

دوره ۵، شماره ۱  
ناشر: دانشگاه زابل

سر دبیر:

تقی زهرایی صالحی؛ [tsaleh@ut.ac.ir](mailto:tsaleh@ut.ac.ir)

مدیر مسئول:

داریوش سعادت؛ [saadatdariush@uoz.ac.ir](mailto:saadatdariush@uoz.ac.ir)

مدیر اجرایی:

احمد راشکی؛ [ah\\_rashki@usal.es](mailto: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](http://nfvm.uoz.ac.ir)

پست الکترونیک: [nfvm@uoz.ac.ir](mailto: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 میکروشناسی 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 میکروشناسی 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](mailto:nfvm.uoz.ac.ir) ارسال گردد. جهت هرگونه سؤال و پیگیری با ایمیل مجله: [nfvm@uoz.ac.ir](mailto:nfvm@uoz.ac.ir) می‌توانید در ارتباط باشید.

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

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

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

برای ترازبندی پاراگراف‌ها از `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. 2<sup>nd</sup> 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 بخش‌های زیر باشد:

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

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

\* **بحث**

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

**مقاله مروری (Review)**

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

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

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

#### **مقاله کوتاه (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

## بررسی حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) حامل انواع ژن *mec* در جدایه‌های مسبب ورم پستان تحت بالینی گاو

مه‌ری امینی کمرودی<sup>۱</sup>، غلامرضا هاشمی تبار<sup>۲</sup>، مهدی عسکری بدوئی\*<sup>۳</sup>، بابک خرمیان<sup>۴</sup>، حمیده کلاته رحمانی<sup>۵</sup>

- ۱- دانش آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۴- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۵- دانش آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۶ اسفند ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۸ فروردین ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۴ اردیبهشت ۱۴۰۱

### چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم پستان در گاوهای شیری می‌باشد. بروز مقاومت به متی‌سیلین در این باکتری از نگرانی‌های عمده در دامپزشکی و بهداشت عمومی است. با توجه به شناسایی انواع جدیدی از ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت به متی‌سیلین، هدف از این مطالعه بررسی حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و انواع ژن *mec* برای نخستین بار در منطقه شمال شرق کشور می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر، هویت ۵۴ جدایه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس مسبب ورم پستان تحت بالینی گاو با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی بررسی شد. از این تعداد، تنها در ۴۴ سویه قسمت اختصاصی ژن *nuc* ردیابی شد. سپس، مقاومت جدایه‌ها به پنی‌سیلین، سفوکستین، انروفلوکساسین، تایلوژین و تری-متوپریم-سولفامتوکسازول بر اساس روش انتشار دیسک تعیین گردید. در انتها، بررسی مولکولی حضور ژن‌های *mecA*، *mecB* و *mecC* در جدایه‌ها صورت گرفت. طبق نتایج، بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۵۴ درصد) و تری-متوپریم-سولفامتوکسازول (۲۳ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک تایلوژین (۷ درصد) بود. تنها در یک جدایه (۲/۳ درصد) حضور ژن *mecA* مورد تأیید قرار گرفت، در حالی که، این جدایه در تست فنوتیپی به‌عنوان MRSA شناسایی نگردید. هیچ یک از ژن‌های *mecB* و *mecC* در این مطالعه شناسایی نشدند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در منطقه شمال شرق ایران، مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های ورم پستان گاو رخداد بالایی ندارد. همچنین، این مطالعه نشان می‌دهد که انواع کمتر شناخته شده ژن‌های مقاومت به متی‌سیلین در این منطقه شایع نیست. با این حال، توصیه می‌شود که مطالعات جامع‌تری در این خصوص صورت گیرد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن *mec* ورم پستان تحت بالینی

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم پستان در گاوهای شیری می‌باشد که اغلب موجب بیماری ورم پستان تحت بالینی می‌گردد (۱). بیماری ورم پستان یک واکنش التهابی غدد پستانی است که معمولاً از طریق سیستم شیردوشی، دست و لباس شیردوش و ماشین شیردوشی آلوده منتقل می‌گردد (۲، ۳). گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اغلب فاقد علائم آشکار بالینی است که نتیجه‌ی آن عدم تشخیص به موقع و تأخیر در شروع درمان است که خود می‌تواند به افزایش هزینه‌ها و طولانی‌تر شدن طول دوره درمان بینجامد (۴، ۵).

دو سال پس از معرفی پنی‌سیلین جهت درمان عفونت‌های حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس در سال ۱۹۴۰، سوبه مقاوم به پنی‌سیلین در سال ۱۹۴۲ پدید آمد. به دنبال راهکاری برای حل این مقاومت در سال ۱۹۶۰ از یک آنتی‌بیوتیک ساختگی از خانواده بتالاکتام (متی‌سیلین) جهت درمان سوبه‌های مقاوم با موفقیت استفاده شد ولی یک سال بعد از این اتفاق، سوبه‌های نوظهوری موسوم به استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین (*Methicillin resistance Staphylococcus aureus*) به وجود آمدند (۶). اولین MRSA مرتبط با ورم پستان در سال ۱۹۷۵-۱۹۷۲ در کشور بلژیک گزارش شد (۷، ۸). این مقاومت ناشی از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک جهت درمان ورم پستان و عدم انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بوده است (۹). در پنج دهه گذشته، MRSA ها اغلب به‌عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی مطرح بودند اما در سال‌های اخیر به‌عنوان عفونت اکتسابی از حیوان و جامعه نیز مطرح گردیده‌اند. خطرات انتقال این سوبه‌های مقاوم به انسان به اثبات رسیده است و سوبه ST398 از جمله دودمان‌های شناخته شده‌ای

است که وابسته به حیوان بوده و اغلب از انسان‌هایی که با حیوانات در تماسند جداسازی شده است (۱۰). سوبه‌های MRSA درمان ورم پستان ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس را با چالش مواجه می‌کند و علاوه بر آن می‌تواند سبب مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی شود که در درمان ورم پستان به‌طور رایج استفاده می‌گردد (۱۰).

مقاومت در MRSA وابسته به حضور ژن‌های مقاومت با منشأ کروموزومی *mecA* و *mecC* (۱۱) یا پلاسمیدی، *mecB* است (۱۲). این ژن‌های مقاومت، پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین تغییر یافته با تمایل پایین به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را کد می‌کنند (۶، ۱۲، ۱۳). ژن *mecA* و *mecC* بر روی کروموزوم همراه با ژن‌های تنظیمی *mecI* و *mecR* قرار گرفته است، ژن‌های *mecA* و *mecC* تقریباً ۶۹ درصد در سطح ژن و ۶۳ درصد در سطح آمینواسید به یکدیگر شباهت دارند و هر دو پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین را کد می‌کنند. پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین کد شده توسط ژن *mecC* نسبت به پروتئینی که توسط ژن *mecA* کد می‌شود پایداری کمتری در دمای ۳۷ درجه دارد و نسبت به آگزاسیلین حساس و نسبت به سفوکسیتین مقاوم است. پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین حاصل از ژن *mecA* نسبت به هر دو مقاومت نشان می‌دهد (۱۴، ۱۵).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که منشأ احتمالی ژن *mecA* / استافیلوکوکوس سیوریوری (*Staphylococcus coeuri*) است (۱۶). ژن *mecC* اولین بار در سال ۲۰۱۱ از نمونه‌های شیر موجود در مخزن تانک و انسان در انگلستان و ایرلند جداسازی گردید. این ژن علاوه بر گاو و انسان در دیگر گونه‌ها مانند اسب و میش و حیوانات خانگی نیز یافت شده است. به دلیل جداسازی ژن *mecC* از دیگر گونه‌های

مقاومت در سویه‌های حامل این ژن‌ها و بررسی پراکندگی احتمالی آنها در مناطق جغرافیایی مختلف، می‌تواند زمینه را برای شناسایی دقیق سویه‌های مقاوم در آزمایشگاه‌های بالینی و تحقیقاتی و توقف انتشار سریع این سویه‌ها فراهم کند (۲۱).

در این مطالعه برای نخستین بار، حضور سویه‌های MRSA در ارتباط با انواع ژن *mec* در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری در منطقه شمال شرق کشور مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### الف- جمع‌آوری نمونه و تشخیص

**بیوشیمیایی:** در پژوهش حاضر ۵۴ جدایه احتمالی استافیلوکوکوس اورئوس که از چهار فارم گاو شیری صنعتی در مشهد طی ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۸ به‌دست آمده است مورد مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که ۱۰ میکرولیتر از نمونه به‌دست آمده در بلاد آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید سپس از پرگنه‌ی رشد کرده بر روی این محیط برای انجام رنگ‌آمیزی گرم جهت بررسی مورفولوژی باکتری، برای تست کاتالاز جهت تفکیک استرپتوکوکوس از استافیلوکوکوس اورئوس و آزمایش DNase، کو آگلواز، تخمیر قند مانیتول جهت تشخیص گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردید. ایزوله‌ها پس از انجام آزمایش‌های تشخیصی اولیه، در محیط حاوی ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- نگهداری شد. در انتها پس از کشت و خالص‌سازی مجدد، از تست‌های مقدماتی کاتالاز و اکسیداز و تخمیر قند مانیتول در محیط مانیتول سالت آگار استفاده گردید.

#### ب- استخراج DNA و آزمایش زنجیره‌ای

پلیمرز جهت شناسایی گونه: به منظور تأیید

استافیلوکوکوس مانند سیوری<sup>\*</sup>، استیپانوویسی<sup>□</sup>، گزایلوز<sup>□</sup>، ساپروفلاویتیکوس<sup>□</sup> ممکن است بتوان این گونه‌ها را نیز به‌عنوان منشأ احتمالی این ژن در نظر گرفت (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷). ژن *mecB* اولین بار در سال ۲۰۱۸ از نمونه انسانی جداسازی گردید. این ژن بر روی پلاسمیدی قرار گرفته است که علاوه بر ژن *mecB*، ژن مقاومت غیر بتالاکتامی را نیز کد می‌کند و به دلیل جداسازی این ژن از میکروکوکوس کازئولیتیکوس<sup>\*\*</sup> ممکن است بتوان آن را به‌عنوان منشأ احتمالی این ژن نیز مطرح کرد (۱۲، ۱۸). مقاومت فنوتیپی در MRSA تحت شرایط کشت (دمای انکوباتور، pH محیط کشت و غیره) می‌تواند به صورت هموزنوس یا هتروژنوس بروز پیدا کند. بیشتر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت هتروژنوس از خود نشان می‌دهند. بدین معنی که همه سویه‌ها ممکن است ژن مقاومت را داشته باشند اما تعداد کمی می‌توانند آن را بیان کنند (۱۹).

مطالعات زیادی در رابطه با ردیابی ژن *mecA* از نمونه دامی در ایران و دیگر کشورها در دسترس است، اما مطالعات انجام شده در رابطه با ژن‌های *mecB* و *mecC* در این مناطق بسیار محدود است. با توجه به این که گاوشیری می‌تواند مخزن ژن *mecC* باشد، طبق بیانیه سازمان بهداشت جهانی گونه‌های MRSA به‌عنوان عامل تهدیدکننده‌ی سلامت عموم شناخته می‌شوند و جهت مبارزه با سویه‌های مقاوم توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید در کوتاه‌ترین زمان ممکن مورد نیاز مبرم است (۲۰). درک مکانیسم مولکولی

*Staphylococcus sciuri*<sup>\*</sup>

*stepanovicii Staphylococcus*<sup>†</sup>

*Staphylococcus xylosus*<sup>‡</sup>

*Staphylococcus saprophyticus*<sup>§</sup>

*Macrocooccus caselyticus*<sup>\*\*</sup>

تشخیص نهایی جدایه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* بر مبنای شناسایی قسمت اختصاصی ژن *nuc* DNA تام جدایه‌ها با استفاده از کیت تجاری (Korea.Gene All) طبق دستورالعمل سازنده استخراج گردید (۲۲). سپس به منظور تأیید جدایه‌ها به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌وسیله یک جفت پرایمر اختصاصی ژن *nuc* (ساخت شرکت دنا زیست مشهد، ایران) استفاده شد (۲۳) (جدول ۱). در نهایت حضور ژن *nuc* در ۴۴ جدایه از ۵۴ جدایه مورد بررسی به تأیید رسید و به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص نهایی داده شد.

برای انجام واکنش PCR در هر لوله‌ی اپندروف، به مقدار ۰/۳ میکرومولار از هر پرایمر (Reverse، Forward)، ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس آماده (Denmark, Ampliqon) و ۴ میکرولیتر از DNA هر جدایه اضافه کرده و با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس در دستگاه ترموسایکلر (Biorad) قرار داده شدند. مراحل انجام واکنش مطابق با جدول شماره ۲ طی گردید. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR جهت تعیین وجود ژن *nuc* درون چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد و در دستگاه ژل الکتروفورز به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۱۰۰ ولت قرار گرفت. سپس از باندهای حاصله در دستگاه ترانس ایلومیناتور عکس‌برداری گردید. برای نشان دادن اندازه باندهای تکثیری از DNA ladder شرکت سینا کلون ایران (Lithuania, 1601, Fermentas) استفاده شد. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات، از ایزوله

*استافیلوکوکوس اورئوس* (کلکسیون آزمایشگاه ورم پستان دانشکده دامپزشکی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. (جدول ۲).

**ج - واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت ردیابی ژن‌های *mecA mecB mecC*:** برای این منظور از پرایمرهای اختصاصی (سنتز پرایمر توسط شرکت سیناکلون، ایران انجام گرفت) طراحی شده توسط Becker و همکاران در سال ۲۰۱۸ و Ishihara و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطابق با جدول شماره ۱ استفاده گردید (۱۲، ۲۴).

در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۱۰ میکرولیتر از بافر 2x آماده PCR، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر (Forward، Reverse) و ۴ میکرولیتر DNA اضافه کرده و به‌وسیله آب مقطر استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس در دستگاه ترموسایکلر (Biorad) قرار داده شدند. سیکل‌های حرارتی برای انجام واکنش برای ژن‌های *mecA، mecB، mecC* مطابق با جدول شماره ۲ تنظیم گردید. در نهایت به میزان ۱۲ میکرولیتر از محصول PCR جهت تعیین وجود ژن‌های مورد بررسی درون چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد و ۵۰ دقیقه تحت ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز گردید. از باندهای حاصله، در دستگاه ترانس ایلومیناتور با کمک اشعه UV عکس‌برداری شد. برای نشان دادن اندازه باندهای تکثیری از مارکر 100bp-Plus تولیدی شرکت سینا کلون ایران استفاده شد. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از ایزوله MRSA *mecA* مثبت (کلکسیون آزمایشگاه ورم پستان دانشکده دامپزشکی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

منبع	اندازه باند (جفت باز)	توالی پرایمر	ژن هدف
۲۳	۶۱۳	F:CTGGCATATGTATGGCAATTGTT R:TATTGACCTGAATCAGCGTTGTCT	<i>nucA</i>
۲۴	۵۱۹	F:TGTCCGTAACCTGAATCAGC R: TGCTATCCACCCTCAAACAG	<i>mecA</i>
۱۲	۲۲۶۶	F:TTAACATATACACCCGCTTG R: TAAAGTTCATTAGGCACCTCC	<i>mecB</i>
۱۲	۱۹۳۹	F:TCAAATTGAGTTTTTCCATTATCA R: AACTTGGTTATTCAAAGATGACGA	<i>mecC</i>

جدول ۲- مشخصات سیکل، زمان و دمای پرایمرهای ژن *nucA*، *mecB*، *mecC*، *mecA*

مراحل	<i>nucA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>mecB</i>
دنا تورا سیون اولیه (دما و زمان)	۹۴°C, ۵min	۹۴°C, ۳min	۹۴°C, ۳min	۹۴°C, ۴min
دنا تورا سیون (دما و زمان)	۹۴°C, ۴۵s	۹۴°C, ۴۵s	۹۴°C, ۴۵s	۹۵°C, ۳۰s
اتصال (دما و زمان)	۵۵°C, ۴۵s	۵۵°C, ۱min	۵۵°C, ۱min	۵۶°C, ۱min
بسط (دما و زمان)	۷۲°C, ۴۵s	۷۲°C, ۱min	۷۲°C, ۱min	۷۲°C, ۴۵s
بسط نهایی (دما و زمان)	۷۲°C, ۵min	۷۲°C, ۵min	۷۲°C, ۵min	۷۲°C, ۵min
تعداد سیکل‌ها	۳۱	۳۳	۳۳	۳۳

شد و بعد از ۱۸ تا ۲۰ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد و نتایج بر اساس جدول استاندارد به صورت مقاوم، حساس، نیمه‌حساس گزارش گردید. بر اساس آخرین دستورالعمل CLSI برای شناسی فنوتیپی سویه‌های MRSA از دیسک سفوکسیتین استفاده گردید (۲۵). ۱۴ میلی‌متر یا کمتر به عنوان MRSA، ۱۷-۱۵ میلی‌متر به عنوان حساسیت نسبی و ۱۸ میلی‌متر یا بیشتر حساس در نظر گرفته شد.

### نتایج

**الف- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی:** در پژوهش حاضر ۵۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس اخذ شده از آزمایشگاه ورم پستان کلینیک دانشکده

### د- تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها:

حساسیت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، انزوفلوکسازین (۱۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول تری‌متوپریم (۲۳/۷۵)، تایلوزین (۳۰ میکروگرم) (ساخت شرکت پادتن طب) به روش دیسک دیفوژن بر اساس آخرین استاندارد (Clinical laboratory Standard Institute) مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور برای کلیه جدایه‌ها سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و در محیط مولر هینتون آگار به وسیله سوآپ استریل کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط قرار داده

دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، پس از خالص‌سازی مجدد در آزمایشگاه میکروبیولوژی به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفت.

**ب- نتایج تست مقاومت آنتی‌بیوتیکی:** در پژوهش حاضر از ۴۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۴ (۵۴ درصد) ایزوله، ۱۰ (۲۳ درصد) ایزوله، ۳ (۷ درصد) ایزوله به‌ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول-تری‌متوپریم، تایلوزین مقاومت نشان دادند و مقاومت نسبت به سفوکسیتین و انروفلوکساسین مشاهده نگردید و همچنین ۲۰ (۴۵ درصد) ایزوله، ۳۴ (۷۷ درصد) ایزوله، ۴۴ (۹۳ درصد) ایزوله، ۴۴ (۱۰۰ درصد) ایزوله، ۴۳ (۹۸ درصد) ایزوله، به‌ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول-تری‌متوپریم، تایلوزین، سفوکسیتین و انروفلوکساسین حساسیت نشان دادند. همچنین، ۱ (۲ درصد) جدایه درای مقاومت متوسط به انروفلوکساسین گزارش گردید. (جدول ۲ و نمودار ۱).

**د- نتایج آزمایش مولکولی:** از ۵۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس اخذ شده از آزمایشگاه ورم پستان کلینیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۴ جدایه با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت ردیابی ژن *nucA* به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفت. تمام ۴۴ جدایه با روش PCR از نظر وجود ژن‌های *mecB* و *mecC* مورد آنالیز قرار گرفتند. از ۴۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس تعداد یک جدایه واجد ژن *mecA* شناسایی گردید و در هیچ یک از جدایه‌ها ژن‌های *mecB* و *mecC* ردیابی نشد. جالب توجه این که تنها جدایه حاوی ژن *mecA* در این مطالعه، در تست آنتی‌بیوگرام، حساس به سفوکسیتین گزارش گردید که با تکرار آزمایشات

آنتی‌بیوگرام نیز نتایج مشابهی حاصل گردید.

## بحث و نتیجه‌گیری

از مجموع ۵۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس اخذ شده از آزمایشگاه ورم پستان کلینیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۴ جدایه با آزمون‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت ردیابی ژن *nucA* به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفتند. تمام ۴۴ جدایه با روش PCR از نظر وجود ژن‌های *mecB* و *mecC* و *mecA* مورد آنالیز قرار گرفتند. از ۴۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس تنها یک جدایه واجد ژن *mecA* بوده و در هیچ یک از جدایه‌ها، ژن‌های *mecB* و *mecC* ردیابی نشد. تنها جدایه حاوی ژن *mecA* در این مطالعه، در تست آنتی‌بیوگرام، حساس به سفوکسیتین گزارش گردید و همچنین با تکرار آزمایشات آنتی‌بیوگرام نیز نتایج مشابهی حاصل گردید. نتایج حاصل شده با پژوهش انجام شده توسط خوبی و همکاران (۲۰۱۴) که نشان‌دهنده فراوانی بالای MRSA است در تضاد می‌باشد ولی از نظر عدم همخوانی تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مشابهت دارد. در پژوهش خوبی و همکاران، ۴۴/۴ درصد از ایزوله‌های به‌دست آمده از نمونه‌های انسانی، در تست فنوتیپی به‌عنوان MRSA تشخیص داده شدند اما در تست مولکولی ۵۳/۳ درصد از ایزوله‌ها واجد ژن *mecA* جداسازی گردید (۲۶). عدم تطابق نتایج روش فنوتیپی و ژنوتیپی در این پژوهش و پژوهش حاضر می‌تواند به علت حضور سویه‌های هتروژنوس باشد. همچنین با توجه به این که بررسی مقاومت پس از تهیه استوک گلیسروله و نگهداری در آزمایشگاه به انجام رسیده است ممکن است این جدایه توان بیان ژن *mec* را در شرایط آزمایشگاهی از دست داده باشد که این مسأله می‌تواند به‌عنوان چالش مهمی در شناسایی دقیق سویه‌های MRSA مطرح باشد.

اگرچه در پژوهش حاضر هیچ یک از جدایه‌ها، در تست فنوتیپی به سفوکستین مقاوم نبودند، اما از میان ۴۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی در ۱ (۲/۲۷) درصد) جدایه ژن *mecA* مشاهده گردید که با یافته‌های آهنگری و همکاران (۱۳۹۷) (۲۷)، سنگری‌فر و همکاران (۱۳۹۶) (۲۸)، *Srednik* و همکاران (۲۰۱۹) (۱۱)، که به‌ترتیب در ۱/۳، ۵، ۳/۳ درصد از جدایه‌ها، ژن *mecA* را شناسایی کردند مطابقت دارد اما با نتایج برخی پژوهش‌های انجام شده در ایران و خارج از ایران همخوانی ندارد. برای مثال، در پژوهشی که توسط هوایی و همکاران (۱۳۹۵) (۲)، در شهر اهواز بر روی ۴۴ جدایه به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی انجام شد، میزان ۱۰ (۲۲/۷۲ درصد) ایزوله واجد ژن *mecA* جداسازی گردید. میزان ژن *mecA* گزارش شده در پژوهش حاضر نسبت به این پژوهش انجام شده در ایران پایین بود که می‌تواند به علت استفاده از روش‌های مدیریتی مناسب در گاوداری‌های منطقه مورد مطالعه باشد (۲۹). در مطالعه‌ی دیگری توسط Shrivastava و همکاران از ۸۵ جدایه به‌دست آمده از ورم پستان گاوی، در ۱۴ (۱۶/۴۷ درصد) ایزوله ژن *mecA* ردیابی گردید (۳). که این عدم همخوانی ممکن است به دلیل تفاوت در میزان جامعه آماری و منطقه نمونه‌گیری باشد.

*MRSA* حاوی *mecC* از ۱۳ کشور اروپایی و ۱۴ گونه میزبانی از سال ۱۹۷۵ تا ۲۰۱۱ و از طیف وسیعی از عفونت‌ها از جمله عفونت پوست و استخوان، پنومونی، باکتری می‌کشنده در انسان و ورم پستان و کونژنکتیویت مزمن در حیوانات جدا شده است. بر اساس شواهد، ایزوله‌های *MRSA* حاوی *mecC* واجد چندین فاکتور حدت شناخته شده از جمله: عامل چسبندگی، سوپر آنتی‌ژن و توکسین می‌باشند. همچنین، مقاومت به غیر

بتالاکتام‌ها در میان این ایزوله‌ها غیر معمول است (۳۰). در این پژوهش از ۴۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در هیچ یک از جدایه‌ها ژن *mecC* ردیابی نشد و این یافته در تطابق با نتایج تحقیقات سنگری‌فر و همکاران (۱۳۹۶) (۲۸)، دستمالچی ساعی و پناهی (۲۰۱۹) (۳۱) و *Cikman* و همکاران (۲۰۱۹) (۱۴) است که در این پژوهش‌ها نیز *MRSA* حاوی *mecC* مشاهده نشد که در این مورد عدم ردیابی این ژن در پژوهش حاضر ممکن است به علت کوچک بودن سائز نمونه‌های مورد بررسی باشد. هرچند که در مطالعه حاضر ژن *mecC* در هیچ یک از جدایه‌ها مشاهده نگردید، اما این ژن در مطالعات قبلی در دیگر کشورها با درصدهای متفاوت گزارش گردید. برای مثال *Haenni* و همکاران (۲۰۱۴) (۲۰)، ژن *mecC* را در ۴۰ درصد از جدایه‌های *MRSA* به‌دست آمده از گاو با ورم پستان مشاهده کردند (۳۲). در مطالعه‌ای که توسط *Aklilu* و *Chia* (۲۰۱۹) (۲۰)، بر روی ۶۳ نمونه شیرگاو صورت گرفت در ۲۳/۸ درصد از جدایه‌ها ژن *mecC* مشاهده گردید (۳۳). مطالعات انجام شده در رابطه با ارزیابی شیوع *MRSA* حاوی *mecC* از میان گونه‌های میزبانی متفاوت و نقش آن در ایجاد بیماری، در انسان و حیوان گوناگون و خطر انتقال زئونوز این ایزوله، اهمیت شناسایی و ردیابی این ژن را مشخص می‌نماید (۳۰).

در پژوهش حاضر از ۴۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در هیچ یک از جدایه‌ها ژن *mecB* ردیابی نشد که مطابق با پژوهش سولگی و همکاران (۲۰۱۹) است که از مجموع ۲۲۵ ایزوله جدا شده از نمونه انسانی، از هیچ یک از جدایه‌های نمونه‌های انسانی، ژن *mecB* جداسازی نشد (۳۴) اما *Becker* و همکاران در سال (۲۰۱۸) توانسته‌اند ژن *mecB* را از نمونه سوآب بینی نمونه‌های انسانی جداسازی کنند (۱۲). طبق پژوهش *MacFadyen* و همکاران

(۲۰۱۸)، ممکن است مخزن ژن *mecB* باکتری میکروکوکوس کازئولایتیکوس باشد که عدم حضور این ژن در پژوهش حاضر می‌تواند با عدم گزارش این باکتری در نمونه‌های حاصل از ورم پستان در منطقه مرتبط باشد (۱۸).

