسخه ۷ نرم افزار MEGA و روش neighbor-joining جهت ترسیم درخت استفاده شد. فواصل تکاملی با استفاده از روش کایمورا محاسبه گردید. ویروس‌های ردیابی شده در این مطالعه با علامت دایره مشکی نمایش داده شده اند.

می‌باشند. بازارهای پرندگان می‌توانند به‌عنوان مخزن ویروس‌های مختلف عمل نمایند، و به دلیل تنوع میزبانی، ویروس‌ها قادرند به سرعت گسترش یافته، در نتیجه این بازارها محل مناسبی برای نوترکیبی ویروسی و انتقال بین گونه‌ای هستند (۶).

بحث و نتیجه‌گیری

کرونا ویروس‌ها عوامل ایجاد بیماری‌های مهمی همچون سندرم تنفسی خاورمیانه و سندرم فوق حاد تنفسی و همچنین برونشیت عفونی در طیور صنعتی

مطالعه حاضر به بررسی گاما کرونا ویروس های موجود در سه گونه از پرندگان بازار پرندگان تهران پرداخته است. نتایج حاصل مبین ردیابی ژن نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس ها در بوقلمون و تشابه بالای این ویروس ها هم با سایر گاما کرونا ویروس های یافت شده در بوقلمون و همچنین با ژنوتیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی پرندگان است. ابتلای بوقلمون ها توسط گاما کرونا ویروس در سایر مطالعات نیز مشاهده گشت. Villarreal و همکاران موفق به ردیابی کرونا ویروس بوقلمون در ۱۷ گله مبتلا به التهاب روده حاد و دو گله به ظاهر سالم شدند. گاما کرونا ویروس در ۸۲ درصد از گله های بیمار و ۵۰ درصد از گله های سالم ردیابی شد (۱۰). Jones و همکاران با بررسی نمونه های مشکوک بالینی موفق به ردیابی گاما کرونا ویروس در ۲۰ درصد از نمونه های بوقلمون شدند (۱۱). در مطالعه ای که بین سال های ۲۰۰۷ الی ۲۰۰۹ در فرانسه صورت گرفت ژن نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس بوقلمون در ۳۷ درصد از گله های دارای علائم انتریت دیده شد، در حالی که این نرخ در گله های فاقد علامت ۱۷ درصد گزارش شد (۹). Yu و همکاران نیز در گزارشی، شیوع کرونا ویروس بوقلمون را در در گله های مبتلا به انتریت، ۲۲ درصد عنوان نمودند (۱۲). همان گونه که از مطالعات بالا بر می آید گاما کرونا ویروس نه تنها در بوقلمون های مبتلا به انتریت، به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده این بیماری، و بلکه حتی در پرندگان فاقد علائم نیز ردیابی گردیده که همسو با نتایج حاصل از این مطالعه است.

همچنین شیوع گاما کرونا ویروس در ماکیان در ایران سابقه ای طولانی دارد. در مطالعه ای که بین سال های ۲۰۱۰ الی ۲۰۱۴ انجام گرفت شیوع این ویروس تقریباً ۷۰ درصد در بین طیور صنعتی گزارش گردید (۱۳). مطالعه بعدی که بین سال های

۲۰۱۴ الی ۲۰۱۵ انجام شد حاکی از شیوع ۶۰ درصدی ویروس در بین گله های مرغ گوشتی بود که این میزان در بین سال های ۲۰۱۵ الی ۲۰۱۷ به ۵۲ درصد رسید (۸). با در نظر گرفتن این مطالعات، شیوع ۴۰ درصد این ویروس در ماکیان دور از انتظار نمی باشد.

ارتباط نزدیک کرونا ویروس بوقلمون با ویروس برونشیت عفونی در سایر مطالعات نیز هم در مورد ژن نوکلئوکپسید و هم سایر ژن ها نیز مشاهده گشت که در ادامه به ذکر چند مورد از آنها می پردازیم. Maurel و همکاران نیز در گزارشی در سال ۲۰۰۸ ارتباط نزدیک کرونا ویروس بوقلمون یافت شده در فرانسه را با تیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی طیور ذکر نمودند (۱۴). Breslin و همکاران ثابت نمودند ژن های M و N سه کرونا ویروس جدا شده از بوقلمون ها در آمریکا دارای شباهت بیش از ۹۰ درصدی با همین ژن ها در ویروس برونشیت عفونی بوده و همچنین ژن ۵ (واقع در بین ژن های M و N) ناحیه غیر قابل ترجمه ۳ این ویروس ها کاملاً مشابه این ژن ها در ویروس برونشیت عفونی بوده است. علاوه بر این، درصد تفاوتی که بین این جدایه ها یافت شده بود مشابه همان درصدی از اختلاف است که بین جدایه های ویروس برونشیت عفونی وجود دارد. همچنین این محققین به بیان تشابه بالای ناحیه غیر قابل ترجمه ۳ کرونا ویروس بوقلمون و ویروس برونشیت عفونی پرداختند (۱۵). Lin و همکاران درصد بالایی از تشابه (۹۲-۸۲ درصد) بین ژن های ۳، M، ۵ و N یک سویه کرونا ویروس بوقلمون با ویروس برونشیت یافتند (۱۷). علاوه بر این گزارشی مبنی بر تشابه فراوان بین ژن پلیمرز کرونا ویروس بوقلمون و ویروس برونشیت عفونی وجود دارد (۱۸). افزون بر تشابهات ژنتیکی، Lin و همکاران مشاهده نمودند ۱۸ جدایه کرونا ویروس بوقلمون دارای الگوی واکنش پذیری

رابطه نزدیک این ویروس‌های با سویه واکسینال ماساچوست ویروس برونشیت عفونی بود (۲۱). ژن RNA پلیمراز وابسته به RNA گاما کروناویروس‌ها در ۱۸ گونه از پرندگان وحشی (غاز، اردک، مرغ دراز پا، مرغ نروزی، پنگوئن) در تنگه برینگ ردیابی شد و تجزیه شجره‌شناسی حاکی از ارتباط بسیار نزدیک این سویه‌ها با ویروس برونشیت عفونی بود (۲۲). همچنین ژن RNA پلیمراز وابسته به RNA در پرندگان وحشی مهاجر در کره جنوبی ردیابی و ارتباط آنها با ویروس برونشیت عفونی اثبات گردید (۲۳).

این مطالعه بیانگر گردش گاما کروناویروس‌ها در گونه‌های مختلف پرندگان در بازار پرندگان می‌باشد که در مطالعات همه‌گیر شناسی آتی حائز اهمیت است. نکته دیگر آن که بر طبق نتایج پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر ژن نوکلئوکپسید در ردیابی گاما کروناویروس‌ها در پرندگان توانمند بوده و این مسأله پیش از این از سوی Suryaman و همکاران نیز مطرح شد. آنها با انجام آزمون تکمیلی ایمنووهسیتوشیمی ثابت کردند پرایمرهایی که ژن نوکلئوکپسید را هدف قرار می‌دهند قدرت ردیابی بیشتری نسبت به پرایمرهایی دارند که ژن اسپایک را تکثیر می‌کنند (۲۰).

References

1- Jogalekar MP, Veerabathini A, Gangadaran P. Novel 2019 coronavirus: Genome structure, clinical trials, and outstanding questions. *Experimental Biology and Medicine*. 2020; 245(11): 964-9.

2- Zhou Z, Qiu Y, Ge X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Animal Diseases*. 2021; 1(1): 1-28.

3- Torres C, Listorti V, Lupini C, Franzo G, Drigo M, Catelli E, et al. Gamma and Deltacoronaviruses in quail and pheasants from Northern Italy. *Poultry science*. 2017; 96(3): 717-22.

آنتی‌ژنیک یکسان در برابر پنل آنتی‌بادی‌های مشابه بودند. واکنش پذیری مثبت با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در برابر جدایه‌های کروناویروس بوقلمون و سویه ماساچوست ویروس برونشیت عفونی مشاهده گردید (۱۹).

بنابر نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مذکور، کروناویروس بوقلمون ارتباط نزدیکی با ویروس برونشیت عفونی داشته و این موضوع تنها مختص گونه بوقلمون نبوده و گاما کروناویروس‌هایی که در انواع مختلفی از پرندگان یافت می‌شوند معمولاً دارای شباهت زیادی با ویروس برونشیت عفونی می‌باشند. مطالعه‌ای در اندونزی صورت گرفت و به ردیابی دو ژن اسپایک و نوکلئوکپسید گاما کروناویروس در طوطی‌سانان پرداخت. از ۱۸ گله نمونه‌برداری شده یک جواب مثبت در آزمون زنجیره‌ای پلیمراز ژن اسپایک و ۵ واکنش مثبت در مورد ژن نوکلئوکپسید مشاهده گشت. تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی تشابه بسیار بالای ویروس‌های ردیابی شده را با ژنوتیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی نشان داد (۲۰). Hughes و همکاران در مطالعه‌ای به ردیابی ناحیه غیر قابل ترجمه ۳' گاما کروناویروس در جمعیت پرندگان وحشی شمال انگلستان پرداختند و تحلیل شجره‌شناسی بیانگر

4- Wang Y, Cui X, Chen X, Yang S, Ling Y, Song Q, et al. A recombinant infectious bronchitis virus from a chicken with a spike gene closely related to that of a turkey coronavirus. *Archives of virology*. 2020; 165(3): 703-7.

5- Wille M, Holmes EC. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS microbiology reviews*. 2020; 44(5): 631-44.

6- Yaghoubi H, Ghalyanchilangeroudi A, Karimi V, Ghafouri S, Hashemzadeh M, Hosseini H, et al. Molecular detection of gamma coronaviruses in bird parks of Iran. *Archives of Razi Institute*. 2019; 74(4): 349-55.

7- **Sege W, Ghalyanchi Langeroudi A, Karimi V, Madadgar O, Marandi MV, Hashemzadeh M.** Genotyping of infectious bronchitis viruses from broiler farms in Iraq during 2014-2015. *Archives of virology*. 2016; 161(5): 1229-37.

8- **Hamadan AM, Ghalyanchilangeroudi A, Hashemzadeh M, Hosseini H, Karimi V, Yahyaraeyat R, et al.** Genotyping of Avian infectious bronchitis viruses in Iran (2015–2017) reveals domination of IS-1494 like virus. *Virus research*. 2017; 240: 101-6.

9- **Maurel S, Toquin D, Quéguiner M, Men MI, Allée C, Lamandé J, et al.** Molecular identification and characterization of a turkey coronavirus in France. VI International Symposium on Avian Corona-and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Rauschholzhausen, Germany, 14-17 June 2009; 2009: VVB Laufersweiler Verlag.

10- **Villarreal L, Assayag M, Brandão P, Chacón J, Astolfi-Ferreira C, Gomes C, et al.** Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in an outbreak of poult enteritis and mortality syndrome. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2006; 8(2): 131-5.

11- **Jones R, Ellis R, Cox W, Errington J, Fuller C, Irvine R, et al.** Development and validation of RT-PCR tests for the detection and S1 genotyping of infectious bronchitis virus and other closely related gammacoronaviruses within clinical samples. *Transboundary and emerging diseases*. 2011; 58(5): 411-20.

12- **Yu M, Ismail M, Qureshi M, Dearth R, Barnes H, Saif Y.** Viral agents associated with poult enteritis and mortality syndrome: the role of a small round virus and a turkey coronavirus. *Avian diseases*. 2000; 297-304.

13- **Hosseini H, Fard MHB, Charkhkar S, Morshed R.** Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010–2014). *Avian diseases*. 2015; 59(3): 431-5.

14- **Maurel S, Toquin D, Briand F-X, Queguiner M, Allee C, Bertin J, et al.** First full-length sequences of the S gene of European isolates

reveal further diversity among turkey coronaviruses. *Avian pathology*. 2011; 40(2): 179-89.

15- **Breslin JJ, Smith LG, Fuller FJ, Guy JS.** Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid protein gene and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. *Virus research*. 1999; 65(2): 187-93.

16- **Breslin JJ, Smith LG, Fuller FJ, Guy JS.** Sequence analysis of the matrix/nucleocapsid gene region of turkey coronavirus. *Intervirology*. 1999; 42(1): 22-9.

17- **Lin TL, Loa CC, Wu CC.** Complete sequences of 3' end coding region for structural protein genes of turkey coronavirus. *Virus research*. 2004; 106(1): 61-70.

18- **Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN.** Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus research*. 1999; 60(2): 181-9.

19- **Lin TL, Loa CC, Wu CC, Bryan T, Hooper T, Schrader D.** Antigenic relationship of turkey coronavirus isolates from different geographic locations in the United States. *Avian diseases*. 2002; 46(2): 466-72.

20- **Suryaman GK.** Identification and Pathomorphological Study of Avian Coronavirus in Chicken and Several Psittacine Species: *IPB University*; 2021.

21- **Hughes LA, Savage C, Naylor C, Bennett M, Chantrey J, Jones R.** Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerging infectious diseases*. 2009; 15(7): 1091.

22- **Muradrasoli S, Bálint Á, Wahlgren J, Waldenström J, Belák S, Blomberg J, et al.** Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the Bering Strait area (Beringia). *PLoS One*. 2010; 5(10): e13640.

23- **Kim H-R, Oem J-K.** Surveillance of avian coronaviruses in wild bird populations of Korea. *Journal of wildlife diseases*. 2014; 50(4): 964-8.

Detection of Gammacoronaviruses from live bird markets, Tehran, 2020

Zahra Ziafati Kafi¹, Hossein Hosseini², Arash Ghalyanchi Langeroudi¹, Mohammad Abdoshah³, Abed Mirbagheri¹, Ali Hojbar Rajeouni¹, Naser Sadri, Hamideh Najafi^{1*}

1 - Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

2 - Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.

3 - Department of Avian Disease Research and Diagnostic, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Receive: October 13, 2021; Revise: December 16, 2021; Accept: January 1, 2022

Summary

Infectious Bronchitis Virus is a Gammacoronavirus responsible for huge economic loss to poultry industry worldwide. Poultry (*Gallus gallus*) is the major host of the virus, but IBV-like coronaviruses can infect different species of birds. To determine the role of different bird species in infectious bronchitis virus epidemiology, this work was conducted to detect Gammacoronaviruses in Tehran live bird market. Cloacal swabs were collected from three bird species including poultry, duck and turkey; the RNA was extracted by CinnaPure isolation kit; subsequently the complementary DNA was synthesized by RevertAid First strand kit. Polymerase chain reactions targeting two genes of the nucleocapsid and the spike were run on complementary DNAs synthesized in the previous step. Polymerase chain reactions successfully detected the spike and the nucleocapsid genes in 40% of poultry and 66.6% of turkeys, respectively. Phylogenetic analysis showed that gammacoronaviruses detected in this work were closely related to infectious bronchitis virus type 4/91. This work also introduced the circulation of gammacoronaviruses in different bird species from a bird market, this issue could be significant in the future epidemiologic studies. The findings also described that the nucleocapsid gene detection is much more effective than the spike gene detection in terms of gammacoronavirus monitoring.

Keywords: *Duck, Iran, Turkey, Molecular detection, Corona-like viruses*



ردیابی ژنومی و مطالعه فراوانی آلودگی با کریپتوسپورییدیوم در کبوترهای اصفهان

مجید غلامی آهنگران*^۱، مهرداد استادپور^۲، اویس پورمهدی^۳

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

۲- دانش‌آموخته، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۹ دی ۱۴۰۰، بازنگری: ۳ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۶ بهمن ۱۴۰۰

چکیده

کریپتوسپورییدیوز از بیماری‌های مهم انگلی در دام، طیور و انسان است که از نظر بهداشتی و اقتصادی اهمیت زیادی دارد. تکثیر این انگل در دام و طیور می‌تواند باعث حفظ چرخه انگل در محیط گردد. لذا کنترل بیماری در این میزبان‌ها با کاهش بار آلودگی محیط و نهایتاً کنترل بیماری در انسان همراه است. به‌منظور ردیابی کریپتوسپورییدیوم در کبوترهای خانگی، در چهار فصل مختلف سال ۱۳۹۷ از ۱۰۰ کبوتر خانگی با جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شد. پس از استخراج ژنوم از نمونه‌های مدفوعی، با پرایمر اختصاصی به ردیابی ژن SS rRNA کریپتوسپورییدیوم پرداخته شد. در ۶ نمونه (۶ درصد نمونه‌ها) قطعه ۱۳۲۵ جفت بازی مربوط به ژن SS rRNA کریپتوسپورییدیوم تکثیر شد (۴ کبوتر ماده و ۲ کبوتر نر). از نظر آماری، هیچ ارتباطی بین مؤلفه جنس و بروز آلودگی وجود نداشت. بررسی‌ها نشان داد از ۶ مورد مثبت، ۵ مورد در فصل سرد و تنها یک مورد در فصل گرم ردیابی شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد در فصول سرد میزان آلودگی به‌طور معنی‌داری بیشتر است (۱۱/۳۶ درصد در مقابل ۱/۷۸ درصد) ($P < 0.05$). کبوترهای اصفهان به کریپتوسپورییدیوم آلوده‌اند و لازم است برنامه کنترلی مناسب در این پرندگان به‌عنوان یکی از میزبان‌های این تک‌یاخته انجام شود. قطعاً کاهش میزان آلودگی در کبوترها می‌تواند میزان آلودگی محیط به این عامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و حیوان را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: کریپتوسپورییدیوم، کبوتر، اصفهان، PCR

مقدمه

خانواده کریپتوسپورییدیوم، انگل‌های فرصت‌طلب هستند که باعث کریپتوسپورییدیوز در سراسر جهان می‌شوند (۱). کریپتوسپورییدیوز به دلیل شیوع زیاد و پتانسیل بیماری‌زایی مشترک انسان و دام، به عنوان بیماری مهمی است که در سلامت عمومی بسیار قابل توجه است. انتقال کریپتوسپورییدیوم هنگامی رخ می‌دهد که یک میزبان با مواد آلوده شده توسط مدفوع انسان یا حیوان آلوده در تماس قرار گیرد (۲، ۴). کریپتوسپورییدیوز از جمله بیماری‌های مهم در دام، طیور و انسان است که هم از نظر بهداشتی و هم از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارد. تکثیر و فعالیت انگل در قسمت‌های مخاطی دستگاه تنفس و گوارش علاوه بر عوارض مستقیم، زمینه‌ساز سایر عوامل پاتوژن مانند مایکوپلاسماها در دستگاه تنفس می‌گردد.

کریپتوسپورییدیوم علاوه بر ایجاد بیماری در دستگاه تنفس طیور، با تخریب بافت روده موجب بروز اسهال و اختلال در هضم و جذب مواد غذایی می‌گردد. تک‌یاخته کریپتوسپورییدیوم با ایجاد اختلال در عملکرد و فیزیولوژی سلول‌های روده‌ای و همچنین آسیب‌هایی که از نظر پاتولوژیکی در سلول‌های روده‌ای موجب می‌شود، زمینه‌ساز بروز سایر بیماری‌های روده‌ای و دستگاه گوارش نیز می‌گردد (۵). گونه‌های این جنس که قبلاً به عنوان انگل‌های داخل سلولی اجباری در نظر گرفته می‌شدند و متعلق به خانواده کوکسیدیا بودند، اخیراً به عنوان بخشی از زیرکلاس *Gregaria* طبقه‌بندی شده‌اند، زیرا آنها می‌توانند چرخه زندگی خود را در محیط بدون سلول ادامه دهند (۶). با این وجود، آنها در چرخه زندگی انگلی، به عنوان عوامل ایجادکننده بیماری در انسان و حیوانات مانند پستانداران، خزندگان، ماهی‌ها و پرندگان تلقی می‌گردند (۷).

کریپتوسپورییدیوم سویه‌های بسیار زیادی دارد که در بین آنها گونه *بالی* متداول‌ترین گونه در پرندگان است که به صورت بالینی و تحت بالینی می‌تواند ۱۲ راسه از پرندگان را مبتلا کند (۸). گونه گالی، ۵ راسه از پرندگان به ویژه گنجشک‌سانان و طوطی‌سانان را آلوده می‌کند. گونه *مله* / *گریدیس* عمدتاً ماکیان‌سانان خصوصاً بوقلمون‌ها را مبتلا می‌کند و تنها گونه‌ای از پرندگان است که پستانداران را به شکل تجربی و طبیعی مبتلا می‌کند (۹). علاوه بر اینها، ژنوتیپ‌های I تا V نیز در پرندگان گزارش شده است که در رابطه با اختصاصیت میزبانی آنها اطلاعات بسیار کمی در دست است (۱۰). اگرچه بسیاری از عفونت‌های کریپتوسپورییدیوم ناشی از گونه *مله* / *گریدیس* و *بالی* در مجاری روده‌ای و تنفسی و بورس پرندگان به وجود می‌آید با این وجود نمی‌توان از نقش احتمالی سایر گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های کریپتوسپورییدیوم (که هنوز از نظر مولکولی مشخص نشده‌اند) در ایجاد بیماری، چشم‌پوشی کرد (۱۱). گونه *بالی* اغلب به عنوان عوامل ایجادکننده عفونت در سیستم تنفسی فوقانی، گوش میانی و ملتحمه چشمی پرندگان وحشی مانند جغدها، پرستوها و شاهین‌ها در نظر گرفته می‌شوند (۱۱، ۱۵).

آزمایشات مولکولی، یک عامل اساسی در تشخیص کریپتوسپورییدیوز است زیرا اوسیسیت‌های کریپتوسپورییدیوم در مقایسه با کوکسیدیاهای دیگر کوچک‌تر هستند، اسپوروسیست ندارند، مشاهده آنها دشوار است و از نظر مورفولوژی شبیه به قارچ‌ها و اسپوره‌های مخمر هستند. در نمونه‌هایی که اوسیسیت‌های کمی وجود دارد، برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب در نمونه‌های مدفوع مورد بررسی با استفاده از رایج‌ترین روش‌های تشخیصی مانند رنگ‌آمیزی اسید فست یا مشاهده تخمک‌ها در زیر میکروسکوپ نوری انجام می‌شود (۹). معمولاً نتایج

منفی کاذب نیز به دلیل حساسیت کم تکنیک‌های رنگ‌آمیزی در نمونه‌هایی با تعداد کم اووسیت به وجود می‌آید (۱۶).

هدف از مطالعه اخیر شناسایی کریپتوسپوریدیوم به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام در کبوتر است تا با توجه به شیوع این بیماری در کبوترهای خانگی، برنامه کنترلی مناسب در جهت جلوگیری از ایجاد بیماری در این پرندگان و نیز جلوگیری از انتشار آلودگی در محیط و نهایتاً آلودگی انسان به عمل آید.

مواد و روش‌ها

در این بررسی به‌منظور ردیابی کریپتوسپوریدیوم در مدفوع کبوترهای خانگی، در مدت ۱۲ ماه در سال ۱۳۹۷ از کبوترهای خانگی ارجاعی به کلینیک بخش خصوصی واقع در شهرستان اصفهان نمونه مدفوع تازه اخذ شد. در این بررسی، نمونه‌ها از ۱۰۰ قطعه کبوتر خانگی با جنس نر و ماده و در طی چهار فصل جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از هر پرنده به شکل مجزا با ثبت مشخصات کامل شامل زمان نمونه‌گیری، سن تقریبی و جنس جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در کنار یخ منتقل شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند.

استخراج DNA با روش فنل-کلروفورم طبق روش معمول انجام شد. پس از استخراج ژنوم، با روش حساس و دقیق PCR به شناسایی کریپتوسپوریدیوم اقدام شد. برای این منظور از پرایمرهای منتشر شده استفاده شد که به تکثیر ژن SS rRNA می‌پردازد (۸). توالی پرایمرها به شکل 5' TTCTAGAGCTAATACATGCG 3' و 5' CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA 3' انجام شد. در این واکنش قطعه‌ای به طول ۱۳۲۵ جفت باز تکثیر می‌شود. واکنش‌گرهای مربوط به واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با هم مخلوط شدند. این مخلوط شامل ۱ میکرولیتر از DNA

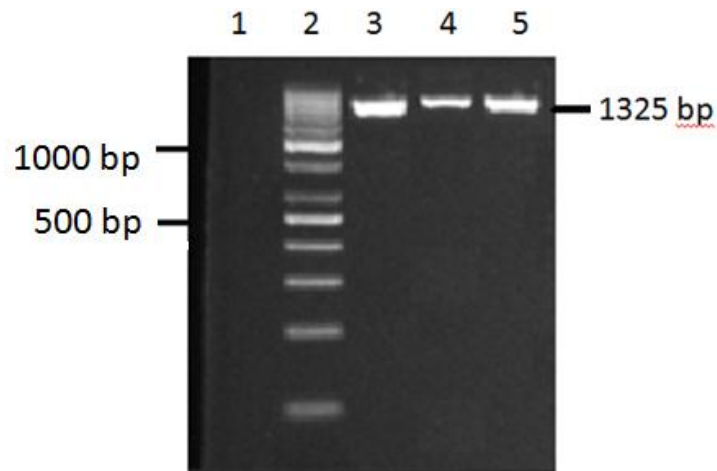
الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۳ میکرومول کلرید منیزیم و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاز) می‌باشد. سپس ۲ تا ۳ قطره روغن معدنی استریل برای جلوگیری از تبخیر، به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید و بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) قرار داده شد.

در این بررسی مرحله دناتوراسیون، اتصال و گسترش ۳۵ سیکل تکرار شد. محصول PCR بر روی ژل ۱ درصد آگارز با ولتاژ ۸۰ ولت برای مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید، سپس ژل مورد نظر با اتیدیم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه یووی‌داک مشاهده شد.

نتایج

در نمونه‌های مثبت قطعه ۱۳۲۵ جفت بازی ژن SS rRNA مربوط به کریپتوسپوریدیوم تکثیر شد و در نمونه‌های کنترل منفی تکثیر نشد (تصویر شماره ۱). نتایج نشان داد در نمونه‌های تهیه شده از ۱۰۰ قفس کبوتر نر و ماده، ۶ نمونه واجد باند ۱۳۲۵ جفت بازی بوده و از لحاظ کریپتوسپوریدیوم مثبت می‌باشند (۶ درصد) (جدول ۱). از ۶۰ کبوتر ماده نمونه‌گیری شده ژن SS rRNA مربوط به کریپتوسپوریدیوم در ۴ کبوتر تکثیر شد و در ۴۰ کبوتر نر، ۲ نمونه مثبت یافت شد که از نظر بررسی‌های آماری، هیچ ارتباط معناداری بین جنس و بروز آلودگی وجود نداشت (جدول شماره ۲).

بررسی‌ها نشان داد از ۶ مورد مثبت، ۵ مورد در فصل سرد و تنها یک مورد در فصل گرم ردیابی گردیده است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان می‌دهد ارتباط معناداری بین فصل (سرد و گرم) و آلودگی با کریپتوسپوریدیوم وجود دارد به طوری که در فصول سرد میزان آلودگی به طور معناداری بیشتر است (۱۱/۳۶ درصد در مقابل ۱/۷۸ درصد)



تصویر شماره ۱- الکتروفورز مربوط به محصول PCR ژن ss rRNA کریپتوسپورییدیوم (ستون یک: نمونه منفی، ستون ۲: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۳ تا ۵: نمونه های مثبت)

جدول شماره ۱- مقایسه درصد موارد آلودگی در فصول مختلف و جنس های مختلف کبوتر خانگی (اهلی)

| جنسیت | ماده | | نر | | کل |
|----------|-----------------------|------------|-------------------|------------|----|
| | تعداد و درصد نمونه ها | تعداد مثبت | تعداد و درصد مثبت | تعداد مثبت | |
| تابستان | ۱۸ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| پاییز | ۱۰ | ۱ | ۱۰ | ۱ | ۲ |
| زمستان | ۱۶ | ۲ | ۱۲/۵ | ۱ | ۳ |
| بهار | ۱۶ | ۱ | ۶/۲۵ | ۰ | ۱ |
| تعداد کل | ۶۰ | ۴ | ۶/۶۶ | ۲ | ۶ |

جدول شماره ۲- مقایسه درصد موارد آلودگی به کریپتوسپورییدیوم در جنس نر و ماده در کبوترهای خانگی

| جنسیت | وضعیت آلودگی | |
|-------|--------------|------------|
| | موارد مثبت | موارد منفی |
| ماده | ۴ | ۵۶ |
| نر | ۲ | ۳۸ |

جدول شماره ۳- مقایسه درصد موارد آلودگی به کریپتوسپورییدیوم در فصول مختلف سرد و گرم در کبوترهای خانگی

| فصول | وضعیت آلودگی | |
|---------------------------|--------------|------------|
| | موارد مثبت | موارد منفی |
| فصول سرد (پاییز و زمستان) | ۵ | ۳۹ |
| فصول گرم (بهار و تابستان) | ۱ | ۵۵ |

بحث و نتیجه گیری

آلودگی با کریپتوسپورییدیوم در پرندگان بیشتر محدود به ماکیان، بوقلمون، کبک، قرقاول، طاووس، مرغ جنگلی، اردک، غاز، گونه‌های مختلف طوطی، فنچ و قناری می‌باشد. تا به حال از ۳۰ جنس پرنده از سراسر دنیا گزارش‌های مربوط به عفونت کریپتوسپورییدیوم وجود داد که معمولاً میزان شیوع آن از صفر تا ۱۵ درصد در پرندگان مختلف، متفاوت بوده است (۷، ۹). اولین گزارش مربوط به کریپتوسپورییدیوم در پرندگان توسط تیزر در سال ۱۹۲۹ بوده است که در محتویات سکومی یک مرغ این عفونت توصیف شده است (۱۷). آنچه از نظر بهداشت عمومی اهمیت بیشتری دارد و در پرندگان گزارش شده است مربوط به ۳ گونه پارووم، هومنیس و مله /گریدیس می‌باشد که گونه مله /گریدیس در بین این ۳ گونه بیشترین آلودگی را در پرندگان به خود اختصاص داده و شبیه پاروم از دامنه میزبانی وسیعی برخوردار است. این گونه علاوه بر این که پرندگان را آلوده می‌کند می‌تواند انسان، سگ، گربه، خوک، خرگوش و سایر پستانداران را نیز آلوده کند (۱۸، ۱۹). مطالعات قبلی در برزیل و بیشتر قسمت‌های دنیا وجود کریپتوسپورییدیوم را در مدفوع کبوتر گزارش کرده‌اند. جمعیت کبوترها در مناطق شهری به دلیل دسترسی به غذا، به طور فزاینده‌ای در حال رشد است (۲۰-۲۲). به گفته ساکو و همکاران (۲۰۱۳)، ازدیاد جمعیت کبوترها در مناطق شهری می‌تواند منجر به قرار گرفتن بیشتر انسان در معرض عوامل بیماری‌زا مانند کریپتوسپورییدیوم شود، زیرا این پرندگان نه تنها به راحتی در ساختمان‌ها و مکان‌های ساختمانی آشیانه می‌سازند بلکه آزادانه در اطراف میادین و فضاهای عمومی پرواز می‌کنند و از طریق مدفوع خود، محیط را آلوده می‌کنند (۲۳). در مطالعه‌ای که در شهر ریودوژانیرو برزیل در سال ۲۰۱۶ بر روی مدفوع

کبوتر انجام شد، نمونه‌های مدفوع کبوتر را با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و تکنیک‌های مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار داده و میزان شیوع کریپتوسپورییدیوم را ۲۰/۹ درصد اعلام کردند (۲۰). در مطالعاتی که در کشور عراق و ایران بر روی این انگل صورت گرفت، میزان شیوع کریپتوسپورییدیوم را پس از بررسی‌های میکروسکوپی به ترتیب ۱/۲ درصد و ۲/۹ درصد اعلام کردند (۲۴، ۲۵). همچنین الیویرا و همکاران در سال ۲۰۱۷ با استفاده از تکنیک‌های مولکولی در شهر سائوپائولو، میزان شیوع ۷ درصد را در کبوترها اعلام کردند (۲۶). با استفاده از روش‌های مولکولی در تشخیص این انگل در کبوترهای کشور چین (۱۹، ۲۷) میزان شیوع کریپتوسپورییدیوم به ترتیب ۴/۸ درصد و ۰/۸۲ درصد و در جزایر ایسلند (۲۸) این میزان، ۵/۹ درصد اعلام شد. عوامل زیادی در میزان شیوع و تشخیص این انگل در پرندگان وجود دارد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به موقعیت جغرافیایی، اندازه نمونه، زمان و فصل نمونه‌گیری، سن و جنسیت میزبان و همچنین روش تشخیصی اشاره کرد (۱۹، ۲۹). با این حال میزان شیوع آلودگی در مطالعه اخیر در محدوده سایر مطالعات از کشورهای مختلف است.

گزارشات مختلفی از شیوع گونه‌های آلوده‌کننده پرندگان و به‌ویژه کبوتر وجود دارد. در یک مطالعه، گونه *لیویا* به‌عنوان یکی از گونه‌های رایج در پرندگان مطرح شده است که در محیط‌های شهری زندگی می‌کند و می‌تواند از طریق مدفوع، محیط اطراف را آلوده کند (۲۰). گونه *مله /گریدیس* یکی دیگر از گونه‌های کریپتوسپورییدیوم است که در انسان شیوع بیشتری دارد (۲۹، ۳۲) و در مدفوع کبوترهای چین (۱۹، ۲۷) و تایلند (۳۱) نیز شناسایی شده است. الیویرا در سال ۲۰۱۷ اولین گزارش مربوط به حضور گونه پارووم را در مدفوع کبوترهای شهرهای

از داروهای مهارکننده عفونت به صورت دوره‌ای می‌تواند در کنترل این بیماری در کبوتر و کاهش عوارض تنفسی و گوارشی این بیماری نقش داشته باشد. علاوه بر آن انتظار می‌رود با کاهش میزان آلودگی در کبوترهای اهلی به‌عنوان یک مخزن آلودگی، میزان آلودگی محیط به این عامل بیماری‌زای انسان و حیوان نیز کاهش یابد.

سائوپاتولو و آراکاتوبا گزارش کرد (۲۶). همچنین کبوترها توانایی زیادی در تعامل با انسان و سایر پرندگان اهلی و وحشی دارند و در نتیجه به یک حامل بالقوه جهت انتقال انگل تبدیل می‌شوند (۳۲).

نتیجه‌گیری

با توجه به شواهد مولکولی از آلودگی کبوترها به تک‌یاخته کریپتوسپورییدیوم به نظر می‌رسد استفاده

References

- 1- Hlavsya MC, Cikesh BL, Roberts VA, Kahler AM, Vigar M, Hilborn ED, et al. Outbreaks associated with treated recreational water-United States, 2000–2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2018; 67(19): 547.
- 2- Pumipuntu N, Piratae S. Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Veterinary world*. 2018; 11(5): 681.
- 3- Rossignol JF. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Experimental parasitology*. 2010; 124(1): 45-53.
- 4- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Veterinary parasitology*. John Wiley & Sons; 2015.
- 5- Hashemzade Farhang H, Shahbazi P, Jafari R. Survey of *cryptosporidium* parasite infection in poultry farms around Tabriz. *Veterinary Clinical Pathology, The Quarterly Scientific Journal*. 2014; 8(1): 411-6. [In Persian]
- 6- Ryan U, Paparini A, Monis P, Hijjawi N. It's official—*Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*. 2016; 105: 305-13.
- 7- Leitch GJ, He Q. *Cryptosporidiosis*-an overview. *Journal of biomedical research*. 2011; 25(1): 1-6.
- 8- Baroudi D, Khelef D, Goucem R, Adjou KT, Adamu H, Zhang H, Xiao L. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Veterinary Parasitology*. 2013; 196(3-4): 334-40.
- 9- Nakamura AA, Meireles MV. *Cryptosporidium* infections in birds-a review. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2015; 24: 253-67.
- 10- Zhang XX, Zhang NZ, Zhao GH, Zhao Q, Zhu XQ. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* infection in pet parrots in North China. *BioMed research international*. 2015.
- 11- Baines D, Newborn D, Richardson M. Spread of *Cryptosporidium baileyi* in red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *The Veterinary Record*. 2014; 175(6): 149.
- 12- Bougiouklis P, Miller W, Weissenbock H, Wells A, Palmieri C, Shivaprasad H. *Cryptosporidium baileyi* in a Saker falcon (*Falco cherrug*).
- 13- Coldwell L, Caldow G, Holliman A, Mearns R, Errington H, Giles M, et al. *Cryptosporidium baileyi* in wild red grouse with 'bulgy eye'. *Veterinary Record*. 2012; 170(23): 603-4.
- 14- Ley DH, Moresco A, Frasca Jr S. Conjunctivitis, rhinitis, and sinusitis in cliff swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*) found in association with *Mycoplasma sturni* infection and cryptosporidiosis. *Avian Pathology*. 2012; 41(4): 395-401.
- 15- Molina-Lopez RA, Ramis A, Martin-Vazquez S, Gomez-Couso H, Ares-Mazás E, Caccio SM, Leiva M, Darwich L. *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus scops*) in a rehabilitation centre. *Avian Pathology*. 2010; 39(3): 171-6.
- 16- Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium*—biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology advances*. 2008; 26(4): 304-17.
- 17- Ahmadi-Gharacheh M, Gholami-Ahangaran M, Momtaz H. Molecular detection of *Cryptosporidium* as a zoonotic pathogen, in pet birds of Isfahan, Iran. *Journal of Gorgan University Medical Sciences*. 2020;22 (2): 103 -99. [In Persian]
- 18- Joachim A. Human *cryptosporidiosis*: an update with special emphasis on the situation in Europe. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*.

2004; 51(6): 251-9.

19- Li J, Lin X, Zhang L, Qi N, Liao S, Lv M, Wu C, Sun M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. *Parasitology research*. 2015; 114(6): 2237-41.

20- de Pina Costa A, Bomfim TC. Infecção natural de pombos (*Columba livia*) por *Cryptosporidium* spp. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 2016; 23(3-4).

21- Mirzaghavami M, Sadraei J, Forouzan-deh M. Detection of *Cryptosporidium* spp. in free ranging animals of Tehran, Iran. *Journal of Parasitic Diseases*. 2016; 40(4): 1528-31. [In Persian]

22- Skandrani Z, Desquilbet M, Prévot AC. A renewed framework for urban biodiversity governance: urban pigeons as a case-study. *Natures Sciences Sociétés*. 2018; 26(3): 280-90.

23- Sacco AG, Bergmann FB, Rui AM. Assembleia de aves na área urbana do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotropica*. 2013; 13: 153-62.

24- Bahrami AM, Monfared AL, Razmjoo M. Pathological study of parasitism in racing pigeons: An indication of its effects on community health. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11(59): 12364-70. [In Persian]

25- Radfar MH, Asl EN, Seghinsara HR, Dehaghi MM, Fathi S. Biodiversity and prevalence of parasites of domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in a selected semiarid zone of South Khorasan, Iran. *Tropical Animal Health and*

Production. 2012; 44(2): 225-9. [In Persian]

26- Oliveira BC, Ferrari ED, da Cruz Panegossi MF, Nakamura AA, Corbucci FS, Nagata WB, et al. First description of *Cryptosporidium parvum* in carrier pigeons (*Columba livia*). *Veterinary parasitology*. 2017; 243: 148-50.

27- Qi M, Wang R, Ning C, Li X, Zhang L, Jian F, Sun Y, Xiao L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Experimental Parasitology*. 2011; 128(4): 336-40.

28- Abreu-Acosta N, Foronda-Rodríguez P, López M, Valladares B. Occurrence of *Cryptosporidium hominis* in pigeons (*Columba livia*). *Acta Parasitologica*. 2009; 54(1): 1-5.

29- Ryan U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*. 2010; 124(1): 113-20.

30- Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38(11): 1239-55.

31- Koompapong K, Mori H, Thammasonthijarern N, Prasertbun R, Pintong AR, Popruk S, et al. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. *Parasite*. 2014; 21.

32- Graczyk TK, Majewska AC, Schwab KJ. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in parasitology*. 2008; 24(2): 55-9.

Genomic detection and study of the frequency of *Cryptosporidium* infection in pigeons, in Isfahan

Majid Gholami-Ahangaran^{*1}, Mehrdad Ostadpoor², Oveys Pourmahdi³

1- Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3- Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Receive: January 9, 2022; Revise: January 23, 2022; Accept: January 26, 2022

Summary

Cryptosporidiosis is an important parasitic disease in livestock, poultry and humans that it has great health and economic importance. Propagation of this parasite in livestock and poultry can preserve the parasite cycle in the environment. Therefore, disease control in this host is associated with reducing the load of *Cryptosporidium* in environmental and ultimately disease control in humans. For detection of *Cryptosporidium* in pigeons, 100 domestic pigeons of different genera were sampled in four different seasons at 2018. After extracting the genome from fecal samples, *Cryptosporidium* SS rRNA gene was detected with a special primer. In 6 samples (6%), 1325 bp fragment related to *Cryptosporidium* SS rRNA gene was amplified (4 female and 2 male pigeons). Statistically, there was no relationship between the sex and the incidence of infection. Studies showed that out of 6 positive samples, 5 samples were detected in the cold season and only one sample in the warm season. Data analysis shows that in cold seasons, the rate of infection is significantly higher than warm seasons (11.36% vs. 1.78%) ($P < 0.05$). The pigeons in Isfahan are infected to *Cryptosporidium* and it is necessary to carry out a proper control program in these birds as one of the hosts of this protozoan. Certainly, reducing the level of infection in pigeons can reduce the environmental contamination with the common pathogen between humans and animals.

Key words: *Cryptosporidium*, Pigeon, Isfahan, PCR

مروری جامع بر اثرات استفاده از مخمر بر تنظیم تخمیر در شکمبه، بهبود راندمان تولید و سلامت در نشخوارکنندگان

احسان اسکوییان*^۱، محمد فاصله جهرمی^۱، پریسا شکریزدان^۱، مرضیه حاج‌محمدی^۲، مهدی سالاری پور^۳،
محمد رضا احمدی^۴، هیلا تقوی^۵، مجتبی معین جهرمی^۱

- ۱- گروه تحقیق و توسعه مجموعه خوشه صنعتی آرکا و شرکت دانش بنیان توسعه مکمل زیست فناور آریانا، مشهد، ایران.
- ۲- دکتری تغذیه دام، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۳- دانشجوی دکتری تغذیه دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
- ۴- کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۵- دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۹ آبان ۱۴۰۰، بازنگری: ۹ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۸ بهمن ۱۴۰۰

چکیده

با توجه به نیاز روزافزون جوامع بشری به تولیدات دامی، مزارع پرورش دام به سمت صنعتی شدن پیش رفته است. لذا با افزایش تولید، استفاده از منابع کربوهیدراتی با قابلیت تخمیر بالا در جیره دام‌ها افزایش یافته است. از طرفی عدم سازگاری دستگاه گوارش نشخوارکنندگان به این نوع سیستم تغذیه‌ای باعث بروز بیماری‌های متابولیکی مختلف و کاهش عمر اقتصادی گله می‌شود. همچنین تحقیقات نشان داده است که افزودن آنتی‌بیوتیک به خوراک گاوها باعث افزایش رشد، کاهش ضریب تبدیل، بهبود عملکرد تولید و تولید مثل می‌شود. اما استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دام و مصرف‌کنندگان محصولات دامی می‌شود. به همین خاطر یافتن جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر پروبیوتیک‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از مخمر در تغذیه نشخوارکنندگان سبب استقرار و حفظ تعادل جمعیت باکتری‌های مفید، افزایش هضم فیبر، بهبود عملکرد شکمبه، تنظیم pH شکمبه و کاهش شیوع بیماری‌های متابولیکی می‌شود. همچنین نشان داده شده است که جیره حاوی مخمرها، عملکرد تولید شیر، تداوم شیردهی و کیفیت شیر را بهبود می‌بخشد. پروبیوتیک‌ها می‌توانند با رقابت بر سر مواد غذایی، تولید ترکیبات ضد میکروبی، خنثی نمودن سموم تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها، میزان ابتلا به عفونت‌های روده‌ای و التهاب را کاهش دهند. همچنین حضور ترکیبات مؤثری مانند بتاگلوکان‌ها و مانان‌ها در دیواره سلولی مخمر مسمومیت با سموم قارچی را به‌ویژه در نشخوارکنندگان کاهش می‌دهد و با تحریک سیستم ایمنی و تولید آنزیم‌های هضمی نقش مهمی را در بهبود رشد و سلامت دام، تولید مثل، و تولید ایفا می‌کنند.

واژگان کلیدی: تخمیر شکمبه‌ای، راندمان تولید، فلور میکروبی شکمبه، مخمر، نشخوارکنندگان

مقدمه

امروزه در مزارع صنعتی پرورش دام، برای افزایش راندمان تولید از منابع کربوهیدراتی با قابلیت تخمیر بالا در جیره‌ها استفاده می‌شود. تعادل میکروبی دستگاه گوارش نشخوارکنندگان کارآیی لازم برای این نوع سیستم تغذیه‌ای را نداشته و با گذشت زمان حیوانات از جمله گاوها به بیماری‌های متابولیکی مختلفی دچار شده و عمر اقتصادی آنها کاهش می‌یابد. استفاده آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره گاوها سبب افزایش سرعت رشد، کاهش ضریب تبدیل، بهبود تولید و تولید مثل شده و عمر اقتصادی گله می‌شود. اما وجود بقایای آنتی‌بیوتیکی در فرآورده‌های دامی سبب افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۱).

امروزه پیدایش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها تهدید جدی برای سلامت انسان به شمار می‌آید و عامل اصلی این مشکل استفاده بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک دام و طیور است. بر اساس گزارش سازمان دامپزشکی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام و طیور در ایران ۱۶ برابر استاندارد جهانی بوده که این مقدار معادل کل مصرف این اقلام دارویی در اروپا است (۲، ۳).

امروزه بسیاری از کشورها استفاده از آنتی‌بیوتیک را به‌عنوان محرک رشد از جیره حیوانات حذف نموده و از جایگزین‌هایی نظیر پروبیوتیک‌ها استفاده می‌کنند. بر اساس تعریف سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (Food and Agriculture Organization) و سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف کافی در بهبود سلامت میزبان مؤثر هستند (۴). پروبیوتیک‌ها با رقابت بر سر مواد غذایی و تولید ترکیبات ضد میکروبی،

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را مهار می‌کنند. در میان پروبیوتیک‌ها، مخمرها دارای مواد مغذی ارزشمندی بوده و از نظر اقتصادی دارای قابلیت تولید تجاری هستند. مخمرها یکی از پرکاربردترین میکروارگانیسم‌ها در صنایع غذایی بوده که جهت تولید مخمر زنده، دیواره سلولی مخمر، عصاره مخمر و پیتون مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). دیواره سلولی مخمرها شامل اجزاء مهمی از جمله گلوکان‌ها، مانوپروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک هستند (۲). دیواره سلولی مخمر با تحریک سیستم ایمنی و تولید آنزیم‌های هضمی به بهبود رشد و سلامت دام کمک کرده و همچنین در افزایش عملکرد تولید، کیفیت شیر و گوشت نقش مهمی ایفا می‌کند. در نتیجه استفاده از مخمر به‌عنوان پروبیوتیک در تغذیه دام، علاوه بر تأمین سلامت حیوان می‌تواند سبب بهبود راندمان تولید و ضریب تبدیل نیز شود (۱).

مخمرها که جز شاخه آسکومیست‌ها (*Ascomycota*) و رده‌ی ساکارومیکوتا (*Saccharomycota*) طبقه‌بندی می‌شوند پرمصرف‌ترین نوع پروبیوتیک‌ها در تغذیه دام می‌باشند. مخمرها جز یوکاریوت‌ها بوده و به‌طور طبیعی در فلور میکروبی دستگاه گوارش موجودات، گیاهان، آب و مواد غذایی یافت می‌شوند. در صنعت از مخمرها در تولید الکل، صنایع غذایی، پروتئین‌های تک‌سلولی، تولید ویتامین، تولید پروتئین‌های نوترکیب و کنترل بیولوژیک استفاده می‌شود (۵). امروزه مخمرهایی نظیر ساکارومایسس بولاردی (*Saccharomyces boulardii*)، ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)، دبرومایسس هانسنی (*Debaryomyces hansenii*)، تورولاسپورا دلبروکی (*Torulaspora delbrueckii*)، کلویورومایسس لاکتیس (*Kluyveromyces lactis*)، یاروویا

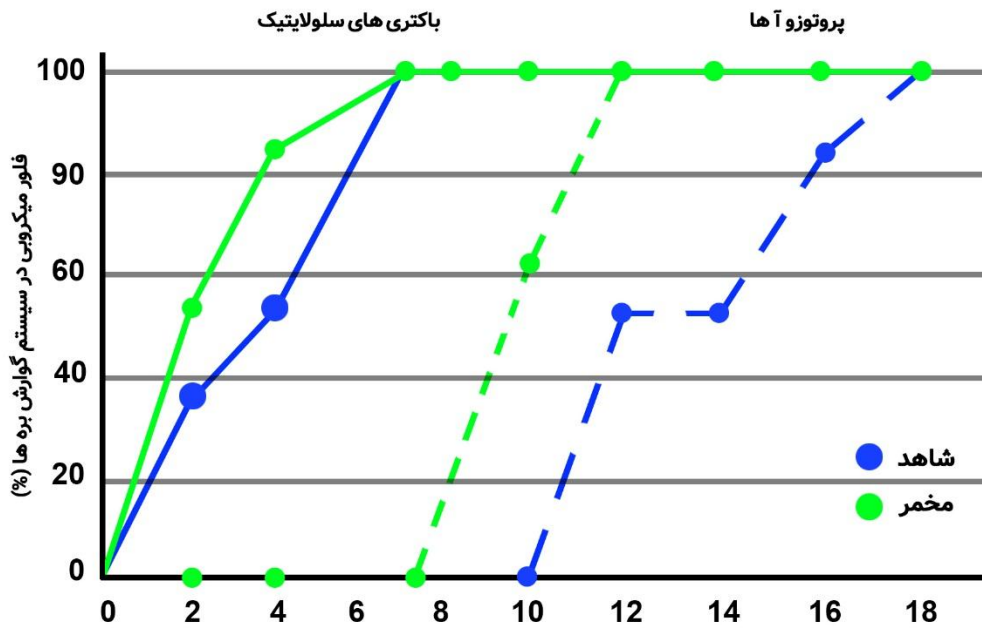
اثرات مخمر در تکامل فلور میکروبی

شکمبه: شکمبه نشخوارکنندگان در ابتدای تولد تکامل نیافته و عاری از میکروارگانیسم‌ها است. میکروارگانیسم‌های مختلف در طول زمان در شکمبه تکامل می‌یابند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که بزاق و مدفوع مادر در انتقال میکروارگانیسم‌ها به گوساله‌های جوان نقش مؤثری دارد اما در سیستم‌های پرورش گاو به شکل صنعتی گوساله‌ها دقایقی بعد از تولد از مادر جدا شده و این امر مانع از انتقال میکروارگانیسم‌های مفید و تسریع تکامل فلور میکروبی شکمبه می‌شود. از طرفی استفاده از جایگزین‌های شیر و یا قطع سریع شیر و تغذیه با جیره‌های آغازین قبل از تکامل شکمبه نیز عملاً تکامل فلور میکروبی شکمبه را با مشکل مواجه می‌کند (۷). در سیستم‌های پرورش فشرده این عوامل باعث شده تا تکامل فیزیکی و میکروبی شکمبه با تأخیر مواجه شود و در نتیجه احتمال ابتلا به بیماری‌های مختلف متابولیکی و میکروبی افزایش یابد. در حقیقت تکامل سریع ساختار و فلور میکروبی شکمبه نقش به‌سزایی در بهبود سیستم ایمنی و سلامت گوساله‌ها ایفا می‌کند (۸). بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از مخمر در جیره نشخوارکنندگان جوان باعث تسریع استقرار باکتری‌های مفید در شکمبه شده که این امر به نوبه خود سبب بهبود جمعیت قارچ‌ها و پروتوزوآها و به‌طور کلی تسریع تکامل فلور میکروبی شکمبه می‌شود (شکل ۱) (۹، ۱۰). بررسی‌ها نشان می‌دهد که تکامل فلور میکروبی در گوساله‌ها سبب بهبود مورفولوژی پرزهای روده، ضخامت دیواره شکمبه و کاهش شیوع اسهال در این گوساله‌ها می‌شود. در نتیجه این حیوانات ضریب تبدیل، افزایش وزن و عملکرد بهتری از خود نشان خواهند داد (شکل ۲) (۱۰).

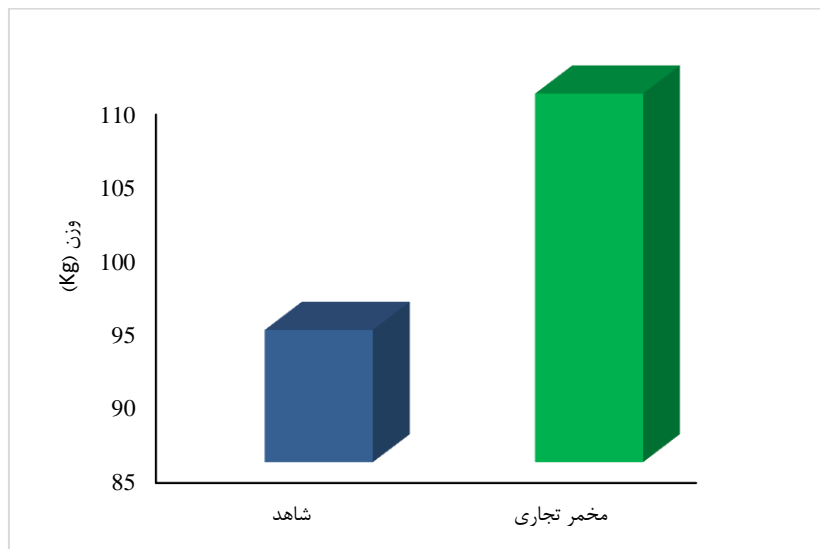
لیپولیتیکا (*Yarrowia lipolytica*)، کلویورومایسس مارکسیانوس (*Kluyveromyces marxianus*)، کلویورومایسس لوددرا (*Kluyveromyces lodderae*) در صنعت دام و طیور به‌عنوان پروبیوتیک کاربرد دارند (۲، ۵). تحقیقات نشان داده است که مخمرها معمولاً ۲ تا ۴ ساعت بعد از تغذیه فعالیت خود را در شکمبه آغاز می‌کنند (۶) و از طریق مکانیسم‌های مختلف سبب بهبود راندمان رشد و تولید در نشخوارکنندگان می‌شوند (۱، ۷). از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به تکامل فلور میکروبی و تسریع رشد شکمبه، تنظیم pH شکمبه، کاهش تولید و تجمع اسید لاکتیک، کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا (نظیر اشریشیاکلی (*Escherichia coli*)، سالمونلا (*Salmonella*)، کامپیلوباکتر (*Campylobacter*)، کاهش تولید متان و افزایش نسبت اسید استیک به پروپیونیک بدون کاهش چربی شیر، کاهش تولید آمونیاک در شکمبه، افزایش تجزیه‌پذیری فیبر در شکمبه، افزایش سطح سیستم ایمنی، تحریک رشد از طریق افزایش دسترسی به مواد مغذی نظیر ویتامین‌ها، مواد معدنی، آنزیم‌ها و اسیدهای آمینه اشاره نمود.

مخمرها با وجود خصوصیات برتر دارای معایبی از قبیل کمبود در محتوای کربوهیدرات، اسیدهای آمینه گوگردی پایین و نوکلئوتیدهای بالا (۴) و همچنین محتوای نسبتاً بالای نیتروژن غیر پروتئینی به شکل اسیدهای نوکلئیک به‌ویژه RNA (۱۳-۲۳ درصد نیتروژن کل) می‌باشد. از دیگر مشکلات استفاده از مخمرها در جیره غذایی داشتن دیواره سلولی مخمر با بیش از ۵۰ درصد وزن سلولی است که باعث کاهش قابلیت هضم مواد مغذی می‌شود (۲).

بحث و نتیجه‌گیری



شکل ۱- اثر استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه تجاری (*Saccharomyces cerevisiae*) در تکامل فلور میکروبی شکمبه گوساله‌ها (از تولد تا هفتاد روزگی) (۱۰)
سطح معنی‌داری کمتر از (P < 0.05) می‌باشد.



شکل ۲- اثر استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه تجاری (*Saccharomyces cerevisiae*) در وزن نهایی در زمان از شیرگیری گوساله‌ها (از تولد تا هفتاد روزگی) (۱۱)
سطح معنی‌داری کمتر از (P < 0.05) می‌باشد.

افزایش تولید اسیدهای ارگانیک از جمله اسید لاکتیک می‌شود که توسط باکتری‌هایی نظیر

اثر مخمر بر تنظیم pH شکمبه: تغذیه نشخوارکنندگان با مقادیر بالای کربوهیدرات سبب

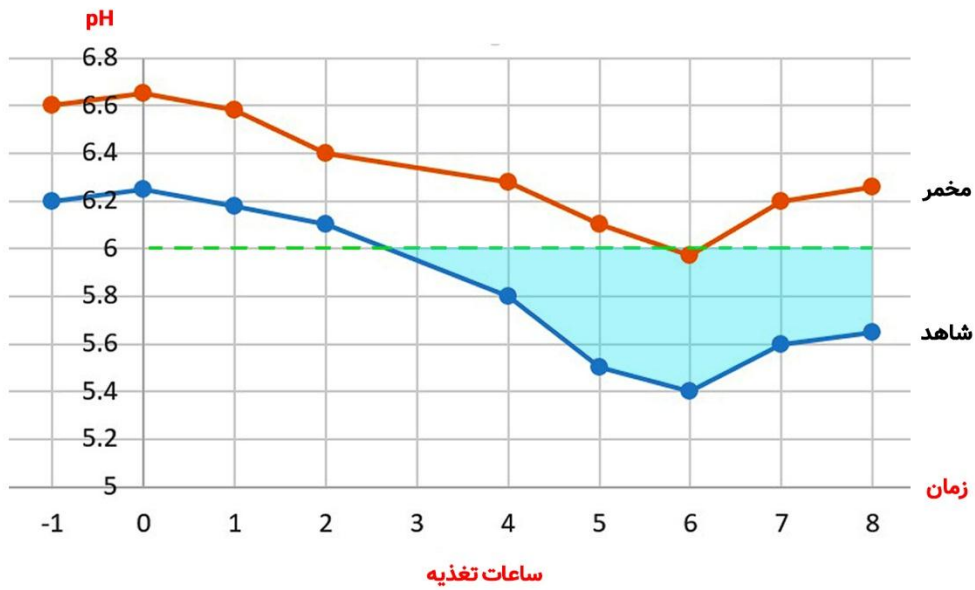
داشته که در نتیجه منجر به کاهش رشد، افزایش التهاب، کاهش چربی شیر، شیوع اسهال و بروز لنگش می‌شود (۱۳، ۱۲). معمولاً ۱۰ تا ۴۰ درصد از گاوهای پرتولید موجود در گله با اسیدوزیس تحت حاد (SARA*) درگیر هستند که این نوع اسیدوزیس علائم کلینیکی بارزی نداشته اما می‌تواند منجر به ضررهای اقتصادی در گله شود. در نتیجه تنظیم pH شکمبه یکی از فاکتورهای اساسی در تغذیه گاوهای پرتولید به شمار می‌آید (۷).

نتایج آزمایشاتی که توسط رابینسون صورت گرفته نشان می‌دهد که استفاده از مخمرها pH شکمبه را از ۶/۳۶ به ۶/۴۶ افزایش می‌دهد و همچنین غلظت اسید لاکتیک را ۸/۱ درصد کاهش داده و تولید اسیدهای چرب فرار را تا ۵/۴ درصد افزایش می‌دهد (۱۱). در تحقیقی نیز نشان داده شده است که استفاده از مخمر در تغذیه گاوهای شیری pH را به میانگین 6.5 ± 0.7 افزایش داده و زمان اسیدوز تحت حاد را نیز کاهش می‌دهد (۱۲). متآنالیز ۱۵۷ آزمایش در مورد اثرات مخمر بر روی عملکرد شکمبه نشان می‌دهد که استفاده از مخمر pH شکمبه را ۰/۰۳ افزایش، تولید اسیدهای چرب فرار را نیز ۲/۱۷ میلی‌مولار افزایش و غلظت اسید لاکتیک را ۰/۹ میلی‌مولار کاهش می‌دهد (۱۴).

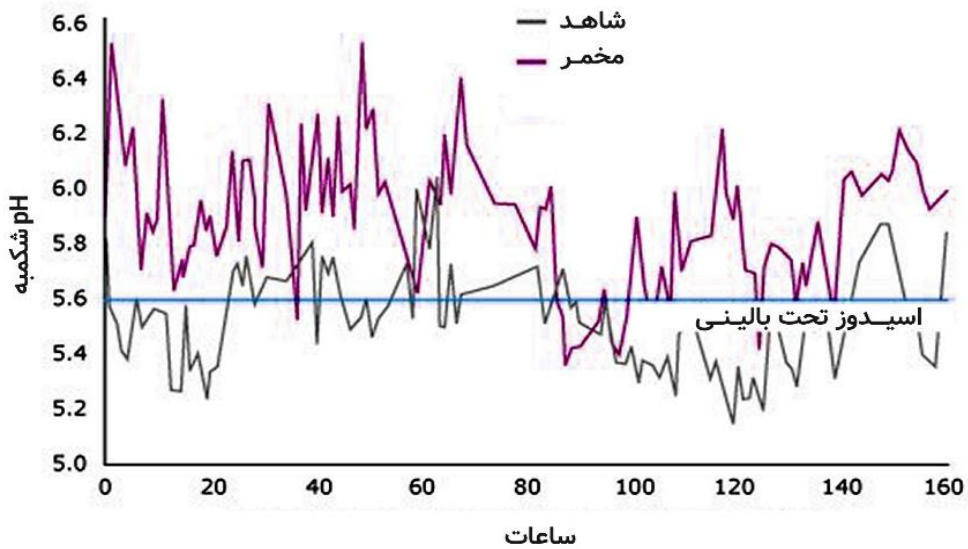
استرپتوکوکوس بـووـیس (*Streptococcus bovis*)، سلنوموناس رومینانتیوم (*Selenomonas ruminantium*)، میتسوکلامولتیاسیدوز (*Mitsuokella multiacidus*) تولید می‌شود. در شرایط فوق باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتیک اسید نظیر مگاسفرا السدنی (*Megasphaera elsdenii*) و سلنوموناس رومینانتیوم (*S. ruminantium*) توان مصرف حجم بالای اسید لاکتیک تولیدی را نخواهند داشت از این رو اسیدیتته شکمبه به شدت کاهش خواهد یافت.

اسید لاکتیک به خاطر داشتن ضریب یونیزاسیون (pKa) پایین (۳/۷) در مقایسه با ضریب یونیزاسیون اسیدهای چرب فرار دیگر نظیر اسید استیک، پروپیونیک و بوتیریک (۴/۸-۴/۹) یکی از اصلی‌ترین عوامل اسیدوزیس در شکمبه می‌باشد. کاهش pH شکمبه موجب کاهش جمعیت میکروبی شکمبه به ویژه باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز نظیر فیبروباکتر سوکسینوجنز (*Fibrobacter succinogenes*)، رومینوکوکوس آلبوس (*Ruminococcus albus*) و فلاووفاسینین (*Ruminococcus flavifaciens*) می‌شود در نتیجه تجزیه بخش فیبری غذا به درستی صورت نخواهد گرفت. در اسیدوز تحت حاد، باکتری‌های گرم منفی تخریب شده و اندوتوکسین‌ها یا لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی آنها آزاد می‌شود که پس از راه‌یابی به خون سبب بروز التهاب می‌گردد. علاوه بر آن، در شرایط اسیدی شکمبه رشد باکتری‌هایی نظیر آلیسونلا هیس‌تامینیفورمانز (*Allisonella histaminiformans*) افزایش یافته که سبب تولید هیستامین از اسید آمینه هیستیدین می‌شود و میزان بروز لنگش در دام را نیز افزایش می‌دهد (۷، ۱۱). به طور کلی می‌توان گفت کاهش اسیدیتته شکمبه برای مدت طولانی تأثیر منفی بر مصرف خوراک، متابولیسم میکروبی و تجزیه مواد غذایی

* Sub-acute Ruminant Acidosis

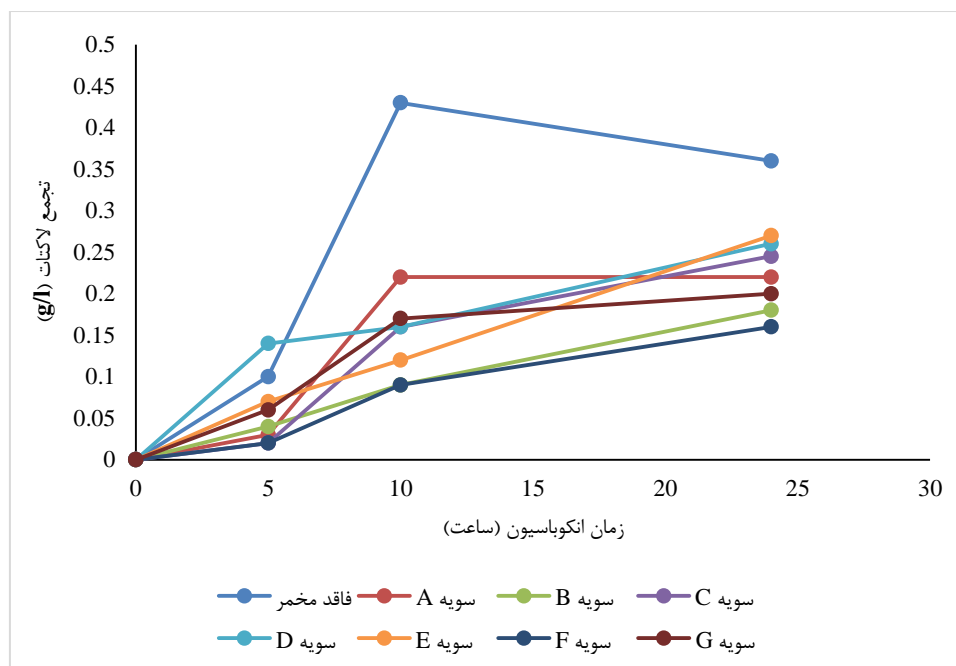


شکل ۳- اثر استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر کنترل pH شکمبه در گاو شیری (۱۴)
سطح معنی‌داری کمتر از (P < 0.05) می‌باشد.



نمونه از گاوهایی که pH شکمبه آنها هر ۱۵ دقیقه مورد بررسی قرار می‌گرفت

شکل ۴- اثر مخمر ساکارومایسس سرویزیه در جلوگیری از اسیدوز تحت حاد و تغییرات pH شکمبه در گاوهای شیری (۱۵)
سطح معنی‌داری کمتر از (P < 0.05) می‌باشد.



شکل ۵- اثر استفاده از سویه‌های مختلف مخمر بر تولید اسیدلاکتیک در مایع شکمبه (سه گاو فیس‌توله گذاری شده) در شرایط *in vitro* (V) سطح معنی‌داری کمتر از ($P < 0.05$) می‌باشد.