در این پژوهش از ۴۴ جدایه/استافیلوکوکوس اورئوس، ۵۴ و ۲۳ درصد از ایزوله‌های به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی به‌ترتیب به پنی‌سیلین و سولفامتوکسازول-تری‌متوپریم مقاومت نشان دادند. در پژوهشی که توسط Youssif و همکاران (۲۰۱۹)، Akkou و همکاران، پورتقی و همکاران و صاحب خطیری و همکاران (۲۰۱۱) در شهر مشهد، تهران، روی ۴۵، ۱۱۱، ۴۴ و ۴۵ جدایه/استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی انجام شد، به‌ترتیب مقاومت به پنی‌سیلین ۵۶، ۸۷، ۱۰۰ و ۵۰ درصد گزارش گردید (۲۳، ۳۵، ۳۶، ۳۷). که نتایج پژوهش صاحب خطیری و همکاران و Youssif و همکاران، مشابه با نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد. اما میزان مقاومت به پنی‌سیلین گزارش شده در پژوهش حاضر کمتر از میزان گزارش شده در مطالعه پورتقی و همکاران و Akkou و همکاران است. که ممکن است به علت استفاده وسیع از پمادهای داخل پستانی در گاوداری‌ها، استفاده از دوزهای پایین‌تر از مقدار لازم، عدم کامل کردن دوره درمانی باشد (۲۹). همچنین در این پژوهش‌ها به‌ترتیب ۸، ۲ و ۱۱/۱ درصد از ایزوله‌ها به سولفامتوکسازول-تری‌متوپریم مقاوم بودند. میزان مقاومت گزارش شده در مطالعه حاضر بالاتر از میزان گزارش شده در این پژوهش‌ها است که می‌تواند به علت استفاده بیش از حد و طولانی مدت از این آنتی‌بیوتیک در گله‌ها باشد.

در پژوهش اخیر ۷ درصد از ایزوله‌های به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی به تایلوژین مقاومت نشان دادند. در پژوهش‌های بهرامی‌نیا و

همکاران (۳۸) و پورتقی و همکاران (۲۰۱۶) به‌ترتیب ۴۷/۵ و ۲۸/۸ درصد از ایزوله‌ها، به تایلوژین مقاوم بودند (۲). عدم تشابه نتایج این پژوهش‌ها، با نتایج پژوهش حاضر ممکن است ناشی از تفاوت‌های مدیریتی و سیستم‌های شیردوشی باشد (۲۹). همچنین در این پژوهش تمام ۴۴ جدایه حساس به سفوکستین و انروفلوکساسین بودند. مشابه با پژوهش حاضر، در پژوهش Akkou و همکاران، پورتقی و همکاران، تمام جدایه‌ها حساس به سفوکستین و انروفلوکساسین گزارش شد. اما در پژوهش Youssif و همکاران تنها ۲۴ جدایه/استافیلوکوکوس اورئوس (۳۷/۵ درصد) مقاوم به سفوکستین گزارش شد که این میزان بیشتر از یافته‌های ما می‌باشد که ممکن است به علت عدم انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی، استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حضور طولانی مدت گاوهای آلوده در گله باشد (۲۹).

در مطالعه صورت گرفته مشاهده شد که جدایه/استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از حیوانات علاوه بر پنی‌سیلین به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام هم مقاومت نشان داده است (اگرچه درصد مقاومت گزارش شده بالا نبود). درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش شده در این پژوهش، اهمیت بکارگیری استفاده محتاطانه از آنتی‌بیوتیک‌ها را در فارم‌های گاوداری مشخص می‌نماید. این مطالعه برای اولین بار در شمال شرق کشور برای تعیین MRSA حاوی *mecB* و *mecC* صورت گرفته که مشخص شد که این نوع MRSA در منطقه مورد بررسی شایع نبوده و لازم است پژوهش‌های بیشتری در این مورد انجام شود. نتایج این مطالعه همچنین می‌تواند به ما کمک کند تا با روش‌های مناسب‌تری از انتشار کلون‌های مقاوم پیشگیری کنیم.

#### تشکر و قدردانی

لازم به ذکر است که این مقاله با حمایت دانشگاه

مهندس باقرزاده ابراز نموده، همچنین از آقای علی نعمتی و خانم اسدا...پور جهت بازخوانی مقاله تشکر می‌نمایند.

فردوسی مشهد از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته باکتری‌شناسی با کد ۴۸۹۳۹ به انجام رسیده است. نگارندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، سرکار خانم

## References

- 1- El-Tawab A, Ashraf A, El Hofy AI, Amaar AM, Sleim MA, Salem HS. Molecular characterization for some virulence and antibiotic resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cattle's subclinical mastitis in EL-Sharkia Governorate. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2016; 30(1): 219-30.
- 2- Abera M, Demie B, Aragaw K, Regassa F, Regassa A. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. 2010; 2(3): 29-34.
- 3- Shrivastava N, Sharma V, Nayak A, Shrivastava AB, Sarkhel BC, Shukla PC, et al. Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Mastitis in Dairy Cattle in Jabalpur, Madhya Pradesh. *Journal of Animal Research*. 2017; 7(1): 77.
- 4- Havaei SA, Assadbeigi B, Esfahani BN, Hoseini NS, Rezaei N, Havaei SR. Detection of *mecA* and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) in MRSA strains. *Iranian journal of microbiology*. 2015; 7(3): 161. [In Persian]
- 5- Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*. 2016; 12(1): 1-1.
- 6- Turlej AG AT A, Hryniewicz W A L E R I A, Empel J. *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (Scmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*. 2011; 60(2): 95-103.
- 7- Devries LA, VanDamme LR, Fameree L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 1972; 19(7): 598-605.
- 8- Devriese LA, Hommez J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Research in veterinary science*. 1975; 19(1): 23-27.
- 9- Paul I, Isore DP, Joardar SN, Mukhopadhyay SK, Jana C, Ganguly S. Investigation on methicillin resistant gene of *Staphylococcus aureus* for causing bovine mastitis. *Indian J Comp Microbiol Immunol. Infect Dis*. 2015; 36(1): 35-8.
- 10- Bardiau M, Yamazaki K, Duprez JN, Taminau B, Mainil JG, Ote I. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin - resist *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Letters in Applied Microbiology*. 2013; 57(3): 181-6.
- 11- Srednik ME, Crespi E, Testorelli MF, Puigdevall T, Pereyra AM, Rumi MV, et al. First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. *Veterinary and Animal Science*. 2019; 7: 100043.
- 12- Becker K, van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, Seggewiß J, Mellmann A, et al. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*. 2018; 24(2): 242.
- 13- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases*. 2011; 11(8): 595-603.
- 14- Cikman A, Aydin M, Gulhan B, Karakecili F, Kurtoglu MG, Yuksekkaya S, et al. Absence of the *mecC* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical samples: The first multi-centered study in Turkey. *Journal of infection and public health*. 2019; Feb 7.
- 15- Turlej AGATA, Hryniewicz W A L E R I A, Empel J. *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (Scmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*. 2011; 60(2): 95-103.
- 16- Juuti K. Surface protein PIs of methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*-role in adhesion, invasion and pathogenesis, and evolutionary aspects. 2004.

**17- Peacock S J, Paterson G K.** Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual review of biochemistry*. 2015; 84: 577-601.

**18- Macfadyen AC, Fisher EA, Costa B, Cullen C, Paterson GK.** Genome analysis of methicillin resistance in *Macrococcus caselyticus* from dairy cattle in England and Wales. *Microbial genomics*. 2018; 4(8).

**19- Chambers HF.** Methicillin-resistant staphylococci. *Clinical microbiology reviews*. 1988; 1(2): 173-86

**20- Dweba CC, Zishiri OT, El Zowalaty ME.** Isolation and Molecular Identification of Virulence, Antimicrobial and Heavy Metal Resistance Genes in Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*. 2019; 8(2):79.

**21- Misiura A, Pigli YZ, Boyle - Vavra S, Daum RS, Boocock MR, Rice PA.** Roles of two large serine recombinases in mobilizing the methicillin-resistance cassette SCCmec. *Molecular microbiology*. 2013; 88(6): 1218-29.

**22- Kim SH, Jeong HS, Kim YH, Song SA, Lee JY, Oh SH, et al.** Evaluation of DNA extraction methods and their clinical application for direct detection of causative bacteria in continuous ambulatory peritoneal dialysis culture fluids from patients with peritonitis by using broad-range PCR. *Annals of laboratory medicine*. 2012; 32(2): 119-25.

**23- Shebekhtiari N, Nochi Z, Eslampour M, Dabiri M, Bolifion M, Teherikalani M, et al.** Characterization of *staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiologica et immunologica Hungarica*. 2011; 58(2): 113-21.

**24- Ishihara k, Shimokubo N, Sakagami A, Ueno H, Muramatsu Y, Kadosawa T, et al.** Occurrence and Molecular Characteristics Of Methicillin-Resistant *staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. *Applied and environmental microbiology*. 2010; 76 (15): 5165-74.

**25- CaLSI CL.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Twenty: Document M100-S28. Wayne, PA, USA: CLSI.2018; 2018 -19

**26- Khoei F, Mobaiyen H, Nahaei MR, Sedeghi Mohammadi S.** Antibiotic resistance pat-

tern and Frequency of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from shohada hospital, Tabriz. *Journal of medical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014; 2(3): 105-8. [In Persian]

**27- Ahangari Z, Ghorbanpoor M, Shapouri MR, Gharibi D, Ghazvini K.** Methicillin resistance and selective genetic determinants of *Staphylococcus aureus* isolates with bovine mastitis milk origin. *Iranian journal of microbiology*. 2017; 9(3): 152.

**28- Sangarifar Samira, Hassan Ghajavand, Behrooz Johari, and Abazar Yari.** Frequency of *clf-A*, *mecA*, and *mecC* Genes in *Staphylococcus Aureus* Strain isolated From Nosocomial Infections and Cows Milk. 2016; 233-238.

**29- Hashemi M.** Prevalence of antibiotic resistance among bacterial pathogens isolated from dairy cows with mastitis in Far province. *Veterinary Researches & Biological Products*. 2016; 29(3): 85-93. [In Persian]

**30- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA.** The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. 2014; 22(1): 42-7.

**31- Dastmalchi HS, Panahi M.** Genotyping and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminants: differences in the distribution of clonal types between cattle and small ruminants. *Archives of microbiology*. 2019; Sep.

**32- Haenni M, Châtre P, Tasse J, Nowak N, Bes M, Madec JY, et al.** Geographical clustering of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014; 69(8): 2292-2293.

**33- Aklilu E, Chia HY.** First *mecC* and *mecA* positive livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (*mecC* MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia. *Microorganisms*. 2020; 8(2): 147.

**34- Solgi S, Razavi S, Nateghian A, Irajian G, Pournajaf A, Haasnejad-Bibalan M, et al.** Resistance-related determinants in clinically relevant *Staphylococcus aureus* isolated from teaching therapeutic centers, Tehran, Iran. *Reviews in Medical Microbiology*. 2019; May 31. [In Persian]

**35- Youssif NH, Hafiz NM, Halawa MA, Aziz HM.** Genes conferring antimicrobial resistance in cattle with Subclinical mastitis. *Bulgarian J Vet Med*, DOI. 2019; 10: 2019-0028.

**36- Akkou M, Antri K, Bachtarzi MA, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, et al.** Phenotypic and

genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals in Algeria. *Pak. Vet. J.* 2016; 36(2): 184-8.

**37- Pourtaghi H, Aziz AG, Sodagari H.** Antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Alborz province, Iran. *Bulg J vet Med.* 2016; 19(2):

169-74

**38- Bahraminia F, Emadi SR, Emameini M, Farzaneh N, Rad M, Khoramian B.** A high prevalence of tylosin resistance among *staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *In Veterinary Research Forum.* 2017; 8(2): 121. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. [In Persian]

## Investigation of the presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying different *mec* types in isolates causing bovine subclinical mastitis

Mehri Amini Kamroodi<sup>1</sup>, Gholamreza Hashemitabar<sup>2</sup>, Mahdi Askari Badouei<sup>\*3</sup>,  
Babak Khoramian<sup>4</sup>, Hamide Kalate Rahmani<sup>5</sup>

1 - Master of bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2 - PhD, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3 - PhD, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

4 - DVSc, Department of Clinical Sciences, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

5 - PhD, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Receive: March 7, 2022; Revise: April 7, 2022; Accept: April 24, 2022

### Summary

*Staphylococcus aureus* is one of the most important agents causing mastitis in dairy cattle. The emergence of methicillin resistance in *S. aureus* is a concern in veterinary medicine and public health. Due to the identification of new types of genes encoding methicillin resistance in recent years, the aim of this study was to investigate the presence of methicillin resistant (MRSA) and types of *mec* gene for the first time in the northeast of Iran. In the present study, the identity of 54 *staphylococcus aureus* isolates causing bovine subclinical mastitis were investigated using biochemical and molecular tests. Among them, the species-specific *nuc* gene was detected in 44 strains. Then, resistance of isolates to penicillin, cefoxitin, enrofloxacin, tylosin and trimethoprim-sulfamethoxazole were determined using the disk diffusion method. Finally, the molecular investigations for detection of the *mecA*, *mecC*, *mecB* genes were conducted. According to the results, the highest resistance were related to penicillin (54%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (23%), and the lowest resistance was related to tylosin (7%). The *mecA* gene was observed in only one isolate (2.3%), while the isolate was not identified as MRSA in phenotypic test. The results of the present study show that the incidence of methicillin resistance in bovine mastitis strains of the area is not high. This study also showed that less known types of *mec* genes were not common in this region. However, further studies must be performed in this regard.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *mec*, subclinical mastitis

## بررسی بروز هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهرستان اهواز

احمد رضا عطایی<sup>۱</sup>، سیده ام البنین قاسمیان<sup>۲\*</sup>، مرتضی رزاقی منش<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته، گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.

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

۳- استادیار، گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.

دریافت مقاله: ۳۱ فروردین ۱۴۰۱، بازنگری: ۳۰ اردیبهشت ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۱

### چکیده

مایکوپلازما هموفلیس عامل کم‌خونی عفونی گربه‌سانان می‌باشد. با توجه به اینکه هموبارتونلا در مرحله اولیه هیچ نشانه بالینی مشخصی در گربه‌های مبتلا ندارد، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی وقوع هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهرستان اهواز و عوامل مرتبط با آن صوت گرفت. مطالعه حاضر یک بررسی مقطعی-کاربردی بود که به منظور ارزیابی میزان بروز هموبارتونلا در ۱۲۰ قلاده گربه خانگی که طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ به مراکز دامپزشکی شهرستان اهواز ارجاع داده شده بودند، صورت گرفت. فاکتورهایی نظیر سن، جنس، نژاد، اخته کردن، خانگی بودن و علت مراجعه به مراکز دامپزشکی و همچنین داده‌های آزمایشگاهی در گربه‌های آلوده به عفونت هموبارتونلا با گربه‌های غیر آلوده مورد مقایسه قرار گرفت. فراوانی شیوع هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهر اهواز ۱۳/۳ درصد (۱۶ مورد) برآورد شد. میانگین سنی حیوانات مبتلا به هموبارتونلوز بیشتر از حیوانات فاقد هموبارتونلوز بود. ( $Z = -2/75$ ,  $P = 0/006$ ). علت مراجعه اغلب گربه‌های آلوده به هموبارتونلوز، بی‌حالی و بی‌اشتهایی (۴۳/۸ درصد) و در مرتبه بعد تب و اختلالات عصبی (۲۵ درصد) بود. تفاوت معنی‌داری در میزان WBC ( $Z = -0/98$ ,  $P = 0/32$ ), MCV ( $Z = -1/17$ ,  $P = 0/24$ ), MCHC ( $Z = -0/34$ ,  $P = 0/73$ ) و MCH ( $Z = -2/17$ ) در گربه‌های آلوده به هموبارتونلوز کمتر از گربه‌های فاقد هموبارتونلوز بود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، شیوع هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهرستان اهواز ۱۳/۳ درصد است. سن مهم‌ترین عوامل مؤثر در بروز هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی می‌باشد. بنابراین، بررسی دوره‌ای میزان گلبول‌های قرمز از طریق آزمایشات منظم خون در گربه‌های با سنین بالاتر توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: حیوانات خانگی، گلبول‌های قرمز، مایکوپلازما هموفلیس، هموبارتونلوز

## مقدمه

مایکوپلازما هموفلیس که هموبارتونلا فلیس نیز نامیده می‌شود، عامل کم‌خونی عفونی گربه‌سانان می‌باشد که اخیراً به‌عنوان مایکوپلازما هموتروپیک طبقه‌بندی شده است. مایکوپلازما هموفلیس (*M. haemofelis*) و مایکوپلازما هومینوتوم (*M. haemominutum*) دو مایکوپلازما هموتروپیک کاملاً متفاوت می‌باشند که در گربه‌ها براساس توالی‌های ژن rRNA ۱۶S شناسایی شده‌اند. شباهت توالی ژنی بین این ارگانسیم‌ها ۸۳ درصد است. این پاتوژن‌های باکتریایی گاهی اوقات در خون پستاندارانی مانند گربه، موش و سگ وجود دارند (۱، ۲). هموبارتونلا فلیس به‌عنوان یک پاتوژن اولیه یا همراه با سایر عفونت‌های فرصت طلب می‌تواند منجر به بیماری شود. همچنین در حیواناتی که دارای سیستم ایمنی ضعیف هستند، هموبارتونلوز ممکن است در پی سایر بیماری‌ها رخ دهد (۳).

این باکتری‌ها می‌توانند از طریق انتقال تزریقی یا خوراکی مقادیر کمی از خون آلوده به گربه‌های حساس منتقل شوند. انتقال داخل رحمی نیز ممکن است رخ دهد. در گربه‌سانان، هموبارتونلا فلیس می‌تواند از طریق جفت از مادر به جنین، از طریق خراش از یک گربه به گربه دیگر، یا از طریق نیش بندپایان خونخوار (مانند کک) منتقل شود (۴). این باکتری پلئومورفیک خارج سلولی به سطح گلبول‌های قرمز گربه می‌چسبد و از طریق تخریب خارج عروقی گلبول‌های قرمز توسط سیستم فاگوسیت تک هسته‌ای و نیز داخل عروقی یا آسیب مستقیم به غشای سلولی و افزایش شکنندگی اسمزی باعث کم‌خونی همولیتیک می‌شود (۳، ۵). با این حال، هیچ نشانه بالینی در گربه‌های مبتلا به عفونت‌های تحت بالینی و کم‌خونی خفیف قابل تشخیص نیست. علائم بالینی به مرحله بیماری و

سرعت ایجاد کم‌خونی بستگی دارد. شایع‌ترین علائم بالینی در گربه‌های مبتلا عبارتند از: تاکی پنه، افسردگی، ضعف، بی‌اشتهایی، کاهش وزن، رنگ پریدگی غشاهای مخاطی، کم‌آبی، ایکتروس و اسپلنومگالی (۶، ۷).

هموبارتونلا عموماً از طریق روش‌های سیتولوژیک بر روی گسترده‌های خونی قابل تشخیص می‌باشد. با این حال، با توجه به احتمال خطا و نتایج مثبت کاذب بالا، فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به‌عنوان روشی دقیق و مناسب برای تشخیص عفونت‌های ناشی از این باکتری معرفی شده است (۸). تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر مایکوپلازما و سپس جبران کم‌خونی و کم‌آبی گربه تنها راه درمان این بیماری است. در این خصوص تشخیص به موقع و صحیح حائز اهمیت فراوان می‌باشد (۹).

با توجه به این مسأله که در برخی از موارد کم‌خونی شدید می‌تواند منجر به افسردگی شدید و حتی مرگ حیوان شود، ارزیابی شیوع و بروز آن در یک جمعیت خاص و همچنین تشخیص به موقع از عواقب غیر قابل جبران آن جلوگیری کند. امروزه با توجه به گسترش فرهنگ نگهداری از حیوانات خانگی و به‌ویژه گربه، رعایت نکات بهداشتی جهت تأمین آسایش و رفاه حیوانات خانگی و همچنین سلامت بهداشت افرادی که دارای حیوان خانگی می‌باشند و سایر افرادی که با آنها در ارتباطند، امری ضروری می‌باشد. در همین راستا، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی وقوع هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهرستان اهواز و عوامل مرتبط با آن صوت گرفت.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک بررسی مقطعی کاربردی بود که به منظور ارزیابی بروز عفونت هموبارتونلا در گربه‌های خانگی که طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ به مراکز دامپزشکی شهرستان اهواز ارجاع داده شده

**تجزیه تحلیل داده‌ها:** پس از اتمام گردآوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نسخه ۲۴ نرم‌افزار SPSS انجام شد. ابتدا توسط آزمون کولموگراف-اسمیرنف، داده‌های کمی از نظر توزیع نرمال بررسی شدند. برای توصیف اطلاعات دموگرافیک از میانگین، انحراف معیار و جدول توزیع فراوانی استفاده شد. در صورت برخورداری از توزیع نرمال از روش‌های آماری پارامتریک t-test و در صورت عدم برخورداری از توزیع نرمال از روش‌های غیر پارامتریک (آزمون یو من ویتنی) جهت مقایسه گروه‌ها استفاده شد. داده‌های طبقه‌ای با استفاده از آزمون خی دو مورد مقایسه قرار گرفتند. در آزمون‌های انجام شده ضریب اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

**ملاحظات اخلاقی:** طرح تحقیقاتی حاضر توسط مرکز پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر تصویب شده است. کلیه مراحل این طرح مطابق با نکات اخلاقی طبق بیانیه هلسینکی انجام شد.

### نتایج

به‌طور کلی، فراوانی شیوع هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهر اهواز ۱۳/۳ درصد (۱۶ مورد) برآورد شد و ۸۶/۷ درصد (۱۰۴ مورد) از گربه‌ها فاقد هموبارتونلوز بودند. میانگین سنی کل گربه‌های مورد بررسی  $21/88 \pm 23/52$  ماه بود که دامنه آن بین ۱ تا ۱۰۰ ماه قرار داشت. میانگین سنی گربه‌ها به تفکیک ابتلا و عدم ابتلا به هموبارتونلوز به ترتیب  $41/37 \pm 31/78$  ماه (۶-۱۰۰ ماه) و  $20/77 \pm 18/68$  ماه (۱-۹۶ ماه) بود. مقایسه گربه‌های دارای هموبارتونلا با گربه‌های فاقد این بیماری حاکی از تفاوت معنی‌دار فاکتور سن بین دو گروه بود ( $Z = 2/75$ ،  $P = 0/006$ ). به این معنی که میانگین سنی حیوانات مبتلا به هموبارتونلوز بیشتر از حیوانات فاقد هموبارتونلوز بود. بررسی فراوانی جنسیت حاکی

بودند، صورت گرفت. سایر حیوانات خانگی نظیر سگ‌ها از این مطالعه حذف شدند اطلاعات مربوط به گربه‌های مورد بررسی نظیر سن، جنس، نژاد، اخته کردن، نحوه نگهداری حیوان و علت مراجعه به مراکز دامپزشکی در فرم‌های مربوطه ثبت شد. به منظور بررسی آزمایشگاهی، از گربه‌هایی که طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ به مراکز دامپزشکی ارجاع داده شده بودند نمونه خون اخذ گردید. نمونه خون از ورید سفالیک تعداد ۱۲۰ قلاده گربه خانگی تهیه شد و در لوله حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از خون‌گیری، غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC)، میانگین هموگلوبین سلولی (MCH)، حجم متوسط گلبول قرمز خون (MCV)، تعداد گلبول سفید خون (WBC)، تعداد گلبول قرمز خون (RBC)، توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز (RDW)، غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (PDW) و متوسط حجم پلاکت (MPV) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، مقادیر هماتوکریست (HCT) تعداد گرانولوسیت (Gr)، ائوزینوفیل (Eo)، بازوفیل، هموگلوبین (Hb)، پلاکت خون (Plt)، تعداد مونوسیت‌ها (Mo) و تعداد لنفوسیت و نوتروفیل‌ها مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید کم‌خونی و آلودگی، خون‌گیری مجدد از گربه‌های مبتلا صورت گرفت. پس از تهیه نمونه‌های خون و تثبیت آنها با الکل متیلیک، رنگ‌آمیزی لام‌ها به کمک رنگ گیمسا انجام شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری لام‌ها جهت حضور هموبارتونلا ارزیابی گردید. در پایان، فاکتورهای نظیر سن، جنس، نژاد، اخته کردن، نحوه نگهداری حیوان و علت مراجعه به مراکز دامپزشکی و همچنین داده‌های آزمایشگاهی در گربه‌های آلوده به عفونت هموبارتونلا با گربه‌های غیر آلوده مورد مقایسه قرار گرفت.

نژاد چین‌چیلا بود. بررسی وضعیت نژاد حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین نژادهای مختلف از نظر وقوع هموبارتونلوز بود ( $\chi^2=2/27, P=0/89$ ). در کل، ۱۹/۲ درصد (۲۳ نمونه) از گربه‌های خانگی اخته شده بودند. از میان ۹۷ گربه اخته نشده ۲ درصد (۲ مورد) باردار بودند. تفاوت معنی‌داری بین گربه‌های اخته شده و اخته نشده از نظر وقوع هموبارتونلوز مشاهده نشد ( $\chi^2=0/02, P=0/96$ ). مقایسه فراوانی جنسیت، وضعیت باروری، نژاد و علت مراجعه به مرکز دامپزشکی در گربه‌های آلوده و غیر آلوده به هموبارتونلوز در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است.

از آن بود که ۵۳/۳ درصد از گربه‌های خانگی نر و ۴۶/۷ درصد آنها ماده بودند. تفاوت معنی‌داری بین دو جنس از نظر وقوع هموبارتونلوز مشاهده نشد ( $\chi^2=0/08, P=0/77$ ).