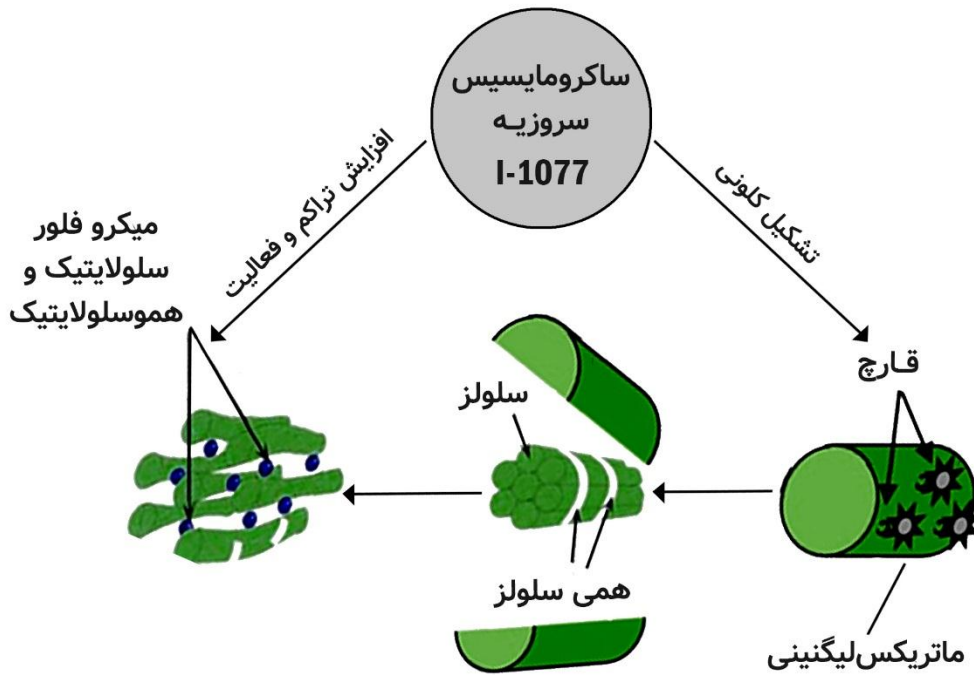
اسید لاکتیک در شکمبه کمک کنند (V). استفاده از مخمر همچنین در رفتار تغذیه‌ای (Eating Behavior) گاوها و میزان نشخوار در نشخوارکنندگان تأثیرگذار است به طوری که گاوهایی که با مخمر تغذیه شدند به طور میانگین هر ۴/۳ در مقایسه با گاوهای تغذیه شده بدون مخمر ۳/۳ ساعت برای مصرف خوراک به آخر مراجعه کردند. همچنین مدت زمان نشخوار نیز در گاوهایی که با مخمر تغذیه شده بودند بیشتر از گاوهایی بود که مخمر دریافت نکردند (۱۶).

اثرات مخمر بر تجزیه فیبر جیره: سلولز و همی سلولز بخشی از ترکیبات دیواره سلولی بوده که دارای ساختار پیچیده و غیر محلول هستند. غلظت این ترکیبات در جیره نشخوارکنندگان به طور میانگین ۳۰۰ گرم در کیلوگرم است. مخمرها با افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده سلولز از جمله قارچ‌هایی نظیر *Neocallimastix frontalis* نقش مؤثری در تجزیه فیبر در شکمبه داشته و تحریک و گسترش توده

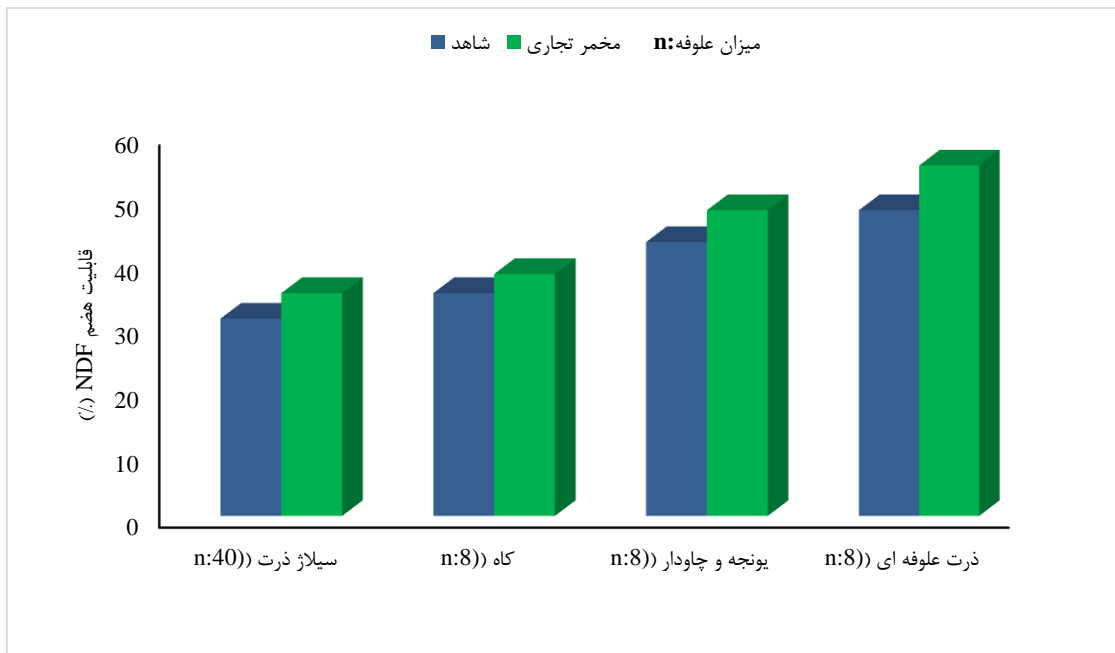
مخمرها با باکتری‌های استروپتوکوکوس بوویس (*S. bovis*) بر سر منابع کربوهیدراتی رقابت و جمعیت آنها را کاهش می‌دهد. از طرفی مخمرها با افزایش دسترسی اسیدهای آمینه، پپتیدها، ویتامین‌ها و اسیدهای ارگانیک باعث تحریک و افزایش جمعیت باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتیک اسید نظیر *M. elsdenii* و سلنوموناس رومینانتیوم (*S. ruminantium*) شده و از این طریق اسید لاکتیک را کاهش داده و pH شکمبه را تنظیم می‌کند (شکل ۱ و ۲) (۱۴، ۷).

مخمرها همچنین از طریق افزایش جمعیت پروتوزوآها در تنظیم pH ایفای نقش می‌کنند. پروتوزوآها ذرات نشاسته را بلعیده و دسترسی باکتری‌های تجزیه‌کننده نشاسته را به این ترکیبات کاهش می‌دهند. نشاسته بلعیده شده توسط پروتوزوآها به کندی تخمیر شده و به اسیدهای چرب (به غیر از اسیدلاکتیک) تبدیل می‌شود. همچنین پروتوزوآها می‌توانند از اسید لاکتیک به عنوان منبع انرژی استفاده کنند و از این طریق به کاهش غلظت

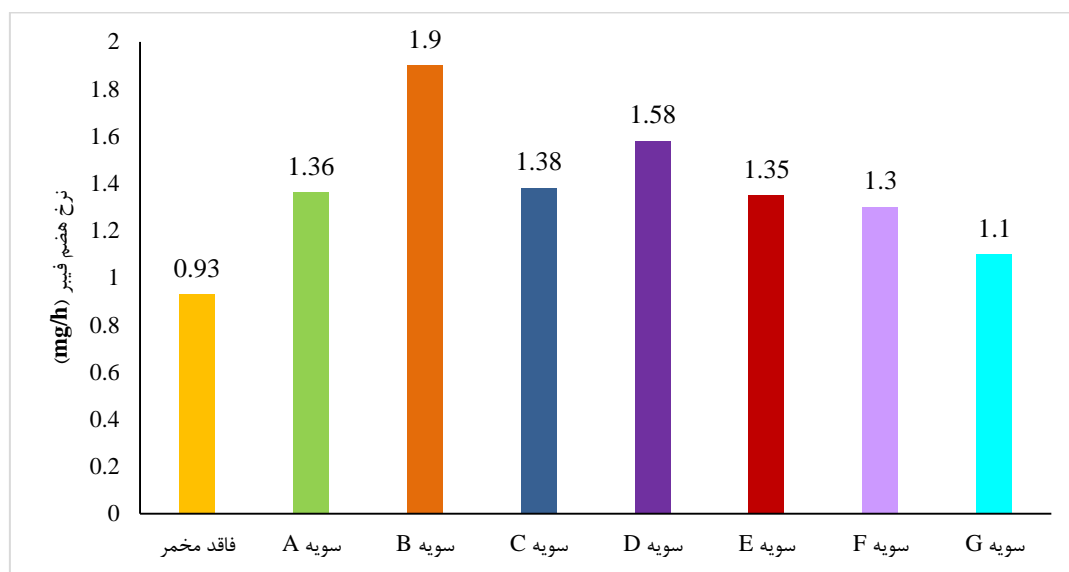
آنها تجزیه فیبر را در شکمبه افزایش می‌دهند (۷)، (۱۷).



شکل ۶- مکانیسم اثر مخمر ساکارومایسیس سروزیه (CNCM I-1077) در افزایش جمعیت و فعالیت قارچها و باکتری‌های سلولایتیک در تجزیه فیبر جیره (۱۷)



شکل ۷- اثر استفاده از مخمر ساکارومایسیس سروزیه (CNCM I-1077) بر قابلیت هضم NDF در جیره گاوهای شیری (۱۷) سطح معنی داری کمتر از (P < 0.05) می‌باشد.



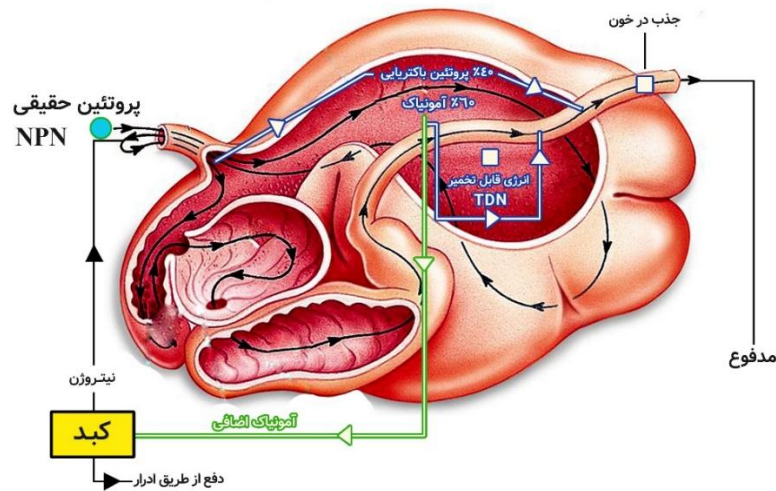
شکل ۸- اثر سویه‌های مختلف مخمر بر راندمان تجزیه فیبر در مایع شکمبه (سه گاو فیستوله گذاری شده) توسط میکروارگانیزم‌های تجزیه‌کننده فیبر در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) (Y) سطح معنی‌داری کمتر از (P < 0.05) می‌باشد.

سلولایتیک مؤثرند (۱۸). نتایج مطالعه‌ای که بر روی گوسفندان انجام شد نیز نشان داد که استفاده از مخمر تجزیه‌پذیری ماده خشک و فیبر را در شکمبه گوسفند افزایش می‌دهد (۱۹). در نتایج مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که افزودن مخمر می‌تواند تا ۱۱ درصد تجزیه‌پذیری NDF جیره را در گاوهای شیری افزایش دهد (۲۰).

اثر مخمر بر نیتروژن آمونیاکی شکمبه:

تجزیه میکروبی پروتئین‌ها، پپتیدها و اسیدهای آمینه در شکمبه تولید آمونیاک می‌نماید (شکل ۴). به‌طور معمول ۶۰ درصد پروتئین خوراک در شکمبه به آمونیاک تبدیل می‌شود که باعث هدر روی منابع پروتئین با ارزش خوراک خواهد شد. مازاد آمونیاک میکروارگانیزم‌های شکمبه توسط ادرار و مدفوع دفع می‌شود. سپس آمونیاک تبدیل به N_2O شده که این گاز جز گازهای گلخانه‌ای محسوب شده به‌طوری که ۲۹۶ برابر بیشتر از دی‌اکسید کربن و ۱۲ برابر بیشتر از متان در گرم شدن زمین نقش

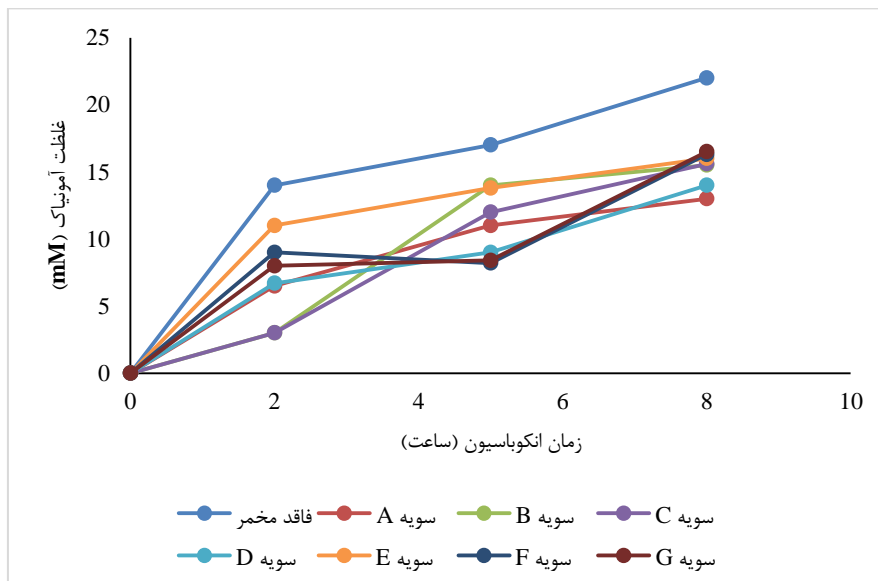
همچنین مخمرها رشد باکتری‌های سلولایتیک نظیر فیروباکتر سوکسینوجنز (*F. succinogenes*)، رومینوکوکوس آلبوس (*R. albus*) و رومینوکوکوس فلاووفاسینس (*R. flavfaciens*)، بوتیروبیوریو فیبریولونس (*Butyrivibrio fibrisolvens*) را نیز بهبود می‌دهد (۱۸). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از مخمر در تغذیه نشخوارکنندگان سبب استقرار، افزایش جمعیت و حفظ تعادل جمعیت باکتری‌های سلولایتیک در شکمبه می‌شود و به دنبال آن فعالیت آنزیم‌هایی نظیر پلی‌ساکاریدازها و گلیکوزید هیدرولازها نیز متعاقباً افزایش می‌یابد (۱۸). همچنین مشخص شده است که مخمرها با حذف اکسیژن و ایجاد محیط بی‌هوازی و بهبود پتانسیل اکسایش و کاهش (Redox Potential) شرایط را برای رشد باکتری‌های سلولایتیک مساعد می‌کنند. علاوه بر این مخمرها از طرق دیگر نظیر فراهم آوردن ویتامین، اسیدهای آمینه، پپتیدها در افزایش جمعیت باکتری‌های



شکل ۹- متابولیسم پروتئین در شکمبه نشخوارکنندگان (۲۱)

تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که برخی از مخمرها با کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه باعث کاهش تولید آمونیاک شده و از این طریق راندمان و عملکرد شکمبه را بهبود می‌دهند (شکل ۱۰). نتایج یک بررسی نشان می‌دهد که برخی از مخمرها با مهار باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک (Hyper-Ammonia Producing Bacteria) نظیر کلسترییدیوم اس‌تیکلندای (*Clostridium sticklandii*)، پپتواس‌ترپتوکوکوس آنیروبیوس (*Peptostreptococcus anaerobius*)، کلسترییدیوم آمینوفیلوم (*Clostridium aminophilum*) مانع از تجزیه پروتئین و تولید آمونیاک در شکمبه شده و این امر از طریق رقابت در مصرف مواد غذایی بین مخمر و باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین و یا از طریق تولید پپتیدهای ضد میکروبی که توسط مخمر تولید می‌شود صورت می‌پذیرد (۲۲).

تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که برخی از مخمرها با کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه باعث کاهش تولید آمونیاک شده و از این طریق راندمان و عملکرد شکمبه را بهبود می‌دهند (شکل ۱۰). نتایج یک بررسی نشان می‌دهد که برخی از مخمرها با مهار باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک (Hyper-Ammonia Producing Bacteria) نظیر کلسترییدیوم اس‌تیکلندای (*Clostridium sticklandii*)، پپتواس‌ترپتوکوکوس آنیروبیوس (*Peptostreptococcus anaerobius*)، کلسترییدیوم آمینوفیلوم (*Clostridium aminophilum*) مانع از تجزیه پروتئین و تولید آمونیاک در شکمبه شده و این امر از طریق رقابت در مصرف مواد غذایی بین مخمر و باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین و یا از طریق تولید پپتیدهای ضد میکروبی که توسط مخمر تولید می‌شود صورت می‌پذیرد (۲۲).



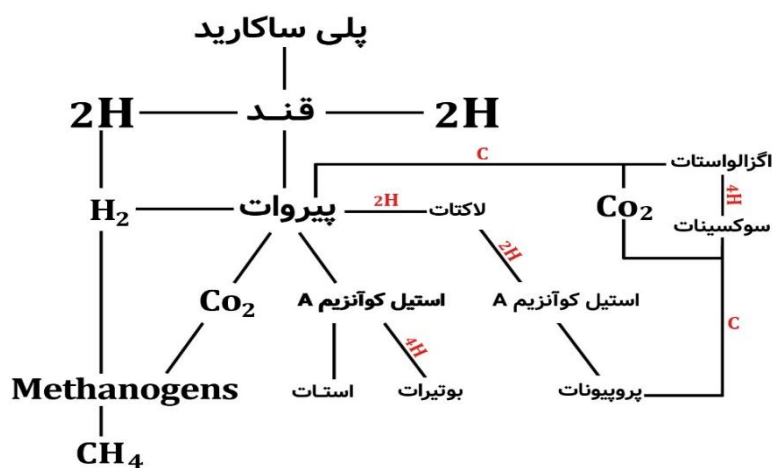
شکل ۱۰- اثر استفاده از سویه‌های مختلف مخمر در تولید نیتروژن آمونیاکی در شکمبه در شرایط *in vitro* بررسی شود (۷). سطح معنی‌داری کمتر از ($P < 0.05$) می‌باشد.

اثر مخمر بر متابولیسم هیدروژن و تولید

متان: در شکمبه عمدتاً هیدروژن تولیدی در طی فرآیند تخمیر توسط باکتری‌های متانوژن و با استفاده از دی‌اکسید کربن به متان تبدیل می‌شود (شکل ۶). متانوژن‌ها یک چرخه ضروری برای حذف هیدروژن در شکمبه بوده که این امر سبب افزایش تجزیه فیبر در شکمبه می‌شود (۲۳).

میزان متان تولیدی در گاو روزانه حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ لیتر بوده که حدود ۸ تا ۱۲ درصد از انرژی خوراک را هدر می‌دهد. علاوه بر آن متان ناشی از تخمیر در دستگاه گوارش حیوانات حدود ۱۸ تا ۲۰

درصد گازهای گلخانه‌ای را



شکل ۱۱- چرخه تجزیه کربوهیدرات‌ها و تولید هیدروژن، دی‌اکسید کربن و متان در شکمبه (۲۳)

تشکیل می‌دهد (۲۴). ثابت شده است استفاده از مخمرها در جیره بسته به نوع مخمر با تغییر چرخه مصرف هیدروژن از متانوژن‌ها به باکتری‌های تولید کننده اسید استیک تولید متان را کاهش می‌دهند. بر اساس یکی دیگر از گزارشات موجود استفاده از مخمر می‌تواند حدوداً ۲۰ درصد از تولید متان در نشخوارکنندگان را کاهش دهد (۲۵).

اثرات مخمر بر میکروارگانیسم‌های

بیماری‌زای نشخوارکنندگان: برخی مخمرها با داشتن خواص ضد میکروبی جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا را در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان کاهش می‌دهند. این کاهش از راه‌های مختلفی مانند حذف رقابتی (Competitive Exclusion)، اتصال به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیر فعال نمودن آنها و یا تجزیه سموم تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا صورت می‌گیرد. افزودن مخمر به جیره گوسفندهای آلوده به باکترهای بیماری‌زا نظیر اشریشیاکلی (*E. coli*) و

لیستریا مونوسییتوژنز (*Listeria monocytogenes*) رشد و تکثیر این باکتری‌ها را تا ۵۰ درصد کاهش داده است (۲۶). علاوه بر آن استفاده از مخمر در گوساله‌ها نشان داده که جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا کلسترییدیوم و سالمونلا را به‌طور چشمگیری کاهش داده است و اسهال ناشی از آنها را نیز مهار کرده است (۲۷). از میان مخمرها ساکارومایسس بولاردی (*S. boulardii*) به‌طور ویژه در کاهش جمعیت کلسترییدیوم دیفیسیل (*Clostridium difficile*) و سموم تولید شده توسط این میکروارگانیسم در گوساله‌های مبتلا به

منجر به تجمع این اسیدهای ارگانیک به‌ویژه اسید لاکتیک در شکمبه شده که کاهش pH و در نتیجه اسیدوز تحت حاد را به دنبال خواهد داشت (۳۰). اسیدوز باعث به هم خوردن تعادل میکروبی، تجزیه باکتری‌های گرم منفی، آزاد شدن لیپوپلی‌ساکاریدها و انتقال آن به داخل گردش خون می‌شود که واکنش‌های شدید التهابی را در بدن به دنبال دارد. اسیدوز تحت حاد در صنعت گاو شیری منجر به ضررهای اقتصادی فراوانی نظیر کاهش مصرف خوراک، کاهش تولید شیر، کاهش چربی شیر، اسهال، لنگش، افت راندمان تولید مثل و کاهش عمر اقتصادی در گاوهای شیری خواهد شد.

نتایج متاآنالیز بیش از ۱۵۷ آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از مخمر در گاوهای شیری تولید شیر را ۱/۲ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و تولید چربی شیر را ۰/۰۵ درصد افزایش می‌دهد. استفاده از مخمر پیک تولید، تداوم شیردهی، تولید پروتئین و لاکتوز شیر را نیز بهبود می‌دهد (۱، ۳۱). نتایج اخیر یک متاآنالیز بر روی ۳۶ آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از مخمر به طور متوسط ۱/۱۸ کیلوگرم در روز (تصحیح شده بر اساس ۳/۵ درصد چربی) به ازای هر گاو افزایش تولید شیر را نشان می‌دهد. میزان چربی شیر ۰/۰۶ کیلوگرم در روز و پروتئین شیر ۰/۰۳ کیلوگرم در روز به ازای هر گاو افزایش نشان می‌دهد (۳۲).

افزایش ماده خشک در گاوهای تازه‌زا به افزایش پیک و تداوم شیردهی کمک زیادی نموده و احتمال بالانس منفی انرژی را در حیوان کاهش می‌دهد و از این طریق به کاهش روزهای باز (Open Days) نیز کمک می‌کند. از طرفی مخمر با کاهش مصرف خوراک در انتهای دوره شیردهی هزینه تولید را کاهش داده و وضعیت بدنی (Body Condition Score) مناسبی برای دروه خشکی و زایمان فراهم می‌آورد (۳۱).

کلستریدیوزیس (*clostridiosis*) مؤثر بوده است. علاوه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، قارچ‌هایی نظیر آفلاتوکسین (Aflatoxins)، تریکوتسین (Tricothecenes)، زیرالنون (Zearalenones)، فیومنسین (Fumonisin) و اوکراتوکسین (Ochratoxins) نیز با تولید سموم سلامت نشخوارکنندگان را تهدید می‌کنند، مشخص شده است که مخمرها با مهار این گونه از قارچ‌ها و یا مهار سموم آنها از طریق تولید ترکیبات ضد قارچی و ترکیباتی حاصل از بتاگلوکان‌ها و مانان الیگوساکاریدها احتمال مسمومیت با سموم قارچی را به‌ویژه در نشخوارکنندگان جوان کاهش می‌دهند (۷، ۲۸).

خصوصیات یک مخمر خوب برای

نشخوارکنندگان: یک سویه مخمر مناسب باید از خصوصاتی مانند توانایی زنده‌مانی در شرایط شکمبه و دستگاه گوارش نشخوارکنندگان، مؤثر در تجزیه فیبر، مؤثر در حفظ تعادل pH، مؤثر در حذف اکسیژن در شکمبه، کاهش تولید آمونیاک در شکمبه، کاهش تولید متان در شکمبه، خواص ضد میکروبی علیه اشریشیاکلی (*E. coli*)، کلستریدیا (*Clostridia*) و سالمونلا (*Salmonella*) برخوردار باشد تا جز سویه‌های بی‌خطر به‌شمار رود و بتوان آن را در خوراک نشخوارکنندگان استفاده کرد (۷، ۲۴، ۲۶، ۲۹).

اثرات مخمر در بهبود کمی و کیفی تولیدات

دامی: به علت کیفیت پایین علوفه در ایران، برای تأمین انرژی در خوراک گاوهای پر تولید بیشتر از جیره‌های حاوی کربوهیدرات‌های با قابلیت تخمیر بالا (NFC) بیش از ۴۰ درصد و NDF کمتر از ۳۲ درصد) نظیر غلات استفاده می‌شود. تغذیه با جیره حاوی غلات بالا تولید اسیدهای ارگانیک را افزایش می‌دهد در صورتی که این میزان بیش از حد باشد

جدول ۱- مقایسه ۳ نوع مخمر تجاری در ۱۹ آزمایش بر تولید شیر و مصرف خوراک در گاوهای شیری (۳۲).

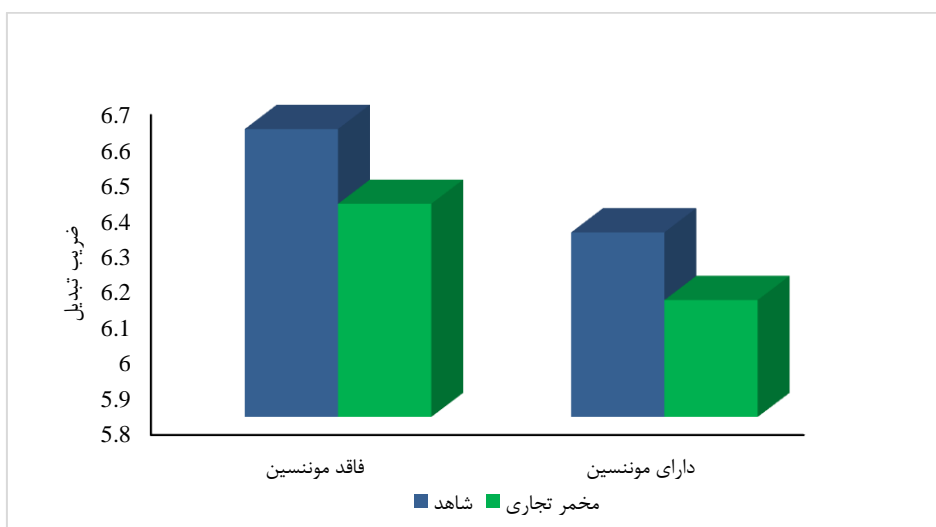
| SEM | نام مخمر تجاری | | | پارامترها (% تغییر نسبت به کنترل) |
|-----|---------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| | Diamond V XP USA | Biomate YC-20 Canada | Yea-Sacc USA | |
| | ۷ | ۶ | ۶ | تعداد آزمایش مورد بررسی |
| ۲/۲ | ۳/۶ | ۲/۶ | ۲/۷ | عملکرد تولید شیر (کیلوگرم در روز) |
| ۲/۹ | ۲/۹ | ۴ | ۳/۴ | تولید چربی شیر (کیلوگرم در روز) |
| ۱/۹ | ۲/۴ | ۱/۲ | ۲/۸ | تولید پروتئین شیر (کیلوگرم در روز) |
| ۳ | ۱/۸ | -۰/۸ | ۳/۴ | افزایش مصرف خوراک (کیلوگرم در روز) |

سطح معنی داری کمتر از ($P < 0.05$) می باشد.

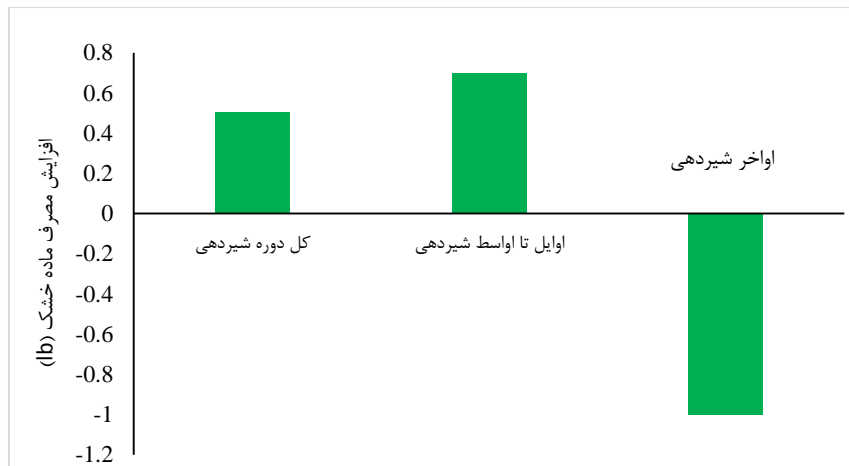
می دهد (۳۳).

متآنالیز بیش از ۳۲ آزمایش بر روی یک مخمر تجاری نشان می دهد که استفاده از مخمر در طول دوره شیردهی ماده خشک مصرفی را به طور متوسط ۲۵۰ گرم به ازای هر گاو در روز افزایش می دهد. مصرف ماده خشک در اوایل تا اواسط شیردهی حدود ۳۰۰ گرم به ازای هر گاو در روز افزایش می یابد. مشخص شده است که افزایش مصرف ماده خشک در ۱۰۰ روز ابتدای دوره شیردهی نقش مهمی در بهبود پیک تولید و تداوم شیردهی در حیوان دارد (۳۴).

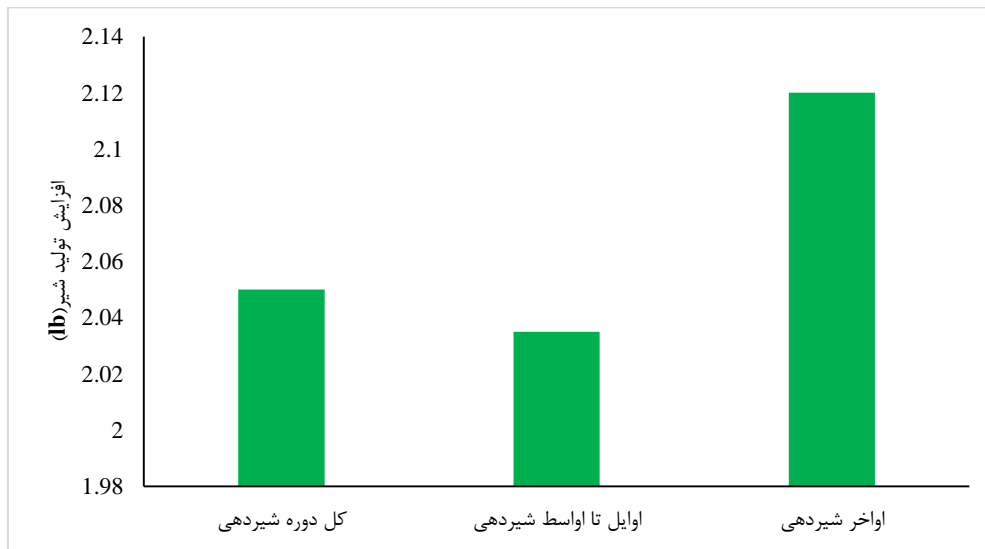
تحقیقات نشان داده است که استفاده از مخمرهای کلویورومایسس مارکسیانوس (*K. marximanus*)، ساکارومایسس سرویزیه (*S. cerevisiae*) و ساکارومایسس اوواروم (*Saccharomyces uvarum*) نیز در خوراک گوسفند مصرف ماده خشک را ۸ تا ۱۹ درصد و وزن را ۱۹ تا ۲۶ درصد افزایش داده است. همچنین مشخص شد که استفاده از این مخمرها به میزان 2×10^9 - $1/5$ سلول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در گوسفندان فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز، بتاگلوکوزیداز، زایلاناز و کربوکسی متیل سلولاز مایع شکمبه را نیز افزایش



شکل ۱۲- اثر استفاده از مخمر تجاری ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) در بهبود ضریب تبدیل گوشت در گاو گوشتی (۳۴) سطح معنی داری کمتر از ($P < 0.05$) می باشد.



شکل ۱۳- متاآنالیز بیش از ۲۲ آزمایش در بررسی اثر استفاده از مخمر دیمنود وی (*Diamond V Yeast*) مصرف ماده خشک در گاوهای شیری (تصحیح شده بر اساس کنترل) (۳۵).
سطح معنی داری کمتر از ($P < 0.05$) می باشد.



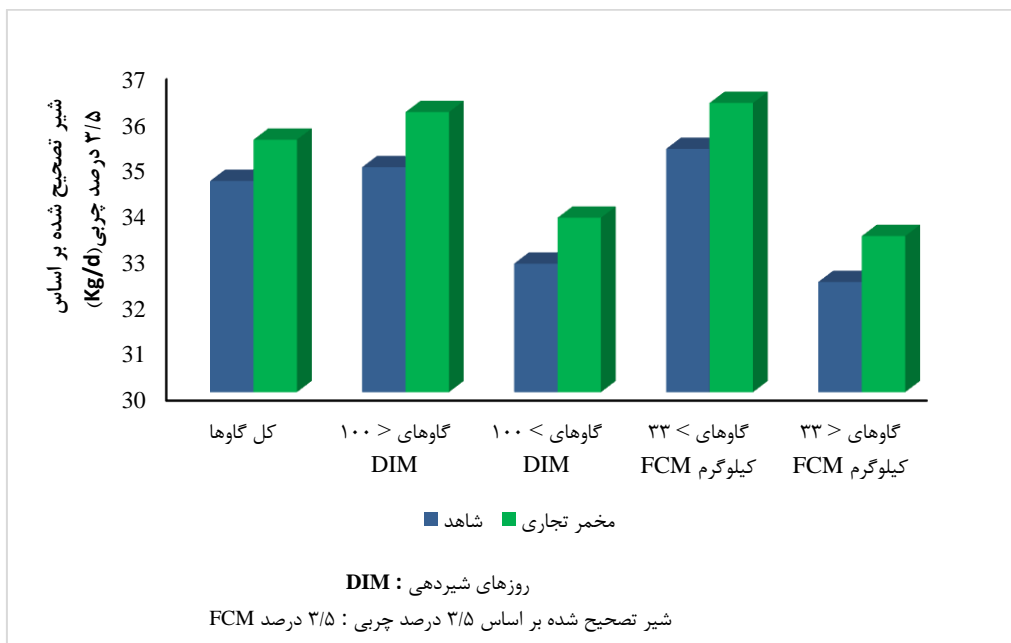
شکل ۱۴- متاآنالیز بیش از ۲۲ آزمایش در بررسی استفاده از مخمر دیمنود وی (*Diamond V Yeast*) بر تولید شیر (تصحیح شده بر اساس کنترل) (۳۵).
سطح معنی داری کمتر از ($P < 0.05$) می باشد.

بهبود می دهد به طوری که با نزدیک شدن به انتهای دوره شیردهی در گاوهایی که در خوراک آنها از مخمر استفاده شده بود تولید شیر روزانه یک کیلوگرم افزایش داشته درحالی که در این برهه میزان ماده خشک مصرفی نیم کیلوگرم کاهش خواهد داشت (۳۴). علاوه بر گاو شیری، استفاده از مخمر در گوساله‌ها نیز اثرات قابل توجهی بر راندمان رشد و افزایش وزن گوساله‌ها دارد. آزمایشی که بر

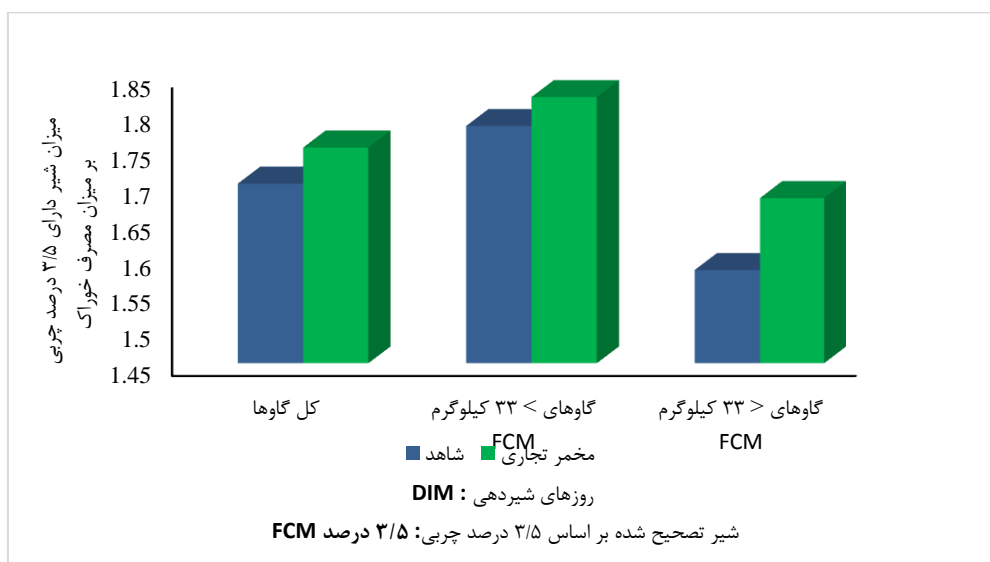
تحقیقات نشان داده است که گاوهایی که با مخمر تغذیه می شوند به میزان یک کیلوگرم تولید شیر روزانه را در طول دوره شیردهی افزایش می دهد. در انتهای دوره شیردهی نیز مصرف مخمر به طور متوسط تولید شیر روزانه را یک کیلوگرم افزایش داده است در حالی که در این زمان مقداری از انرژی خوراک در حیوان صرف جنین می شود (۳۵). مصرف مخمر ضریب تبدیل غذایی را نیز

شیرگیری افزایش وزن و مصرف خوراک گوساله‌هایی که از مخمر استفاده می‌کردند نیز به طور معنی‌داری بالا بود (۳۶).

روی ۱۲۰ گوساله هلشتاین انجام گرفت نشان داد که افزودن مخمر به جیره استارتر گوساله‌ها از روز ۱۰ تا ۷۷ افزایش وزن روزانه را در گوساله‌ها تا قبل از ۳۵ روزگی بهبود می‌بخشد. همچنین بعد از



شکل ۱۵- متاآنالیز ۱۴ آزمایش و ۱۶۱۵ گاو که اثر استفاده از مخمر تجاری ساکارومایسس سرویزیه (CNCM I-1077) بر تولید شیر (تصحیح شده بر اساس چربی) تقسیم‌بندی شده بر اساس روزهای شیرواری و تولید شیر (۳۷) سطح معنی‌داری کمتر از ($P < 0.05$) می‌باشد.



شکل ۱۶- متاآنالیز ۱۴ آزمایش و ۱۶۱۵ گاو که اثر استفاده از مخمر تجاری ساکارومایسس سرویزیه (CNCM I-1077) را بر تولید شیر (تصحیح شده بر اساس چربی) به ازای هر کیلو گرم ماده خشک مصرفی (۳۷) سطح معنی‌داری کمتر از ($P < 0.05$) می‌باشد.

جدول ۲- نتایج متاآنالیز ۱۴ آزمایش و ۱۶۱۵ گاو بر روی اثر استفاده از مخمر تجاری ساکارومایسس سرویزیه (CNCM I-1077) بر تولید شیر،

راندمان خوراک، پروتئین و چربی شیر (۳۷)

| تیمارها | | | | |
|----------|----------|--------------------|--------------------|----------------------------------|
| R-square | P-value | مخمر تجاری | شاهد | |
| ۰/۹۵ | < ۰/۰۰۰۱ | ۳۴/۱۹ ^a | ۳۳/۰۴ ^b | تولید شیر (kg/day) |
| ۰/۹۳ | < ۰/۰۰۰۱ | ۳۵/۵۴ ^a | ۳۴/۵۸ ^b | ۱ FCM % ۳/۵ (kg/day) |
| ۰/۹۶ | ۰/۰۰۰۶ | ۱/۷۵ | ۱/۷۰ | بازده خوراک ^۲ |
| ۰/۷۹ | ۰/۰۰۱۳ | ۲/۹۹ | ۳/۰۳ | محتوای پروتئین حقیقی شیر (%) |
| ۰/۹۴ | < ۰/۰۰۰۱ | ۱/۰۲ ^a | ۱/۰۰ ^b | بازده پروتئین حقیقی شیر (kg/day) |
| ۰/۷۶ | ۰/۰۳۲۶ | ۱/۷۵ | ۳/۸۰ | محتوای چربی شیر (%) |
| ۰/۹۰ | ۰/۰۰۸ | ۱/۲۸ | ۱/۲۵ | بازده چربی شیر (kg/day) |

۱- شیر تصحیح شده بر اساس ۳/۵ درصد چربی شیر

۲- میزان شیر دارای ۳/۵ درصد چربی بر میزان مصرف خوراک

^{a, b} درج حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌داری می‌باشد (P < ۰/۰۰۰۱).

دستگاه گوارش از این منبع کربنی به راحتی استفاده کنند (۳۹). مخمرها با تحریک سلول‌های انتروسیست روده منجر به افزایش تولید آنزیم‌هایی نظیر لاکتاز، سوکراز، مالتاز، گلوکوامیلاز، آمینو پیتیداز، الکالاین فسفاتاز می‌شود. این آنزیم‌های اندوژنوس (Endogenous Enzymes) تجزیه و جذب مواد غذایی را توسط دستگاه گوارش بهبود می‌بخشند (۴). مایکوسین‌ها ترکیبات گلیکوپروتئینی هستند که باعث تخریب دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زا شده و دارای گیرنده‌های اختصاصی بر روی دیواره باکتری‌ها هستند. تولید مایکوسین‌ها در مخمرهای موجود در جنس کلویورومایسسس (*Kluyveromyces*)، ساکارومایسسس (*Saccharomyces*)، زیگوساکارومایسسس (*Zygosac-charomyces*) گزارش شده است (۴۰). مشخص شده است که دیواره سلولی مخمرها حاوی بتاگلوکان‌ها و مانان الیگوساکاریدها بوده که حدوداً ۲۰ تا ۵۰ درصد آن از مانوپروتئین (مانان الیگوساکاراید + پروتئین‌ها)، ۳۰ تا ۶۰ درصد بتاگلوکان و ۱ تا ۶ درصد کیتین تشکیل شده است (۴۱). همچنین مشخص شده است که به‌طور میانگین ۱۵ تا ۲۰ درصد وزن مخمر

اثرات مخمر در بهبود سلامت دام: برای مشاهده اثرات مفید پروبیوتیک‌ها می‌بایست روزانه حدود ۱۰^۶ تا ۱۰^۷ CFU از میکروارگانیسم‌ها توسط حیوان مصرف شود. برخی از مخمرها با تولید پلی‌آمین‌ها (Spermidine, Putrescine) و Spermine در رشد، تمایز و متابولیسم سلول‌ها، همانندسازی DNA، رونویسی و ترجمه تأثیر گذاراند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که پلی آمین‌ها با تحریک سلول‌های اپیتلیال روده، باعث افزایش سرعت رشد و تمایز آنها شده در نتیجه سطح جذب را افزایش داده و توان سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی این سلول‌ها را تقویت می‌کنند (۳۷).

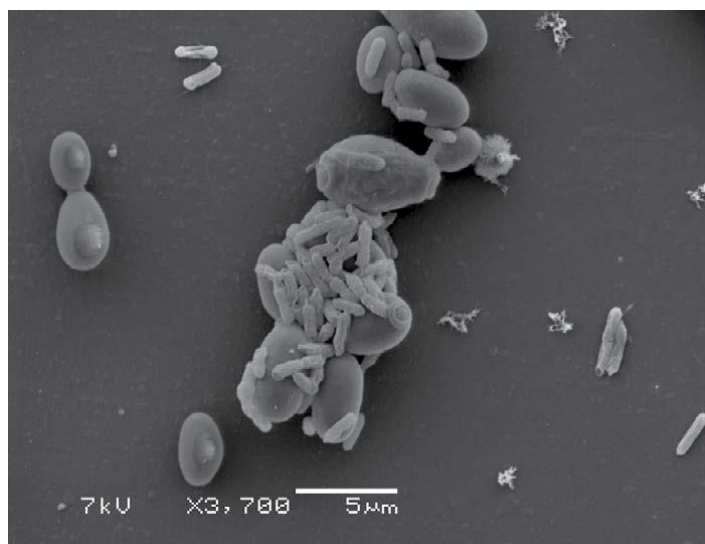
مخمرها همچنین آنزیم‌هایی نظیر پروتازها، هیدرولازها و کربوکسی پیتدازها و آمینوپیتدازها تولید می‌کنند. نتایج بررسی‌های اخیر نشان داده که این آنزیم‌ها رسپتورهای روده‌ای Toxin A را در روده تجزیه نموده و این امر باعث عدم اتصال کلستریدیوم دیفیسیل (*C. difficile*) (عامل عفونت روده در گوساله‌ها) به دیواره روده می‌شود (۳۸). علاوه بر آن وجود آنزیم اینورتاز (Invertase) نیز که باعث تبدیل سوکروز به گلوکوز و فروکتوز شده و باعث شده تا میکروارگانیسم‌های مفید موجود در

اتصال به این ضمامم داشته از این رو مانع چسبیدن و کلونیزه شدن این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در دیواره روده می‌شوند.

آزمایشات بسیاری نشان داده است که بتاگلوکان‌ها و مانان‌های موجود در دیواره سلولی مخمر با بلوکه کردن رسپتورهای مانوزی (عوامل اتصال پاتوژن‌ها به دیواره اپیتلیال روده) میزان ابتلا به عفونت‌های روده‌ای و التهاب را کاهش می‌دهند (۴۲). مخمر با اتصال و مهار پاتوژن‌های نظیر کلستریدیوم دیفیسیل (*C. difficile*)، اش‌ریشیاکلی (*E. coli*)، ویبریو کلرا (*Vibrio cholerae*)، سالمونلا (*Salmonella*) و شیگلا (*Shigella*) همچنین خنثی نمودن سموم تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها از بیماری‌های دستگاه گوارش جلوگیری می‌کند (۴۳).

خشک از دیواره سلولی تشکیل شده است. از سوی دیگر مشخص شده است که ساختار سه بعدی و میزان مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها در دیواره مخمر اثر معنی‌داری بر میزان جذب میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارد. از این رو به نظر می‌رسد که بتاگلوکان و مانان الیگوساکاریدها با قرارگیری در ساختار دیواره مخمر و تشکیل فضایی خاص، توانایی اتصال به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را دارند.

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به موکوس دیواره روده متصل شده و کلونیزه می‌شوند که این امر عفونت و ایجاد التهاب روده را به دنبال دارد. مشخص شده است که این اتصال توسط پروتئین متصل‌کننده کربوهیدرات‌ها (Carbohydrate-Binding Proteins) یا فیمبریا یا پیلی (*Fimbriae*) موجود در دیواره میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا صورت می‌گیرد. این ضمامم روی سطح باکتری‌ها قرار داشته و باکتری‌ها به دیواره سلولی اپیتلیال روده متصل می‌شوند. مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها موجود در مخمر تمایل شدیدی به



شکل ۱۷- توانایی چسبیدن مخمر ساکارومایسس بولاردی (*Saccharomyces boulardii*) به باکتری بیماری‌زای دستگاه گوارش سالمونلا تیفی‌موریوم (*Salmonella typhimurium*) (۴)

سرئویزه (*S. cerevisiae*) همچنین توانایی باند شدن به باکتری‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش نظیر اشریشیاکلی (*E. coli*) و سالمونلا تیفی‌موریوم (*S. Typhimurium*) را داشته و منجر به غیر فعال شدن این میکروارگانیسم‌ها و انتقال آنها از روده به کبد، طحال و غدد لنفاوی می‌شود (۴۴). فواید استفاده از گونه‌های مخمر در جدول ۳ به‌صورت خلاصه آورده شده است.

مخمر ساکارومایسس بولاردی (*S. boulardii*)، آنزیم‌های سرین پروتئاز با وزن مولکولی 120 kDa و 54 kDa تولید می‌کند که می‌تواند سموم تولید شده توسط کلستریدیوم دیفیسیل (*C. difficile*) در روده را مهار کند. این مخمر همچنین با تولید آنزیم فسفاتاز، سموم میکروبی نظیر لیپوپولیساکارید در اشریشیاکلی (*E. coli*) دفسفریلاسیون نموده و سم‌زدایی می‌کند (۴). مخمر ساکارومایسس

جدول ۳- فواید استفاده از گونه‌های مختلف مخمر تجاری بر عملکرد دام

| انواع مخمر | حیوانات مختلف | | رفرنس‌ها |
|--|---|--|--|
| | گوساله | گوسفند و بز | |
| ساکارومایسس سرئویزه (<i>S. cerevisiae</i>) | افزایش تولید شیر، تداوم شیردهی، بهبود کیفیت شیر (چربی و پروتئین) حفظ تعادل جمعیت باکتری‌های سلولایتیک | افزایش وزن روزانه در گوساله‌ها تکامل سریع ساختار و فلور میکروبی | ۱۰، ۱۹، ۳۳، ۱۷، ۸، ۱۳، ۳۱، ۱۷، ۱۶، ۲۵، ۲۸، ۱ |
| | کاهش مسمومیت با سموم قارچی تنظیم pH شکمبه و کاهش اسیدوز | بهبود سیستم ایمنی گوساله تسریع تکامل فلور میکروبی شکمبه | ۱۰، ۳۹، ۲ |
| | | بهبود ضریب تبدیل، افزایش وزن روزانه | |
| ساکارومایسس بولاردی (<i>S. boulardii</i>) | مهار باکتری مضر و سم‌زدایی سموم تولید شده توسط باکتری‌ها کاهش بروز بیماری اسهال در گوساله | | ۴ |
| اواروم (<i>S. uvarum</i>) | | بهبود مصرف ماده خشک افزایش وزن روزانه | ۳۳ |
| یاروویا لیپولیتیکا (<i>Y. lipolytica</i>) | | بهبود مصرف خوراک، عملکرد رتیکولورومن، وضعیت متابولیک و عملکرد رشد گوساله شیرخوار | ۳۹ |

| | | |
|----|---|--|
| ۳۹ | بهبود قابلیت هضم پروتئین خوراک | تورولاسپورا دلبروکی (<i>T. delbrueckii</i>) |
| ۳۳ | بهبود مصرف ماده خشک افزایش وزن روزانه تولید مایکوسین‌ها تخریب دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زا | کلویورومایسس (<i>Kluyveromyces</i>) |
| ۶ | تاثیر بر پارامترهای ایمنولوژیک یک اکسیدان فعال قدرت چسبندگی به دستگاه گوارش | دبرومایسس هانسینی (<i>D. hansenii</i>) |

نتیجه‌گیری

ارزیابی نتایج متعدد نشان داد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند با رقابت بر سر مواد غذایی و تولید ترکیبات ضد میکروبی، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را مهار و با خنثی نمودن سموم تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها از بیماری‌های دستگاه گوارش جلوگیری می‌کند. همچنین حضور ترکیبات مؤثری مانند بتاگلوکان‌ها و مانان‌ها در دیواره سلولی مخمر مسمومیت با سموم قارچی (مایکوتوکسین‌ها) را در دام کاهش می‌دهد و از این طریق سلامت دام و

عملکرد تولید بهبود می‌یابد. همچنین نشان داده شد که افزودن مخمر به جیره نشخوارکنندگان باعث استقرار باکتری‌های مفید در شکمبه، بهبود جمعیت قارچ‌ها و پروتوزوآها، بهبود عملکرد شکمبه (تنظیم pH شکمبه و کاهش تولید آمونیاک) و تسریع تکامل فلور میکروبی شکمبه در نشخوارکنندگان می‌شود و به‌طور کلی از طرق مختلفی می‌تواند سبب بهبود راندمان رشد و ضریب تبدیل، عملکرد تولید، تولید مثل و تقویت سیستم ایمنی در نشخوارکنندگان شود.

References

- 1- Vohra A, Syal P, Madan A. Probiotic Yeasts in Livestock sector. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016.
- 2- Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, Shimazaki K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J. Dairy Sci.* 2016; 87 (12): 6-4050.
- 3- Salamat News. Antibiotic. [Internet]. [Available from: <http://www.salamatnews.com/news/> updated 2007 May 2; cited 2022 Nov.
- 4- Vohra A, Satyanarayana T. Probiotic yeasts. *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology: Springer Sci. Rev.* 2012; p. 411-33.
- 5- Roto SM, Rubinelli PM, Ricke SC. An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Front. vet. sci.* 2015; 2.
- 6- Koul V, Kumar U, Sareen VK, Singh S. Mode of action of yeast culture (YEA-SACC 1026) for stimulation of rumen fermentation in buffalo calves. *J. Sci. Food Agric.* 1998; 77(3): 407-413.
- 7- Chaucheyras-Durand F, Walker N, Bach A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2008; 145(1): 5-26.
- 8- Collado MC, Sanz Y. Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by the use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques. *Vet. Microbiol.* 2007; 121(3): 299-306.
- 9- Lesmeister K, Heinrichs A, Gabler M. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal

dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2004; 87(6): 1832-1839.

10- Magalhães V, Susca F, Lima F, Branco A, Yoon I, Santos J. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2008; 91(4): 149-509.

11- Robinson P. Yeast products for growing and lactating ruminants: A literature summary of impacts on rumen fermentation and performance. Cooperative Extension University Of California, Davis. 2010.

12- Thruene M, Bach A, Ruiz-Moreno M, Stern M, Linn J. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livest. Sci.* 2009; 124(1): 261-5.

13- Desnoyers M, Giger-Reverdin S, Bertin G, Duvaux-Ponter C, Sauvant D. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 2009; 92(4): 1620-32.

14- Julien C, Marden J, Moncoulon R, Auclair E, Bayourthe C, Crovetto G, editors. Ruminal redox potential in dairy cows regarding diet composition and live yeast supplementation: a modelling approach. Energy and protein metabolism and nutrition 3rd EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition Conference 2010, September 6-10, 2010; Parma, Italy: *Wageningen Academic Publishers*, 2010; 1-13.

15- Bach A, Iglesias C, Devant M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007; 53(1): 136-146.

16- DeVries T, Chevaux E. Modification of the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. *J. Dairy Sci.* 2014; 97(10): 6499-6510.

17- Chaucheyras-Durand F, Martin C, Chevaux E, Forano E. Use of yeast probiotics in ruminants: Effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet: In tech, Access Publisher; 2012.

18- Chaucheyras-Durand F, Ameilbonne A, Bichat A, Mosoni P, Ossa F, Forano E. Live yeasts enhance fibre degradation in the cow rumen through an increase in plant substrate colonization by fibrolytic bacteria and fungi. *J. Appl. Microbiol.* 2016; 120(3): 560-570.

19- Mousa KM, El-Malky O, Komonna O, Rashwan S. Effect of live dried yeast supplementation on digestion coefficients, some rumen fermentation, blood constituents and some reproductive and productive parameters in Rahmani sheep. *Am. J. Sci.* 2012; 8: 291-303.

20- Bitencourt LL, Silva JRM, Oliveira BMLd, Dias Júnior GS, Lopes F, Siécola Júnior S, et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. *Sci. Agric.* 2011; 68(3): 301-7.

21- Leng R, Nolan J. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 1984; 67(5): 1072-89.

22- Chaucheyras-Durand F, Masségli S, Fonty G. Effect of the microbial feed additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 on protein and peptide degrading activities of rumen bacteria grown in vitro. *Curr. Microbiol.* 2005; 50(2): 96-101.

23- Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Gouet P. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 3466(9): 61-65.

24- Newbold C, Wallace R, McIntosh F. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 1996; 76(02): 249-261.

25- Lynch H, Martin S. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 2002; 85(10): 2603-2608.

26- Newbold C, Olvera-Ramirez A, editors. The use of yeast-based probiotics to meet new challenges in ruminant production. *J. Anim. Sci.* 2006: Amer soc Animal Science 1111North Dunlap Ave, Savoy, IL 61874 USA.

27- Galvão KN, Santos JE, Coscioni A, Vilasenor M, Sischo WM, Berge ACB. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reprod. Nutr. Dev.* 2005; 45(4): 427-440.

28- Ringot D, Lerzy B, Chaplain K, Bonhoure J-P, Auclair E, Larondelle Y. In vitro bio-sorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Biore-sour. Technol.* 2007; 98(9):1812-1821.

29- Tao M, Yan T, ZHANG N-f, GUO J-p, DENG K-d, Yi Z, et al. Effects of dietary yeast β-

glucan on nutrient digestibility and serum profiles in pre-ruminant Holstein calves. *J. Sci. Food Agric.* 2015; 14(4): 749-757.

30- Malekkhahi M, Tahmasbi A, Naserian A, Danesh-Mesgaran M, Kleen J, AlZahal O, et al. Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood metabolites, and milk production in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016; 213: 29-43.

31- Poppy G, Rabiee A, Lean I, Sanchez W, Dorton K, Morley P. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2012; 95(10): 6027-6041.

32- Robinson P, Erasmus LJ. Effects of analyzable diet components on responses of lactating dairy cows to *Saccharomyces cerevisiae* based yeast products: A systematic review of the literature. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2009; 149(3): 185-198.

33- Tripathi M, Karim S. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livest. Sci.* 2011; 135(1): 17-25.

34- Erasmus L, Coertze R, Leviton M, Chevaux E. A meta-analysis of the effect of monensin or live yeast or a combination thereof on performance of beef cattle. *J Anim Sci.* 2009; 87: 281.

35- Rabiee A, Lean I, Dorton K, Engstrom M, Sanchez W. Effect of feeding Diamond V Yeast Culture™ on milk production and dry matter intake in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Anim Sci.* 2008; 86: 589.

36- Terré M, Maynou G, Bach A, Gauthier M. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 supplementation on performance and rumen microbiota of dairy calves. *Prof. Anim. Sci.* 2015; 31(2): 153-8.

37- De Ondarza M, Sniffen C, Dussert L,

Chevaux E, Sullivan J, Walker N. Case study: Multiple-Study analysis of the effect of live yeast on milk yield, milk component content and yield, and feed efficiency. *Prof. Anim. Sci.* 2010; 26(6): 661-666.

38- Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O'Keane CJ, Castagliuolo I, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *J. Gastro.* 1993; 104: 1108.

39- Shankar T, Thangamathi P, Rama R, Sivakumar T. Optimization of invertase production using *Saccharomyces cerevisiae* MK under varying cultural conditions. *Int. J. Biochem.* 2013; 1(3): 47-56.

40- Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol.* 2012; 3: 421.

41- Bzducha-Wróbel A, Kieliszek M, Błażej S. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. *Eur. Food Res. Technol.* 2013; 237(4): 489-499.

42- Yang Y, Iji P, Kocher A, Mikkelsen L, Choct M. Effects of mannanoligosaccharide and fructooligosaccharide on the response of broilers to pathogenic *Escherichia coli* challenge. *Br. Poult. Sci.* 2008; 49(5): 550-559.

43- Martins FS, Vieira AT, Elian SD, Arantes RM, Tiago FC, Sousa LP, et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes Infect.* 2013; 15(4): 270-279.

44- Martins FS, Rodrigues ACP, Tiago FC, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RM, et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(3): 352-359.

A comprehensive review of the effects of yeast on the regulation of rumen fermentation, productive efficiency and health in ruminants

Ehsan Oskoueian^{1*}, Mohammad Faseleh Jahromi¹, Parisa Shokryazdan¹, Marzieh Hajmohammadi^{1,2}, Mahdi Salari Pour^{1,3}, Mohammad Reza Ahmadi^{1,4}, Hila taghavi⁵, Mojtaba Moein Jahromi¹

- 1- Research and Development, Arka Industrial Group and Ariana knowledge-based company, Mashhad, Iran.
- 2- PhD, Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
- 3- PhD Student in Animal Nutrition, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
- 4- M.Sc. Genetics and Animal Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
- 5- Department of Veterinary, Babol-Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Receive: October 31, 2021; Revise: January 29, 2022; Accept: February 7, 2022

Summary

Due to growing demand of human communities for livestock products, livestock farms have trended towards industrialization. Therefore, with increasing livestock production, the use of highly fermentable carbohydrates has increased in livestock diets. On the other hand, the incompatibility of the gastrointestinal tract of ruminants with this feeding method causes the occurrence of various metabolic diseases and reduces the herd's economic longevity. Research has also shown that adding antibiotics to cow diet increases growth, reduces feed conversion ratio, and improves production and reproduction. But the use of antibiotics for long-term increases antibiotic resistance in livestock and consumers of livestock products. Therefore, it seems necessary to find a suitable alternative to antibiotics such as probiotics. The use of yeast in ruminant nutrition improve to establish and maintain the balance of beneficial bacterial populations, increase fiber digestion, improve ruminal function, ruminal pH and reduce the occurrence of various metabolic diseases. Yeast diets have also to improve milk production performance, persistence in dairy cattle, and milk quality. Probiotics can reduce the risk of intestinal infections and inflammation by competing for food, producing antimicrobial compounds, neutralizing toxins produced by these microorganisms. Also, the presence of effective compounds such as beta-glucans and mannan in the yeast cell wall reduces poisoning by fungal toxins, especially in ruminants, and by stimulating the immune system and the production of digestive enzymes, plays an important role in the growth performance, production, reproduction and the immune system in ruminants.

Keywords: *Rumen Fermentation, Production Efficiency, Rumen microbial Communities, Yeast, Ruminants*

مروری بر تب اسبی پوتومک (Potomac horse fever)

محمد عبدی گودرزی^{۱*}، سیدجلال میریان^۲، غلامرضا کریمی^۲

۱- دانشیار، بخش انگل‌شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
۲- استادیار، بخش انگل‌شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۹ دی ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۷ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۸ بهمن ۱۴۰۰

چکیده

تب اسبی پوتومک نوعی سندروم انتروکولیت حاد است که با تولید کولیک خفیف، تب و اسهال در اسب در تمام سنین و همچنین ایجاد سقط در مادیان های آبستن دیده می‌شود. عامل ایجادکننده بیماری نوعی ریکتزیا به نام *Neorickettsia risticii* است. بیماری تب اسبی پوتومک به نام‌های ارلیشیوز مونوسیتی اسب، تب کانال آب (Ditch fever)، (Shasta River Crud) و کولیت ارلیشیایی اسب نیز معروف است. این بیماری اولین بار به‌عنوان بیماری دام توسط دامپزشکان بخش مونتگومری ایالت مریلند آمریکا تشخیص داده شد. بیماری در اسب‌های مزارع نزدیک به رودخانه پوتومک (Potomoc) دیده شد. با انجام مطالعه اپیدمیولوژیک مشخص شد که PHF دارای وقوع فصلی است. با مرور مقالات مختلف و کتاب مرتبط در این زمینه دیده شد که بیشتر موارد این بیماری در ماه‌های ژوئیه، اگوست و سپتامبر دیده می‌شود. بررسی اپیدمیولوژی PHF نشان داده است که یک ناقل ترماتود در ایجاد این بیماری نقش دارد. جداسازی و تعیین عامل ایجادکننده بیماری از موارد کلینیکی PHF با استفاده از کشت سلول متداول و یا انجام آزمایش PCR انجام می‌شود. این بیماری در بسیاری از نواحی آمریکا و کانادا با استفاده از آزمایش آنتی‌بادی فلورسانت غیر مستقیم تشخیص داده شده است که در تأیید تماس قبلی حیوان با عامل بیماری‌زا است. در گسترش‌های خون آماده شده از موارد کلینیکی اسب، باکتری (*N. risticii*) در مونوسیت‌ها قابل مشاهده نیست و این مورد برعکس مورد آناپلازما فاگوسیتوفیلوم (*A. phagocytophilum*) است که بلافاصله با مشاهده آناپلازما در گرانولوسیت‌های آلوده در گسترش تهیه شده از خون محیطی در اسب تشخیص انجام می‌شود. باکتری (*N. risticii*) از ترماتودهای رها شده از حلزون‌های آب شیرین جداسازی شده است. این بیماری مسری نیست. بیماری PHF یک بیماری جدی و مرگ‌آور است. از نظر کلینیکی اسب‌های بیمار ناقل بیماری نیستند و آنها را می‌توان در کنار اسب‌های سالم و غیر عفونی نگهداری نمود. این بیماری نوعی بیماری مشترک انسان و دام (زئونوز) نیست. توجه دامپزشکان به احتمال وجود این بیماری در اسب و توجه به عامل آب و هوا در ایران ضروری است.

واژگان کلیدی: تب اسبی، پوتومک، ارلیشیا، نئوریکتزیا

که یک ناقل ترماتود در ایجاد این بیماری نقش دارد (شکل شماره ۱). بیماری به شکل تک‌گیر در اثر *N. risticii* در سگ و گربه نیز گزارش شده است. به نظر می‌رسد که گوساله‌ها نسبت به عفونت مقاوم هستند. این بیماری از اکثر ایالات متحده، پنج ایالت از کانادا، امریکای جنوبی (برزیل و اروگوئه)، اروپا (فرانسه و هلند) و هندوستان گزارش شده است. در برزیل و اروگوئه این بیماری با نام محلی خاص به معنی اسهال اسبی با تاریخچه بیش از صد سال گزارش شده است و Dutra و همکارانش در سال ۲۰۰۱ علائم بیماری و وجود ژنوم *N. risticii* را در اسب‌های بیمار گزارش نمودند (۲). این بیماری در بسیاری از نواحی امریکا و کانادا با استفاده از آزمایش آنتی‌بادی فلورسانت غیر مستقیم تشخیص داده شده است که در تأیید تماس قبلی حیوان با عامل بیماری‌زا است. هرچند که مطالعات جدیدتر میزان بالایی از تیت‌های مثبت کاذب را در این آزمایش‌ها نشان داده است و دامنه جغرافیایی واقعی و گسترش بیماری شناخته شده نیست. جدا سازی و تعیین عامل ایجادکننده بیماری از موارد کلینیکی PHF با استفاده از کشت سلول متداول و یا انجام آزمایش PCR فقط از کالیفرنیا، ایلینویز، ایندیانا، کنتاکی، مریلند، میشیگان، نیویورک، نیوجرسی، اوهایو، اورگان، پنسیلوانیا، تگزاس و ویرجینیا گزارش شده است. در نیویورک در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ Lawrence و همکارش وجود ژنوم نئوریکتیزیا را در ترماتودهای گرفته شده از حلزون‌های درپوش‌دار دیلوما ساپروستراتا اثبات نمودند (۳). اسب از هر نژاد و سن مورد هجوم بیماری قرار می‌گیرد، ولی این بیماری در کره اسب زیر یک سال گزارش نشده است. نشانه‌های بیماری در اسب شامل (کاهش اشتها، بی‌قراری یا احساس بیماری، تب، اسهال و لنگش (Laminitis)) است. PHF را می‌توان با درمان حمایتی درمان نمود ولی موارد بیماری‌های حاد و

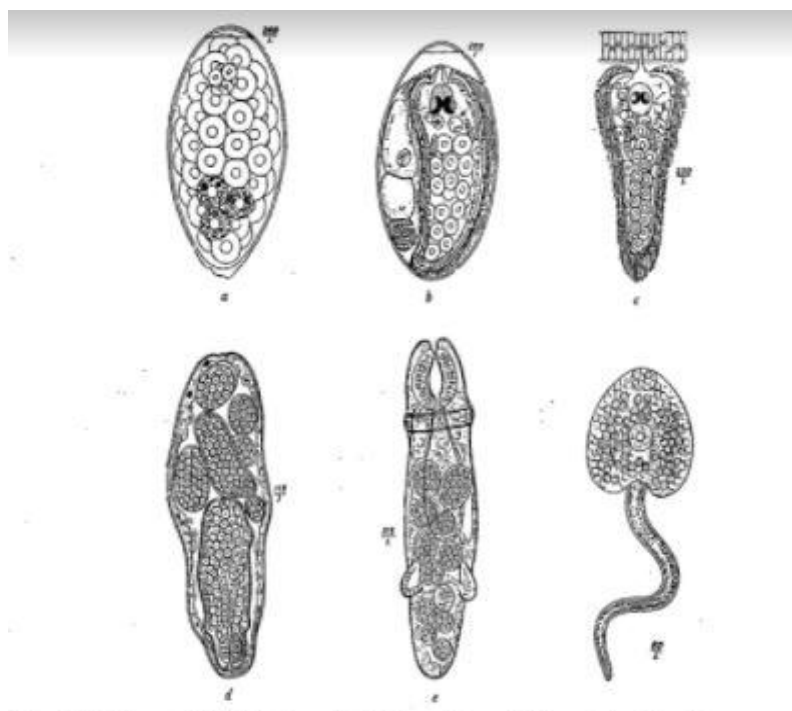
این بیماری به نام‌های ارلیشیوز مونوسیتی اسب، تب کانال آب (Ditch fever)، Shasta River (Crud) و کولیت ارلیشیایی اسب نیز معروف است. Baird و همکارش در سال ۲۰۱۳ جنبه‌های تاریخی این بیماری را در ایالت انتاریو کانادا از سال ۱۹۲۴ تا ۲۰۱۰ مطالعه نمودند (۱). در سال ۱۹۷۹، PHF اولین بار به‌عنوان بیماری دام توسط دامپزشکان بخش مونتگومری ایالت مریلند آمریکا تشخیص داده شد. بیماری در اسب‌های مزارع در یک محدوده نزدیک به رودخانه پوتومک (Potomoc) دیده شد. در فاصله سال‌های ۱۹۷۹ تا ۱۹۸۱، اکثر موارد PHF در مریلند در فاصله یک یا دو مایلی رودخانه پوتومک دیده شد. در فاصله ۱۹۸۲ تا ۱۹۸۶ تعداد موارد کلینیکی تشخیص داده شده و گزارش شده در این منطقه به ۹۰۴ مورد رسید. با انجام مطالعه اپیدمیولوژیک مشخص شد که PHF دارای وقوع فصلی است و بیشتر موارد در ماه‌های July، اگوست و سپتامبر دیده شدند. تقریباً ۷۰ درصد موارد یاد شده از تعداد ۹۰۴ مورد منطقه یاد شده در فاصله ۱۹۸۲ تا ۱۹۸۶ در ماه‌های July و اگوست اتفاق افتادند (۱). تب اسبی پوتومک عبارت از نوعی سندروم انتروکولیت حاد است که با تولید کولیک خفیف، تب و اسهال در اسب در تمام سنین و همچنین ایجاد سقط در مادبان‌های آبستن دیده می‌شود. عامل ایجادکننده بیماری نوعی ریکتیزیا به نام *Neorickettsia risticii* است. در نتیجه ایجاد عفونت در انتروسیت‌ها (Enterocytes) در روده باریک و روده بزرگ منجر به کولیت حاد می‌شود که یکی از علائم و نشانه‌های کلینیکی اصلی (PHF) است. این بیماری در بهار، تابستان و اوایل پاییز دیده می‌شود و وابسته به چراگاه‌هایی است که آب‌های سطحی منشعب از رودخانه را احاطه می‌کند. بررسی اپیدمیولوژی PHF نشان داده است

مروری توسط Mulville در سال ۱۹۹۱ بیماری تب اسبی پوتومک معادل ارلیشیوز مونوسیتی اسب ذکر شده است که گمراه کننده است (۶).

بیماری Potomac (تب اسبی پوتومک) مسری نیست. در صورت مشاهده موارد ابتلا در کل اسب‌های یک گله در یک محل، این وضع به دلیل شرایط محیطی است که ناقلین را در یک محل آلوده نموده است. این بیماری باعث کولیت، دی‌هیدراسیون (از دست دادن آب و مایعات بدن) و اسهال می‌شود. بیماری PHF یک بیماری جدی و دارای پتانسیل مرگ‌آور است. با وجود جدا نمودن عامل بیماری از مدفوع اسب‌های بیمار، ولی از نظر کلینیکی اسب‌های بیمار ناقل بیماری نیستند و آنها را می‌توان در کنار اسب‌های سالم و غیر عفونی نگهداری نمود. این بیماری نوعی بیماری مشترک انسان و دام (زئونوز) نیست، یعنی قابل انتقال از اسب به انسان نمی‌باشد.

سخت پیش‌آگهی ضعیفی دارد. تشخیص سریع و درمان به موقع خیلی اهمیت دارد. چرخه انتقال بیماری PHF خیلی پیچیده است. در بعضی منابع عامل بیماری به نام *Ehrlichia risticii* اشاره شده است و بیماری پوتومک به نام ارلیشیوز گرانولوسیتی اسب اشاره شده است (۴) که به همراه بیماری دیگری در اسب به نام ارلیشیوز مونوسیتی اسب نام برده شده است. ارلیشیوز مونوسیتی اسب در اثر *Ehrlichia equi* ایجاد می‌شود و بروز هر دو بیماری فصلی است. *Ehrlichia equi* توسط کنه‌های خانواده ایکسودیده (کنه‌های سخت) و جنس ایکسودس در امریکا منتقل می‌شود. کنه جنس ایکسودس در ایران در استان‌های شمالی دیده می‌شود (۵). علائم بیماری در اثر *Ehrlichia equi* شامل تب بالا، حالت افسردگی، آنورکسی (بی‌اشتهایی)، تورم اندام‌های حرکتی، مشاهده نقاط خونریزی در مخاط (پتشی)، زردی مخاطات، عدم تعادل و سنگین راه رفتن اسب می‌باشد (۴) (نکته مورد توجه این‌که در عنوان مقاله

شکل ۱- مراحل رشد و تکوین فاسیولا هپاتیکا به عنوان یک ترماتود در شکل دیده می‌شود. a- تخم، b- تخم حاوی میراسیدیوم، c- میراسیدیوم، d- اسپوروسیست، e- ردی (اقتباس از کتاب Soulsby, 2005)



اتیولوژی و پاتوژنز: عامل بیماری (*N. risticii*)

نوعی باکتری گرم منفی درون سلولی اجباری است که دارای تروفیسم به طرف مونوسیت‌ها است. مطالعات مورفولوژیکی اولیه این باکتری جدا شده از کشت سلول و همچنین پاسخ‌های سرولوژی نسبت به (*N. risticii*) باعث شد که این باکتری در جنس ارلیشیا (*Ehrlichia*) قرار داده شود. سپس بررسی‌های آنالیز DNA مشخص نمود که (*N. risticii*) خیلی وابسته به (*N. helminthoeca*) است که عامل بیماری مسمومیت سالمون در سگ‌ها است و (*Ehrlichia sennetsu*) که باعث بیماری افراد در ژاپن می‌شود. در گسترش‌های خون آماده شده از موارد کلینیکی اسب، باکتری (*N. risticii*) در مونوسیت‌ها قابل مشاهده نیست و این مورد بر عکس مورد آناپلازما فاگوسیتوفیلوم (*A. phagocytophilum*) است که بلافاصله با مشاهده آناپلازما در گرانولوسیت‌های آلوده در گسترش تهیه شده از خون محیطی در اسب تشخیص انجام می‌شود.

باکتری (*N. risticii*) از ترماتودهای رهاشده از حلزون‌های آب شیرین جداسازی شده است. این باکتری همچنین در چراگاه‌های کالیفرنیا از حلزون‌های درپوش‌دار، گونه‌های مختلف جنس *Juga* جداسازی شده است (۷). ژنوم (DNA) این باکتری در فرم‌های بالغ و نابالغ سیزده نوع از حشرات (تریکوپترا، افروپترا، damsel flies (سنجاقک‌ها و زیگوپترا) Dragonflies (انایزوپترا و سنجاقک‌ها) و پلکوپترا (Plecoptera) تشخیص داده شده است. انجام مطالعات انتقال بیماری با استفاده از caddis flies آلوده به باکتری یاد شده باعث ایجاد بیماری به شکل کلینیکی شده است. یکی از راه‌های آلودگی به این باکتری و ایجاد بیماری تصور می‌رود که بلع تصادفی حشرات آبی تازه متولد شده است که باکتری (*N. risticii*) را در مرحله متاسرکر

ترماتود با خود منتقل می‌کنند. دوره انکوباسیون حدود ۱۰ تا ۱۸ روز است. باکتری مولد بیماری در مدفوع اسب‌های آلوده شده به شکل تجربی وجود دارد، ولی ارزش بیولوژیک این موضوع روشن نیست. از نظر کلینیکی اسب‌های بیمار قادر به سرایت بیماری به اسب‌های سالم نیستند و اسب‌های بیمار را می‌توان در کنار اسب‌های سالم نگهداری نمود (۸). Palmer و همکارش در سال ۱۹۹۴ در مطالعه انجام شده به مدت ۹۰ روز پونی‌های سالم را در کنار پونی‌های آلوده شده به شکل تجربی نگهداری کردند و انتقال آلودگی دیده نشد (۸). انجام مطالعات اضافی برای تعیین نقش دقیق ناقل بیماری و میزبان‌های ترماتود در چرخه پیچیده نگهداری این باکتری لازم است انجام شود.

یافته‌های کلینیکی و ضایعات: Murray

سال ۱۹۹۶ در کتاب خود با عنوان اختلالات معده و روده بزرگ در حیوانات بزرگ به این بیماری اشاره نموده است و سیمای درمانگاهی این بیماری را در اسب شبیه سالمونلوز می‌داند. به این ترتیب که ۲ تا ۴ روز پس از آلودگی تب زودگذر ملایمی ایجاد شده و پس از ۱۰ تا ۱۴ روز از آغاز آلودگی تب، کم‌اشتهایی و نشانه‌های ملایم تا شدید گوارشی به صورت کولیک ملایم، مدفوع شل تا اسهال پرحجم بروز می‌کند (۹). در منابع جدیدتر، مشخصات کلینیکی PHF در ابتدا به شکل اختصاصی شامل کسالت (mild depression)، آنورکسی (بی‌اشتهایی) و به‌دنبال آن تب (۳۸/۹ تا ۴۱/۷) درجه سانتی‌گراد است. در این مرحله صدهای روده‌ای ممکن است کاهش داشته باشد. در یک دوره ۲۴ تا ۴۸ ساعت اسهال متوسط تا شدید دیده می‌شود (قوام مدفوع مانند حالت مدفوع در گاو تا به شکل آبکی دیده می‌شود). این وضع در ۶۰ درصد اسب‌های آلوده دیده می‌شود. شروع اسهال اغلب همراه با ناراحتی شکمی خفیف است. در بعضی اسب‌ها علائم شدید

سال‌های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۹ را بررسی نمودند. تعداد ۴۶ مورد از موارد PHF در فاصله آخر ژوئن تا اوایل سپتامبر اتفاق افتادند. از تعداد ۴۱ اسب پذیرش شده در کالج دامپزشکی اونتاریو ۲۸ مورد زنده ماندند و ۱۳ مورد به دلیل محدودیت اقتصادی و یا پیش‌آگهی ضعیف بیماری به روش اوتانازی (euthanized) کشته شدند. اکثر موارد در بخش جنوبی اونتاریو و به موازات مرز بین آمریکا و کانادا دیده شدند. نمونه خون و مدفوع ۴۳ مورد مشکوک به PHF برای آزمایش PCR و اثبات *N. risticii* به دو آزمایشگاه ارسال شدند. در ۱۶ مورد از تعداد ۴۳ مورد برای نئوریکتوزیا مثبت اعلام شدند. ۱۴ مورد *N. risticii* تشخیص داده شدند و ۲ مورد *N. findlayensis* که گونه جدیدی از نئوریکتوزیا و عامل تب اسبی پوتومک نیز می‌باشد تشخیص داده شدند (۱۱).

تشخیص بیماری: در حال حاضر تشخیص

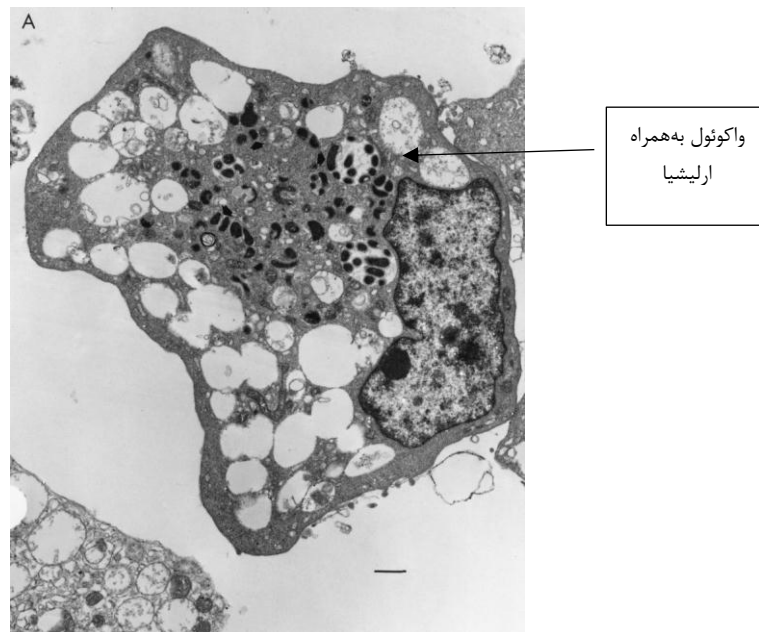
PHF اغلب بر اساس مشاهده علائم کلینیکی خاص و همچنین بر اساس وقوع فصلی و جغرافیایی بیماری صورت می‌گیرد. تشخیص قطعی باید بر اساس ایزولاسیون (جداسازی) عامل بیماری و اثبات وجود *N. risticii* انجام شود که با بررسی نمونه‌های خون و یا مدفوع اسب‌های عفونی از طریق کشت سلول و یا PCR انجام می‌شود. آزمایش سرولوژی برای تشخیص ارزش محدودی دارد، هر چند که بسیاری از اسب‌های آلوده دارای تیترا آنتی‌بادی بالا در زمان عفونت هستند. به دلیل وجود وقوع بالای تیتراهای مثبت کاذب، تفسیر آزمایش آنتی‌بادی فلورسانت غیر مستقیم در اسب‌ها به شکل منفرد مشکل است. مشاهده تیتراهای افزایشی در نمونه‌های متناوب می‌تواند مؤثر باشد. جداسازی عامل بیماری در کشت سلول هرچند امکان پذیر است ولی زمان‌بر است و به‌طور معمول در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص نیز در دسترس نیست.

عفونت خون (sepsis) و دهیدراسیون دیده می‌شود. علائم کلینیکی قابل تفریق از علائم مربوط به سالمونلا و عفونت‌های آنتروکولیت ناشی از سایر عوامل بیماری‌زا نیست. لنگش (Laminitis) به‌عنوان یک درگیری شدید PHF در ۲۰ تا ۳۰ درصد از اسب‌های عفونی به شکل پدیده غالب دیده می‌شود. یافته‌های بررسی تابلوی آزمایش خون (هماتولوژی) در مراحل اولیه PHF متفاوت بوده و از لوکوپنی (leukopenia) (به شکل نوتروپنی و لنفوپنی) و ترومبوسیتوپنی تا یک هموگرام طبیعی (برخلاف وجود بیماری سیستمی) دیده می‌شود. یک یافته متداول در مورد بیماری PHF عبارت از لوکوسیتوز واضح است که به‌طور طبیعی پس از گذشت چند روز از شروع بیماری دیده می‌شود. PHF ممکن است به همراه همه موارد فوق و یا ترکیبی از هریک از علائم کلینیکی فوق دیده شود. پس از گذشت چند ماه از بیماری کلینیکی در مادیان‌های آبستن، ممکن است سقط جنین در اثر عفونت جنین به *N. risticii* دیده شود. از نظر تجربی مادیان‌های آبستن، عفونی شده در فاصله ۱۰۰ تا ۱۶۰ روز از دوره حاملگی در فاصله ۱۹۰ تا ۲۵۰ روز از دوره حاملگی سقط می‌کنند. معمولاً سقط جنین به همراه عفونت پرده‌های جنینی (placentitis) و جفت‌ماندگی (retained placenta) است (۱۰). بررسی ضایعات جنین شامل کولیت، هپاتیت پری‌پورتال و هیپریپلازی لنفوئید گره‌های لنفاوی مزانتریک و طحال می‌باشد. یافته‌های کالبدشکافی در اسب‌های غیر آبستن که دچار انترکولیت شده بودند، غیر اختصاصی و شامل مشاهده التهاب گسترده به‌خصوص در روده بزرگ بود. Arroyo و همکارانش در سال ۲۰۲۱، یافته‌های کلینیکی، محل‌های جغرافیایی، تشخیص آزمایشگاهی و کشت سلول برای جداسازی گونه‌های مختلف نئوریکتوزیا در موارد PHF تشخیص داده شده در اونتاریو بین

PCR بر روی نمونه‌های خون و مدفوع پونی‌های به‌طور تجربی آلوده شده و نمونه‌های سریال خون گرفته‌شده از موش‌های آلوده شده به *N. risticii* و نمونه‌های خون و مدفوع در اسب‌های مشکوک به بیماری و دارای علائم کلینیکی مقایسه شده است (۱۳). برای بالا بردن شانس تشخیص باید آزمایش DNA بر روی هر دو نمونه خون و مدفوع اسب‌های عفونی صورت گیرد چون وجود عامل بیماری به شکل همزمان در هر دو نمونه قطعی نیست.

Pusterla و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ با استفاده از مراحل مختلف ترما توده‌های جمع‌آوری شده از حلزون‌های *Juga yrekaensis*، توانستند عامل بیماری را منتقل نمایند (۱۲). علاوه بر آن عامل بیماری از طریق کشت آن با استفاده از خون گرفته شده از اسب‌های آلوده در سلول‌های مونوسیت موش با میکروسکوپ الکترونی اثبات شد (۱۲) (تصویر شماره ۲) با آزمایش Real time PCR و تشخیص DNA نئوریکتیزیا در مدت ۲ ساعت تشخیص انجام می‌شود. در مطالعه‌ای توسط Mott و همکارانش، ارزش IFA و کشت سلول و آزمایش

شکل ۲- میکروگراف تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی تداخلی (transmission) از واکوئول‌های سیتوپلاسمی کشت ماکروفاژ موش، ارلیشیا با فلش مشخص شده است.



ساعت از شروع درمان دیده می‌شود. این پاسخ به درمان وابسته به کاهش درجه حرارت مخرجی (rectal) و به دنبال آن بهبودی در علائم ظاهری، اشتها و صداهای شکمی در اسب می‌باشد. در صورت اقدام سریع و شروع درمان، علائم کلینیکی اغلب تا روز سوم پس از درمان از بین می‌روند. علاوه بر آن تجویز خوراکی اریترومایسین و ریفامپین نیز

درمان بیماری: درمان موفقیت‌آمیز اسب‌های مبتلا به PHF به کمک اکسی‌تتراسایکلین (Oxytetracycline) به میزان (۶/۶ میلی‌گرم نسبت به هر کیلوگرم از وزن بدن به شکل تزریق درون‌رگی دو بار در روز) در صورتی که در اوایل شروع بیماری و در دوره کلینیکی بیماری تجویز شود، امکان‌پذیر است. پاسخ مناسب به درمان معمولاً در فاصله ۱۲

از موارد طبیعی نسبت داد. علاوه بر این، بخشی از عدم موفقیت واکسن نیز می‌تواند به دلیل فقدان محافظت آنتی‌بادی در محل عرضه آنتی‌بادی باشد. چون راه طبیعی انتقال آلودگی مشخص شده بلع عمل بیماری‌زا از طریق دهان می‌باشد. کاهش بلع حشرات آلوده در اسب‌ها (در زمان نگهداری اسب در اصطبل) به کمک خاموش کردن چراغ‌ها در هنگام شب امکان‌پذیر است. احتمال خطر انتقال عامل بیماری از اسب به انسان یا به عبارت بهتر (زئونوز بودن بیماری) اثبات نشده است.

با توجه به موارد فوق و جدید بودن این بیماری، توجه دامپزشکان به احتمال وجود این بیماری در اسب و توجه به عامل آب و هوا در ایران ضروری است. با نمونه‌برداری از موارد آنترکولیت و یا لنگش و ارسال نمونه خون و مدفوع به آزمایشگاه‌های مرتبط می‌توان جامعه دامپزشکی و دست‌اندرکاران صنعت پرورش اسب را از راهکارهای مناسب برای مطالعه این بیماری و احتمال وجود آن در ایران بهره‌مند ساخت.

پیشنهاد شده است (۱۴). به‌طور کلی برنامه درمان ضد میکروبی بیش از ۵ روز نیست. در اسب‌هایی که علائم آنترکولیت دیده می‌شود باید اقدام به تجویز مایعات و داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAID) شود. لنگش (Laminitis) بیشتر از سایر علائم آنترکولیت دیده می‌شود و در صورت توسعه شدید بوده و اغلب در برابر درمان مقاوم است. میزان مرگ و میر کلی حدود ۵ تا ۳۰ درصد است.

پیشگیری از تب اسبی پوتومک: چندین نوع واکسن بر اساس استفاده از تمام پیکر باکتری و غیر فعال شده با استفاده از همان استرین آلوده‌کننده اسب به شکل تجاری در دسترس است. با وجود اینکه با واکسیناسیون پونی‌ها (Ponies) و آلودگی تجربی متعاقب آن، ۷۸ درصد محافظت دیده شده است ولی با استفاده از واکسن در اسب‌ها در شرایط طبیعی (مزرعه) محافظت کمی دیده شد. وجود مشکلات در محافظت و عدم موفقیت واکسن را می‌توان به هتروژن بودن آنتی‌ژنی و ژنومی در بین بیش از ۱۴ استرین مختلف از *N. risticii* ایزوله‌شده

References

- 1- Baird JD, Arroyo LG. Historical aspects of Potomac horse fever in Ontario (1924-2010). *Can Vet J.* 2013; 54(6): 565-72.
- 2- Dutra F, Schuch LF, Delucchi E, Curcio BR, Coimbra H, Raffi MB, Dellagostin O, Riet-Correa F. Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 2001; 13(5): 433-7.
- 3- Lawrence SA, Poulin R. Detection of the bacterial endosymbiont Neorickettsia in a New Zealand digenean. *Parasitol Res.* 2001; 115(11): 4275-4279.
- 4- Madigan JE, Pusterla N. Ehrlichial diseases. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2001; 16(3): 487-99.
- 5- Abdigoudarzi, M. Geographical distribution of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Northern parts of Iran, Final Report for Research and Training Deputy of Ministry of Jihad for Agriculture 1997 [in Persian].
- 6- Mulville P. Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever): a review. *Equine Vet J.* 1991; 23(6): 400-4.
- 7- Barlough JE, Reubel GH, Madigan JE, Vredevoe LK, Miller PE, Rikihisa Y. Detection of Ehrlichia risticii, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (Pleuroceridae: Juga spp.) from northern California. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(8): 2888-93.
- 8- Palmer JE, Benson CE. Studies on oral transmission of Potomac horse fever. *J Vet Intern Med.* 1994; 8(2):87-92.
- 9- Murray MJ. Disorders of the stomach and disorders of the large intestine. In Large animal Internal Medicine. (BP Smith, ed.) 2nd edn, pp710-719 and 723-30, Mosby; 1996.

10- Coffman EA, Abd-Eldaim M, Craig LE. Abortion in a horse following *Neorickettsia risticii* infection, *J Vet Diagn Invest.* 2008; 20:827-830

11- Arroyo LG, Moore A, Bedford S, Gomez DE, Teymournejad O, Xiong Q, Budachetri K, Bekebrede H, Rikihisa Y, Baird JD. Potomac horse fever in Ontario: Clinical, geographic, and diagnostic aspects. *Can Vet J.* 2021; 62(6): 622-628

12- Pusterla N, Madigan JE, Chae JS, DeRock E, Johnson E, Pusterla JB. Helminthic transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the

causative agent of Potomac horse fever, by using trematode stages from freshwater stream snails. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(3): 1293-7.

13- Mott J, Rikihisa Y, Zhang Y, Reed SM, Yu CY. Comparison of PCR and culture to the indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of Potomac horse fever. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(9): 2215-2219.

14- Palmer JE. Potomac horse fever, *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1993; 9(2): 399-410.

A review Study on Potomac Horse Fever

Mohammad Abdi-Goudarzi^{1*}, Seyed Jalal Mirian², GholamReza Karimi²

1- Associate Professor, Department of Veterinary Parasitology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.

2- Assistant Professor, Department of Veterinary Parasitology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.

Receive: January 19, 2022; Revise: February 6, 2022; Accept: February 7, 2022

Summary

Potomac Horse Fever (PHF) is an acute enterocolitis syndrome causing mild colic, fever and diarrhea in all life stages in horses. It is also responsible for abortion in pregnant mares. The agent of PHF was diagnosed as *Neorickettsia risticii*. PHF was first diagnosed as a livestock disease, by veterinarians in Maryland State of USA in horses living around Potomac River. Since, most of the cases of disease were recorded in July, August and September, then it was regarded as a seasonal disease. Later studies revealed that a trematode vector takes the role as a vector for transmission. Routine cell culture and PCR were used for clinical diagnosis of the PHF. Using indirect fluorescent antibody tests revealed positive cases in most places of Canada and America, which regarded as former contacts with the agent of disease. *Neorickettsia risticii* could not be seen in monocyte in prepared blood smears from clinical cases of horses and this is contrary to *Anaplasma phagocytophilum* which very easily seen in granulocytes of blood in infected horses. *Neorickettsia risticii* has been isolated from released trematodes from fresh water snails. PHF is not a contagious disease and infected horses could be kept near susceptible horses. PHF is not regarded as a zoonosis. It is concluded that related veterinarians to horse industry in Iran should be informed about the possible occurrence of disease.

Key words: Horse fever, Potomac, Ehrlichia, Neorickettsia

مطالعه هیستوپاتولوژیکی ضایعات ریوی و شناسایی مولکولی پاستورلوز و مایکوپلاسموز در کشتارگاه فریمان

منوچهر حسن‌زاده^۱، سیده آیدا داوری^{۲*}، محسن نجیمی^۲، عباس جمشیدیان^۲

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

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

دریافت مقاله: ۱۰ آذر ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۱ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۹ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

پاستورلوز و مایکوپلاسموز مهم‌ترین بیماری‌های تنفسی باکتریایی هستند که از لحاظ اقتصادی سبب کاهش تولید، کاهش وزن، افزایش میزان مرگ و میر در گله‌های گوسفندان شیری و گوشتی می‌شوند. این مطالعه جهت تعیین خصوصیات هیستوپاتولوژیکی و مولکولی ضایعات ریوی ایجاد شده توسط پاستورلوز و مایکوپلاسموز در گوسفندان کشتار شده در فریمان انجام شد. ۴۹۶۰ ریه از گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه فریمان در سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. ۹۰ ریه از ۴۹۶۰ (۱/۸۱ درصد) که از لحاظ ماکروسکوپی مشکوک به پنومونی بودند بررسی میکروسکوپی شدند. واکنش زنجیره پلیمرز جهت شناسایی مولکولی پاستورلا مولتی‌سیدا/مایکوپلاسمما/وی‌نومونیه انجام شد. همچنین، آنالیز آماری مربع کای انجام شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ آنالیز شدند. آنالیز مولکولی نشان‌دهنده ۱۶ نمونه مثبت پاستورلا مولتی‌سیدا/مایکوپلاسمما/وی‌نومونیه در تمامی نمونه‌ها منفی بود. در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی، متداول‌ترین ضایعه، برونکوپنومونی چرکی بود (۱/۱۶ درصد). به‌علاوه، ارتباط آماری معنی‌داری بین سن، جنس و فصل با پاستورلا مولتی‌سیدا/وی‌نومونیه وجود نداشت ($P > 0/05$). این یافته‌ها آشکار کرد که پاستورلا مولتی‌سیدا یکی از عوامل متداول مسبب پنومونی باکتریایی در گوسفندان کشتار شده در فریمان است و مشخصات هیستوپاتولوژیکی آن قابل توجه می‌باشد.

کلمات کلیدی: پاستورلا مولتی‌سیدا، ریه، گوسفند، مایکوپلاسمما/وی‌نومونیه

مقدمه

میکروارگانیزم‌های عفونی متعددی (باکتری، میکوپلاسما، ویروس‌ها و قارچ‌ها)، در تقابل با سیستم دفاعی بدن میزبان و شرایط محیطی می‌توانند سبب پنومونی شوند (۳). پاستورلا مولتی‌سیدا و میکوپلاسما اوی‌نومونیه دو باکتری مهم و مسبب این بیماری هستند (۱۷). پاستورلا مولتی‌سیدا یک باکتری گرم منفی و فلور نرمال قسمت قدامی دستگاه تنفس گوسفند است که به‌عنوان متداول‌ترین و مهم‌ترین پاتوژن ثانویه مسبب پنومونی در قسمت‌های خلفی دستگاه تنفس نشخوارکنندگان کوچک شناخته شده است (۱۶). یکی از اصلی‌ترین منابع تأمین پروتئین به‌عنوان بخش اصلی رژیم غذایی روزانه انسان، توسط گوسفند و بز مهیا می‌شود. پنومونی‌های پاستورلوزی به علت کاهش تولید شیر و گوشت، حذف لاشه در کشتارگاه، افزایش میزان درگیری و گاهی مرگ و میر به‌خصوص در بره‌های نوزاد، سبب مضرات اقتصادی قابل توجهی برای دامداران می‌شوند (۱۲، ۱۷، ۱۸).

گونه‌های میکوپلاسما باکتری‌های کوچک فاقد دیواره هستند که سبب بیماری‌های تنفسی در اغلب گونه‌های پستانداران و طیور می‌شوند. میکوپلاسما اوی‌نومونیه در نشخوارکنندگان کوچک سبب تورم پستان، آرتريت مفصلی، بیماری‌های دستگاه تولید مثلی و ضایعات چشمی می‌شود (۱۸). این باکتری همچنین می‌تواند شرایط بدن میزبان را جهت تهاجم پاتوژن‌هایی نظیر منهمیا همولایتیکا و پاستورلا مولتی‌سیدا مساعد کند (۲۵). پنومونی‌ها بر اساس مشخصات هیستوپاتولوژیکی و میزان شدت (خفیف تا شدید و حاد تا مزمن)، به پنج دسته طبقه‌بندی می‌شوند: برونکوپنومونی چرکی، برونکوپنومونی فیبری، پنومونی بینابینی، پنومونی آمبولیک و پنومونی گرانولوماتوزی (۲۶). امروزه

روش‌های مولکولی نظیر PCR به علت سرعت، دقت، حساسیت و اختصاصیتی که دارند، به‌عنوان روش‌های قابل اعتماد به صورت گسترده جهت تشخیص عوامل عفونی استفاده می‌شوند و می‌توانند یافته‌های حاصل از روش‌های کیفی نظیر هیستوپاتولوژی را تأیید نمایند (۲۴).

مطالعات فراوانی در رابطه با پنومونی‌های باکتریایی در گوسفند یا توصیف ضایعات پاتولوژیک آنها و تشخیص مولکولی عوامل آنها در ایران و سایر کشورها انجام شده است (۱، ۳، ۶، ۱۱، ۱۲، ۱۷، ۲۰، ۲۲). بیماری پاستورلوز به‌عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام از لحاظ بهداشت عمومی مورد توجه است و می‌تواند در انسان عفونت‌های تحت بالینی، مزمن و حتی حاد ایجاد کند (۱۶). کشتارگاه دام فریمان، به‌عنوان اولین کشتارگاه صنعتی دام در شرق کشور از اهمیت خاصی برخوردار است (<https://gooshtfariman.com>). این کشتارگاه در جاده فریمان، نزدیک به شهرستان فریمان (در ۷۵ کیلومتری مشهد مقدس) و در شمال شرق استان خراسان رضوی واقع شده است و از آب و هوای نیمه‌کوهستانی، که جهت کشاورزی و دامپروری مناسب است، برخوردار می‌باشد. با وجود اهمیت استراتژیک کشتارگاه فریمان و واردات غیر قانونی دام از کشورهای همسایه شرقی ایران (۲۳)، مطالعه و بررسی خاصی در رابطه با پنومونی‌های دامی توسط محققین و دامپزشکان بخش خصوصی در این منطقه صورت نگرفته است. بنابراین، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی مشخصات ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژی ضایعات ریوی همراه با تشخیص مولکولی پاستورلوز و میکوپلاسماوز در گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه صنعتی فریمان انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در مطالعه حاضر، از ۴۹۶۰ گوسفند نر و ماده از تمامی گروه‌های سنی و

کشتارگاهی مطابقت داده شود. نتایج ماکروسکوپیکی و میکروسکوپیکی در جداول جداگانه‌ای به ثبت رسیدند که در قسمت نتایج آورده شده است.

روش استخراج DNA و واکنش زنجیره پلیمرز (PCR): DNA از نمونه‌های فریز شده توسط کیت تجاری سیناژن (DNPTM, CinnaGen Co., Iran) طبق دستورالعمل کیت مذکور استخراج و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. توالی ژن KMT1 توسط روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (5'-KMT1T7: ATCCGCGATTTACCCAGTGG-3' و KMTSP6: 5'-GCTGTA AACGAACTCGCCAC-3' بر اساس پژوهش‌های قبلی (۱۲)، جهت شناسایی پاستورلا مولتی‌سیدا تکثیر شد. PCR در حجم نهایی ۱۵ μl شامل ۲ μl از DNA استخراج شده، بافر ۱x، mM ۰.۳، از dNTP، mM 1.5 از MgCl₂، μl ۱۱۰ Pmo و هر آغازگر و یک واحد Taq DNA پلیمرز تهیه شد. برنامه PCR به صورت ۳۵ چرخه شامل: ۹۴ °C به مدت یک دقیقه (جداسازی اولیه دو رشته)، ۹۴ °C به مدت دو دقیقه (جداسازی دو رشته)، ۵۵ °C به مدت ۵۴ ثانیه (اتصال پرایمرها)، ۷۲ °C به مدت ۱/۵ دقیقه (تکثیر رشته‌ها) برای دستگاه ترموسایکلر انتخاب شد. پس از اتمام چرخه‌ها، یک تکثیر نهایی در ۷۲ °C به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت.

شناسایی توالی‌های ژن ۱۶S rRNA اختصاصی مایکوپلازما/وی‌نومونیه توسط روش PCR و با استفاده از آغازگرهای LMF1 (5'-TGAACGGAATATGTTAGCTT-3' و LMR1 (5'-GACTTCATCCTGCACTCTGT-3') بر اساس پژوهش‌های قبلی صورت گرفت (۴). برنامه PCR به صورت ۳۰ چرخه حرارتی شامل: ۹۴ °C به مدت پنج دقیقه (جداسازی دو رشته)، ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال پرایمرها)، ۷۲ °C به مدت ۵۰

نژادهای مخلوط ارجاعی به کشتارگاه صنعتی فریمان به صورت تصادفی در طول سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ استفاده شد. مراحل مراجعه به کشتارگاه و جمع‌آوری نمونه‌ها در هر چهار فصل سال در بازه زمانی مذکور انجام گرفت. از مجموع ۴۹۶۰ ریه مورد بررسی، از ۹۰ بافت ریه که در بررسی ماکروسکوپی به پنومونی باکتریایی مشکوک بودند جهت بررسی هیستوپاتولوژی و مولکولی نمونه‌برداری شد. هر نمونه با حفظ مشخصات میزبان، به دو قسمت تقسیم گردیده، نیمی از آن جهت بررسی پاتولوژیک در فرمالین بافر ۱۰ درصد و نیمی دیگر جهت بررسی مولکولی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل قرار گرفت. نمونه‌های فریز شده جهت استخراج DNA توسط نیتروژن مایع به صورت پودر ریز و یکدست در آمدند.

ارزیابی هیستوپاتولوژیکی: نمونه‌های بافتی تازه با ابعاد ۵/۱×۱×۱ سانتی‌متر از ۹۰ گوسفند مشکوک به پنومونی در بررسی‌های ماکروسکوپیکی کشتارگاهی، بلافاصله در فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت شدند و جهت تثبیت بهتر، فرمالین نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت تعویض گردید. پس از انجام مراحل روتین تهیه بافت (آگیری با اتانول، شفاف‌سازی با زایلن، آغشتگی و قالب‌گیری در پارافین مذاب) توسط دستگاه اتوتکنیکون، برش‌های بافتی با ضخامت میانگین ۵ میکرومتر توسط میکروتوم روتاری در آزمایشگاه هیستوپاتولوژی تهیه و طبق روش متداول رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ شدند. اسلایدهای حاصله توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و ضایعات موجود در هر اسلاید به صورت جداگانه ثبت و عکس‌برداری شد تا با مشخصات ماکروسکوپیکی بافت‌ها در بررسی

ثانیه (تکثیر رشته‌ها) و در نهایت، یک تکثیر نهایی در 72°C به مدت ۱۰ دقیقه برای دستگاه ترموسایکلر انتخاب شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برومید جداسازی و زیر نور فرابنفش مشاهده شدند.

آنالیز آماری: ارتباط متغیرهای مستقل (فصل نمونه‌گیری، سن و جنس گوسفندان) با متغیرهای وابسته (آلودگی با باکتری‌های مذکور در مطالعه حاضر) توسط آزمون مربع کای بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت. سطح معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر

گرفته شد.

نتایج

یافته‌های ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژی:

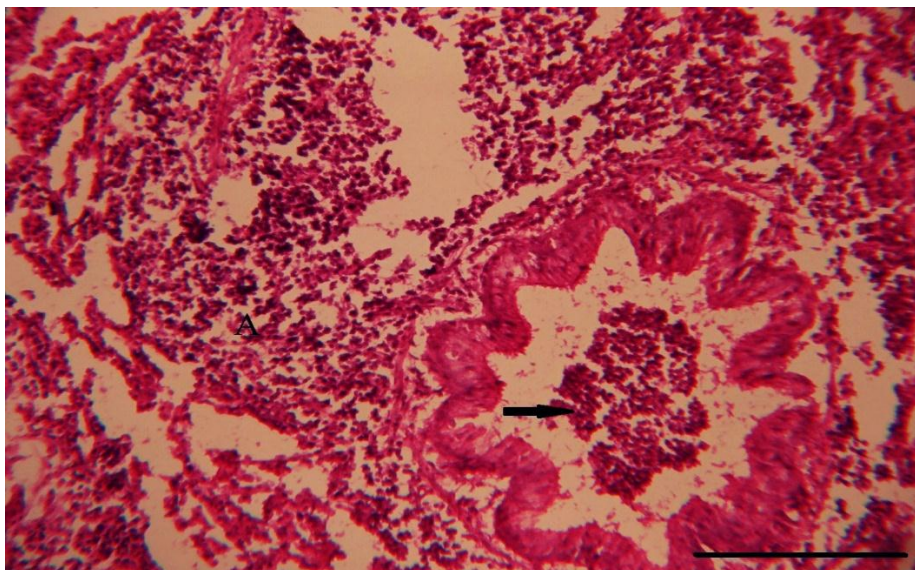
از مجموع ۴۹۶۰ ریه گوسفند مورد بررسی در کشتارگاه صنعتی فریمان، ۱۸۴ مورد (۳/۶۸ درصد) در مشاهده و ملامسه دارای ضایعات ماکروسکوپی (با چشم غیر مسلح) بودند. از این بین، سفت‌شدگی ریه (لاستیکی و گوشتی شدن قوام ریه) (۴۰ مورد، ۰/۱۸ درصد) و کیست هیداتید (۳۲ مورد، ۰/۶۴ درصد) بیشترین موارد مشاهده شده را تشکیل دادند. نحوه توزیع ماکروسکوپی ضایعات ریوی در مطالعه حاضر در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- توزیع فراوانی ضایعات ماکروسکوپی ریه‌های گوسفندان کشتار شده مشکوک به پنومونی در کشتارگاه صنعتی فریمان

| ردیف | ضایعات ماکروسکوپی | فراوانی مطلق (تعداد) | فراوانی نسبی (درصد) | فراوانی نسبی در کل ریه‌ها (درصد) |
|------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------------------|
| ۱ | سفت‌شدگی | ۴۰ | ۲۱/۷۴ | ۰/۱۸ |
| ۲ | کیست هیداتید | ۳۲ | ۱۷/۴۰ | ۰/۶۴ |
| ۳ | پرخونی/خونریزی | ۲۳ | ۱۲/۵ | ۰/۴۶ |
| ۴ | چسبندگی و مرمری شدن | ۲۲ | ۱۱/۹۵ | ۰/۴۴ |
| ۵ | ترشحات چرکی در مجاری | ۱۹ | ۱۰/۳۳ | ۰/۳۸ |
| ۶ | رنگ پریدگی | ۱۸ | ۹/۷۸ | ۰/۳۶ |
| ۷ | اتساع مجاری | ۱۵ | ۸/۱۵ | ۰/۳۰ |
| ۸ | آبسه ریوی | ۸ | ۴/۳۵ | ۰/۱۶ |
| ۹ | تورم بافتی | ۷ | ۳/۸۰ | ۰/۱۴ |
| | مجموع | ۱۸۴ | ۱۰۰ | ۳/۶۸ |

مشخصات ماکروسکوپی این ریه‌ها بود. نفوذ نوتروفیل‌ها به لومن برونشیول‌ها (برونشیولیت) و برونش (برونشیت) و فضاهای بین آلوئولی (شکل ۱)، و نیز وجود خونریزی در موارد حادث از مشخصات میکروسکوپی ریه‌های مبتلا به برونکوپنومونی چرکی بود.

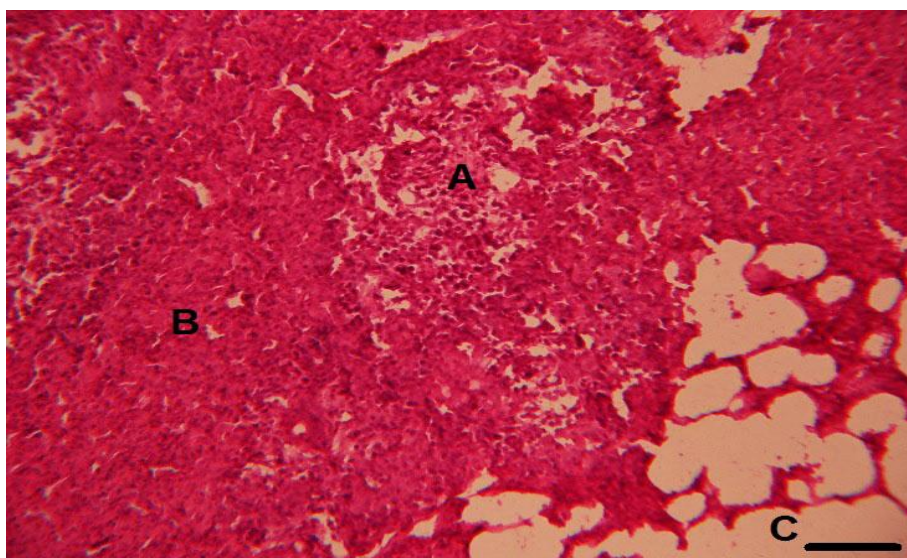
در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی، مجموع ۲۰۲ ضایعه مشاهده شد که فراوان‌ترین پنومونی ایجاد شده از نوع برونکوپنومونی چرکی بود (۵۸/۲۰۲ مورد، ۲۸/۷۲ درصد) (جدول ۲). سفت‌شدگی نامنظم لب‌لار به‌خصوص در لوب‌های قدامی و شکمی، هیپرمی، تجمع چرک در برونش و برونشیول‌ها، اتساع برونشیول‌ها و تورم بافت ریه از



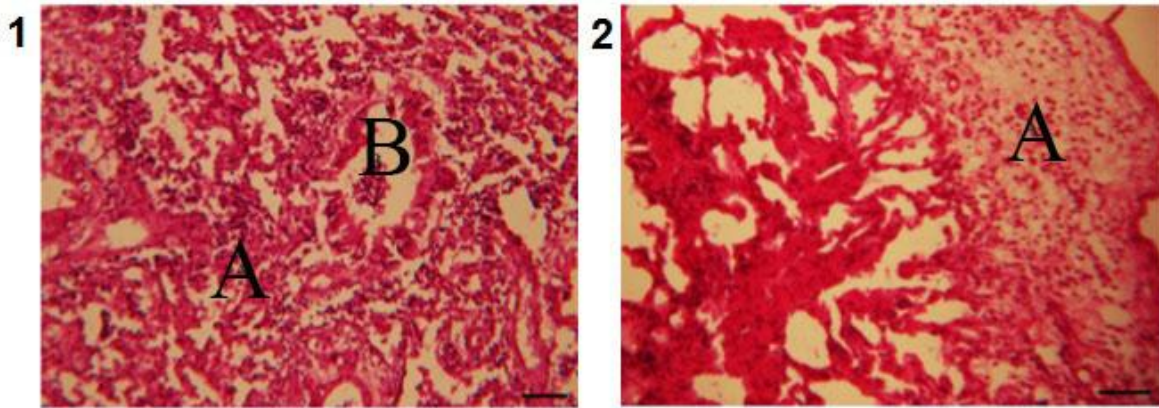
شکل ۱- برونکوپنومونی چرکی همراه با نفوذ نوتروفیل‌ها به داخل برونشیول (فلش) و فضاهای آلوئولی (A) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین، مقیاس = $140\mu\text{m}$)

۴/۹۵ درصد از ریه‌های گوسفندان درگیر ضایعات میکروسکوپی مشاهده شد (۱۰/۲۰۲). چسبندگی پلورا به پارانشیم ریه، در برخی موارد قوام سخت پارانشیم و ظاهر مرمری سطح ریه از مشخصات اصلی این پنومونی در بررسی ظاهری بود. در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی نیز، چسبندگی پلورا به پارانشیم توسط ترشح فیبرین و نفوذ نوتروفیل‌ها به لومن برونشیول‌ها از مشخصات بارز این پنومونی بود (شکل ۳).

آبسه‌های ریوی (۱۵/۲۰۲، ۷/۴۲ درصد) با اندازه‌های مختلف (۵-۱ سانتی‌متر) حاوی چرک مایل به زردرنگ بدون بو به صورت چند کانونی و اغلب در لوب دیافراگماتیک مشاهده شدند. پنومونی بینابینی در ده ریه بزرگ و رنگ پریده مشاهده شد (۱۰/۲۰۲ مورد، ۴/۹۵ درصد)، که در بررسی هیستوپاتولوژیکی دچار نفوذ منتشره سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای به پارانشیم ریه، اتلکتازی و آمفیزم بودند (شکل ۲). برونکوپنومونی فیبرینی در



شکل ۲- پنومونی بینابینی همراه با نفوذ سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای به پارانشیم ریه (A)، اتلکتازی (B) و آمفیزم (C) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین، مقیاس = $50\mu\text{m}$)



شکل ۳- برونکوپنومونی فیبری. (۱): نفوذ نوتروفیل‌ها به فضاهای بین آلوئولی (A) و برونشیول (B) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، مقیاس = ۷۰µm)، (۲): رسوب فیبرین روی پرده جنب (A) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، مقیاس = ۶۰µm)

| ردیف | ضایعات میکروسکوپی | فراوانی مطلق (تعداد) | درصد فراوانی به کل ریه‌ها | درصد فراوانی نسبت به دیگر ضایعات |
|------|-----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|
| ۱ | برونکوپنومونی چرکی | ۵۸ | ۱/۱۶ | ۲۸/۷۲ |
| ۲ | اتلکتازی | ۲۴ | ۰/۴۸ | ۱۱/۸۹ |
| ۳ | کیست هیداتید | ۲۳ | ۰/۴۶ | ۱۱/۳۹ |
| ۴ | هیپرمی | ۱۵ | ۰/۳۰ | ۷/۴۲ |
| ۵ | آبسه ریوی | ۱۵ | ۰/۳۰ | ۷/۴۲ |
| ۶ | برونشیولیت | ۱۴ | ۰/۲۸ | ۶/۹۴ |
| ۷ | پنومونی بینابینی | ۱۰ | ۰/۲۰ | ۴/۹۵ |
| ۸ | برونکوپنومونی فیبرینی | ۱۰ | ۰/۲۰ | ۴/۹۵ |
| ۹ | پنومونی کرمی | ۷ | ۰/۱۴ | ۳/۴۶ |
| ۱۰ | برونشیت | ۷ | ۰/۱۴ | ۳/۴۶ |
| ۱۱ | آمفیزم | ۷ | ۰/۱۴ | ۳/۴۶ |
| ۱۲ | خونریزی | ۶ | ۰/۱۲ | ۲/۹۷ |
| ۱۳ | کلسیفیکاسیون | ۶ | ۰/۱۲ | ۲/۹۷ |
| | مجموع | ۲۰۲ | ۴/۰۴ | ۱۰۰ |

جدول ۲- توزیع ضایعات ریوی میکروسکوپی در گوسفندان مشکوک به پنومونی کشتار شده در کشتارگاه صنعتی فریمان

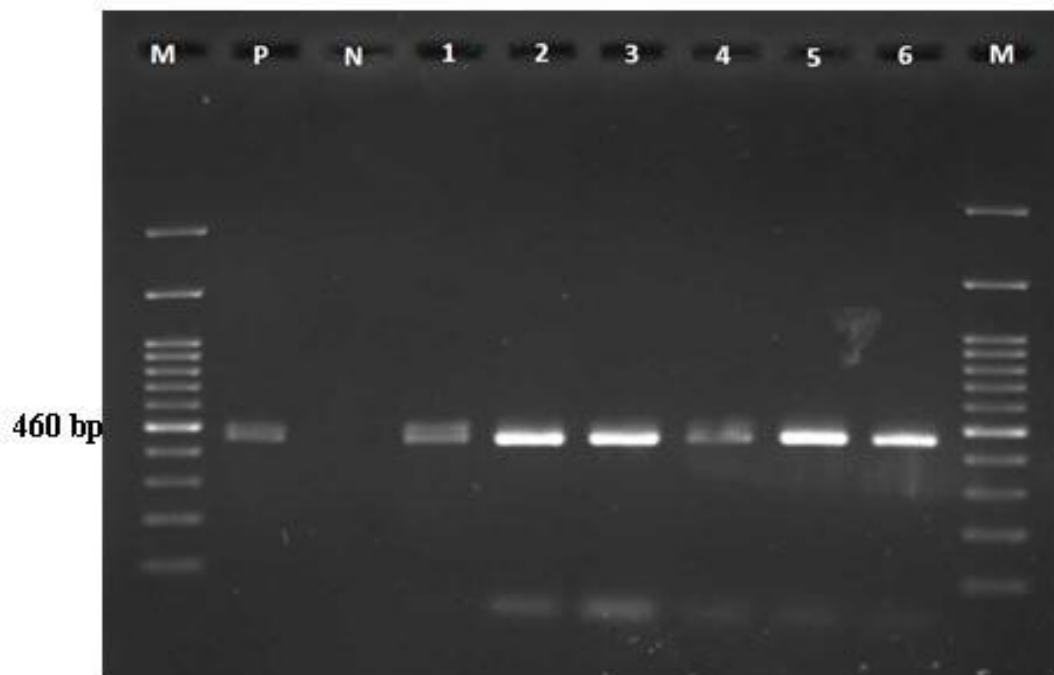
از واکنش PCR به دست آمد (شکل ۴). توزیع فصلی این نمونه‌های مثبت در طول بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۳، ۲، ۵ و ۶ مورد بود. برونکوپنومونی چرکی، هیپرمی، خونریزی، اتلکتازی

نتایج مولکولی و آماری: پاستورلا مولتی‌سیدا از ۱۷/۷۷ درصد (مورد ۱۶/۹۰) از ریه‌های مشکوک به پنومونی باکتریایی جدا شد. محصولات تکثیر شده از ژن اختصاصی این باکتری با ردیف ۴۶۰ bp

مطالعه هیستوپاتولوژیکی ضایعات ریوی و شناسایی مولکولی پاستورلوز و ...

فراوانی آن صفر بود. آنالیز آماری نشان داد که هیچ ارتباط آماری معنی‌داری بین ریه‌های مبتلا به پاستورلا مولتی‌سیدا و متغیرهای مستقل (سن، جنس و فصل) وجود ندارد (جدول ۳).

و آمفیژم، برونشیت و برونشیولیت، آبسه‌های ریوی و کیست هیداتید از جمله ضایعات مختلف مشاهده‌شده در این ریه‌ها در بررسی هیستوپاتولوژیک بودند. در حالی که مایکوپلازما اوی‌نومونیه از هیچ‌کدام از نمونه‌ها جداسازی نشد و



شکل ۴- نتایج الکتروفورز در ژل برای شناسایی پاستورلا مولتی‌سیدا. M: سایز مارکر DNA، چاهک P: کنترل مثبت، چاهک N: کنترل منفی، چاهک‌های ۱-۶: نمونه‌های مثبت

جدول ۳- شیوع عامل پاستورلا مولتی‌سیدا به تفکیک سن، جنسیت و فصل در گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه صنعتی فریمان

| سطح معنی‌داری آماری $P < 0,05$ | آزمون مربع کای | تعداد نمونه منفی | تعداد نمونه مثبت | تعداد کل نمونه‌ها | سطوح | متغیرها |
|-----------------------------------|----------------|------------------|------------------|-------------------|--------------|---------|
| $(P=0,370)$ | ۳/۱۴۱ | ۱۹ | ۳ | ۲۲ | بهار | فصل |
| | | ۲۱ | ۲ | ۲۳ | تابستان | |
| | | ۱۷ | ۵ | ۲۲ | پاییز | |
| | | ۱۷ | ۶ | ۲۳ | زمستان | |
| $(P=0,418)$ | ۰/۶۵۷ | ۳۶ | ۶ | ۴۲ | زیر دو سال | سن |
| | | ۳۸ | ۱۰ | ۴۸ | بالای دو سال | |
| $(P=0,454)$ | ۰/۵۶۰ | ۴۰ | ۷ | ۴۷ | نر | جنسیت |
| | | ۳۴ | ۹ | ۴۳ | ماده | |

نتایج مولکولی پژوهش حاضر نشان داد که

بحث و نتیجه‌گیری

۱۷/۷۷ درصد (۱۶/۹۰ مورد) از ریه‌های مشکوک به پنومونی باکتریایی در گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه صنعتی فریمان آلوده به پاستورلا مولتی‌سیدا هستند ولی نمونه آلوده به مایکوپلازما اوی‌نومونیه وجود نداشت. در پژوهشی که جهت جستجوی پاستورلا مولتی‌سیدا در ریه ۵۰۰ گوسفند مبتلا به پنومونی در کشتارگاه کاشان انجام گرفت، میزان آلودگی ۰/۶ درصد اعلام شد و آب و هوای گرم و خشک این منطقه و نیز درمان آنتی‌بیوتیکی زیاد جهت پیشگیری از پنومونی، علت فراوانی پایین پاستورلوز بیان گردید (۹). در پژوهشی دیگر که بر روی ۲۸۲ ریه گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه زیاران استان تهران انجام گرفت، آلودگی پاستورلایی ۴۲/۵ درصد اعلام شد که در مقایسه با مطالعه حاضر بیشتر بود. استرس حمل و نقل و کاهش سطح ایمنی از علل اصلی فراوانی زیاد در این مطالعه اعلام شد (۱۲). در یک مطالعه که به منظور بررسی میکروبی و هیستوپاتولوژی بر روی ۱۳۳۵ بره با سن کمتر از ۶ ماه در نیجریه انجام شد، ۱۲۶ مورد (۹/۴ درصد) آلوده به پاستورلا مولتی‌سیدا بودند (۱۹). دلیل فراوانی پایین این باکتری نسبت به مطالعه حاضر سن کم بره‌ها و آب و هوای گرم منطقه می‌باشد. در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی در گوسفندان با سن بالای دو سال بود. در مطالعه‌ای که در مزارع پرورش گوسفند اسپانیا انجام شد، تأثیر عوامل طبیعی بر ایجاد پنومونی مورد بررسی قرار گرفت که از ۱۰۵۴ دام دچار بیماری تنفسی، پاستورلا مولتی‌سیدا از ۱۴ مورد (۱/۳۲ درصد) و گونه‌های مایکوپلازما از ۲۸ مورد (۲/۶۵ درصد) جدا شدند. در این مطالعه پنج عامل طبیعی باد، تغییرات فصلی، تغییرات دمایی، ایجاد شبنم در پوشش گیاهی و بارندگی از مهم‌ترین عوامل ایجاد پنومونی عنوان شد (۱۵). در مطالعه حاضر فراوانی نسبی پاستورلا مولتی‌سیدا ۰/۰۳۲ درصد

۱۶/۴۹۶۰ مورد) بود که آن هم می‌تواند به دلیل آب و هوای سرد، صنعتی بودن منطقه فریمان و ورود بی‌رویه دام قاچاق باشد. در مطالعه حاضر ارتباط آماری معنی‌داری بین شیوع آلودگی به پاستورلا مولتی‌سیدا و متغیر فصل وجود نداشت اما طبق نتایج، در نیمسال اول این مطالعه (بهار و تابستان) که در منطقه فریمان تغییرات هوایی به نسبت کمتر و هوا معتدل‌تر می‌باشد شیوع پاستورلا مولتی‌سیدا ۵ مورد (۱۱/۱ درصد) و در نیمسال دوم (پاییز و زمستان) ۱۱ مورد (۲۴/۴ درصد) بود. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۴ در اتیوپی انجام شد از ۹۵۲ نمونه سرمی گوسفندان با علائم ظاهری پنومونی ۱۶/۸ درصد نمونه‌ها با آزمایشات سرولوژی از لحاظ آلودگی به پاستورلا مولتی‌سیدا مثبت اعلام شد. بیشترین درگیری در فصل تابستان (۶۴ درصد) و کمترین درگیری در فصل زمستان (۱/۹ درصد) اعلام شد (۲). در پژوهش Ezzi و همکاران (۲۰۰۷)، شیوع پاستورلوز در بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۱/۷۴ درصد، ۲/۵۵ درصد، ۰/۱۲ درصد و ۱/۰۲ درصد گزارش شد (۱۲). اگرچه در مطالعه فوق بر خلاف پژوهش حاضر میزان فراوانی پاستورلوز در فصل تابستان بیشتر بود، اما همسو با مطالعه حاضر نشان‌دهنده عدم وجود ارتباط آماری معنی‌دار بین این بیماری و فصل نمونه‌گیری بودند. همان‌طور که از نتایج مطالعه حاضر بر می‌آید، بین شیوع پاستورلا مولتی‌سیدا و جنسیت گوسفندان کشتار شده رابطه آماری معنی‌داری وجود نداشت. شیوع عامل مذکور ۷ مورد (۱۴/۹ درصد) در جنس نر و ۹ مورد (۲۰/۹ درصد) در جنس ماده بود. همچنین بین شیوع عامل پاستورلا مولتی‌سیدا با سن گوسفندان کشتار شده نیز ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت. در این مطالعه شیوع آلودگی گوسفندان بالای دو سال ۱۰ مورد (۲۰/۸ درصد) و شیوع آلودگی گوسفندان زیر دو سال ۶

مورد (۱۴/۳) درصد) بود. برآیند نتایج مربوط به سن و جنس دام‌های کشتار شده آلوده به پاستورلا مولتی‌سیدا/ نشان می‌دهد عامل مذکور بیشتر دام‌های ماده بالای دو سال را درگیر می‌کند. یکی از دلایل افزایش پنومونی پاستورلوزی در جنس ماده بالای دو سال را می‌توان نگهداری این دام‌ها در خارج از دامداری‌ها و تغذیه با کیفیت کم در چرای آزاد بیان کرد. در مطالعه عزیزی و همکاران بر روی ۱۰۰۰ لاشه مشکوک به پنومونی در جنوب غرب ایران پنومونی پاستورلوزی با شیوع ۲۴/۵۲ درصد بیشترین شیوع پنومونی میکروبی را به خود اختصاص داد. استرس ناشی از فاکتورهای انگلی و ویروسی علل اصلی ایجاد پنومونی پاستورلایبی در این مطالعه اعلام شد (۳). در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه فوق، شیوع پاستورلوز کمتر بود ولی مشابه با این مطالعه، در پژوهش حاضر نیز مواردی از آلودگی‌های انگلی نظیر هیداتیدوزیس همراه با پاستورلوز وجود داشت.

بر خلاف گزارشات وجود پنومونی ناشی از مایکوپلاسما/ اوی‌نومونیه در گوسفندان کشتار شده در مناطق مختلف ایران و جهان (۶، ۱۷، ۲۰، ۲۱، ۲۵)، در پژوهش حاضر این باکتری از هیچ‌کدام از نمونه‌ها جدا نشد.

در بررسی ماکروسکوپیکی ضایعات ریوی در مطالعه حاضر، فراوانی ریه‌های ضایعه‌دار نسبت به کل ریه‌ها ۳/۶۸ درصد بود که این فراوانی نسبت به مطالعات مشابه انجام شده در اهواز، بیشتر و در مقایسه با ارومیه کمتر بود (۱، ۱۱). علت این تفاوت را می‌توان تأثیر شرایط آب و هوایی بر میزان ضایعات ریوی دانست که منطقه فریمان در مقایسه با اهواز آب و هوای سردتر و کوهستانی و در مقایسه با ارومیه آب و هوای گرم‌تر دارد. در مطالعات صورت گرفته در خارج از کشور نیز فراوانی ضایعات ریوی گوسفندان ضبط شده در اتیوپی و ترکیه به‌ترتیب

۴۴/۵ درصد و ۳۵/۴۰ درصد اعلام شد (۱۰، ۱۳). در پژوهش حاضر، سفت‌شدگی، کیست هیداتید، پرخونی، چسبندگی و مرمری شدن ریه‌ها نسبت به دیگر ضایعات بیشترین فراوانی را در بررسی ماکروسکوپی به خود اختصاص دادند. در مطالعات اسماعیل‌زاده و همکاران و نیز عراقی‌سوره و همکاران، کیست هیداتید، بیشترین درصد فراوانی در بین ضایعات ریوی را داشتند (۱، ۱۱)، که نسبتاً مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. از علل فراوانی قابل توجه کیست هیداتید در پژوهش حاضر می‌توان به سنتی بودن دامداری‌های منطقه فریمان و نیز همجواری سگ‌های نگهبان با دام‌ها در شرایط غیر بهداشتی اشاره نمود. در بررسی هیستوپاتولوژی در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی ضایعات مربوط به برونکوپنومونی چرکی بود که به نظر می‌رسد استرس ناشی از تغییرات آب و هوایی منطقه، صنعتی بودن شهرستان فریمان و متعاقباً وجود گازهای گلخانه‌ای، همچنین انتخاب ریه‌هایی با ظاهر پنومونی باکتریایی از دلایل افزایش فراوانی این ضایعه نسبت به سایر ضایعات باشد. در مطالعه پاتولوژیکی، باکتریولوژیکی و انگل‌شناسی در کشتارگاه اهواز، پنومونی بینابینی در مقام اول و برونکوپنومونی در مقام هفتم قرار گرفت که با مطالعه حاضر همخوانی نداشت. ویروس‌ها و گازهای گلخانه‌ای علت افزایش پنومونی بینابینی در این مطالعه اعلام شد (۱۱). در پژوهشی که در شهرکرد توسط کریمی و محمدنیا انجام شد (۱۴)، مشابه با مطالعه حاضر برونکوپنومونی چرکی بیشترین فراوانی را داشت و یکی از دلایل افزایش برونکوپنومونی چرکی در این مطالعه اعلام شد. در آب و هوای سرد منطقه مذکور اعلام شد. در مطالعه پاتولوژیکی و باکتریولوژیکی پنومونی در بره‌ها در ترکیه، پنومونی فیبرینی، پنومونی بینابینی و برونکوپنومونی فیبرینی بیشترین فراوانی را داشتند و

بهداشت عمومی مورد توجه است و می‌تواند در انسان عفونت‌های تحت‌بالینی، مزمن و حتی حاد ایجاد کند. با توجه به وضعیت بهداشتی ضعیف دامداری‌های سنتی منطقه فریمان و ورود غیر قانونی دام به این منطقه، لزوم توجه بیشتر و اقدامات بهداشتی گسترده جهت پیشگیری از این بیماری در این منطقه وجود دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از پرسنل محترم کشتارگاه فریمان، کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل و نیز از جناب آقای دکتر داریوش سعادت‌بی‌داری بابت همکاری بی‌دریغشان کمال تشکر را دارند. بودجه این تحقیق به صورت مشترک توسط دانشگاه زابل (No.UOZ_GR_9517_87) و نویسندگان تامین گردید.

References

1- Araghi-Sooreh A, Hoseinzad-Nazlu M, Nassiry M. Study on the prevalence of pulmonary lesions of slaughtered sheep at Urmia abattoir. *Veterinary Clinical Pathology*. 2013; 7(27): 229-38. [In Persian]

2- Ayelet G, Yigezu L, Gelaye E, Tariku S, Asmare K. Epidemiologic and serologic investigation of multifactorial respiratory disease of sheep in the central highland of Ethiopia. *Intern J Appl Res Vet Med*. 2004; 2(4): 274-8.

3- Azizi SH, Oryan A, Shahrani K. Pneumonia in slaughtered sheep in south-western Iran: pathological characteristics and aerobic bacterial aetiology. *Vet Ital*. 2013; 49(1): 109-18.

4- Besser TE, Cassirer EF, Potter KA, VanderSchalie J, Fischer A, Knowles DP, et al., Association of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection with population-limiting respiratory disease in free-ranging Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). *J Clin Microbiol*. 2008; 46(2): 423-30.

5- Chen Y, He H, Pan P, He S, Dong X, Chen Y, et al., Rapid and combined detection of *Mycoplasma pneumoniae*, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus using AllGlo quadruplex quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2016; 65(7): 590-5.

دلیل افزایش ضایعات پنومونی، سطح پایین بهداشت و فقدان سیستم‌های صنعتی اصلاح نژاد کافی عنوان شد (۱۰)، که از این لحاظ با مطالعه حاضر همخوانی داشت.