اکثر (۶۸/۳) گربه‌های خانگی شهرستان اهواز از نژاد مو کوتاه خانگی (DSH) بودند. همچنین، ۲۰/۸ درصد (۲۵ نمونه) از آنان از نژاد پرشین و ۱/۷ درصد (۲ نمونه) از نژاد آمیخته پرشین-همالین و ۱/۷ درصد (۲ نمونه) همالین بودند. همچنین، ۵ درصد (۶ نمونه) از گربه‌های خانگی نژاد اسکاتلندی و ۱/۷ درصد (۲ نمونه) از آنان نژاد انگلیسی داشتند. تنها یک مورد (۰/۸ درصد) از گربه‌های خانگی از

جدول ۱- مقایسه فراوانی جنسیت، وضعیت باروری، نژاد و علت مراجعه در گربه‌های آلوده و غیر آلوده به هموبارتونلوز

P-value	$\chi^2$	کل		فاقد هموبارتونلوز		دارای هموبارتونلوز		متغیرها	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
0/77	0/08	۵۳/۳	۶۴	۵۳/۸	۵۶	۵۰	۸	نر	جنسیت
		۴۶/۷	۵۶	۴۶/۲	۴۸	۵۰	۸	ماده	
0/96	0/02	۱۹/۲	۲۳	۱۹/۲	۲۰	۱۸/۸	۳	اخته شده	وضعیت
		۷۹/۲	۹۵	۸۰/۸	۸۴	۸۱/۳	۱۳	اخته نشده	
0/89	2/27	۶۸/۳	۸۲	۶۷/۳	۷۰	۷۵	۱۲	مو کوتاه خانگی	نژاد
		۲۰/۸	۲۵	۲۰/۲	۲۱	۲۵	۴	پرشین	
		۵	۶	۵/۸	۶	۰	۰	اسکاتلندی	
		۱/۷	۲	۱/۹	۲	۰	۰	انگلیسی	
		۱/۷	۲	۱/۹	۲	۰	۰	پرشین-همالین	
		۱/۷	۲	۱/۹	۲	۰	۰	همالین	
		۰/۸	۱	۱	۱	۰	۰	چین‌چیلا	
		۰/۰۰۵	33/03	27/5	33	31/7	33	۰	
7/5	9	7/7	8	6/3	1	۰	۰	تروما	
9/2	11	9/6	10	6/3	1	۰	۰	مشکلات ادراری	
13/3	16	8/7	9	43/8	7	۰	۰	بی حالی یا بی اشتها	
12/5	15	13/5	14	6/3	1	۰	۰	زخم یا عفونت	
10	12	9/6	10	12/5	2	۰	۰	مشکلات احشایی	
3/3	4	3/8	4	۰	۰	۰	۰	مشکلات تنفسی	
2/5	3	2/9	3	۰	۰	۰	۰	ریزش مو و مشکلات پوستی	
5/8	7	2/9	3	25	4	۰	۰	تب و اختلالات عصبی	
8/3	10	9/6	10	۰	۰	۰	۰	سایر موارد	

بود ( $t=2/4$ ،  $P=0/01$ ). تفاوت معنی‌داری در میزان WBC ( $Z=-0/98$ ،  $P=0/32$ )، MCV ( $Z=-1/17$ )، MCHC ( $Z=-0/34$ ،  $P=0/24$ ) و MCH ( $Z=-0/73$ )، در گربه‌های آلوده به هموبارتونلوز نسبت گربه‌های به غیر آلوده مشاهده نشد. با این حال، میزان RDW ( $Z=-2/21$ )، RBC ( $Z=-4/57$ ،  $P<0/005$ ) و گربه‌های آلوده به هموبارتونلوز کمتر از گربه‌های فاقد هموبارتونلوز بود. غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (PDW)، متوسط حجم پلاکت (MPV)، ائوزینوفیل (Eo)، بازوفیل، هموگلوبین (Hb)، پلاکت خون (Plt)، تعداد مونوسیت‌ها (Mo)، تعداد لنفوسیت و نوتروفیل در گربه‌های با و بدون هموبارتونلوز تفاوتی نداشت ( $P<0/05$ ).

بیشترین علت مراجعه حیوانات غیر آلوده به هموبارتونلوز، چکاپ سالانه، جهت عقیم‌سازی یا واکسیناسیون بود (۲۷/۵ درصد)، در حالی که علت مراجعه اغلب گربه‌های آلوده به هموبارتونلوز، بی‌حالی و بی‌اشتهایی (۴۳/۸ درصد) و در مرتبه بعد تب و اختلالات عصبی (۲۵ درصد) بود. مقایسه علت مراجعه به مرکز دامپزشکی در گربه‌های آلوده و غیر آلوده به هموبارتونلوز حاکی از تفاوت معنی‌دار بین دو گروه بود ( $\chi^2=33/03$ ،  $P<0/005$ ).

مقایسه میانگین داده‌های آزمایشگاهی در گربه‌های آلوده و غیر آلوده به هموبارتونلوز در جدول شماره ۲ نمایش داده شده است. یافته‌ها حاکی از آن بود که میانگین تعداد گرانولوسیت در گربه‌های با هموبارتونلوز بیشتر از گربه‌های فاقد هموبارتونلوز

جدول ۲- مقایسه میانگین داده‌های آزمایشگاهی در گربه‌های آلوده و غیر آلوده به هموبارتونلوز

داده آزمایشگاهی	دارای هموبارتونلوز	فاقد هموبارتونلوز	کل	آماره* آزمون	P-value
تعداد گلبول سفید خون (۱۰/۸×۱۰ <sup>۹</sup> سلول در لیتر)	۲۹/۸	۳۱/۶۴	۱۸/۰۵	-۰/۹۸	۰/۳۲
تعداد گلبول قرمز خون (میلیون در میلی‌متر مکعب)	۵/۷۲	۱/۳۴	۸/۵۱	-۴/۵۷	<۰/۰۰۵
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	۹/۳۷	۲/۶۹	۱۲/۹۷	-۳/۲۶	۰/۰۰۱
هماتوکریت (L/L)	۲۴/۲۱	۸/۶۷	۳۸/۸۸	-۴/۰۸	<۰/۰۰۵
حجم متوسط گلبول قرمز خون (۱۰۶ میکرولیتر)	۴۳/۳۸	۶/۵۷	۴۴/۷۹	-۱/۱۷	۰/۲۴
میانگین هموگلوبین سلولی (پیکوگرم در هر سلول)	۲۲/۷۴	۲۱/۱۹	۱۷/۳	-۲/۱۷	۰/۲۹
غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (گرم در دسی‌لیتر)	۳۶/۴۲	۸/۵۵	۳۹/۲۸	-۰/۳۴	۰/۷۳
تعداد پلاکت خون	۲۰۶/۲	۱۶۴/۶	۴۳۸/۷	-۳/۱۱	۰/۰۰۲
تعداد لنفوسیت	۳۳/۱۸	۲۷/۳۵	۳۵/۷۹	-۱/۳۶	۰/۱۷
تعداد مونوسیت	۹/۴۵	۱۸/۳	۱۱/۵۶	-۱/۹۵	۰/۵۱
تعداد گرانولوسیت	۷۰/۴۸	۱۷/۲۷	۵۹/۱۸	۲/۴*	۰/۰۱
ائوزینوفیل	۰/۷۳	۰/۲۹	۰/۷۴	-۰/۴۰۲	۰/۶۸
بازوفیل	۱۶۷/۱۲	۶۴/۰۶	۱۷۹/۴۷	-۰/۶	۰/۵۴
عرض توزیع پلاکت	۹/۶۸	۲/۴۹	۱۰/۷۴	-۰/۹۳	۰/۳۵
عرض توزیع گلبول‌های قرمز	۱۳/۱۱	۵/۵۰۸	۱۶/۲۹	-۲/۲۱	۰/۰۲
متوسط حجم پلاکت	۱۱/۱	۱/۷۹	۱۱/۱۸	-۰/۱۷	۰/۸۶
نوتروفیل	۹/۹۸	۱/۵۳	۹/۸۵	-۰/۰۲	۰/۹۷

\*یومان ویتنی  
\*\*t-test

هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی مراجعه کننده به مراکز دامپزشکی شهرستان اهواز ۱۳/۳ درصد برآورد

### بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، شیوع

شد. احتمال وقوع هموبارتونلوز در حیوانات با سن بالاتر بیشتر از گربه‌های جوان‌تر بود. با این حال، نژاد، جنس و اخته کردن تأثیری بر وقوع هموبارتونلوز نداشت. بی‌حالی و بی‌اشتهایی مهم‌ترین عامل مراجعه گربه‌های مبتلا به هموبارتونلوز بود. بررسی یافته‌های آزمایشگاهی حاکی از آن بود که میانگین RBC، هموگلوبین هماتوکریت، پلاکت خون و توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز در گربه‌های مبتلا به هموبارتونلوز کمتر از گربه‌های فاقد این بیماری بود. با این حال، تفاوتی در میانگین سطح MCH، MCHC، WBC و MCV در گربه‌های خانگی آلوده و غیرآلوده به هموبارتونلوز مشاهده نشد.

هموبارتونلوز جزء بیماری‌های انگلی بسیار شایع گربه‌ها در ایران است. فراوانی این بیماری در همه جمعیت‌ها در میان گربه‌های ولگرد بیش از گربه‌های خانگی می‌باشد (۱۴-۱۰). یک مطالعه که بر روی گربه‌های ولگرد شهر کرمان انجام شد حاکی از بروز ۳۱ درصدی مایکوپلازما هموفلیس بود و بروز بیماری ارتباط معناداری با وقوع کم‌خونی داشت (۱۵). در حالی که این میزان در مطالعه ما ۱۳/۳ درصد گزارش شد. شیوع بیماری هموبارتونلوز ممکن است در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت باشد. بر اساس یافته‌های مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۲۱) که در چین صورت گرفت شیوع هموپلازما مثبت ۴/۹ درصد گزارش شد (۱۶). در یک مطالعه انجام شده در شهر شیراز روی ۲۰۰ سگ و ۱۱۲ گربه، تنها ۱/۷۹ درصد از گربه‌ها از نظر هموبارتونلوز فلیس مثبت بودند (۱۷). یافته‌های مطالعه برجی و همکاران که به بررسی هموبارتونلوز در گربه‌های شهر مشهد پرداختند، حاکی از شیوع ۱/۹ درصدی هموبارتونلوز در این شهرستان بود. مشابه یافته‌های ما، ارتباطی بین میزان آلودگی به هموبارتونلوز و جنسیت گربه‌های خانگی مشاهده نشد (۷).

در مطالعه واحدی و همکاران که در شهر تهران انجام شد بروز هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی ۶/۲ درصد برآورد شد (۱۸). در مطالعه مشابه دیگری که یک سال بعد در همین شهر انجام شد بروز هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهر تهران ۱۱/۶۷ درصد بود (۱۹). با این حال، در مطالعه حاضر، درصد بیشتری از وقوع هموبارتونلوز برآورد شد که می‌تواند دلیل بر فراوانی بیشتر هموبارتونلوز در جمعیت گربه‌های خانگی شهرستان اهواز نسبت به سایر نقاط کشور باشد. در یک مطالعه مشابه توسط زیبایی و همکاران که یک سال پیش در شهرستان اهواز انجام شد شیوع هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهر اهواز ۵/۱ درصد گزارش شد. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند هشدار در خصوص احتمال افزایش شیوع هموبارتونلوز در میان گربه‌های خانگی شهرستان اهواز باشد. علاوه بر این در مطالعه فوق‌الذکر، ۴ مورد آلوده مربوط به نژاد موکوتاه اهلی بود و نژاد پرشین آلودگی نداشت. با این حال در مطالعه حاضر هیچ ارتباطی بین وقوع هموبارتونلوز و نژاد گربه‌های خانگی یافت نشد. همچنین زیبایی و همکاران نشان دادند که همه نمونه‌های آلوده بالای ۲ سال بودند (۲۰). این یافته با نتایج ما که حاکی از وقوع بیشتر هموبارتونلوز در گربه‌های مسن‌تر بود هم راستاست. یافته‌های مطالعه اسکوتی‌زاده و همکاران نیز حاکی از شیوع بالاتر هموبارتونلوز در گربه‌های بالای ۶ ماه نسبت به گربه‌های کمتر از ۶ ماه بود و بالاترین سنی که آلودگی در آن دیده شد ۱/۵ سالگی بود (۱۰). تأثیر سن بالا بر بروز هموبارتونلوز در دیگر مطالعات نیز تأیید شده است (۲۱).

جنسیت مذکر، اخته نبودن، دسترسی به بیرون و تراکم بالای جمعیت گربه‌ها به‌عنوان عوامل خطر و پیش‌بینی‌کننده عفونت هموبارتونلوزیس فلیس گزارش شده است (۲۱، ۲۲). سن اخته شدن در

شایع‌ترین علایم گزارش شده در میان گربه‌های آلوده به عفونت هموبارتونلا بود. با توجه به این که کم‌خونی یکی از علایم مشخص در گربه‌های آلوده به عفونت هموبارتونلا است، موارد فوق محتمل و قابل پیش‌بینی است. با این حال، در برخی موارد تشابهی بین مطالعه ما و سایر مطالعات وجود نداشت که بر لزوم انجام مطالعات بیشتر در این خصوص تاکید می‌کند. نکته‌ای که در این خصوص باید مورد توجه قرار گیرد آن است که عفونت هموبارتونلا می‌تواند در گربه‌های سالم نیز مشاهده گردد که در صورت بروز استرس فعال گردد.

در خصوص ارزیابی آزمایشگاهی نمونه خون گربه‌های آلوده به هموبارتونلوز و مقایسه آن با و گربه‌های غیر آلوده به این بیماری، مطالعه تورکان نشان داد که در آزمایش اسمیر مستقیم خون، فاکتورهای هماتولوژیک شامل گلبول‌های قرمز، نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، HCT، MCHC و رتیکولوسیت‌ها بین گروه شاهد و گربه‌های آلوده تفاوت معنی‌داری داشتند (۱). به طور مشابه یافته‌های مطالعه ما نیز نشان داد که میزان RBC، HCT، Plt و RDW در گربه‌های مبتلا به هموبارتونلوز کمتر از گربه‌های فاقد این بیماری بود. کاهش HCT و RBC در گربه‌های آلوده را می‌توان از طریق اثرات میکروارگانسیم‌ها بر گلبول‌های قرمز توضیح داد (۱).

در همین راستا، یافته‌های مطالعه رنجبر بهادری نشان داد که مقادیر گلبول‌های قرمز، MCH، MCHC، NRBC و تعداد سلول‌های بانند در گربه‌های آلوده به هموبارتونلوز به طور چشمگیری نسبت به گربه‌های غیرآلوده کمتر بود (۱۹). مشابه با این یافته‌ها میزان کمتر RBC در گربه‌های مبتلا به هموبارتونلوز نسبت به گربه‌های فاقد این بیماری گزارش شد. با این حال، یافته‌های مطالعه ما نشان داد که تفاوتی در میزان MCHC و MCH بین

ایران مطابق با استانداردهای جهانی نیست و بیشتر گربه‌ها بعد از سن بلوغ اخته می‌شوند، در حالی که به دلیل پیوند با جفت مخالف، احتمال ابتلای حیوان با عفونت هموبارتونلوز بسیار زیاد است. طبق عرف رایج در ایران، اکثر صاحبان گربه اجازه می‌دهند حیوان به بیرون دسترسی داشته باشد. با این حال، یافته‌های ما وجود ارتباط بین وقوع هموبارتونلوز را با جنسیت و نژاد رد کرد. مشابه تحقیق حاضر، مطالعه تورکان و همکاران که در سال ۲۰۱۲ جهت تعیین میزان شیوع هموبارتونلا فلیس و بررسی نقش عوامل خطر آن انجام شد، نشان داد که ارتباطی بین آلودگی با هموبارتونلا و اخته شدن، جنسیت و نژاد گربه‌ها وجود ندارد و تنها سن بالا بر وقوع این بیماری تأثیرگذار بود (۱). این یافته‌ها توسط دیگر مطالعات مشابه مورد تأیید قرار گرفته است (۷). با این حال برخی یافته‌ها جنسیت مذکر، اخته نبودن، و نژاد را (خصوصاً در گربه‌هایی با نژاد نامشخص) به‌عنوان عوامل مؤثر در وقوع هموبارتونلوز معرفی کرده‌اند (۲۱). با توجه به وجود داده‌های متناقض در این خصوص، انجام مطالعات بیشتر جهت پاسخ به ارتباط میان این متغیرها ضروری به نظر می‌رسد.

بر اساس یافته‌های یک مطالعه کم‌خونی و تب بالا علائم اصلی هموبارتونلوز در گربه‌ها می‌باشند. ناهنجاری‌های یافت شده در معاینه معمول هماتولوژی شامل کم‌خونی جبران‌پذیر نورموسیتیک خفیف، کم‌خونی نورموسیتیک-هیپوکرومیک و ماکروسیتیک-نورموکرومیک، ائوزینوفیلی خفیف (بین ۱۱ تا ۱۳ درصد) و مونوسیتوز (بین ۱-۱۲ درصد) می‌باشد (۲۳). در مطالعه ما بیشترین عامل مراجعه به دلیل چکاپ سالیانه یا دریافت واکسن بود که بر بی‌علامت بودن این بیماری در مراحل اولیه هموبارتونلوز تأکید می‌کند. همچنین، لاغری، بی‌اشتهایی و ضعف از

گربه‌های خانگی آلوده و غیر آلوده به هموبارتونلوز مشاهده نشد. به نظر می‌رسد انجام مطالعات بیشتر جهت روشن شدن ارتباط میان میزان MCHC و MCH با بروز هموبارتونلوز ضروری است.

شیوع بالای هموبارتونلوز در اهواز حاکی از این است که گربه‌ها منابع مهم انتقال این عفونت می‌باشند. یکی از مشکلات جدی در زمینه عفونت هموبارتونلوز بی‌علامت بودن آن می‌باشد. بر اساس یافته‌های یک مطالعه، موردی از اختلالات رفتاری و سرفه در گربه‌های مبتلا به هموبارتونلوز گزارش شد، در حالی که دیگر موارد هیچ ناهنجاری رفتاری را از خود نشان ندادند (۲۴). در حال حاضر نگرانی‌هایی وجود دارد که آیا تغییرات و علایم گزارش شده دلیل بیماری اولیه هستند یا ثانویه به هموبارتونلوز. در موارد هموبارتونلوز، انتظار می‌رود که میزان پاسخ احیاکننده با شدت کم‌خونی با یک پاسخ ماکروسیتیک و نرموکرومیک مطابقت داشته باشد. با این حال در شرایط التهابی مزمن همراه با هموبارتونلوز، پاسخ مورد انتظار نرموسیتی، نرموکرومیک است (۲۳). تشخیص با بررسی سیتولوژیک اسمیرهای خونی به دلیل مشاهده پراکنده ارگانسیم مشکل‌ساز است. آنتی‌بادی‌ها را می‌توان با آزمایش آنتی‌بادی فلورسنت غیر مستقیم یا با روش الیزا ارزیابی کرد، با این حال، هیچ یک از این روش‌ها معمولاً استفاده نمی‌شوند. سنجش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از مهم‌ترین ابزارهای تشخیص هموبارتونلوز است (۲۱). هنگام تشخیص این بیماری، مشکلات اصلی مربوط به وقوع چرخه‌ای پاتوژن در خون، لوکالیزه شدن سطح گلبول‌های قرمز، اندازه کوچک آن و وسعت طیف تظاهرات بالینی است. در بیشتر موارد، هموبارتونلوز (gemobartonellosis) در پس‌زمینه عفونت‌های ویروسی، جراحات، استرس و سایر عواملی که مقاومت بدن را کاهش می‌دهد، ظاهر می‌شود.

مراقبت از گربه‌های با علائم کم‌خونی و سرفه ضروری است، زیرا هموبارتونلوز ممکن است یک اختلال اولیه باشد. بررسی پرونده‌های بیشتر برای بهبود پیش‌آگهی و درمان این بیماری در گربه‌ها در ایران مورد نیاز است. ترانسسیکلین درمان عمده همه عفونت‌های مایکوپلازما می‌باشد. مشتق داکسی‌سیکلین که می‌تواند به صورت سوسپانسیون خوراکی تجویز شود معمولاً برای گربه‌ها تجویز می‌شود. عموماً سه هفته استفاده از دارو برای سرکوب ارگانسیم لازم است. هر چند، در برخی موارد، پاسخ به درمان مدت زمان بیشتری به طول می‌انجامد. از بین بردن مایکوپلازما تنها بخشی از درمان است. با توجه به این که سیستم ایمنی بدن میزبان است که گلبول‌های قرمز را از بین می‌برد، پردنیزولون یا هورمون‌های استروئیدی مشابه باید تجویز گردد. گربه‌ها عموماً پاسخ خوبی به درمان می‌دهند و پیش‌آگهی درمان خوب است مگر در گربه‌هایی که دچار مشکل تضعیف‌کننده سیستم ایمنی هستند. با این حال، در برخی موارد نیاز به بستری شدن، تزریق خون و حمایت تغذیه‌ای می‌باشد.

#### محدودیت‌ها و نقاط ضعف و قوت

مطالعه حاضر می‌تواند داده‌های ارزشمندی را در خصوص بروز هموبارتونلوز در جمعیت گربه‌های خانگی شهر اهواز و همچنین عوامل مؤثر بر آن ارائه نماید. این حال، محدودیت‌هایی نیز دارد. با توجه به گذشته‌نگر بودن مطالعه و ویژگی‌های نمونه (محدود شدن به گربه‌های شهرستان اهواز)، امکان تعمیم یافته‌های این مطالعه به دیگر جمعیت‌ها میسر نیست.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، شیوع هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی شهرستان اهواز ۱۳/۳ درصد است. سن مهم‌ترین عوامل مؤثر در بروز هموبارتونلوز در گربه‌های خانگی می‌باشد. بنابراین،

## References

1. Torkan S, Aldavood SJ, Raffie SM, Hejazi H, Shirani D, Momtaz H. Prevalence and risk factor analysis of Haemobartonella felis in cats using direct blood smear and PCR assay. *Comparative Clinical Pathology*. 2013; 22(6): 1103-9.
2. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Revision of haemotrophic Mycoplasma species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52(2): 683.
3. Satriawan I, Octaviani DIDA. Haemobartonellosis in a Domestic Cat in Indonesia: a Case Study. *Veterinary Biomedical and Clinical Journal*. 2021; 3(2): 23-6.
4. Soto F, Walker R, Sepulveda M, Bittencourt P, Acosta-Jamett G, Müller A. Occurrence of canine hemotropic mycoplasmas in domestic dogs from urban and rural areas of the Valdivia Province, southern Chile. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2017; 50: 70-7.
5. Wiebe VJ. Drug Therapy for Infectious Diseases of the Dog and Cat: Wiley; 2015.
6. Aslan Ö. Hemotropic mycoplasmas: From Haemobartonella to Mycoplasma. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*. 2016; 1(1): 31-40.
7. Borji H, Razmi G, Ahmadi A, Karami H, Yaghfoori S, Abedi V. A survey on endoparasites and ectoparasites of stray cats from Mashhad (Iran) and association with risk factors. *Journal of Parasitic Diseases*. 2011; 35(2): 202-6.
8. Messick JB, Santos AP, Guimaraes AMS. Complete genome sequences of two hemotropic mycoplasmas, Mycoplasma haemofelis strain Ohio2 and Mycoplasma suis Strain Illinois. *Am Soc Microbiol*; 2011.
9. Ayllón T, Diniz PPV, Breitschwerdt EB, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F, Sainz A. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 2012; 12(2): 143-50.
10. Oskoueizadeh K, Zahraei SM, Ale DS, Majlesi B, Ghafari H, Eshrafi TI, et al. Study in prevalence of Bartonella henselae infection in domestic cats from Tehran. 2008.
11. Tsai YL, Lin CC, Chomel BB, Chuang ST, Tsai KH, Wu WJ, et al. Bartonella infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011; 11(8): 1023-30.
12. Liu Q, Eremeeva ME, Li D. Bartonella and Bartonella infections in China: from the clinic to the laboratory. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2012; 35(2): 93-102.
13. Stojanovic V, Foley P. Infectious disease prevalence in a feral cat population on Prince Edward Island, Canada. *The Canadian Veterinary Journal*. 2011; 52(9): 979.
14. Barrs V, Beatty J, Wilson B, Evans N, Gowan R, Baral R, et al. Prevalence of Bartonella species, Rickettsia felis, haemoplasmas and the Ehrlichia group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. *Australian veterinary journal*. 2010; 88(5): 160-5.
15. Akhtar Danesh B, Hosseini Hoshyar S, Moeini E, Hemmati Z. Molecular detection of Mycoplasma haemophilus infection in the population of stray cats in Kerman. *Veterinary laboratory research*. 2012; 4(1): 87.
16. Zhang Y, Zhang Z, Lou Y, Yu Y. Prevalence of hemoplasmas and Bartonella species in client-owned cats in Beijing and Shanghai, China. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2021: 20-0681.
17. Shoorijeh SJ, Gaur S, Musavi A, Hydarpour A. Prevalence of Haemobartonella sp. in dog and cat population of Shiraz, Fars Province of Iran. *Journal of Applied Animal Research*. 1999; 16(1): 101-4.
18. Vahedi SM, Bolourchian M, Abolghasempour S, Fard RM, Akbarein H, Salehi TZ, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of feline hemotropic mycoplasmas. *Journal of Veterinary Research*. 2014; 69(3): 213-7.
19. Ranjbar Bahadori S, Nooshirvani K, Shirani D. Study on incidence of haemobartonellosis in pet cats of Tehran. *Journal of Veterinary Research*. 2015; 70(1): 23-8.
20. Zibae S, Mosalanezhad B, MJalali S,

**Bahrami S, Avizwh R.** Incidence of haemobartonellosis in pet cats of Ahvaz city National Conference on Modern Veterinary Technologies<sup>^</sup> th September 2021.

**21. Tasker S, Braddock J, Baral R, Helps C, Day M, Gruffydd-Jones T, et al.** Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2004; 6(6): 345-54.

**22. Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, et al.** Prevalence,

risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(3): 961-9.

**23. Kurtdede A, Ural K.** Haemobartonellosis of Cats in Ankara, Turkey. *Acta Veterinaria Brno*. 2004; 73(4): 507-12.

**24. Hill T, Odesnik B.** Omentalisation of perinephric pseudocysts in a cat. *Journal of small animal practice*. 2000; 41(3): 115-8.

## Evaluation of haemobartonellosis in pet cats in Ahvaz, Iran

AhmadReza Ataei<sup>1</sup>, Seyedeh Ommolbanin Ghasemian<sup>2\*</sup>, Morteza Razaghimanesh<sup>3</sup>

1- Postgraduate, Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran.

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

3- Assistant Professor, Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran.

Receive: April 20, 2022; Revise: May 20, 2022; Accept: May 21, 2022

### Summary

---

*Mycoplasma haemofelis* is the cause of infectious anemia among cats. Due to the asymptomatic nature of hemobartonella in the initial stage, the present study aimed to evaluate the incidence of hemobartonellosis and its related factors in domestic cats in Ahvaz, Iran. This cross-sectional study was performed to investigate the development of hemobartonella in 120 domestic cats referred to veterinary centers in Ahvaz city within 2021-2022. Factors, such as age, gender, race, castration, domesticity, and reasons for referring to the veterinary centers, as well as laboratory data of cats infected with hemobartonella infection, were compared with those of non-infected cats. The prevalence of hemobartonellosis in domestic cats in Ahvaz city was estimated at 13.3% (16 cases). The mean age of cats with hemobartonellosis was higher than those without hemobartonellosis ( $Z=-2.75$ ,  $P=0.006$ ). Lethargy and anorexia were the predominant reasons of referred to the veterinary centers among hemobartonellosis-infected cats (43.8%), followed by fever and neurological disorders (25%). No significant difference was found in terms of white blood cells ( $Z=-0.98$ ,  $P=0.32$ ), mean cell volume ( $Z=-1.17$ ,  $P=0.24$ ), mean corpuscular hemoglobin concentration ( $Z=-0.34$ ,  $P=0.73$ ), and mean corpuscular hemoglobin ( $Z=-2.17$ ,  $P=0.29$ ). However, the levels of red cell distribution width ( $Z=-2.21$ ,  $P=0.02$ ) and red blood cell ( $Z=-4.57$ ,  $P<0.005$ ) were lower in cats infected with hemobartonellosis than in healthy cats. According to the results of the present study, the incidence rate of hemobartonellosis was 13.3% among domestic cats in Ahvaz city. Age was found the most important factor in the development of hemobartonellosis in domestic cats. Therefore, it is recommended to perform periodic monitoring of red blood cell counts through regular blood tests in older cats.