نتایج مولکولی مطالعه حاضر نشان داد که پاستورلا مولتی‌سیدا/ یکی از عوامل متداول پنومونی‌های باکتریایی در منطقه فریمان می‌باشد. در بین مشاهدات ماکروسکوپی، سفت‌شدگی ریه و کیست هیداتید نسبت به ضایعات دیگر فراوانی بیشتری داشتند و در مطالعه هیستوپاتولوژی نیز برونکوپنومونی چرکی (در اثر پنومونی پاستورلوزی) نسبت به سایر ضایعات بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. بنابراین نتایج مولکولی، نتایج هیستوپاتولوژی را تأیید نمود. بیماری پاستورلوز به‌عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام از لحاظ

6- Dae AA, Khodakaram-Tafti A, Derakhshandeh A, Seyedin M. Identification of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in sheep with pneumonia in North East of Iran. *Iran J Vet Res*. 2020; 21(1): 15-9.

7- Danesh-Lari S, Tahamtan Y, Hayati M, Kargar M. Rapid and simultaneous identity of virulence factors and capsular typing of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats by Multiplex PCR. *Journal of Microbial World*. 2010; 3(3): 162-8. [In Persian]

8- De Alwis MC. Haemorrhagic septicaemia--a general review. *Br Vet J*. 1992; 148(2): 99-112.

9- Ebrahimi A, Halajifar M, Ataei S, Lotfalian S. Investigation of *Pasteurella multocida* in sheep pneumonic lesions of Kashan abattoir. *IJVCS*. 2010; 4(1): 29-32. [In Persian]

10- Ertan O. The pathologic and bacteriologic comparison of pneumonia in lambs. *Turk J Vet Anim Sci*. 2005; 30(6): 593-9.

11- Esmailzadeh S, Sabbagh A, Mohammadiyan B, Alborzi A, Ghorbanpour M, Pourmahdi M. Study on the prevalence of pulmonary lesions of slaughtered sheep at Ahvaz abattoir. *Iranian Veterinary Journal*. 2011; 9(4): 14-24. [In Persian]

- 12- Ezzi A, Moradi bidhendi S, Jabbari AR.** Survey on pneumonic pasteurellosis in slaughtered sheep and goats at the Ziaran abattoir. *Archives of Razi Institute*. 2017; 62(4): 235-9.
- 13- Jibat T, Ejeta G, Asfaw Y, Wudie A.** Causes of abattoir condemnation in apparently healthy slaughtered sheep and goats at HELMEX abattoir, Debre Zeit, Ethiopia. *Rev Med Vet*. 2008; 159(5): 305-11.
- 14- Karimi I, Mohammadnia AR.** Slaughter of sheep's lung lesions in Shahrekord. *Pajouhesh-Va-Sazandegi*. 2003; 16(1): 78-81. [In Persian]
- 15- Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, Gonzalez JM, De Las Heras M.** Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. *Small Rumin Res*. 2008; 80(1-3): 28-32.
- 16- Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER.** Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(12): 3035-9.
- 17- McAuliffe L, Hatchell FM, Ayling RD, King AI, Nicholas, RA.** Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in *Pasteurella*-vaccinated sheep flocks with respiratory disease in England. *Vet Rec*. 2003; 153: 687-8.
- 18- Nicholas RAJ.** Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin Res*. 2002; 45(2): 145-9.
- 19- Odugbo MO, Odama LE, Umoh JU, Lamorde AG.** *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: prevalence, clinical and pathological studies. *Small Rumin Res*. 2005; 66(1-3): 273-7.
- 20- Rong G, Zhao JM, Hou GY, Zhou HL.** Seroprevalence and molecular detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in goats in tropical China. *Trop Anim Health Prod*. 2014; 46(8): 1491-5.
- 21- Sasani F, Raisi A, Moghadam M.** Interstitial pneumonia in slaughtered sheep of Tehran province. *Journal of Comparative Pathobiology*. 2006; 3(2): 513-8. [In Persian]
- 22- Shayegh J, Sharaf J, Mikaili P, Namvar H.** Pheno-and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8(16): 3707-10.
- 23- Taya A, Afzali A, Moosavi nezhad SM.** Socio-economic impact of illegal livestock entry on the eastern border provinces, 3rd national conference on combating desertification and sustainable development of Iran Desert Wetlands (Relying on Meighan Desert Wetland); 2012-09-15; Islamic Azad University of Arak, Iran: <https://civilica.com/doc/223406>; 2012. [In Persian]
- 24- Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S.** Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol*. 2009; 40(1): 1-11.
- 25- Weiser GC, Drew ML, Cassirer EF, Ward AC.** Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *M. arginini* in bighorn sheep using enrichment culture coupled with genus- and species-specific polymerase chain reaction. *J Wildl Dis*. 2012; 48(2): 449-53.
- 26- Yang F, Dao X, Rodriguez-Palacios A, Feng X, Tang C, Yang X, et al.,** A real-time PCR for detection and quantification of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *J Vet Med Sci*. 2014; 76(12): 1631-4.
- 27- Zachary JF, McGavin MD.** Pathologic basis of veterinary disease. 5th ed. Mosby: St Louis; 2011, P: 495-504.

Histopathological study of pulmonary lesions and molecular detection of pasteurellosis and mycoplasmosis in Fariman slaughter house

Manoochehr Hasanzadeh¹, Seyedeh Aida Davari^{*2}, Mohsen Najimi², Abbas Jamshidian²

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

2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: December 1, 2021; Revise: January 31, 2022; Accept: February 28, 2022

Summary

The most economically significant bacterial pneumonias are pasteurellosis and mycoplasmosis as causative agents of reduction in production, weight loss, increasing mortality rates in dairy and fattening sheep herds. This study was conducted to determine the histopathological and molecular properties of lung lesions caused by pasteurellosis and mycoplasmosis in slaughtered sheep at Fariman. A total of 4960 lungs were collected from sheep slaughtered at Fariman abattoir in 2019-2020. 90 of 4960 (1.81%) lungs which were macroscopically suspected to be suffering from pneumonia were examined microscopically. The polymerase chain reaction test was carried out for molecular detection of *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma ovipneumonia*. Furthermore, statistical analysis was performed using the Chi-square test and the data were analyzed by SPSS software version 20. The molecular analysis showed that 16 specimens (0.032%) were positive for *P. multocida*, but *M. ovipneumonia* was negative in all specimens. In the histopathological investigation, the most common lesion was suppurative bronchopneumonia (1.16%). In addition, there was no significant association between age, sex and season with *P. multocida* ($P>0.05$). These findings revealed that *P. multocida* is one of the common cause of bacterial pneumonia in slaughtered sheep at Fariman and its histopathological characteristics are notable.

Key words: *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma ovipneumonia*, Lung, Sheep

بررسی مقایسه اثر اسانس اوژنول با مترونیدازول بر تک‌یاخته تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاه

محمدامین ترابی^{۱*}، فرانک شریفی^۲، پریسا روشن‌میرام کندری^۱

۱- دانشجوی دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲- دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۴ دی ۱۴۰۰، بازنگری: ۵ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۷ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

تریکوموناس گالینه یک انگل تاژک‌دار مخصوص حیوانات خون‌گرم است که منحصراً در پرندگان یافت می‌شود و بیشتر در کبوتر و قمری وجود دارد. همچنین ممکن است پرندگان دیگر نیز آلوده شوند. در این مطالعه پس از نمونه‌برداری از چینه‌دان کبوترها، انگل‌ها در محیط دیاموند برات کشت داده شدند. پس از کشت انگل، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور نگهداری شدند تا تعداد تک‌یاخته به حدود ۱۰۰۰۰ انگل در هر میلی‌لیتر محیط کشت رسید. سپس در هشت گروه شامل یک شاهد و هفت تیمار (یک گروه مترونیدازول و شش تیمار اسانس اوژنول) طبق دوزهای ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ایجاد رقت‌های مورد نظر به محیط کشت از اوژنول استفاده شد. پس از قرار دادن میکروپلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه در بازه‌های زمانی مورد نظر (۱، ۲، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) پس از کشت مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر چاهک برداشته و با ۲۰ لاندانگ رنگ تریپان‌بلو با گوشه لامل مخلوط گردید و پس از ۱۰ دقیقه تعداد انگل‌های مرده نسبت به زنده‌ها مورد شمارش قرار گرفت. مرگ و میر در گروه مترونیدازول در تمامی زمان‌های مطالعه اختلاف معنی‌دار را نشان داد ($p \leq 0.05$). در غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اوژنول اختلاف میان میزان مرگ و میر در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت برای تمامی این غلظت‌ها معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$). اختلاف میان میزان مرگ و میر در زمان‌های ۱ و ۲ ساعت در غلظت ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر اوژنول معنی‌دار نبود. نتایج حاصل از تحقیق کاملاً گویای اثر مناسب عصاره اوژنول در رقت‌های بالا (به غیر تیمار ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر تریکومونیاژیس است.

کلمات کلیدی: اوژنول، تریکوموناس گالینه، مترونیدازول، تک‌یاخته

استفاده از گیاهان دارویی در سرزمین ایران از سابقه‌ای طولانی برخوردار است. در حال حاضر مطالعات زیادی در مورد اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد انگلی و ضد قارچی گیاهان مختلف انجام می‌گیرد. افزایش بروز عفونت‌های انگلی، عوارض سوء ضد انگل‌های سنتتیک و بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و محدودیت استفاده از سایر داروها به دلیل پائین بودن سمیت انتخابی، شناخت داروهای جدید، مطمئن و مؤثر را لازم می‌سازد که از این میان مطالعه بر روی داروهای گیاهی از اهمیت خاصی برخوردار است. عوارض جانبی که در استفاده از داروهای سنتتیک به وجود می‌آید معمولاً با استفاده از گیاهان دارویی ایجاد نمی‌شود (۱، ۲).

اوژنول (اسید اوژنیک و اسید کاربوفیلیک آلیل گاباکول) با فرمول $C_{10}H_{12}O_2$ و به وزن مولکولی ۱۶۴/۲۰ است. نام شیمیایی این ماده ۴-آلیل-۱-هیدروکسی ۲-متوکسی بنزن می‌باشد این مایع شفاف و تقریباً بی‌رنگ و یا زردرنگ است که از دسته داروهای فنلی بوده و ماده اصلی تشکیل‌دهنده عصاره گیاه میخک است که به‌عنوان ضد درد در دندانپزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳).

تریکومونیاژیس پرنندگان توسط تریکوموناس گالینه ایجاد می‌شود. این تک‌یاخته دارای سوبه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا است. سوبه‌های ابرگ و جونزبار سوبه‌های حاد انگل هستند که در فواصل زمانی ۳/۵ ساعت مراحل تقسیم خویش را طی می‌نمایند. بیماری ایجادشده دهانی- حلقی بوده و جوجه کبوترها نسبت به این بیماری حساسیت بیشتری را از خود نشان می‌دهند. انتقال آلودگی از طریق آب و غذای آلوده و همچنین از مادر به جوجه بر اثر تغذیه از محتویات و شیر چینه‌دان کبوتر مادر، انجام می‌پذیرد (۴، ۵).

در مطالعه صورت گرفته در سال ۱۳۸۶ بر روی ۱۹۰ کبوتر و ۶۴ قطعه ماکیان خانگی از مناطق مختلف شهر اهواز از نظر آلودگی به تریکوموناس با تهیه سوآپ از ناحیه دهان و حنجره و به روش گسترش مطلوب روی لام مشخص شد که ۷۸/۹۴ درصد کبوتران به تریکوموناس گالینه آلوده بودند اما هیچ یک از ماکیان به تریکوموناس آلوده نبودند همچنین مشخص شد که کمترین آلودگی در بین کبوتران بیشتر از سه سال بود و میزان آلودگی در فصل گرم ۸۱/۵۵ درصد بود که نسبت به میزان آلودگی به فصل سرد با ۷۴/۸۱ درصد به میزان ۶/۷۴ درصد بیشتر بود. این بررسی نشان داد که میزان آلودگی به تریکوموناس در بین کبوتران شهر اهواز بسیار شایع می‌باشد و همچنین با افزایش سن کبوتران این میزان کاهش می‌یابد (۶).

استفاده از داروهای مختلفی همچون ایپرونیدازول به میزان ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پرنده به مدت ۷ روز به صورت آشامیدنی مؤثر می‌باشد. دیمتریدازول، نیتیزول، اینهپتین و سولفات مس نیز می‌توانند در کنترل بیماری مؤثر باشند (۶).

مواد و روش کار

به‌منظور تهیه محیط کشت جهت رشد تک‌یاخته تریکوموناس گالینه ۲/۹۵ گرم از diamond modified broth (QUELAB) با ۹۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط و به مدت یک دقیقه حرارت داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد و ۴۵ دقیقه بعد از خنک شدن ۱۰ میلی‌لیتر سرم جنین گوساله (Biowest) برای غنی‌سازی محیط و برای جلوگیری از رشد سایر میکروب‌ها پن‌استرپ (۱ درصد) به محیط اضافه شد. تمامی مراحل با رعایت اصول استریلیتی و در کنار شعله انجام شد.

برای تهیه نمونه انگلی ابتدا از ده کبوتر توسط

بررسی مقایسه اثر اسانس اوژنول با مترونیدازول بر تک‌یاخته تریکوموناس گالینه ...

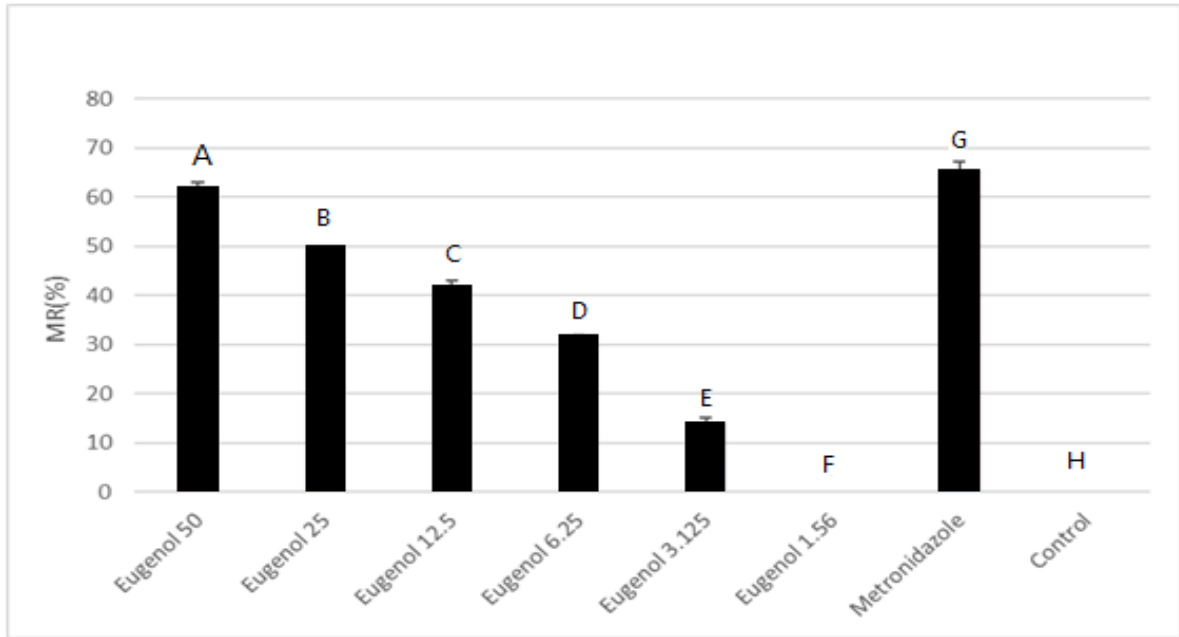
دقیقه تعداد انگل‌های مرده نسبت به زنده‌ها مورد شمارش قرار گرفت و درصد مرگ و میر یا زنده بوده به کل انگل‌های شمارش شده در حداقل تا ۱۰ شان میکروسکوپی محاسبه گردید. آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار IBMSPSS نسخه ۲۲ (شیکاگو، ایالات متحده) انجام شده است. در ابتدا با استفاده از تست شاپیروویک (Shapiro-Wilk) بررسی توزیع نرمال داده‌ها انجام شد. اختلاف میان میانگین گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز یکطرفه واریانس One way Analysis of Variance (ANOVA) و تست تعقیبی توکی Tukey مورد بررسی قرار گرفتند. اختلاف میان میزان مرگ و میر در زمان‌های مختلف با استفاده از تست آنالیزهای مکرر Repeated Measures مورد بررسی قرار گرفته است. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده‌اند. مقادیر $p \leq 0.05$ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

مقادیر مرگ و میر در تروفوزوایت‌ها در بازه زمانی ۱ ساعت پس از تیمار در گروه‌های مختلف در نمودار ۱ نشان داده شده است. تیمار با تمامی غلظت‌های اوژنول به جز غلظت ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به بروز مرگ و میر معنی‌دار در تروفوزوایت‌ها نسبت به گروه کنترل گردید ($p \leq 0.05$). میان غلظت اوژنول ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده نشده است ($p \geq 0.05$). اوژنول در بالاترین غلظت خود منجر به $1 \pm 62\%$ مرگ و میر در تروفوزوایت‌ها شده است که در مقایسه با مترونیدازول $1/76 \pm 65/33$ که به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شده است اختلاف معنی‌دار را نشان نمی‌دهد ($p \geq 0.05$).

سوآپ نمونه‌برداری انجام شد و در بررسی میکروسکوپی حضور تریکوموناس گالینه در ۸ نمونه تأیید شد. سپس از ناحیه حلقی کبوتران به روش گاوژ آب مقطر و آسپیره چینه‌دان (به وسیله سرنگ مخصوص گاوژ چیه دان) گرفته و به محیط کشت آماده شده در فالکون ۱۰ سی‌سی حاوی محیط کشت اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد نمونه انگلی به ۱۰۰۰۰ انگل در هر میلی‌لیتر رسیده برای انجام مراحل بعدی آزمایش آماده می‌باشد. برای انجام رقت‌سازی از میکروپلیت ۹۶ خانه استفاده شد. به این صورت که ابتدا ۱۸۰ لاندا از محیط کشت حاوی انگل به چاهک شماره ۱ و به چاهک ۲ تا ۸ هر کدام ۱۰۰ لاندا محیط کشت حاوی انگل اضافه شد. در چاهک شماره ۹ نیز ۱۰۰ لاندا محیط کشت حاوی انگل برای نمونه (کنترل مثبت) اضافه شد. مقدار ۲۰ لاندا از محلول اوژنول (برند پیراکس) به چاهک اول اضافه شد و پس از مخلوط شدن ۱۰۰ لاندا به چاهک شماره ۲ و به همین صورت این کار تا چاهک شماره ۶ انجام شد و در انتها ۱۰۰ لاندا از چاهک آخر دور ریخته شد. یک خانه هم مترونیدازول (۹۸ درصد تهران شیمی) به اندازه دوز استاندارد ۲۵ میلی‌گرم (کنترل منفی) اضافه گردید. به این ترتیب غلظت دارو در چاهک شماره ۱ تا ۶ به ترتیب ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر رسید. تمام این موارد با سه بار تکرار انجام شد.

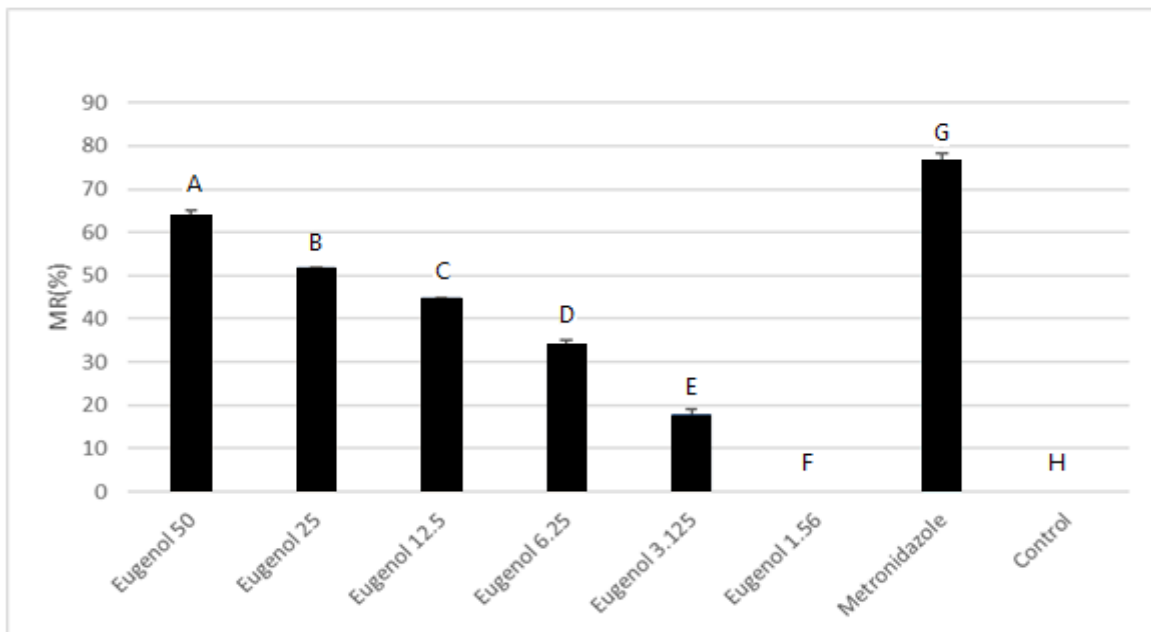
پس از قرار دادن میکروپلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه در بازه‌های زمانی مورد نظر (۱، ۲، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) پس از کشت مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر چاهک برداشته و با ۲۰ لاندا رنگ تریپان بلو با گوشه لامل مخلوط گردید و پس از ۱۰



نمودار ۱- میزان مرگ و میر در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه پس از ۱ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اوژنول، مترونیدازول و کنترل

منجر به $1 \pm 64\%$ درصد مرگ و میر در تروفوزوایت‌ها گردید که در مقایسه با سایر غلظت‌های اوژنول تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$). در زمان دو ساعت نیز اختلاف میان اوژنول با غلظت $1/56$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و گروه کنترل معنی‌دار نبوده است ($p \geq 0.05$).

میزان مرگ و میر در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه پس از ۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اوژنول در نمودار ۲ نشان داده شده است. به جز غلظت‌های $1/56$ میکروگرم بر میلی‌لیتر سایر غلظت‌های اوژنول منجر به مرگ و میر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل شدند ($p \leq 0.05$). در غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر اوژنول

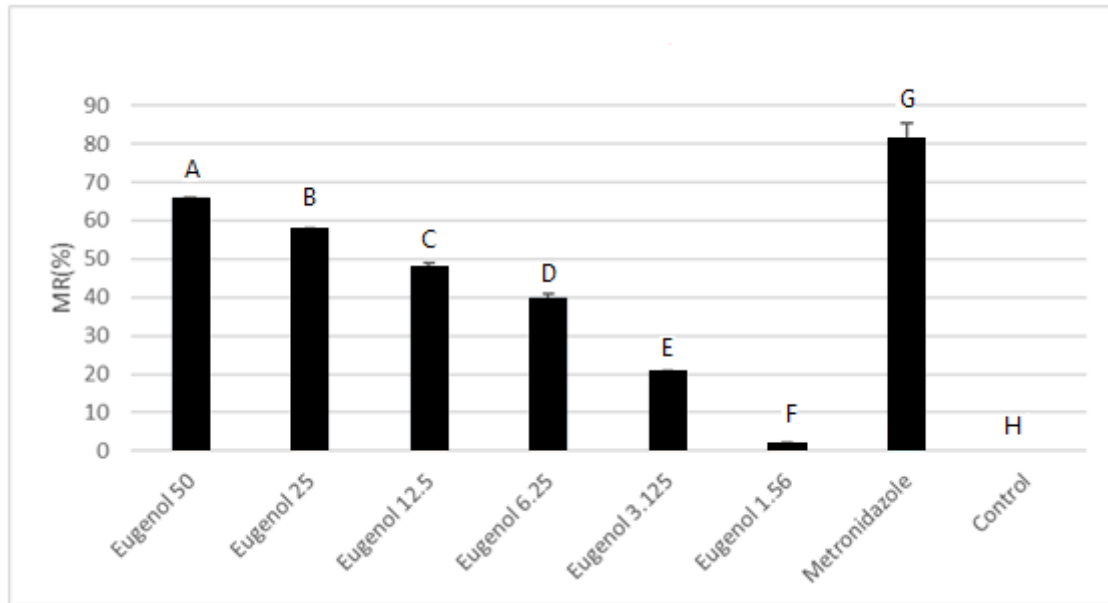


نمودار ۲- میزان مرگ و میر در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه پس از ۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اوژنول، مترونیدازول و کنترل

بررسی مقایسه اثر اسانس اوژنول با مترونیدازول بر تک‌یاخته تریکوموناس گالینه ...

با گروه‌های مترونیدازول و کنترل معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$). بالاترین غلظت از اوژنول موجب ۶۶ درصد مرگ در تروفوزوایت‌ها گردیده است که نسبت به تمامی غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$).

پس از شش ساعت تیمار در گروه‌های مختلف، میزان مرگ و میر تروفوزوایت‌ها در گروه کنترل مثبت مترونیدازول به $4/06 \pm 81/33$ درصد رسیده و نسبت به تمامی تیمارها بیشتر بوده همچنین اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$). اختلاف میان تمامی غلظت‌های اوژنول در مقایسه

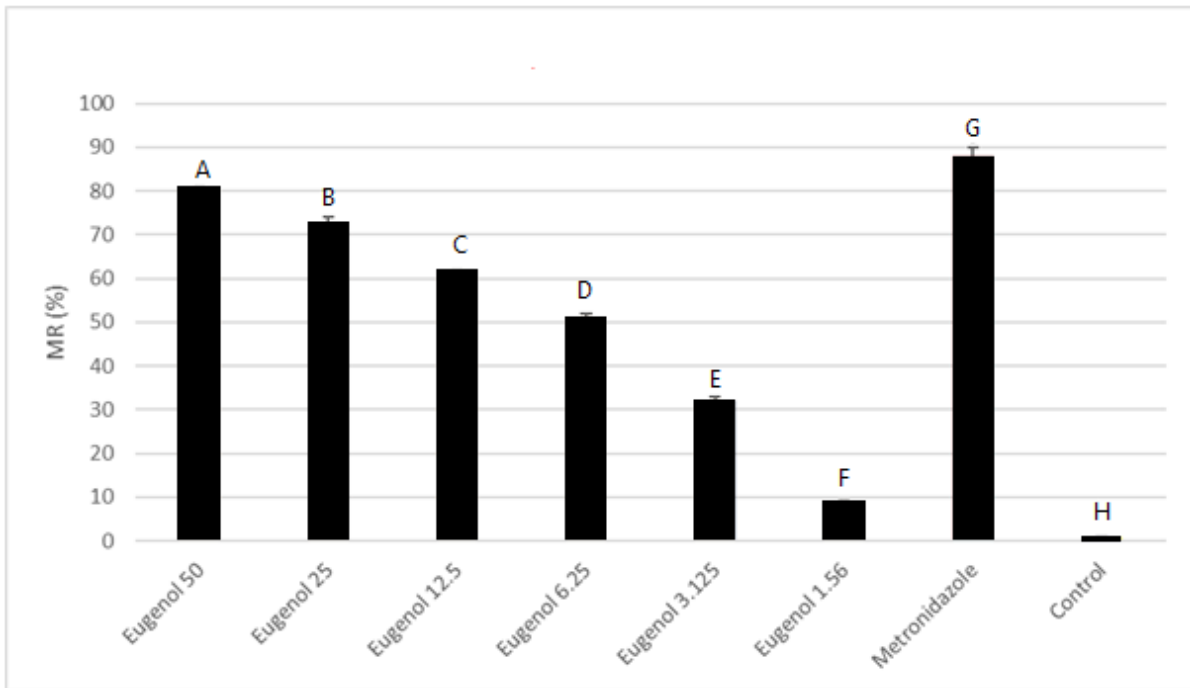


نمودار ۳- میزان مرگ و میر در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه پس از ۶ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اوژنول، مترونیدازول و کنترل

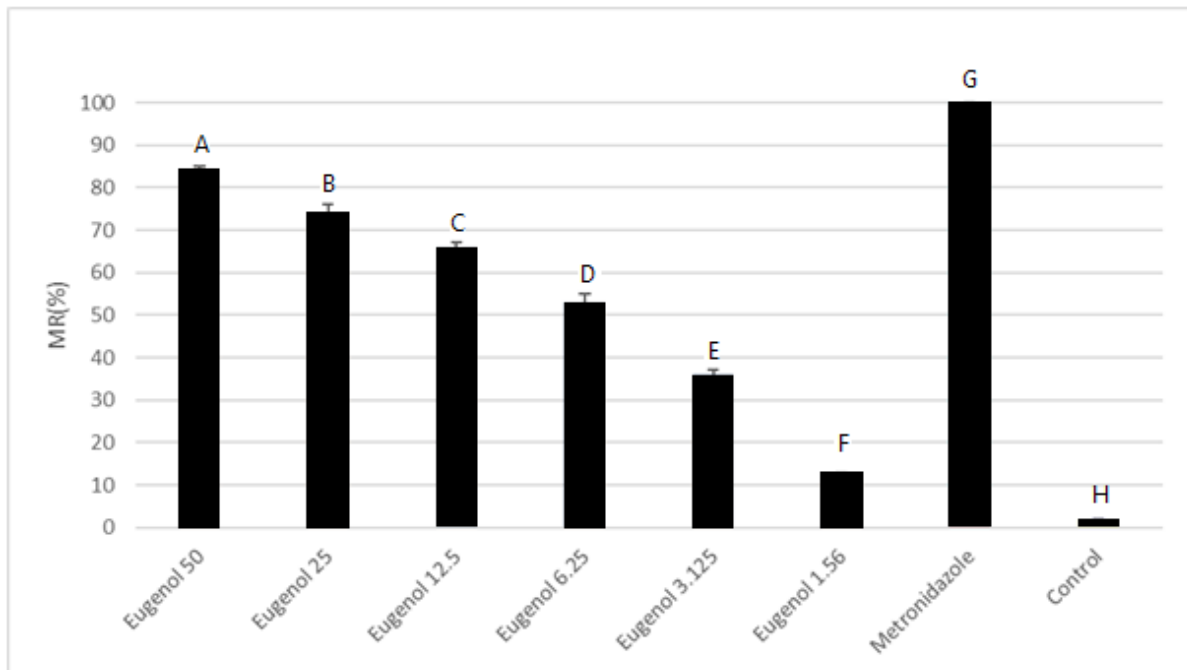
حاضر، تمامی غلظت‌های اوژنول منجر به مرگ و میر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل شدند ($p \leq 0.05$) (نمودار ۵). اوژنول در بالاترین غلظت خود (غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منجر به ۸۴ درصد مرگ و میر شد. مترونیدازول در این زمان با ایجاد ۱۰۰ درصد مرگ و میر بیشترین اثر را بر تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه موجب شد و در مقایسه با تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌دار را نشان داد ($p \leq 0.05$). اوژنول در کمترین غلظت خود نیز در زمان ۲۴ ساعت با ایجاد ۱۳ درصد مرگ و میر اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد ($p \leq 0.05$).

در بازه زمانی ۱۲ ساعت تمامی غلظت‌های اوژنول منجر به مرگ و میر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل شدند ($p \leq 0.05$) (نمودار ۴). اوژنول در غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب منجر به ۷۳، ۶۲، ۵۱، ۳۲ و ۹ درصد مرگ و میر در تروفوزوایت‌ها شد. مترونیدازول در این نقطه زمانی با حدود ۸۸ درصد مرگ و میر بیشترین اثر را بر تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه اعمال نموده که در مقایسه با تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$).

در زمان ۲۴ ساعت، آخرین بازه زمانی مطالعه



نمودار ۴- میزان مرگ و میر در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه پس از ۱۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اوژنول، مترونیدازول و کنترل



نمودار ۵- میزان مرگ و میر در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اوژنول، مترونیدازول و کنترل

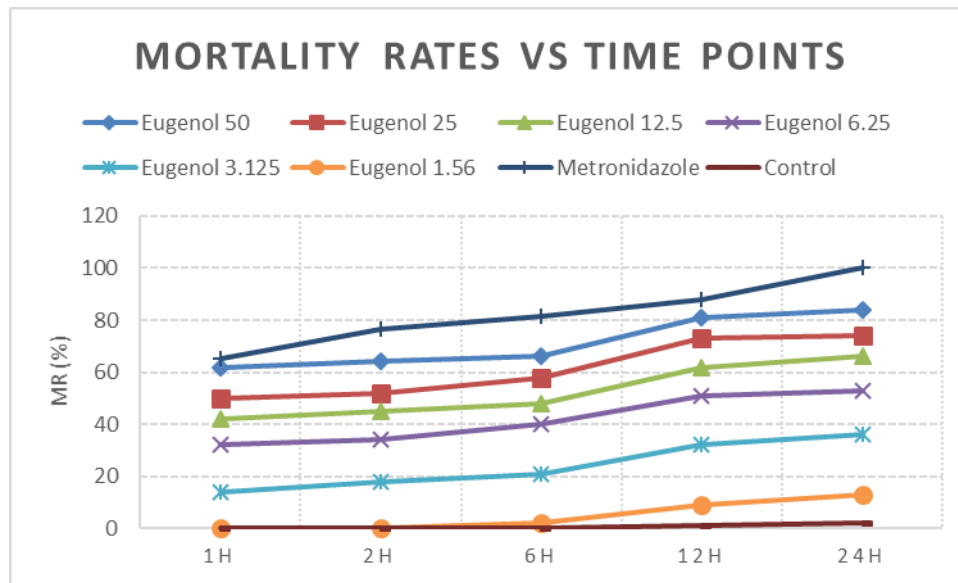
معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($p \geq 0.05$). مرگ و میر در گروه مترونیدازول در تمامی زمان‌های مطالعه اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$). در غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶

تفاوت میان میزان مرگ و میر در زمان‌های مختلف برای مواد مورد آزمایش در مطالعه حاضر در شکل ۶ نشان داده شده است. میزان مرگ و میر در گروه کنترل در زمان‌های مختلف مطالعه تفاوت

بررسی مقایسه اثر اسانس اوژنول با مترونیدازول بر تک‌یاخته تریکوموناس گالینه ...

در غلظت ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر اوژنول معنی‌دار نبوده است در حالی که برای سایر غلظت‌ها این اختلاف معنی‌دار نشان داده شده است ($p \leq 0.05$).

میکروگرم بر میلی‌لیتر اوژنول اختلاف میان میزان مرگ و میر در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت برای تمامی این غلظت‌ها معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$). اختلاف میان میزان مرگ و میر در زمان‌های ۱ و ۲ ساعت



نمودار ۶- مقایسه میزان مرگ و میر در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه در بازه‌های زمانی مختلف

در این مطالعه اثرات اوژنول در غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر تک‌یاخته‌ی تریکوموناس مورد بررسی و با داروی مترونیدازول مقایسه شد. اگرچه در غلظت‌های پایین علاوه بر گذشت زمان میزان کشندگی این ماده نسبت به داروی انتخابی مترونیدازول رضایت‌بخش نبود، اما در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از گذشت ۲۴ ساعت منجر به مرگ و میر ۸۴ درصدی در تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه شد. اگرچه مترونیدازول پس از گذشت ۲۴ ساعت منجر به مرگ و میر ۱۰۰ درصدی تروفوزوایت‌ها شد اما اوژنول با اثرات مؤثر بر این تک‌یاخته، به همراه فواید مفید آن می‌تواند جایگزین مناسبی در درمان تریکومونیاژیس مقاوم به مترونیدازول تلقی گردد.

یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۷ مزیت استفاده

بحث

درمیان بیماری‌های ناشی از تک‌یاخته‌ها، درگیری با تریکوموناس یکی از اصلی‌ترین این بیماری‌هاست، این عامل چه در پزشکی و چه در دامپزشکی از اهمیت زیادی برخوردار است و عمده‌ترین راه درمان در دسترس در حال حاضر، دارویی به نام مترونیدازول است، مقاومت روزافزون این انگل به دارو از یک سو و اثرات متعدد زیان‌بار دارو از سوی دیگر باعث شده که تحقیقات زیادی در جهت شناسایی دارویی مؤثر انجام شود، از سوی دیگر ماده‌ی اوژنول با منشأ گیاهی غالباً اثر خوبی داشته، این نکته از این جهت کارآمد است که کمتر ماده‌ای در تحقیقات روی یوکاریوت‌ها اثری مشابه اوژنول دارد، همچنین این ماده در اسانس و عصاره اکثر گیاهان از جمله میخک، ریحان، دارچین و برگ‌های خلیج، به میزان فراوانی وجود دارد (۸، ۹).

از *Artemisia sieberi* را علییه انگل-تریکوموناس گالینه در شرایط Invivo و Invitro نشان دادند. این محققین نشان دادند که درمان کبوتران آلوده با اسانس درمنه دشتی در مقایسه با مترونیدازول منجر به بهبود سریعتر کبوتران مبتلا گردید. درمنه دشتی یکی از گیاهانی است که شامل مقادیر بالایی از اوژنول می‌باشد (۱۰). در مطالعه حاضر از این ماده مؤثره به صورت مجزا استفاده شده است و در هیچ کدام از گروه‌ها، علی‌رغم گذشت زمان ۲۴ ساعت میزان کشندگی تروفوزوایت‌ها به داروی انتخابی مترونیدازول نرسیده است ولی در غلظت بالا (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به میزان مرگ و میر ۸۴ درصدی رسید.

امروزه استفاده از فرآورده‌های گیاهی به منظور مقابله با پاتوژن‌ها مد نظر پژوهشگران قرار گرفته است. از این جهت برای پیشگیری و درمان تریکوموناس گالینه از گیاهان مختلفی استفاده شده است. در پژوهشی که در کشور نیجریه انجام شده است اسانس گیاه *Dennettia tripetala* تحت آزمون کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی، ۳۶ ماده مشخص شد که اوژنول نیز در این میان مشاهده می‌شود. علاوه بر اثرات ضد میکروبی این اسانس و حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس به آن، در برابر تریکوموناس گالینه نیز اثرات مثبتی از خود نشان داد (۱۱). اگرچه در این مطالعه از اسانس یک گیاه مشخص استفاده نشد، اما به صورت جزئی از ماده‌ی مؤثر اوژنول جهت بررسی میزان کشندگی بر تروفوزوایت‌های تریکوموناس گالینه استفاده شد. استفاده از ترکیبات خالص موجود در اسانس و عصاره‌ها به کشف تأثیرات مثبت اجزای آنها بر پاتوژن‌ها کمک می‌کند.

بر اساس تحقیقات همسو، اثرات مختلفی از اسانس گل میخک از جمله کنه‌کشی نسبت به گروه‌های شاهد مشاهده شد. در این تحقیقات علاوه

بر اثرات باکتری‌کشی، قارچ‌کشی، نماتدکشی و حشره‌کش بودن اسانس این گیاه، خواص مربوط به این گیاه را به ترکیب اصلی آن اوژنول نسبت داده‌اند (۱۴-۱۲). اسانس این گیاه می‌تواند ترکیب مؤثری در کنترل انگل‌ها شناخته شود و مواد مؤثره‌ی آن در سایر گیاهان این خانواده و خانواده برگ‌بوها و نعنایان یافت می‌شود. در مطالعه حاضر نیز با توجه به پیشینه‌ی مثبتی که از اوژنول مشاهده می‌شد، در مقابله با تریکوموناس گالینه استفاده شد. اگرچه حداکثر غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در این مطالعه نتوانست اثرات کشندگی مشابه با داروی مترونیدازول از خود نشان دهد اما ممکن است غلظت‌های بالاتر و همچنین استفاده از سایر ترکیبات موجود در اسانس گیاهان به صورت توأمان اثرات مطلوب‌تری را نشان دهد.

عصاره‌های مشتق شده از گیاهان دارای ترکیبات مؤثری در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌هاست که از گذشته در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفت. اوژنول به‌عنوان ماده‌ی غالب در اسانس میخک، نقش اصلی را در این عصاره ایفا می‌کند. بر اساس مطالعات میدانی و گسترده Singh و Nagaichi فعالیت ضد انگلی عصاره‌ی ریحان در شرایط آزمایشگاهی به اوژنول نسبت داده شده است و همچنین فعالیت ضد کرمی علیه *Caenorhabditis elegans* را از خود نشان داده است. همچنین عصاره‌ی ریحان اثرات ضد لاروی علیه *A. stephensi*، *A. aegypti* و *C. quinquefasciatus* را از خود نشان داده است که این فعالیت نیز به اوژنول نسبت داده شده است (۱۵). با توجه به پتانسیل بالای اوژنول در برابر عوامل بیماری‌زا و مضراتی که داروهای ضد انگل و سنتتیک می‌تواند داشته باشند، این ماده می‌تواند در آینده نقش مهمی در بهداشت جهانی داشته باشد. امید است با تحقیقات بیشتر و دقیق‌تر از مزیت‌های

نتایج حاصل از تحقیق کاملاً گویای اثر مناسب عصاره‌ی اوژنول در رقت‌های بالا بر تریکومونیاژیس است، و می‌توان با بررسی‌های بیشتر از این گیاه به‌عنوان درمانی جدید در درمان تریکومونیاژیس مقاوم به مترونیدازول استفاده کرد چرا که این ماده مزایای بسیار ویژه‌ای دارد که امکان بهره‌برداری از آن را آسان‌تر و مناسب‌تر نسبت به سایر منابع سنتتیک کرده است، این مزایا شامل در دسترس بودن گیاهان دارای اوژنول در مناطق مختلف کشور، عدم بروز عوارض جانبی و مسمومیت با این ماده، امکان استفاده در مقادیر بالا و زمان استفاده‌ی بیشتر به دلیل فقدان اثرات زیست محیطی، می‌باشد که می‌تواند در درمان تریکومونیاژیس مؤثر باشد.

References

- 1- Gorlenko CL, Kiselev HY, Budanova EV, Zamyatnin AA, Ikryannikova LN. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: new heroes or worse clones of antibiotics? *Antibiotics*. 2020; 9: 170.
- 2- Mulat M, Pandita A, Khan F. Medicinal plant compounds for combating the multi-drug resistant pathogenic bacteria: a review. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2019; 20: 183–196.
- 3- Nejad SM, Özgüneş H, Başaran N. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*. 2017; 14: 201.
- 4- Feng SY, Chang H, Li FH, Wang CM, Luo J, He HX. Prevalence and molecular characterization of *Trichomonas gallinae* from domestic pigeons in Beijing, China. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018; 65: 369–372.
- 5- McBurney S, Kelly-Clark WK, Forzán MJ, Vanderstichel R, Teather K, Greenwood SJ. Persistence of *Trichomonas gallinae* in Birdseed. *Avian Diseases*. 2017; 61: 311–315.
- 6- Miah M, Nabavi L, Zabrdast M. Prevalence of *Trichomonas* infection in pigeons and poultry in Ahvaz. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2109; 3: 47–50.
- 7- Munoz E, Castella J, Gutierrez JF. In vivo and in vitro sensitivity of *Trichomonas gallinae* to some nitroimidazole drugs. *Veterinary parasitology*. 1998; 78: 239–246.

بالقوه‌ی این ماده بهره برد. در پژوهش مشابه دیگری توسط اشرف الدول و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص شد اوژنول در کاهش حدت بیماری‌زایی باکتری *Vibrio parahaemolyticum* به جهت عدم توانایی این باکتری در ساخت بیوفیلیم و توانایی حرکت آن مؤثر می‌باشد (۱۶).

در مطالعه جیاکامور و لاورنس در سال ۲۰۲۱ اثر باکتری‌کشی اوژنول به‌عنوان یک ماده طبیعی علیه *Escherichia coli* بررسی شد. نتایج نشان داد این عصاره تأثیر به‌سزایی بر فرایند از بین بردن این ارگانیسم دارد (۱۷).

نتیجه‌گیری

- 8- Graves KJ, Ghosh AP, Schmidt N, Augostini P, Secor WE, Schwebke JR, et al. Trichomonas vaginalis virus among women with trichomoniasis and associations with demographics, clinical outcomes, and metronidazole resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 2019; 69: 2170–2176.
- 9- Lin HC, Chu LJ, Huang PJ, Cheng WH, Zheng YH, Huang CY, et al. Proteomic signatures of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* reveal novel proteins associated with drug resistance. *Parasites & vectors*. 2020; 13: 1–14.
- 10- Youssefi MR, Tabari MA, Moghadamnia AA. In vitro and in vivo activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. *Iranian journal of veterinary research*. 2017; 18: 25. [In Persian]
- 11- Gbolade AA, Arcoraci T, D'Arrigo M, Olorunmola FO, Biondi DM, Ruberto G. Essential oils of *Dennettia tripetala* Bak. f. stem bark and leaf. Constituents and biological activities. *Planta Medica*. 2009; 75: PI32.
- 12- Asha MK, Prashanth D, Murali B, Padmaja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia*. 2001; 72: 669–670.
- 13- El-Zemity SR, Rezk HA, Farok S, Zaitoon AA. Acaricidal activity of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against the

house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Trends in acarology*. 2010; 541–543.

14- He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2007; 163: 137–143.

15- Singh K, Nagaich S. Anthelmintic efficacy of the alcoholic extract of *Ocimum sanctum* against common poultry worms *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinae*. *J Parasit Dis*. 2002; 26: 42–45.

16- Ashrafudoulla M, Mizan MFR, Ha AJ, Park SH, Ha SD. Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*. 2020; 91: 103500.

17- Jeyakumar GE, Lawrence R. Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*. *Journal of Herbal Medicine*. 2021; 26: 100406.

Evaluation of the effect of eugenol essential oil on *Trichomonas galline* protozoan in vitro

Mohammaad-Amin Torabi^{1*}, Faranak Sharifi², Parisa Roshanmaram Kondori¹

1- DVM student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Science and Research, Tehran, Iran.

2- Graduated student, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University of Babol, Babol, Iran.

Receive: January 14, 2022; Revise: February 24, 2022; Accept: February 26, 2022

Summary

Trichomonas galline is a flagellate parasite of warm-blooded animals found in birds that is more perceptible and lethal. Other birds may also be infected. In this study of pigeon stratigraphy, the British killed broth in a diamond environment. After culturing the parasite, the samples were kept in an incubator at 37 ° C for 48 hours until the number of protozoa reached about 1000 parasites per ml of culture medium. Then in eight groups including one control and seven treatments (one metronidazole group and six treatments of eugenol essential oil) according to doses of 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 micrograms per liter, eugenol is used to create the desired dilutions to the culture medium. . . After placing the microplate in the incubator at a temperature of 37 degrees at the desired intervals of 1, 2, 6, 12 and 24 hours after culture, 20 microliters of each well was removed and with 20 Landa trypan paint. It was mixed with the lamellar corner and after 10 minutes the number of dead Englishmen compared to the living ones was counted. Mortality in the metronidazole group showed a significant difference at all times of the study ($p \leq 0.05$). At 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ eugenol, the difference between the mortality rates at 6 and 12 hours was significant for all of them ($p \leq 0.05$). The difference between mortality at 1 and 2 hours at 1.56 $\mu\text{g} / \text{L}$ eugenol was not significant. The results of the study fully indicate the appropriate effect of eugenol extract in high dilutions (untreated (1.56 $\mu\text{g} / \text{ml}$)) on trichomoniasis.

Key words: *Eugenol, Trichomonas galline, metronidazole, protozoan*

ارزیابی شاخص بورس در واکسن گامبورو موسسه رازی در شرایط پرورشی جوجه‌های گوشتی

عبدالرضا نبی‌نژاد^{۱*}، وحید نعمان^۲، کمال‌الدین علامه^۳

- ۱- بخش تحقیقات بیماری‌های ویروسی طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۲- بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی دام، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ آذر ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۱ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۷ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

تعداد ۷۰۰ قطعه جوجه گوشتی نژاد آرین انتخاب و بر مبنای واکسیناسیون گامبورو به دو گروه تیمار و شاهد در قفس‌های مجزا توزیع شد، در گروه تیمار واکسن گامبورو نوع متوسط سویه IBD 071IR به‌صورت آشامیدنی در روزهای ۱۴ و ۲۰ مصرف و در گروه شاهد واکسیناسیون گامبورو انجام نشد، برنامه واکسن‌های برونشیت، نیوکاسل و آنفلوانزا در هر دو گروه مشابه بود. اندازه‌گیری میزان تیترا آنتی‌بادی برای بیماری‌های نیوکاسل و آنفلوانزا با روش HI و برای بیماری‌های برونشیت و گامبورو به روش الایزا با استفاده از کیت بیوجک انجام پذیرفت، بر اساس نتایج در کل نمونه‌ها، میانگین تیترها در سن ۴۵ روزگی برای نیوکاسل، آنفلوانزا، برونشیت عفونی به‌ترتیب ۶/۱، ۴/۲۰، ۲۶۱۰ بود و ضریب تغییرات CV تیترا آنتی‌بادی برای نیوکاسل ۳۱ درصد، برای آنفلوانزا ۴۹ درصد، برای برونشیت ۵۸ درصد بود، میانگین تیترا گامبورو در گروه تیمار در روزهای یک، ۲۰، ۳۳ و ۴۵ به‌ترتیب ۱۱۸۰۰، ۵۷۲۷، ۶۳۲۵ و ۵۷۹۷/۸ و در گروه شاهد به‌ترتیب ۲۲۹۸، ۴۵۰۱، ۱۱۸۰۰ و ۱۰۸۷ بود، ضریب تغییرات تیترا گامبورو در گروه تیمار نیز به‌ترتیب ۳۷/۵، ۴۲، ۳۷ و ۴۸ درصد و در گروه شاهد ۳۷/۵، ۵۸، ۹۴ و ۱۳۸ درصد بود، در هر دو گروه با کشتار ۲۰ قطعه جوجه در ۲۰ و ۴۵ روزگی، شاخص نسبت وزن بورس به وزن بدن در گروه تیمار به‌ترتیب ۰/۲۱ و ۰/۲۳ و در گروه شاهد ۰/۱۰ و ۰/۱۴ بود، بر این اساس واکسن گامبورو IBD 071IR مؤسسه رازی در افزایش تیترا آنتی‌بادی هومورال و افزایش شاخص بورس در جوجه‌های تحت مطالعه تأثیر معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: کارایی، شاخص بورس، واکسن رازی، جوجه گوشتی

بورس فابرسیوس یکی از ارگان‌های مهم لنفاوی اولیه در طیور بوده و مرکز تولید و توسعه سلول‌های لنفوسیتی نوع B است، رشد و توسعه بورس فابرسیوس در دوران جنینی آغاز و تا بعد از هج ادامه دارد (۱)، توسعه و نمو بورس فابرسیوس در شرایط طبیعی و به دور از بیماری گامبورو و سایر عوامل سرکوب‌گر سیستم ایمنی طیور در سنین هشت تا ده هفتگی به اوج خود رسیده و سپس روند تحلیل آن آغاز و سرانجام در سن شش تا هفت ماهگی به طور کامل تحلیل می‌رود (۲)، اندازه و وزن بورس فابرسیوس در سلامت و عملکرد سیستم ایمنی طیور تأثیر مستقیم دارد و به همین دلیل تعیین وزن بورس فابرسیوس در طیور و نسبت آن به وزن بدن یا شاخص بورس از معیارهای بررسی عملکرد سیستم ایمنی طیور است (۲، ۳)، در مطالعه‌ای بر روی ۵۰۰ قطعه جوجه گوشتی نژاد کاب در شرایط ایزوله شاخص وزن بورس به وزن بدن تا سن ۴۲ روزگی، ۰/۱۱ تعیین شد (۴)، بیماری بورس عفونی طیور (IBD)، یا بیماری گامبورو یک بیماری بسیار مسری و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در جوجه‌های جوان بوده که توسط ویروس IBDV ایجاد و ضررهای اقتصادی زیادی را در صنعت طیور جهان ایجاد می‌کند (۵) IBDV یک RNA ویروس دو رشته‌ای متعلق به جنس Avibirnavirus از خانواده Birnaviridae است، ژنوم آن به دو بخش A و B تقسیم می‌شود. در ژنوم قسمت بزرگ‌تر اول که به راحتی قابل بازخوانی است (ORF1) توسط بخش A کدگذاری شده و یک پلی‌پروتئین ۱۱۰ کیلو دالتونی تولید نموده که به‌طور خودکار به سه قطعه پروتئین ویروسی شامل VP2، (به وزن ۴۸ کیلو دالتون)، VP3 (به وزن ۳۳-۳۵ کیلو دالتون) و VP4 (به وزن ۲۴ کیلو دالتون) و نیز یک قطعه VPX تقسیم می‌شود (۶، ۷)

ویروس‌های IBDV دارای دو سروتیپ ۱ و ۲ بوده و هر دو سروتیپ ویروس می‌توانند به‌طور طبیعی مرغ، بوقلمون، اردک، مرغ دریایی و شترمرغ را آلوده کنند. بیماری‌زایی در مرغ فقط توسط سروتیپ یک گزارش شده است. ویروس با ایجاد تغییرات در ژنوم VP2 و ایجاد اپی‌توپ‌های مختلف و جدید، آنتی‌ژن‌سیتی وحدت ویروس به‌طور مداوم در حال تغییر است، لذا سوش‌های واریانت و سوش‌های بسیار خطرناک (vvIBDV)، دلیل تلفات قابل توجه و مرگ و میر بالا در جوجه‌ها می‌باشد؛ پروتئین حاصل از VP2 دارای خاصیت ایمونونژنیک بوده و با تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده باعث محافظت میزبان می‌شود، اخیراً، IBDV بر اساس تغییرات مشخص در اسیدهای آمینه در ناحیه فوق متغیر پروتئین کپسید VP2 (hVP2) در بین گروه‌های مختلف به هفت ژنوگروه طبقه‌بندی شده است و ژنوگروه یک در سطح جهانی توزیع شده است. در حال حاضر، این بیماری توسط واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته یا غیر فعال شده کنترل می‌شود، البته ممکن است واکسن‌های معمول قدرت محافظت کامل در برابر سویه vvIBDV را نداشته باشند، واکسن‌های غیر فعال یا کشته شده معمولاً در مرحله قبل از تخم‌گذاری در پرندگان مصرف شده تا سطوح بالاتری از تولید آنتی‌بادی را برای حداقل ۲ هفته القاء کنند. با این حال، با ظهور واریانت‌های آنتی‌ژنیک و سویه‌های بسیار خطرناک IBDV (vvIBDV)، جوجه‌ها به‌طور کامل توسط واکسن‌های IBD معمولی محافظت نمی‌شوند، واکسن‌های نسل جدید با مزیت غلبه بر تداخل با آنتی‌بادی‌های مادری، علاوه بر ایمنی، از سهولت و پایداری در تولید برخوردارند و اثربخشی بالایی در صورت تزریق به جنین در اواخر دوره فرخیه‌تگی یا بلافاصله بعد از تفریح نشان داده اند (۸)، واکسن تخفیف حدت یافته IBD 071IR محتوی ویروس

استفاده از واکسن‌های ساخت مؤسسه رازی آغاز شد، برنامه واکسیناسیون عمومی شامل برونشیت طیور H120 (به صورت اسپری درشت در یک‌روزگی در کارتن)، نیوکاسل B1 (به صورت قطره چشمی در شش‌روزگی)، نیوکاسل La sota (به صورت آشامیدنی در ۱۰، ۱۸ و ۲۷ روزگی) و نیز واکسن کشته دوگانه نیوکاسل و آنفلوانزا (به صورت تزریق زیر پوست گردن در شش‌روزگی) بود، در گروه تیمار واکسن تخفیف حدت یافته گامبورو نوع متوسط سویه IBD 071IR (به صورت آشامیدنی و با استفاده از فرمول دوتتر در ۱۴ و ۲۲ روزگی) (۶) مصرف و در گروه شاهد واکسیناسیون گامبورو انجام نشد.

اندازه گیری تیتتر: به طور کلی به منظور بررسی وضعیت ایمنی گله بر علیه بیماری‌های نیوکاسل، آنفلوانزای سویه (H9N2-NHP-AI)، برونشیت عفونی و گامبورو با خون‌گیری تصادفی از بیست قطعه جوجه در روزهای یک، ۲۰، ۳۳ و ۴۵ در هر دو گروه نسبت به تعیین تیتتر آنتی‌بادی اقدام شد، تعیین میزان تیتتر آنتی‌بادی برای بیماری‌های نیوکاسل و آنفلوانزا با روش HI و برای بیماری برونشیت و گامبورو به روش الیزا با استفاده از کیت بیوجک انجام پذیرفت (۹).

اندازه گیری شاخص بورس: به منظور بررسی تعیین شاخص وزنی بورس، در روزهای ۲۰ و ۴۵ در هر گروه تعداد ۲۰ قطعه از هر دو گروه تیمار (واکسینه شده با گامبورو سویه IBD 071IR و گروه شاهد) به طور تصادفی انتخاب و پرنده‌ها بعد از وزن‌کشی، خون‌گیری و به روش انسانی کشته و بعد از کالبدگشایی، غده بورس فابریسیوس از جدار خلفی کلوک هر کدام خارج و بلافاصله وزن بورس با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت دهم گرم اندازه‌گیری و ثبت شد، شاخص بورس برای هر پرنده با استفاده از فرمول مربوطه $[100 \times (\text{وزن بدن} / \text{وزن بورس}) = \text{شاخص بورس}]$ محاسبه گردید

متوسط بورس عفونی (گامبورو) جدا شده از غالب و شایع مزارع کشور بوده که در تخم مرغ‌های SPF جنین‌دار کشت داده شده است. هر دز واکسن دارای حداقل عیا EID 505/210 ذره ویروسی می‌باشد (۹).

اثر اقتصادی: ارزیابی تأثیر اقتصادی IBD بر صنعت طیور به دلیل ماهیت پیچیده تلفات مرتبط با این بیماری دشوار است. نقص ایمنی ناشی از عفونت IBDV در جوجه‌ها، گله را مستعد سایر عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و انگلی می‌کند و در نتیجه منجر به تلفات غیر مستقیم می‌شود. به دلیل مقاوم بودن ویروس در برابر بیشتر مواد ضد عفونی‌کننده و عوامل محیطی، واحد مرغداری آلوده به IBDV باقی می‌ماند و ممکن است در دوره‌های بعدی بیماری دوباره ظاهر شود (۱۰).

فرم حاد یا مزمن گامبورو در گله باعث کاهش بازده تولید و سود خالص از نظر ضریب تبدیل خوراک می‌شود، بررسی‌ها نشان داده که سویه‌های غیر بیماری‌زای ویروس بورس عفونی طیور رایج در مزارع ساسکاچوان کانادا منجر به زیان اقتصادی قابل توجهی در حدود ۳/۹ میلیون کیلوگرم در سال به صنعت گوشت جوجه‌های گوشتی می‌شود (۱۱).

مواد و روش‌ها

سالن پرورش: تعداد ۷۰۰ قطعه جوجه گوشتی نژاد آرین با میانگین وزن ۴۱ گرم از مادران ۵۱ هفته خریداری و در دو گروه ۳۵۰ قطعه‌ای تیمار و شاهد (بر اساس مصرف یا عدم مصرف واکسن گامبورو) با رعایت اصول بهداشتی و ایمنی زیستی مطلوب در قفس‌های مجزا با ظرفیت ۱۰ قطعه‌ای تقسیم شدند، به طور کلی سیستم تغذیه و پرورش این پرندگان بر اساس نیاز آنها انجام پذیرفت.

واکسیناسیون: برنامه واکسیناسیون آنها منطبق بر تیتتر یک‌روزگی و وضعیت منطقه با

(۱۲). ۲۰، ۳۳ و ۴۵ به ترتیب ۱۱۸۰۰، ۵۷۲۷، ۶۳۲۵ و ۵۷۹۷/۸ و در گروه شاهد به ترتیب ۱۱۸۰۰، ۴۵۰۱، ۲۲۹۸ و ۱۰۸۷ بود (جدول ۱)، ضریب تغییرات تیترا گامبورو در گروه تیمارها نیز به ترتیب ۳۷/۵، ۴۲، ۳۷ و ۴۸ درصد و در گروه شاهد ۳۷/۵، ۵۸، ۹۴ و ۱۳۸ درصد بود (جدول ۲). شاخص بورس (نسبت وزن بورس به وزن بدن) در گروه تیمار به ترتیب ۰/۲۱ و ۰/۲۳ و در گروه شاهد ۰/۱۲ و ۰/۱۴ بود (جدول ۳). مقایسه آماری عیار آنتی‌بادی علیه ویروس گامبورو در گروه تیمار و شاهد تفاوت معنی‌داری (در سطح $P < 0.05$) را نشان داد، همچنین شاخص بورس در گروه تیمار به طور معنی‌داری (در سطح $P < 0.05$) با گروه شاهد تفاوت داشت.

روش آماری: آنالیز داده‌ها، مقایسه میانگین‌های عیار آنتی‌بادی و نیز میانگین‌های شاخص بورس در آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه با آزمون تکمیلی دانکن انجام شد و $P > 0.05$ سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد (۱۳).

نتایج

در همه نمونه‌ها، میانگین تیتراها در سن ۴۵ روزگی برای نیوکاسل ۶/۱، برای آنفلوانزا ۴/۲۰ و در برونشیت عفونی ۲۶۱۰ بود، ضریب تغییرات تیترا آنتی‌بادی برای نیوکاسل ۳۱ درصد، برای آنفلوانزا ۴۹ درصد و برای برونشیت نیز ۵۸ درصد بود، میانگین تیترا گامبورو در گروه تیمار در روزهای یک

جدول ۱- میانگین تیترا آنتی‌بادی علیه نیوکاسل، آنفلوانزا، برونشیت و گامبورو در گله تحت مطالعه

| میانگین تیترا سن | نیوکاسل (HI) | آنفلوانزا (HI) | برونشیت (کیت بیوچک) ELISA | گامبورو (تیمار) ELISA | گامبورو (شاهد) ELISA |
|------------------|--------------|----------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|
| یک روزگی | ۶/۲۰ | ۵/۱۰ | ۴۵۰۰ | ۱۱۸۰۰ | ۱۱۸۰۰ |
| ۲۰ روزگی | ۴/۵ | ۲/۸۵ | ۵۱۴۳/۵ | ۵۷۲۷ | ۴۵۰۱ |
| ۳۳ روزگی | ۵/۶ | ۳/۲۵ | ۳۷۸۰ | ۶۳۲۵ | ۲۲۹۸ |
| ۴۵ روزگی | ۶/۱ | ۴/۲۰ | ۲۶۱۰ | ۵۷۹۷/۸ | ۱۰۸۷ |

جدول ۲- ضریب تغییرات (%CV) تیترا در مراحل مختلف نمونه‌گیری

| ضریب تغییرات (%CV) | نیوکاسل | آنفلوانزا | برونشیت | گامبورو (تیمار) | گامبورو (شاهد) |
|--------------------|---------|-----------|---------|-----------------|----------------|
| یک روزگی | ٪۱۷/۲ | ٪۱/۵ | ٪۳۳ | ٪۳۷/۵ | ٪۳۷/۵ |
| ۲۰ روزگی | ٪۲۱/۵ | ٪۱۹/۵ | ٪۳۶ | ٪۴۲ | ٪۵۸ |
| ۳۳ روزگی | ٪۲۶ | ٪۴۳ | ٪۴۶/۵ | ٪۳۷ | ٪۹۴ |
| ۴۵ روزگی | ٪۳۱ | ٪۴۹ | ٪۵۸ | ٪۴۸ | ٪۱۳۸ |

CV= coefficient of variation

جدول ۳- شاخص بورس در گروه تیمار (واکسینه) و شاهد (غیر واکسینه) در ۲۰ و ۴۵ روزگی

| سن | | ۲۰ روزگی | | ۴۵ روزگی | |
|--|-------|----------|--------|----------|--|
| وضعیت بورس فابرسیوس | | | | | |
| | تیمار | شاهد | تیمار | شاهد | |
| حد اکثر وزن بورس (به گرم) | ۲/۲ | ۰/۸۷ | ۹/۳۷ | ۴/۴۹ | |
| حد اقل وزن بورس (به گرم) | ۰/۹ | ۰/۶۲ | ۴/۵۲ | ۲/۳۸ | |
| میانگین وزن بورس (به گرم) | ۱/۴۵ | ۰/۷۹ | ۶/۱۱ | ۳/۵۶ | |
| ضریب تغییرات وزن بورس (%CV) | ٪۸۳/۳ | ٪۱۰۸/۴ | ٪۴۶/۲ | ٪۱۶۸/۵ | |
| میانگین وزن بدن (به گرم) | ۶۶۹/۳ | ۶۶۵/۶ | ۲۵۴۶/۵ | ۲۵۳۹ | |
| شاخص بورس (نسبت میانگین وزن بورس به میانگین وزن بدن X ۱۰۰) | ۰/۲۱ | ۰/۱۲ | ۰/۲۳ | ۰/۱۴ | |

بحث

با توجه به نتایج و جداول، در مورد واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل با استفاده از واکسن B1 (ویروس لنتوزن B1 تخفیف حدت یافته) در روز ششم و متعاقباً مصرف واکسن لاسوتا که ویروس لنتوزن لاسوتای تخفیف حدت یافته در روز یازدهم سیستم ایمنی تحریک گردید، در یک روزگی تیتراژ ۶/۲ بود و در روز بیستم به ۴/۵ رسید، این تغییرات اگر چه به طور نسبی با کاهش مواجه بوده، ولی تغییر ایمنی از ایمنی غیر فعال مادری به ایمنی فعال رخ داده و به عدد ۴/۵ رسیده است، از آنجا که تیتراژ آنتی بادی مادری می تواند به طور طبیعی هر چهار روز، یک واحد کاهش داشته باشد، انتظار می رفت که در روز بیستم تیتراژ در حدود یک برسد، لیکن در روز بیستم و پس از دو مرحله واکسیناسیون علیه نیوکاسل، میانگین تیتراژ گله معادل ۴/۵ و در نهایت نیز در روز ۴۵ تیتراژ به ۶/۱ رسید، که مؤید عملکرد مثبت و مؤثر واکسیناسیون است، بررسی ضریب تغییرات تیتراژها که از ۱۷/۲ درصد در یک روزگی به ۳۱ درصد در ۴۵ روزگی رسیده است نیز نشان دهنده تأثیر مثبت واکسن در حد مطلوب و یکنواختی آن در گله است.

بر اساس نظر الکساندر، عیار پادتن ایجاد شده به وسیله واکسن های زنده علیه بیماری نیوکاسل حدود چهار تا شش است (۱۴). برخی دیگر نیز کارایی واکسیناسیون گله های طیور را منوط به وجود تیتراژ آنتی بادی مساوی یا بیشتر از سه واحد را برای ۸۵ درصد گله می دانند (۱۵). ایمنی در آنفلوانزا ایمنی اختصاصی برای تحت تیپ مربوطه است و واکسیناسیون آنفلوانزا باید بر اساس سرو تیپ شیوع بیماری در کشورها و برنامه های پیشگیرانه ابلاغی باشد (۱۶)، واکسن کشته آنفلوانزا سرو تیپ H9N2 با ایجاد ایمنی مناسب در سن چهل و پنج روزگی تیتراژ ۴/۲ و میزان پراکندگی ۴۹ درصد را ایجاد نمود که وضعیت قابل قبولی برای مقابله با عفونت احتمالی ویروس کم حدت H9N2 تقریباً مناسب است، البته در صورت افزایش تعداد ویروس یا بیماری زمینه ای و عفونت ثانویه شکننده است. ضمن این که در خصوص بیماری های ویروسی و به ویژه آنفلوانزا رعایت مسائل امنیت زیستی بسیار مؤثر است و استفاده از واکسن به تنهایی کافی نیست، زیرا شکست تیتراژ در اثر حجم زیاد ویروس وحشی امکان پذیر است (۱۷).

بر اساس مطالعات سرولوژیک خنثی‌سازی ویروس و ممانعت از هماگلوتیناسیون و مطالعات مولکولی سروتیپ‌های مختلف ویروس برونشیت در ترکیب آمینو اسیدهای سازنده آنتی‌ژن S1 دارای ۲۰ تا ۵۰ درصد تفاوت هستند، به عبارتی می‌توان گفت در بهترین حالات ایمنی متقاطع علیه آنتی‌ژن S1 بین تیپ‌های مختلف ویروس برونشیت بین ۵۰ تا ۸۰ درصد خواهد بود. بنابراین مهم‌ترین نکته برای واکسیناسیون علیه بیماری برونشیت طیور استفاده از واکسن اختصاصی همولوگ در جاهای آلوده است (۱۸)، در مطالعه حاضر نیز با استفاده از واکسن مناسب منطقه در روز اول، تیترا حاصله در سن ۲۰ روزگی نسبت به تیترا روز اول افزایش جزئی داشت و میزان پراکندگی نیز ۳۶ درصد بود، این تیترا در روز ۳۳ و سپس روز ۴۵ روند نزولی داشت و به ۲۶۱۰ و ضریب تغییرات ۵۶ درصد رسید که با توجه به یک بار واکسیناسیون در روز اول این واکسن کارایی مناسبی را از خود نشان داد.

در گروه تیمار برنامه استفاده شده مصرف واکسن گامبور بر اساس نتایج تیترا یک‌روزگی و مبتنی بر فرمول دوترا تعیین شد (۱۹)، تا کنون سویه‌های مختلفی از سروتیپ یک ویروس گامبور تشخیص داده شده است که حد اکثر ۳۰ درصد ایمنی متقاطع دارند، لذا تشخیص نوع ویروس در حال گردش و شرایط منطقه در انتخاب نوع واکسن از نوع حاد یا متوسط بسیار مهم بوده و کاربرد واکسن حاد در شرایطی که بیماری از نوع متوسط است، سبب تخریب شدید بورس و حتی انتشار بیماری خواهد شد (۱۶، ۲۰)، اولین دوز واکسن گامبور در سن ۱۵ روزگی به‌صورت آشامیدنی استفاده و نتایج تیترا در سن بیست‌روزگی کاهش نسبی تیترا یک روزگی را نشان داد، در واکسیناسیون مجدد در سن بیست روزگی، تیترا آنتی‌بادی علیه بیماری گامبور در سن سی و سه

روزگی ۶۳۲۵ و میزان پراکندگی ۳۷ درصد بوده است، با توجه به این که بیشترین حساسیت جوجه گوشتی به بیماری گامبور سن ۳ تا ۶ هفتگی است، در سن ۴۵ روزگی نیز تیترا به‌طور میانگین ۵۷۹۷/۸ و ضریب تغییرات نیز ۴۸ درصد بود، در گروه شاهد که واکسن گامبور مصرف نشد، در روزهای یک، ۲۰، ۳۳ و ۴۵ میزان تیترا به‌ترتیب ۱۱۸۰۰، ۴۵۰۱، ۲۲۹۸ و ۱۰۸۷ بود، ضریب تغییرات تیترا نیز به‌ترتیب ۳۷/۵، ۵۸، ۹۴ و ۱۳۸ درصد بود که می‌تواند نشان‌دهنده کاهش یکنواخت تیترا یک روزگی مادری و یا احتمالاً آلودگی جزئی به ویروس واکسن است، ضریب تغییرات هم عدم یکنواختی همین کاهش تیترا را نشان داده است، لذا استفاده از واکسن گامبور مناسب و با برنامه در حفظ توان ایمنی جوجه گوشتی در برابر بیماری گامبور امری ضروری است.

در گروه تیمار و شاهد اندازه‌گیری وزن بدن پرنده و نیز وزن غده بورس فابرسیوس در روز ۲۰ و ۴۵ نشان داد که واکسینه شدن تیماران با واکسن گامبور 071IR IBD رازی در روزهای ۱۴ و ۲۲ تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن غده بورس فابرسیوس ($P < 0.05$) و بهبود شاخص بورس از ۰/۲۱ به ۰/۲۳ داشته است، همچنین ضریب تغییرات میانگین وزن غده بورس فابرسیوس با افزایش مراتب واکسیناسیون بهبود یافته است و از ۸۳/۳ درصد در روز ۲۰ به ۴۶/۲ درصد در روز ۴۵ رسیده است، لذا می‌توان گفت مصرف واکسن گامبور فوق در گروه تیمار تأثیر منفی بر رشد غده بورس ایجاد نکرده و لذا رشد بورس در گله یکنواخت بوده است، در گروه شاهد شاخص بورس در روز ۲۰ از ۰/۱۲ به ۰/۱۴ در روز ۴۵ رسیده است، لیکن در همین روزها ضریب تغییرات از ۱۰۸/۴ درصد به ۱۶۸/۵ درصد رسیده است که نشان از عدم یکنواختی در رشد غده بورس در گروه شاهد است،

ضریب ۱۱ / ۰ را به دست آوردند، در طی این مدت میانگین وزن بورس از ۰/۲۴ به ۴/۸۵ رسید، همچنین ضریب تغییرات از ۲۵ درصد به ۲۱ درصد تغییر نمود (۲۰)، ایشان دریافتند که افزایش میزان پراکندگی وزن بورس با افزایش سن پرند رابطه عکس دارد.

موراس و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی پاتوژنیسیته چند واکسن زنده بیماری گامبورو در بزبیل دریافتند که واکسن‌های حدت متوسط بر روی نسبت وزن بورس فابریسیوس به وزن بدن تأثیر ندارند و اختلاف معنی‌داری بین این واکسن‌ها و گروه شاهد وجود ندارد (۲۲).

مودهر و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات دو واکسن با حدت متوسط و حدت متوسط حاد را در جوجه‌های گوشتی بررسی و گزارش نمودند که واکسن با حدت متوسط حاد باعث آسیب‌های هیستوپاتولوژی در بورس فابریسیوس شده و در گروه کنترل و حدت متوسط تغییرات محسوس در بورس فابریسیوس دیده نشد (۲۳).

ارزیابی شاخص بورس یکی از مشخصه‌های مهم تشخیصی در مطالعه بیماری ناشی از ویروس گامبورو به شمار می‌رود. اندازه‌گیری شاخص بورس، اثرات احتمالی توسط سویه‌های بسیار حاد را روی بورس مشخص می‌سازد (۲۴) شوشتری و همکاران (۱۳۹۶) میانگین شاخص بورس در دو گله غیر واکسینه و آلوده به ویروس‌های بسیار حاد بیماری بورس عفونی را کمتر از سایر گله‌های مطالعه شده گزارش نمودند، این میانگین فقط در یک گله از لحاظ آماری کمتر بود. بنابراین به نظر می‌رسد پایین بودن شاخص بورس در این دو گله مربوط به آلودگی به ویروس بسیار حاد بیماری بورس عفونی می‌باشد. ایشان وجود رابطه مستقیم بین زمان آلودگی به ویروس و میزان تحلیل بورس مطرح نموده و آلودگی زودتر گله‌ی دارای شاخص

بر اساس نتایج مصرف واکسن گامبورو در گروه تیمار تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن بدن نسبت به گروه شاهد نداشته است.

با توجه به اینکه هدف ویروس واکسن گامبورو بورس فابریسیوس بوده و ممکن است سبب فعالیت و سازمان‌یابی یا تحلیل فولیکول‌های بورس و تغییرات پاتولوژیک در آنها شود (۱۶، ۲۱)، زاناه و همکاران (۲۰۲۰)، علاوه بر وجود ضایعات در سطح بورس و عضلات، وجود التهاب و خون‌ریزی در سطح کیسه‌های هوایی و نیز خون‌ریزی در سطح قلب را از نشانه‌های کالبدگشایی بورسیت عفونی در سروتیپ‌های مطالعه شده بر شمرده‌اند (۲۱) اندازه‌گیری وزن غده بورس فابریسیوس و به دست آوردن نسبت آن به وزن بدن یا تعیین شاخص بورس، یکی از روش‌های بررسی عملکرد و فعالیت ویروس گامبورو در طیور به شمار می‌آید (۹).

توت ساپول و همکاران (۲۰۲۱) تأثیر دو نوع واکسن گامبورو شامل سویه بسیار ویروولنت M.B و نیز سویه ویروس کلاسیک V217 را بر وضعیت تیترا واکسن نیوکاسل و همچنین بر وزن بورس و میزان ضایعات ایجاد شده در بورس را نشان دادند، تأثیر واکسن نوع کلاسیک V217 در ایجاد ایمنی هومورال علیه نیوکاسل به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بیش از واکسن بسیار ویروولنت M.B بود، همچنین در واکسن کلاسیک میزان تخریب بورس کمتر و میانگین وزن بورس بیشتر از واکسن ویروولنت بود (۳).

کازابان و همکاران (۲۰۱۵)، با تأکید بر اهمیت تعیین وزن و ابعاد بورس فابریسیوس در نژادهای مرغ گوشتی برای مدیریت سیستم ایمنی و سلامت پرند، در ۵۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر نژاد کاب روند تغییرات وزن بورس به وزن بدن را در شرایط عدم مصرف واکسن گامبورو و به دور از وقوع بیماری بررسی و از سن ۷ تا ۴۲ روزگی به‌طور متوسط

ایجاد ایمنی بر علیه ویروس گامبور و نیز افزایش نسبی وزن غده بورس فابرسیوس و بهبود شاخص بورس مؤثر بود.

سپاسگزاری

نگارنده از مساعدت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی و اداره کل دامپزشکی استان اصفهان سپاسگزار است.

کمتر و زمان بیشتر برای اثرات مخرب ویروس در آتروفی بورس گزارش نمودند (۶).

به‌طور کلی واکسن‌های مورد استفاده در این مطالعه که توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تولید شده است، ایمنی قابل قبولی را در جوجه‌های گوشتی نژاد آرین ایجاد نمود، همچنین مصرف واکسن گامبور 071IR IBD در گروه تیمار به‌طور مشخص و معنی‌دار ($P < 0.05$) در

References

- 1- Schat KA, Skinner MA. Avian Immunosuppressive Diseases and Immune Evasion. in Avian Immunology, In: Ltd E, editor. *Avian Immunology*, 2nd Edition, ed. San Diego, CA: Elsevier Ltd. 2014; 275–97.
- 2- Olah I, Nagy N, Verwelde L. Structure of the Avian Lymphoid System: in Avian Immunology, In: Ltd. E, editor. *Avian Immunology*. 2nd Edition ed. San Diego, CA.: Elsevier Ltd. 2014; 11–44.
- 3- Thomrongsuwannakij T, Charoenvisal N, Chansiripornchai N. Comparison of two attenuated infectious bursal disease vaccine strains focused on safety and antibody response in commercial broilers. *Veterinary World*. 2021; 14(1): 8.
- 4- Cazaban C, Palya V, Gardin Y. What a normal bursa of Fabricius should look like in the current chicken lines? *Acta Vet Hung*, in pres . 2015.
- 5- Saif Y, Fadly A, Glisson J, McDougald L, Nolan L, Swayne D. Diseases of Poultry 13th ed. *Blackwell Publishing Ltd. Iowa*. 2013.
- 6- Shoushtari AH. Survey to Detect Very Virulent Infectious Bursal Disease in Broiler Flocks Before Vaccination. *Veterinary Journal* (Pajouhesh & Sazandegi) No pp. 2016; 115: 42-9.
- 7- Asadpour Y, E R, H. S. Molecular Detection of Gumboro Disease Virus in Broiler Flocks with Acute Clinical Signs in Guilan Province. *Veterinary Researches & Biological Products*. 2016; 116.
- 8- Ashash U, Noach C, Perelman B, Costello C, Sansalone P, Brazil T, et al. In ovo and day of hatch application of a live infectious bursal disease virus vaccine to commercial broilers. *Avian Dis*. 2019; 63(4): 713-20.
- 9- Mayahi M, Talazadeh F, Allahdadi Varzane H. The effect of two non- cloned intermediate Iranian and foreign infectious bursal disease vaccines on broiler chicks performance. *Journal of Veterinary Research*. 2016; 71(4): 447-51.
- 10- Dey S. Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2019; 10: 85–97.
- 11- Zachar T, Popowich S, Goodhope B. 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan. *Canada Can J Vet Res*. 2016; 80(4): 255–61.
- 12- Cazaban C, Natalia Majo Masferrer, Pascual RD, Espadamala MN, Taiana Costa, Gardin Y. Proposed bursa of fabricius weight to body weight ratio standard in commercial broilers. *Poultry Science*. 2015; 94(9): 2088-93 .
- 13- Wagner B, Gardner I, Cameron A, G DM. Statistical analysis of data from surveys, monitoring, and surveillance systems. In: M.D. S, editor. *Animal Disease Surveillance and Survey Systems, Methods and Applications*. 1st ed. Iowa: *Blackwell Publishing*. 2003.
- 14- Alexander Dj. Newcastle Disease and other paramyxovirus Infections, . In: Calnek, editor. *Diseases of poultry Wolfe*; 2008. p. 496-513.
- 15- Alexander D. Newcastle disease in the European Union 2000-2009 (Review). *Avian Pathology*. 2011; 40(6): 58-547.
- 16- David E Swayne, John R Glisson, Larry

R. McDougald), Lisa K Nolan, David L. Suarez, Nair VL. Diseases of poultry. 13 ed. Iowa: Wiley Blackwell. 2013.

17- OIE. Vaccination: a tool for the control of avian influenza, Scientific Conference information document Verona Recommendations in Italy. In: c.-o.a.s.b.E.U. OIE/FAO/IZSve Scientific Conference, editor. OIE: VERONA; 2007.

18- Franzo G, Legnardi M, Claudia M T, Michele D, Martini M, Cecchinato M. Evolution of infectious bronchitis virus in the field after homologous vaccination introduction. *Vet Res.* 2019; 50-92.

19- Health. WOFA. Infectious Bursal Disease (Gumboro disease). In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2016: 931–51.

20- Christophe C, Masferrer NM, Roser D P, Espadamala MN, Taiana C, Gardin Y. Proposed bursa of fabricius weight to body weight ratio standard in commercial broilers. *Poultry Science.*

2015; 94: 2088–93.

21- Zannah M, Awaludin A, Rukmi DL, Nusantoro S, Budi S, Kusuma. Case Study on Genesis Infectious Bursal Disease (IBD) on Broiler chickens at PT. Aretha Nusantara Farm Bandung. *Journal of Livestock Science and Production.* 2020; 4(1): 7.

22- Moraes HLS, Salle CTP, Padilha AP, Nascimento VP, Padilha AP, Nascimento VP, et al. Infectious bursal disease: Evaluation of pathogenicity of commercial vaccines from Brazil in specific pathogen free chickens. *Braz J Poultry Sci.* 2004; 6: 243-7.

23- Mudhar ASA, Al-Mayah AAS. Histopathological changes of bursa fabricius of imported broilers and local chicks vaccinated with two types of infectious bursal disease vaccines. *Iraqi poult Sci J.* 2012; 6: 80-9.

24- Jackwood D, Jackwood D. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Disease.* 1997; 41(1): 97-104.

Evaluation of Bursa index of Razi Institute Gamburo vaccine in broilers breeding

Abdolreza Nabinejad^{*1}, Vahid Noaman², Kamaladdin Allameh³

1- Viral Poultry Disease Research Dept., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

2- Animal Parasitology Research, Dept., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3- Animal Sciences Research Dept., Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.

Receive: December 21, 2021; Revise: March 2, 2022; Accept: March 8, 2022

Summary

A number of 700 broiler chickens were selected and distributed based on Gamburo vaccination in two treatment and control groups at separate cages with normal feeding conditions. The general vaccination program included bronchitis, Newcastle disease and influenza. Gamburo vaccination used orally on days 14 and 20 in the treatment group but control group was not given. Antibody titers were measured for Newcastle disease and influenza by HI method and for bronchitis and Gamburo disease by ELISA method using biocheck kit. Based on the results in all samples, the mean titers at 45 days of age for Newcastle, influenza, Infectious bronchitis was 6.1, 4.20, and 2610, respectively, and the CV% of antibody titers was 31% for Newcastle, 49% for influenza, and 58% for bronchitis. The average Gamburo titer in the treatment group on days 1, 20, 33 and 45, were 11800, 5727, 6325 and 5797.8, and in the control group were 11800, 4501, 2298 and 1087, respectively. The CV% of Gamburo titers in the treatment group was 37.5%, 42%, 37% and 48%, and in the control group was 37.5%, 58%, 94% and 138% respectively. The ratio of averages of bursa weight to body weight (Bursa index) at the day of 20 and 45 in the treatment group was 0.21 and 0.23 but in the control group were 0.10 and 0.14 respectively. Therefore Gamburo vaccine IBD 071IR Razi Institute has a significant impact ($P < 0.05$) on increasing the titer of humoral antibodies and bursa index.

Keywords: Determining, Razi vaccine, broiler, Efficacy, Bursa weight

بررسی فراوانی تیلیریا اکوئی در اسب‌های منطقه ورامین با روش‌های رنگ‌آمیزی و مولکولی

علی اصغر شیرازی^۱، نادیا طایفی نصرآبادی^{۲*}، سیدرضا حسینی^۳

۱- دانش‌آموخته رشته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

۲- استادیار گروه آموزشی انگل‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۳- استادیار گروه آموزشی انگل‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۴ بهمن ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۳ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۸ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

تیلیریا اکوئی تک‌یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکسا و خانواده تیلریده می‌باشد که در گذشته بابزیا اکوئی نامیده می‌شد. این انگل عامل اصلی بیماری پیروپلاسموز اسب سانان (اسب، الاغ، گورخر و قاطر) است. این بیماری نه به خاطر گسترش سریع و اثرات مخرب بر روی اسب‌ها و مرگ و میر در موارد حاد بلکه به علت ضرر اقتصادی ناشی از ایجاد محدودیت‌های تجاری و ممنوعیت‌های مکانی در مناطقی که شیوع می‌یابد مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه خون از اسب‌های چهار منطقه مختلف در ورامین جمع‌آوری شد و سپس با روش رنگ‌آمیزی و مولکولی از نظر آلودگی مورد بررسی قرار گرفت همچنین وجود آلودگی در گروه‌های مختلف سن، جنس، نژاد، نوع نگهداری و فعالیت بدنی در نرم‌افزار Excel 2010 جمع‌آوری و طبقه‌بندی شد و سپس با نرم‌افزار SPSS با شماره ورژن ۲۵ و استفاده از آزمون مربع کای به تجزیه و تحلیل نتایج پرداخته شد. در این مطالعه ۷ درصد آلودگی وجود داشت که لزوم توجه به این بیماری را برای دامپزشکان نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: تیلیریا اکوئی، اسب، منطقه ورامین، روش رنگ‌آمیزی، روش مولکولی

مقدمه

نقاط جهان که دارای کنه‌های ناقل مناسب بودند، امروزه از اکثر مناطق مختلف جهان گزارش گردیده است. کنه‌های گونه ایکسودیده به‌عنوان ناقل اصلی در این انگل مطرح می‌باشند که در ایران گونه‌های مختلفی نظیر هیالوما، آناتولیکوم، آناتولیکوم، همافیزیالیس، پونکتاتا و ریپی سفالوس بورسا هستند که تقریباً تمام مناطق کشور به گونه‌های مشهورتر ناقل این انگل آلوده هستند و آلودگی به کنه‌های ناقل در مناطق مختلف فراگیر است. علاوه بر کنه‌ها، انسان، سایر حیوانات، وسایل آلوده، ابزار جراحی و انتقال خون به‌عنوان ناقلین مکانیکی این تک‌یاخته مطرح هستند. همچنین انتقال عمودی نیز در سطح گله‌ها مطرح است که می‌تواند منجر به سقط، مرده زایی و تولد کره‌های ضعیفی که مدتی بعد از تولد می‌میرند شود. مبتلایان تا پایان عمر ناقل محسوب می‌گردند و از ورود آنها به مناطق غیر آلوده جلوگیری به عمل می‌آید (۳-۵).

پیروپلاسماوز دارای فرم‌های فوق حاد، حاد، تحت حاد و مزمن می‌باشد که بیماری دارای نشانه‌های پاتوگنومونیک نیست و باید از سایر بیماری‌ها با علائم بالینی مشابه مانند: سورا*، کم‌خونی عفونی اسب[†]، دورین[‡]، پورپورای هموراژیک[§]، مریضی آفریقایی اسب** و از برخی مسمومیت‌ها تمیز داده شود، همچنین نشانه‌های درمانگاهی در بیماری پیروپلاسماوز ناشی از *بازیا کابالی* و *تیلریا اکوئی* مشابه است، اما تفریق بیماری ناشی از این دو تک‌یاخته برای توفیق در درمان حائز اهمیت است. علائم بالینی بیشتر در حیوانات ضعیف‌تر و یا دارای بیماری دیگر و حیواناتی که

تیلریا اکوئی (*Theileria equi*) تک‌یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکسا و خانواده تیلریده می‌باشد که در گذشته *بازیا اکوئی* (*Babesia caballi*) نامیده می‌شد، اما در سال ۱۹۹۸ و با تشخیص یک مرحله‌ی خارج از گلبول قرمز در اسب *بازیا اکوئی* به *تیلریا اکوئی* تغییر طبقه‌بندی داده شد (۱). این تک‌یاخته عامل اصلی بیماری پیروپلاسماوز اسب سانان (اسب، الاغ، گورخر و قاطر) است، این بیماری نه به خاطر گسترش سریع و اثرات مخرب بر روی اسب‌ها و مرگ و میر در موارد حاد بلکه به علت ضرر اقتصادی ناشی از ایجاد محدودیت‌های تجاری و ممنوعیت‌های مکانی در مناطقی که شیوع می‌یابد مورد توجه قرار گرفته است. صنعت اسب‌داری در کشور از صنایع نوپا و اشتغال‌زا محسوب می‌گردد که با مدیریت علمی و اصولی می‌توان به گسترش روزافزون این صنعت امید داشت و از ظرفیت‌های مناسب داخلی به خوبی بهره‌مند شد. شهرستان ورامین در مرکز کشور و در نزدیکی پایتخت واقع شده است و تاکنون در پایتخت شیوع این تک‌یاخته مورد ارزیابی قرار نگرفته بود، با توجه به فراوانی میزبان‌های واسط در مناطق مختلف کشور و منطقه مورد مطالعه، باشگاه‌های سوارکاری و نیز مجموعه‌های پرورش اسب در ورامین و نزدیکی به پایتخت تعیین میزان شیوع انگل ضروری به نظر می‌رسید. این بیماری در لیست قرنطینه‌ی سازمان بهداشت جهانی دامپزشکی (OIE) قرار دارد و از ورود مبتلایان و ناقلین به نقاطی که بیماری در آن وجود ندارد جلوگیری به عمل می‌آید (۲). پیروپلاسماوز اسب‌سانان به‌طور وسیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری گسترش یافته است، این بیماری ابتدا در تک سمی‌های قاره آسیا مشاهده گردید ولی با انتقال حیوانات آلوده به سایر

* Surra

† Equine infectious anemia

‡ Dourine

§ African horse sickness

** Purpura hemorrhagica

مطالعه ابتدا شهرستان به چهار قسمت شمال، جنوب، شرق و غرب و سپس از هر قسمت ۲۵ نمونه مجموعاً ۱۰۰ نمونه تهیه شد.

نمونه‌گیری از اسب‌های بالای شش ماه و در ماه‌های بهمن و اسفند سال ۱۳۹۹ انجام گردید، بدین صورت که ۲ میلی‌لیتر خون از ورید وداج اسب‌ها بعد از استریل کردن با پنبه و الکل در لوله‌های خون‌گیری استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA اخذ و شماره‌گذاری شد و در دفترچه‌ای مشخصات اسب‌ها شامل: شماره لوله، نام صاحب دام، تاریخ نمونه‌گیری، جنسیت، نژاد، نوع نگهداری و فعالیت بدنی و سن (سن اسب‌ها بر اساس اظهارات مالک اسب، فرمول دندانی و نیز جدول نام‌گذاری اسب‌های عرب در ایران بر اساس حروف الفبا و سال تولد میلادی تعیین شد) ثبت گردید.

از ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از نظر جنسیت (۵۹ نر و ۴۱ ماده) و از نظر رده سنی (۱۷ راس زیر دو سال، ۲۷ راس دو تا پنج سال و ۵۶ راس بالای پنج سال) سن داشتند و در نژادهای (۴۶ عرب، ۱۵ فریزین، ۱۱ ایرانی، ۱۱ KWPN، ۷ ترکمن، ۶ اسبچه خزر و ۴ پونی) بودند، همچنین از نظر فعالیت بدنی (۳۴ اسب اسبدوانی، ۱۸ اسب پرش و ۴۸ اسب به صورت خانگی) نگهداری می‌شدند.

رنگ‌آمیزی گسترش خونی با رنگ گیمسا:

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج یک قطره خون روی لام قرار گرفت و به کمک یک لام دیگر از این قطره یک گستره نازک تهیه گردید، سپس گستره‌های تهیه شده به مدت ۴ دقیقه در متانول ۹۹ درصد تثبیت شد و با محلول گیمسا ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد و سپس با آب مقطر شست و شو داده شد و در نهایت به کمک روغن ایمرسیون با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد از ریابی قرار گرفت که با بزرگ‌نمایی ۱۰۰، حدوداً ۳۰۰

تحت استرس‌های گوناگون نمود پیدا می‌کند. دوره کمون به دنبال نیش کنه آلوده ۱۰-۲۱ روز است و در صورتی که آلودگی با نشانه‌های درمانگاهی همراه باشد افسردگی، بی‌میلی به حرکت، خوابیدن، تب، ادم، کولیک خفیف و زردی دیده شده و مبتلایان ممکن است بسیار لاغر شده و خون‌ریزی‌هایی در مخاط مجاری بینی، واژن، پلک سوم مشاهده گردد و کاهش فعالیت تا مرگ ناگهانی قابل انتظار خواهد بود (۳، ۵، ۶).

طیف گسترده‌ای از روش‌های تشخیصی انگل‌شناسی، سرولوژی و مولکولی برای تیلریا اکوئی مورد استفاده قرار می‌گیرد، بسته به روش شناسایی انگل، میزان آلودگی حتی در یک گروه ثابت از دام‌ها نیز می‌تواند متفاوت و متغییر باشد. همچنین مرحله‌ای از بیماری که نمونه‌گیری در آن انجام می‌گردد در نتایج و نیز انتخاب روش یا روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مؤثر می‌باشد. با بررسی میکروسکوپی می‌توان تک‌یاخته را در داخل گلبول قرمز شناسایی کرد که بهترین زمان برای نمونه‌گیری در روش رنگ‌آمیزی در هفته ابتدایی بیماری می‌باشد، از مزایای روش رنگ‌آمیزی ارزانی و دسترسی ساده و امکانات کم که موجب سهولت در نمونه‌برداری، رنگ‌آمیزی و بررسی مستقیم انگل بر اساس خصوصیات شکل‌شناسی تک‌یاخته می‌توان اشاره کرد. در بین سایر روش‌های مولکولی و سرولوژی روش PCR دارای حساسیت و ویژگی مناسب برای تشخیص موارد تحت بالینی است، همچنین استفاده ترکیبی از چند روش برای شناسایی موارد حاد و تحت حاد مورد تأکید قرار گرفته است (۲، ۴).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: شهرستان ورامین در مرکز کشور و در نزدیکی استان تهران واقع شده است. در این

به تیلریا اکوئی به ازای ۱۰۰ گلبول قرمز تعیین گردید (۴).

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

ارزیابی DNA/استخراج شده: بررسی حضور تک‌یاخته تیلریا اکوئی در DNA های استخراج شده به وسیله پرایمرهای طراحی شده توسط هال و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت پذیرفت (۷).

گلبول قرمز در هر شان میکروسکوپی به وسیله میکروسکوپ نیکون مورد ارزیابی قرار گرفت، تعداد حداقل ۲۰۰ شان میکروسکوپی در هر گستره از نظر وجود پیروپلاسم تیلریا اکوئی به دقت مورد بررسی قرار گرفت و در صورت مشاهده یک انگل یا مورد مشکوک، نمونه به‌عنوان مشکوک برای ارزیابی مجدد کنار گذاشته شد و سپس مجدداً نمونه‌های مشکوک برای تأیید تشخیص و نیز ریزبینی گستره‌ها برای محاسبه شدت آلودگی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور تعداد گلبول قرمز آلوده

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمر طراحی شده توسط هال و همکاران و شماره دسترسی آن در بانک ژن

| شماره دسترسی (GenBank) | توالی نوکلئوتیدی |
|------------------------|---------------------------------------|
| JX177670 | F: 5'-AGCCATGCATGTCTAAGTACAAGCTTTT-3' |
| | R: 5'-TCCGAATAATTCACCGGATCACTC-3' |

بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder به اندازه ۱۰۰ جفت باز و ۱ کیلوباز و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات مرتبط با هر اسب ابتدا به وسیله نرم‌افزار Excel 2010 جمع‌آوری و طبقه‌بندی شد و سپس با نرم‌افزار SPSS با شماره ویرایش ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. ابتدا فراوانی آلودگی در گروه‌های مختلف محاسبه شد، سپس با استفاده از آزمون مربع کای مقایسه آماری بین فراوانی آلودگی در گروه‌های مختلف سنی، جنسی، نژادی و فعالیت بدنی و نوع نگهداری انجام پذیرفت و نتایج حاصل از روش مولکولی با نتایج حاصل از روش رنگ‌آمیزی مقایسه گردید.

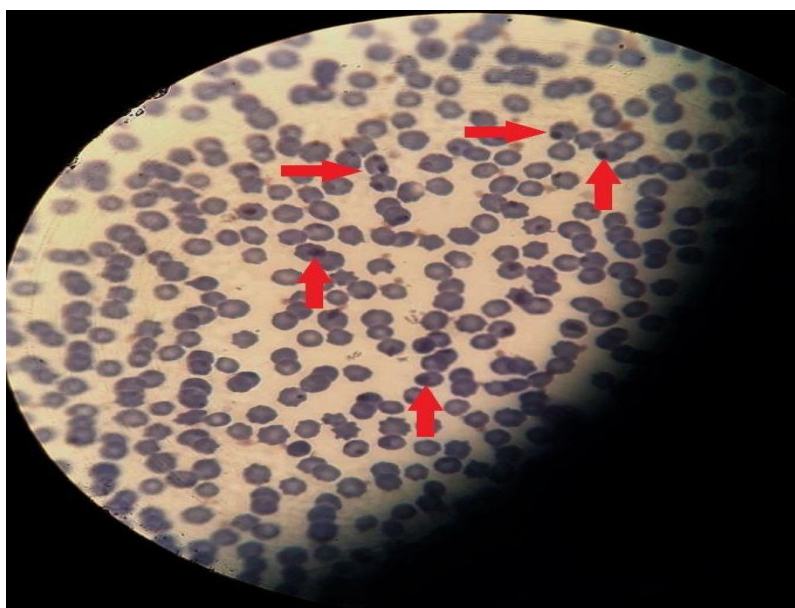
نتایج

بررسی نتایج روش رنگ‌آمیزی و مولکولی:

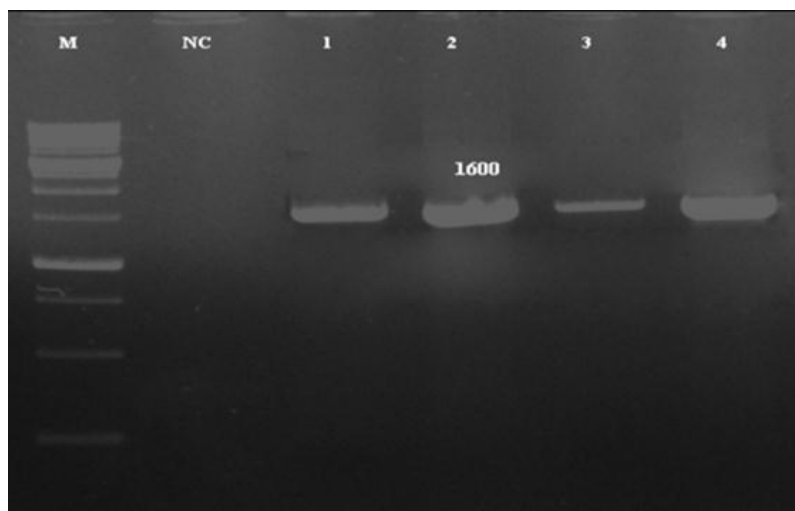
واکنش نهایی PCR واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱ میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرومول dNTPS، ۲ میلی‌مول MgCl₂ و ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Taq (فرمنتاس - لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، در نهایت محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت

سن داشتند (جدول ۳). ۴ اسب عرب، ۲ اسب فریزین و یک اسب ایرانی بودند و هیچ مورد مثبتی در نژادهای KWPN، ترکمن، اسبچه خزر، پونی مشاهده نگردید (جدول ۴). ۲ اسب برای اسب‌دوانی و کورس و ۵ اسب به‌عنوان خانگی نگهداری می‌شدند و مورد مثبتی در بین اسب‌های پرش مشاهده نشد (جدول ۵).

در بررسی با روش رنگ‌آمیزی گستره‌های خونی با توجه به پارامترهای بیومتریکی و مورفولوژیک شامل اندازه، محل و شکل انگل در گلبول‌های قرمز حیوان ۴ مورد مثبت مشاهده گردید (تصویر ۱) همچنین در روش مولکولی ۷ نمونه مثبت گزارش شد (تصویر ۲) که ۳ نمونه در هر دو تست مثبت بود. ۴ نر و ۳ ماده (جدول ۲) و ۳ اسب زیر دو سال و ۲ اسب بین دو تا پنج سال و ۲ اسب هم بالای پنج سال



تصویر ۱- تصویر گلبول‌های قرمز آلوده به تیلریا اکوئی از نمونه مثبت در روش رنگ‌آمیزی با بزرگ‌نمایی شیئی 100x (اجرام پیروپلاسمایی به وسیله آنوپلازما سنتنراله و ارلیشیا با هسته مجزا بنفش و سیتوپلاسم مشخص قابل تفکیک هستند)



تصویر ۲- باند ۱۶۰۰ bp مربوط به نمونه مثبت تیلریا اکوئی در روش مولکولی - ستون M مارکر ۱ کیلو بازی DNA - ستون NC نمونه کنترل منفی - ستون‌های ۱-۴ نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۶۰۰ جفت بازی

جدول ۲- فراوانی تیلریا اکوئی در منطقه ورامین بر اساس روش تشخیص و جنسیت

| روش تشخیصی | روش رنگ آمیزی | روش مولکولی | جنس |
|------------|---------------|-------------|-----|
| نر | ۱ (۱۱/۶۹) | ۴ (۶۱/۷۷) | |
| ماده | ۳ (۷۱/۳۱) | ۳ (۷۱/۳۱) | |
| مجموع | ۴ (۱۰۰/۱۰۰) | ۷ (۱۰۰/۷) | |

جدول ۳- فراوانی تیلریا اکوئی در منطقه ورامین بر اساس روش تشخیص و سن

| روش تشخیصی | روش رنگ آمیزی | روش مولکولی | سن |
|------------|---------------|-------------|----|
| ≤۲ | ۱ (۵۱/۸۸) | ۳ (۱۷/۶۴) | |
| ۲-۵ | ۰ | ۲ (۷۱/۴۰) | |
| ≥۵ | ۳ (۵۱/۳۵) | ۲ (۳۱/۵۷) | |
| مجموع | ۴ (۱۰۰/۱۰۰) | ۷ (۱۰۰/۷) | |

جدول ۴- فراوانی تیلریا اکوئی در منطقه ورامین بر اساس روش تشخیص و نژاد

| روش تشخیصی | رنگ آمیزی | روش مولکولی | نژاد |
|------------|-------------|-------------|------|
| عرب | ۴ (۸۱/۶۹) | ۴ (۸۱/۶۹) | |
| فریزین | ۰ | ۲ (۱۳/۳۳) | |
| ایرانی | ۰ | ۱ (۹/۰۹) | |
| KWPN | ۰ | ۰ | |
| ترکمن | ۰ | ۰ | |
| اسبچه خزر | ۰ | ۰ | |
| مجموع | ۴ (۱۰۰/۱۰۰) | ۷ (۱۰۰/۷) | |

جدول ۵- فراوانی تیلریا اکوئی در منطقه ورامین بر اساس روش تشخیص و نوع نگهداری و فعالیت بدنی

| روش تشخیصی | رنگ آمیزی | روش مولکولی | نوع نگهداری و فعالیت بدنی |
|-------------|-------------|-------------|---------------------------|
| اسبدوانی | ۲ (۵۱/۸۸) | ۲ (۵۱/۸۸) | |
| پرش | ۰ | ۰ | |
| حیوان خانگی | ۲ (۴۱/۱۶) | ۵ (۱۰/۴۱) | |
| مجموع | ۴ (۱۰۰/۱۰۰) | ۷ (۱۰۰/۷) | |

بحث

تا کنون مطالعات کمی با استفاده از روش‌های مولکولی در سطح جهان بر روی تک‌یاخته‌های خونی اسب صورت گرفته است و عمده روش‌های مورد استفاده روش رنگ‌آمیزی یا سرولوژیکی می‌باشد. در این مطالعه دو روش تشخیصی شامل رنگ‌آمیزی که معمول‌ترین روش جهت تشخیص

تک‌یاخته‌های خونی می‌باشد و تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز که یک روش اختصاصی با حساسیت و ویژگی بالاست مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفتند (۲). نتایج روش‌های رنگ‌آمیزی و مولکولی حاکی از آن است که ۷ درصد از نمونه‌ها مثبت بودند.

با توجه به میزان شیوع حاصله در این مطالعه به

نظر می‌رسد که این بیماری در منطقه ورامین به صورت اندمیک وجود دارد ولی شیوع آن بالا نمی‌باشد که می‌تواند دو علت داشته باشد: الف- مدیریت مناسب اسب‌داری‌ها و بهداشت بالای محیطی، رعایت اصول امنیت زیستی، شناسایی حیوانات بیمار و جداسازی و درمان و مبارزه مداوم با ناقلین. ب- فصل نمونه‌برداری که در فصول ازدیاد کنه‌ها نبوده است.

در آزمون آماری مربع کای انجام شده تمامی متغیرهای موجود اعم از سن، نژاد، جنس و نوع نگهداری و فعالیت بدنی در هر دو روش تشخیصی از یکدیگر مستقل بودند و هیچ ارتباط معناداری بین متغیرها مشاهده نگردید این نتایج با نتایج سایر مطالعات در داخل و خارج از کشور مانند: مالکی فرد و همکاران در سال ۲۰۱۴ که به جداسازی این تک‌یاخته با روش مولکولی و رنگ‌آمیزی در اسب‌های آذربایجان غربی پرداختند و ارتباط معناداری بین میزان شیوع و سن و جنسیت گزارش نکردند (۸)، کاکه‌خانی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ به بررسی میزان فراوانی این تک‌یاخته به روش مولکولی و رنگ‌آمیزی در اسب‌های کردستان پرداختند و تفاوت معناداری بین میزان شیوع و جنس و سن گزارش نکردند (۹)، که با مطالعات ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۸ در اسب‌های آذربایجان غربی (۱۰)، بهرامی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در استان یزد (۱۱)، آلبرتو دیاز سانچز و همکاران در غرب کوبا سال ۲۰۱۸ (۱۲) و علی و همکاران در سال ۲۰۲۱ در پنجاب پاکستان (۱۳) همخوانی دارد، اما در مطالعاتی نیز ارتباط معناداری بین میزان شیوع و سن، جنس، نژاد و نوع نگهداری و فعالیت بدنی گزارش گردیده است مانند: استینمن و همکاران در سال ۲۰۱۲ که به بررسی شیوع تیلریا اکوئی در ۵۹۰ اسب از ۴۶ مزرعه در اسرائیل با استفاده از تست PCR پرداختند که ۱۵۶ مورد

(۲۶/۴ درصد) مثبت گزارش شد و تفاوتی در بین جنس و سن برای افزایش شانس ابتلا مشاهده نشد اما تفاوت در میزان شیوع بین نژادهای مختلف معنادار بود و در نژادهای بومی با میزان شیوع (۳۶/۳ درصد) نسبت به اسب‌های دارای نژاد خالص مانند عرب (۹ درصد) و تروبرد (۱۰ درصد) اختلاف معناداری داشتند (۱۴)، آیلا والدو وینوس و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی فراوانی تیلریا اکوئی در غرب مکزیک با روش PCR پرداختند و از ۱۰۰۰ نمونه جمع‌آوری شده ۱۹۷ مورد (۱۹/۷ درصد) مثبت گزارش شد همچنین تفاوت معناداری بین دو جنس و نژادهای مختلف مشاهده نشد اما نویسندگان گزارش کردند که با افزایش سن شانس ابتلا به تیلریا اکوئی افزایش می‌یابد و بیشترین نرخ ابتلا (۲۵/۰۵ درصد) در سن بالای ۴ سال و کمترین نرخ ابتلا (۱۰/۳۴ درصد) در سن کمتر از یک سالگی گزارش گردیده است (۱۵).

نتیجه‌گیری

از آنجا که استان تهران یکی از کانون‌های پرورش اسب در ایران است و امروزه پرورش اسب در این منطقه به یک صنعت تبدیل شده است و با توجه به اهمیت پیروپلاسموز در صنعت اسب‌داری و زیان اقتصادی ناشی از آن و با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و مطالعات دیگر در کشور می‌توان بیماری ناشی از تک‌یاخته تیلریا اکوئی را یکی از بیماری‌های مهم و قابل توجه در تک‌سمیان محسوب نمود که می‌بایست توجه بیشتری به این بیماری و تلاش برای پیشگیری و درمان آن در استان تهران صورت گیرد. همچنین لزوم توجه بیشتر دامپزشکان به این بیماری و درمان آن نیز به‌عنوان یکی از الویتهای کاری برای دامپزشکان شاغل در این بخش از صنعت در کشور محسوب می‌گردد. همچنین این احتمال وجود دارد که میزبان‌های واسط اختصاصی که در انتقال این

کنه‌های سخت میزبان واسط نیز بایستی در الویت‌های بهداشتی در اسب‌داری‌ها باشد و به صورت منظم برای مقابله با میزبان‌های واسط برنامه‌ریزی و انجام پذیرد.

آلودگی نقش دارند نیز به‌عنوان یکی از الویت‌های محققین برای پژوهش‌ها مطرح باشد. همچنین با توجه به اینکه این بیماری به صورت اندمیک در این منطقه وجود دارد، برنامه سمپاشی و حذف و کنترل

References

- 1- Mehlhorn H, Schein E. Redescription of Babesia equi Laveran, 1901 as Theileria equi Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitology research*. 1998; 84(6): 467-75.
- 2- Rothschild CM. Equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013; 33(7): 497-508.
- 3- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. Veterinary medicine-e-book: a text-book of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. *Elsevier Health Sciences*. 2016; 811-813.
- 4- De Waal DT. Equine piroplasmosis: a review. *British Veterinary Journal*. 1992; 148(1): 6-14.
- 5- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Veterinary parasitology. *John Wiley & Sons*. 2015; 475-484.
- 6- Smith BP. Large animal internal medicine, 3rd edn, Mosby. ISBN: 0-323-00946-B. 2002; 814-817.
- 7- Hall CM, Busch JD, Scoles GA, Palma-Cagle KA, Ueti MW, Kappmeyer LS, et al. Genetic characterization of Theileria equi infecting horses in North America: evidence for a limited source of US introductions. *Parasites & vectors*. 2013; 6(1): 1-2.
- 8- Malekifard F, Tavassoli M, Yakhchali M, Darvishzadeh R. Detection of Theileria equi and Babesia caballi using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. *In Veterinary research forum: an international quarterly journal*. 2014; 5(2): 129 [In Persian].
- 9- Kakekhani S, Rahbari S, Madani R, Bokaei S. Molecular and microscopic detection of Theileria equi and Babesia caballi in horses in Kurdistan Province, Iran. *Archives of Razi Institute*. 2017; 72(1): 51-5 [In Persian].
- 10- Ebrahimi M, Adinehbeigi K, Hamidinejat H, Tabandeh MR. Molecular characterization of Theileria equi infection in horse populations belonging to West Azerbaijan, Iran: insights into the importance of Equine Merozoite Antigen (EMA)-1 in its diagnosis. *Annals of parasitology*. 2018; 64(1). [In Persian].
- 11- Bahrami S, Ghadrardan AR, Mirabdollahi SM, Fayed MR. Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. *Trop Biomed*. 2014; 31(1): 110-7 [In Persian].
- 12- Díaz-Sánchez AA, Pires MS, Estrada CY, Cañizares EV, del Castillo Domínguez SL, Cabezas-Cruz A, et al. First molecular evidence of Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in Cuba. *Parasitology research*. 2018; 117(10): 3109-18.
- 13- Ali S, Ijaz M, Farooqi SH, Durrani AZ, Rashid MI, Ghaffar A, et al. Molecular characterisation of Theileria equi and risk factors associated with the occurrence of theileriosis in horses of Punjab (Pakistan). *Equine Veterinary Education*. 2021; 33(2): 75-83 [In Persian].
- 14- Steinman A, Zimmerman T, Klement E, Lensky IM, Berlin D, Gottlieb Y, et al. Demographic and environmental risk factors for infection by Theileria equi in 590 horses in Israel. *Veterinary Parasitology*. 2012; 187(3-4): 558-62.
- 15- Ayala-Valdovinos MA, Lemus-Flores C, Galindo-García J, Bañuelos-Pineda J, Rodríguez-Carpene JG, Sánchez-Chiprés D, et al. Diagnosis and prevalence of Theileria equi horses in western Mexico by nested PCR. *Parasitology international*. 2017; 66(1): 821-4.

Prevalence of *Theileria equi* in horses of Varamine's area by staining method and molecular method

Ali Asghar Shirazi¹, Nadia Taiefi Nasrabadi*², Sayyed Reza Hoseini³

1- D.V.M. Faculty of Veterinary Medicine, karaj branch, Islamic Azad University, karaj, Iran.

2- Associate professor of Department of Pathobiology, karaj branch, Islamic Azad University, karaj, Iran.

3- Associate professor of Department of Pathobiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: January 24, 2022; Revise: March 4, 2022; Accept: March 9, 2022

Summary

Theileria equi is a protozoan of the Apicomplexa phylum and the family *Theileridae*, before known as *Babesia equi*. This parasite is the main cause of equine piroplasmosis (horses, donkeys, zebras and mules). The disease has been noted not because of its rapid spread and devastating effects on horses and mortality in acute cases, but because of the economic losses caused by trade restrictions and limitations in areas where it is prevalent. In this study, blood samples were collected from 100 horses from four different regions in Varamin and then its result was investigated from the perspective of infection by staining and molecular methods. Furthermore, the presence of infection in different groups including age, sex, breed, type of maintenance and bodily activity was collected and classified with the assistance of Excel 2010 software and afterwards we analyzed the data with SPSS software by version number 25 and also using chi-square test. Finally, we concluded that there was 7% contamination, which demonstrates that paying attention to this disease would be essential for veterinarians.

Keywords: *Theileria equi*, Horse, Varamin region, staining method, molecular method

بررسی اثرات ضد لیشمانیائی عصاره روغنی (*Pistacia atlantica*) پسته کوهی (بنه) بر پروماستیگوت لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) در شرایط برون تنی

میلاذ دولتیاپی^۱، غزاله ادهمی^{۲*}، یحیی معروفی^۳

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

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

۳- استادیار گروه علوم پایه دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۳ دی ۱۴۰۰، بازنگری: ۲۰ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۵ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

لیشمانیوز یک زئونوز، تک‌یاخته‌ای و از معضلات بهداشت عمومی می‌باشد. استفاده از ترکیبات آنتی‌موان پنج ظرفیتی به‌عنوان داروهای شیمیایی در درمان لیشمانیازیس جلدی همراه با محدودیت‌ها و عوارض جانبی متعدد می‌باشند. امروزه عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از آنها منابع نوید بخشی در طب گیاهان دارویی هستند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثر عصاره روغنی (*Pistacia atlantica*) منطقه اورامانات در استان کردستان ایران بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی بود. در این مطالعه، غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰ درصد عصاره روغنی (*Pistacia atlantica*) به پلیت حاوی سویه استاندارد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور اضافه شد. اثر بخشی غلظت‌های مختلف عصاره روغنی با روش رنگ‌سنجی MTT (3-(4,5)-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) و شمارش پروماستیگوت‌های زنده تعیین گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد غلظت‌های مختلف عصاره روغنی اثر مهاری بر روی پروماستیگوت لیشمانیا داشته و غلظت ۵۰ درصد عصاره روغنی بیشترین تأثیر را نشان داد. نتایج مطالعه نشان داد بین تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در غلظت‌های مختلف عصاره روغنی و زمان‌های مختلف مورد مطالعه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه) اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P \leq 0.05$). نتایج مطالعه نشان داد که عصاره روغنی این گیاه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر مطلوبی بر لیشمانیا ماژور دارد. لذا ارزیابی تأثیر عصاره روغنی گیاه بر زخم لیشمانیائی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت، پسته کوهی، MTT.

لیشمانیوز بیماری منتقله از بندپایان می باشد که ۴۰۰ میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به آن هستند (۲۱). لیشمانیوز معضل بهداشت عمومی و بیماری اندمیک در ۸۸ کشور می باشد. بعد از مالاریا، لیشمانیوز مهم ترین بیماری انگلی به شمار می رود (۲۱). لیشمانیوز جلدی متداول ترین فرم لیشمانیوز است که به صورت وسیع کشورهای فقیر و توسعه یافته را درگیر کرده است (۸). این عفونت همه گیر به وسیله جنس *لیشمانیا* با دامنه وسیعی از تظاهرات بالینی از اشکال بدون علامت تا زخم های سطحی جدی توسط *لیشمانیا مائزور* ایجاد می شود (۱۲). لیشمانیوز از طریق نیش پشه خاکی به انسان منتقل می شود (۶). ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیمنوان به عنوان داروهای خط اول در درمان لیشمانیوز جلدی در نظر گرفته می شود اما تجویز این داروها با اشکالات متعددی مرتبط است از آن جمله می توان به عدم دسترسی به دارو، هزینه بالای دارو، تزریق دردناک، طول دوره کمون طولانی، عوارض جانبی سمی جدی بر روی کلیه ها و قلب، بازگشت مجدد بیماری، بافت اسکار، و مقاومت داروئی اشاره کرد (۱۴). انسان از زمان های قدیم محصولات طبیعی و عصاره های گیاهی را جهت درمان بیماری های متعدد به دلیل عوارض جانبی کم، قیمت ارزان و در دسترس بودن بالای آنها به کار برده است (۱۵). یکی از این گیاهان مورد توجه که به طور وسیعی در طب سنتی ایران استفاده می شود، پسته کوهی می باشد (۱۶).

بر اساس مطالعات گذشته گیاه داروئی پسته کوهی کردی (بنه) به صورت سنتی به عنوان عامل درمانی در عفونت های مختلف به کار رفته است (۱۶). بنه یا پسته کوهی (*Pistacia atlantica*) *subsp. Kurdica* یک گیاه از خانواده آناکاردیاسه می باشد که بومی ایران بخصوص در منطقه اورامانات

استان کردستان غرب ایران می باشد (۱۹). ترکیبات موجود در آن نظیر آلفا توجن (α -Thujene)، آلفا پینن (α -Pinene)، کامفن (Camphene)، سابینن (Sabinene)، بتا پینن (Pinene)، لیمونن (Limonene)، و ترکیبات فنلی موجود در آن به گیاه خواص ضد میکروبی بخشیده است (۳).

بهره برداری از پسته کوهی تاریخچه طولانی در کردستان داشته و به صورت سنتی در درمان بیماری زخم معده و التیام زخم ها به کار رفته است (۲۲). پسته کوهی گونه کردی یک گیاه کوهی بومی کردستان می باشد که به طور وسیعی در کوهستان های زاگرس کردستان پراکنده شده است (۵). طبق گزارشات، در مطالعات متعدد بخش های مختلف گیاه دارای اثرات بیولوژیکی نظیر فعالیت ضد التهابی می باشد (۷). همچنین طبق گزارشات، عصاره روغنی گیاه اثرات ضد میکروبی قابل توجهی دارد (۱۳). در مطالعات دیگر همچنین به ویژگی های فارماکولوژیکی متعدد پسته کوهی نظیر فعالیت ضد باکتریائی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد انگلی در برابر تعدادی از گونه های بیماری زا اشاره شده است (۱۷). بنه (*pistacia atlantica*) از خانواده آناکاردیاسه، یکی از گونه های پسته کوهی در ایران است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی فعالیت ضد لیشمانیائی عصاره روغنی پسته کوهی گونه *kurdica* بر پروماستیگوت های *لیشمانیا مائزور* می باشد.

در مطالعات صورت گرفته توسط Mutoro و همکاران بر روی بادمجان تاجریزی (*Solanum nigrum*)، محمودوند و همکاران بر روی عصاره متانولی مورد (*Myrtle*)، میرزائی و همکاران بر روی عصاره اسپند، احمدی رنانی و همکاران بر روی عصاره سیر، شمشادی و همکاران بر روی هندوانه کوهی (*Caparis Spinoza*)، فرقی و همکاران بر روی عصاره الکلی بلوط حلبی، محمودوند و همکاران

کشت پروماستیگوت‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف عصاره روغنی بنه: به پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط کشت RPMI، لیشمانیا ماژور همراه با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی در پلیت‌های ۹۶ خانه با تراکم 4×10^4 انگل در هر میلی‌لیتر (شمارش با استفاده از لام نئوبار) در ۳ تکرار عصاره روغنی بنه به نسبت ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد محیط کشت اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید (۱۱).

تست ارزیابی زنده ماننی پروماستیگوت: ارزیابی میزان تکثیر پروماستیگوت، به‌وسیله شمارش سلول‌های انگل با لام هماسیتومتر (نئوبار) قبل و بعد از اضافه کردن عصاره روغنی بنه در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون انجام شد (۳۳). گروه کنترل منفی شامل پروماستیگوت کشت داده شده در سه تکرار بدون عصاره روغنی بنه بوده و سپس IC_{50} محاسبه گردید (۱۱).

تست سنجش MTT: در این روش، آنزیماتیک به‌عنوان سوبسترای واکنش از نمک‌های محلول تترازولیوم که مهم‌ترین آنها MTT است استفاده می‌شود. MTT قادر به عبور از غشا سلول‌ها می‌باشد. آنزیم دهیدروژناز میتوکندریائی قادر است پس از ورود MTT به سلول‌های سالم حلقه تترازولیوم آن را بشکند و آن را به فورمازان نامحلول و آبی رنگ تبدیل کند. در حالی که سلول‌های مرده از این عمل ناتوان هستند. به وسیله این آزمایش ساده و دقیق می‌توان پاسخ سلول‌های مختلف را به داروهای سایتوتوکسیک ارزیابی کرد. این روش نسبت به سایر روش‌ها ساده‌تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجرا است. به علاوه کلیه مراحل آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید (۱۱).

قابلیت زنده‌مانی پروماستیگوت‌ها با سنجش MTT ارزیابی شد. پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در پلیت‌های ۹۶ خانه به تعداد 4×10^4 در هر چاهک در حضور غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ عصاره

بر روی عصاره الکلی پسته، ابراهیمی صدر و همکاران بر روی جعفری فرنگی (*Chaerophyllum*)، برازجانی و همکاران بر روی *Arnebia Euchroma* عزت‌پور و همکاران، بر روی گیاهان فوق‌واجد اثرات ضد لیشمانیائی بوده‌اند. از آنجا که داروهای گیاهی از لحاظ قیمت مقرون به صرفه است و نیز معمولاً فاقد عوارض داروهای شیمیائی می‌باشد می‌توانند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیائی باشند (۲۱، ۱۸، ۲۰، ۴، ۲۴، ۱۴، ۱۷، ۱۲، ۱۰، ۱۳).

جهت تشخیص لیشمانیوز از روش‌های مختلف می‌توان استفاده کرد. الایزا یکی از تکنیک‌های بکار گرفته جهت تشخیص لیشمانیوز می‌باشد که در آن تعداد زیادی نمونه را می‌توان همزمان آزمایش کرد (۱۱).

مواد و روش‌ها

کشت انگل: سویه استاندارد لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) جهت کشت انگل از آزمایشگاه دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 به همراه پنی‌سیلین (Iu/ml ۱۰۰)، استرپتومایسین (mg/ml ۱۰۰) و ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FCS) غیر فعال شده با حرارت کشت داده شد (۱۷). سپس ۳ بار با سالین فسفات بافر (PBS) شستشو داده شده و در ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد (۲۰). پس از کشت انگل محیط‌های کشت به‌طور مرتب از نظر رشد پروماستیگوت، تعداد و حرکت آنها و آلودگی ثانویه مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد گیاهی: پسته وحشی پس از جمع‌آوری در منطقه اورامانات، تمیز کردن و شستشو با آب معمولی، توسط جریان هوا خشک و سپس توسط دستگاه خردکن به صورت پودر درآورده شده و پس از مالش‌های متوالی در دستگاه پرس، عصاره (روغن) آن گرفته شد (۹). گیاهان جمع‌آوری شده توسط مرکز تحقیقات کشاورزی دامپرووری و گیاهان داروئی دانشگاه آزاد سنندج تأیید شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای مقایسه نتایج اثربخشی غلظت‌های مختلف در زمان‌های متفاوت گروه‌های آزمون و کنترل، از روش ANOVA یک طرفه و نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شده و سطح معنی‌داری $P < 0/5$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج اثرات سایتوتوکسیک عصاره روغنی بنه بر *لیشمانیا مازور* در جدول (۱)، اثرات ممانعت از رشد چهار غلظت عصاره روغنی بنه بر پروماستیگوت‌ها در زمان‌های مختلف درج شده است. اثرات ممانعت‌کنندگی از رشد وابسته به دوز بوده، به گونه‌ای که غلظت‌های ۱۰ درصد بعد از ۲۴ ساعت و غلظت ۵۰ درصد پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون به ترتیب کمترین و بیشترین درصد مرگ و میر را نشان دادند. کمترین تعداد پروماستیگوت در هر میلی‌لیتر در ۷۲ ساعت پس از کشت در غلظت ۵۰ درصد $41633/3 \pm 186/6 \times 10^4$ بود ($P < 0/5$) (جدول ۱).

روغنی بنه در ۲۴ درجه انکوبه شدند (۹). پروماستیگوت‌های بدون عصاره روغنی در محیط کشت با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد (۳۳). ۳ چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت همچنین به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از انکوباسیون چاهک‌ها، ۲۰ میکرولیتر MTT (۱۷ mg/ml) به چاهک‌ها اضافه شده و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت در ۲۴ درجه و اتاق تاریک صورت گرفت (۱۱). چاهک‌ها سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به پلیت‌ها اضافه شده و مجدد انکوباسیون صورت گرفت. بعد از ۱۰ دقیقه، جذب نوری چاهک‌ها (OD) به‌وسیله الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. درصد زنده‌مانی به‌وسیله فرمول محاسبه گردید.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار پروماستیگوت‌های *لیشمانیا مازور* در زمان‌های مورد بررسی در محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف

| p-value<0/05 | ۷۲ ساعت پس از مواجهه | ۴۸ ساعت پس از مواجهه | ۲۴ ساعت پس از مواجهه | قبل از مواجهه | |
|--------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------|
| | $452 \times 10^4 \pm 0/000$ | $449 \times 10^4 \pm 0/000$ | $443 \times 10^4 \pm 0/000$ | $440 \times 10^4 \pm 0/000$ | کنترل مثبت |
| | $330 \times 10^4 \pm 5/0000$ | $371 \times 10^4 \pm 5/000$ | $10^4 \times 338 \pm 32145/5$ | $440 \times 10^4 \pm 0/000$ | غلظت ۱۰٪ |
| | $271/3 \times 10^4 \pm 102632/1$ | $305/3 \times 10^4 \pm 4932/8$ | $360/6 \times 10^4 \pm 95043/8$ | $440 \times 10^4 \pm 0/000$ | غلظت ۱۵٪ |
| | $256 \times 10^4 \pm 242693/2$ | $279 \times 10^4 \pm 121243/5$ | $292/3 \times 10^4 \pm 125033/3$ | $440 \times 10^4 \pm 0/000$ | غلظت ۲۵٪ |
| | $186/6 \times 10^4 \pm 41633/3$ | $221 \times 10^4 \pm 50332/3$ | $226 \times 10^4 \pm 50332/3$ | $440 \times 10^4 \pm 0/000$ | غلظت ۵۰٪ |

P<0/5

لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در سراسر دنیا می‌باشد (۲۴). طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی قریب به ۳۵۰ میلیون نفر در ۸۸ کشور دنیا در معرض مخاطرات این بیماری می‌باشند. سالانه حدود ۱-۲ میلیون نفر به موارد ابتلا جدید افزوده می‌شود. حدود ۹۰ درصد از مبتلایان به لیشمانیوز جلدی ساکن کشورهای افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و

در ارزیابی اثر کشندگی عصاره روغنی بنه بر رشد پروماستیگوت *لیشمانیا مازور* نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت عصاره روغنی بنه قدرت زنده‌مانی پروماستیگوت‌ها کاهش یافت. ۳۷ درصد پروماستیگوت‌ها، ۷۲ ساعت پس از کشت انگل تیمار شده با غلظت ۵۰ درصد عصاره روغنی گیاه از بین رفتند ($P < 0/5$) (جدول ۲).

بحث

بررسی اثرات ضد لیشمانیائی عصاره روغنی پسته کوهی (بنه) بر پروماستیگوت ...

لیشمانیا، ایجاد مقاومت بر علیه داروها و طولانی بودن دوره درمانی این داروها و نبود واکنش مؤثر بر علیه آن علیرغم سرمایه‌گذاری‌های ملی و بین‌المللی همگی دلالت بر اهمیت این بیماری زئونوتیک دارد (۱).

سوریه می‌باشند. لیشمانیوز جلدی از زمان‌های دور در ایران وجود داشته و امروزه کشور ما یکی از کانون‌های مهم این بیماری در جهان محسوب می‌شود. هزینه‌های درمانی، نا کارآمدی روش‌های کنترل ناقصین و مخازن، عوارض داروهای ضد

جدول (۲). میانگین OD، درصد زنده مانی و درصد کشتندگی در زمان‌های مورد بررسی در محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف

| ۲۴ ساعت پس از مواجهه | ۴۸ ساعت پس از مواجهه | ۷۲ ساعت پس از مواجهه | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------|----------|
| ۰/۳۳۹ | ۰/۳۳۳ | ۰/۳۲۸ | OD | کنترل |
| ۹۶ | ۹۲ | ۸۸ | درصد زنده مانی | |
| ۴ | ۸ | ۱۲ | درصد کشتندگی | |
| ۰/۳۳۴ | ۰/۳۲۸ | ۰/۳۲۱ | OD | غلظت ۱۰٪ |
| ۹۲ | ۸۹ | ۸۵/۵ | درصد زنده مانی | |
| ۸ | ۱۱ | ۱۴/۵ | درصد کشتندگی | |
| ۰/۳۳۱ | ۰/۳۲۴ | ۰/۳۱۸ | OD | غلظت ۱۵٪ |
| ۹۰/۵ | ۸۷ | ۸۴ | درصد زنده مانی | |
| ۹/۵ | ۱۳ | ۱۶ | درصد کشتندگی | |
| ۰/۳۲۷ | ۰/۳۲۰ | ۰/۳۱۹ | OD | غلظت ۲۵٪ |
| ۸۸/۵ | ۸۵ | ۶۹/۵ | درصد زنده مانی | |
| ۱۱/۵ | ۱۵ | ۳۰/۵ | درصد کشتندگی | |
| ۰/۲۹۳ | ۰/۲۸۱ | ۰/۲۷۶ | OD | غلظت ۵۰٪ |
| ۷۱/۵ | ۶۵/۵ | ۶۳ | درصد زنده مانی | |
| ۲۸/۵ | ۳۴/۵ | ۳۷ | درصد کشتندگی | |

بنه تأثیرات مطلوب درمانی بر روی پروماستیگوت لیشمانیا مازور دارد و استفاده از عصاره روغنی بنه باعث کاهش تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور گردید. اثربخشی عصاره روغنی بنه بر پروماستیگوت‌های انگل با توجه به مقایسه تعداد انگل در گروه کنترل با گروه‌های آزمون در زمان‌های مختلف وابسته به غلظت و زمان است و با افزایش غلظت عصاره روغنی و زمان تأثیر، تعداد انگل کاهش می‌یابد. تعداد پروماستیگوت‌ها پس از کشت در بالاترین غلظت استفاده شده، پس از ۲۴ ساعت از کشت به $10^4 \times 226$ کاهش یافت، در حالی که در گروه کنترل، تعداد پروماستیگوت‌ها به $10^4 \times 443$ رسید و تعداد پروماستیگوت‌ها پس از ۷۲ ساعت به $10^4 \times 186/6$ کاهش یافت که نشان از تأثیر مطلوب

در ذکر اهمیت لیشمانیوز جالب است که بدانیم ساخت داروی مؤثر بر علیه لیشمانیوز هفتمین اولویت پژوهشی تحقیقاتی WHO می‌باشد و علیرغم انجام پژوهش‌های گسترده در این زمینه هنوز درمان مشخصی برای این بیماری یافت نشده و روزانه شاهد موارد جدید ابتلا به بیماری هستیم (۲).

لذا توسعه داروهای کمتر سمی، ارزان، مؤثر و در دسترس از اهم امور بوده و داروهای گیاهی بهترین جایگزین می‌باشند (۲۲). در میان طیف وسیعی از گیاهان، آن دسته که سابقه طولانی مصرف به‌عنوان غذا یا دارویی در طب سنتی را داشته‌اند از اهمیت بیشتری در مطالعات بیولوژیکی برخوردارند (۲۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره روغنی

در سایر مطالعات صورت گرفته همچنین اثرات ضد لیشمانیائی سیر، چای سبز، سیاه دانه، حنا، درمنه، آویشن و شیرین بیان اشاره شده است (۲).

نتیجه گیری

امروزه استفاده از داروهای گیاهی در درمان بیماری‌های انگلی و به‌خصوص لیشمانیوز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در سال‌های اخیر، از عصاره و اسانس گیاهان مختلف برای درمان سالک استفاده شده است (۹). پسته کوهی گیاه بومی غرب ایران می‌باشد و نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که عصاره روغنی این گیاه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر مطلوبی بر لیشمانیا مازور دارد. لذا بررسی تأثیر گیاه بر زخم لیشمانیائی توصیه می‌شود.