**Key words:** Hemobartonellosis, *Mycoplasma hemofelis*, Pets, Red blood cells

## بررسی اپیدمیولوژی بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک بر اساس سیستم اطلاعات جغرافیایی؛ مطالعه موردی در استان کرمانشاه ۱۳۹۰-۱۳۹۸

هامون کردستانی<sup>۱</sup>، مهرداد پویانمهر<sup>۲\*</sup>، احسان اله افشاری صفوی<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، ایران.

۲- استادیار ایمونولوژی، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، بخش ایمونولوژی و میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، ایران.

۳- استادیار داخلی دام بزرگ، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۱ بهمن ۱۴۰۰، بازنگری: ۷ اردیبهشت ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۷ خرداد ۱۴۰۱

### چکیده

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی دام است. این بیماری در ایران اندمیک است. هدف این مطالعه استفاده از سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) جهت کمک در کنترل بیماری PPR طی یک دوره هشت ساله در استان کرمانشاه بود. گزارش بیماری PPR در سطح استان کرمانشاه طی یک دوره زمانی ۱۳۹۰-۱۳۹۸ جمع‌آوری و با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS 10.6 لایه‌های تقسیمات استان مشخص شد. اطلاعات مربوط به تعداد کل دام‌های هر شهرستان به تفکیک، دام‌های معاینه شده، دام‌های مبتلا، تلفات و کانون‌های پرخطر بیماری به صورت جدول توصیفی به پایگاه داده اضافه و با استفاده از سیستم مختصات جغرافیایی (GCS) به نقشه‌ی استان متصل گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس تفاوت بین نقاط درگیر بیماری، میزان درگیری و مناطق استان کرمانشاه با استفاده از نرم‌افزار *SSPS 18* و آزمون *chi-square* و *Fisher* انجام شد. اختلاف معنی‌داری در رخداد بیماری در قسمت‌های مختلف استان مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). در کانون‌های درگیری و ابتلا بیشترین و کمترین آمار به ترتیب مربوط به منطقه غربی ۳۹/۴ درصد، مرکزی ۳۵/۹ درصد و منطقه شرقی ۲۴/۶ درصد بود. بیشترین و کمترین تلفات نیز با ۴۶۵ و ۶ مورد مربوط به سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۶ بود. نتایج این مطالعه به دلیل اندمیک بودن بیماری در ایران به سیاست‌گذاران بهداشتی حوزه دام برای اتخاذ روش‌های کنترلی کمک و موجب شناخت بهتر اپیدمیولوژی بیماری می‌شود. لذا دقت در ثبت کامل و جامع کدهای اپیدمیولوژیک سیستم GIS و توجه بیشتر به سیستم پایش لازم است.

واژگان کلیدی: اپیدمیولوژی، سیستم اطلاعات جغرافیایی، کرمانشاه، طاعون نشخوارکنندگان کوچک

## مقدمه

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) یک بیماری حاد نشخوارکنندگان کوچک با میزان واگیری ۹۰-۸۰ درصد و میزان مرگ و میر بین ۸۰-۵۰ درصد می‌باشد. بیماری با تب بالا، ترشحات چشم و بینی، پنومونی، نکروز، اولسرغشاهای مخاطی، التهاب دستگاه گوارش و اسهال شدید مشخص می‌گردد (۱). عامل بیماری ویروسی متعلق به جنس موربیلی ویروس از خانواده پارامیکسوویریده در راسته مونونگاویرالز می‌باشد (۲). ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک از طریق تماس مستقیم با ترشحات و مواد دفعی حیوانات آلوده منتقل می‌شود. این بیماری بسیار مسری و تمام ترشحات می‌توانند حامل ویروس باشند. مقادیر قابل توجهی از ویروس در ترشحات بینی، چشم و دهان بیماران و در اواخر بیماری در مدفوع نیز یافت می‌شود. تماس بین دام بیمار و سالم مهم‌ترین راه انتقال این بیماری است وجود تراوشات عفونی در محل زندگی دام (آبشخورها، آخورها، بستر، محل پرواربنندی و میادین دامی) امکان انتقال و انتشار بیماری وجود دارد (۳). این ویروس همانند سایر موربیلی ویروس‌ها، لنفوتروپیک و اپیتلیوتروپیک بوده و موجب جراحات شدیدی در بافت‌های لنفاوی و اپیتلیال می‌شود (۵). ویروس در آئروسول‌ها نیز فراوان بوده و دستگاه تنفسی محتمل‌ترین راه ورود ویروس می‌باشد. علائم بیماری پس از یک دوره کمون ۴ تا ۵ روزه همراه با تب ۴۰-۴۱ درجه، افسردگی، خواب آلودگی، ریزش ترشحات آبکی از چشم‌ها، بینی و دهان با بروز عفونت‌های ثانویه غلیظ، زرد رنگ و بدبو، قرمز شدن پوشش مخاطی دهان و چشم‌ها، بروز نواحی خاکستری رنگ کوچک ته‌سوزنی بر روی لثه‌ها، کام، لب‌ها، تورم و ترک خوردگی لب‌ها همراه با ظهور دلمه‌هایی بر روی آن، تنفس سریع، مشکل

و صدادار، بیرون آوردن زبان و سرفه آرام و دردناک، تغییر در پوشش مخاط بینی، مهبلی، واژن، بروز اسهال ۲ تا ۳ روز بعد از شروع تب، همراه با ژولیدگی موه‌های بدن تظاهر می‌نماید (۶). گرچه بیماری خاص نشخوارکنندگان کوچک است، اما گاو و خوک نیز بدون بروز علائم کلینیکی به ویروس آلوده می‌شوند (۷). این بیماری اولین بار (۱۹۴۰) در آفریقا گزارش شد (۸). در سال ۱۹۹۰ به‌صورت همه‌گیری‌هایی از شبه جزیره عربستان و ترکیه، سپس پاکستان، هند، بنگلادش و چین گزارش شد (۹). بیماری در منطقه آسیا (۱۰) و ایران آندمیک است (۱۱). در بررسی‌های اپیدمیولوژیک در هر منطقه کمک به عملیات کنترل و پیشگیری هدفدار می‌باشد (۱۲). در ایران بررسی عوامل خطر این بیماری به‌وسیله بررسی داده‌های موجود در سازمان دامپزشکی کشور، اسناد سازمان جهانی بهداشت حیوانات و نیز از مطالعه‌های کلی نگر انجام می‌گیرد (۱۳). از طرفی استفاده از سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) در اپیدمیولوژی دامپزشکی ابزاری کارآمد جهت مدیریت آسان در ارزیابی راه‌کارهای مختلف پیشگیری و کنترل شیوع بیماری‌های عفونی حیوانات است. این مطالعه نیز با استفاده از طراحی سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) وضعیت بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک طی یک دوره نه ساله (۱۳۹۰-۱۳۹۸) را در استان کرمانشاه واقع در منطقه غربی ایران و شرایط جغرافیای مناسب دام پروری شناسایی می‌نماید تا بر اساس دستورالعمل‌های OIE، با ایجاد شناختی مناسب در کنترل و رسیدن به هدف ریشه‌کنی بیماری کمک نماید.

## مواد و روش کار

**الف) تحلیل شیوع بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک طی سال‌های ۱۳۹۸-**

۱۳۹۰: استان کرمانشاه از شمال با استان کردستان، از شرق با استان همدان، از غرب با کشور عراق و از جنوب با استان‌های لرستان و ایلام همجوار است. این استان دارای تعداد تقریبی ۵۱۹۴۳۶۳ راس دام سبک (گوسفند و بز) و سنگین (گاو و گوساله) می‌باشد. با توجه به وضعیت خاص اقلیمی (آب و هوایی چهار فصل، پوشش‌های گیاهی و ارتفاعات رشته کوه‌های زاگرس)، اکثر قریب به اتفاق دام‌ها به صورت آزاد و رها از چراگاه‌های اطراف روستاها و مزارع تغذیه می‌کنند (سرشماری اداره آمارا داره کل دامپزشکی استان کرمانشاه). با توجه به لزوم مراقبت اپیدمیولوژیکی مستمر متناسب با ویژگی‌ها و شرایط موجود (ثبت و گردآوری سیستماتیک و آنالیز داده‌ها برای امکان ارزیابی تعیین وضعیت سلامتی جمعیت دامی، عملیات جاری، پیشگیری و کنترل بیماری) با استفاده از فرم‌های گزارش موارد وقوع بیماری طاعون نشخوارکنندگان ثبت شده در سامانه سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) اداره کل دامپزشکی استان کرمانشاه اطلاعات بیماری جمع‌آوری شد. ابتدا با ساخت یک پایگاه داده در محیط نرم‌افزار ArcGIS 10.6 لایه‌های نقشه‌ی ایران، تقسیمات استان کرمانشاه به این پایگاه داده اضافه شد.

**ب) آنالیز داده‌ها:** در این بررسی بر اساس وسعت شهرستان‌های استان و نیز جمعیت دام‌های مورد بررسی، استان به سه منطقه مرکزی (شهر کرمانشاه)، غربی (شهرستان‌های اسلام آباد، دالاهو، روانسر، جوانرود، پاوه، ثلاث، سر پل ذهاب، گیلان غرب و قصر شیرین) و شرقی (هرسین، صحنه، سنقر و کنگاور) تقسیم گردید در این بررسی بر اساس تقسیم‌بندی سازمان دامپزشکی کشور واحدهای مزرعه (روستاها، مجتمع‌های دامداری و دامپروری) با حداقل ظرفیت یک دام مبتلا به بیماری بالینی طاعون نشخوارکنندگان کوچک در نظر گرفته شد.

اطلاعات مربوط به پارامترهای عددی (شامل تعداد کل دام، دام‌های معاینه شده، واکسیناسیون، دام‌های مبتلا به بیماری، تلفات دام‌ها و کانون‌های پرخطر بیماری) طی یک دوره زمانی ۹ ساله (۱۳۹۸-۱۳۹۰) به صورت جدول توصیفی به پایگاه داده اضافه و با استفاده از سیستم مختصات جغرافیایی (GCS) به نقشه‌ی استان متصل شد. جهت بررسی اختلاف شیوع بیماری در نقاط مختلف استان کرمانشاه تجزیه و تحلیل داده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون‌های chi-square و Fisher انجام شد.

### نتایج

بر اساس گزارش مرکز GIS اداره کل دامپزشکی استان مبنی بر اطلاعات واکسیناسیون، نرخ ابتلا و تلفات ناشی از بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۰ از مجموع کل ۵۱۹۴۳۶۳ دام استان، تعداد ۳۹۶۳۱۷۸ برابر با ۷۶/۴۱ درصد تحت واکسیناسیون و پایش بیماری قرار گرفته‌اند. نتایج بررسی موارد مثبت بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک با استفاده از آزمون chi-square و مقایسه قسمت‌های مختلف استان اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بررسی کانون‌های آلوده به بیماری طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۰ نشان داد، بیشترین درگیری مربوط به مناطق روستایی مرکزی شهرستان کرمانشاه و اسلام آباد با ۳۳۸۸ و ۳۰۳۱ مورد مثبت (۴۷/۲ و ۴۲/۲۳ درصد) و کمترین درگیری مربوط به مناطق روستایی شهرستان ثلاث باباجانی و پاوه با ۱ و ۰ مورد مثبت (۰ و ۰/۱۳ درصد) بود (جدول ۱ و نقشه ۱). بر اساس همین آمار کانون‌های درگیری و ابتلا به بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک استان در تقسیم‌بندی مناطق استان بیشترین درگیری به ترتیب مربوط به منطقه غربی با ۳۹/۴ درصد، مرکزی با ۳۵/۹ درصد و منطقه شرقی با

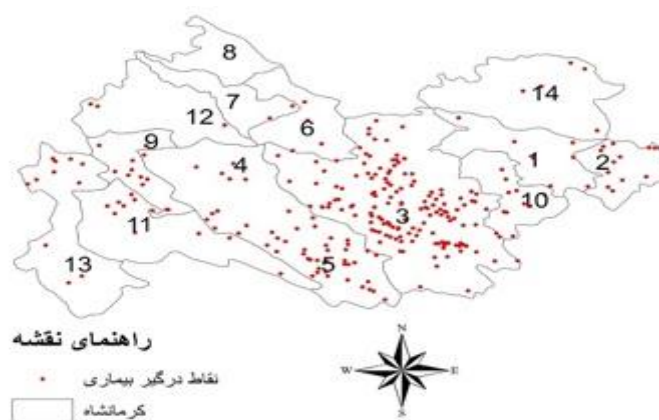
درگیری به‌ترتیب بر اساس موارد درگیری در هر سال با ۳۲/۳ درصد (۱۳۹۳) و موارد درگیری هر سال نسبت به سال‌های دیگر با ۳۳/۳ درصد (۱۳۹۶) و کمترین درگیری بر همین اساس با ۰/۹ درصد (۱۳۹۶) و ۲ درصد (۱۳۹۰) گزارش شده است (نمودار ۲).

۲۴/۶ درصد کمترین درگیری از میان کل مبتلایان به بیماری را نشان دادند (جدول ۲، نقشه ۲) بر اساس گزارشات بیشترین تلفات با ۴۶۵ مورد مربوط به سال ۱۳۹۰ و کمترین تلفات با ۶ مورد مربوط به سال ۱۳۹۶ بوده است (نمودار ۱). همچنین بر اساس داده کاوی سال‌های مورد مطالعه بیشترین

جدول ۱- وضعیت مبتلایان به بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک استان کرمانشاه به تفکیک شهرستان بر اساس (شواهد بالینی و آزمایشگاهی) بر پایه اطلاعات GIS طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۸

ردیف	شهرستان	معاینه شده	مثبت (شواهد بالینی - تأیید آزمایشگاهی)	منفی
۱	صحنه	۴۶۳۰	۱۴۲۳	۳۲۰۷
۲	کنگاور	۹۸۲۰	۸۱۴	۹۰۰۶
۳	کرمانشاه	۱۶۷۰۲۳	۳۳۸۸*	۱۶۳۶۳۵
۴	دالاهو	۳۷۳۹	۱۳۱	۳۶۰۸
۵	اسلام آباد	۸۴۳۰	۳۰۳۱*	۵۳۹۹
۶	روانسر	۱۲۶۰	۱۱۴	۹۰
۷	جوانرود	۴۷۰	۱۴۲	۳۲۸
۸	پاوه	۰	۰	۰
۹	سرپل ذهاب	۲۸۲۸	۷۹	۳۷۴۹
۱۰	هرسین	۲۸۰۰	۷۱	۲۷۲۹
۱۱	گیلانغرب	۲۳۷۰	۲۲۷	۲۱۴۳
۱۲	ثلاث باباجانی	۲۰۰	۱	۱۹۹
۱۳	قصر شیرین	۵۹۱۷	۹۱	۵۸۳۰
۱۴	سنقر	۷۶۵۷	۱۴	۷۶۴۶
	جمع کل	۱۹۶۰۳۷	۷۱۷۷	۱۸۷۷۱۳

توجه: \* بیشترین موارد مثبت بر اساس شواهد بالینی و تأیید آزمایشگاهی



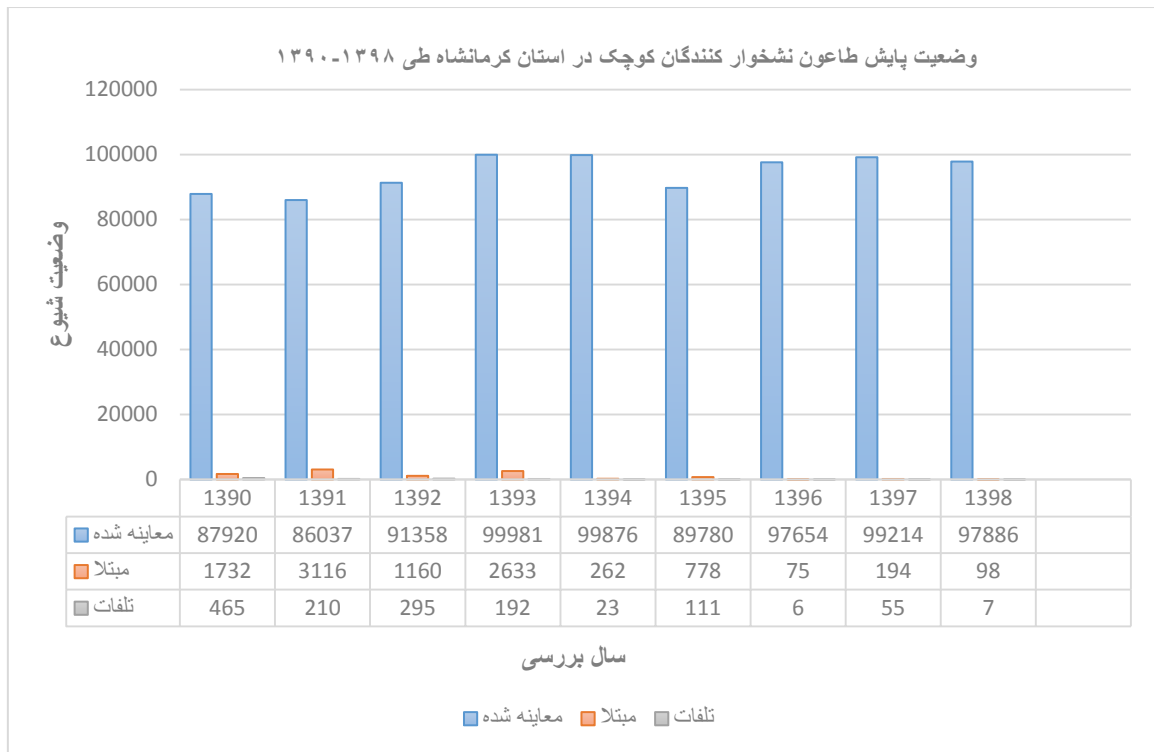
نقشه ۱ GIS از جدول ۱- وضعیت بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک شهرستان های استان کرمانشاه بر اساس ( شواهد بالینی و آزمایشگاهی) بر پایه اطلاعات GIS طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۸ با توجه به راهنمای نقشه

جدول ۲- وضعیت بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک در مناطق مختلف استان کرمانشاه طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۰ بر اساس ( شواهد بالینی و آزمایشگاهی) بر پایه اطلاعات GIS طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۰

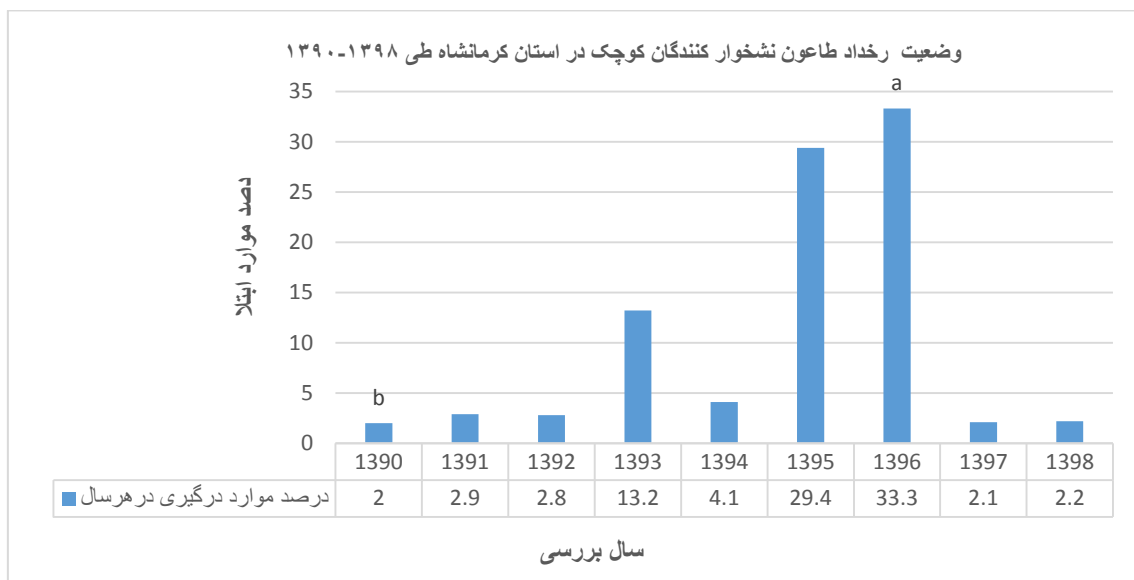
طاعون نشخوارکنندگان کوچک				
منطقه	مثبت	منفی	کل	
مرکزی	تعداد	۳۳۸۸	۱۶۳۶۳۵	۱۶۷۰۲۳
	درصد موارد ابتلا در هر منطقه	۳۵/۹	۷۸/۸	۷۷/۰
شرقی	تعداد	۲۳۲۲	۲۲۵۸۵	۲۴۹۰۷
	درصد موارد ابتلا در هر منطقه	۲۴/۶	۱۰/۹	۱۱/۵
غربی	تعداد	۳۷۱۸	۲۱۳۴۲	۲۵۰۶۰
	درصد موارد ابتلا در هر منطقه	۳۹/۴	۱۰/۳	۱۱/۵
کل	تعداد	۹۴۲۸	۲۰۷۵۶۲	۲۱۶۹۹۰
	درصد موارد ابتلا در هر منطقه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



نقشه ۲ GIS از جدول ۲- وضعیت بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک در مناطق مختلف استان کرمانشاه بر اساس ( شواهد بالینی و آزمایشگاهی) بر پایه اطلاعات GIS طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۰ با توجه به راهنمای نقشه



نمودار ۱- وضعیت شیوع بیماری طاعون نشخوار کنندگان کوچک استان کرمانشاه به تفکیک سال بر اساس ( شواهد بالینی و آزمایشگاهی) بر پایه اطلاعات GIS طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۸  
\*توجه بیشترین پایش در ۱۳۹۳، کمترین تلفات در ۱۳۹۶ و بیشترین تلفات مربوط به ۱۳۹۰ گزارش شده است



نمودار ۲- گزارش موارد مثبت طاعون نشخوار کنندگان کوچک استان کرمانشاه بر اساس ( شواهد بالینی و آزمایشگاهی) بر پایه اطلاعات GIS طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۸ با توجه به درصد موارد ابتلا در هر سال

\* رخداد طاعون نشخوار کنندگان کوچک در کل استان کرمانشاه بین سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۸ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

\*\* بیشترین رخداد مربوط به سال ۱۳۹۶ (a) و کمترین آن در سال ۱۳۹۰ (b) گزارش شده بود

## بحث و نتیجه‌گیری

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) یک بیماری حاد نشخوارکنندگان کوچک است که سبب کاهش بازدهی و خسارات اقتصادی فراوان در بسیاری از کشورها می‌شود (۱۴). در ایران این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۷۳ و بعد از آن از اکثر نقاط ایران گزارش شده است (۱۵). مطالعات نشان می‌دهند درصد بالای آلودگی به علت وجود ویروس PPR به میزان گسترده‌ای در جمعیت‌های نشخوارکنندگان منطقه است و انتقال طبیعی ویروس در بین حیوانات مزرعه در مناطق روستایی را نشان می‌دهد (۱۶، ۱۷). خطر انتقال طاعون نشخوارکنندگان (PPR) در ارتباط با گونه، جنس، سن حیوانات و مهاجرت تأیید شده است (۱۸). همچنین سیستم پرورش ترکیبی دام‌ها، ورود حیوانات از مناطق مختلف به میادین محلی فروش دام، تماس نزدیک بین حیوانات آلوده و سالم، چرای گاوهای بدون نشانه‌های بیماری در مراتع در تماس نزدیک با گوسفندان و بزها از طرق مختلف انتقال ویروس است (۱۹، ۲۰). در بررسی‌های اپیدمیولوژی بیماری PPR در نشخوارکنندگان کوچک اهلی (گوسفند و بز) در پاکستان (۲۰۱۱) ۴۵/۵ درصد (۲۱)، هند (۲۰۰۸) ۲۶/۱۳ درصد (۲۲)، هند (۲۰۰۹) ۴۶/۰۱ درصد (۲۳)، تانزانیا (۲۰۱۱) ۵۶/۷ درصد (۲۴)، تبت (۲۰۰۹) ۲۹/۷۷ درصد (۲۵)، عربستان (۲۰۱۱) ۵۵/۹۵ درصد (۲۶)، کرمانشاه (۲۰۱۴) ۲۳/۳۳ درصد (۲۷)، ایلام (۲۰۰۶) ۳۰ درصد (۱۱) و اهواز (۲۰۱۹) ۵۸ درصد از نمونه‌های گوسفندان و بزهای بررسی شده (۲۸) مثبت گزارش شد. در این بررسی کانون‌های آلوده از سامانه سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) اداره کل دامپزشکی کرمانشاه (گزارش بروز بیماری، سن، جنس، گونه، وضعیت ظاهری دام، علائم بالینی مشخص، تعداد دام‌های

## بررسی اپیدمیولوژی بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک بر اساس سیستم ...

کله، تعداد دام‌های مبتلا، زمان ابتلای دام‌های بیمار و مشکوک با علائم بالینی بیماری) به دست آمد. گرچه بررسی‌های انجام شده بر روی تعداد معینی نمونه صورت گرفته است، اما تفاوت بین یافته‌های مختلف در مطالعات مشابه در مناطق مختلف علاوه بر روش‌های کنترل مدیریتی ممکن است ناشی از تفاوت در تعداد موارد بررسی، سن، شرایط جغرافیایی و فصل و سال بررسی باشد. این تحقیق یک مطالعه مقطعی توصیفی تحلیلی از کلیه پرونده‌های مربوط به این بیماری از سال ۱۳۹۰ لغایت ۱۳۹۸ بود. بررسی روند نه ساله وقوع بیماری نشان دهنده روند چند دامنه‌ای (واریانس ابتلا) از سال ۱۳۹۰ تا سال ۱۳۹۸ می‌باشد. آمار ارائه شده در شرایط اندمیک بر اساس علائم بالینی در دام‌ها (رویت نشانه‌های مشکوک به PPR) و نمونه‌گیری و ردیابی حضور ویروس (اخذ تایید چند نمونه آزمایشگاهی) به صورت تصادفی در منطقه و ارائه یک سیمای کلی از وضعیت بیماری PPR در استان بر اساس ثبت داده‌ها در سیستم GIS اداره کل دامپزشکی می‌باشد. بر این اساس در میزان ابتلا به بیماری به ترتیب در سال ۱۳۹۳ افزایش، در ۱۳۹۴ کاهش، در ۱۳۹۵ افزایش و در ۱۳۹۶ کاهش و در سال ۱۳۹۷ افزایش دیده می‌شود. این وضعیت مشخص کننده واریانس در کنترل بیماری است (جدول ۱). همچنین رخداد طاعون نشخوارکنندگان کوچک در کل جمعیت در استان کرمانشاه بین سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۸ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). بیشترین نسبت درصد سال به سال‌های دیگر مربوط به سال ۱۳۹۶ و کمترین آن در سال ۱۳۹۰ گزارش شده بود (نمودار ۱). افزایش عملیات واکسیناسیون، افزایش آگاهی دامداران و آشنا شدن کارشناسان به روش‌های صحیح مبارزه موجب کاهش روند بیماری می‌شود. به طوری که بسته به تعداد دام پایش شده و دریافت واکسن در

شناسنامه‌دار نبودن دام‌های منطقه، عدم ثبت تحرکات دامی و کنترل ورود و خروج دام‌های قاچاق، عدم ایمن‌سازی کامل و عدم سامان‌دهی دلان) بود. بنابراین به دلیل اندمیک بودن طاعون نشخوارکنندگان کوچک در ایران و منطقه، به واسطه تحمیل افزایش هزینه‌های بیماری، کاهش تولید و تأثیر منفی بر تجارت دامپروری، شناخت وضعیت گذشته و حال حاضر بیماری بر اساس یک سیستم کامل GIS، در هدایت هر چه بهتر منابع برای کنترل بهینه و پیشگیری از بروز بیماری در آینده ضروری است.