عصاره روغنی بنه بر پروماستیگوت‌های انگل دارد. طبق نتایج آزمون MTT نیز با افزایش زمان انکوباسیون و افزایش غلظت عصاره روغنی، درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های انگل کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که ۷۲ ساعت پس از کشت و در غلظت ۵۰ درصد، این میزان به ۶۳ درصد رسید که نتایج به‌دست آمده از آزمون MTT با روش شمارش همخوانی داشت.

در مطالعه اسکندری و همکاران عصاره‌های ترخون و بابونه دارای فعالیت ضد لیشمانیائی قابل توجهی بودند. در مطالعات دیگر فعالیت ضد لیشمانیائی عصاره گیاه سدآب، گل همیشه بهار، اکیناسه، باجاری، آلوئه، یونجه سیاه، آلوئه ورا، درمنه کوهی، آنقوره و قوزه پنبه گزارش شده است (۱).

References

- 1- Farivand S, Doodi M, Shoai Gh. Evaluation of anti-leishmaniasis effect of alcoholic extract of black alfalfa leaves (*Medicago lupulina*) on promastigotes of *Leishmania major* (MRHO / IR / 75 / ER) in vitro by MTT and microscopic methods and determination of its compounds by GC / MS method. *Journal of Medicinal Plant*. 2017; 16(61): 77-93 [In Persian].
- 2- Fooladvand M, Borazjani M, Khorami S. Evaluation of anti-leishmaniasis effect of extracts of three species of native Persian Gulf's marine animals in vitro. *Armaghane danesh Journal*. 2020; 25(4): 438-450 [In Persian].
- 3- Matini M, Bakhtiyar Nejad S, Dastan D, Maghsood A, Fallah M. Investigation of in-vitro efficacy of pistacia atlantica subsp. kurdica extracts against trichomonas vaginalis. *Stud Med Sci*. 2018; 29(3): 198-207 [In Persian].
- 4- Ahmadi-Renani K, Mahmoodzadeh A, Cheraghali AM, Esfahani AA. Effect of garlic extract on cutaneous leishmaniasis and the role of nitric oxide. *Iranian J Med Sci*. 2015; 27(3): 97-100 [In Persian].
- 5- Ahmed HM. Traditional uses of Kurdish medicinal plant *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* Zohary in Ranya, Southern Kurdistan. *Genet Resour Crop Evol*. 2017; 64(6): 473-1484.
- 6- Ahua KM, Ioset JR, Ioset KN, Diallo D, Mauël J, Hostettmann K. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *J Ethnopharma*. 2007; 110(1): 99-104.
- 7- Amri O, Zekhnini A, Bouhaimi A, Tahrouch S, Hatimi A. Anti-inflammatory Activity of Methanolic Extract from *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *Pharma J*. 2018; 10(1): 71-76.
- 8- Beaufay C, Nghiem DT, Mingeot-Leclercq MP, Quetin-Leclercq J. In Vitro Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Vietnamese Plants. *Molecules*. 2017; 22(7): 1071.
- 9- Bonyadian M, Hejazi H, Azizi H, Habibi-an S, Sayahi E. Antileishmania activity of *Levandula officinalis* oily extract against *Leishmania major* in in vitro media. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2015; 1: 1-17 [In Persian].
- 10- Borazjani R, Aminnia S, Rastegarian M, Hosseini M, Ghanbarinasab Z, Ashkani-Esfahani S, et al. Effect of Hydroalcoholic Extract of *Arnebia Euchroma* on the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. 2018; 12(8): 21-23 [In Persian].
- 11- Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F,

Sadraei J. In vitro study on cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iranian Journal of Parasitology*. 2014; 9(1): 1-6 [In Persian].

12- Ebrahimisadr P, Majidiani H, Bineshian F, Jameie F, Ghasemi E, Ghaffarifar F. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Chaerophyllum Extract on *Leishmania major* and J774 Cell Line in Vitro. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2017; 12(3): e38948 [In Persian].

13- Ezatpour B, Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Azadpour M, Ezzatkah F. In vitro and in vivo antileishmanial effects of Pistacia khinjuk against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 1: 149707 [In Persian].

14- Farghi Yamchi A, Dabirzadeh M, Maroufi Y. In Vitro Effect of Methanolic Extract of *Quercus infectoria* Galls on Promastigotes and Amastigotes of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Medical Laboratory Journal*. 2018; 12(5): 23-28.

15- Hesami G, Bahramian S, Fatemi A, Hesami S. Effect of Pistacia atlantica subsp. kurdica essential oil and acetic acid on *Botrytis cinerea* growth in culture media and strawberry fruits. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 2014; 3(2): 100-106 [In Persian].

16- Khodavaisy S, Rezaie S, Noorbakhsh F, Baghdadi E, Sharifynia S, Aala F. Effects of Pistacia atlantica subsp. kurdica on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Jundishapur journal of microbiology*. 2016; 9(7): e35452 [In Persian].

17- Mahmoudvand H, Doostishoar F. Effects of Pistacia vera methanolic extract against *Leishmania major* promastigotes. *Scholars Research*

Library. 2016; 8(10): 136-139 [In Persian].

18- Mahmoudvand H, Lalehmarzi HS, Falahi S, Baharanchi MM, Bayat P, Jahanbakhsh S. Antileishmanial Activity of Myrtle Methanolic Extract against *Leishmaniamajor*: an In Vitro Study. *Herbal Medicines Journal*. 2017; 22(6): 122-125 [In Persian].

19- Minaiyan M, Karimi F, Ghannadi A. Anti-inflammatory effect of Pistacia atlantica subsp. kurdica volatile oil and gum on acetic acid-induced acute colitis in rat. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2015; 2(2): 1-12 [In Persian].

20- Mirzaie M, Nosratabadi SJ, Derakhshfar A, Sharif I. Antileishmanial activity of Peganum harmala extract on the in vitro growth of *Leishmania major* promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug. *Veterinarski Arhiv*. 2007; 77(4): 365-371 [In Persian].

21- Mutoro CN, Kinyua JK, Kariuki DW, Ingonga JM, Anjili CO. In vitro study of the efficacy of Solanum nigrum against *Leishmania major*. *F1000Research*. 2018; 7: 1329.

22- Ozbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gunduz C, Ural A, et al., Antileishmanial activity of selected turkish medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 13(12): 2047-2055.

23- Rahimi AR, Hadian J, Azizi M, Abdosi V, Larijani K. Quantity and Quality of Essential Oil of Pistacia atlantica Subsp. Kurdica in Response to Gradual Harvest of Oleoresin. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016; 19(3): 616-623.

24- Shemshadi B, Ranjbar-Bahadory S, Ahmadi H. Effect of Caparis spinosa root extract on promastigotes and amastigotes of *Leishmania major*. *Journal of Paramedical Sciences*. 2015; 6(1): 1-15.

Effect of *Pistacia atlantica* (kurdica) oil extract on promastigotes of *Leishmania major*

Milad Dolatyabi¹, Ghazaaleh Adhami^{2*}, Yahya maroufi³

1- Veterinary graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Veterinary Pathobiology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

3- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

Accept: February 24, 2022 Receive: January 3, 2022, Revise: February 9, 2022,

Summary

Leishmaniasis is a protozoan zoonosis that causes problems in public health. The use of pentavalent antimony compounds as chemical drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis are associated with various limitations and side effects. Today, the plant extracts and their derivations are the promising sources in herbal medicine. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of oil extract *Pistacia atlantica* from Uramanat area in Kurdistan province, Iran, on promastigotes of standard strain *Leishmania major in vitro*. In this study, 10, 15, 25, and 50% concentrations of oily extract were added to the plate containing promastigotes of *Leishmania major*. The effectiveness of different concentrations of extract was determined by MTT (3-[4, 5- (dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric method and counting of living promastigotes. The results of present study showed, different concentrations of oil extract has an inhibitory effect on promastigotes of *Leishmania* and the extract 50% has the most effect. The results showed a significant different between in the number of promastigotes of *Leishmania major* in different concentrations of extract and exposure times (24, 48, and 72 hours) ($P \leq 0.05$). The results show that extract of *pistacia atlantica* has an appropriate effect on *Leishmania major in vitro*. Therefore, it is suggested to be evaluated the effect of the extract *Pistacia atlantica* on leishmaniasis wounds.

Keywords: *Leishmania major*, *Promastigotes*, *Pistacia atlantica*, *MTT*

بررسی میزان شیوع ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک در باکتری‌های /شیریشیاکلی مقاوم به تتراسایکلین جداسازی شده از ضایعات بیماری کلی باسیلوز طیور

محمود نخعی^{۱*}، محمد جهانتیغ^۲، محسن نجیمی^۳، سعید سالاری^۳

۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ شهریور ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۲ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۵ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

از مدت‌ها قبل آنتی‌بیوتیک‌ها اولین خط دفاعی برای جلوگیری از عفونت /شیریشیاکلی بودند، اما از آنجا که باکتری‌ها به‌طور فزاینده‌ای در برابر درمان مقاوم شده‌اند، قدرت خود را از دست داده‌اند. تحقیق حاضر با هدف بررسی مقاومت به تتراسایکلین‌ها و شیوع ژن‌های مقاومت *tetA* و اینتگرون کلاس یک در /شیریشیاکلی جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز انجام شد. با انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام در این مطالعه 96/6 درصد از جدایه‌های /شیریشیاکلی مقاوم به یک یا هر دو آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین و تتراسایکلین بودند. نتایج آزمایش نشان داد 98/2 درصد از باکتری‌های /شیریشیاکلی مقاوم به تتراسایکلین جداسازی شده از ضایعات بیماری کلی‌باسیلوز حامل *tetA* می‌باشند. میزان شیوع ژن اینتگرون کلاس یک 98/2 درصد می‌باشد. همچنین 96/5 درصد از جدایه‌های این باکتری حامل هر دو ژن اینتگرون کلاس یک و *tetA* می‌باشند. با در نظر گرفتن نتایج، شیوع دو ژن *tetA* و اینتگرون کلاس یک در این تحقیق نسبت به سایر پژوهش‌های انجام گرفته به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است که این تفاوت می‌تواند بیانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیاد در مرغداری‌های این منطقه باشد که بر لزوم استفاده محتاطانه از تتراسایکلین‌ها در تولید طیور برای کاهش شیوع /شیریشیاکلی مقاوم در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها تأکید می‌کند.

واژگان کلیدی: اینتگرون کلاس یک، *tetA* /شیریشیاکلی، کلی‌باسیلوز، تتراسایکلین

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات، از جمله طیور، اغلب برای درمان یا پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند (۱، ۲). مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک توسط دام‌ها یک مشکل جهانی است که می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های انسانی و حیوانی مانند /شیریشیالکی را افزایش دهد (۳، ۴). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های طیور و انتقال این توانایی به دست آمده به باکتری‌های انسانی می‌تواند درمان عفونت‌های انسانی را مختل کند (۳).

تتراسایکلین‌ها آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده‌ای هستند که به‌طور وسیع در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت استفاده می‌شوند (۵). خانواده تتراسایکلین‌ها را باید متشکل از دو رده عمومی از داروها دانست. تتراسایکلین‌های قدیمی‌تر شامل تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین می‌باشد که آب دوست بوده و دامنه اثر ضد باکتریایی و نحوه‌ی اثر آنها در بدن یکسان است. دومین رده از تتراسایکلین‌ها در برگیرنده داروهای جدیدتر مانند داکسی‌سایکلین و مینوسایکلین هستند که در چربی بیشتر حل می‌شوند و بهتر از تتراسایکلین‌های قدیمی در بافت‌ها نفوذ می‌کنند، داکسی‌سایکلین آنتی‌بیوتیک به‌دست آمده از آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین می‌باشد و به خاطر ویژگی‌های خاص جایگاه ویژه‌ای در گروه تتراسایکلین‌ها دارد. همچنین دسترسی زیستی این دارو برای دستگاه گوارش بهتر می‌باشد. نتایج مطالعات نشان داده است که استفاده از داکسی‌سایکلین برای درمان کلی‌باسیلوز تجربی در جوجه‌های گوسی از طریق آب آشامیدنی مؤثر بوده و اثرات درمانی ناشی از آن مشابه تتراسایکلین و فلومکوتین می‌باشد (۶، ۷). این داروها از اتصال aminoacyl-tRNA به زیر واحد ۳۰ ریبوزومی جلوگیری کرده و سنتز پروتئین را، مختل می‌کنند

که مانع رشد باکتری‌های حساس می‌شود (۵). به دلیل مزایای بی‌شمار تتراسایکلین‌ها، از جمله در دسترس بودن گسترده، هزینه کم و عوارض جانبی اندک، استفاده از این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های حیوانی و انسانی در سال‌های اخیر افزایش یافته است (۸). این امر منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم به تتراسایکلین شده است که اکنون استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها را محدود کرده است (۹).

بررسی‌های ژنوتیپی که توسط دانشمندان ژاپنی در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، نشان می‌دهد، برخی از سویه‌های /شیریشیالکی به دلیل وجود ژن مقاومت در برابر بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند و از آنجایی که به روش‌های مختلف مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها قادر به انتقال عوامل ژنتیکی مقاومت به سویه‌های دیگر هستند، شاهد افزایش قابل توجه این مقاومت‌ها هستیم (۱۰). ارزیابی اپیدمیولوژیک مولکولی سویه‌های مقاوم به این ترکیبات می‌تواند دانش ما را در مورد درمان‌های مناسب گسترش دهد و از اتلاف سرمایه جلوگیری کند (۱۳). مکانیسم اصلی مقاومت به تتراسایکلین از طریق کسب ژن‌های *tet* عمدتاً شامل عملکرد پمپ بیرون‌ریز، محافظت از ریبوزوم و غیر فعال سازی آنزیمی است. جهش‌ها همچنین به مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک می‌کنند (۱۲). ژن‌های *tet* موجود در باکتری‌های گرم منفی عمدتاً مربوط به پمپ بیرون‌ریز هستند که توسط ژن‌های *tetA tetB tetC tetD tetG* و کدگذاری می‌شوند (۱۴)، (۱۵). در بسیاری از موارد، مشخص شده است که مقاومت چندگانه با پلاسمیدهای قابل انتقال مرتبط است و اهمیت اینتگرون‌ها در اکتساب ژن‌های مقاومت به‌عنوان ناقل اصلی مقاومت چندگانه در باکتری‌های گرم منفی و تا حد کمتری در باکتری‌های گرم مثبت است (۱۱، ۱۴). اینتگرون‌ها

دارد. این مطالعه بینش جدیدی را برای توضیح دو ژن رمزگذار مقاومت در برابر تتراسایکلین‌ها فراهم می‌کند که ممکن است به‌طور هم‌افزایی مقاومت ضد میکروبی را در برابر تتراسایکلین‌ها در جدایه‌های اشریشیاکلی افزایش دهند. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی مقاومت در برابر تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین و شیوع دو ژن مقاومت به آنها (*tetA* و اینتگرون کلاس یک) در اشریشیاکلی جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در مزارع گوشتی منطقه سیستان انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌ها:

جمعیت مورد مطالعه شامل جوجه‌های گوشتی صنعتی مبتلا به کلی‌باسیلوز، می‌باشد. نمونه‌گیری از هشت مزرعه گوشتی طی سال ۹۹ در منطقه سیستان، ایران انجام شد. پس از کالبدگشایی و شناسایی ضایعات مربوطه، در مجموع ۱۰۰ نمونه از جوجه‌های آلوده گرفته شد. به این صورت که از ضایعات اندام‌های داخلی با استفاده از یک سواب استریل نمونه‌برداری شد و سپس سواب در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Tryptic Soy Agar قرار گرفت و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس در محیط کشت مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) کشت داده شد (مرک ، آلمان). جدایه‌های اشریشیاکلی از ضایعات مربوط به کلی‌باسیلوز تهیه و با استفاده از روش‌های دقیق میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی شد. به‌طور خلاصه، جدایه‌های باکتریایی دارای کلنی تیبیک در محیط‌های مک کانکی آگار و EMB آگار که لاکتوز، ایندول و متیل رد مثبت، در حالی که VP ، سیترات، اوره آز و H₂S منفی بودند به‌عنوان *E. coli*

از جمله عوامل ژنتیکی متحرکی هستند که می‌توانند ژن‌های مقاومت به ترکیبات ضد باکتریایی را حمل کنند و با محل‌های خاصی از ژنوم ترکیب شوند (۱۷، ۱۸). تا کنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده است، اما ژن‌های مسئول به مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی اغلب با اینتگرون کلاس ۱ همراه هستند (۱۹). ساختار پایه اینتگرون‌های کلاس ۱ شامل دو بخش محافظت شده (CS) است که معمولاً توسط یک ناحیه متغیر که شامل کاست‌های متحرک حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک است، از هم جدا می‌شوند (۳۵). ناحیه اختصاصی سیستم نوترکیب بین *attI* و *attC* باعث شده است که آرایه متنوعی از عوامل تعیین کننده مقاومت توسط اینتگرون‌های کلاس ۱ ترسیم شوند (۱۱، ۳۵، ۳۶). ناحیه‌های کدکننده کاست‌های ژنی فاقد پروموتور هستند. با این حال، اکثر کاست‌هایی که ژن‌های مختلف مقاومت ضد میکروبی را رمزگذاری می‌کنند با بیش از ۱۳۰ ژن مقاومت قابل تشخیص تا کنون پیدا شده است (۳۷). در مطالعه‌ای که در کشور کره بر روی جدایه‌های اشریشیاکلی صورت گرفت ارتباط مثبتی بین جدایه‌های دارای ژن *int1* و *tetA* مشاهده شد که این امر تأیید می‌کند که جدایه‌های حاوی ژن *tetA* به احتمال زیاد حامل اینتگرون‌های کلاس ۱ هستند (۱۶). این مشاهدات قبلاً توسط دیگران نیز گزارش شده است، آنها دریافتند که اینتگرون کلاس یک و *tetA* بر روی یک پلاسمید قابل انتقال بزرگ یا سایر عناصر ژنتیکی در اشریشیاکلی همزیستی دارند و ارتباط بین ژن‌های *tetA* و اینتگرون‌های کلاس یک را تأیید می‌کند (۴۱، ۴۲).

استراتژی‌های جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیاز به نظارت بر ژن‌های رمزگذار آن

در نظر گرفته شدند (۴۳).

تست حساسیت ضد میکروبی: برای مطالعه مقاومت به تتراسایکلین نمونه‌ها، از روش دیسک دیفیوژن روی محیط مولر-هینتون آگار (مرک، آلمان) با دو دیسک آنتی‌بیوتیک شامل داکسی‌سایکلین (۳۰ µg) و تتراسایکلین (۳۰ µg) استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از شرکت هامون طب، تهران، ایران تهیه گردید. بدین منظور، ابتدا کلونی‌های خالص باکتری جداسازی شده در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی حل گردید تا کدورت آن برابر کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند شود. نمونه باکتری از این لوله بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط کشت قرار گرفت. محیط‌های کشت به دستگاه انکوباتور منتقل و نتیجه آزمایش پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر ناحیه مهار اندازه‌گیری و نتایج بر اساس دستورالعمل CLSI تفسیر گردید، بدین صورت که نتایج با قطر کمتر مساوی ۱۱ میلی‌متر مقاوم به تتراسایکلین و برای آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین نتایج با قطر کمتر مساوی ۱۰ میلی‌متر مقاوم به داکسی‌سایکلین در نظر گرفته شد (۴۴).

استخراج ژنوم باکتری: به جهت استخراج

DNA باکتری‌ها، ابتدا باکتری/شریشیاکلی را در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن پنج دقیقه در 3600 سانتریفیوژ گردید. با حذف مایع رویی (supernatant) قسمت رسوب شده (pellet) را در 200 µl آب دوبار تقطیر حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه در

دستگاه Thermomixer قرار گرفت و در نهایت برای مدت ۱۰ دقیقه در 15000 g سانتریفیوژ گردید و مایع رویی آن به‌عنوان DNA در میکروتیوب 200 µl در دمای 20- نگهداری و ذخیره شد.

واکنش PCR و تکثیر ژن tetA و اینتگرون

کلاس یک: برای تکثیر ژن tetA و اینتگرون کلاس یک (int1) از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس معمولی (Conventional PCR) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR در جدول ۱ آمده است. برای بررسی ژن‌های مورد نظر از توالی تأیید شده در مطالعات قبلی استفاده شد (۲۰، ۲۱). در واکنش PCR برای نمونه کنترل مثبت از نمونه‌ای که بهترین باند را در محدوده مورد نظر داشت استفاده شد و برای نمونه کنترل منفی از تمام موارد مورد استفاده برای واکنش بجز نمونه DNA استفاده گردید. برنامه کامل PCR برای ژن‌های مورد نظر در جداول ۲ و ۳ آمده است. تمامی پرایمرها و محلول‌ها از شرکت پیشگام تهران ایران تهیه گردید. واکنش PCR با حجم 16 µl شامل 2 µl از DNA الگو، 8 µl محلول مستر میکس، 1 µl از هر کدام از پرایمرهای بالا دست و پایین دست و 4 µl آب مقطر استفاده شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن در محلول اتیدیوم بروماید (سیناژن، ایران) در دستگاه ژل داگ (کمبریج، آلمان) مورد مطالعه قرار گرفتند.

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از

آزمون آماری Likelihood ratio کای و ضریب همبستگی فی کرامر استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن های *IntI* و *tetA*

| ژن هدف | توالی پرایمر | وزن باند | نام پرایمر | رفرانس |
|--------|----------------------------------|----------|------------|--------|
| IntI | 5' - GGCATCCAAGCAGCAAG-3' | متغیر | intI-F | ۲۱ |
| | 5' -AAGCAGACTTGACCTGA-3' | | intI-R | |
| TetA | 5' -CGCCTTTCCTTGGGTTCTCTATATC-3' | ۱۸۲ | tetA-F | ۲۰ |
| | 5' -CAGCCCACCGAGCACAGG-3' | | tetA-R | |

جدول ۲- برنامه استفاده شده در واکنش PCR برای تکثیر ژن های *tetA*

| مرحله | تعداد سیکل | دما (درجه سانتی گراد) | زمان (ثانیه) |
|--------------|------------|-----------------------|--------------|
| واسرشت اولیه | ۱ | ۹۴ | ۳۰۰ |
| واسرشت شدن | ۳۵ | ۹۴ | ۳۰ |
| اتصال آغازگر | ۳۵ | ۵۵ | ۳۰ |
| بسط | ۳۵ | ۷۲ | ۳۰ |
| بسط نهایی | ۱ | ۷۲ | ۳۰۰ |

جدول ۳- برنامه استفاده شده در واکنش PCR برای تکثیر ژن های *IntI*

| مرحله | تعداد سیکل | دما (درجه سانتی گراد) | زمان (ثانیه) |
|--------------|------------|-----------------------|--------------|
| واسرشت اولیه | ۱ | ۹۴ | ۱۸۰ |
| واسرشت شدن | ۳۵ | ۹۴ | ۳۰ |
| اتصال آغازگر | ۳۵ | ۵۶ | ۴۰ |
| بسط | ۳۵ | ۶۸ | ۴۰ |
| بسط نهایی | ۱ | ۷۲ | ۳۰۰ |

نتایج

نتایج مربوط به جداسازی باکتری ها: از مجموع ۱۰۰ جوجه گوشتی کالبدگشایی شده، ۶۰ جدایه مثبت/اشریشیاکلی جداسازی و با آزمایشات استاندارد بیوشیمیایی شناسایی و تأیید شده و برای آزمایش های بعدی استفاده گردید.

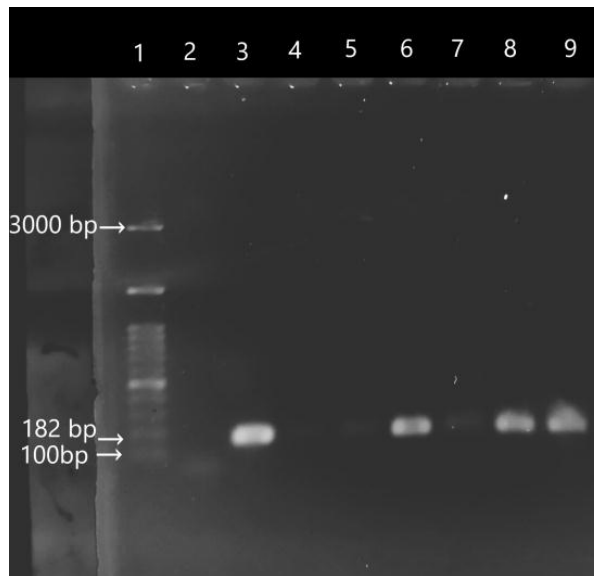
الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک ها: در این مطالعه 96/6 درصد (۵۸ نمونه) از جدایه های اشریشیاکلی مقاوم به یک یا هر دو آنتی بیوتیک مورد بررسی بودند همچنین میزان جدایه های مقاوم به هر دو آنتی بیوتیک 93/3 درصد مشاهده شد.

میزان ۹۵ درصد نمونه ها مقاوم به تتراسایکلین، و به همین میزان به داکسی سایکلین مقاوم بودند.

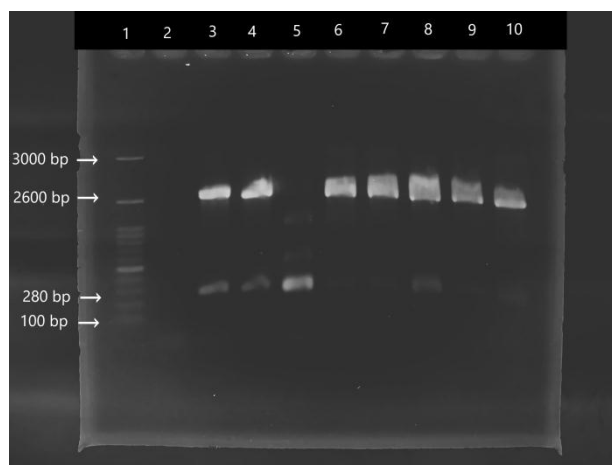
واکنش PCR و تکثیر ژن های *tetA* و اینتگرون کلاس یک: نتایج آزمایش نشان داد 98/2 درصد از باکتری های اشریشیاکلی مقاوم به تتراسایکلین جداسازی شده از ضایعات بیماری کلی باسیلوز حامل *tetA* می باشند که وزن باند آن در محدوده ۱۸۲ مشاهده شد (شکل ۱). میزان شیوع ژن اینتگرون کلاس یک 98/2 می باشد و وزن باندهای اینتگرون نیز در محدوده های 280 الی 2600 جفت باز مشاهده گردید (شکل ۲). همچنین 96/5

وجود ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک و مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ($P < 0.05$).

درصد از جدایه‌های این باکتری حامل هر دو ژن می‌باشند. ارتباط آماری معنی‌داری بین شیوع ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک مشاهده نشد ($P < 0.05$). همچنین ارتباط آماری معنی‌داری بین



شکل ۱- نتایج PCR معمولی برای جستجوی *tetA* (ستون شماره یک مارکر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز، ستون شماره ۲ نمونه کنترل منفی و ستون شماره ۳ کنترل مثبت)



شکل ۲- نتایج PCR معمولی برای جستجوی اینتگرون کلاس یک (ستون شماره یک مارکر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز، ستون شماره ۲ نمونه کنترل منفی و ستون شماره ۳ نمونه کنترل مثبت)

و خطر بسیار کمی از نظر عوارض جانبی دارد. علاوه، تتراسایکلین یکی از ارزانه‌ترین عوامل ضد میکروبی موجود است (۲۹). در این مطالعه، مقاومت در برابر هردو آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه برای

بحث

تتراسایکلین بیشترین آنتی‌بیوتیک استفاده شده در درمان و کنترل بیماری‌های مختلف طیور است. تتراسایکلین می‌تواند به صورت خوراکی تجویز شود

بررسی میزان شیوع ژن های *tetA* و اینتگرون کلاس یک در باکتری‌های اشریشیاکلی ...

بسیاری از جدایه‌ها مشاهده شد، 96/6 درصد جدایه‌های اشریشیاکلی مقاوم به یک یا هر دو آنتی‌بیوتیک مورد بررسی بودند که این مقاومت می‌تواند به دلیل استفاده بیش از اندازه از ترکیبات تتراسایکلین در تولید و پرورش طیور باشد در مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شده است، فراوانی مقاومت به تتراسایکلین در اشریشیاکلی جدا شده از کلی‌باسیلوز در ایران 95/8 درصد گزارش شده است که مشابه نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد (38). علاوه بر این، شیوع مقاومت ضد میکروبی اشریشیاکلی جدا شده از بوقلمون در ایران، برای تتراسایکلین 51/7 درصد بود (22). Adesiyun و همکاران (2007) میزان مشابهی از مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی را در بین اشریشیاکلی‌های جدا شده از تخم‌مرغ به تتراسایکلین (58/5 درصد) گزارش کردند (23).

تاکنون مطالعات زیادی در مورد رابطه بین شیوع اینتگرون‌ها و مقاومت‌های دارویی چندگانه یا مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک در سویه‌های اشریشیاکلی صورت گرفته است (24، 25). در مطالعه حاضر بسیاری از جدایه‌ها حامل ژن اینتگرون کلاس یک بودند، میزان شیوع این ژن در جدایه‌های مقاوم به تتراسایکلین 98/2 درصد مشاهده شد. در مطالعه انجام شده توسط کهن سال (2018) میزان مقاومت جدایه‌های اشریشیاکلی را در برابر تتراسایکلین 91/5 درصد گزارش نمود که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد همچنین میزان شیوع اینتگرون کلاس یک را 48/75 درصد گزارش نمودند که کمتر از نتایج این مطالعه می‌باشد (26). در مطالعه‌ای مشابه انجام شده توسط Cavicchio و همکاران در سال 2015 میزان شیوع اینتگرون کلاس یک را 49/8 درصد از تعداد 299 نمونه اشریشیاکلی بیماریزای طیور (APEC) گزارش نمودند (39). در پژوهشی دیگر که توسط Oosterik و همکاران در

سال 2014 روی مرغان تخم‌گذار انجام گرفت در 96 نمونه APEC جدا شده 21/6 درصد اینتگرون کلاس یک گزارش شد، همچنین وابستگی معنی‌داری بین وجود اینتگرون و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مشاهده شد (40). در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن *tetA* در جدایه‌های مقاوم به تتراسایکلین 98/2 درصد مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر انجام شده توسط Sandalli و همکاران (2010) حضور ژن‌های مقاوم به تتراسایکلین متعدد در اشریشیاکلی گزارش شده است. آنها مشاهده کردند که ژن *tetA* می‌تواند به خوبی در اشریشیاکلی بیان شده و متعاقباً به تتراسایکلین مقاومت نشان دهد (28). Chopra و Roberts (2001) گزارش کرده‌اند که *tetA* باعث ایجاد مقاومت در برابر تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و کلر تتراسایکلین می‌شود (29). در مطالعه روی گوشت و فرآورده‌های گوشتی، Woo و Koo (2011) مشاهده کردند که بسیاری از جدا شده‌ها (98/3 درصد) حداقل یک ژن *tet* دارند که 52/4 درصد *tetA* را نشان می‌دهد که این میزان کمتر از نتایج این تحقیق می‌باشد (12). Guerra و همکاران (2003) شیوع *tetA* را 66 درصد در اشریشیاکلی جدا شده از گاو، خوک و طیور گزارش کرد (30). Maynard و همکاران (2004)، در یک مطالعه بر روی اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های انسانی و حیوانی، نشان داد که فراوانی *tetA* بیشتر از *tetB* در جدا شده از هر دو منبع است (31). سیفی و خوشبخت (2016) در مطالعه‌ای انجام شده در ایران گزارش دادند که 73 درصد از سویه‌های *E. coli* جدا شده از گله‌های گوشتی مورد مطالعه مقاوم به تتراسایکلین بودند و علاوه بر این 46 درصد جدا شده‌ها حاوی ژن *tetA* می‌باشند (32). در مطالعه انجام شده توسط اسدی و همکاران در سال 97 بر روی برخی از ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی در

بیماری‌های طیور مفید باشد. با توجه به نتایج ما، شیوع دو ژن *tetA* و اینتگرون کلاس یک در این تحقیق نسبت به سایر پژوهش‌های انجام گرفته به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است که این تفاوت می‌تواند بیانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیاد در مرغداری‌های این منطقه باشد که احتمالاً به دلیل استفاده فراوان و غیر اصولی از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی طیور باشد. از آنجایی که انتقال افقی اینتگرون‌ها تحت عنوان موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و مقاومت چندگانه مطرح می‌باشد بنابراین نتیجه شیوع بالای اینتگرون‌ها مطمئناً ایجاد و گسترش هرچه سریع‌تر گونه‌های مقاوم به درمان است و روز به روز، درمان بیماری‌های طیور و حتی بیماری‌های انسانی با مشکلات بیشتری مواجه می‌شود. با شناسایی انواع ژن‌های مسئول مقاومت، ممکن است رویکردهای مؤثرتری برای درمان بیماری‌های عفونی ایجاد شود. بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه بر لزوم استفاده محتاطانه از تتراسایکلین‌ها در تولید طیور برای کاهش شیوع *E. coli* مقاوم در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها تأکید می‌شود. با این حال، همچنین توصیه می‌شود که برای کاهش مقاومت ضد میکروبی و درمان مؤثرتر بیماری‌های عفونی طیور، از آنتی‌بیوتیک‌های کلاس‌های مختلف و تست آنتی‌بیوگرام استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی و ژنتیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل نهایت قدردانی و تشکر را دارد. شماره گرنت: UOZ-GR-7846.

شریشیاکلی جدا شده از کلی‌باسیلوز در طیور گوشتی آنها دریافتند که بیشترین ژن موجود در جدایه‌های شریشیاکلی *tetA* می‌باشد که شیوع آن را ۶۳/۸۵ درصد گزارش کردند (۳۸). Belaynehe و همکاران بیان داشته‌اند که همه جدایه‌های شریشیاکلی مورد مطالعه دارای حداقل یک ژن *tet* بوده و ۹۵ درصد از سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین دارای *tetA* یا *tetB* می‌باشند، همچنین ۵۱/۱ درصد دارای فقط *tetA* می‌باشند، بعلاوه ارتباط مثبتی بین جدایه‌های دارای ژن *tetA* و *int1* مشاهده شد (۱۶). در بررسی دیگر که نتایجی مشابه تحقیق حاضر داشت توسط Mohamed و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور اندونزی بر روی شریشیاکلی جدا شده از سبزیجات انجام شد آنها مشاهده کردند که تمام جدایه‌ها مقاوم به تتراسایکلین بوده و حاوی ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک می‌باشند (۳۳).

به دلیل آن که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعددی می‌توانند در اینتگرون قرار داشته باشند، وزن باندهای اینتگرون متغیر می‌باشد. در مطالعه حاضر وزن باندهای اینتگرون در محدوده‌های 280 الی 2600 جفت باز مشاهده شد. Roe و همکاران (۲۰۰۳) وزن باندهای اینتگرون کلاس یک را در محدوده ۶۸۰ الی ۲۰۰۰ جفت باز گزارش نمودند (۲۷). که این اختلاف می‌تواند بیانگر تفاوت توالی ژنی اینتگرون باکتری‌های شریشیاکلی جدا شده در منطقه مورد مطالعه در تحقیق حاضر باشد که احتمالاً دارای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری هستند.

ارزیابی الگوی مقاومت به تتراسایکلین می‌تواند در انتخاب عوامل مناسب آنتی‌بیوتیکی برای درمان

References

1- Aarestrup FM. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark.

APMIS. Supplementum. 2000; 101: 1-48.

2- Miranda JM, Guarddon M, Vázquez BI, Fente CA, Barros-Velázquez J, Cepeda A, Fran-

co CM. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food control*. 2008; 19(4): 412-6.

3- Hammerum AM, Heuer OE. Human health hazards from antimicrobial-resistant Escherichia coli of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 48(7): 916-21.

4- Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*. 2012; 127(1): 4-22.

5- Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of microbiology*. 1996; 165(6): 359-69.

6- Bill RL. Clinical Pharmacology and Therapeutics for Veterinary Technicians-E-Book. *Elsevier Health Sciences*; 2016.

7- Goren E, De Jong WA, Doornenbal P, Laurence T. Therapeutic efficacy of doxycycline hyclate in experimental Escherichia coli infection in broilers. *Veterinary Quarterly*. 1988; 10(1): 48-52.

8- Garcia PG, Silva VL, Diniz CG. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic Escherichia coli in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. *The Journal of Microbiology*. 2011; 49(1): 46-52.

9- Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical microbiology reviews*. 1992; 5(4): 387.

10- Kawano M, Yaguchi K, Osawa R. Genotypic analyses of Escherichia coli isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiology and immunology*. 2006; 50(12): 961-6.

11- Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. Annual review of genetics. 2010 1; 44: 141-66.

12- Koo HJ, Woo GJ. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in Escherichia coli isolated from meat and meat products. *International journal of food microbiology*. 2011; 145(2-3): 407-13.

13- Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic Escherichia coli isolates from cow-calf herds in western Canada. *Applied*

and Environmental Microbiology. 2008; 74(12): 3658.

14- Schwaiger K, Hölzel C, Bauer J. Resistance gene patterns of tetracycline resistant Escherichia coli of human and porcine origin. *Veterinary microbiology*. 2010; 142(3-4): 329-36.

15- Skočková A, Cupáková Š, Karpíšková R, Janštová B. Detection of tetracycline resistance genes in Escherichia coli from raw cow's milk. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021; 2021: 777-84.

16- Belaynehe KM, Shin SW, Yoo HS. Inter-relationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal Escherichia coli isolates from cattle farms. *BMC veterinary research*. 2018; 14(1): 1-1.

17- Bissonnette L, Roy PH. Characterization of In0 of Pseudomonas aeruginosa plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 1992; 174(4): 1248.

18- Barlow RS, Gobius KS. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 58(6): 1133-8.

19- Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002; 292(2): 115-25.

20- Koo HJ, Woo GJ. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in Escherichia coli isolated from meat and meat products. *International journal of food microbiology*. 2011; 145(2-3): 407-13.

21- Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995; 39(1): 185.

22- Shahbazi P, Jahantigh M, Salari S. Antibiotic resistance pattern and prevalence of some extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolated from Turkey. *Vet Res Biol Prod*. 2018; 15: 647-79.

23- Adesiyun A, Offiah N, Seepersadsingh N, Rodrigo S, Lashley V, Musai L. Antimicrobial resistance of Salmonella spp. and Escherichia coli isolated from table eggs. *Food Control*. 2007; 18(4): 306-11.

24- Cavicchio L, Dotto G, Giacomelli M, Giovanardi D, Grilli G, Franciosini MP, et al. Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic

Escherichia coli from poultry in Italy. *Poultry science*. 2015; 94(6): 1202-8.

25- Ahmed AM, Shimamoto T, Shimamoto T. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic Escherichia coli isolated from septicemic broilers. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013; 303(8): 475-83.

26- Kohansal M. Isolation characterization and molecular evaluation of genetic factors of antibiotic resistance in pathogenic Escherichia coli. *Veterinary Research and Biological Products*. 2018; 31(3): 10-9.

27- Roe MT, Byrd JA, Smith DP, Pillai SD. Class 1 and class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. *Journal of food protection*. 2003; 66(8): 1426-31.

28- Sandalli C, Özgümüş OB, Sevim A. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010; 26(11): 2099-103.

29- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2001; 65(2): 232.

30- Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German Escherichia coli isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52(3): 489-92.

31- Maynard C, Bekal S, Sanschagrín F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, et al. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal Escherichia coli isolates of animal and human origin. *Journal of clinical microbiology*. 2004; 42(12): 5444.

32- Seifi S, Khoshbakht R. Prevalence of tetracycline resistance determinants in broiler isolated Escherichia coli in Iran. *British poultry science*. 2016; 57(6): 729-33.

33- Mohamed SA, Ardiyati T, Rifa'i M. Detection of class 1 integron-associated gene cassettes and tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from ready to eat vegetables. *Annals of Medicine and Surgery*. 2020; 55: 327-31.

34- Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The integron: adaptation on demand. *Microbiology spectrum*. 2015; 3(2): 3-2.

35- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2006; 4(8): 608-20.

36- Stokes HW, Nesbø CL, Holley M, Bahl MI, Gillings MR, Boucher Y. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn 402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*. 2006; 188(16): 5722-30.

37- Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, Chen D, Bian H, Li Y, Yu G. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2015; 14(1): 1-1.

38- Asadi A, Zahraei Salehi T, Jamshidiyan M. Molecular analysis of antibiotic resistance genes in Escherichia coli from broiler chickens in shahrehabak by Multiplex PCR Technique. *Iranian Journal of Animal Science*. 2018; 49(2): 203-11.

39- Cavicchio L, Dotto G, Giacomelli M, Giovanardi D, Grilli G, Franciosini MP, et al. Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic Escherichia coli from poultry in Italy. *Poultry science*. 2015; 94(6): 1202-8.

40- Oosterik LH, Peeters L, Mutuku I, Goddeeris BM, Butaye P. Susceptibility of avian pathogenic Escherichia coli from laying hens in Belgium to antibiotics and disinfectants and integron prevalence. *Avian diseases*. 2014; 58(2): 271-8.

41- Sunde M, Norström M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolated from Norwegian meat and meat products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 58(4): 741-7.

42- Boerlin P, Travis R, Gyles CL, Reid-Smith R, Heather Lim NJ, Nicholson V, et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario. *Applied and environmental microbiology*. 2005; 71(11): 6753-61.

43- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary microbiology and microbial disease. *Blackwell science*. 2002.

44- Wayne, P.A. Clinical and laboratory standards institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 2011.

Survey of prevalence of tet(A) and class 1 Integron genes in tetracycline-resistant *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis

Mohamoud Nakhaei^{1*}, Mohammad Jahantigh², Mohsen Najimi³, Saeed Salari³

1- D.V.M., Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: September 9, 2021; Revise: March 3, 2022; Accept: March 6, 2022

Summary

Antibiotics have long been the first line of defense against *Escherichia coli* infection, but they have lost their potency as the bacteria become increasingly resistant to treatment. The aim of this study was to evaluate the resistance to tetracyclines and the prevalence of tetA and integron class I resistance genes in *E. coli* isolated from broilers with colibacillosis. In this study, 96.6 % of *Escherichia coli* isolates resistant to one or both tetracycline antibiotics were studied. Experimental results showed that 98.2 % of tetracycline-resistant *Escherichia coli* bacteria isolated from lesions of colibacillosis carry tetA. The prevalence of class I integron gene was 98.2%. Also, 96.5% of the isolates of this bacterium carried both genes. Considering the results, the prevalence of tetA and integron class 1 genes in this study was significantly higher than other studies. This difference could indicate high antibiotic resistance in poultry farms in this region which emphasizes the need for cautious use of tetracyclines in poultry production to reduce the prevalence of *E. coli* resistant to these antibiotics.

Key words: *Integron class, tet (A), Escherichia coli, Colibacillosis, tetracycline*

ارزیابی مخازن ویروس سارس کوید ۲ بر اساس آنالیز فیلوژنتیک توالی آمینواسیدهای پروتیین سطحی S و گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین (ACE2)

مجید باصری صالحی*

دانشیار گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

دریافت مقاله: ۱۱ بهمن ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۷ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۲۲ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

ویروس سارس کوید ۲ دارای ساختاری کروی شکل است که حاوی پروتیین‌های M، E، N و S می‌باشد. پروتیین سطحی S این ویروس نقش مهمی در اتصال ویروس به گیرنده سطحی سلولی ACE2 میزبان دارد. هدف از این تحقیق ارزیابی مخازن ویروس سارس کوید ۲ بر اساس ارتباط فیلوژنتیک توالی آمینو اسیدهای پروتیین سطحی S ویروس و گیرنده سطحی سلولی ACE2 در موجودات مختلف می‌باشد. برای انجام این تحقیق توالی کامل ژنوم، توالی آمینو اسیدهای پروتیین سطحی S ویروس سارس کوید ۲ و توالی آمینو اسیدهای گیرنده سطح سلول ACE2 برخی حیوانات و انسان از وبگاه NCBI و GenBank گرفته شد و با استفاده از نرم‌افزار مگا x روابط فیلوژنتیکی مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که ویروس‌های سارس کوید ۲ جدا شده از مناطق جغرافیایی مختلف دارای منشأ مشترکی بودند. آنالیز پروفایل آمینو اسیدهای پروتیین سطحی S در وارپته‌های مختلف نشان‌دهنده تغییرات زیاد و سرعت جهش در ژنوم این ویروس‌ها می‌باشد. از طرف دیگر توالی آمینو اسیدهای پروتیین ACE2 انسان شباهت زیادی به حیواناتی مانند خوک، شتر، خفاش، روباه پرنده و خفاش میوه‌خوار داشت که نشان‌دهنده مخزن‌های مختلف ویروس می‌باشد. بنابر این جهش ژنی در ناحیه کدکننده پروتیین سطحی S این ویروس و تشابه توالی آمینو اسیدهای پروتیین ACE2 در موجودات مختلف می‌تواند باعث ظهور وارپته‌های جدید ویروس در مخازن گوناگون حیوانی گردد که این پدیده احتمال سرایت ویروس را به انسان، حتی پس از واکسیناسیون و ایجاد ایمنی گروهی افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: آنالیز فیلوژنتیک، سارس کوید ۲، S پروتیین، ACE2

مقدمه

کرونا ویروس، ویروس کروی و RNA داری است که به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری‌های سارس و مرس شناخته می‌شود. این ویروس در سال ۲۰۱۹ در شهر ووهان از استان هوئی کشور چین عفونتی شبیه به ذات‌الریه ایجاد کرد که این بیماری را به نام کوید ۱۹ و عامل آن را سارس کوید ۲ گزارش کردند (۱، ۲). عموماً علائم این بیماری تب، سرفه، درد عضلانی، خستگی، بی‌حالی همراه با تنگی احتمالی مجاری تنفسی است که در برخی موارد با میزان ۲ تا ۳ درصد باعث ایجاد مرگ می‌گردد. ویروس سارس کوید ۲ دارای پروتئین‌های S، M، N و E می‌باشد که نقش مهمی در بقای ویروس ایفا می‌کنند. پروتئین S با وزن مولکولی ۱۸۰ تا ۲۲۰ دالتون به تعداد زیاد بر روی سطح این ویروس قرار دارد و در اتصال به سلول میزبان و ایجاد عفونت نقش مهمی ایفا می‌کند. این پروتئین با اتصال به گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین (ACE2) و ایجاد فعالیت پروتولیتیکی شکسته شده و شرایط نفوذ ویروس را به درون سلول مهیا می‌نماید (۳). گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین بر روی غشا خارجی بسیاری از سلول‌های انسان از جمله ریه، رگ‌های خونی، قلب، کلیه‌ها و روده وجود دارد. این آنزیم از طریق تجزیه و تبدیل آنژیوتنسنین ۲ موجب کاهش فشار خون از طریق گشاد کردن رگ می‌گردد (۴). امروزه ثابت شده است که گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین (ACE2) علاوه بر انسان، در سطح سلول‌های موش، خوکچه، اسب، میمون، پرندگان، حشره، خفاش و بسیاری از موجودات دیگر هم وجود دارد (۵، ۶).

به طور کل ویروس‌ها موجوداتی کاملاً وابسته به میزبان در نظر گرفته می‌شوند. به همین دلیل بقای ویروس‌ها می‌تواند در طبیعت وابسته به میزبان و مخازن آنها باشد. این مخازن با ایجاد شرایط مطلوب

موجب رشد ویروس و حفظ بقای آنها می‌گردند (۷). (۸). سوالی که با توجه به این اطلاعات مطرح می‌گردد این است که چه موجوداتی و با چه ویژگی می‌توانند قابلیت مخزن شدن ویروس‌ها و به خصوص ویروس کرونا را در طبیعت داشته باشند. برای پاسخ به این سوال، تحقیق حاضر گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین (ACE2) را به عنوان مولکول گیرنده ویروس کرونا بر اساس گزارش‌ها (۳، ۵) در نظر گرفته و با استفاده از توالی نوکلئوتیدهای ژنوم کامل ویروس، توالی آمینواسیدهای پروتئین سطحی S و توالی آمینواسیدهای این مولکول سعی بر انجام آنالیز فیلوژنتیک با هدف آشنایی با مخازن ویروس کرونا می‌نماید. در این تحقیق مخازن ویروس کرونا (وابسته به منطقه جغرافیایی) که باعث همه‌گیری‌های احتمالی در آینده باشد ارزیابی شده، و سرایت این ویروس به انسان با استفاده از مخازن ویروس مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

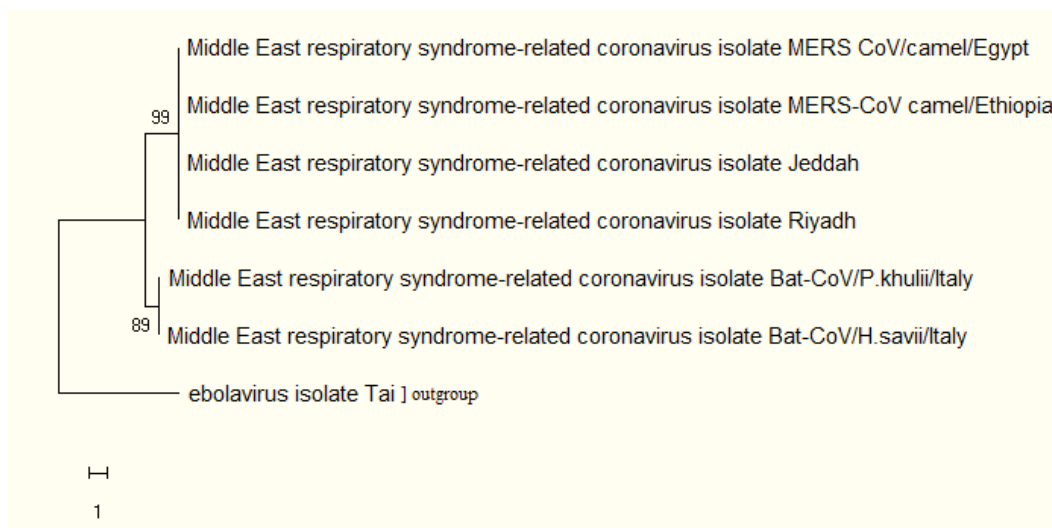
در تحقیق حاضر توالی ژنوم کامل ویروس کرونا، توالی آمینواسیدهای پروتئین‌های سطحی S این ویروس و توالی گیرنده سطح سلولی ACE2 موجودات مختلف مانند خفاش نعل بینی، خفاش پهن بینی، شتر دو کوهان، خفاش برزیلی، خوک، خفاش قهوه‌ای، خفاش، روباه پرنده، خفاش سبیل‌دار و خفاش میوه‌خوار از وبگاه NCBI و GenBank دانلود گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار Mega X توالی‌های به دست آمده هم ردیف شده و با استفاده از روش نیورن جونینگ با بوت استرپ ۵۰۰ تکرار مورد آنالیز قرار گرفتند (۹). در ادامه توالی ژنوم کامل ویروس مرس نیز بر اساس منطقه جغرافیایی از وبگاه NCBI و GenBank دانلود گردید. سپس ژنوم‌های به دست آمده در مقایسه با یکدیگر و همچنین در مقایسه با توالی ژنوم کامل ویروس سارس کوید ۲ مورد آنالیز قرار گرفتند. این توالی‌ها با

بیماری کوید ۱۹ و ویروس‌های عامل بیماری مرس نشان می‌دهد که توالی ژنوم همه ویروس‌های سارس کوید ۲ به دست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف (پاکستان، ایران، انگلستان، آمریکا، هندوستان، آفریقای جنوبی، ترکیه و چین) در یک کلد قرار گرفتند که بیانگر ارتباط نزدیک با منشأ مشترک این ویروس‌ها می‌باشد (شکل ۲). از طرف دیگر محاسبه فاصله ساختار ژنوم به دست آمده (d=0.53) نشان داد که با در نظر گرفتن گروه خارجی (out group) این فاصله بسیار ناچیز بوده است (شکل ۳). از نظر نوع جهش بیشترین جهش نقطه‌ای ترانزیشن (۱۵/۹) و بیشترین جهش نقطه‌ای ترانس ورژن (۶/۸۵) مربوط به نوکلئوتیدهای T/U می‌باشد. در حالی که کمترین جهش نقطه‌ای ترانزیشن (۱۰/۸) و کمترین جهش نقطه‌ای ترانس ورژن (۴/۹) مربوط به نوکلئوتید C محاسبه گردید (جدول ۱).

استفاده از روش بیان شده هم ردیف شدند. سپس با استفاده از روش نیبورن جونینگ با بوت استراپ ۵۰۰ تکرار مورد آنالیز قرار گرفتند. در تحقیق حاضر علاوه بر آنالیزهای انجام شده فاصله توالی ژنوم‌های کامل ویروس کرونا و نوع جهش (ترانزیشن و ترانس ورژن) با استفاده از نرم‌افزار Mega X محاسبه و ثبت گردید.

نتایج

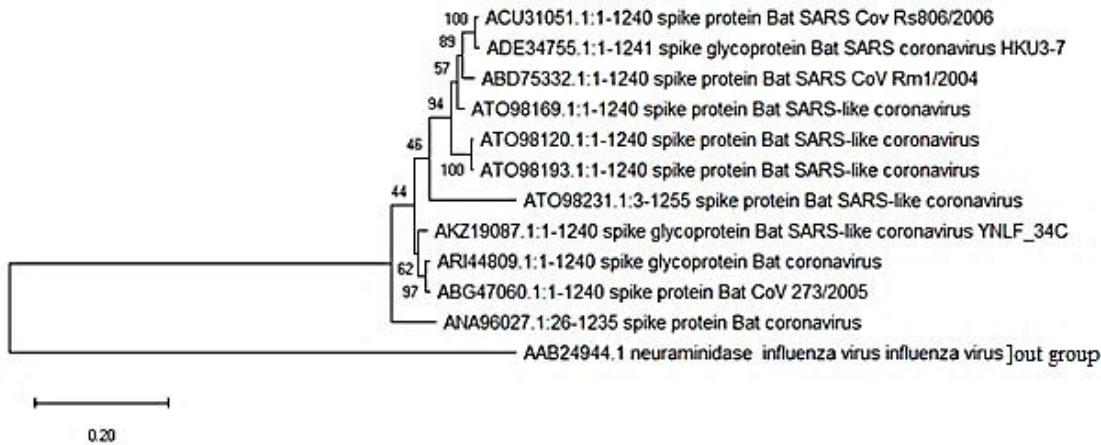
نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که ویروس‌های کرونای عامل بیماری مرس جدا شده از مصر، اتیوپی، جده و ریاض (عربستان سعودی) همگی منشأ یکسانی دارند (این ویروس‌ها همه در یک کلد درخت فیلوژنتیک قرار گرفتند). اگرچه ویروس کرونای عامل بیماری مرس جدا شده از ایتالیا در کلدی جداگانه قرار گرفت (شکل ۱). ترسیم درخت فیلوژنتیکی کرونا ویروس‌های عامل



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک ویروس کرونا عامل بیماری مرس جدا شده از مناطق مختلف

شده در این تحقیق تغییرات عموماً حذف آمینواسیدهای هیستیدین و تریپتوفان در بعضی واریته‌های ویروس کرونا و کاهش آمینو اسیدهای والین و تیروزین است.

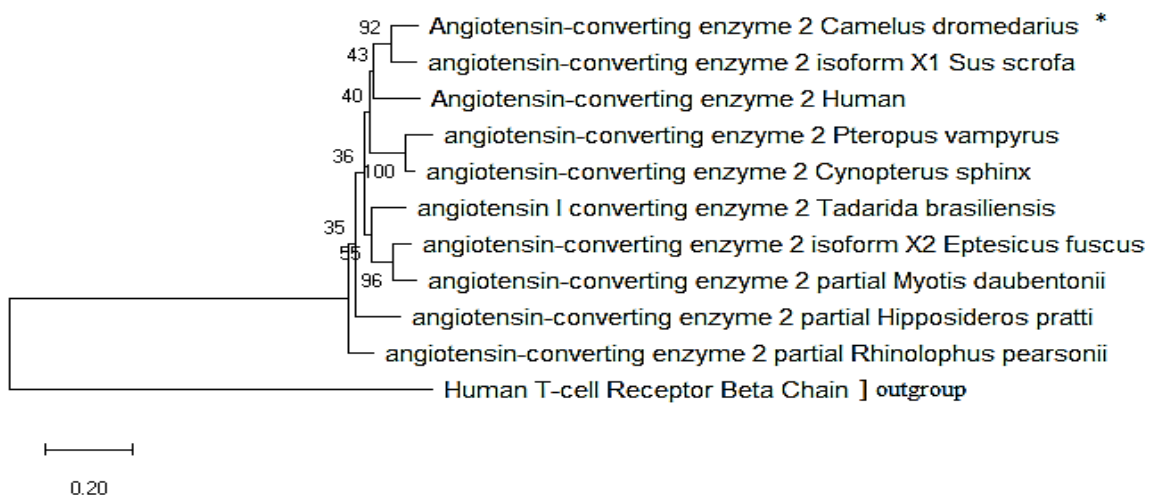
همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است درخت فیلوژنتیک رسم شده دارای تعداد زیادی کلد است که نشان‌دهنده تغییرات زیاد در توالی آمینواسیدهای پروتیین سطحی S در واریته‌های ویروس کرونا می‌باشد. بر اساس محاسبات انجام



شکل ۴- تعیین ارتباط توالی آمینو اسیدهای پروتیین سطحی S ویروس سارس کوید ۲

به ترتیب نزدیک به خوک، شتر، خفاش، روباه پرنده و خفاش میوه‌خوار می‌باشد. علاوه بر این توالی آمینو اسیدهای ACE2 خفاش نعل بینی کمترین قرابت را به توالی آمینو اسیدهای ACE2 انسان دارد.

نتایج به دست آمده از ارزیابی توالی آمینو اسیدهای پروتیین گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسی ACE2 در موجودات گوناگون نشان داد که توالی آمینو اسیدهای پروتیین ACE2 انسان



شکل ۵- تعیین ارتباط توالی آمینو اسیدهای گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسی ACE2 در موجودات مختلف

* Rhinolophus pearsonii خفاش نعل بینی، Hipposideros pretty خفاش پهن بینی، Camelus dromedaries شتر دو کوهان، Tadarida brasiliensis خفاش برزیلی، Sus scrofa خوک، Eptesicus fuscus خفاش قه‌وای، Pteropus vampyrus خفاش (روباه پرنده)، Myotis daubentonii خفاش سیبل‌دار و Cynopterus phinx خفاش میوه‌خوار.

جهش در ژنوم ویروس کرونا می‌تواند منجر به ظهور واریته‌های جدید و ظهور سارس کوید ۱ و ۲ گردد (۱۰). بر اساس گزارش محققین این ویروس پس از جهش یافتن تمایل به اتصال به گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسیین ACE2 در میزبان‌های متفاوت از جمله انسان می‌یابد (۱۱). اگرچه در سال ۲۰۰۸ برخی محققین بر اساس تأیید موارد عنوان شده مبنی بر اتصال ویروس‌های کرونا w1v16 و w1v16 به گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسیین ACE2، عنوان نمودند که برخی از ویروس‌های کرونا مانند RP3 قادر به اتصال به گیرنده ACE2 نمی‌باشد (۱۲). با این وجود امروزه گیرنده اصلی ویروس سارس کوید ۲ در میزبان آنزیم مبدل آنژیوتنسیین (ACE2) در نظر گرفته می‌شود. در سال ۲۰۰۳ در گزارشی عنوان گردید که بعضی حیوانات مانند سرنواری چینی بدون داشتن علائم عفونت دارای آنتی‌بادی بر علیه ویروس کرونا بودند (۵) که دلیل آن احتمالاً ساختار متفاوت گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسیین (ACE2) می‌باشد.

همان‌گونه که قبلاً عنوان گردید ویروس‌های کرونا عامل بیماری‌های مرس، سارس و کوید ۱۹ می‌باشد. اما با وجود منشأ مشترک این ویروس‌ها به چه دلیلی بیماری‌های متفاوتی بر اساس مناطق مختلف جغرافیایی ایجاد می‌کند. نتیجه این تحقیق نشان داد که ویروس‌های کرونای عامل بیماری مرس جدا شده از مصر، اتیوپی، جده و ریاض (عربستان سعودی) همگی دارای یک کلد درخت فیلوژنتیک بودند. در حالی که ویروس کرونای عامل بیماری مرس جدا شده از ایتالیا در کلد جداگانه قرار گرفت. این یافته نشان‌دهنده اهمیت مخزن برای ویروس کرونا می‌باشد، چرا که مخزن ویروس کرونای عامل بیماری مرس در مصر، اتیوپی و

عربستان سعودی شتر و مخزن ویروس کرونای عامل بیماری مرس در ایتالیا خفاش می‌باشد. بنابراین می‌توان به احتمالی نتیجه گرفت که جهش در این ویروس منجر به تطبیق ویروس به مخزن جدید می‌گردد. جالب این که نتیجه به دست آمده از تعیین ارتباط توالی آمینو اسیدهای پروتئین سطحی S ویروس سارس کوید ۲ نشان داد که حتی ویروس‌های جدا شده از خفاش دارای توالی یکسان نبودند و اعداد محاسبه شده از نزدیکی توالی آمینو اسیدهای پروتئین سطحی S بسیار کم است که نشان‌دهنده عدم مشابهت ویروس‌ها حتی در مخزن‌هایی یکسان مانند خفاش می‌باشد. باید در نظر داشت تغییرات در ژنوم این ویروس‌ها می‌تواند منجر به اتصال ویروس کرونا به گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسیین (ACE2) در میزبان جدید شده که در این روند شرایط سرایت به انسان مهیا می‌گردد. از طرف دیگر نتایج تحقیق حاضر نشان داد که توالی آمینو اسیدهای پروتئین ACE2 انسان شباهت زیادی به خوک، شتر و سپس به خفاش روباه پرند و خفاش میوه‌خوار دارد. بنابراین تغییرات جزئی در پروتئین سطحی ویروس کرونا که احتمالاً در مخزن صورت می‌گیرد منجر به افزایش تمایل ویروس برای اتصال به گیرنده سلولی ACE2 انسان می‌گردد. چندین محقق معتقد هستند که پدیده نوترکیبی و تغییر آنتی‌ژنی ویروس دو عامل مهم برای سرایت ویروس کرونا به انسان می‌باشد. عموماً این دانشمندان کسب قطعه کوچکی از ماده ژنتیکی ویروس کرونایی که ژن کدکننده پروتئین سطحی ویروس کرونا است به وسیله ویروس سارس کوید ۱ علت سرایت این ویروس به انسان می‌دانند (۱۳، ۱۴، ۱۵). نتایج توالی ویروس‌های سارس کوید ۲ جدا شده از مناطق گوناگون در این تحقیق نشان داد که این ویروس‌ها همگی دارای منشأ یکسانی بودند. اگرچه ارتباط نزدیکی بین ویروس‌های سارس

بعضی حیوانات احتمالاً می‌تواند علت سرایت ویروس به انسان باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی یافته‌های این تحقیق تأیید کننده منشأ یکسان همه ویروس‌های عامل بیماری کوید ۱۹ می‌باشد. از طرف دیگر جهش ژنومی در ناحیه کدکننده پروتیین سطحی S این ویروس و مشابهت توالی آمینو اسیدهای پروتیین ACE2 در موجودات مختلف (مانند خوک، شتر، خفاش روباه پرند و خفاش میوه‌خوار) احتمالاً باعث ایجاد واریته‌های جدید ویروس کرونا در مخزن می‌گردد. در این روند تمایل پروتیین سطحی S برای اتصال به گیرنده سلولی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین ACE2 انسان افزایش یافته و سرایت آغاز می‌گردد. بنابر این نتیجه این تحقیق بیان کننده شناخت کامل مخزن‌های ویروس کرونا برای محدود کردن بیماری کوید ۱۹ می‌باشد. از طرف دیگر عدم شناخت صحیح مخزن‌های این ویروس می‌تواند باعث همه‌گیری‌های مجدد حتی پس از انجام واکسیناسیون و ایجاد ایمنی گروهی گردد.

کوید ۲ و ویروس‌های کرونا عامل بیماری مرس مشاهده نشد. اخیراً ژنوم سارس کوید ۲ در کشور چین توالی یابی شده و مشخص گردیده است که دارای ۱۵ ژن با ۳۰۰۰۰ باز می‌باشد که در صورت جهش در این ژن‌ها می‌تواند منجر به ظهور واریته‌های جدید ویروس گردد (۱۶). نتایج آنالیز مقایسه‌ای ژنوم ویروس سارس کوید نشان داد که ویروس کرونایی که در سال ۲۰۰۲ در چین یافت شد تباری بسیار نزدیک به ویروس سارس داشته که باعث مرگ ۷۷۴ نفر شده است. مخزن اصلی این ویروس خفاش نعل بینی بوده است، اگرچه از تعداد زیادی گربه نخل آسیایی و راکون هم جدا گردیده است (۱۶، ۱۷). امروزه مشخص گردیده است که ویروس سارس کوید ۲ عامل بیماری کوید ۱۹ مشابه به ویروس کرونای RatG13 می‌باشد که در سال ۲۰۱۳ در چین یافت شده است. اگرچه مخزن ویروس کرونای RatG13 به درستی مورد بررسی و ارزیابی قرار نگرفته است اما خفاش، جوندگان و حتی پرندگان مخزن احتمالی این ویروس قلمداد شده است (۱۸، ۱۹). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که توالی آمینو اسیدهای پروتیین ACE2 انسان به

References

- 1- Singhal T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *The indian journal of pediatrics*. 2020; 87(4): 281-6.
- 2- Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual review of virology*. 2016; 3: 237-61.
- 3- Jung BK, An YH, Jang JJ, Jeon JH, Jang SH, Jang H. The human ACE-2 receptor binding domain of SARS-CoV-2 express on the viral surface of the Newcastle disease virus as a non-replicating viral vector vaccine candidate. *PloS one*. 2022; 17(2): e0263684.
- 4- Goyal M, Tewatia N, Vashisht H, Jain R, Kumar S. Novel corona virus (COVID-19); Global efforts and effective investigational medicines: A review. *Journal of Infection and Public Health*. 2021; 14(7): 910-21.
- 5- Koleya T, Kumara M, Goswami A, Ethathulla AS, Hariprasada G. Structural modeling of Omicron spike protein and its complex with human ACE-2 receptor: Molecular basis for high transmissibility of the virus. *Biochemical and biophysical research communications*. 2022.
- 6- Alfaleh MA, Zawawi A, Al-Amri SS, Hashem AM. David versus goliath: ACE2-Fc receptor traps as potential SARS-CoV-2 inhibitors. *InmAbs*. 2022; 14(1): 2057832. Taylor & Francis.
- 7- Wang X, Ye Y, Gong H, Wu J, Yuan J, Wang S, et al. The effects of different angiotensin II type 1 receptor blockers on the regulation of the ACE-AngII-AT1 and ACE2-Ang (1-7)-Mas axes in pressure overload-induced cardiac remodeling in male mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016; 97: 180-90.

8- Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses. *International journal of biological sciences*. 2020; 16(10): 1686.

9- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 2018; 35(6): 1547.

10- Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TT, Perry BW, Castoe TA, et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nature microbiology*. 2020; 5(11): 1408-17.

11- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426(6965): 450-4.

12- Zhou H, Chen X, Hu T, Li J, Song H, Liu Y, et al. A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Current biology*. 2020; 30(11): 2196-203.

13- Yang XL, Hu B, Wang B, Wang MN, Zhang Q, Zhang W, et al. Isolation and characterization of a novel bat coronavirus closely related to the direct progenitor of severe acute respiratory

syndrome coronavirus. *Journal of virology*. 2015; 90(6): 3253-6.

14- Ren W, Qu X, Li W, Han Z, Yu M, Zhou P, et al. Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *Journal of virology*. 2008; 82(4): 1899-907.

15- Menachery VD, Graham RL, Baric RS. Jumping species—a mechanism for coronavirus persistence and survival. *Current opinion in virology*. 2017; 23: 1-7.

16- Luk HK, Li X, Fung J, Lau SK, Woo PC. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019; 71: 21-30.

17- Zarehzadeh S, Baserisalehi M. SARS-CoV-2 originated from laboratory?. *Japanese Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2020 Oct.1.

18- Yu P, Hu B, Shi ZL, Cui J. Geographical structure of bat SARS-related coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019; 69: 224-9.

19- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*. 2020; 579(7798): 270-3.

Study on Sara-CoV 2 reservoirs by phylogenetic analysis of aminoacid Sequences of S and Angiotension-converting Enzyme (ACE2) proteins

Majid Baseri Salehi*

Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazeroon Branch, Islamic Azad University, Kazeroon, Iran.

Receive: January 31, 2022; Revise: March 8, 2022; Accept: March 13, 2022

Summary

Sars-Cov2 has spherical shape with many spike proteins *viz*, M,N,E and S. S protein of this virus has major role in attachment of the virus to host receptor Angiotension-converting Enzyme (ACE2) protein. The purpose of this study was evaluation of Sars-Cov2 reservoirs by phylogenetic analysis aminoacid sequences of S and Angiotension-converting Enzyme (ACE2) proteins in the different animals. To perform the study whole genome and amino acid sequences of S protein of Sars-Cov2 and sequences of ACE2 protein of some animals and human were downloaded from NCBI and GenBank and subjected to phylogenetic analysis of their relationship using MegaX software. The results obtained indicated that all Sars-Cov2 isolated from different geographical areas have similar origin. On the other hand, amino acid profile of S protein in the different viral variants showed several sequences. In addition, amino acid sequence of Human ACE2 was very close to camel, Swine and bats (*Pteropus vampyrus* and *Cynopterus phinx*). Therefore the present study showed that gene mutation in surface protein coding sequence of corona virus and the similarity of ACE2 amino acid sequences in different animals cause emerging the new variants of corona virus in the different reservoirs. Hence it might increase the rate of transmission of the virus to human even after vaccination and herd immunity.

Keywords: Phylogenetic analysis, Sars cov2, S protein, ACE2

مقایسه اثر عسل بهار نارنج (*Citrus aurantium*) با پماد فنی توئین بر ترمیم زخم در موش صحرائی

اویس پورمهدی^۱، ایلاز مشتاق^۲، مهسا رضوان^۳، مجید غلامی آهنگران^{۴*}

۱- گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

۲- گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

۳- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۵ دی ۱۴۰۰، بازنگری: ۷ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

در این مطالعه تجربی ۳۲ موش صحرائی نیمه بیهوش شدند و زخمی تمام ضخامت در قسمت پشتی به ابعاد یک سانتی‌متر مربع ایجاد شد. موش‌ها در گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت (اوسرین)، عسل بهار نارنج ۷۵ درصد و فنی توئین ۱ درصد تقسیم‌بندی شدند. در گروه تجربی تحت درمان روزانه ۲ بار به مقدار یک گرم از پماد به صورت یک لایه نازک بر روی سطح زخم‌ها به مدت ۱۴ روز قرار داده شد. نمونه‌برداری جهت بررسی‌های هیستوپاتولوژی در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ بعد از ایجاد زخم صورت گرفت. برای اندازه‌گیری جمع‌شدگی زخم از نرم‌افزار دیجی مایزر استفاده شد. در این بررسی میزان آنژیوژنز، فیبروبلازی، تشکیل بافت پوششی، رسوب کلاژن و ارتشاح سلول‌های التهابی مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی میکروسکوپی در روز ۴، آسیب اپیدرم و درم با حضور لخته خونی و نفوذ سلول‌های التهابی در گروه تحت درمان و بافت جوانه‌ای در حال تشکیل در گروه‌های عسل بهار نارنج ۷۵ درصد و فنی توئین ۱ درصد مشاهده شد. در روز هفتم بافت جوانه‌ای در گروه‌های تحت درمان قابل تشخیص بود. در گروه تحت درمان با عسل ۷۵ درصد تراکم سلولی بافت جوانه‌ای نسبت به سایر گروه‌ها کمتر و سنتز کلاژن نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر و بافت پوششی در حال تشکیل نیز قابل تشخیص بود. در روز دهم از تراکم سلول‌های آماسی، عروق خونی و سلول‌های فیبروبلاستی در بافت جوانه‌ای کاسته شد. در گروه کنترل منفی و کنترل مثبت نسبت به عسل ۷۵ درصد و فنی توئین ۱ درصد بافت جوانه‌ای جوان تر به نظر می‌رسید. بافت جوانه‌ای در گروه عسل ۷۵ درصد و فنی توئین ۱ درصد تراکم سلولی کمتر و سنتز کلاژن بیشتر را نشان داد. در گروه عسل ۷۵ درصد تشکیل بافت پوششی در مقایسه با روز هفتم پیشرفت بیشتری داشت. در روز چهاردهم در گروه عسل ۷۵ درصد بافت جوانه‌ای بالغ به صورت تراکم سلولی کم و رشته‌های کلاژن ضخیم و منظم و بالغ‌تر از سایر گروه‌ها به نظر می‌رسید و بافت پوششی به‌صورت کامل سطح زخم را پوشانده بود. در بررسی اندازه‌گیری انقباض زخم نتایج حاکی از آن بود که گروه تحت درمان با عسل ۷۵ درصد نسبت به فنی توئین ۱ درصد بهبودی بالاتری داشته که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

واژگان کلیدی: ترمیم زخم، عسل بهار نارنج، فنی توئین، زخم برشی، موش صحرائی

مقدمه

پوست بزرگ‌ترین بافت بدن است که در طول زندگی به‌طور مداوم در حال گسترش و نوسازی می‌باشد و نقش مهمی را در حفاظت بدن ایفا می‌کند. پوست از لحاظ مورفولوژی و عملکردی از دو لایه‌ی اپیدرم و درم تشکیل شده است. لایه‌ی اپیدرم خارجی‌ترین لایه‌ی سلولی پوست می‌باشد که از سلول‌های ملانوسیت، لانگرهانس و سلول‌های التهابی تشکیل شده است (۱). این لایه به‌عنوان خارجی‌ترین لایه پوست نقش حفاظتی دارد و مانع از دست رفتن رطوبت بدن و ورود میکروارگانیسم‌ها می‌شود. درم مابین اپیدرم و بافت‌های زیرین پوست قرار دارد و توسط غشای پایه به اپیدرم متصل می‌شود. درم شامل کلاژن، فیبرهای الاستیک و ماتریکس خارج سلولی، غدد عرق، غدد سباسه، فولیکول مو، غدد آپوکرین، غدد لنفاوی و عروق خونی می‌باشد که این عروق خونی مسئولیت تأمین مواد غذایی اپیدرم و درم و دفع مواد زائد آن را بر عهده دارد (۲). گیرنده‌های حسی مکانیکی و دمائی در این لایه قرار دارند در نتیجه هرگونه آسیب به پوست منجر به شکسته شدن این سد حفاظتی شده و در موارد شدیدتر نیز حیات موجود را تهدید می‌کند (۳). زخم بخش آسیب دیده پوست، غشای مخاطی و یا سطحی از اندام بدن است و در اثر عوامل مختلف محیطی ایجاد می‌شود. زخم‌ها در دو گروه زخم باز و زخم بسته تقسیم‌بندی می‌شوند. در زخم‌های باز، پوست به‌صورت تمام ضخامت از موضع جدا می‌شود. از ویژگی‌های بارز یک زخم باز می‌توان به خونریزی، آسیب و جداسازی بافتی و اختلال در فعالیت فیزیولوژیکی بافت اشاره کرد. زخم‌های باز بر اساس درجه آلودگی به ۴ گروه زخم تمیز، زخم تمیز-آلوده، زخم آلوده و زخم کثیف-آلوده تقسیم‌بندی می‌شوند (۴). زخم‌های بسته یا زیرجلد به آن دسته از زخم‌هایی اطلاق می‌شود که هیچ یک

از لایه‌های پوست از هم جدا نمی‌شود. از انواع زخم‌های بسته می‌توان به کوفتگی‌ها، له شدگی‌ها و پارگی بافت‌های زیر جلدی اشاره کرد (۵). مراحل عمده‌ی روند ترمیم زخم عبارتند از: (۱) فرآیند التیامی (۲) تشکیل بافت پوششی (۳) جمع شدگی زخم. هر کدام از این مراحل مجموعه‌ای از فرایندهای پیچیده بافتی و سلولی است. از دیرباز تا کنون درمان‌های طب سنتی در میان مردم رواج بسیار داشته است. امروزه نیز به دلیل دسترسی آسان، مقرون به صرفه بودن و عوارض کمتر نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. عسل محصول طبیعی از تراوشات گیاهان می‌باشد که زنبور عسل آن را جمع‌آوری کرده و پس از ایجاد یکسری تغییرات آن را در کندو ذخیره می‌کند (۶). همچنین عسل یک مخلوط اشیاع از فروکتوز، گلوکز، دیگر کربنات‌ها و ۲۰ درصد آب و حاوی آمینواسیدها، موم، رنگدانه و اجزای طعم دهنده محسوب می‌شود. بر اساس گیاه مورد مصرف، حاوی ویتامین C، B₁، B₂، نیکوتیک اسید و اسید فرمیک می‌باشد (۷). از عسل به‌عنوان ترکیب طبیعی در درمان جای زخم بعد از جراحی جهت تسریع بهبود ترمیم و پاکسازی موضع مورد استفاده قرار می‌گرفت. عسل دارای خواص آنتی‌باکتریال، ضد قارچی، آنژیژنز و دبریمان طبیعی می‌باشد (۴). همچنین با ویژگی‌هایی چون چسبندگی بالا، فشار اسمزی زیاد، اسیدیته بالا، وجود آنزیم‌های با فعالیت ضد میکروبی مثل دیاستاز، ایجاد بستر مناسب جهت رشد بافت گرانوله، کاهش ادم، تحریک آنژیوژنز و اپیتلیال سازی و تکثیر فیبروبلاست منجر به تسریع التیام زخم می‌شود (۸). آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عسل مانع تشکیل رادیکال‌های آزاد شده و مسئول واکنش ضد التهابی می‌باشند (۹). نارنج نام درختی از راسته‌ی ناترک سانان، تیره‌ی سابیان و از جنس مرکبات می‌باشد. شکوفه‌های آن یکی از

گردید. موش‌ها در قفس‌های جداگانه‌ی استاندارد پلی‌پروپیلن، در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 55 ± 5 و سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده و جهت رسیدن به نتایج بهتر موش‌ها به صورت ۳ تایی در قفس‌ها تقسیم بندی شدند. در طول تحقیق حیوانات به شکل دستی، با غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی تغذیه گردیدند و به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. حیوانات به مدت ۱۰ روز در محل آزمایش به منظور تطابق با شرایط محیطی جدید قرار گرفتند اصول اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتو ملی سلامت در همه مراحل آزمایش رعایت شد.

عسل بهار نارنج: عسل بهار نارنج با مرغوب‌ترین کیفیت از مشهد خریداری و جهت تهیه‌ی پماد عسل بهار نارنج ۷۵ درصد، ۷۵ گرم عسل با ۲۵ گرم اوسرین به‌عنوان پایه‌ی پماد ترکیب شد.

پماد فنی توئین: پماد فنی توئین ۱ درصد شرکت داروسازی کیش مدیفارم از داروخانه تهیه گردید.

طراحی مطالعه و گروه‌بندی: حیوانات به‌صورت تصادفی به چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند. گروه یک به‌عنوان کنترل منفی: پس از ایجاد زخم تحت هیچ پروسه درمانی قرار نگرفتند. گروه ۲ به‌عنوان کنترل مثبت: پس از ایجاد زخم تا بهبودی، از پماد اوسرین به صورت موضعی و دوبار در روز استفاده شد. گروه‌های ۳ و ۴ درمان: پس از ایجاد زخم تا بهبودی کامل به ترتیب از پماد عسل بهار نارنج ۷۵ درصد و پماد فنی توئین یک درصد به صورت موضعی، دوبار در روز و به مقدار یک گرم استفاده شد. موش‌ها با ترکیبی از داروی کتامین (۶۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن) و زایلازین (۲۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن) به‌صورت تزریق داخل

معطرترین گل‌هاست. در مطالعه‌ای بر روی عصاره‌ی روغنی بهار نارنج، مشاهده شد ترکیبات زیستی فعال در آن، تأثیرات قابل توجهی بر التهاب حاد و مزمن دارد. همچنین اثر ضد دردی بر روی اعصاب مرکزی و محیطی داشته و در ترکیب با دیگر خواص آن گزینه‌ی مناسبی در درمان زخم‌ها می‌باشد (۱۰). خواص ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج نیز تأیید شده است (۱۱). فنی توئین خوراکی دارویی برای کنترل حملات صرعی است. همچنین از پماد فنی توئین جهت بهبود زخم‌های فشاری استفاده می‌شود. از آن جایی که این دارو به‌طور گسترده به‌صورت موضعی برای التیام، کاهش درد و تورم در طیف وسیعی از زخم‌ها و سوختگی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌توان در شکل‌های کرم، لوسیون یا پانسمان آغشته به دارو تجویز شود. فنی توئین سدیم از مشتقات هیدانتوئین‌ها می‌باشد که به شکل پماد ۱ درصد جهت ترمیم زخم‌های جلدی مورد مصرف قرار می‌گیرد. فنی توئین باعث افزایش سرعت تشکیل سلول‌های بافت همبند، بافت گرانوله، کلاژن‌سازی، تشکیل بافت عروقی و تکثیر فیبروبلاست‌ها می‌شود. در مطالعه چن و همکاران که بر روی موش‌های صحرایی دیابتیک انجام شد، سرعت التیام زخم در گروه درمان شده با فنی توئین موضعی نسبت به گروه کنترل (نرمال سالین) سریع‌تر بود. در مطالعه‌ی آلبسول و همکاران اثر فنی توئین موضعی در افزایش پذیرش اتوگرافت در موش‌ها بررسی شد، نتایج این مطالعه نشان داد که فنی توئین می‌تواند احتمال پذیرش اتوگرافت را افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این زخم، عسل بهار نارنج مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 210 ± 20 از انستیتو پاستور (آمل) تهیه

هماتوکسین به‌عنوان یک رنگ بازی در نظر گرفته می‌شود. از این رنگ برای رنگ‌آمیزی ساختارهای اسیدی استفاده می‌شود و این ساختارها رنگ بنفش به خود می‌گیرند. بنابراین در این رنگ‌آمیزی هسته سلول بنفش و سایر اجزای سلول صورتی می‌شوند.

جهت رنگ‌آمیزی با هماتوکسین بعد از گذراندن مراحل پارافین‌زدایی و آبدهی، لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در رنگ هماتوکسین قرار گرفتند. پس از خارج کردن لام‌ها از ظرف حاوی رنگ، در آب جاری به مدت ۳ تا ۵ دقیقه شسته شدند. برای رنگ‌آمیزی با ائوزین نمونه‌ها در ظرف حاوی ائوزین به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس به مدت ۳ دقیقه در آب جاری شستشو داده شدند.

نتایج

در بررسی هیستوپاتولوژی، در ناحیه زخم روند ترمیم زخم که شامل اپیتلیزاسیون (تشکیل بافت پوششی) و تشکیل بافت جوانه‌ای (شامل تکثیر سلولی فیبروبلاستی جهت تولید کلاژن به همراه روند رگزایی) در ناحیه درم مشاهده شد. ناحیه زخم همچنین فاقد ضمام جلدی شامل فولیکول مو، غدد عرق و غدد چربی بود. در بررسی میکروسکوپی و مطالعه توصیفی برش‌های بافتی در رنگ‌آمیزی هماتوکسین-ائوزین در روز ۴، آسیب اپیدرم و درم با حضور لخته خونی و نفوذ سلول‌های التهابی در گروه تحت درمان و بافت جوانه‌ای در حال تشکیل در گروه‌های غسل بهار نارنج ۷۵ درصد و فنی‌توئین ۱ درصد مشاهده شد. در روز هفتم بافت جوانه‌ای شامل تکثیر سلول‌های فیبروبلاستی و آنژیوژنز در گروه‌های تحت درمان قابل تشخیص بود. در گروه تحت درمان با غسل ۷۵ درصد تراکم سلولی بافت جوانه‌ای نسبت به سایر گروه‌ها کمتر و سنتز کلاژن نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود و بافت جوانه‌ای بالغ‌تر به نظر می‌رسید و بافت پوششی در حال تشکیل نیز قابل تشخیص بود. در روز دهم از تراکم

صفاقی نیمه بیهوش شدند. سپس موهای پشت هر حیوان توسط تیغ شیو تراشیده شد و با تیغ جراحی زخمی به ضخامت پوست و به اندازه یک سانتی‌متر مربع در سطح پشتی کمری نزدیک ستون فقرات ایجاد گردید عمق زخم شامل درم و هیپودرم بود و روز عمل، روز صفر محسوب شد. طول دوره‌ی درمان ۱۴ روز بود. نمونه‌گیری از حاشیه زخم طی روزهای چهارم، هفتم، دهم و چهاردهم انجام شد. برای ارزیابی روند بهبود زخم، مساحت زخم از چهارمین روز بعد از ایجاد زخم تا روز چهاردهم توسط دوربین موبایل از فاصله‌ی ثابت عکس‌برداری شد و پس از انتقال به کامپیوتر با نرم‌افزار دیجی‌مایزر تحت اندازه‌گیری قرار گرفت. گروه‌های مورد آزمایش در زمان‌های مشخص شده از نظر آنژیوژنز، فیبروبلاستی، تشکیل بافت پوششی، رسوب کلاژن و ارتشاح سلول‌های التهابی مورد بررسی قرار گرفتند.

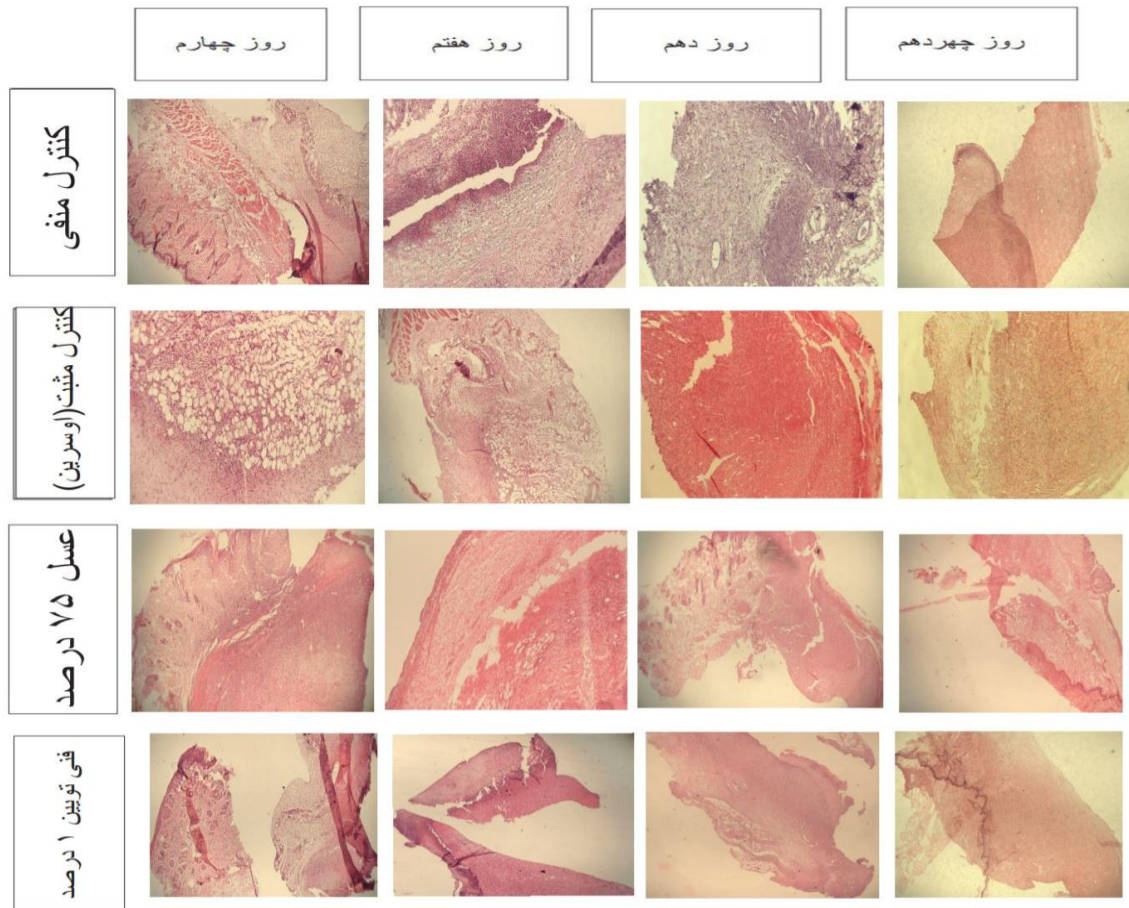
بیوپسی از زخم: نمونه‌های اخذ شده جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفتند و پس از یک روز فرمالین نمونه‌ها تعویض شد و بعد از گذراندن مراحل پاساژ بافتی و آبگیری توسط درصدهای مختلف الکل‌ها با پارافین مایع تحت قالب‌گیری قرار گرفتند و پس از سرد شدن، برش‌های پنج میکرونی توسط میکروتوم داده شد. ورقه‌ها بر روی لام‌های شیشه‌ای قرار گرفتند و بعد از پارافین زدایی و رنگ‌آمیزی با هماتوکسین-ائوزین توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

رنگ‌آمیزی: بیشتر سلول‌ها بی‌رنگ یا شفاف هستند بنابراین جهت مشاهده باید رنگ‌آمیزی شوند. رنگ‌آمیزی هماتوکسین-ائوزین نوعی رنگ‌آمیزی غیر اختصاصی متداول است که در آن از دو رنگ هماتوکسین و ائوزین استفاده می‌شود. ائوزین رنگ اسیدی با بار منفی است. این رنگ ساختارهای بازی را به رنگ قرمز یا صورتی در می‌آورد که ساختارهای ائوزینوفیک نامیده می‌شوند.

مقایسه اثر عسل بهار نارنج با پماد فنی توئین بر ترمیم زخم در موش صحرایی ...

جوانه‌ای بالغ به صورت تراکم سلولی کم و رشته‌های کلاژن ضخیم و منظم و بالغ‌تر از سایر گروه‌ها به نظر می‌رسید و بافت پوششی به صورت کامل سطح زخم را پوشانده بود. در مجموع به نظر می‌رسد ترکیب عسل بهار نارنج ۷۵ درصد با اعمال ضد التهابی در روزهای اولیه ترمیم و تشکیل سریع‌تر بافت پوششی و بلوغ سریع‌تر بافت جوانه‌ای، اثر ترمیمی سریع‌تری نسبت به گروه‌های کنترل منفی، مثبت و فنی توئین ۱ درصد داشته است.

سلول‌های آماسی، عروق خونی و سلول‌های فیبروبلاستی در بافت جوانه‌ای کاهش داشت. در گروه کنترل منفی و کنترل مثبت نسبت به عسل ۷۵ درصد و فنی توئین ۱ درصد بافت جوانه‌ای جوان‌تر به نظر می‌رسید. بافت جوانه‌ای در گروه عسل ۷۵ درصد و فنی توئین ۱ درصد تراکم سلولی کمتر و سنتز کلاژن بیشتر را نشان داد. در گروه عسل ۷۵ درصد تشکیل بافت پوششی در مقایسه با روز هفتم پیشرفت بیشتری داشت. در روز چهاردهم در زخم‌های تحت درمان با عسل ۷۵ درصد بافت



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی زخم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

جدول ۱- نتایج هیستوپاتولوژی زخم در گروه کنترل منفی

| بدون تیمار (کنترل منفی) | روز چهارم | روز هفتم | روز دهم | روز چهاردهم |
|----------------------------|-----------|----------|---------|-------------|
| نوزایش عروقی | + | ++ | ++ | + |
| فیبروپلازی | - | +++ | ++ | ++ |
| تشکیل بافت پوششی | - | - | - | + |
| رسوب کلاژن | - | + | + | ++ |
| ارتشاح سلول‌های التهابی | +++ | +++ | ++ | + |

میزان تراکم سلول‌های لوکوسیت و فیبروبلاست در هر شان از () تا (++++) درجه‌بندی شد. در صورت مشاهده سلول‌های زیاد (++++) و در صورت عدم وجود سلول () و مقادیر بین این دو (+)، (++) و (+++). میزان کلاژن در هر شان از () تا (++++) درجه‌بندی شد. در صورت مشاهده کلاژن زیاد (++++) و در صورت عدم وجود کلاژن () و مقادیر بین این دو (+)، (++) و (+++). در تشکیل بافت پوششی در صورت ضخیم شدن لبه‌های پوشش ()، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی کمتر از ۵۰ درصد (+) ، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی بیشتر از ۵۰ درصد (++) ، در صورت پل زدن ناحیه‌ی برش (++) و در صورت کراتینیزه شدن بافت پوششی (++++) به آن تعلق گرفت.

جدول ۲- نتایج هیستوپاتولوژی زخم در گروه کنترل مثبت

| تیمار با اوسرین (کنترل مثبت) | روز چهارم | روز هفتم | روز دهم | روز چهاردهم |
|---------------------------------|-----------|----------|---------|-------------|
| نوزایش عروقی | + | ++ | ++ | + |
| فیبروپلازی | - | +++ | ++ | ++ |
| تشکیل بافت پوششی | - | - | - | + |
| رسوب کلاژن | - | + | + | ++ |
| ارتشاح سلول‌های التهابی | +++ | +++ | ++ | + |

میزان تراکم سلول‌های لوکوسیت و فیبروبلاست در هر شان از () تا (++++) درجه‌بندی شد. در صورت مشاهده سلول‌های زیاد (++++) و در صورت عدم وجود سلول () و مقادیر بین این دو (+)، (++) و (+++). میزان کلاژن در هر شان از () تا (++++) درجه‌بندی شد. در صورت مشاهده کلاژن زیاد (++++) و در صورت عدم وجود کلاژن () و مقادیر بین این دو (+)، (++) و (+++). در تشکیل بافت پوششی در صورت ضخیم شدن لبه‌های پوشش ()، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی کمتر از ۵۰ درصد (+) ، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی بیشتر از ۵۰ درصد (++) ، در صورت پل زدن ناحیه‌ی برش (++) و در صورت کراتینیزه شدن بافت پوششی (++++) به آن تعلق گرفت.

جدول ۳- نتایج هیستوپاتولوژی زخم در گروه تحت درمان با عسل بهار نارنج ۷۵ درصد

| عسل بهار نارنج ۷۵٪ | روز چهارم | روز هفتم | روز دهم | روز چهاردهم |
|-------------------------|-----------|----------|---------|-------------|
| نوزایش عروقی | ++ | ++ | + | + |
| فیبروپلازی | ++ | ++ | + | + |
| تشکیل بافت پوششی | - | + | ++ | ++++ |
| رسوب کلاژن | + | ++ | ++ | +++ |
| ارتشاح سلول‌های التهابی | ++ | + | + | - |
| ارتشاح سلول‌های التهابی | ++ | ++ | + | + |

میزان تراکم سلول‌های لوکوسیت و فیبروبلاست در هر شان از () تا (++++) درجه بندی شد. در صورت مشاهده سلول‌های زیاد (++++) و در صورت عدم وجود سلول () و مقادیر بین این دو (+)، (++) و (+++). میزان کلاژن در هر شان از () تا (++++) درجه بندی شد. در صورت مشاهده کلاژن زیاد (++++) و در صورت عدم وجود کلاژن () و مقادیر بین این دو (+)، (++) و (+++). در تشکیل بافت پوششی در صورت ضخیم شدن لبه‌های پوشش ()، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی کمتر از ۵۰٪ (+) ، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی بیشتر از ۵۰٪ (++) ، در صورت پل زدن ناحیه‌ی برش (++) و در صورت کراتینیزه شدن بافت پوششی (++++) به آن تعلق گرفت.

مقایسه اثر عسل بهار نارنج با پماد فنی توئین بر ترمیم زخم در موش صحرایی ...

جدول ۴- نتایج هیستوپاتولوژی زخم در گروه تحت درمان با پماد فنی توئین

| فنی توئین ۱ درصد | روز چهارم | روز هفتم | روز دهم | روز چهاردهم |
|-------------------------|-----------|----------|---------|-------------|
| نوزایش عروقی | ++ | ++ | + | + |
| فیبروپلازی | ++ | +++ | ++ | ++ |
| تشکیل بافت پوششی | - | - | - | + |
| رسوب کلاژن | + | + | ++ | ++ |
| ارتشاح سلول‌های التهابی | ++ | ++ | + | + |

میزان تراکم سلول‌های لوکوسیت و فیبروبلاست در هر شان از () تا (++++) درجه‌بندی شد. در صورت مشاهده سلول‌های زیاد (++++) و در صورت عدم وجود سلول () و مقادیر بین این دو ()، (++) و (+++). درجه‌بندی شدند. میزان کلاژن در هر شان از () تا (++++) درجه‌بندی شد. در صورت مشاهده کلاژن زیاد (++++) و در صورت عدم وجود کلاژن () و مقادیر بین این دو ()، (++) و (+++). درجه‌بندی شدند. در تشکیل بافت پوششی در صورت ضخیم شدن لبه‌های پوشش ()، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی کمتر از ۵۰ درصد ()، در صورت مهاجرت سلول‌های پوششی بیشتر از ۵۰ درصد (++)، در صورت پل زدن ناحیه‌ی برش (++) و در صورت کراتینیزه شدن بافت پوششی (++++). به آن تعلق گرفت.



شکل ۲- تصویر ماکروسکوپی زخم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه تحت درمان با عسل بهار نارنج ۷۵ درصد مشاهده شد.

همان‌طور که در شکل بالا مشاهده می‌شود، بیشترین میزان بهبودی ظاهری در پایان روز ۱۴ در

جدول ۵- میانگین و انحراف معیار درصد بهبودی زخم روز چهارم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

| گروه | تعداد | میانگین | انحراف معیار | P-value (ANOVA) |
|---------------------|-------|---------|--------------|-----------------|
| کنترل منفی | ۸ | ۱۱,۸۱ | ۰,۸۶۵ | P<0.001 |
| کنترل مثبت (اوسرین) | ۸ | ۱۳,۰۰ | ۱,۱۹۹ | |
| عسل بهار نارنج ۷۵٪ | ۸ | ۱۸,۶۹ | ۱,۰۷۶ | |
| فنی‌توئین ۱ درصد | ۸ | ۱۰,۲۵ | ۱,۲۳۴ | |

همان‌طور که در جدول بالا مشاهده می‌شود، در مقایسه‌ی درصد بهبودی زخم، بیشترین میزان درصد بهبودی در روز چهارم به‌ترتیب در گروه تحت درمان با عسل بهار نارنج ۷۵ درصد (۱۸,۶۹ درصد)، گروه کنترل مثبت (۱۳,۰۰ درصد)، کنترل منفی (۱۱,۸۱ درصد) و کمترین میزان در گروه تحت درمان با فنی‌توئین ۱ درصد (۱۰,۲۵ درصد) بوده که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<0.001).

جدول ۶- میانگین و انحراف معیار درصد بهبودی زخم در روز هفتم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

| گروه | تعداد | میانگین | انحراف معیار | P-value (Kruskal wallis test) |
|---------------------|-------|---------|--------------|-------------------------------|
| کنترل منفی | ۸ | ۱۷,۲۰ | ۱,۲۴۷ | P<0.001 |
| کنترل مثبت (اوسرین) | ۸ | ۳۰,۲۹ | ۱,۱۵۴ | |
| عسل بهار نارنج ۷۵٪ | ۸ | ۴۱,۹۴ | ۱,۱۵۵ | |
| فنی‌توئین ۱٪ | ۸ | ۲۸,۵۶ | ۱,۲۳۷ | |

همان‌طور که در جدول بالا مشاهده می‌شود، در مقایسه‌ی درصد بهبودی زخم، بیشترین میزان درصد بهبودی زخم در روز هفتم به‌ترتیب در گروه تحت درمان با عسل بهار نارنج ۷۵ درصد (۴۱,۹۴ درصد)، گروه کنترل مثبت (۳۰,۲۹ درصد) و در گروه تحت درمان با پماد فنی‌توئین ۱ درصد (۲۸/۵۶ درصد) دیده شد و کمترین میزان در گروه کنترل (۱۷/۲۰ درصد) بوده که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<0.001).

جدول ۷- میانگین و انحراف معیار درصد بهبودی زخم روز دهم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

| گروه | تعداد | میانگین | انحراف معیار | P-value (Kruskal wallis test) |
|---------------------|-------|---------|--------------|-------------------------------|
| کنترل منفی | ۸ | ۳۹,۵۴ | ۱,۳۵۵ | P<0.001 |
| کنترل مثبت (اوسرین) | ۸ | ۴۲,۳۵ | ۱,۱۲۴ | |
| عسل بهار نارنج ۷۵٪ | ۸ | ۷۳,۱۸ | ۱,۰۹۳ | |
| فنی‌توئین ۱٪ | ۸ | ۴۷,۷۳ | ۱,۴۰۶ | |

همان‌طور که در جدول بالا مشاهده می‌شود، بیشترین میزان بهبودی زخم در روز دهم به‌ترتیب

بیشترین میزان بهبودی زخم در روز دهم به‌ترتیب

مقایسه اثر عسل بهار نارنج با پماد فنی توئین بر ترمیم زخم در موش صحرایی ...

مثبت (۴۲/۳۵ درصد) دیده شد و کمترین میزان در گروه کنترل منفی (۳۹/۵۴ درصد) بوده که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$).

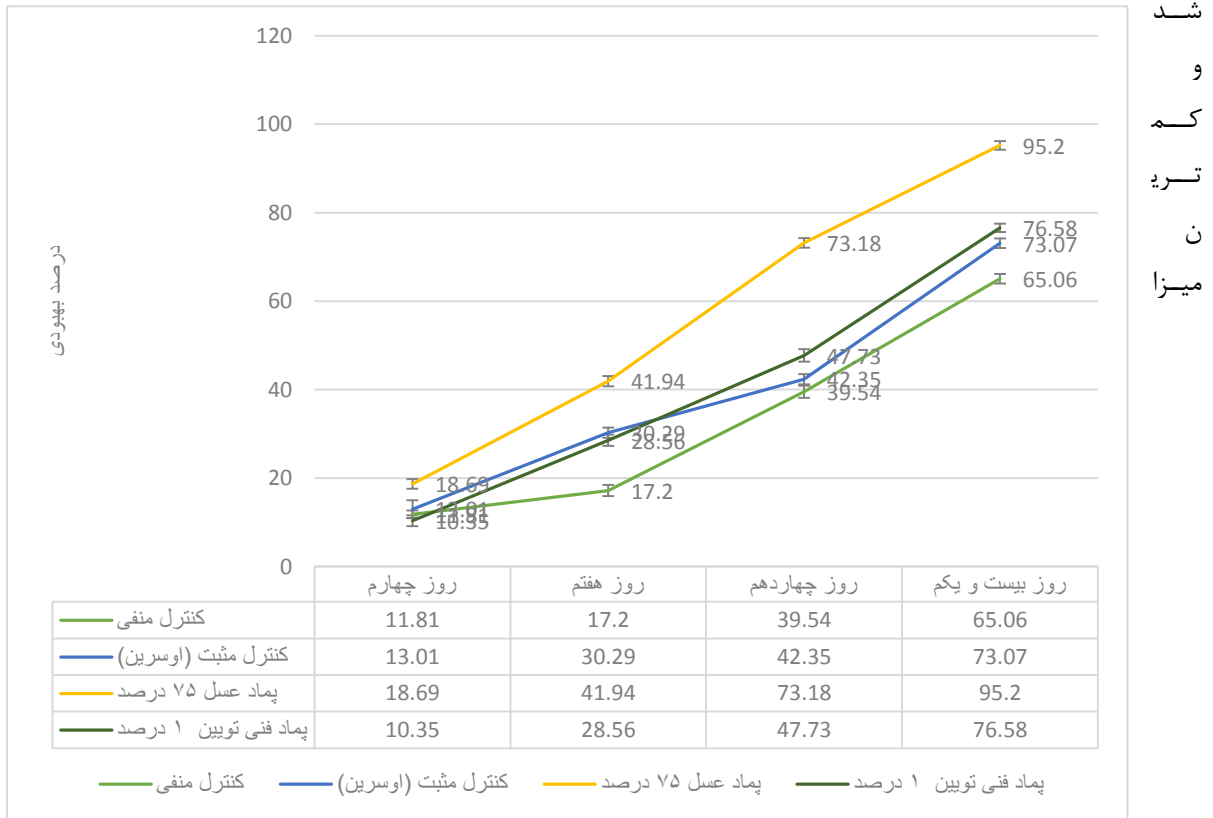
در گروه تحت درمان با عسل بهار نارنج ۷۵ درصد (۷۳/۱۸ درصد)، سپس در گروه تحت درمان با پماد فنی توئین ۱ درصد (۴۷/۷۳ درصد) و گروه کنترل

جدول ۸- میانگین و انحراف معیار درصد بهبودی زخم روز چهاردهم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

| گروه | تعداد | میانگین | انحراف معیار | P-value (Kruskal wallis test) |
|---------------------|-------|---------|--------------|-------------------------------|
| کنترل منفی | ۸ | ۶۵,۰۶ | ۱,۰۷۶ | P<0.001 |
| کنترل مثبت (اوسرین) | ۸ | ۷۳,۰۷ | ۱,۰۹۴ | |
| عسل بهار نارنج ۷۵٪ | ۸ | ۹۵,۰۲ | ۰,۹۵۵ | |
| فنی توئین ۱٪ | ۸ | ۷۶,۵۸ | ۰,۹۵۳ | |

ن در گروه کنترل منفی (۶۵/۰۶ درصد) بوده که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$).

همان‌طور که در جدول بالا مشاهده می‌شود، بیشترین میزان درصد بهبودی زخم در روز چهاردهم به ترتیب در گروه تحت درمان با عسل بهار نارنج ۷۵ درصد (۹۵/۰۲ درصد) و سپس در گروه تحت درمان با پماد فنی توئین ۱ درصد (۷۶/۵۸ درصد) و گروه کنترل مثبت (۷۳/۰۷ درصد) دیده



شد و کم‌ترین میزان

نمودار ۱- مقایسه درصد بهبودی زخم با گذشت زمان در گروه‌های مختلف

بحث

بر اساس مطالعات انجام شده قبلی بر روی اثر بخشی عسل و پماد فنی‌توئین در سرعت جمع‌شدگی زخم در موش صحرایی نتایج حاکی از آن بود که عسل و فنی‌توئین سرعت بسته شدن زخم را نسبت به گروه کنترل افزایش دادند و سرعت بهبودی در گروه فنی‌توئین بیشتر بود (۴)

در بررسی انجام شده بر روی تأثیر پانسمن عسل با پانسمن هیدروکلئید بر ترمیم زخم فشاری، نتایج هر دو پانسمن در ترمیم نتایج مشابهی نشان داده و هر دو در بهبودی زخم فشاری مؤثر بوده‌اند. بنابراین راحتی تهیه، مقرون به صرفه بودن و طبیعی بودن پانسمن عسل در ترمیم زخم فشاری موجب گردید تا این پانسمن به‌عنوان گزینه مناسب‌تر و بهتر در ترمیم زخم فشاری توصیه گردد (۱۲)

در مطالعه انجام شده در بررسی مقایسه‌ی عسل و روغن حیوانی در تسریع روند ترمیم زخم در موش صحرایی، یافته‌ها نشان‌دهنده آن بود که تشکیل بافت گرانوله، تراکم و فعال شدن سلول‌های فیبروبلاست، کراتینیزه شدن سطح زخم و ضخامت شای پایه و اپیدرم در گروه درمان با عسل بیشتر از گروه روغن حیوانی بود. عسل بیشتر از روغن حیوانی موجب کاهش التهاب، ادم و باز شدن زخم گردید. میزان بهبودی زخم در گروه عسل بیشتر از گروه روغن حیوانی بود ($P < 0.05$) (۵).

در بررسی تأثیر عسل بر زخم‌های ناشی از سوختگی، نتایج حاکی از آن بود که عسل در درمان عفونت‌های برجای مانده از عمل سزارین و سوختگی‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم کارآمدتر عمل می‌کند. خواص عسل در ترمیم زخم‌ها به علت ویژگی‌های دبرید کننده آنزیم کاتالاز، جذب ادم ناشی از خاصیت عسل در جذب رطوبت، توانایی آن در گسترش گرانولاسیون و اپی‌تلیزاسیون از لبه‌های زخم و خواص ضد باکتریایی آن می‌باشد. تأثیر عسل بر روی زخم‌های ناشی از سوختگی پس از درمان تا بهبودی کامل مشخص شده است (۳).

در مطالعه‌ای بر روی موش‌های صحرایی تحت تیمار با عسل آکاسیا (اقاقیای سیاه)، مشاهده شد میزان پوست‌زایی و التیام به طرز معنی‌داری در گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود (۱۳).

در مطالعه‌ی انجام شده بر روی اثرات عسل گیاه کلپوره بر فرآیند التیام زخم سوختگی، درصد بهبودی زخم در روزهای ۱۲ و ۱۸ در گروه کنترل به‌ترتیب ۳۰/۲ و ۶۱/۴ درصد و در گروه تیمار به‌ترتیب ۳۹ و ۷۸ درصد بود. در بررسی کیفی هیستوپاتولوژی نمونه‌های بافتی درمان شده با عسل، فرایند ترمیم زخم سرعتی بهتر، با آرایش منظم‌تر و تراکم آماسی کمتر از خود نشان داد. نتایج این مطالعه نشان داد که احتمالاً عسل گیاه کلپوره باعث تسریع در روند التیام زخم سوختگی در موش می‌گردد (۲).

سوختگی، فشاری و ساده مؤثر بوده و نتایج مطالعات گذشته با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. مطالعه‌ی حاضر نشان داد که استفاده از عسل بهار نارنج ۷۵ درصد می‌تواند بر روند التیام زخم از نظر زمانی تأثیر مثبت داشته باشد و در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ درصد بهبودی زخم در گروه تحت درمان با عسل ۷۵ درصد بیشترین مقدار بوده که در بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپیک شاهد بهبود بهتر و سریع‌تر در این گروه بودیم و با آنژیوژنز سریع در بافت جوانه‌ای و تکثیر فیبروبلاست‌ها و تولید کلاژن بیشتر و تشکیل بافت پوششی و کاهش ارتشاح سلول‌های التهابی، وضعیت کلی ترمیم زخم را بهبود بخشید و در مرحله‌ی بعد گروه تحت درمان با پماد فنی توئین ۱ درصد بهترین شرایط را داشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی حاضر می‌توان نتیجه گرفت که بهبود زخم با عسل بهار نارنج ۷۵ درصد نسبت به پماد فنی توئین بهتر بوده و به دلیل خواص ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و قارچی، اسمزی، تحریک آنژیوژنز و اپیتلیزاسیون عسل بهار نارنج می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از ریاست محترم و مدیر گروه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل اعلام می‌دارد.

References

1- Ansari Cheharsughi MS, Ahmadi-Dastgerdi A, Gholami-Ahangaran M. Antibacterial effect of Capparis spinosa (*Capparis spinosa*) and Pistacia atlantica (*Pistacia atlantica*) extracts on growth of Escherichia coli in vitro and in vivo. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*. 2020; 14(54): 115-126. [In Persian]

2- Ansari M, Alizadeh AM, Paknejad M, Khaniki M, Naeimi SM. Effects of *teucrium polium* honey on burn wound healing process. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2009; 11(3): 7-12. [In Persian]

در بررسی انجام شده بر روی تأثیر عسل در بهبود زخم ساق پا در ۲۵ بیمار، هر زخم دو بار در روز و به مدت یه هفته با عسل استریل تحت درمان قرار گرفت. در طول دوره درمان، متوسط سطح زخم تمام بیماران به‌طور قابل توجهی از ۵۱ به ۲۲ کاهش یافت. در ۱۸ بیمار کاهش میزان شدت درد دیده شد. در حالی که در ۵ بیمار شدت درد در آنها ثابت بود. رضایت از درمان با عسل در ۸۰ درصد بیماران مثبت بود (۱۴).

طی مطالعه‌ی انجام شده در تجویز موضعی همزمان عسل و آلئوئه‌ورا، تسریع جمع‌شدگی و التیام زخم‌های ناشی از سوختگی درجه دو مشاهده گردید. بهبودی سریع و دسترسی آسان به عسل و آلئوئه‌ورا سبب پیشنهاد این ترکیبات برای درمان زخم‌های ناشی از سوختگی شد (۱۵).

نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات انجام گرفته قبلی بر روی تأثیر عسل بر روی زخم‌های ناشی از سوختگی، مقایسه عسل و روغن حیوانی در روند ترمیم زخم در موش صحرایی، تأثیر پانسمان عسل با پانسمان هیدروکلئید بر ترمیم زخم فشاری و مقایسه‌ی اثر عسل و فنی توئین در سرعت بسته شدن زخم و تأثیر عسل آکاسیا بر میزان پوست‌زایی و التیام می‌توان نتیجه گرفت که عسل بر تسریع ترمیم زخم‌های

3- Hadagali MD, Chua LS. The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. *European Food Research and Technology*. 2014; 239(6): 1003-1014.

4- RIAHI S, IMANI H, Torkamaan G, MOFID M, Ghoshouni H, Khoushbaten A. Effect of topical application of honey on skin wound healing with full thickness in male rats. 2008; 5(1): 23-27.

5- Ghaderi R, Afshar M, Akhbarie H, Gollalipour M J, Ghaderi R, Afshar M. Comparison of the efficacy of honey and animal oil in accelerat-

ing healing of full thickness wound of mice skin. *Int J Morphol.* 2010; 28(1): 193-8. [In Persian]

6- Salahvarzan A, Abdolapour F, Ismaeli A, Sepahvand F. Anti-oxidant and anti-microbial activities of two types of honey by change in bees, diet in comparison with other honey products in Abestan region of Khorramabad province, yafte. 2015; 17(3): 10-15. [In Persian]

7- Ouchemoukh S, Louaileche H, Schweitzer P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food control.* 2007; 18(1): 52-58.

8- Esmaelian B, Najafi O, Aldavood S, Jalali F, Farshid A, Rahmani S. Clinical and histopathological evaluations of local honey application in the healing of experimental wounds in dog. *Journal of Veterinary Research.* 2012; 67(3): 265-271. [In Persian]

9- Henriques A, Jackson S, Cooper R, Burton N. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 58(4): 773-777.

10- Khodashenas B. The influential factors on antibacterial behaviour of copper and silver nanoparticles. *Indian Chemical Engineer.* 2016; 58(3): 224-239. [In Persian]

11- Ammar I, Bardaa S, Mzid M, Sahnoun Z, Rebaii T, Attia H, et al. Antioxidant, antibacterial and in vivo dermal wound healing effects of Opuntia flower extracts. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2015; 81: 483-490.

12- Nowroozi N, Faraji S, Nouralishahi A, Shahrousvand M. Biological and structural properties of graphene oxide/curcumin nanocomposite incorporated chitosan as a scaffold for wound healing application. *Life Sciences.* 2021; 264: 118640. [In Persian]

13- Eftekhari B, Sahraian M, A, Nouralishahi B, Khaji A, Vahabi Z, Ghodsi M, et al. Prognostic factors in the persistence of posttraumatic epilepsy after penetrating head injuries sustained in war. *Journal of neurosurgery.* 2009; 110(2): 319-326. [In Persian]

14- Mayer A, Slezak V, Takac P, Olejnik J, Majtan J. Treatment of non-healing leg ulcers with honeydew honey. *Journal of tissue viability.* 2014; 23(3): 94-97.

15- Shahani M, Rouhollah F, Atabi F, Hajra-souliha S, Samsami M. Cellular Effects of Wound Fluid (Seroma) from Tumor Bed on Human Breast Cancer Cell Lines. *Archives of Advances in Biosciences.* 2021; 12(1): 18-24. [In Persian]

Comparison of the effect of *citrus aurantium* honey with phenytoin ointment on wound healing in rats

Oveys Pourmahdi¹, Ilar Moshtagh², Mahsa Rezvan³, Majid Gholami-Ahangaran^{4*}

1- Department of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

2- Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

3- Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

4- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: December 26, 2021; Revise: February 26, 2022; Accept: March 11, 2022

Summary

In this experimental study, 32 rats were anesthetized with 2% ketamine and 5% xylazine, ip. Then a shear wound was created on the back of each animal, measuring one cm² in full thickness. Mice were divided into negative control, positive control (osrine), spring orange 75% and phenytoin 1% groups. In the experimental group, 2 g of ointment was applied twice a day as a thin layer on the surface. Wounds were monitored for 14 days. Sampling was performed for histopathological examinations on days 4, 7, 10 and 14 after wounding. Digiser software was used to measure wound shrinkage. In this study, the rate of angiogenesis, fibroplasia, epithelial formation, collagen deposition and infiltration of inflammatory cells were evaluated. On microscopic examination on day 4, epidermal and dermal damage was observed in the presence of blood clots and infiltration of inflammatory cells in the treated group and budding tissue forming in the 75% spring orange and phenytoin 1% honey groups. On day 7, bud tissue was detectable in the treated groups. In the group treated with honey, 75% of the cell density of bud tissue was lower than the other groups and collagen synthesis was higher than the other groups and the developing epithelial tissue was also detectable. On day 10, the density of inflammatory cells, blood vessels, and fibroblasts in bud tissue decreased. In the negative and positive control groups, 75% of the bud tissue appeared younger than honey and 1% phenytoin. Germ tissue in honey group 75% and phenytoin 1% showed lower cell density and higher collagen synthesis. In the honey group, 75% of the formation of epithelial tissue was more advanced compared to the 7th day. On the 14th day in the honey group, 75% of the mature bud tissue appeared to have low cell density and collagen fibers were thicker, regular and more mature than the other groups, and the covering tissue completely covered the wound surface. In the study of wound contraction, the results showed that the group treated with honey 75% had a higher improvement than phenytoin 1%, which was statistically significant.

Key words: Wound healing, spring orange honey, phenytoin, shear wound, rat

بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاه دارویی چریش تهیه شده با حلال‌های مختلف بر روی باکتری‌های بیماری‌زا

حبیب دهمرده^{۱*}، رضا روحانی^۲، زهرا بیگمی^۳

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

۲- گروه جراحی مغز و اعصاب، بیمارستان امیرالمومنین، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

دریافت مقاله: ۷ آبان ۱۴۰۰، بازنگری: ۳۰ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۸ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

چریش (*Azadirachta indica*) به‌عنوان یک گیاه دارویی به دلیل خواص ضد باکتریایی، ضد مالاریا، ضد ویروسی و ضد قارچی شناخته شده است. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاه دارویی چریش تهیه شده با حلال‌های مختلف بر روی باکتری‌های بیماری‌زا است. قسمت‌های مختلف گیاه دارویی چریش از منطقه سیستان و بلوچستان جمع‌آوری گردیده، در سایه خشک و با استفاده از حلال‌های مختلف عصاره‌گیری انجام شد و قطر هاله مهار در رقت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در برابر سویه‌های باکتری بررسی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره استونی میوه چریش بیشترین تأثیر بر *انتروکوکوس فیکالیس*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسنتری* داشته است و عصاره متانولی و اتانولی میوه بیشترین مهارکنندگی بر روی *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* از خود نشان داده است همچنین عصاره استونی برگ بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* از خود نشان داده است. نتایج نشان داد که برگ و میوه گیاه دارویی چریش با حلال‌های مختلف، اثر مهاری متفاوتی علیه میکروب‌ها داشته‌اند.

واژگان کلیدی: حلال‌های عصاره‌گیری، گیاه چریش، باکتری بیماری‌زا، قطر هاله مهار رشد

مقدمه

گیاهان دارویی به‌عنوان ذخایر و گنجینه‌های ژنتیکی، بخش مهمی از تنوع زیستی در بخش کشاورزی محسوب می‌شوند. با توجه به نقش ویژه گیاهان دارویی در مدیریت پایدار به‌ویژه در ابعاد توسعه اقتصادی، زیست-محیطی، بهداشتی، اشتغال، امنیت غذایی و ذخایر ژنتیکی مطالعه و بررسی آنها حائز اهمیت است. رویکرد روزافزون به استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهانی، اهمیت کشت و تولید این گیاهان را بیشتر کرده است. استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور استخراج عصاره‌های آنها برای تولید دارو و جایگزین کردن آنها به جای داروهای شیمیایی برای حفظ سلامتی انسان‌ها از مهم‌ترین نیازهای تمدن امروزی است (۲۹).

گیاهان دارویی حاوی ذخایر ارزشمندی از ترکیبات فعال زیستی از جمله متابولیت‌های ثانویه هستند که بسیاری از آنها اثرات ضد میکروبی، آفت‌کشی یا دورکنندگی داشته و در دفاع گیاهان در برابر آفات و بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. گیاهان بالغ بر یکصد هزار متابولیت ثانویه طبیعی با وزن مولکولی پایین تولید می‌کنند. چریش با نام علمی *Azadirachta indica* از خانواده سنجد تلخ () *Meliaceae* از جمله گیاهان دارویی با خاصیت حشره‌کشی و کنه‌کشی است که تاکنون موفقیت‌های زیادی در استفاده از ترکیبات مختلف آن در کنترل آفات حاصل شده است (۵، ۲۵).

چریش درختی همیشه‌سبز و بومی کشورهای جنوب و جنوب شرق آسیا بوده و در هندوستان، پاکستان، سریلانکا، تایلند، برمه، مالزی، بنگلادش و اندونزی پراکنده است. این درخت در نواحی گرم جنوب و جنوب شرقی ایران از جمله سواحل خلیج فارس، بندرعباس، جزیره قشم، چابهار و میناب می‌روید و احتمالاً از هندوستان وارد ایران شده است

(۶، ۱۰).

خواص ضد قارچی، ضد باکتریایی و حشره‌کشی عصاره برگ و بذر چریش ناشی از وجود ترکیبات فنلی، فلاونوئید، لیمونید، ترپن و ترپنوئید می‌باشد (۲۴).

چندین ترکیب فعال شیمیایی در این گیاه از جمله گلیکوزیدها، کومارین، تانن، آزادیراکتین، نیمبین، نیمبیدین، دی‌ترپنوئیدها، تری‌ترپنوئیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، ترکیبات گوگردی، پلی‌فنولیک‌ها وجود دارد (۲۲). بخش‌های مختلف درخت چریش، از جمله برگ‌ها، پوست، میوه، گل‌ها، روغن و صمغ در درمان برخی بیماری‌ها نظیر سرطان، فشار خون بالا، بیماری‌های قلبی و دیابت کاربرد دارد. اثرات بالقوه‌ای که هنگام استفاده از این عصاره‌ها مشاهده می‌شود، مطمئناً می‌تواند به مکانیسم‌های سلولی و مولکولی نسبت داده شود. این مکانیسم‌ها شامل مهار رادیکال‌های آزاد، سم‌زدایی، ترمیم DNA، تغییر چرخه سلولی، کاهش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و اتوفاجی، نظارت بر سیستم ایمنی، ضد التهاب، ضد فعالیت‌های رگ‌زایی و ضد متاستاتیک و توانایی تعدیل مسیریهای سیگنالی مختلف است (۲۶).

روغن چریش که به راحتی در نواحی شمال هند در دسترس است برای درمان سرطان، بیماری‌های پوستی، اختلالات گوارشی و ایدز فرموله شده است (۳۰).

عصاره برگ چریش فعالیت ضد باکتریایی بالقوه را نشان داد (۱۶). همچنین مشخص شد که روغن چریش در کشتن باکتری‌های مقاوم به چند داروی جدا شده از انسان موثر است (۱۴). یک گلیکولیپید محلول در آب، سولفونوکینوووسیل دی‌آسپیل گلیسرید جدا شده از برگ چریش، فعالیت بازدارنده‌ای را در برابر *سالمونلا تیفی*، *شیگلا دیسانتریا*، *اشرشیاکلی* و *ویبریو کلرا* نشان داد (۳).

اشریشیالکی (ATCC 25922)، شیگلا دیسنتری (ATCC 1288)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، باسیلیوس سرئوس (ATCC 1015) و لیستریا مونوسیژنوزا (ATCC 1298) استفاده شد.

از کشت تازه باکتری، سوسپانسیونی با رقت نیم مک فارلند (کدورت معادل $10^8 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر)، تهیه شد و به صورت چمنی در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس در فواصل مناسب، تعدادی چاهک به قطر ۶ میلی‌متر با عمق ۵ میلی‌متر ایجاد گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها درون چاهک مربوط به آن ریخته شد. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد نمونه‌های باکتریایی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. به‌منظور تأیید نتایج حاصل از آزمایش برای هر یک از عصاره‌ها و برای هر نمونه باکتریایی، سه بار تکرار گردید.

نتایج

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بیشترین و کمترین تأثیر گیاه دارویی چریش بر *انتروکوکوس فیکالیس* به ترتیب حاصل از عصاره استون بافت میوه و عصاره هگزان برگ بود (نمودار ۱). نمودار ۲ نشان می‌دهد که بیشترین تأثیر مهار رشد گیاه دارویی چریش بر *اشریشیالکی* حاصل از عصاره متانول میوه و کمترین میزان مربوط به عصاره متانول برگ مشاهده شد (نمودار ۲). عصاره استونی میوه و برگ به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر مهار رشد را بر باکتری شیگلا دیسنتری داشته است (نمودار ۳).

علاوه بر آن بیشترین تأثیر مهار رشد عصاره اتانولی میوه بر *سودوموناس آئروژینوزا* بود (نمودار ۴). همچنین عصاره استونی میوه علاوه بر *انتروکوکوس فیکالیس* بیشترین تأثیر و عصاره

مواد مؤثره چریش بر سیستم هاضمه، اندوکراین و تولید مثل حشرات اثرگذار است (۱۷). پیچیدگی ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی می‌تواند تأثیر مثبتی بر کاربرد اسانس‌ها در مدیریت بیمارگرهای گیاهی داشته باشد. اسانس‌ها به دلیل داشتن خاصیت آب‌گریزی خود قادرند غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرند و با ایجاد اختلال و بی‌نظمی در زنجیره انتقال الکترون و کارکرد آنزیم‌ها، فعالیت سلول‌های میکروارگانیسم‌ها را به‌طور قابل‌توجهی کاهش دهند (۱۸). بر این اساس، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاه دارویی چریش تهیه‌شده با حلال‌های مختلف بر روی باکتری‌های بیماری‌زا بوده است.

مواد و روش‌ها

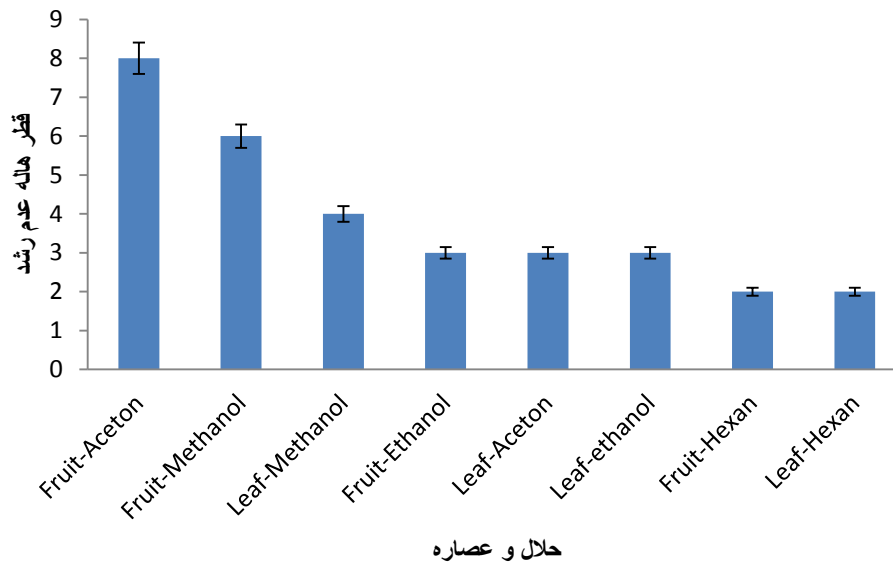
تهیه نمونه: گیاه مورد استفاده در این تحقیق از شهرستان سرپاز (سیستان و بلوچستان) جمع‌آوری و در هرباریوم گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت تعیین‌گونه شد. پس از جمع‌آوری گیاهان، برگ‌ها در شرایط مناسب و در سایه خشک گردیده و جهت تهیه عصاره با آسیاب خرد شد.

تهیه عصاره: برای تهیه عصاره از روش ماسراسیون استفاده شد (۲۴). به این صورت که پس از خرد کردن برگ و میوه، ۵۰ گرم از هر نمونه به مدت ۴۸ ساعت در اتانول، هگزان، استون و متانول خیسانده شده و پس از گذشت این مدت زمان با کاغذ صافی صاف گردید. بعد از اتمام عملیات عصاره‌گیری، عصاره‌های به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر خلا) (شرکت طیف آزما طب، ایران)) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و در دمای ۴۰ درجه به مدت ۲ روز خشک گردید.

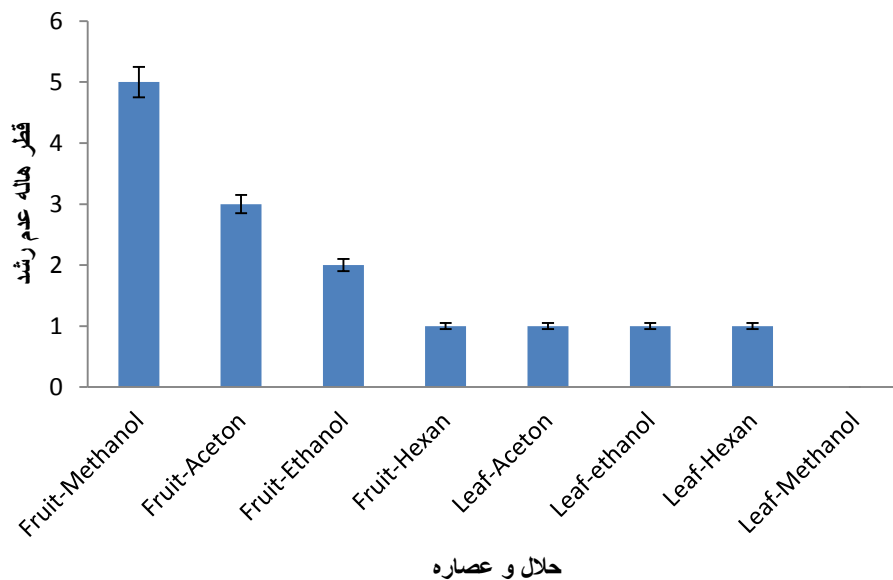
سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت: در این تحقیق از سویه‌های باکتریایی استاندارد *انتروکوکوس فیکالیس* (ATCC 29212)،

عصاره استون برگ و عصاره هگزان و بافت میوه بوده است (نمودار ۶).