مطالعه حاضر اطلاعاتی پایه در خصوص رخداد بیماری آندمیک PPR در جمعیت نشخوارکنندگان استان کرمانشاه در منطقه غربی ایران در اختیار قرار می‌دهد. با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی وضعیت اپیدمیولوژی PPR در حیوانات اهلی در منطقه و مناطق جغرافیایی مختلف کشور با شرایط آب و هوایی متفاوت بر اساس سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) صورت نگرفته است، گزارش این مطالعه برای اولین بار انجام می‌گیرد. لذا نتایج این مطالعه در کمک به سیاست‌گذاران بهداشتی حوزه دام برای اتخاذ روش‌های کنترلی موجب شناخت بهتر اپیدمیولوژی از وضعیت شیوع بیماری PPR شده و به استراتژی اجرای برنامه واکسیناسیون و کنترل بیشتر کمک می‌نماید. همچنین دقت در ثبت کامل و جامع کدهای اپیدمیولوژیک سیستم GIS و توجه بیشتر به سیستم دائمی پایش لازم است.

سال، درصد ابتلای گله کاهش یافته است. وقوع ماهیانه بیماری بر اساس داده‌های پایش جغرافیایی نشان‌دهنده تک دامنه‌ای بودن روند بیماری در طول سال بوده و اوج کانون‌های بیماری در مواقعی بروز کرده که ظرفیت واحدهای پروار بندی استان تکمیل شده است. به عبارتی حضور بیشترین جمعیت دامی حساس در یک مقطع زمانی باعث شیوع بیماری شده است. این یافته‌ها متناسب با گزارش سازمان جهانی بیماری‌های واگیر دام OIE (افزایش کانون‌های بیماری در شرایط آب و هوای سرد و مرطوب به علت ماندگاری بیشتر ویروس) است. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهند، ظرفیت دامداری و ترکیب سنی جمعیت دامی هر واحد، بزرگی گله، چرا در مراتع مشترک (نشخوارکنندگان کوچک و گاوها)، عبور حیوانات از مرزهای روستایی نیز می‌تواند موجب افزایش استعداد گله برای ابتلا به بیماری باشد (۲۹). در بررسی نقشه‌های GIS و اطلاعات میدانی کارشناسان دامپزشکی کل استان نیز اصرار بر چرای مشترک و آزاد در منطقه از سوی دامداران بود. گرچه دامدارانی که به‌طور معمول دام‌های مورد نیاز خود را از مناطق پیرامون دامداری تهیه می‌کنند، با خطر کمتری در ابتلا به بیماری گله برخوردارند. یک دلیل آن می‌تواند به واسطه شناخت و اطلاع از سابقه دامداری‌های مبدأ باشد. در این رابطه نیز عدم توجه دامداران در بررسی‌های کارشناسی سازمان دامپزشکی مشهود است. از سوی دیگر از محدودیت‌های این مطالعه عدم وجود دقت در ثبت کامل و جامع سیستم GIS مربوط به کدهای اپیدمیولوژیک (حمل و نقل دام‌ها،

## References

1- Khan M A, Hussain S N, Bahadar S, A. Ali A, Shah A. out break of peste des petits ruminants (PPR) in goats in district Chitral, NWFP, Pakistan . *Agri Bio Sci*. 2008.

2- Parida J. Sero-prevalence Study of Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) in Small Ruminants in Tribal areas of OdishaJ. *Pub Health Epi*. 2015.

- 3- Abdallah A, Majok A, El Malik K, Ali A. Sero-prevalence of peste des petits ruminant's virus (PPRV) in small ruminants in Blue Nile, Gadaref and North Kordofan States of Sudan. *Pub Health Epi.* 2012; 4(3): 59-64.
- 4- Chauhan H, Chandel B, Kher H, Dadawala A, Agrawal S. Peste des petits ruminants virus infection in animals. *Vet World* .2009; 2(4).
- 5- Kul O, Atmaca H T, Munir M. Pathology of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants and concurrent infections. *Peste des Peti Rum Virus Springer.* 2015; 119-131.
- 6- Abubakar M, Ashiq S, Zahoor A B, Arshed M J, Banyard A C. Diagnosis and Control Strategies for Peste Des Petits Ruminants Virus: Global and Pakistan Perspectives. *Pakistan Vet.* 2011; 31(4).
- 7- Lembo T, Oura C, Parida S, Hoare R, Frost L, Fyumagwa R, et al. Peste des petits ruminants infection among cattle and wildlife in northern Tanzania. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(12): 20-37.
- 8- Gibbs EP. Virus diseases of food animals: a world geography of epidemiology and control. V. 1: Inter perspec Academic Press; 1981.
- 9- Constable P, Hinchcliff K, Done S, Grünberg W. Abomasal ulcers of cattle. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. *Vet Med, Elsevier.* 2017; 518-522.
- 10- Banyard A C, Parida S, Batten C, Oura C, Kwiatek O, Libeau G. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Gen Virol.* 2010; 91(12): 2885-2897.
- 11- Bazarghani T, Charkhkar S, Doroudi J Bani Hassan E. A review on peste des petits ruminants (PPR) with special reference to PPR in Iran. *Vet Med, Series B.* 2006; 53: 17-18. [In Persian]
- 12- Torsson E, Kgotlele T, Berg M, Mtui-Malamsha N, Swai E S, Wensman J J, et al. History and current status of peste des petits ruminants virus in Tanzania. *Infec ecology & epidemi.* 2016; 6(1): 32701.
- 13- Shaila M, Shamaki D, Forsyth M A, Diallo A, Goatley L, Kitching R, et al. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants viruses. *Virus research.* 1996; 43(2): 149-153.
- 14- Abraham G, Sintayehu A, Libeau G, Albina E, Roger F, Laekemariam Y, et al. Antibody seroprevalences against peste des petits ruminants (PPR) virus in camels, cattle, goats and sheep in Ethiopia. *Prevent vet Med.* 2005; 70(2): 51-57.
- 15- Barani S, G. Torabi G, Bahonar M. An investigation on ten years outbreak of PPR (Peste des petits ruminants). 15th Ir *Vet Congress.* 2008. [In Persian]
- 16- Balamurugan V, Krishnamoorthy P, Raju D, Rajak K, Bhanuprakash V, Pandey A, et al. Prevalence of Peste-des-petits-ruminant virus antibodies in cattle, buffaloes, sheep and goats in India. *Virus disease.* 2014; 25(1): 85-90.
- 17- Balamurugan V, Saravanan P, Sen A, Rajak K, Bhanuprakash V, Krishnamoorthy P, et al. Sero-epidemiological study of peste des petits ruminants in sheep and goats in India between 2003 and 2009. *Re Sci & Tech-OIE.* 2011; 30(3): 889.
- 18- Mahajan S, Agrawal R, Kumar M, Mohan A, Pande N. Risk of seroconversion to peste des petits ruminants (PPR) and its association with species, sex, age and migration. *Small rumi Re.* 2012; 104(1-3): 195-200.
- 19- Al-Majali A M, Hussain N O, Amarin N M, Majok A A. Seroprevalence of, and risk factors for, peste des petits ruminants in sheep and goats in Northern Jordan. *Prevent vet Med.* 2008; 85(1-2): 1-8.
- 20- Sarker S, Islam M H. Prevalence and risk factor assessment of Peste des petits ruminants in goats in Rajshahi, Bangladesh. *Vet world.* 2011; 4(12): 546.
- 21- Zahur A, Ullah A, Hussain M, Irshad H, Hameed A, Jahangir M, et al. Sero-epidemiology of peste des petits ruminants (PPR) in Pakistan. *Prevent Vet Med.* 2011; 102(1): 87-92.
- 22- Ingle V, Sivakumar P, Kalorey D, Pote D, DhamannaPatil P, Vanjari S. Seroprevalence of blue tongue and pestes des petits ruminants among goats in nagpur district of Vidarbha region. *Tamilnadu J Vet Anim Sci.* 2008; 4: 142-145.
- 23- Chavan V, Digraskar S, Dhonde S, Bedarkar S. Seromonitoring of Peste Des Petits ruminants (PPR) in goats (*Capra hircus*) of Parbhani region of maharashtra. *Vet World.* 2009; 2(8).
- 24- Matondo R, Muse E, Karimuribo E D, Misinzo G, Albano M O, Gitao G C. Clinicopathological findings of the 2011 outbreak of peste des petits ruminants (PPR) in Tandahimba district, southern Tanzania. *Sokoine Uni of Agri.* 2012.

25- Wang Z, Bao J, Wu X, Liu Y, Li L, Liu C, *et al.* Peste des petits ruminants virus in Tibet, China. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(2): 299.

26- Elshemey T, Mahmoud M. Seroprevalence of antibodies against peste des petits ruminants (PPR) virus in sheep and goat in Kingdom Saudia Arabia . *Vet Sci Tech.* 2011; 32(1): 175-182.

27- Foroughi A, Chaharacain B, Ownagh A, Mardani K. Comparison of c-ELISA and RT-PCR Methods in Detection of Peste Des Petits Ruminants in Early Stage from Clinical Specimens

in Goats and Sheep in Kermanshah Province. *Ex Ani Bio.* 2014; 1 (4): 51-56. [In Persian]

28- Rasooli A, Nouri M, Abad-Shapouri M, Khalafi E, Daghari M. Seroprevalence of peste des petits ruminants (PPR) virus infection in sheep and cattle in Ahvaz. *Vet Re.* 2019; 73(4). [In Persian]

29- Salih H A M, Elfadil A A M, Saeed I K, Ali Y H. Seroprevalence and risk factors of Peste des Petits Ruminants in sheep and goats in Sudan. *Advanced Vet & Ani Re.* 2014; 1(2): 42-49.

## Epidemiology of Peste des petits ruminants based on GIS; a case study in Kermanshah province, 2011-2019

Hamon Kurdistan<sup>1</sup>, Mehrdad Pooyan Mehr<sup>2\*</sup>, Ehsanollah Afshari Safavi<sup>3</sup>

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Iran.

2- Assistant Professor of Immunology, Department of Basic Sciences and Pathobiology, Department of Immunology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Iran.

3- Assistant Professor of Internal Medicine, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsy University, Mashhad, Iran.

Receive: January 31, 2022; Revise: April 27, 2022; Accept: May 28, 2022

### Summary

Peste des petits ruminants (PPR) is one of the most important infectious diseases of livestock. This disease is endemic in Iran. The aim of this study was to use GIS to help control PPR over an eight-year period in Kermanshah province. Reports of PPR disease in Kermanshah province were collected over a period of 2011-2019. Using ArcGIS 10.6 software, the provincial segments were identified. The total number of livestock infected, mortality and high risk centers were added to the descriptive table and It was connected to the province map using the Geographical Coordinate System. Data analysis was performed based on the difference between disease incidence points, incidence rates and areas of Kermanshah province using SSPS 18 software and Fisher chi-square test.: There was a significant difference in disease incidence in different parts of the province ( $P < 0.05$ ). In conflict and infection centers, the highest and lowest statistics were related to the western region with 39.4%, the central region with 35.9% and the eastern region with 24.6%, respectively. The highest and lowest casualties with 465 and 6 cases were related to 2012 and 2017. Due to the endemic nature of the disease in Iran, the results of this study in helping veterinary health policy makers in adopting control methods and better understanding of the epidemiology of the disease. Therefore, it is necessary to pay attention to the complete and comprehensive registration of the epidemiological codes of the GIS system and pay more attention to the monitoring system.

**Keywords:** *Epidemiology, GIS, Kermanshah, Peste des petits ruminants*

## ارزیابی تروپیسیم بافتی و بیماری‌زایی سه جدایه ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص

محمد اسلام پناه<sup>۱</sup>، نجمه معتمد<sup>۲\*</sup>، حمید شوشتری<sup>۳</sup>

- ۱- بخش پاتولوژی و اپیدمیولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۲- بخش تحقیق و تولید واکسن و فراورده‌های بیولوژیک طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۹ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۳ خرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۶ خرداد ۱۴۰۱

### چکیده

تحت تیپ H9N2 آنفلوانزای پرندگان جزو ویروس‌های مهم از نظر اقتصادی در صنعت طیور خاورمیانه بوده و در ایران نیز به صورت اندمیک شده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی تروپیسیم بافتی و بیماری‌زایی ۳ جدایه مختلف از ویروس H9N2 انجام شد. بدین منظور ۸۴ جوجه یک روزه SPF به طور تصادفی به چهار گروه مساوی (۲۱ جوجه در هر گروه) در ایزولاتورهای جداگانه با فشار هوای مثبت تقسیم شدند. جوجه‌های ۳۰ روزه در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ با EID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۶</sup> از سه ویروس H9N2 جدا شده در سال‌های مختلف از مرغداری‌های گوشتی ایران به روش چشمی-بینی تلقیح شدند، گروه چهارم به‌عنوان شاهد با مایع آلانتوئیک تلقیح شدند. در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ پس از تلقیح نمونه‌ها شامل سواب کلواکی، سواب حلقی-دهانی و بافت‌های مختلف جمع‌آوری شدند. از روش Real-time PCR برای شناسایی ویروس در نمونه‌های بافت و سواب استفاده شد. ویروس H9N2 در تمام بافت‌ها در روزهای ۲، ۴ و ۶ پس از تلقیح به استثنای کبد و تیموس شناسایی شد. حداکثر ضایعات هیستوپاتولوژیک نای، ریه، کبد، کلیه، طحال، لوزه سکوم و تیموس در روزهای ۲ تا ۸ مشاهده گردید. ضایعات در سایر بافت‌ها از جمله لوزه‌های سکومی و کلواک چندان برجسته نبود. در بررسی ایمنو‌هیستوشیمی، وجود آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا در سلول‌های اپیتلیال بافت‌های ریه، کلیه و روده در روزهای ۴ و ۶ پس از تلقیح مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده شدت بیماری‌زایی سه ویروس مورد مطالعه تقریباً مشابه، کم و فاقد تلفات با علائم خفیف تنفسی و دیرسیون بود. با این حال دیده شده که علی‌رغم بیماری‌زایی کم ویروس‌های H9N2 تظاهر علائم بالینی عفونت با این ویروس در گله‌های تجاری بسیار متغیر و بعضاً با تلفات و خسارات اقتصادی مهمی همراه است.

**واژگان کلیدی:** ویروس آنفلوانزای پرندگان، واکنش زنجیره پلی‌مرز در زمان واقعی، بیماری‌زایی، هیستوپاتولوژی، ایمنو‌هیستوشیمی

## مقدمه

از اوایل دهه ۱۹۹۰ ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 به یکی از شایع‌ترین ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در طیور در بسیاری از نقاط جهان مبدل شد. اگرچه این ویروس به‌عنوان ویروس‌های آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم طبقه‌بندی می‌شود و عموماً ممکن است باعث بیماری خفیف تا متوسط شود، اما گاهی با عوارض و مرگ و میر قابل‌توجهی در پرندگان حساس به‌ویژه در نتیجه عفونت‌های همزمان مانند اشریشیاکلی همراه است. علیرغم واکسیناسیون گسترده، این ویروس باعث خسارات اقتصادی مهمی در صنعت طیور می‌شود (۱). علاوه بر این، در سال ۱۹۹۸، ویروس H9N2 از کودکی با علائم آنفلوانزا در چین جدا شد که بیانگر ماهیت زئونوز بودن ویروس H9N2 و توانایی ویروس برای عبور از سد بین گونه‌ای است. این ویروس متعلق به خانواده Orthomyxoviridae است و بر اساس تفاوت آنتی‌ژنی بین ژن‌های نوکلئوپروتئین و ماتریکس به انواع A، B، C و اخیراً D طبقه‌بندی می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A که در پرندگان و برخی پستانداران و انسان بیماری‌زا هستند بر اساس دو گلیکوپروتئین سطحی به نام‌های هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) به تحت‌تیپ‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. در حال حاضر، ۱۶ تحت‌تیپ هماگلوتینین (H1-H16) و ۹ تحت‌تیپ نورآمینیداز (N1-N9) در پرندگان شناسایی شده‌است. دو تحت‌تیپ (H17، H18) از ویروس‌های آنفلوانزای A در خفاش‌ها در گواتمالا شناسایی شده‌اند (۲). ویروس‌های آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم (LPAI) حاوی آمینو اسید مونوبازیک (آرژنین) در محل برش هستند و فقط می‌توانند در بافت‌های تنفسی و دستگاه گوارش تکثیر شوند. بیماری‌زایی ویروس متغیر است و به وجود سایر عوامل بیماری‌زا و شرایط محیطی

بستگی دارد. گزارش‌های مختلفی در مورد شدت بیماری‌زایی H9N2 منتشر شده‌است (۳). در آسیای شرقی ویروس‌های H9N2 بدون هیچ بیماری قابل تشخیصی جدا شدند (۴) و ویروس کره‌ای H9N2 باعث بیش از ۳۰ درصد مرگ و میر و کاهش تولید تخم پس از آلودگی آزمایشی جوجه‌های SPF شد (۵). در مطالعات تجربی ایران و پاکستان، بیماری‌زایی H9N2 و مرگ و میر غیرعادی گزارش شده‌است (۶، ۷).

در مطالعه‌ای در کشور اردن سال ۲۰۰۸، ویروس H9N2 در جوجه‌های گوشتی بیشتری و شدیدتر از جوجه‌های SPF ضایعات در دستگاه تنفسی ایجاد کرده بود (۸). در حال حاضر اطلاعات زیادی در مورد بیماری‌زایی ویروس‌های H9N2 وجود ندارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی علائم بالینی، ضایعات کالبدگشایی، ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی سه ویروس H9N2 به دنبال تلقیح داخل چشمی بینی (Occulo-nasal) تحت شرایط کنترل شده در جوجه‌های SPF بود.

## مواد و روش کار

**ویروس:** سه جدایه ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2، A/ck/Iran/96/102/2016، A/ck/Iran/89/51/2010، A/ck/Iran/92/1/2013 جدا شده از طغیان‌های آنفلوانزا و در سال‌های متفاوت از مرغداری‌های صنعتی در ایران از آزمایشگاه تشخیص بیماری‌های پرندگان مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انتخاب شدند. بر اساس آنالیز مولکولی این جدایه‌ها همه متعلق به تحت تیپ H9N2 آسیایی بودند، در ادامه این ویروس‌ها به ترتیب به نام‌های: ایزوله ۹۶، ۹۲ و ۸۹ معرفی می‌گردند. سه جدایه انتخاب شده ابتدا در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF ۹ الی ۱۱ روزه تکثیر

از هر گروه به‌طور تصادفی آسان کشی شدند. پس از کالبدگشایی ضایعات ماکروسکوپیک ثبت و نمونه‌های بافتی شامل: نای، ریه، کلیه، تیموس، کبد، بورس فابریسیوس، طحال و لوزه سکومی از گروه‌های کنترل و آزمایش جمع‌آوری شد و هر بافت در دو قسمت یکی به منظور انجام تست‌های مولکولی و قسمت دوم در بافر فرمالین ۱۰ درصد و به جهت انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی فیکس شدند. تمام مراحل تحقیق مطابق با اصول کمیته نظارت بر اخلاق حیوانات و کمیته رفاه حیوانات مؤسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی انجام شد.

**آنالیز مولکولی:** از ۲۰۰ میکرولیتر از محیط سوآب و سوسپانسیون ۲۰ درصد نمونه‌های بافتی با کیت اسید نوکلئیک ویروسی با خلوص بالا RNA ویروس (روش، آلمان) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. RNA های ویروسی استخراج شده در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با آب عاری از RNase تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

توالی جفت پرایمر و پروب طراحی شده برای نواحی حفاظت شده HA2 ژن هم‌گلویتینین تحت تیپ (9) H9 که قبلاً گزارش شده در جدول ۱ ذکر شده اند.

شدند و برای تعیین EID50 آنها پس از تهیه رقت‌های سریالی  $10^{-1}$  الی  $10^{-9}$  از هر ویروس، ۰/۲ میلی‌لیتر از هر رقت به تخم‌مرغ جنین‌دار عاری از عوامل پاتوژن خاص ۹-۱۱ روزه تزریق و پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز با روش اسپیرمن کاربر (Spearman-Karber) ارزیابی شدند.

**طرح آزمایش:** هشتاد و چهار جوجه ۱ روزه سفید لگهورن عاری از عوامل پاتوژن خاص (SPF) (شرکت ونکیز، هند)، به طور تصادفی به چهار گروه (۲۱ جوجه در هر گروه) تقسیم و در ایزولاتورهای با فشار هوای مثبت جداگانه نگهداری شدند. در طول آزمایش دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. در سن ۳۰ روزگی جوجه‌های ۳ گروه با تیتراژ EID50  $10^6$  در ۱۰۰ میکرولیتر و به روش داخل چشمی - بینی از هر ایزوله H9N2 تلقیح شدند، گروه چهارم به‌عنوان کنترل منفی و شاهد با ۰/۱ میلی‌لیتر مایع آلتوتوئیک عاری از ویروس تلقیح شدند.

جوجه‌های هر گروه روزانه از نظر وجود علائم بالینی و یا تلفات احتمالی ارزیابی می‌شدند. در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ پس از تلقیح (dpi)، سوآب‌های حلقی-دهانی و کلوآکال برای آنالیز مولکولی جمع‌آوری شد و هر نوبت سه قطعه جوجه

جدول ۱- توالی جفت پرایمر و پروب طراحی شده برای آزمایش RT-PCR

Target	Primer/probe	Sequence (5' to 3')
HA2 H9	H9-Forward	CCTGCTAGATCAAGTAGAG
	H9-Reverse	GAGTTGAATCCCTATCTGCA
	H9 probe	FAM-CATAGCTGGATTCATAGAAGGAGGTT-TAMARA

استفاده شد (Hilden, Qiagen, آلمان). RT-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از (Corbett (RotorGene 3000، استرالیا) انجام شد. سیکل حرارتی RT-PCR به منظور تشخیص ژن H9 به شرح ذیل بود: ابتدا مرحله رونوشت‌برداری معکوس (RT) به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ چرخه دمایی شامل ۱۵ ثانیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد.

#### هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی: برای

بررسی هیستوپاتولوژیک، نای، ریه، تیموس، لوزه سکومی، بورس فابریسیوس، طحال، کبد و کلیه از هر جوجه جمع‌آوری و در بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. پس از پارافینه شدن بافت‌ها، قطعات بافتی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر بریده و با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند.

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی بر روی نمونه‌های ریه و کلیه انجام شد. برای تشخیص آنتی‌ژن ویروس، از کیت تشخیصی تجاری ایمونوهیستوشیمی (ABC) (HRP/DAB اختصاصی موش Abcam.ab64259، ایالات متحده آمریکا) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. پس از پارافین زدایی و هیدراتاسیون توسط زایلن/اتانول چند قطره پراکسید هیدروژن برای بلوک کردن پراکسید داخل بافتی اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد، ۲ بار در بافر (تریس فسفات سالین) TBS شسته شد. محلول بلوک پروتئین اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا از رنگ‌آمیزی غیر اختصاصی پس‌زمینه جلوگیری شود. مجدد لام‌ها ۲ بار در بافر TBS شسته شدند. احیا و بازیابی آنتی‌ژن در سیترات سدیم به مدت ۵ دقیقه و در مایکروویو انجام و سپس دو بار شستشو با TBS. آنتی‌بادی اولیه ضد نوکلئوپروتئین آنفولانزای تیپ A تهیه شده در موش (ab20343 [AA5H])

(abcam) اضافه و لام‌ها در طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۴ بار شستشو در بافر TBS. ایمنوگلوبولین جی (IgG) ضد موش بیوتینیل‌تهیه شده در بز به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از شستشو در بافر TBS استریپتاویدین پراکسیداز اضافه و ۱۰ دقیقه دیگر انکوبه شد. ۲۰ لاندا کروموژن DAB روی اسلایدها ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند پس از شستشو در بافر در نهایت از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین به‌عنوان counterstain و رنگ زمینه صورت گرفت.

#### نتایج

**علائم بالینی:** در جوجه‌های گروه شاهد و جوجه‌های تلقیح شده با ایزوله ۹۶ علائم بالینی مشاهده نشد، اما در جوجه‌های آلوده به ایزوله ۹۲ دپرسیون، خمودگی، تجمع اطراف منبع گرما و چرت زدن در روز دوم پس از تلقیح در یک جوجه مشاهده شد. در گروه ایزوله ۸۹ در روز چهارم پس از تلقیح، دپرسیون، خمودگی، چرت زدن در یک جوجه مشاهده شد.

**ضایعات کالبدگشایی:** تمام اندام‌های داخلی در گروه کنترل نرمال بود. در گروه تلقیح شده با ایزوله ۹۶، التهاب متوسطی در ریه یک جوجه مشاهده شد. هیپرمی و احتقان خفیف در پانکراس در یک جوجه در گروه ۹۲ مشاهده شد. در گروه ۸۹ ظاهر غیر طبیعی مشاهده نشد.

**نتایج مولکولی:** نمونه‌های گروه کنترل همگی از لحاظ ویروسی منفی بودند. نمونه‌های مثبت بین روز دوم تا روز هشتم پس از تلقیح مشاهده شد. نمونه‌های مثبت در روز چهارم یا ششم بیشتر از سایر زمان‌های نمونه‌برداری پس از تلقیح بود. بافت تیموس و کبد از نظر وجود ژنوم ویروس در بافت منفی بودند. (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- نتایج نمونه‌های سواب حلقی دهانی و کلوک در گروه‌های تلقیح شده با سه جدایه ویروس H9N2

روز پس از تلقیح	گروه	سواب حلقی دهانی		سواب کلوک		درصد نمونه مثبت (%)
		تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	
۲	۹۶	۲/۶	۳۳	۰/۶	۰	۰
	۹۲	۱/۶	۱۶	۰/۶	۰	۰
	۸۹	۲/۶	۳۳	۰/۶	۰	۰
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۴	۹۶	۴/۶	۶۶	۳/۶	۵۰	۵۰
	۹۲	۵/۶	۸۳	۵/۶	۸۳	۸۳
	۸۹	۴/۶	۶۶	۴/۶	۶۶	۶۶
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۶	۹۶	۱/۶	۱۶	۳/۶	۵۰	۵۰
	۹۲	۱/۶	۱۶	۳/۶	۵۰	۵۰
	۸۹	۲/۶	۳۳	۲/۶	۳۳	۳۳
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۸	۹۶	۰/۶	۰	۲/۶	۳۳	۳۳
	۹۲	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	۸۹	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۱۰	۹۶	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	۹۲	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	۸۹	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۱۲	۹۶	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	۹۲	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	۸۹	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰

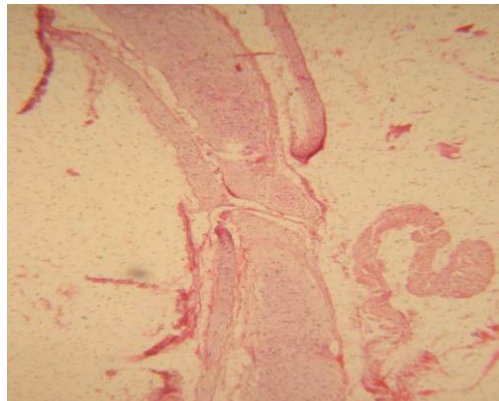
جدول ۳- نتایج مولکولی مقایسه‌ای بافت‌های نمونه‌گیری شده در جوجه‌های تلقیح شده با سه جدایه ویروس H9N2

گروه‌یافت	روز پس از تلقیح																								
	۲				۴				۶				۸				۱۰				۱۲				
	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	
نای	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ریه	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
بورس	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
کبد	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
طحال	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لوزه	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سکومی																									
تی‌موس	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## هیستوپاتولوژی

**نای:** نوع یافته‌های میکروسکوپی در جدایه‌های مورد مطالعه تقریباً مشابه بود، اما شدت و ماندگاری ضایعات بین جدایه‌ها تا حدودی متفاوت بود. یافته‌های میکروسکوپی در ایزوله ۹۶ شامل: پرخونی، احتقان، تخریب و کنده شدن اپیتلیوم و از بین رفتن مژک‌های تنفسی و ادم در روزهای ۲ و ۴

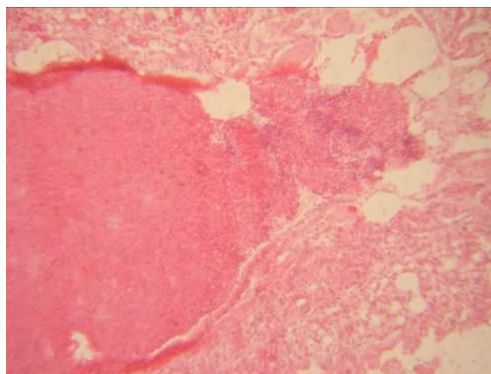
و کمی شدیدتر در روز ۶ بود. در روز ۸ شدت آن کاهش و در روزهای ۱۰ و ۱۲ فرایند بهبود آغاز شده بود. در ایزوله‌های ۹۲ و ۸۹ ضایعه از روز ۲ شروع شد و در روز ۴ کمی شدیدتر بود. در روز ۶ شدت ضایعات رو به کاهش بود که در روزهای ۸-۱۰ و ۱۲ همچنان کاهش داشت. (عکس ۱).



شکل ۱- نای: ۶ dpi، پرخونی، احتقان، لایه‌برداری، پوسته پوسته شدن، ریزش قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E × 100

**ریه:** ضایعات میکروسکوپی در برونش و بافت بینابینی ایجاد شده بود. ضایعات پایدار نبودند و ویژگی خاصی نداشتند. بین جدایه‌ها از نظر میزان و شدت ضایعات تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در ایزوله ۹۲ و ۹۶ پرخونی و احتقان کانونی در روزهای ۲ تا ۸ از جمله ترومبوزهای غیر عفونی مشاهده شد و در روز ۴ شدت ضایعات افزایش یافت و پرخونی

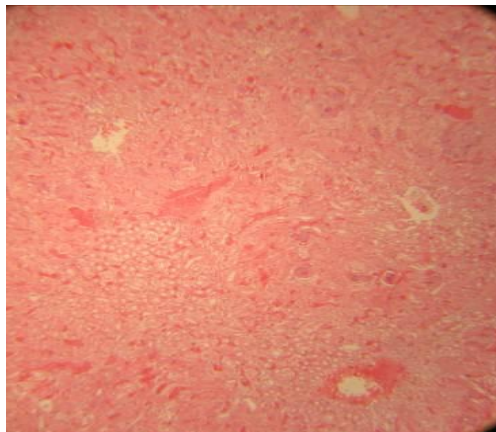
در نایژه‌ها در روز ۶ مشاهده شد. در ایزوله ۸۹، پرخونی و احتقان کانونی در روزهای ۲ تا ۴ شدیدتر و شامل ترومبوزهای غیر عفونی در روز ۶ و هیپرپلازی اپیتلیال در روز ۸ قابل مشاهده بود. در همه ایزوله‌ها، ضایعات دارای یک روند ثابت و کاهشی در روزهای ۱۰ و ۱۲ بودند (شکل ۲).



شکل ۲- ریه: ۴ dpi، احتقان در برونش‌ها، احتقان کانونی و ترومبوز غیر عفونی قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E × 100

انفیلتراسیون تک‌هسته‌ای متوسط و کانون‌های پراکنده ادم، خونریزی و پرخونی به طور متوسط قابل مشاهده بود. دژنراسیون متوسط تا شدید توبول‌ها و ادم اطراف گلومرول‌ها و بین لوله‌ها در روز ۶ مشاهده شد. از روز ۸ تا ۱۲، ارتشاح تک‌هسته‌ای متوسط و نکروز لوله‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۳).

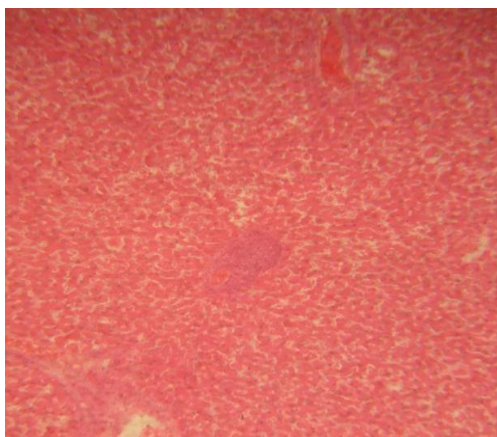
**کلیه:** ضایعات کلیه از روز ۴ پس از تلقیح در تمام ایزوله‌های مورد مطالعه، از جمله درگیری لوله‌ای و پارانشیمی رخ داد. از روز دوم، نفوذ خفیف سلول‌های تک‌هسته‌ای، کانون‌های پراکنده احتقان و پرخونی مشاهده شد. در روز چهارم از دست رفتن برخی گلومرول‌ها،



شکل ۳- کلیه: dpi ۴، فقدان مقداری گلومرول، انفیلتراسیون تک‌هسته‌ای متوسط و کانون‌های پراکنده ادم، خونریزی و پرخونی متوسط قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E  $\times 100$

شد. در روز ۸، دژنراسیون و نکروز اضافه شد. این روند در روزهای ۱۰ و ۱۲ با شیب نزولی ادامه یافت (شکل ۴).

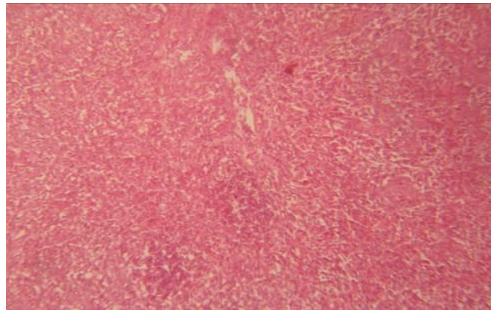
**کبد:** ارتشاح لنفوسیتی و ادم در روز دوم مشاهده شد. ادم، نکروز، پرخونی و خونریزی در روز ۴، ارتشاح لنفوسیتی با کمی شدت بیشتر و ادم و کانون‌های پرخونی و خونریزی در روز ۶ مشاهده



شکل ۴- کبد: dpi ۸، احتقان کانونی و ترومبوزهای غیر عفونی قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E  $\times 100$

خونی و احتقان خفیف در روز دوم مشاهده شد. در روز چهارم، تخلیه نسبی فولیکول های لنفاوی مشاهده شد. در روز هشتم پس از تلقیح، شدت ضایعات یکسان بود و همچنان رو به کاهش بود (شکل ۵).

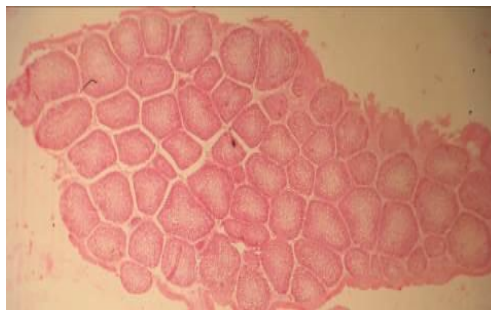
**طحال:** گروه ۹۶ پرخونی خفیف و کاهش جزئی در پالپ قرمز در روزهای دوم و چهارم نشان دادند. در روز ۶، ادم نسبی کاهش فولیکول های لنفاوی ادامه داشت. در روزهای دهم و دوازدهم به سمت بهبودی پیش رفت. در ۹۲ و ۸۹ جدایه، مشاهده پر



شکل ۵- طحال: dpi ۴، تخلیه نسبی فولیکول های لنفاوی، نواحی ادما تیک و پرخونی در سینوسوئیدها دیده می شود. رنگ آمیزی H&E × 400

روز ۴ که این تخریب فولیکول در روزهای ۶ و ۸، با شدت کمتر ادامه یافت (شکل ۶).

**بورس فابریسیوس:** یافته ها در هر سه جدایه تا حدودی مشابه بود و شامل: تخلیه نسبی سلول های لنفاوی در فولیکول ها در روز ۲ و ادامه تا حدی در



شکل ۶- بورس فابریسیوس: dpi ۴، تخلیه نسبی سلول های لنفاوی در فولیکول ها قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E × 40

پرزه ها در روز ۶، هیپرپلازی اپیتلیال در روز ۸، و در روزهای ۱۰ و ۱۲ روند بهبودی داشت (شکل ۷).

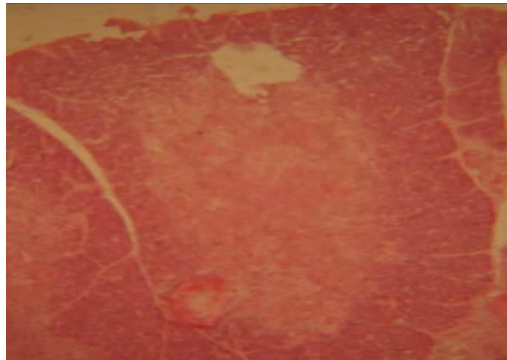
**لوزه های سکومی:** یافته ها شامل ادم زیر مخاطی و دژنراسیون پرزه ها در روز ۲ و ۴، جدا شدن



شکل ۷- لوزه های سکومی: هیپرپلازی اپیتلیال ۴ روز پس از تلقیح قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E × 40

تخلیه نسبی در روزهای ۴، ۶ و ۸ مشاهده شد که تا پایان مطالعه با روند کاهشی ادامه یافت. (شکل ۸).

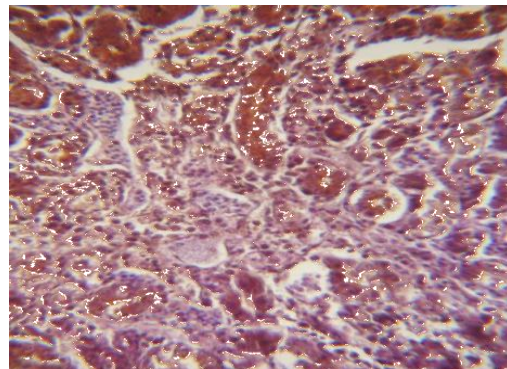
تیموس: کاهش متوسط فولیکولی و ادم کورتکس در روز دوم مشاهده شد. ادم، پرخونی و



شکل ۸- تیموس: ۴ dpi، ادم، پرخونی، تخلیه نسبی در قشر همراه با نکروز دیده می‌شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین  $\times 100$

اپی‌تلیال گلومرولی بافت کلیه و روده در روزهای ۴ و ۶ پس از تلقیح تأیید شد. (شکل ۹).

ایمونوهیستوشیمی: وجود آنتی‌ژن نوکلوکپسید ویروس آنفلوآنزای تیپ A توسط مشاهده رنگ قهوه‌ای در بافت ریه، سلول‌های



شکل ۹- کلیه: ۴ dpi، رنگ قهوه‌ای نشان‌دهنده آنتی‌ژن‌های نوکلئوپروتئین در سلول‌های اپیتلیال لوله‌های کلیه است. رنگ آمیزی  $\times 400$  IHC

جوجه‌های گوشتی گزارش شده است (۱۰). در دو گروه از سه گروه آزمایشی علائم افسردگی و چرت زدن دیده شد. در مورد کالبدگشایی، در ۴ روز پس از تلقیح، التهاب خفیف در ریه و پرخونی در پانکراس مشاهده شد.

در یک مطالعه، سیانوز در تاج و ریش در روز ۳ پس از تلقیح مشاهده شد. پرخونی در روده کوچک و تورم کلیه در روز ششم پس از تلقیح بیشترین

## بحث

بیماری‌زایی سه جدایه مشابه اما کاملاً یکسان نبود و در شروع علائم بالینی و هیستوپاتولوژیک و دفع ویروس بین جدایه‌های مورد مطالعه تفاوت جزئی وجود داشت، اما این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود.

تورم سر، ورم ملتحمه، افسردگی، ترشحات چشمی، کاهش مصرف غذا و آب، سرفه، عطسه و سینوزیت اطراف چشم در عفونت‌های H9N2 در

علائم کالبدگشایی بود (۱۱). گزارش شده است که تحت تیپ H9N2 تنها در دستگاه تنفسی تکثیر می‌شود (۱۲). با این وجود شناسایی ویروس در طحال، نای، ریه، تیموس، بورس فابریسیوس و لوزه‌های سکوم تا ۵ روز و از سوابع‌های کلواکال تا ۵-۷ روز پس از تلقیح هم دیده شده است (۱۳-۱۵) محققان عقیده دارند که منبع ویروس در مدفوع به دلیل تکثیر ویروس در کلیه‌ها است (۱۶)، هر چند برخلاف این ادعا گزارشی است که ویروس H9N2 قبل از جداسازی از کلیه‌ها از روز ۳ تا ۹ پس از تلقیح در مدفوع هم شناسایی شده بود (۱۰، ۱۷).

با استفاده از واکنش RT-PCR Real-time ژن H9 در سوابع‌های اوروفارنژیال از ۶-۲ روز پس از تلقیح، در حالی که ۴-۸ روز از سوابع‌های کلواکال شناسایی شد. طحال و لوزه‌های سکومی مانند سایر مطالعات تا ۸ روز دارای ویروس بودند (۱۱، ۱۷). ژن H9 در کبد و تیموس در مطالعه ما شناسایی نشد. نشان داده شد که ویروس‌های LPAI مانند H9N2 نمی‌توانند باعث ایجاد ویرمیما شوند، بنابراین فقدان ویروس H9N2 در بافت کبد، که قبلاً نشان داده شده بود منطقی به نظر می‌رسد (۱۰، ۱۱). با در نظر گرفتن مسیرهای ورود ویروس، سن گله، نوع نمونه، وضعیت ایمنی و نژاد جوجه‌های آلوده، مدت زمان جداسازی ویروس یا شناسایی ژنوم ویروسی از بافت‌ها یا سوابع‌های مختلف ممکن است متفاوت باشد (۱۵).

در سنجش IHC، حضور آنتی‌ژن‌های نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا (NP) نوع A در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های اپیتلیال بافت‌های ریه، کلیه و روده در روزهای ۴ و ۶ پس از تلقیح نشان داده شد. حضور آنتی‌ژن ویروسی H9N2 در ۲ و ۴ روز پس از عفونت از نای، ریه و سیتوپلاسم اپیتلیوم لوله‌های کلیوی نکروزه گزارش شده است (۱۱). تشخیص طولانی مدت آنتی‌ژن

نوکلئوپروتئین AI در نای و ریه از ۲ تا ۱۱ و کلیه‌ها از ۶ تا ۱۱ روز پس از عفونت H9N2 توسط هادی پور مشاهده شد (۱۸).

در بررسی‌های میکروسکوپ نوری، بیشتر ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک در نای و ریه‌ها به‌ویژه بین روزهای ۲ تا ۸ پس از تلقیح مشاهده شد. ضایعات ریوی به صورت پرخونی در برونش‌ها و خونریزی کانونی در بافت پارانشیم در روزهای ۲ تا ۸ از جمله ترومبوز غیر عفونی مشاهده شد. در سن ۲۰ روزگی در جوجه‌های ROSS، نای التهاب حاد همراه با ادم، پرخونی، دژنراسیون غدد مخاطی و ارتشاح هتروفیل دو روز پس از تلقیح مشاهده شد، سپس التهاب لنفوسیتی نای و ریه همراه با انفیلتراسیون لنفوسیتی مشاهده شد. هیپرپلازی اپیتلیال تا ۱۱ روز پس از تلقیح ویروس مشاهده شد (۱۸، ۱۹). پس از عفونت تجربی با ویروس‌های LPAI مانند H7N1، H7N2، H10N4، دپرسیون تنفسی و کنده شدن اپیتلیوم در روزهای ۲ تا ۸ پس از عفونت مشاهده شد، هیپرپلازی اپیتلیال ریه هم از روز ۶ مشاهده شد (۱۵).

در مطالعه حاضر تغییرات هیستوپاتولوژی در کلیه از روز ۲ تا ۸ پس از تلقیح مشاهده شد (۱۵، ۱۶، ۲۰). بر عکس، در مطالعه‌ای بر روی ویروس‌های H4N8 و H5N1 کم بیماری‌زا، مشخص شد که نکروزه در اپیتلیوم توبولار رخ نمی‌دهد، و لذا پیشنهاد شد که این ویروس‌ها ممکن است در کلیه طیور تکثیر نشوند (۱۴). به دلیل عدم شناسایی ویروس در بافت تیموس، تغییرات هیستوپاتولوژیک در بورس و تیموس ممکن است به دلیل پاسخ ایمنی میزبان (لنفوسیت‌های B و T) برای حذف آنتی‌ژن خارجی باشد (۱۵، ۲۱). مشاهدات ما در بافت‌های طحال شامل پرخونی خفیف، کاهش جزئی در پالپ قرمز، هیپرپلازی سلول‌های

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر بیماری‌زایی و تروپیسم بافتی ۳ ویروس H9N2 جدا شده در سال‌های مختلف از مرغداری‌های ایران را در جوجه‌های بدون پاتوژن خاص مدل‌سازی کردیم تا بررسی کنیم که آیا بیماری‌زایی متفاوتی دارند؟ در مطالعات تجربی متعدد که سعی در بازتولید تظاهرات بالینی ویروس در سطح مرغداری‌ها داشته‌اند، مرگ و میر و علائم تنفسی به ندرت مشاهده شده مگر این که با عفونت ثانویه ویروسی یا باکتریایی همراه شود. در تحقیق حاضر هم هیچ گونه تلفاتی در گروه‌های تجربی دیده نشد و ضایعات تنها محدود به دستگاه تنفس و گوارش بود احتمالاً علت ضایعات هیستوپاتولوژیک در بافت‌هایی مانند تیموس که ویروس در آن شناسایی نشده بود واکنش‌های التهابی/ایمونولوژیک میزبان باشد. دوره تشخیص و دفع ویروس بین ۲ تا ۸ روز پس از تلقیح بود که نشان‌دهنده زمان محدود و کوتاه برای دفع ویروس و پاک‌سازی ویروس از بافت‌ها بود. با توجه به گزارشات موجود در سال‌ها و یا از کشورهای مختلف به نظر می‌رسد ویروس‌های H9N2 علی‌رغم قرار گرفتن در دسته ویروس‌های آنفلوآنزا با بیماری‌زایی کم اما تظاهرات متفاوتی در مرغداری‌ها از نظر شدت بیماری و بروز علائم بالینی از خود نشان می‌دهند که بسته به سویه ویروس، سن گله، شرایط ایمنی و مسائل مدیریتی می‌تواند متغیر باشد هر چند که در نهایت تروپیسم این ویروس به دستگاه تنفسی و دستگاه گوارش محدود می‌شود.

### سپاسگزاری

نویسندگان مفتخرند از تمامی پرسنل بخش تشخیص بیماری طیور به خاطر کمک صمیمانه آنها در این تحقیق قدردانی کنند.

رتیکولواندوتلیال مشابه مطالعات دیگران بود (۱۸)، (۱۹). به نظر می‌رسد که اصطلاح بیماری‌زایی کم به تنهایی برای توصیف بیماری‌زایی ویروس H9N2 کافی نباشد، زیرا به نظر می‌رسد که تظاهر بالینی ایزوله‌های مختلف ویروس می‌تواند بسیار متفاوت باشد، اگرچه عواملی مانند مدیریت، عفونت‌های همزمان باکتریایی و ویروسی یا سرکوب‌کننده سیستم ایمنی. عوامل، سن، وضعیت ایمنی، سویه ویروس و نژاد مرغ می‌توانند از دلایل اصلی تفاوت‌های بیماری‌زایی در ایزوله‌های H9N2 باشند (۱، ۳، ۴، ۲۲). عفونت همزمان در شرایط مزرعه می‌تواند باعث تشدید بیماری و تظاهرات بسیار متفاوت از گزارشات تجربی شود. لذا در تفسیر نتایج و تعمیم آن به شرایط پرورش تجاری توجه به این نکته که آزمایش حاضر در شرایط کاملاً کنترل شده و در جوجه‌های SPF صورت گرفته و ممکن است همین جدایه‌ها در شرایط فیلدی به دلیل حضور عوامل پاتوژن ثانویه یا بیماری‌های سرکوبگر سیستم ایمنی با عوارض شدید و خسارات اقتصادی مشخص همراه باشند ضروری است. چنانچه که ویروس‌های مورد مطالعه همه از درگیری و طغیان‌های مشخص بالینی گله‌های تجاری جدا شده بودند. در خصوص تروپیسم این سه جدایه هر سه به بافت‌های گوارشی و تنفسی محدود بود که شاخصه بالینی ویروس‌های کم بیماری‌زا می‌باشد. تروپیسم غیر معمول برای ویروس‌های H9N2 توسط Bonfante و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است که یک ویروس H9N2 از دودمان G1 دارای تروپیسم برای اویداکت در مرغان تخم‌گذار بود. اگرچه شواهد آزمایشگاهی به وضوح توانایی ویروس‌های H9N2 را برای القای پاتولوژی در سطح مجرای تخمک نشان می‌دهد، تنها داده‌های کمی در مورد این نوع تروپیسم وجود دارد (۲۳).

## References

- 1- **Alexander DJ.** Report on Avian Influenza in the Eastern Hemisphere During 1997–2002. 2003;47 %. *J Avian Diseases*(s3): 792-7, 6.
- 2- **Kandeil A, Gomaa MR, Shehata MM, El Taweel AN, Mahmoud SH, Bagato O, et al.** Isolation and Characterization of a Distinct Influenza A Virus from Egyptian Bats. *Journal of virology.* 2019; 93(2): e01059-18.
- 3- **Capua I, Alexander DJ.** Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology.* 2004; 33(4): 393-404.
- 4- **Guo YJ, Krauss S, Senne DA, Mo IP, Lo KS, Xiong XP, et al.** Characterization of the Pathogenicity of Members of the Newly Established H9N2 Influenza Virus Lineages in Asia. *Virology.* 2000; 267(2): 279-88.
- 5- **Kim JA, Cho SH, Kim HS, Seo SH.** H9N2 influenza viruses isolated from poultry in Korean live bird markets continuously evolve and cause the severe clinical signs in layers. *Veterinary microbiology.* 2006; 118(3): 169-76.
- 6- **Naeem K, Ullah A, Manvell RJ, Alexander DJ.** Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. 1999; 145(19): 560-.
- 7- **Nili H, Asasi K.** Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathology.* 2002; 31(3): 247-52.
- 8- **Gharaibeh S.** Pathogenicity of an Avian Influenza Virus Serotype H9N2 in Chickens. 2008;52 %. *Avian Diseases*(1): 106-10, 5. [In Persian]
- 9- **Mirzaei SeyedGholamreza SH, Nouri Abbas.** Development and Evaluation of Real-Time RT-PCR Test for Quantitative and Qualitative Recognition of Current H9N2 Subtype Avian Influenza Viruses in Iran. *Archive of Razi Institute.* 2018; 73(3): 177-82. [In Persian]
- 10- **Mosleh N, Dadras H, Mohammadi A.** Evaluation of H9N2 avian influenza virus dissemination in various organs of experimentally infected broiler chickens using RT-PCR %. *Iranian Journal of Veterinary Research.* 2009; 10(1): 12-20. [In Persian]
- 11- **Riel Dv, Munster VJ, Wit Ed, Rimmelzwaan GF, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, et al.** H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. 2006; 312(5772): 399.
- 12- **Bano S, Naeem K, Malik S.** Evaluation of Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus Serotype H9N2 in Chickens. *Avian diseases.* 2003; 47: 817-22.
- 13- **Kwon J-S, Lee H-J, Lee D-H, Lee Y-J, Mo I-P, Nahm S-S, et al.** Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. *Virus Research.* 2008; 133(2): 187-94.
- 14- **Slemons RD, Swayne DE.** Nephrotropic Properties Demonstrated by A/Chicken/Alabama/75 (H4N8) Following Intravenous Challenge of Chickens. *Avian Diseases.* 1992; 36(4): 926-31.
- 15- **Swayne DE, Radin MJ, Hoepf TM, Slemons RD.** Acute Renal Failure as the Cause of Death in Chickens Following Intravenous Inoculation with Avian Influenza Virus A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8). *Avian Diseases.* 1994; 38(1): 151-7.
- 16- **Slemons RD, Swayne DE.** Replication of a Waterfowl-Origin Influenza Virus in the Kidney and Intestine of Chickens. *Avian Diseases.* 1990; 34(2): 277-84.
- 17- **Manjili S, Haghdoost I, Mortazavi P, Habibi H, Lashini H, Saberfar E.** Detection of H9N2 avian influenza virus in various organs of experimentally infected chickens. *African journal of microbiology research.* 2011; 5. [In Persian]
- 18- **Hadipour M.** Seroprevalence Survey of H9N2 Avian Influenza Virus in Backyard Chickens around the Caspian Sea in Iran. *Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular - REV BRAS CIR CARDIOVASC.* 2010; 12.
- 19- **Pazani J, Vasfi Marandi M, Ashrafihelan J, Marjanmehr S, Farid G.** Pathological Studies of A / Chicken / Tehran / ZMT - 173/99 (H9N2) Influenza Virus in Commercial Broiler Chickens of Iran. *International Journal of Poultry Science.* 2008; 7. [In Persian]
- 20- **Banani M MR, Pourbakhsh SA.** Simultaneous isolation of Ornithobacterium rhinotracheal and avian influenza virus subtype H9N2 from commercial poultry. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2002; 3(2): 190-5. [In Persian]
- 21- **Swayne DE, Slemons RD.** Comparative Pathology of a Chicken-origin and Two Duck-origin Influenza Virus Isolates in Chickens: The Effect of Route of Inoculation. *Veterinary Pathology.* 1994; 31(2): 237-45.

22- Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, Webster RG. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. *Virology*. 2007; 361(1): 45-55.

23- Bonfante F, Mazzetto E, Zanardello C,

Fortin A, Gobbo F, Maniero S, *et al.* A G1-lineage H9N2 virus with oviduct tropism causes chronic pathological changes in the infundibulum and a long-lasting drop in egg production. *Veterinary Research*. 2018; 49(1): 83.

## Assessment of parthenogenesis and tissue tropism of three H9N2 avian influenza virus isolates after experimental infection in Specific-Pathogen-Free chickens

Mohammad Eslampanah<sup>1</sup>, Najmeh Motamed<sup>2\*</sup>, Hamid Shoushtari<sup>3</sup>

1- Pathology department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and extension organization, Karaj, Iran.

2- Poultry vaccines research and production department , Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and extension organization, Karaj, Iran.

3- Poultry diseases research and diagnostic department , Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and extension organization, Karaj, Iran.

Receive: April 26, 2022; Revise: May 24, 2022; Accept: May 26, 2022

### Summary

Avian influenza virus (AIV) subtype H9N2 is one of the most important AIV in poultry around the world. An experiment was carried out for studying the pathogenicity of three H9N2 isolates. Eighty four one-day-old SPF chickens were divided randomly into “four groups (21 chicks per group)” in separate isolators with positive Air pressure. At the age of 30 days-old chickens in group 1,2, and 3 were inoculated with 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub> of three H9N2 isolates by oculo-nasal route, 4th group was kept as control and inoculated with mock allantoic fluid. Samples including oropharyngeal and cloacal swabs and various tissues were collected at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days post-inoculation (PI). The Real-time PCR assay was used for detection of the virus swab and tissue samples. In experiment groups, H9N2 AIV was detected from all examined tissues in 2, 4 and 6 dpi, exception was liver and thymus. Maximum histopathological lesions were seen from 2 till 8 dpi in trachea, lung, liver, kidney, spleen, cecal tonsil and thymus eventually. Lesions in other tissues including cecal tonsils, and cloaca was not significant. In immunohistochemical investigation, the presence of antigen in the epithelial cells of lung, kidney and intestinal tissues, was observed on 4 and 6 days post inoculation. Considering the fact that H9N2 viruses are of low pathogenicity but they show various clinical signs in commercial flocks. The results of this study showed that there was some pathogenic differences between three isolates but the differences were not significant.

**Key words:** Avian influenza virus, H9N2 subtypes, Immunohistochemistry, Real time RT-PCR, SPF chicken

## بررسی شیوع بابزیا کنیس در سگ‌های شهری و اهلی شهر اصفهان

سید رضا حسینی<sup>۱\*</sup>، میلاد حمزه علی طهرانی<sup>۲</sup>، مینو پرتوی نصر<sup>۳</sup>

- ۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
- ۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
- ۳- گروه بیولوژی مولکولی، آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی مینا، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ اسفند ۱۴۰۰، بازنگری: ۴ اردیبهشت ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۱

### چکیده

بازریویزیس می‌تواند میزبان‌های مهره‌دار گوناگونی شامل حیوانات اهلی و وحشی و انسان را آلوده نماید. این انگل، تک‌یاخته داخل سلولی بوده که در داخل گلبول‌های قرمز خون یافت می‌شود و به‌وسیله کنه‌های خانواده ایکسودیپه به میزبان‌های حساس انتقال می‌یابد. با بررسی ۲۰۰ نمونه خون اخذ شده از دو جمعیت ۱۰۰ قلاده از سگ‌های شهری و اهلی شهر اصفهان و با استفاده از روش‌های معمول انگل‌شناسی و استفاده از روش مولکولی (PCR) جهت تایید قطعی حضور تک‌یاخته بابزیا در خون حیوانات مذکور اقدام شد سپس نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون مربع کای ( $X^2$ ) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در نمونه‌های مورد مطالعه در روش مولکولی از سگ‌های صاحب‌دار ۲۱/۱۰ درصد و ۳۹/۲۰ درصد در سگ‌های شهری مشاهده شد که با مقایسه روش مشاهده میکروسکوپی که در سگ‌های صاحب‌دار ۱۳/۶ درصد و در سگ‌های شهری ۱۷/۹ درصد مشاهده گردید. این میزان بیانگر شیوع پایین‌تر انگل در سگ‌های صاحب‌دار نسبت به سگ‌های شهری در شهر اصفهان می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بابزیا کنیس در سگ‌های بدون صاحب شهر اصفهان دارای شیوع بالاتری بوده و با توجه به توان بالقوه این سگ‌ها و وفور ناقلین بندپا در اشاعه این بیماری، این موضوع نیازمند توجه بیشتر مسئولین نسبت به جمع‌آوری و ساماندهی حیوانات شهری بیش از گذشته می‌باشد.

کلمات کلیدی: اصفهان، بابزیا کنیس، سگ اهلی، سگ شهری، عفونت انگلی

## مقدمه

بایزیویس (پیروپلاسمازیس) به وسیله گونه‌های مختلف *بازیبا* ایجاد می‌شود و می‌تواند میزبان‌های مهره‌دار گوناگونی شامل حیوانات اهلی و وحشی و انسان را آلوده نماید. این انگل، تک‌یاخته داخل سلولی بوده که در داخل گلبول‌های قرمز خون یافت می‌شود و به وسیله کنه‌های خانواده ایکسودیپه به میزبان‌های حساس انتقال می‌یابد. از ویژگی‌های این بیماری لیز گسترده گلبول‌های قرمز است که در نهایت منجر به کم‌خونی، زردی، هموگلوبینوری و نهایتاً مرگ می‌شود. *بازیبا* در سگ‌ها نیز موجب کم‌خونی همولیتیک می‌شود. دو گونه *بازیبا کنیس* و *بازیبا گیسونی* باعث آلودگی در سگ‌های اهلی و وحشی می‌گردند. *بازیبا کنیس* بر خلاف *بازیبا گیسونی* جزء *بازیبا*های بزرگ بوده و اغلب در توله سگ‌ها ایجاد عفونت می‌کند، با توجه به شیوع قابل توجه انگل *بازیبا* در سگ‌های مورد مطالعه در ایران و نیز وجود ناقلین آن، نیاز به مطالعات مختلف برای کنترل و مبارزه با کنه جهت جلوگیری از گسترش بیماری در بین جمعیت سگ‌ها ضروری است (۸).

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌گیری:** جهت انجام مطالعه حاضر در طی بازه زمانی فروردین تا شهریور سال ۱۴۰۰ نسبت به نمونه‌گیری از سگ‌های اهلی مراجعه کننده به درمانگاه‌های دام کوچک شهر اصفهان و همچنین پناهگاه‌های نگهداری از سگ‌های بی‌سرپرست شهر اصفهان اقدام شد، تهیه نمونه با اخذ دو میلی‌لیتر از خون عروق سفالیک و نگهداری در لوله‌های ضد انعقاد واجد EDTA استریل مخصوص هماتولوژی با درج مشخصات حیوان اعم از سن و جنسیت اقدام گردید و سپس نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه مرجع جهت انجام آزمایشات انگل‌شناسی و تشخیص مولکولی ارسال گردید.

## بررسی‌های مورفولوژیکی: پس از اخذ

نمونه‌های ارسال شده ابتدا نسبت به تهیه گسترش نازک خون بر روی لام و رنگ‌آمیزی استاندارد با روش گیمسا اقدام شد و سپس گسترش‌های تهیه شده با استفاده از بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون و با کمک میکروسکوپ چشمی ( Nikon Japan - YS2) مورد بررسی قرار گرفت، مطابق با کلیدهای تشخیصی انگل‌شناسی در مورد تک‌یاخته *بازیبا کنیس*، این تک‌یاخته واجد اندازه ۵،۴ میکرون و گرد تا گلابی شکل و انگل داخل سلولی (داخل گلبول‌های قرمز خون) بوده که با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های استاندارد قابل تشخیص می‌باشد (۷، ۱۲).

**استخراج DNA** برای استخراج DNA.

نمونه‌های خون اخذ شده ابتدا از فریزر ۲۱- درجه سانتی‌گراد خارج شده و برای استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تمام DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز PCR** برای انجام

واکنش PCR از پرایمرهای PIRO - A1 (Forward) و PIRO - B (Reverse) که توانایی تکثیر ژنوم ریبوزومی (18 S rRNA Gene) در تک‌یاخته *بازیبا کنیس* را دارد (ثبت شده در بانک جهانی ژن) و منجر به تولید محصول PCR به طول ۴۵۰ جفت باز می‌شود استفاده شد (جدول و تصویر شماره ۱). حجم کلی محصول PCR برابر با 50  $\mu$ l بوده و شامل One Time PCR Buffer، 4  $\mu$ l Genomic DNA، 1.5 U Taq Polymerase (Ampliqon, Denmark)، 30 pmol of each primer (Metabion, Korea) 100  $\mu$ M of each dATP, dTTP, dCTP, dGTP 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Ampliqon, Denmark) و می‌باشد (۲۰). جهت PCR نمونه‌ها از دستگاه

مدت ۵ دقیقه انجام گردید. از نمونه‌های بدون DNA ژنومی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE \* 0.5 آنالیز و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و در دستگاه UV illuminator مشاهده شد (۲).

ترموسایکلر اتوماتیک (SimpliAmp, USA) استفاده شد. برنامه PCR جهت تکثیر ژن شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

Name of reactions	Name of Primer & Accession no of Corresponding gene	Nucleotide sequence (5' - 3')	PCR product
PCR for all samples	PIRO-A1 PIRO-B	AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC TTAAATACGAATGCCCCAAC	450 bp

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای تکثیر ناحیه 18 S rRNA Gene

301 TTGGCCTACC GAGGCAGCAA CGGGTAACGG GGAATTAGGG TTCGATTCCG GAGAGGGAGC  
361 CTGAGAGACG GCTACCACAT CTAAGGAAGG CAGCAGGCGC GCAAATTACC CAATCCCGAC  
421 ACGGGGAGGT AGTGACAAGA AATAACAATA CAGGGCTAAT GTCTTGTAAT TGGAATGATG  
481 GTGACTTAAA CCCTCACCAG AGTAGCAATT GGAGGGCAAG TCTGGTGCCA GCAGCCGCGG  
541 TAATCCAGC TCCAATAGCG TATATTAAC TTGTTGCAGT TAAAAAGCTC GTAGTTGTAT  
601 TTTTGTGGTGG CGGTTTGTG CCTTGTGGC TIGATTCCGC TTGGCTTTTG GCTTTTGGC  
661 TTATTACTTT GAGAAAATTA GAGTGTTCAGC AGCAGACTTT TGTCTTGAAT ACTGTAGCAT  
721 GGAATAATAG AGTAGGACTT TGGTCTATT TTGTTGGTTT GGGAACCTTG GGTAATGGTT  
781 ANTAGGAACG GTTGGGGGCA TTCGTATTTA ACTGTCAGAG GTGAAATCT TAGATTTGTT

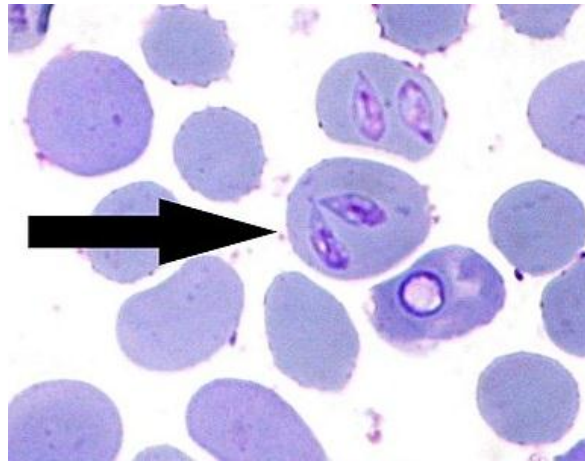
شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی قطعه مورد نظر برای تکثیر ناحیه 18 S rRNA Gene

نتایج بررسی شاخص‌های ریخت‌شناسی و مورفومتریک نمونه‌های اخذ شده شامل ۱۳/۶ درصد آلودگی در سگ‌های اهلی و ۱۷/۹ درصد آلودگی در سگ‌های بدون صاحب شهری مشاهده شد که بیانگر آلودگی نسبتاً پایین به این انگل با توجه به روش آزمایش (انگل‌شناسی) بود (شکل ۳).

**تجزیه و تحلیل آماری:** نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با کمک آزمون مربع کای ( $X^2$ ) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت، سطح معنی‌دار بودن تحقیق ( $P < 0.05$ ) بود که نشان از معنی‌دار بودن تحقیق دارد.

## نتایج

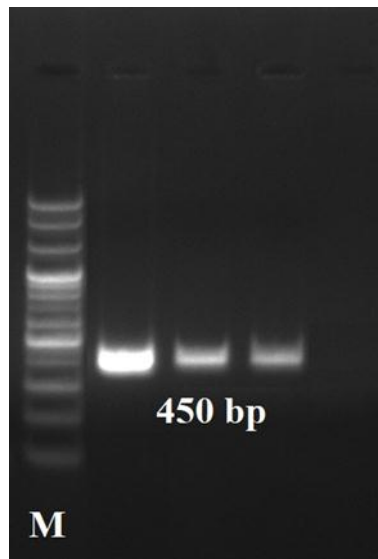
نتایج بررسی ریخت‌شناسی بازیا کنیس:



شکل ۳- تک‌یاخته *بازریا کنیس* داخل گلبول قرمز خون سگ

واکنش PCR با پرایمرهای ذکر شده، ۴۵۰ جفت باز بوده و تمامی نمونه‌های کنترل مثبت انتخاب شده قابل تکثیر با پرایمرهای مذکور بودند. (شکل ۲).

**نتایج مولکولی (نتایج بررسی مولکولی *DNA* استخراج شده از *بازریا کنیس*):** اندازه قطعه تکثیر شده (18 S rRNA Gene) بعد از انجام



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR

تک‌یاخته *بازریا* در خون حیوانات مذکور اقدام شد، نتایج حاصل شده شامل ۲۱/۱۰ درصد آلودگی در سگ‌های اهلی و ۳۹/۲۰ درصد آلودگی در سگ‌های بدون صاحب شهری بود. (جدول شماره ۲).

**نتیجه واکنش PCR:** با بررسی ۲۰۰ نمونه خون اخذ شده از دو جمعیت ۱۰۰ قلاده از سگ‌های شهری و اهلی شهر اصفهان و با استفاده از روش مولکولی (PCR) جهت تکثیر و تأیید قطعی حضور

درصد آلودگی در جمعیت سگ‌ها	سگ‌های شهری	سگ‌های صاحب‌دار
روش مشاهده میکروسکوپی	۱۳/۶	۱۷/۹
روش مولکولی	۲۱/۱	۳۹/۲

جدول ۲- درصد شیوع انگل بابزیا کنیس در جمعیت مورد مطالعه

## بحث و نتیجه‌گیری

تا به امروز روش میکروسکوپی ساده‌ترین و در دسترس‌ترین و همچنین ارزان‌ترین روش موجود در تشخیص بابزیا بوده است. حساسیت این روش در موارد حاد و در طول دوره پارازیتی بسیار بالا می‌باشد ولی در موارد مزمن میزان پارازیتی بسیار پایین بوده و یا متناوب می‌باشد که این مورد باعث مشکل در تشخیص به موقع این بیماری می‌شود (۴). امروزه با پیشرفت روش‌های مولکولی (PCR) حساسیت و ویژگی در تشخیص بسیاری از ارگانیزم‌های عفونی افزایش یافته است و می‌توان با استفاده از این ابزار به راحتی وجود یا عدم وجود بیماری را نشان داد. این روش‌ها را می‌توان در مطالعات اپیدمیولوژیک و فیلوژنی نیز به کار گرفت. در این مطالعه با استفاده از ناحیه ژنی 18 S rRNA Gene که یک ناحیه به شدت حفاظت شده است، حضور یا عدم حضور این انگل بررسی شد (۱۱). تاکنون مطالعات مختلفی در جهت بررسی مولکولی بابزیا کنیس در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است و وجه مشترک اکثریت غریب به اتفاق این مطالعات استفاده از ژن‌های ریبوزومی بوده است. دلیل استفاده از این ژن‌ها ثبات و حفاظت شده بودن این ناحیه ژنی است و هر نوع تفاوت در این ژن‌ها را می‌توان به منزله تفاوت تبارشناسی در نظر گرفت، وجه مشترک تمامی این مطالعات میزان شیوع کم این انگل می‌باشد. تفاوت میان میزان شیوع در شهرهای مختلف می‌تواند به دلیل فاکتورهای اپیدمیولوژیک باشد. مهم‌ترین فاکتور در

این زمینه توزیع جغرافیایی کنه‌های ناقل می‌باشد که با توجه به شرایط اقلیمی متفاوت در ایران، تفاوت در میزان شیوع امری طبیعی می‌باشد. در مطالعه راضی جلالی و همکاران (۲۰۱۳) با عنوان بررسی عفونت بابزیا در سگ‌های شهری و روستایی شهرستان اهواز، با مطالعه ۲۰۰ قلاده سگ شهری ۳/۷۵ درصد و در سگ‌های روستایی ۵/۵ درصد آلودگی به بابزیا کنیس گزارش شده بود (۱۳). در مطالعه اختردانش و همکاران (۲۰۱۶) تحت عنوان تشخیص مولکولی گونه‌های بابزیا در سگ‌های آلوده به کنه در جنوب شرقی ایران از مجموع ۲۸۴ سگ مورد بررسی شیوع مولکولی ۵ درصد گزارش شده است (۱). در مطالعه Iatta و همکاران (۲۰۲۱) با هدف مطالعه پاتوژن‌های ناقل در سگ‌های مناطق مختلف ایران و پاکستان، از مجموع ۴۰۳ سگ مورد بررسی تنها ۱ درصد آلودگی به این انگل در مناطق بررسی شده گزارش گردیده است (۹). در مطالعه حبیبی و همکاران (۲۰۱۹) تحت عنوان شناسایی خصوصیات مولکولی بابزیا کنیس و جلی و تیلریا آنولاتا در سگ‌ها و کنه‌های آزاد شهرستان شهریار استان تهران، ۲۵ درصد آلودگی به بابزیا کنیس و جلی در کنه‌های جمع‌آوری شده در منطقه مذکور مشاهده شده است (۶). در مطالعه دلیمی و همکاران (۲۰۱۹) با عنوان بررسی مولکولی لیشمانیوز احشایی و بابزیوز در سگ‌های اهلی مشکین شهر استان اردبیل از مجموع ۱۴۸ سگ مورد بررسی هیچ‌گونه آلودگی گزارش نشده است (۳). در مطالعه خان‌محمد و همکاران (۲۰۲۱) با عنوان شناسایی

لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (جدول شماره ۲) که دلیل اصلی و عمده درمان ضد انگل‌های خارجی به صورت دوره‌ای در سگ‌های اهلی و عدم ارتباط آنها با سگ‌های بدون صاحب و سایر سگ‌های اهلی می‌باشد هرچند قرار گرفتن سگ‌ها در محیط‌هایی از قبیل پارک‌ها که سگ‌های ولگرد و یا سگ‌های صاحب‌دار دیگر در آن رفت و آمد دارند، احتمال آلودگی را افزایش می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان *Babesia canis* در سگ‌های بدون صاحب شهر اصفهان دارای شیوع بالاتری بوده و با توجه به توان بالقوه این سگ‌ها و وفور ناقلین بندپا در اشاعه این بیماری، این موضوع نیازمند توجه بیشتر مسئولین نسبت به جمع‌آوری و ساماندهی حیوانات شهری بیش از گذشته می‌باشد.

مولکولی و تعیین ژنوتیپ *Babesia canis* در سگ‌های شهرستان مشکین شهر، شمال غرب ایران، از مجموع ۴۳ نمونه مورد بررسی شیوع ۹/۳ درصد به تک‌یاخته *Babesia canis* دیده شده است (۱۰). در مطالعه قاسم‌زاده و همکاران (۲۰۲۲) تحت عنوان شناسایی مولکولی ژنوتیپ A در *Babesia canis* یک سگ، توانستند در نمونه‌های مورد بررسی جدایه ژنوتیپ A *Babesia canis* را با کمک ژنوتایپینگ توصیف نمایند (۵). در مطالعه Badwi و همکاران (۲۰۲۰) تحت عنوان شناسایی مولکولی *Babesia canis* در سگ‌های استان بغداد کشور عراق، با بررسی ۳۱۰ سگ مورد بررسی شیوع ۵/۱ درصد گزارش گردید (۲). در مطالعه حاضر میزان شیوع انگل در سگ‌های اهلی ۲۱/۱۰ درصد و در سگ‌های بدون صاحب شهری ۳۹/۲۰ درصد تعیین گردید که از

## References

- 1- Akhtardaneshi B, Saberi M, Nurollahifard SR, Aghazamani M. Molecular Detection of *Babesia* spp. In Tick Infested Dogs in Southeastern Iran. *Journal of Disease and Global Health*. 2016; 8(2): 72-77. [In Persian]
- 2- Badawi NM, Yousif AA. *Babesia canis* spp. in dogs in Baghdad Province, Iraq: First molecular identification and clinical and epidemiological study. *Veterinary World*. 2020; 13(3): 579-585.
- 3- Dalimi AH, Mohammadiha A, Mohammadnajar M. A Molecular Study on Visceral Leishmaniasis and Babesiosis in Domestic Dogs of Meshkinshahr, Ardabil Province. *Pathobiology Research*. 2019; 22(2):91-95.
- 4- Fathipour V, Esmailnejad B, Habibi Gh, Afshari A, Tavassoli M, Asri Rezaei S, et al. *Babesia canis* caused clinical babesiosis in a female Shih Tzu dog. *Veterinary Research Forum*. 2021; 12 (4) 519-522. [In Persian]
- 5- Ghasemzade M, Esmailnejad B, Asri Rezaei S, Hadian M. Molecular identification of *Babesia canis canis* genotype A in a dog from Iran. *VetMed Sci*. 2022; 8:21-25. [In Persian]
- 6- Habibi Gh, Imani A, Afshari A, Bozorgi S. Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* and *Theileria annulata* in Free-Ranging Dogs and Ticks from Shahriar County, Tehran Province, Iran. *Iran J Parasitol*. 2019; 15(3): 321-331. [In Persian]
- 7- Hashempoor F. Principles and Methods of Laboratory Veterinary Parasitology. *Lorestan: Marz Danesh Press*. 2015: 33-43.
- 8- Heidari H, Sadeghi MR, Gharekhani J. Parasitology & Veterinary Parasitic Disease. *Hamedan: University of Bo-Ali Sina Press*. 2009: 159-160.
- 9- Iatta R, Sazmand A, Nguyen V, Nemati F, Mazhar Ayaz M, Bahiraei Z, et al. Vector-borne pathogens in dogs of different regions of Iran and Pakistan. *Parasitology Research*. 2021; 120: 4219-4228.
- 10- Khanmohammad M, Zolfaghari Emameh R, Arshadi M, Razmjou E, Karimi P. Molecular Identification and Genotyping of *Babesia canis* in Dogs from Meshkin Shahr County, Northwestern Iran. *J Arthropod-Borne Dis*. 2021; 15(1): 97-107. [In Persian]
- 11- Panait, L.C., Hrazdilová, K., Ionică, A.M., Deak, G., Chi samera, G.B., Adam, C, et al. *Babesia pisicii* n. sp. And *Babesia canis* Infect European Wild Cats, *Felis silvestris*, in Romania. *Microorganisms*. 2021; 9(7): 1474.

12- Razavi M, Rajabloo M, Shayegh H. Veterinary Clinical Parasitology. 8<sup>th</sup> ed. Shiraz: University of Shiraz Press. 2016: 1-52.

13- Razi jalali MH, Mosallanejad B, Avizeh

R, Alborzi AR, Hamidi Nejat H, Taghipour R. Babesia infection in urban and rural dogs in Ahvaz district, Southwest of Iran. Archives of Razi Institute. 2013; 68(1): 37-42. [In Persian]

## Prevalence of *Babesia canis* in urban and domestic dogs in Isfahan

Seyed Reza Hosseini<sup>1\*</sup>, Milad HamzehAli Tehrani<sup>2</sup>, Minoo Partovi Nasr<sup>3</sup>

1- Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

2- Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of Molecular Biology, Mabna Veterinary Laboratory, Karaj, Iran.

Receive: March 9, 2022; Revise: April 24, 2022; Accept: May 21, 2022

### Summary

---

Babesiosis is caused by different species of babesiosis. It can infect a variety of vertebrate hosts, including domestic and wild animals and humans. The parasite is an intracellular monocyte found inside red blood cells. It is transmitted to sensitive hosts by ticks in the oxidized family. This disease is characterized by extensive lysis of red blood cells, which leads to anemia, jaundice, hemoglobinuria, and eventually death. In this work, 200 blood samples were examined taken from two populations of 100 urban and domestic dogs in Isfahan using common parasitological methods and molecular method (PCR) to amplify and confirm the presence of *Babesia* protozoa in the blood of these animals. The results were then statistically analyzed using SPSS software V.16 and the chi-square test (X<sup>2</sup>). In the samples obtained from pet dogs, a molecular prevalence of 21/10% was observed in urban dogs compared to 39/20%. It was reported by comparing the observational method of parasitology 13/6% and 17/9%, in domestic and urban dogs, respectively. This indicates the low prevalence of this parasite is in domestic dogs compared to the urban dogs in Isfahan. The results of the present study showed that *Babesia canis* has a higher prevalence in stray dogs in Isfahan. Owing to the potential of these dogs and the abundance of arthropod carriers in the spread of this disease, this issue should be further considered by officials to collect and organize. Urban animals are increasing than ever before.

**Key words:** *Babesia canis*, Domestic Dog, Isfahan, Parasitic Infection, Urban Dog

## بررسی انتروکولیت سالمونلایی در باشگاه‌های اسب استان کرمانشاه

زهرا مینوش سیاوش حقیقی<sup>۱\*</sup>، سید حسین مؤدب<sup>۲</sup>

۱- استادیار، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۲- متخصص داخلی دام‌های بزرگ، کرمانشاه، ایران.

دریافت مقاله: ۳۱ تیر ۱۴۰۱، بازنگری: ۷ مرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱۰ شهریور ۱۴۰۱

### چکیده

از تعداد ۵۹ راس اسب دارای علائم اسهال و کولیک در یک بازه زمانی نه ساله (۱۳۹۹-۱۳۹۰)، ۵۴ درصد تلف شده و مابقی زنده ماندند. ۳۰ درصد حیوانات مبتلا در محتویات رفلاکس معدی-بینی (۲ مورد)، مدفوع (۹ مورد) و محتویات روده هنگام کالبدگشایی (۷ مورد)، باکتری سالمونلا جدا گردید. در معاینه بالینی قبل از انجام درمان، علائم دپرفشن، تاکی‌کاردی، تاکی‌پنه، احتقان عروق مخاطی، افزایش CRT، تب، هیپوترمی، اسهال، اسهال خونی، دل‌درد، رفلاکس بینی-معدی، ایلئوس، کاهش حرکات روده، اتساع روده‌ها در معاینه رکتال، مشاهده شد. در بررسی کالبدگشایی ۲۰ رأس اسب مبتلا، اتساع شدید معده، اتساع شدید سکوم و کولون، خونریزی‌های پتشی و اکیموز سطوح سرورزی و مخاطی روده باریک و کولون، کلیه‌های کم‌رنگ و بزرگ، غدد آدرنال پر خون، مورد توجه قرار گرفت. در بررسی میکروسکوپی، بیشترین ضایعات در سکوم و کولون به‌صورت ادم وسیع لایه پارین و زیر مخاط، ترومبوس‌های بزرگ فیبرینی داخل عروق پارین و زیر مخاط، خونریزی و نکروز انعقادی اپیتلیوم سطحی مخاط پرزها و ارتشاح سلول‌های التهابی به لایه پارین سکوم و کولون مشاهده گردید. علائم بالینی، ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در این بررسی با یافته‌های مطالعات قبلی در مورد سالمونلوز اسب مشابهت داشتند که علاوه بر جداسازی و کشت باکتری، این یافته‌ها نیز از جمله قابل اعتمادترین علائم تشخیص بیماری در اسب‌های مبتلا هستند.