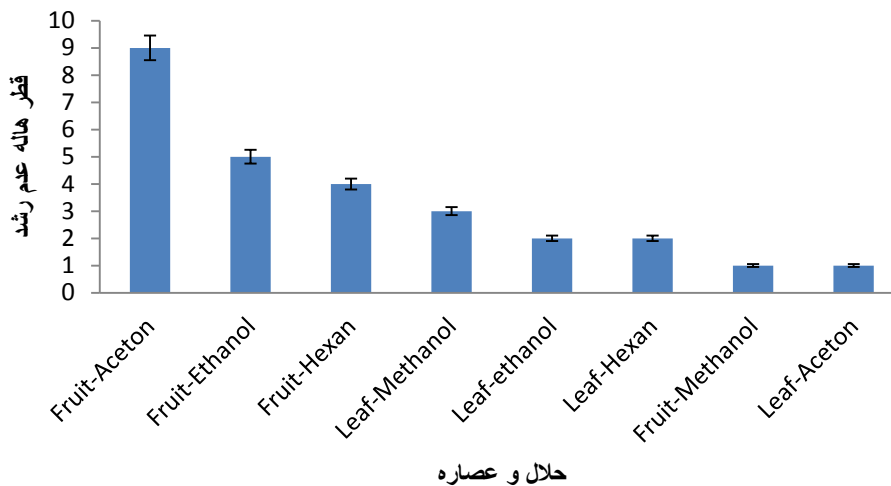
هگزان میوه کمترین میزان تأثیر را روی باسیلوس سرئوس داشت (نمودار ۵). بیشترین و کمترین تأثیر مہار رشد بر لیستریا مونوسیتوزنز به ترتیب حاصل از



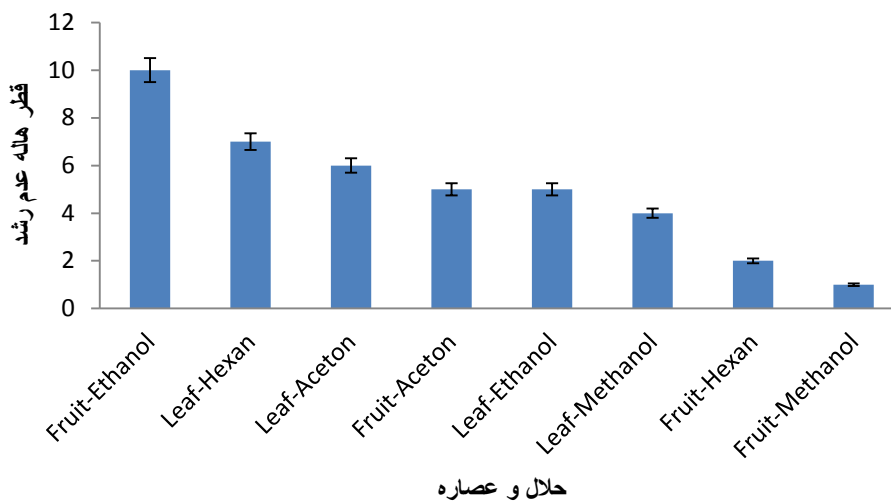
نمودار ۱- تأثیر نوع بافت و حلال عصاره‌گیری بر قطر هاله (میلی‌متر) عدم رشد انتروکوکوس فیکالیس



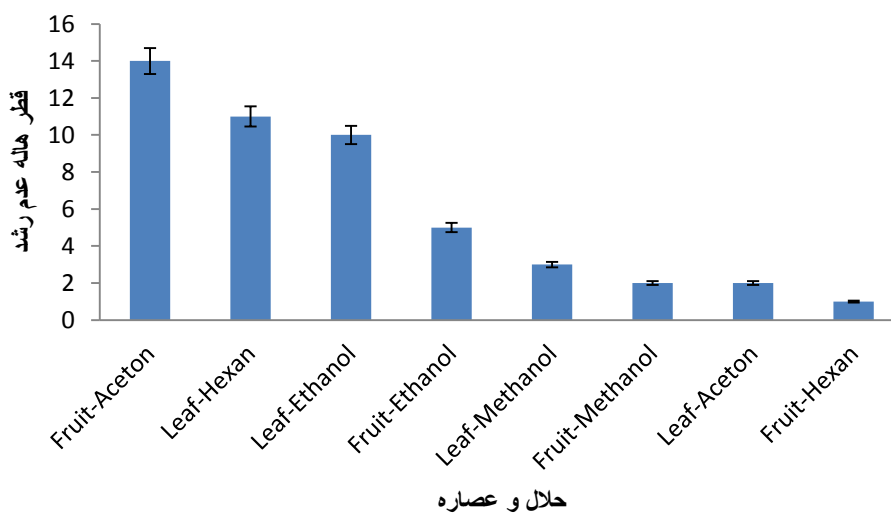
نمودار ۲- تأثیر نوع بافت و حلال عصاره‌گیری بر قطر هاله (میلی‌متر) عدم رشد اشریشیاکلی



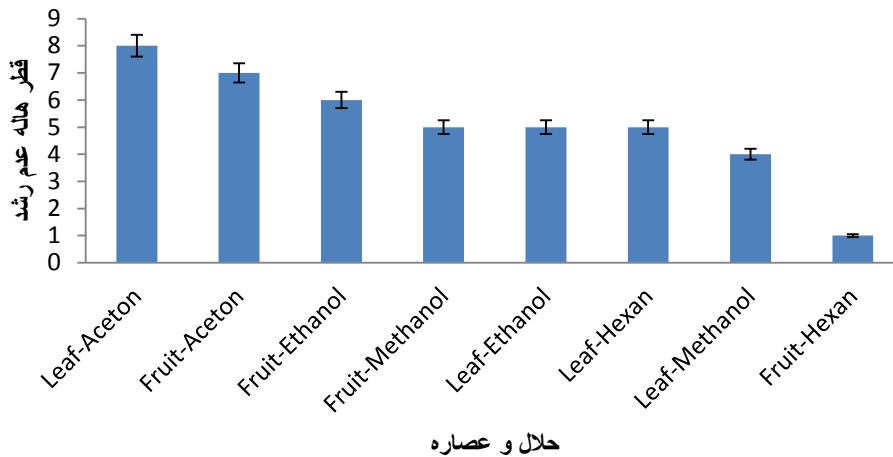
نمودار ۳- تأثیر نوع بافت و حلال عصاره‌گیری بر قطر هاله عدم رشد شینگلا دیسنتری



نمودار ۴- تأثیر نوع بافت و حلال عصاره‌گیری بر قطر هاله عدم رشد سودوموناس آتروژینوزا



نمودار ۵- تأثیر نوع بافت و حلال عصاره‌گیری بر قطر هاله عدم رشد باسیلوس سرئوس



نمودار ۶- تأثیر نوع بافت و حلال عصاره‌گیری بر قطر هاله (میلی‌متر) عدم رشد لیستریا مونوسیتوژنز

بحث

گیاهان دارویی به‌عنوان ذخایر و گنجینه‌های ژنتیکی، بخش مهمی از تنوع زیستی در بخش کشاورزی محسوب می‌شوند. با توجه به نقش ویژه گیاهان دارویی در مدیریت پایدار به‌ویژه در ابعاد توسعه اقتصادی، زیست محیطی، بهداشتی، اشتغال، امنیت غذایی و ذخایر ژنتیکی، بررسی آنها حائز اهمیت است. رویکرد روزافزون به استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهانی، اهمیت کشت و تولید این گیاهان را بیشتر کرده است. استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور استخراج عصاره‌های آنها برای تولید دارو و جایگزین کردن آنها به جای داروهای شیمیایی برای حفظ سلامتی انسان‌ها از مهم‌ترین نیازهای تمدن امروزی می‌باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حلال‌ها و بافت‌های مختلف گیاه دارویی چریش تأثیر متفاوتی بر عوامل مختلف میکروبی دارند. اجزای گیاه چریش (*Azadirachta indica*) دارای مهارکنندگی رشد باکتری از طریق تجزیه دیواره سلولی، می‌باشند (۲۳). عصاره اتانولی برگ چریش فعالیت ضد باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با بیشترین مناطق بازدارندگی

در غلظت ۱۰۰ درصد نشان داده است (۳۱). نتایج بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره برگ چریش در برابر برخی از سویه‌های حساس و مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های بیماری‌زای مهم انسانی نشان داده است که عصاره متانولی قوی‌ترین اثر بازدارنده رشد (نسبت به حلال‌های اتیل استات و اتانولی) را بر هر دو سویه استاندارد و جدا شده بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است (۱۹). در تحقیق حاضر، بیشترین و کمترین تأثیر مهار رشد بر *سودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب حاصل از عصاره اتانولی و متانولی میوه بوده است. دلیل اختلاف نتایج به دست آمده می‌تواند به شرایط حاکم بر هر دو آزمایش از جمله، گونه گیاه، نوع بافت گیاهی، سن گیاه، خاستگاه گیاه، فصل برداشت و غیره باشد (۷، ۳۴).

بررسی نتایج عصاره اتانولی و عصاره آبی برگ و پوست خشک و تازه *A. indica* (چریش) علیه *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده که مواد تازه چریش بیشترین تأثیر را بر روی *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته‌اند و در کل عصاره‌های تازه کارآمدتر از عصاره‌های خشک بوده‌اند. *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها باکتری بود که به‌طور مستعد تحت تأثیر عصاره‌های چریش قرار

پروتئوس و لگاریس، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی بررسی شد، نتایج نشان داد که بیشترین مهارکنندگی عصاره متانولی چریش در برابر باسیلوس سوبتیلیس با ناحیه بازدارندگی در حدود ۲۸ میلی‌متر بوده است (۱۱) و همچنین در مطالعه دیگری نیز بیان شد که عصاره چریش مهارکننده استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین است (۳۲).

در مطالعه Ali و همکاران که فعالیت ضد میکروبی برگ چریش بر روی باکتری‌های *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum* and *Escherichia coli* را بررسی کردند، نتایج نشان داد که عصاره برگ چریش مهارکنندگی خوبی بر روی باکتری‌ها داشته است (۱).

در مطالعه Abalaka و همکاران که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره برگ چریش بر روی باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، و اشریشیاکلی را بررسی کردند نتایج نشان داد که بیشترین حساسیت مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا و بعد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی بوده است (۲) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

نتایج مطالعه Koona و همکاران که فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی چریش را بررسی کردند نشان داد که بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی و انتروکوکوس فیکالیس بوده و اثرات کمتر در برابر باکتری باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه بوده است (۱۶).

در بسیاری از مطالعات فعالیت ضد باکتریایی بالایی در برابر کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس مشاهده شد و در مطالعات کمی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی روغن

گرفته است، در حالی که اشریشیاکلی به هیچ‌یک از آنها پاسخ نداد (۹). در صورتی که در تحقیق حاضر مشخص شد که بیشترین تأثیر مهار رشد گیاه دارویی چریش بر اشریشیاکلی حاصل از عصاره متانولی میوه بوده است. ضمناً بیشترین تأثیر مهار رشد گیاه دارویی چریش بر سودوموناس آئروژینوزا حاصل از عصاره اتانولی و بافت میوه بوده است.

بررسی و نتایج عصاره‌های آبی، اتانولی و اتیل استات برگ چریش بر رشد برخی از پاتوژن‌های انسانی (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*، *Candida albicans* و *Microsporium gypseum*) نشان داده که غلظت ۲۰ درصد عصاره اتیل استات بالاترین فعالیت بازدارندگی را در برابر تمام پاتوژن‌های آزمایشی در تمام غلظت‌های استفاده شده در مقایسه با غلظت‌های مشابه سایر عصاره‌ها نشان داد (۲۰). عصاره‌های آبی و متانولی برگ چریش اثرات مهاری علیه باکتری اشریشیاکلی، گونه‌های سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده‌اند (۲۱). عصاره اتانولی برگ چریش اثرات بازدارندگی علیه اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد (۲۸).

در مطالعه vestby و همکاران نتایج نشان داده شد که عصاره گیاه چریش مهارکننده عفونت‌های بیوفیلم ناشی از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فیکالیس و سودوموناس آئروژینوزا بوده است (۳۳) و همچنین عصاره اتانولی برگ چریش مهارکننده بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین در رقت‌های ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۷). فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی، آبی و اتری برگ‌های چریش بر روی شش نوع باکتری شامل باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی

جمله سیکلواکسیژناز (COX) و آنزیم لیپواکسیژناز (LOX) نقش ضد التهابی دارد (۱۲). از طرفی با توجه به این که این گیاه صرفاً در غلظت‌های پایین برای لنفوسیت‌های انسانی غیر سمی است (۱۵)، لذا پیشنهاد می‌گردد استفاده از آن صرفاً در شرایط آزمایشگاهی و در صورت استفاده انسانی، صرفاً با تجویز پزشک و بعد از گذراندن تست‌های بالینی مقدر باشد.

چریش در برابر اشریشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه مشاهده شد (۱۳).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حلال‌ها و بافت‌های مختلف گیاه دارویی چریش تأثیر متفاوتی بر انواع مختلف میکروب‌ها داشتند. چریش به دلیل منبع غنی آنتی‌اکسیدان به‌عنوان خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد کاربرد دارد. چریش همچنین از طریق تنظیم فعالیت‌های آنزیمی پیش‌التهابی از

References

- 1- Ali E, Islam S, Hossen I, Khatun M, Islam A. Extract of neem (*Azadirachta indica*) leaf exhibits bactericidal effect against multidrug resistant pathogenic bacteria of poultry. *Vet Med Sci*. 2021; 7(5): 1921–1927.
- 2- Abalaka M, Oyewole OA, Kolawole AR. Antibacterial activities of *azadirachta indica* against some bacterial pathogens. *Adv Life Sci*. 2012; 2(2): 5-8.
- 3- Bharitkar YP, Bathini S, Ojha D, Ghosh S, Mukherjee H, Kuotsu K, et al. Antibacterial and antiviral evaluation of sulfonylquinosyldiacylglyceride: A glycolipid isolated from *Azadirachta indica* leaves. *Letters in Applied Microbiology*. 2014; 58: 184–189.
- 4- Chibuzo UC. Antimicrobial Activity of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Extract on Some Bacteria. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2019; 8: 431-437.
- 5- Deng Y, Shi D, Yin Z, Guo J, Jia R, Xu J, et al. Acaricidal activity of petroleum ether extract of neem (*Azadirachta indica*) oil and its four fractions separated by column chromatography against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* larvae in vitro. *Experimental Parasitology*. 2012; 130(4): 475-477.
- 6- Fernández-Grandon GM, Harte SJ, Ewany J, Bray D, Stevenson PC. Additive Effect of Botanical Insecticide and Entomopathogenic Fungi on Pest Mortality and the Behavioral Response of Its Natural Enemy. *Plants*. 2020; 9(2): 173.
- 7- Fazeli-Nasab B, Sirousmehr A, Mirzaei N, Solimani M. Evaluation of total phenolic, flavonoid content and antioxidant activity of Leaf

and Fruit in 14 different genotypes of *Ziziphus mauritiana* L. in south of Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*. 2017; 4(4): 1-14.

8- Fooladvand Z, Fazeli-nasab B. Antibacterial activities of *Stachys lavandulifolia* Vahl. extract against eight bacteria. *Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs)*. 2014; 5(1): 13-18.

9- Francine U, Jeannette U, Pierre RJ. Assessment of antibacterial activity of neem plant (*Azadirachta indica*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Med Plants Stud*. 2015; 3(4): 85-91.

10- Gogi MD, Syed AH, Atta B, Sufyan M, Arif MJ, Arshad M, et al. Efficacy of biorational insecticides against *Bemisia tabaci* (Genn.) and their selectivity for its parasitoid *Encarsia formosa* Gahan on Bt cotton. *Scientific reports*. 2021; 11(1): 1-12.

11- Grover A, Bhandari B. S, Rai N. Antimicrobial activity of medicinal plants-*Azadirachta indica* A. Juss, *Allium cepa* L. and *Aloe vera* L. *Journal of Pharm Tech Research*. 2011; 3(2): 1059-1065.

12- Hossain MA, Al-Toubi WA, Weli AM, Al-Riyami QA, Al-Sabahi JN. Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. *Journal of Taibah University for Science*. 2013; 7(4): 181-188.

13- Jagannadh JH, Radhika M. Antimicrobial emulsion (coating) based on biopolymer containing neem (*meliaazadirachata*) and turmeric (*curcuma longa*) extract for wound healing. *Biomed Mater Eng*. 2006; 16(5): 329-36.

- 14- Jain D, Jayaram L, Prabhu MV, Bhat K.** Antibacterial effect of neem (*Azadirachta indica*) oil on multidrug resistant bacteria isolated from human infections. *International Journal of Biological and Medical Research*. 2013; 4: 3544–3546.
- 15- Jerobin J, Makwana P, Suresh Kumar R, Sundaramoorthy R, Mukherjee A, Chandrasekaran N.** Antibacterial activity of neem nanoemulsion and its toxicity assessment on human lymphocytes in vitro. *International journal of nanomedicine*. 2015; 10(2): 77-86.
- 16- Koona S, Budida S.** Antimicrobial potential of the extracts of the leave of azadirachta indica linn. *Nat Sci Biol*. 2011; 3(1): 65-9.
- 17- Khanavi M, Hasanloo T, Hajimehdipoor H.** Quantitative Determination of Azadirachtin in *Melia indica* and *M. azedarach*. *Journal of Medicinal Plants*. 2019; 18(69): 185-193.
- 18- Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y.** Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1981; 45(4): 945-952.
- 19- Maleki L, Sadeghian-Rizi T, Ghannadian M, Sanati M H, Shafizadegan S, Sadeghi-Aliabadi H.** Antibacterial activity of *Azadirachta indica* leaf extracts against some pathogenic standards and clinical bacterial isolates. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*. 2017; 5(1): 12987-12987.
- 20- Mahmoud D, Hassanein N, Youssef K, Abou Zeid M.** Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011; 42: 1007-1016.
- 21- Mamman PH, Mshelia WP, Susbatrus SC, Sambo KW.** Antibacterial effects of crude extract of *Azadirachta indica* against *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2013; 5(1): 14-18.
- 22- Mondall N, Mojumdar A, Chatterje S, Banerjee A, Datta J, Gupta S.** Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium. *J Appl Sci Environ Manage*. 2009; 13(1): 49-53.
- 23- Allan EJ, Eeswara P, Johnson S, Mordue AJ (Luntz), Morgan ED, Stuchbury T.** The production of azadirachtin in-vitro tissue culture of neem, *Azadirachta indica* Pestic. *Sci*. 1994; 42: 147-152.
- 24- Nathan SS, Kalaivani K, Murugan K.** Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta tropica*. 2005; 96(1): 47-55.
- 25- Patil SP, Chaudhari RY, Nemade MS.** *Azadirachta indica* leaves mediated green synthesis of metal oxide nanoparticles: A review. *Talanta Open*. 2022; 5: 100083.
- 26- Patil SM, Shirahatti PS, V B C K, Ramu R, M N N P.** *Azadirachta indica* A. Juss (neem) as a contraceptive: An evidence-based review on its pharmacological efficiency. *Phytomedicine*. 2021; 88: 153596.
- 27- Quelemes PV, Perfeito ML, Guimarães MA, dos Santos RC, Lima DF, Nascimento C.** Effect of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Leaf Extract on Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and *Schistosoma Mansoni* Worms. *J. Ethnopharmacol*. 2015; (175): 287–294.
- 28- Rasool M, Malik A, Arooj M, Alam MZ, Alam Q, Awan M, et al.** Evaluation of antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Azadirachta indica* and *Psidium guajava* against clinically important bacteria at varying pH and temperature. *Biomed Res*. 2017; 28: 134-139.
- 29- Ramesh P, Okigbo R.** Effects of plants and medicinal plant combinations as anti-infectives. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2008; 2(7): 130-135
- 30- Santhosh V, Navaratnam V.** Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. *Asian Pacific J Trop Biomed*. 2013; 3(7): 505-514.
- 31- Sarmiento WC, Maramba CC, Gonzales MLM.** An in-vitro study on the antibacterial effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extract on methicillin-sensitive and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PIDSP J*. 2011; 12(1): 40-45.
- 32- S L P, A U, S J G F.** Investigation on the Biofilm Eradication Potential of Selected Medicinal Plants against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol. Rep*. 2020; 28, e00523.
- 33- Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL.** Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiot*. 2020; 9(2).
- 34- Valizadeh M, Beigomi M, Fazeli-Nasab B.** Antibacterial and Anti biofilm effects of ethanol and acetone leaf extract of *Momordica charantia* and *Tecomella undulata* against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Adv Biol Biomed Res*. 2020; 8(4): 403-418.

Investigating the antimicrobial activity of *Azadirachta indica* medicinal plant prepared with different solvents on pathogenic bacteria

Habib Dahmardeh^{1*}, Reza Rohani², Zahra Beigomi³

۱۴۲

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

2- Department of Neurosurgery, Amiralmomenin Hospital, Zabol University of medical sciences, Zabol, Iran.

3- Medical School, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Receive: October 29, 2021; Revise: February 19, 2022; Accept: February 27, 2022

Summary

Azadirachta indica is known as a medicinal plant due to its antibacterial, antimalarial, antiviral and antifungal properties. The purpose of this study is to investigate the antimicrobial activity of *Azadirachta indica* medicinal plant prepared with different solvents on pathogenic bacteria. Different parts of *Azadirachta indica* medicinal plant were collected from Baluchistan-Sistan and Baluchistan region, extraction was done in dry shade and using different solvents, and the diameter of the inhibitory halo in a dilution of 100 mg/ml against Bacterial strains were investigated. The results of this study showed that the greatest effect of *Azadirachta indica* medicinal plant on *Enterococcus phicalis*, *Bacillus cereus* and *Shigella dysentery* was obtained from acetone extract and fruit tissue. Against *Escherichia coli* obtained from methanol extract and fruit tissue. Against *Pseudomonas aeruginosa* obtained from ethanol extract and fruit tissue. It was against *Listeria monocytogenes* obtained from acetone extract and leaf tissue. The results of this study showed that the leaves and fruits of *Azadirachta indica* medicinal plant with different solvents had different inhibitory effects against microbes.

Key words: extraction solvents, *Azadirachta indica* plant, pathogenic bacteria, halo diameter of growth inhibition

بررسی میزان ارتباط بین شمارش کلی باکتری‌ها، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته در سلامتی شیر خام دامداری‌های استان خوزستان

حامد واعظی^۱، زهره مشاک^{۲*}

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

دریافت مقاله: ۰۵ بهمن ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۲ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۸ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

با توجه به خصوصیات شیر، ارزیابی ویژگی‌های آن برای تولیدکنندگان شیر و صنایع تولیدی فرآورده‌های لبنی ضروری است. در این مطالعه ۲۴۰ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از دامداری‌های استان خوزستان طی فصول مختلف سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ از نظر شمارش کلی باکتریایی، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ضمن تفاوت معنی‌دار داده‌ها بین ویژگی‌های شیر دو نوع دامداری (صنعتی و سنتی) و همچنین فصول مختلف (بهار و تابستان در مقایسه با دو فصل دیگر)، به‌طور کلی رابطه معکوسی میان اسیدیته با شمارش کلی باکتریایی و همچنین تعداد یاخته‌های پیکری وجود دارد ($p < 0.05$). بنابراین فاکتورهای ذکر شده برای تشخیص سلامتی شیر خام مهم است. در نتیجه می‌توان اظهار نظر نمود که ایجاد گاو‌داری‌های صنعتی، رعایت بهداشت حین شیردوشی و طی زنجیره انتقال شیر از مزرعه تا کارخانه و همچنین اعمال سیستم‌های بهداشتی نظیر تجزیه و تحلیل خطر و کنترل نقاط بحرانی، عملیات بهداشت خوب و عملیات تولید خوب، در سلامتی شیر خام تولیدی الزامی می‌باشد.

واژگان کلیدی: اسیدیته، شمارش یاخته‌های پیکری، شمارش کلی باکتریایی، دامداری، استان خوزستان

مقدمه

شیر یکی از مهم‌ترین، کامل‌ترین و ضروری‌ترین غذاهای طبیعی بشر بوده که به صورت انواع فرآورده‌های لبنی برای سنین مختلف قابل استفاده می‌باشد. با توجه به خصوصیات شیر، کنترل این فرآورده با ارزش و اندازه‌گیری ترکیبات موجود در آن برای تولیدکنندگان شیر و صنایع تولیدی فرآورده‌های لبنی کاملاً ضروری است. این امر از آن جهت حائز اهمیت می‌باشد که در کشور ما نیز کیفیت شیر تأثیر مستقیمی بر فرآوری شیر و کیفیت محصولات تولیدی دارد (۶-۱). کیفیت شیر تحت تأثیر عوامل محیطی و خصوصیات دام قرار می‌گیرد، لذا حفظ کیفیت شیر خام به منظور حفظ جایگاه رقابتی در بازار فروش امری مهم بوده و هر گونه تغییر در ترکیب شیمیایی آن تهدید جدی برای تولید کننده شیر، کارخانجات لبنی و مصرف‌کنندگان است (۲، ۷). یکی از شاخص‌های مهم ارزیابی کیفیت و سلامت شیر، تعداد یاخته‌های پیکری (Somatic cell Count) است. تمامی شیرهای دوشیده شده دارای یاخته‌هایی هستند که از بدن دام جدا شده و وارد شیر می‌شود که بخش عمده آنها را نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها تشکیل می‌دهد. هنگام ایجاد عفونت باکتریایی در گاو، صدمه دیدگی بافت‌ها یا سایر عواملی که منجر به التهاب و تورم در پستان می‌گردد، تعداد یاخته‌های پیکری در شیر افزایش می‌یابد که این امر نتیجه انتقال گلبول‌های سفید خون از خون به غدد پستانی است. با افزایش تعداد یاخته‌های پیکری در شیر، کیفیت فرآوری و راندمان تولید بعضی از محصولات لبنی، به دلیل افزایش تغییرات در ترکیبات شیر، کاهش می‌یابد (۱۰-۸). افزایش لیپولیز و پروتئولیز حاصل از آنزیم‌های یاخته‌های پیکری به ترتیب سبب بوی تند و همچنین کاهش راندمان فرآورده تولیدی می‌شود. در بسیاری از

کشورها، از تعداد یاخته‌های پیکری به‌عنوان شاخص ارزیابی بهداشتی شیر و در قیمت‌گذاری شیر خام استفاده می‌شود. البته نتایج مطالعات اثر یاخته‌های پیکری بر ترکیبات مختلف شیر در کشورهای مختلف جهان متفاوت می‌باشد که دلیل این امر تفاوت در نژاد، منطقه، آب و هوا، تغذیه دام و سایر عوامل محیطی است که بر داده‌های به دست آمده و اثرات مورد بررسی تأثیرگذار می‌باشد (۳، ۱۰).

اسیدیته قابل تیترا نقش اساسی و مهمی جهت ارزیابی تکنیکی کیفیت شیر دارد. ترکیبات شیر که اسیدی می‌باشند و در میزان اسیدیته شیر دخالت می‌نمایند شامل دی‌اکسیدکربن، پروتئین، فسفات و سیترات می‌باشند (کریم، ۱۳۸۵). اسیدیته شاخص مهمی در کهنگی و یا تازگی شیر خام محسوب می‌شود. بار میکروبی شیر، نحوه نگهداری، طول عمر شیر و افزودن مواد افزودنی بازدارنده رشد میکروبی بر روی میزان اسیدیته شیر خام مؤثرند. فعالیت باکتریایی می‌تواند تبدیل لاکتوز به اسیدلاکتیک را افزایش دهد و بنابراین سبب بالا رفتن مقدار اسیدیته قابل تیترا می‌گردد (۱۰، ۱۱). درجه حرارت و رطوبت بالا از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر شمارش کلی باکتریایی (Microbial total count) می‌باشند. میکروارگانیزم‌های موجود در شیر شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و ویروس‌ها است، اما بر اساس روش استاندارد برای شمارش کلی باکتریایی صرفاً باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌هایی که تحت شرایط مشخص قادر به رشد و تولید کلنی باشند، مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. انتظار می‌رود که تحت شرایط غیر بهداشتی در طی زنجیره تولید شیر خام و یا همچنین وجود شیر گاوهای ناسالم شمارش کلی باکتریایی و نیز تعداد یاخته‌های پیکری افزایش بیشتری پیدا کنند (۶، ۱۲). دمای محیط و نحوه نگهداری شیر خام به میکروارگانیزم‌های آلوده کننده امکان رشد و تکثیر داده و می‌تواند موجب

افت کیفیت شیر شود (۵، ۶). با توجه به این که استان خوزستان از نواحی گرمسیر کشور ایران محسوب می‌شود، در این منطقه امکان بروز آلودگی‌های شیر خام افزایش می‌یابد. از سویی دامداری‌های سنتی دارای تجهیزات پیشرفته پرورش دام نبوده و نظارت‌های بهداشتی بر این دامداری‌ها انجام نمی‌شود. حال آنکه در دامداری‌های صنعتی با رعایت اصول فنی و بهداشتی، تغذیه و نگهداری دام انجام شده و جهت پرورش دام از تجهیزات مخصوص استفاده می‌شود. امروزه بیش از ۷۰ درصد شیر و گوشت مورد نیاز کشور را دامداری‌های سنتی و خرد روستایی تأمین می‌کنند و سهم دامداری‌های صنعتی کمتر از ۳۰ درصد است (۳، ۱۳).

بنابراین به دلیل اهمیت کنترل کیفیت شیر و همچنین جایگاه آن به‌عنوان یک محصول با ارزش، در این مطالعه ارتباط اسیدیته، شمارش کلی باکتریایی و تعداد یاخته‌های پیکری نمونه‌های شیر خام جمع‌آوری شده از دامداری‌های استان خوزستان (صنعتی و سنتی) جهت تعیین آلودگی شیر خام طی فصول مختلف سال ۱۳۹۹ الی ۱۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌های شیر از مخازن جمع‌آوری شیر خام در استان خوزستان به‌طور تصادفی (اول و پانزدهم هر ماه) و طی چهار فصل (پاییز و زمستان ۱۳۹۹ و بهار و تابستان ۱۴۰۰) جمعاً ۲۴۰ نمونه جمع‌آوری شد. هر یک از نمونه‌های شیر به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر، در ظروف سترون جمع‌آوری شده و کنار بسته‌های یخ نگهداری شد. نمونه‌برداری به نحوی انجام شد تا از بروز هر گونه آلودگی میکروبی در نمونه‌ها جلوگیری شود. نمونه‌های شیر فوراً به آزمایشگاه منتقل شد (۱۴).

شمارش کلی باکتریایی: به‌منظور تهیه سوسپانسیون اولیه پس از مخلوط کردن نمونه، با رعایت شرایط آسپتیک و تجهیزات سترون مقدار یک میلی‌لیتر از نمونه به ۹ میلی‌لیتر محلول پپتون واتر ۰/۱ درصد اضافه شد و به مدت پنج الی ۱۰ ثانیه مخلوط شد. به همین ترتیب رقت‌های متوالی از هر نمونه تهیه شد (۱۵). شمارش باکتریایی در نمونه‌های شیر به روش شمارش کلنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته انجام شد. به این منظور مقدار یک میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده در پلیت سترون ریخته و با حدود ۲۰ الی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت پلیت کانت آگار مایع، با دمای حدود ۴۰ درجه سلسیوس مخلوط شد. پس از بستن محیط کشت، پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد. پلیت‌های حاوی ۱۰ الی ۳۰۰ کلنی شمارش شده و تعداد برحسب تعداد میکروارگانیزم در میلی‌لیتر (CFU/ml) شیر خام گزارش شدند (۱۲).

تعداد یاخته‌های پیکری: شمارش یاخته‌های پیکری نمونه‌های شیر به روش میکروسکوپی انجام شد. به این منظور هر نمونه شیر در عرض حداکثر شش ساعت پس از نمونه‌برداری آزمایش شد. جهت آزمایش ابتدا نمونه شیر در حمام آب گرم در دمای ۳۸ الی ۴۲ درجه سلسیوس گرم شده با احتیاط مخلوط شد و سپس تا دمای اتاق (حدود ۲۰ درجه سلسیوس) خنک شد. به کمک میکروسرنگ از هر نمونه بر روی سطح دو لام، دو لایه نازک گستره تهیه شد. گستره‌های تهیه شده پس از خشک شدن به روش نیومان-لامپرت و روش اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها در محلول اتانول ۹۵ درجه غوطه‌ور شد و سپس اجازه داده شد تا الکل باقی‌مانده روی لام تبخیر شود. گستره‌ای که در اثر رنگ‌آمیزی آسیب کمتری دیده باشد، جهت

استفاده شد. آزمون‌های مقایسه‌ای با حد احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ انجام شده و P-Value بیش از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

نمونه‌ها از نظر شمارش کلی باکتریایی، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته مورد بررسی قرار گرفتند که محل و زمان نمونه‌برداری به‌عنوان متغیرهای مستقل و شمارش کلی باکتریایی، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته به‌عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. بین متغیرهای آماری مطالعه، آزمون همبستگی دو طرفه پی‌رسون انجام شد که از این نظر رابطه معکوس میان اسیدیته نمونه‌های شیر با شمارش کلی باکتریایی و همچنین تعداد یاخته‌های پیکری وجود داشت ($p < 0/05$). ضریب همبستگی میان اسیدیته نمونه‌های شیر و شمارش کلی باکتریایی برابر با $-0/212$ بود. منفی بودن این مقدار نشانه این است که در نمونه‌های شیر دارای اسیدیته بالاتر، شمارش کلی باکتریایی کمتر می‌باشد ($p < 0/01$). همچنین ضریب همبستگی میان اسیدیته نمونه‌های شیر و تعداد یاخته‌های پیکری برابر با $-0/260$ بود. منفی بودن این مقدار نیز نشانه این است که در نمونه‌های شیر دارای اسیدیته بالاتر، تعداد یاخته‌های پیکری کمتر می‌باشد ($p < 0/01$). بین شمارش کلی باکتریایی نمونه‌های شیر و تعداد یاخته‌های پیکری همبستگی مستقیم وجود داشت. ضریب همبستگی بین شمارش کلی باکتریایی و تعداد یاخته‌های پیکری برابر با $+0/686$ می‌باشد. مثبت بودن این ضریب نشانه این است که در نمونه‌های شیر دارای شمارش کلی باکتریایی بالاتر، تعداد یاخته‌های پیکری نیز بالاتر می‌باشد ($p < 0/01$). میانگین و انحراف معیار برای شمارش کلی باکتریایی، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته به تفکیک فصل نمونه‌برداری محاسبه شد (جدول ۱ تا ۳).

شمارش انتخاب شد. در نهایت یاخته‌های دارای هسته (مانند گلبول‌های سفید و یاخته‌های بافت پوششی)، با استفاده از میکروسکوپ شمارش شدند. نتایج بر حسب تعداد جسم سلولی در میلی‌لیتر (SCC/ml) شیر خام گزارش شد (۱۶).

اندازه‌گیری اسیدیته: جهت اندازه‌گیری

اسیدیته، پس از یکنواخت‌سازی، ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه شیر خام آماده شده در یک بشر ریخته و چهار قطره محلول فنل فتالین (یک گرم پودر فنل فتالین در صد میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه)، به آن اضافه شد. سپس بشر زیر بورت حاوی سود ۰/۱ نرمال (۴/۴۴ گرم سود خالص را در آب به حجم یک لیتر) قرار داده شد. در حین به هم زدن محتویات بشر، به آهستگی به آن سود افزوده شد تا زمانی که قطره سود وارد شده به نمونه رنگ صورتی پایداری را ایجاد کند (۸/۴: pH)، به‌طوری که زمان کل آزمایش بیشتر از ۳۰ ثانیه طول نکشد. جهت اطمینان از یکنواختی و صحت آزمایش، نتیجه با شاهد مقایسه شد. حجم سود مصرفی در تیتراسیون در عدد ۱۰ ضرب شده و نتیجه اسیدیته بر حسب درصد اسیدلاکتیک (درجه دورنیک D°) محاسبه شد (۱۷).

آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار

آماري IBM SPSS Statistics نسخه ۲۴ انجام شد. برای انجام آزمون‌های آماری مقایسه‌ای از داده‌های شمارش کلی باکتریایی و شمارش یاخته‌های پیکری به صورت لگاریتم بر مبنای ۱۰ و برای بررسی توصیفی این دو شاخص از داده‌های طبیعی (بدون اعمال لگاریتم) استفاده شد. جهت مقایسه داده‌ها بین دامداری‌های سنتی و صنعتی از T-Test، جهت مقایسه داده‌ها بین فصول مختلف از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و جهت بررسی همبستگی بین نتایج شمارش کلی باکتریایی، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته از تست همبستگی پی‌رسون

بررسی میزان ارتباط بین شمارش کلی باکتری‌ها، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته ...

جدول ۱- میانگین \pm انحراف معیار (حداقل و حداکثر) شمارش کلی باکتریایی، تعداد یاخته‌های پیکری و اسیدیته نمونه‌های شیر خام جمع‌آوری شده از دامداری‌های استان خوزستان به تفکیک فصل نمونه‌برداری

| فصل نمونه‌برداری | شمارش کلی باکتریایی (CFU/ml) | تعداد یاخته‌های پیکری (SCC/ml) | اسیدیته (درجه دورنیک) |
|------------------|--|--|--|
| فصل بهار | $2/55 \times 10^6 \pm 1/12 \times 10^6$ ab | $2/02 \times 10^5 \pm 0/69 \times 10^5$ b | $14/40 \pm 0/34$ ab (۱۵/۰۰ الی ۱۳/۵۰) |
| فصل تابستان | $3/57 \times 10^6 \pm 1/92 \times 10^6$ c | $1/71 \times 10^5 \pm 0/68 \times 10^5$ a | $14/58 \pm 0/94$ bc (۱۵/۵۰ الی ۱۳/۰۰) |
| فصل پاییز | $2/96 \times 10^6 \pm 1/45 \times 10^6$ bc | $1/52 \times 10^5 \pm 0/68 \times 10^5$ a | $14/82 \pm 0/42$ c (۱۵/۵۰ الی ۱۳/۵۰) |
| فصل زمستان | $2/04 \times 10^6 \pm 1/03 \times 10^6$ a | $1/62 \times 10^5 \pm 0/55 \times 10^5$ a | $14/18 \pm 0/39$ a (۱۵/۰۰ الی ۱۳/۰۰) |
| میانگین کل | $2/78 \times 10^6 \pm 2/45 \times 10^6$ ($7/40 \times 10^6$ الی $2/95 \times 10^6$) | $1/72 \times 10^5 \pm 0/67 \times 10^5$ ($2/91 \times 10^5$ الی $0/54 \times 10^5$) | $14/50 \pm 0/62$ (۱۵/۵۰ الی ۱۳/۰۰) |

* اختلاف آماری بین فصول مختلف با حروف کوچک انگلیسی نشان داده شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار (حداقل و حداکثر) اسیدیته، شمارش کلی باکتریایی و تعداد یاخته‌های پیکری نمونه‌های شیر خام جمع‌آوری شده از استان خوزستان به تفکیک فصل نمونه‌برداری در دامداری‌های صنعتی

| فصل نمونه‌برداری | شمارش کلی باکتریایی (CFU/ml) | تعداد یاخته‌های پیکری (SCC/ml) | اسیدیته (درجه دورنیک) |
|------------------|--|--|---|
| فصل بهار | $1/95 \times 10^6 \pm 0/85 \times 10^6$ c | $1/58 \times 10^5 \pm 0/67 \times 10^5$ b | $14/30 \pm 0/29$ a (۱۴/۵۰ الی ۱۳/۵۰) |
| فصل تابستان | $0/92 \times 10^6 \pm 0/22 \times 10^6$ b | $1/08 \times 10^5 \pm 0/30 \times 10^5$ a | $15/30 \pm 0/25$ b (۱۵/۵۰ الی ۱۵/۰۰) |
| فصل پاییز | $0/72 \times 10^6 \pm 0/22 \times 10^6$ b | $0/90 \times 10^5 \pm 0/25 \times 10^5$ a | $14/8 \pm 0/29$ c (۱۵/۰۰ الی ۱۴/۰۰) |
| فصل زمستان | $0/41 \times 10^6 \pm 0/08 \times 10^6$ a | $1/36 \times 10^5 \pm 0/56 \times 10^5$ b | $14/30 \pm 0/31$ a (۱۵/۰۰ الی ۱۴/۰۰) |
| میانگین کل | $0/68 \times 10^6 \pm 0/43 \times 10^6$ ($7/40 \times 10^6$ الی $0/29 \times 10^6$) | $1/20 \times 10^5 \pm 0/46 \times 10^5$ ($2/60 \times 10^5$ الی $0/54 \times 10^5$) | $14/65 \pm 0/50$ (۱۵/۵۰ الی ۱۳/۵۰) |

* اختلاف آماری بین فصول مختلف با حروف کوچک انگلیسی نشان داده شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار (حداقل و حداکثر) اسیدیته، شمارش کلی باکتریایی و تعداد یاخته‌های پیکری نمونه‌های شیر خام جمع‌آوری شده از استان خوزستان به تفکیک فصل نمونه‌برداری در دامداری‌های سنتی

| فصل نمونه‌برداری | شمارش کلی باکتریایی (CFU/ml) | تعداد یاخته‌های پیکری (SCC/ml) | اسیدیته (درجه دورنیک) |
|------------------|--|--|---|
| فصل بهار | $4/42 \times 10^6 \pm 1/11 \times 10^6$ ab | $2/58 \times 10^5 \pm 0/28 \times 10^5$ b | $14/60 \pm 0/33$ b (۱۵/۰۰ الی ۱۴/۰۰) |
| فصل تابستان | $6/22 \times 10^6 \pm 1/17 \times 10^6$ c | $2/35 \times 10^5 \pm 0/14 \times 10^5$ b | $13/90 \pm 0/83$ a (۱۵/۰۰ الی ۱۳/۰۰) |
| فصل پاییز | $5/20 \times 10^6 \pm 1/33 \times 10^6$ b | $2/15 \times 10^5 \pm 0/26 \times 10^5$ ab | $14/90 \pm 0/52$ c (۱۵/۵۰ الی ۱۳/۵۰) |
| فصل زمستان | $3/67 \times 10^6 \pm 1/69 \times 10^6$ a | $1/88 \times 10^5 \pm 0/40 \times 10^5$ a | $14/10 \pm 0/42$ a (۱۴/۵۰ الی ۱۳/۰۰) |
| میانگین کل | $4/88 \times 10^6 \pm 1/63 \times 10^6$ ($7/12 \times 10^6$ الی $0/40 \times 10^6$) | $2/24 \times 10^5 \pm 0/38 \times 10^5$ ($2/91 \times 10^5$ الی $0/95 \times 10^5$) | $14/34 \pm 0/69$ (۱۵/۵۰ الی ۱۳/۰۰) |

* اختلاف آماری بین فصول مختلف با حروف کوچک انگلیسی نشان داده شده است.

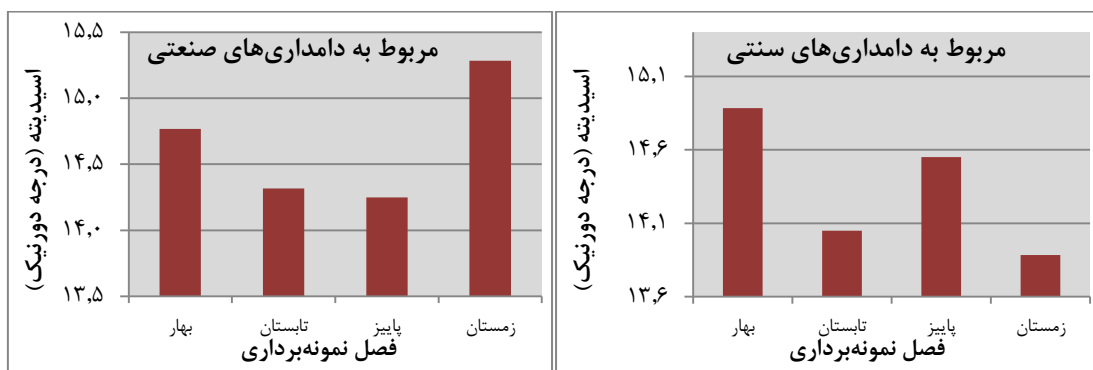
می‌باشد. مقدار مجاز تعداد یاخته‌های پیکری نیز کمتر از 5×10^5 SCC/ml می‌باشد (۱۸). میزان اسیدیته در ۰/۸ درصد نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از دامداری‌های صنعتی و در ۲۰/۸ درصد

محدوده مجاز اسیدیته شیر خام ۱۴ الی ۱۶ درجه دورنیک است. اما در صورت انطباق سایر ویژگی‌های شیر با استانداردهای مقدار اسیدیته شیر بین ۱۳ الی ۱۴ درجه دورنیک نیز قابل قبول

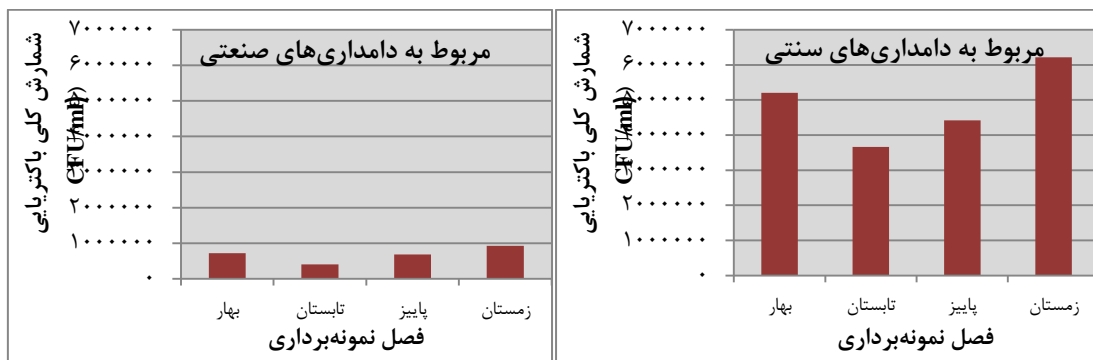
بالاتر بر عهده سازمان دامپزشکی کشور می‌باشد (۱۹). در مطالعه حاضر شمارش کلی باکتریایی در ۱/۷ درصد نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از دامداری‌های صنعتی و ۹۰/۸ درصد نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از دامداری‌های سنتی بیشتر از مجاز شمارش کلی باکتریایی به چهار درجه ممتاز، یک، دو و سه تقسیم می‌شود که حد مجاز در شیر درجه سه بین 5×10^5 CFU/ml الی 1×10^6 CFU/ml می‌باشد و تصمیم‌گیری در خصوص شیر خام دارای مقادیر مشخص شده است. (نمودار ۱ الی ۳).

نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از دامداری‌های سنتی بین ۱۳ الی ۱۴ درجه دورنیک بود. میزان اسیدیته و تعداد یاخته‌های پیکری در فصل تابستان بیشتر از بقیه فصول بود.

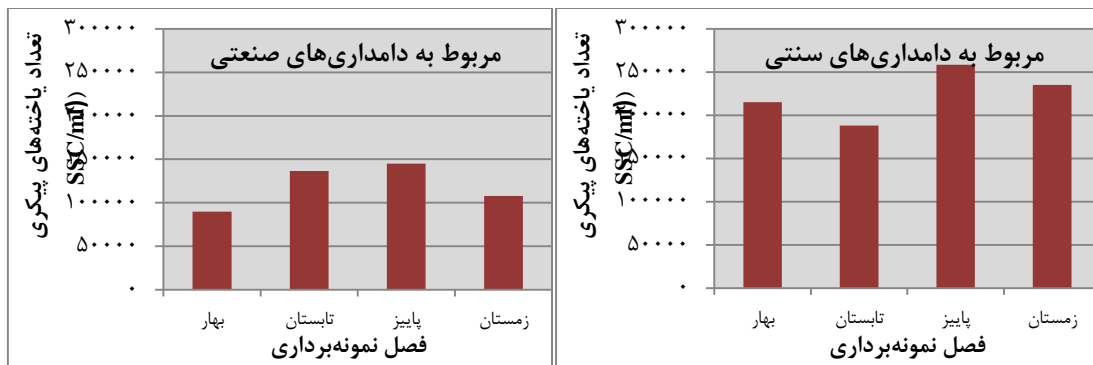
شیر خام از نظر حد مجاز شمارش کلی باکتریایی به چهار درجه ممتاز، یک، دو و سه تقسیم می‌شود که حد مجاز در شیر درجه سه بین 5×10^5 CFU/ml الی 1×10^6 CFU/ml می‌باشد و تصمیم‌گیری در خصوص شیر خام دارای مقادیر



نمودار ۱- روند تغییرات اسیدیته (درجه دورنیک) در نمونه‌های شیر طی فصول مختلف به تفکیک نوع دامداری



نمودار ۲- روند تغییرات شمارش کلی باکتریایی در نمونه‌های شیر طی فصول مختلف به تفکیک نوع دامداری



نمودار ۳- روند تغییرات تعداد یاخته‌های پیکری در نمونه‌های شیر طی فصول مختلف به تفکیک نوع دامداری

در دامداری‌های صنعتی کمترین مقدار میانگین اسیدیته و بیشترین مقدار یاخته‌های پیکری مربوط به فصل پاییز است. با توجه به نتیجه آزمون ANOVA در دامداری‌های صنعتی میزان اسیدیته در فصل‌های تابستان و پاییز به‌طور معنی‌داری نسبت به فصل بهار کمتر بود. همچنین تعداد یاخته‌های پیکری در فصول تابستان و پاییز نسبت به فصل بهار بیشتر بود ($p < 0/05$). با توجه به نتیجه آزمون ANOVA در دامداری‌های سنتی میزان اسیدیته در فصل‌های زمستان به‌طور معنی‌داری نسبت به فصل بهار کمتر بود. همچنین شمارش کلی باکتریایی و تعداد یاخته‌های پیکری در فصل زمستان نسبت به فصل بهار بیشتر بود ($p < 0/05$).

بر اساس نتایج آزمون آماری T Test مقادیر اسیدیته در نمونه‌های شیر نمونه‌برداری شده از دامداری‌های صنعتی بیشتر از نمونه‌های شیر نمونه‌برداری شده از دامداری‌های سنتی بود ($p < 0/01$). همچنین مقادیر شمارش کلی باکتریایی و تعداد یاخته‌های پیکری در نمونه‌های شیر نمونه‌برداری شده از دامداری سنتی بیشتر از دامداری‌های صنعتی بودند ($p < 0/01$) (جدول ۲).

بحث

با افزایش روز افزون جمعیت، تهیه مواد غذایی سالم، کافی و حاوی پروتئین یکی از مسائل مهم جهان به شمار می‌رود. شیر و فرآورده‌های لبنی در مقایسه با سایر اغذیه حیوانی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا و قیمت کمتر در سلامتی آحاد جامعه نقش به‌سزایی ایفا می‌نماید. نژاد دام، ژنتیک، وضعیت تغذیه، دفعات شیردوشی، زمان و فصل شیردوشی، دمای نگهداری دام، مدیریت گله و سن دام از عواملی است که بر روی میزان تولید و کیفیت شیر و ترکیبات شیمیایی آن مؤثر می‌باشد (۱، ۶). اسیدیته شاخص مهمی در کهنگی و یا تازگی شیر خام محسوب می‌شود. بار میکروبی شیر،

نحوه‌ی نگهداری، طول عمر شیر و افزودن مواد افزودنی بازدارنده رشد میکروبی بر روی میزان اسیدیته شیر خام مؤثرند. فعالیت باکتریایی می‌تواند تبدیل لاکتوز به اسیدلاکتیک را افزایش دهد و بنابراین سبب بالا رفتن مقدار اسیدیته قابل تیر گردد. همچنین درجه حرارت بالا نیز از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر روی تعداد سلول‌های باکتریایی می‌باشد لذا انتظار می‌رود که تحت شرایط غیر بهداشتی در طی زنجیره‌ی تولید شیر خام و یا همچنین وجود شیر گاوهای ناسالم شمارش کلی باکتریایی و همچنین سلول‌های سوماتیک و نتیجتاً اسیدیته افزایش بیشتری پیدا کنند.

یکی از شاخص‌های ارزیابی بهداشتی شیر، شمارش کلی باکتریایی شیر خام است. مطالعات بسیاری در زمینه کیفیت میکروبی شیر خام صورت گرفته است. در تحقیق Elmoslemany و همکاران (۲۰۰۹) در کانادا میانگین شمارش کلی باکتریایی در نمونه‌های شیر خام، $CFU/ml \times 10^4$ ذکر شده است که از میزان به دست آمده در این مطالعه کمتر است (۴). در بررسی دیگری که توسط Molla و Godefay (۲۰۰۰) بر روی کیفیت باکتریولوژیکی شیر خام در کشور اتیوپی انجام شد، میانگین شمارش کلی باکتریایی در مرحله تحویل به کارخانه $CFU/ml \times 10^8$ بود که از میانگین شمارش کلی باکتریایی در این تحقیق بالاتر می‌باشد. آنها کیفیت شیر خام را متأثر از مدت زمان و شرایطی که شیر از تولید تا تحویل به کارخانه طی می‌کند، عنوان نمودند (۷). در مطالعه حاضر در فصل گرما با افزایش درجه حرارت شمارش کلی باکتریایی در شیر خام افزایش پیدا کرد. البته میزان شمارش کلی باکتریایی در دامداری‌های سنتی در مقایسه با دامداری‌های صنعتی بیشتر است که دلیل آن می‌تواند رعایت کمتر مسائل بهداشتی از نظر عوامل شیردوشی، حمل و نقل و انبارداری باشد.

مطالعات مشابه نیز نشان داد که عدم رعایت اصول شستشوی صحیح در مراکز جمع‌آوری شیر در پمپ‌های انتقال شیر به مخازن شیر سردکن، همچنین زمان طولانی بین دوشش شیر تا انتقال به مراکز جمع‌آوری شیر از عوامل افزایش آلودگی محسوب می‌شوند (۳، ۲۰).

Reyes و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر روش شیردوشی، ضد عفونی و نحوه مدیریت گله را بر تعداد یاخته‌های پیکری در شیرهای ذخیره شده در دامداری‌های مناطق گرمسیری کشور کلمبیا مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که لگاریتم تعداد یاخته‌های پیکری در شیردوشی به روش سنتی یا دستی (میانگین $SCC/ml \times 10^6$ ، $4/06 \times 10^6$)، به‌طور قابل توجهی بالاتر از شیردوشی به روش ماشینی (میانگین $SCC/ml \times 10^6$ ، $1/88 \times 10^6$) بود، زیرا کاربران ماشین شیردوشی جهت نظافت پستان گاو با روش غوطه‌ورسازی (pre-dipping) پستانک شیردوشی در محلول ضد عفونی کننده و یا با روش سوزاندن (singeing) موهای ناحیه پستان گاو به کمک شعله خنک پروپان، آموزش دیده بودند (۳). مطالعه حاضر نیز در استان خوزستان به‌عنوان یکی از مناطق گرمسیری کشور ایران انجام شد و به‌طور مشابه تعداد یاخته‌های پیکری در نمونه‌های شیر دامداری‌های سنتی بیشتر از دامداری‌های صنعتی بود (حداکثر $SCC/ml \times 10^5$ ، $2/91 \times 10^5$).

تعداد یاخته‌های پیکری در شیر خام یکی از شاخص‌های مهم ارزیابی کیفیت و سلامت آن است که شامل یاخته‌های پوششی، نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌شود. در بسیاری از کشورها از این شاخص جهت ارزیابی بهداشتی شیر و به‌منظور قیمت‌گذاری آن استفاده می‌گردد. بسیاری از مطالعات انجام شده نشانگر کاهش تولید شیر و فرآورده‌های آن همگام با افزایش تعداد یاخته‌های پیکری می‌باشد (۲۱). افزایش انواع

یاخته‌های پیکری در اثر استرس‌هایی مانند تغییر در زنجیره غذایی دام، تأثیر مرحله خاصی از شیر دوشی و یا ترکیبی از موارد ذکر شده می‌باشد در مطالعات مختلف به تأثیرات فصلی بروی تعداد یاخته‌های پیکری اشاره شده است. Keskin و Atasever (۲۰۱۳) تأثیر عوامل مختلف از جمله جمعیت گله، محل عرضه، محل دامداری و فصل شیردوشی را بر تعداد یاخته‌های پیکری در نمونه‌های شیر بررسی کرده و عنوان کردند که در فصول تابستان و پاییز تعداد یاخته‌های پیکری نسبت به فصول زمستان و بهار به‌طور معناداری بیشتر است (۹).

در تحقیق حاضر نیز با توجه به دما و رطوبت هوا، در دامداری‌های صنعتی در فصول تابستان و پاییز یاخته‌های پیکری در نمونه‌های شیر خام افزایش داشته که به نظر می‌رسد از طریق ایجاد استرس فیزیولوژیک در این فصول ایجاد می‌شود. در این دو فصل در نمونه‌های دامداری‌های صنعتی، مقدار اسیدیته نیز کاهش یافت. مطالعات پیشین مهم‌ترین عامل بروز آلودگی در شیر خام را عفونت‌های پستانی عنوان نموده‌اند (۱). Diaz و همکاران (۲۰۰۲) معتقد بودند که در فصل تابستان احتمالاً رقابت شدیدتری بین گونه‌های بیماری‌زا در داخل پستان وجود دارد (۲۲)، در نتیجه عفونت‌های مختلف ایجاد شده منجر به افزایش تعداد یاخته‌های پیکری در این فصل می‌گردد. Nagy و همکاران (۲۰۱۳) کیفیت میکروبیولوژیکی و سایر خصوصیات شیر شتر را در طی یک دوره ۲ ساله مورد بررسی قرار دادند که همانند نمونه‌های شیر خام دامداری‌های صنعتی در مطالعه حاضر، در فصول گرم افزایش بار میکروبی مشاهده شد. آنها همچنین همبستگی بین تعداد یاخته‌های پیکری و تعداد میکروارگانیسم‌ها را مورد تأیید قرار دادند (۲۳). Erdem و Atasever (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای که بر روی شیرهای عرضه شده در دامداری‌های کشور

ترکیه داشتند، عنوان کردند که در هر منطقه بیشترین تعداد یاخته‌های پیکری در شیر، مربوط به فصل تابستان است (۲۴). با توجه به این که در استان خوزستان فصل تابستان و پاییز فصول گرم سال محسوب می‌شود، در مطالعه کنونی در دامداری‌های صنعتی تعداد یاخته‌های پیکری در این فصول بیشتر بود. در نمونه‌های شیر خام دامداری‌های سنتی بیشترین میانگین شمارش کلی باکتریایی و تعداد یاخته‌های پیکری در تابستان و زمستان مشاهده شد و همچنین اسیدیته کاهش یافت. البته تعداد یاخته‌های پیکری در دامداری‌های سنتی بالاتر از دامداری‌های صنعتی بود که می‌تواند به دلیل توجه کمتر به مسائل بهداشتی و بروز بیماری‌هایی نظیر ورم پستان (Mastitis) باشد. در مطالعه Gocmen و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی رابطه بین تعداد یاخته‌های پیکری و تعداد کل باکتری‌ها در نمونه‌های شیر بز در روزهای پس از زایمان پرداختند. آنها عنوان نمودند که رابطه معنی‌داری بین این دو شاخص وجود ندارد و در ضمن میزان آنها در فصول مختلف سال اختلاف معنی‌داری نداشت. اما در موارد عفونت‌های درون پستان (intramammary) تعداد یاخته‌های پیکری و شمارش کلی باکتریایی افزایش یافت و نتیجه گرفته شد که کاهش این شاخص‌ها، می‌تواند نشانه مهمی از نظر سلامت بز در روزهای پس از زایمان باشد (Rodrigues و همکاران (۲۰۱۷) انواع میکروارگانیزم‌های موجود در مخازن شیر را در مورد ایالات متحده مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که هر چند بین تعداد یاخته‌های پیکری و شمارش کلی باکتریایی در نمونه‌های شیر ارتباط آماری وجود ندارد، اما در شیرهای دارای تعداد یاخته‌های پیکری بالا (بیش از $200,000$ SCC/ml)، میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا (مانند کورینه‌باکتریوم) به‌طور معنی‌داری بیشتر است (۲۶).

Grodzki و Przynsucha (۲۰۰۴) تأکید کردند که عدم کارایی در روش‌های بهداشتی می‌تواند دلیل اصلی افزایش یاخته‌های پیکری در شیر خام در فصول گرم باشد (۲). بر اساس مطالعات پیشین، عوامل منجر به ایجاد ورم پستان سبب افزایش تعداد یاخته‌های پیکری و همچنین سبب تغییر در ترکیبات شیر نظیر لاکتوز، چربی و کازئین و پروتئین می‌گردد (۸، ۲۷، ۲۸). با توجه به این که شیر تازه دارای اسیدلاکتیک نیست، علت اسیدیته طبیعی شیر، سایر ترکیبات خاصی است که واکنش اسیدی از خود نشان می‌دهند. عواملی که بر روی میزان اسیدیته تأثیر دارند شامل بار میکروبی شیر، نحوه نگهداری شیر، عمر شیر و افزودن مواد بازدارنده رشد میکروبی یا خنثی‌کننده اسیدیته هستند. به عبارتی نگهداری شیر در محل‌های سرد مانند سردخانه و یخچال باعث کاهش فعالیت میکروارگانیزم‌ها و ثابت ماندن اسیدیته می‌شود (۶، ۱۰). مطالعات نشان‌دهنده ارتباط غیر مستقیم بین اسیدیته با افزایش تعداد یاخته‌های پیکری است. در مطالعه Wanjala و همکاران (۲۰۱۷) نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه در پایتخت کشور کنیا مورد بررسی قرار گرفت که میانگین اسیدیته ۲۰ درجه دورنیک بود و $52/8$ درصد نمونه‌های شیر خام دارای اسیدیته بیش از ۱۸ درجه دورنیک (حد مجاز اسیدیته در کشور کنیا) بودند. همچنین میانگین شمارش کلی باکتریایی $5/71 \times 10^7$ CFU/ml بود و در $95/2$ درصد نمونه‌های شیر خام شمارش کلی باکتریایی بیش از 10^6 CFU/ml بود (Yarabbi و همکاران (۲۰۱۴) نمونه‌های شیر در استان خراسان رضوی را مورد بررسی قرار داده و ضمن تأثیر بار میکروبی بر کیفیت شیر و تأیید کاهش کیفیت شیر در فصل تابستان، نشان داده شد که با افزایش تعداد یاخته‌های پیکری، اسیدیته به مقادیر کمتر از ۱۴ و

و تعداد یاخته‌های پیکری و افزایش کیفیت شیر خام می‌باشند (۱، ۳).

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش تعداد یاخته‌های پیکری نمونه‌های شیر دامداری‌های استان خوزستان در فصول تابستان و پاییز در مطالعه حاضر، می‌توان افزایش دما و رطوبت را نوعی خطر بالقوه محسوب کرد که بر روی کیفیت شیر خام تأثیرگذار است. نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده بهتر بودن کیفیت شیر خام دامداری‌های صنعتی نسبت به دامداری‌های سنتی می‌باشد، اما صرفاً ایجاد دامداری‌های صنعتی جهت حل مشکل کیفیت شیر خام کافی نبوده و جهت ارتقاء کیفیت آن، رعایت بهداشت در طی زنجیره شیردوشی از فارم تا کارخانه و اعمال سیستم‌های بهداشتی نظیر HACCP (تجزیه و تحلیل خطر و کنترل نقاط بحرانی)، GHP (عملیات بهداشت خوب) و GMP (عملیات تولید خوب) الزامی می‌باشد.

References

- 1- Albenzio M, Figliola L, Caroprese M, Marino R, Sevi A, Santillo A. Somatic cell count in sheep milk. *Small Ruminant Research*. 2019; 176: 24-30.
- 2- Przystucha T, Grodzki H. The relationships between collection system, delivery size and season and somatic cells level count in raw milk classified to the highest quality classes. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities Series Animal Husbandry*. 2004; 1(07).
- 3- Reyes J, Sanchez J, Stryhn H, Ortiz T, Olivera M, Keefe G. Influence of milking method, disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia. *The Veterinary Journal*. 2017; 220: 34-9.
- 4- Elmoslemany A, Keefe G, Dohoo I, Dingwell R. Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 2009; 92(9): 4239-48.
- 5- Chye FY, Abdullah A, Ayob MK.

در برخی موارد کمتر از ۱۳ درجه دورنیک کاهش می‌یابد (۱۰). با توجه به این مطالعات به نظر می‌رسد که هم کاهش اسیدیته به مقادیر کمتر از حد مجاز و هم افزایش آن به مقادیر بیشتر از حد مجاز، هر دو مورد می‌تواند نشانه فساد و یا آلودگی شیر خام باشد. در مطالعه حاضر مقدار اسیدیته در ۰/۸ درصد نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از دامداری‌های صنعتی و در ۲۰/۸ درصد نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از دامداری‌های سنتی بین ۱۳ الی ۱۴ درجه دورنیک بود که نشان‌دهنده بهتر بودن سلامت شیر در دامداری‌های صنعتی می‌باشد. با توجه به این موضوع استفاده از دستگاه شیرسردکن (Plate Cooler) بلافاصله بعد از دوشیدن شیر، تمیز بودن ابزار شیردوشی، شستشوی نوک پستان گاو با آب گرم حاوی مواد ضد عفونی کننده و خشک کردن جداگانه آنها با دستمال کاغذی، دور ریختن شیر اولیه دوشش و همچنین آموزش دامداران از جمله عوامل مؤثر در کاهش شمارش کلی باکتریایی

Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food microbiology*. 2004; 21(5): 535-41.

6- Gitty K, Armaghan D, Amirhossein K. Milk and its quality: Tehran University Publications. 2007.

7- Godefay B, Molla B. Bacteriological quality of raw cow's milk from four dairy farms and a milk collection centre in and around Addis Ababa. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 2000; 113(7-8): 276-8.

8- Barbano D, Rasmussen R, Lynch J. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *Journal of Dairy Science*. 1991; 74(2): 369-88.

9- Keskin A, Atasever S. Somatic cell count of bovine bucket milk: a study from Turkey. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2013; 2(9): 98-102.

10- Yarabbi H, Mortazavi A, Mehraban M, Sepehri N. Effect of somatic cells on the physico-chemical and microbial properties of raw milk in different seasons. *International Journal of Plant*,

Animal and Environmental Sciences. 2014; 4(3): 289-98.

11- Farkhondeh A. Methods of testing milk and its products. 1995, editor: Tehran university 1995.

12- ISIRI. Comprehensive method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony enumeration at 30°C using the mixed culture method. *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 2015.

13- Arfai M, HajiHosseinnejad G. Investigating the effectiveness of training courses for livestock farmers in Ashtian region. *Agricultural Extension and Education Research*. 2009; 1.

14- ISIRI. Milk and its products - sampling guide. *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 2009.

15- ISIRI. Microbiology of food and animal feed - test preparation, initial suspension and decimal dilutions for microbiology test. 8923-5. *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 2012.

16- ISIRI. Milk - body cells (first part - microscopic method, reference method. *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 2013.

17- ISIRI. Milk and its products - determination of the acidity of dry milk, reference method - test method. *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 2004.

18- ISIRI. Raw milk - Milk and its products, characteristics and test methods. *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 1985.

19- ISIRI. Microbiology of milk and its products - characteristics. *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 2009.

20- Van Schaik G, Green L, Guzman D, Esparza H, Tadich N. Risk factors for bulk milk somatic cell counts and total bacterial counts in smallholder dairy farms in the 10th region of Chile. *Preventive veterinary medicine*. 2005; 67(1): 1-17.

21- Revelli G, Sbodio O, Tercero E. Total bacterial count in raw milk from the dairy farms

that characterize the zone northwest of Santa Fe and south of Santiago del Estero. *Revista Argentina de microbiología*. 2004; 36(3): 145-9.

22- Diaz J, Muelas R, Segura C, Peris C, Molina P. Effect of mastitis on milk composition in Manchega ewes: preliminary results. *Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*. 1996: 305-9.

23- Nagy P, Faye B, Marko O, Thomas S, Wernery U, Juhasz J. Microbiological quality and somatic cell count in bulk milk of dromedary camels (*Camelus dromedarius*): Descriptive statistics, correlations, and factors of variation. *Journal of Dairy Science*. 2013; 96(9): 5625-40.

24- Atasever S, Erdem H. Association of somatic cell count with catalase enzyme activity in bovine bucket milk. *Trends in Animal and Veterinary Sciences*. 2010; 1(1): 24-7.

25- Gocmen H, Darbaz I, Ergene O, Esendal OM, Aslan S. The relationships between somatic cell count, total bacterial count and intramammary infection in milk samples of Damascus goats during postpartum days. *Small Ruminant Research*. 2019; 180: 1-5.

26- Rodrigues M, Lima S, Canniatti-Brazaca SG, Bicalho R. The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(4):2536-52.

27- Lindmark-Månsson H, Bränning C, Alden G, Paulsson M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *International Dairy Journal*. 2006; 16(7): 717-27.

28- Payab. Preparation of a mathematical model to predict changes in total microbial load and raw milk acidity: *Tehran University*. 2013.

29- Wanjala G, Mathooko F, Kutima P, Mathara J. Microbiological quality and safety of raw and pasteurized milk marketed in and around Nairobi region. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 2017; 17(1): 11518-32.

The relationship between the total bacterial count, Somatic cell count and acidity in the raw milk health of livestock farms in Khuzestan province

Hamed Vaezi¹, Zohreh Mashak^{2*}

۱۵۴

1- Graduate of veterinary medicine, Department of food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2- Associate Professor, Department of food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Receive: January 25, 2022; Revise: March 3, 2022; Accept: March 9, 2022

Summary

Due to the properties of milk, control of this product and evaluation of its characteristics is necessary for milk producers and dairy products industries. In this study, 240 raw milk samples collected from livestock farms in Khuzestan province during different seasons of 1399-1400 were analyzed in terms of the total count of microorganisms, the number of corporal cells and acidity. The results showed that there is a significant difference in the data between the two types of animal husbandry (industrial and traditional) and also different seasons (spring and summer compared to the other two seasons). Also, results showed an inverse correlation between acidity with total bacterial count and somatic cell count ($p < 0.05$). So, the aforementioned factors are important for diagnosing the safety of raw milk. For this purpose, it seems establishing of industrial dairy farms, hygienic management through the milking and during the milk-to-factory transmission chain and also applying hygienic systems such as hazard analysis and critical control points, good manufacturing practice and good hygienic practice are required.

Key words: *Acidity, Somatic cell Count, Total bacterial count, dairy farms, Khuzestan Province*

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2022

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, Faculty 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