کلمات کلیدی: تک سمیان، انتروکولیت، سالمونلوز، هیستوپاتولوژی

## مقدمه

میکروارگانسیم‌های متعددی به‌عنوان عوامل انتروکولیت در اسب شناخته شده‌اند (۵-۱). سالمونلا به‌عنوان یک باکتری گرم‌منفی غیر هوازی اختیاری از پاتوژن‌های شناخته شده و معمول در اسب است که به علت ایجاد التهاب سکوم و کولون اغلب علایم بالینی شامل دل‌درد و اسهال را موجب می‌شود (۶). اسب‌های مبتلا به این باکتری طیفی از علایم بالینی از دفع بدون علامت ارگانسیم تا مرگ فوق حاد را نشان می‌دهند (۹-۷). تعریف سالمونلوز شامل آلودگی به میکروارگانسیم سالمونلا و همچنین بروز علایم قابل مشاهده بیماری است، اگرچه در برخی گزارشات حیوانات دفع‌کننده میکروارگانسیم بدون علایم بالینی هم به‌عنوان مورد ابتلاء در نظر گرفته می‌شوند (۱۰). بر این اساس سه دسته میزبان مبتلا به سالمونلا وجود دارند: اسب‌های حامل بدون دفع ارگانسیم از مدفوع، اسب‌های حامل همراه با دفع ارگانسیم در مدفوع، و اسب‌های دفع‌کننده میکروارگانسیم دارای علایم بالینی (۱).

بر اساس سن میزبان، بیماری به‌صورت سپتی‌سمی فوق حاد، انتروکولیت حاد، اسهال مزمن، توقف رشد و به ندرت پلی‌آرتریت، اورکیت و سقط جنین بروز می‌کند (۳). اسب‌های مبتلا اغلب علایم سپسیس مرتبط با اندوتوکسمی، شوک قلبی-عروقی، سندروم نشت عروقی و اختلالات انعقادی را نشان می‌دهند. تب، تاکی‌کاردی، کاهش هوشیاری و دهیدراتاسیون هم از علایم ابتلا در اسب است (۷، ۱۱). همچنین سالمونلوز ممکن است به‌صورت اتساع معده و سندروم ایلئوس در حیوان مبتلا بروز کند. در موارد غیر معمول بیماری، اسب‌ها با علائم تب خفیف، ایلئوس روده باریک همراه با رفلاکس حجم زیادی از محتویات معده، مشخص می‌شوند. سالمونلوز می‌تواند به‌صورت تک‌گیر یا اپیدمی‌های

شدید در اسب‌های حساس بروز نماید (۵، ۷، ۱۲). فاکتورهای متعددی بر سرنوشت علایم بالینی در اسب‌های مبتلا از جمله حدت گونه سالمونلا، دوز مورد مواجهه و مقاومت میزبان، موثرند (۱۳، ۱۴).

سالمونلاهای پاتوژن دیواره روده میزبان را مورد تهاجم قرار داده و توسط ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها فاگوسیت می‌شوند. این ارگانسیم همچنین می‌تواند در ماکروفاژها زنده مانده و از ایمنی میزبان و مواد ضد میکروبی مصون بماند (۱۵). فاکتورهای حدت باکتری و پاسخ‌های التهابی میزبان به ارگانسیم هر دو در بروز ضایعات پاتولوژیک بیماری نقش دارند. سالمونلا تیفی موریوم بیماری‌زاترین سروتیپ شناخته شده در اسب محسوب شده و بالاترین نرخ مرگ و میر را در مقایسه با سایر سروتیپ‌های سالمونلا دارد. جداسازی باکتری قطعی‌ترین راه تشخیص حضور ارگانسیم سالمونلا در میزبان است (۱، ۵، ۱۲).

به علت تشابه علایم بیماری با سایر موارد انتروکولیت‌ها با علل باکتریایی و ویروسی، اطلاعات چندان دقیقی از میزان بروز سالمونلوز در اسب‌های مناطق مختلف کشور وجود ندارد. این مطالعه به بررسی بروز سالمونلوز در اسب‌داری‌های استان کرمانشاه و علایم میکروسکوپی و ماکروسکوپی آن می‌پردازد.

## مواد و روش کار

تعداد ۵۹ رأس اسب کرد (۳۷ ماده‌ایان و ۲۲ نریان) با شکایت دامدار مبنی بر دارا بودن علایم اصلی اسهال و دل‌درد در باشگاه‌های نگهداری اسب در استان کرمانشاه، در یک بازه زمانی ۹ ساله (۱۳۹۹-۱۳۹۰) مورد مطالعه قرار گرفتند. از این تعداد، ۵۴ درصد تلف شده و مابقی زنده ماندند. ۳۰ درصد اسب‌ها در کشت نمونه از محتویات رفلاکس بیینی-معده (۲ مورد)، مدفوع (۹ مورد) و از محتویات روده در کالبدگشایی (۷ مورد) در کشت

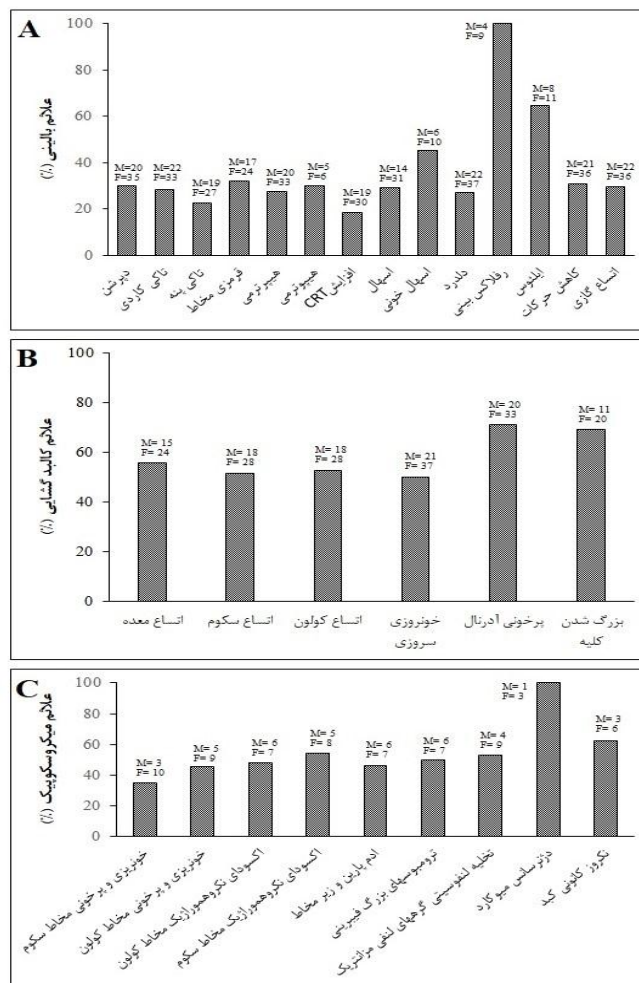
شدت علائم، مورد الکترولیت و مایع درمانی قرار گرفتند (۱۶).

تعداد ۲۰ راس اسب (۱۴ ماده‌ای و ۶ نر) تلف شده کالبدگشایی شده و پس از بررسی ضایعات محوطه بطنی و قفسه سینه، از معده، سکوم، کولون، روده باریک، گره‌های لنفی مزانتریک، قلب، کبد، نمونه هیستوپاتولوژیک در فرمالین بافر ۱۰ درصد جمع‌آوری و جهت تهیه اسلاید و انجام رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین به آزمایشگاه پاتولوژی ارجاع گردید.

در نمونه‌گیری از این تعداد حیوان تلف شده، تعداد ۱۳ مورد در کشت باکتریولوژیک سالمونلا مثبت اعلام شد.

سالمونلا مثبت اعلام شدند. در روش کشت ابتدا نمونه مدفوع حیوان دارای علائم بر روی محیط کشت انتخابی غنی‌شده، کشت و سپس کلنی‌های تکثیر شده جهت کاهش تعداد سایر ارگانیسم‌های مداخله‌گر روده‌ای، به محیط کشت جداسازی انتخابی (آگار مک کانکی) منتقل شدند (۱۶).

از تعداد ۵۰ رأس اسب دارای علائم نیز خون‌گیری انجام و جهت بررسی تست‌های هماتولوژیک به آزمایشگاه ارسال گردید. تمامی حیوانات در این مطالعه، تحت درمان دوزهای توصیه شده از داروهای ضد انگل بوده و مدفوع اکثر آنها فاقد تخم انگل یا حاوی تعداد کمی تخم انگل بود. حیوانات مبتلا در طی این بررسی، بر اساس



نمودار ۱- درصد علائم بالینی (A)، کالبدگشایی (B) و میکروسکوپی (C)، در اسب‌های نر (M) و ماده (F) سالمونلا مثبت

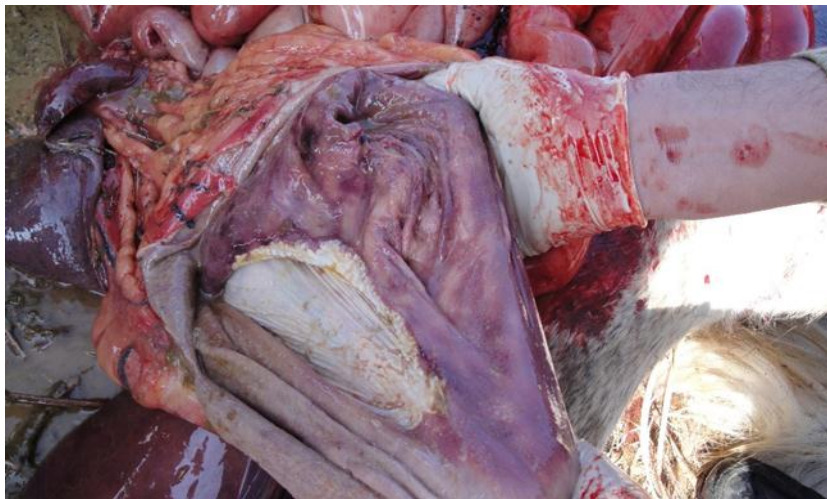
## نتایج

در معاینه بالینی قبل از درمان یا مرگ، علائم دپرفیوژن، تاکی کاردی، تاکی پنه، احتقان عروق مخاطی، افزایش CRT، تب، هیپوترمی، اسهال، اسهال خونی، دل درد، رفلاکس بینی-معدی، ایلئوس، کاهش حرکات روده، اتساع روده‌ها در معاینه رکتال، مشاهده گردید (نمودار ۱).

یافته‌های هماتولوژیک نیز شامل لوکوپنی، نوتروپنی با انحراف به چپ، افزایش هماتوکریت، افزایش نیتروژن اوره خون و کراتینین، هیپوآلبومینمی و افزایش سطح فیبرینوژن بود.

در بررسی کالبدگشایی بیست رأس اسب با علائم عمومی دل‌درد و اسهال، اتساع شدید معده، اتساع شدید سکوم و کولون، خونریزی‌های پتشی و اکیموز سطوح سروزی و مخاطی روده باریک و کولون، کلیه‌های کمرنگ و بزرگ و پرخونی غدد آدرنال، مشاهده گردید (نمودار ۱).

در کالبدگشایی همچنین، مخاط معده پرخونی به همراه ادم و خونریزی کانونی را نشان می‌داد (تصویر ۱). روده باریک و کولون علائمی از پرخونی‌های شدید تا ترشحات موکوسی و خونریزی داشت (تصویر ۲).



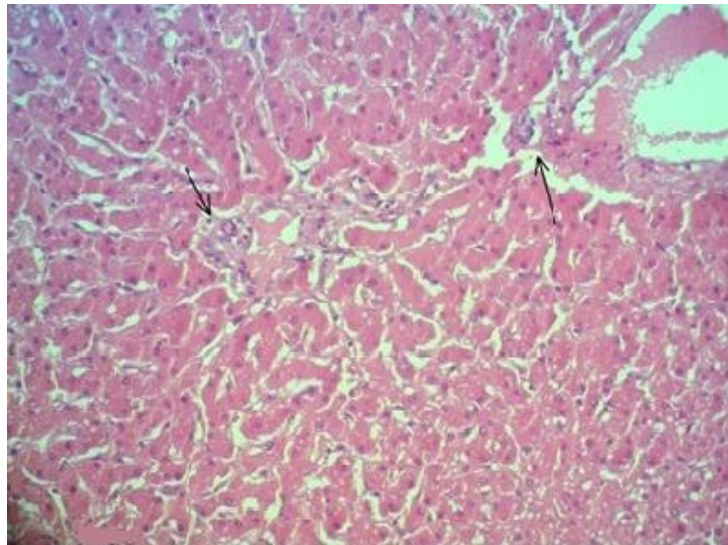
شکل ۱- معده اسب پرخونی شدید و ادم مخاطی



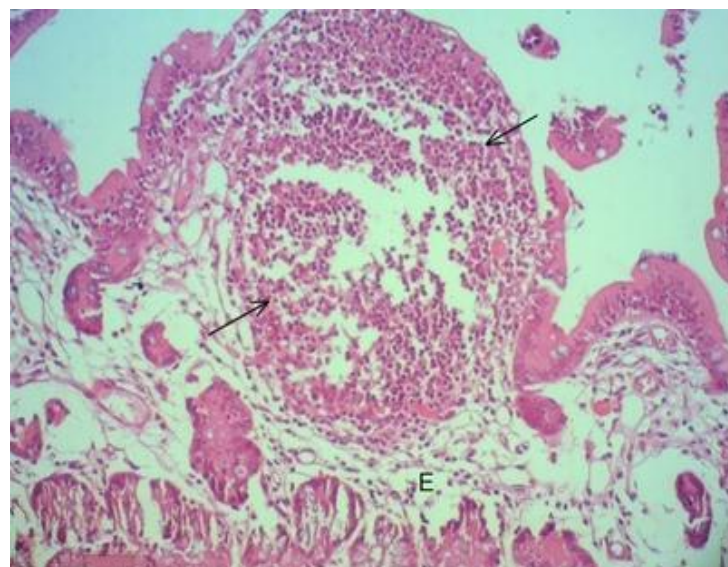
شکل ۲- کولون کوچک خونریزی اکیموز شدید در سطح سروزی، روده متسع از گاز

از لحاظ هیستوپاتولوژیک، شدیدترین ضایعات در سکوم و کولون اسب‌های مبتلا دیده شد. خون‌ریزی به همراه نکروز انعقادی اپیتلیوم در سطح مخاط همراه با ارتشاح شدید سلول‌های التهابی در لایه پارین مهم‌ترین یافته بود. اکسودای فیبرینی-سلولی متصل به اپیتلیوم نکروزه در سطوح مخاطی

برخی نواحی روده مشاهده گردید. ادم شدید لایه‌های پارین، زیر مخاط و عضلانی سرتاسر روده کاملاً مشهود بود. مویرگ‌های لایه پارین و زیر مخاط حاوی ترومبوس‌های فیبرینی بزرگ بودند (تصاویر ۳ و ۴).



شکل ۳- بافت روده، ادم شدید لایه پارین و زیر مخاط (E)، ترومبوس‌های فیبرینی بزرگ در عروق خونی لایه زیر مخاط (T). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، بزرگنمایی X40



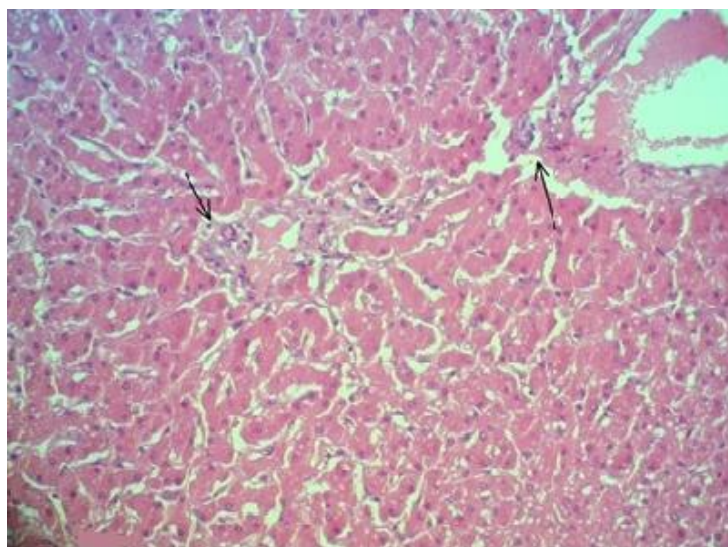
شکل ۴- بافت روده، ادم لایه پارین (E) و ارتشاح سلول‌های التهابی در لایه پارین (پیکان‌ها)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، بزرگنمایی X100

لنفوسیت بوده و بعضاً کلنی‌های باکتری داخل

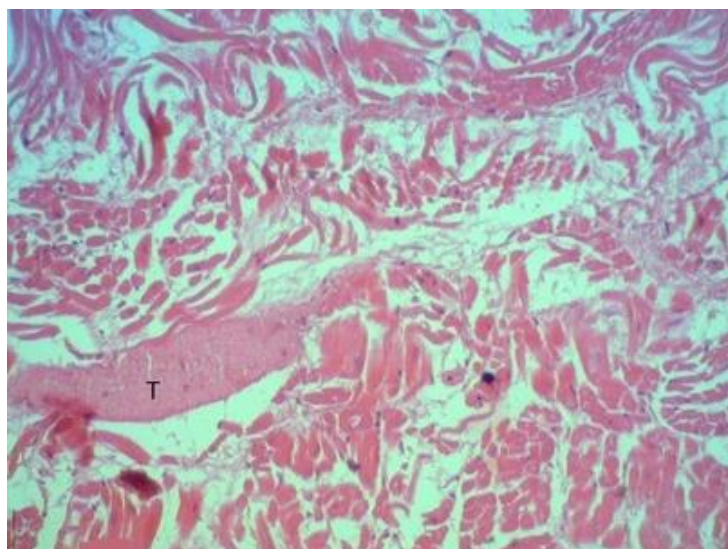
مراکز زایای گره‌های لنفی مزانتریک خالی از

در موارد ابتلای کره اسب‌ها علاوه بر دژنرسانس سلول‌های عضلانی، میوکاردیت فیبرینی شدید به همراه ترومبوس‌های فیبرینی داخل عروق کوچک میوکارد نشان داد (تصویر ۶) (نمودار ۱).

سینوس‌های زیر کپسولی مشاهده می‌شد. ندول‌های پاراتیفوئید شامل کانون‌های کوچک نکروز سلول‌های کبدی به همراه ارتشاح و تجمع سلول‌های التهابی در برخی نمونه‌ها مشاهده شد (تصویر ۵). بافت قلب



شکل ۵- بافت کبد، حضور کانونی سلول‌های التهابی (پیکان‌ها). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی X100



شکل ۶- بافت قلب کره اسب مبتلا به سالمونلا، ترومبوس داخل عروقی (T) رسوب مقادیر زیاد رشته‌های فیبرین در میوکارد به همراه دژنرسانس سلول‌های قلبی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی X100

بازوی دمایی و pH گسترده تکثیر یابد (۱۷) گونه‌های سالمونلا همواره به‌عنوان یک عفونت بیمارستانی مقاوم به داروهای چندگانه ضد میکروبی

### بحث و نتیجه‌گیری

سالمونلا عامل عفونی مقاومی است که می‌تواند بعضاً تا ماه‌ها در مدفوع حیوان زنده بماند و در

رسوب فیبرین و تغییرات عروقی است (۱۱). باکتری سالمونلا ارگانیسیم مهاجم روده است که از طریق آنتی‌ژن فیمبریای اختصاصی سطحی خود عمل می‌کند و موجب اندوسیتوز وابسته به گیرنده می‌شود (۴). واکوئل‌های متصل به غشاء سپس ارگانیسیم را به ماکروفاژهای موجود در لایه پارین منتقل می‌کنند (۷، ۱۵).

سالمونلا سپس با اختلال در کانال‌های کلر انتروسیت‌ها منجر به بروز اسهال ترشحی می‌شود. این ارگانیسیم همچنین موجب القاء آپوپتوز در انتروسیت‌ها و فراخوانی نوتروفیل‌ها به مخاط روده می‌شود. اندوتوکسین باکتری بروز ترومبوس در عروق را القاء می‌کند. کانون‌های متعدد نکروز هپاتوسیتی و هیپرپلازی سلول‌های کوپفر (ندول‌های پاراتیفوئید) نشانه سالمونلوز حاد روده‌ای است (۱۵). لنفادنوپاتی مزانتریک هم در اغلب موارد ابتلا مشاهده می‌شود (۱). ضایعات در حیواناتی که از بیماری می‌میرند بر اساس این که کدام نشانگان بیماری را بروز دهند متفاوت است. شدت ابتلا به بیماری به سن اسب، فاکتورهای مستعد کننده مثل استرس، سابقه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و سروتیپ باکتری مرتبط است. شدیدترین علائم در کره اسب‌های زیر چهار ماه به صورت سپتی‌سمی فوق حاد بروز می‌کند که می‌تواند مرگ در اثر شوک را در حیوان موجب شود (۲۲).

ضایعات میکروسکوپی در حیواناتی که از سالمونلوز فوق حاد می‌میرند شامل نکروز فیبرینوئید عروقی است. در فرم فوق حاد یا سپتی‌سمیک حاد بیماری، خونریزی‌های پتشی یا اکیموز خصوصاً بر روی غشاهای مخاطی (پریکارد یا صفاق) مشاهده می‌شوند. خونریزی‌های پتشی بر روی دریچه‌های قلبی، مخاط مثانه و ناحیه قشری کلیه و غدد آدرنال هم ممکن است دیده شود. کورتکس کلیه در اکثر موارد بی‌رنگ است در مقابل ناحیه مدولای کلیه

در انسان و در بیمارستان‌های دامپزشکی تک سمیان مطرح بوده است و زمانی که این باکتری ژن‌های کدکننده مسئول مقاومت به داروهای ضد میکروبی را کسب کند، همواره درمان مساله‌ای چالش برانگیز خواهد بود (۱۸). منابع بالقوه عفونت سالمونلایی عمدتاً شامل مصرف آب و غذای آلوده، تماس با سطوح و آئروسول‌های آلوده، مواجهه و تماس مستقیم با حیوان آلوده و بلعیدن مدفوع آلوده پرندگان می‌باشد (۱۶). حاملین عفونی واقعی آن‌گونه که در مورد انسان (*S.typhi*) و گاو (*S.dublin*) ذکر شده است در مورد اسب و تک سمیان وجود ندارد (۱۷). با وجود زئونوز بودن عامل بیماری، انتقال آن از اسب و تک سمیان به انسان کمتر اتفاق می‌افتد (۱۹). برنامه جهانی و یکسانی جهت امنیت زیستی و مقابله با این عامل عفونی وجود ندارد و معمولاً به متغیرهایی مانند منطقه جغرافیایی، تعداد حیوانات موجود در منطقه و نوع حیوانات آن منطقه وابسته است (۲۰).

از آنجا که حیوان مبتلا مقادیر زیادی میکروارگانیسیم از طریق مدفوع خود دفع می‌کند و ارگانیسیم به شدت عفونی است، این بیماری همواره از لحاظ بیوسکیوریتی از اهمیت زیادی برخوردار بوده است (۱۶). به طور کلی در تشخیص این بیماری کشت مدفوع حساسیت بیشتری در مقایسه با سایر روش‌های نمونه‌گیری از جمله سواب رکتوم دارد که این امر احتمالاً به علت مقادیر بیشتر نمونه مدفوع در محیط کشت است (۲۱). در این مطالعه اسب‌های دارای علائم عمومی بالینی گوارشی شامل دل‌درد، اسهال، تاکی‌کاردی، تاکی‌پنه به همراه کاهش حرکات و اتساع روده‌ها مورد بررسی باکتریولوژیک و میکروسکوپی قرار گرفتند.

مهم‌ترین علائم بالینی سالمونلوز شامل اسهال، بی‌اشتهایی و هیپرترمی و عمده‌ترین ضایعات میکروسکوپی آن شامل نکروز مخاط روده به همراه

پرخون شده است. طحال بزرگ شده و ریه‌ها پرخون و ادماتوز هستند (۲۳). گره‌های لنفی نیز می‌توانند علایم ادم و خونریزی را نشان دهند (۲۴). در نهایت مرگ حیوان اغلب به دنبال انعقاد داخل عروقی وسیع و منتشر به علت واکنش شوارتزمن گسترده حادث می‌شود. در این بررسی نیز علایم انتریت و انتروکولیت فیبرینونکروتیک خصوصاً به همراه ترومبوس‌های بزرگ فیبرینی در ناحیه پارین و زیر مخاط در حیوانات سالمونلا مثبت کالبدگشایی شده قابل توجه بوده و کاملاً با یافته‌های حاصل از مطالعات قبل همخوانی داشت. ضایعات ماکروسکوپی در اسب‌های مبتلا به سالمونلا اغلب شامل انتریت و انتروکولیت است که به صورت اسهال در حیوان مبتلا ظاهر می‌شود (۲۴). ضایعات شاخص کالبدگشایی شامل التهاب گسترده فیبرینی یا هموراژیک سکوم و کولون است. مخاط شامل نکروز سطحی بوده و ممکن است غشاء کاذب خاکستری رنگی که متشکل از ترشحات فیبرینی و بقایای نکروتیک سلول‌های اپیتلیالی است، سطح آن را پوشانده باشد. مویرگ‌های لایه پارین و زیر مخاط حاوی ترومبوس‌های فیبرینی هستند. در موارد مزمن تر ضایعات به صورت کانون زخم‌های مخاطی گرد که در ناحیه زیر مخاط دارای ادم هستند، دیده می‌شود. گره‌های لنفی مزانتریک بزرگ و ادماتوز بوده و ممکن است دارای خونریزی باشند (۱). نواحی دیگر محوطه شکمی از جمله معده ممکن است دارای ادم، پرخونی و خونریزی کانونی در

مخاط باشد. تغییرات روده باریک از پرخونی ساده تا اکسودای موکوسی یا هموراژیک متغیر است. ضایعات سالمونلوز مزمن مثل سالمونلوز حاد به صورت کانون‌های کولیت یا التهاب سکوم اولسراتیو یا فیبرینی مشخص می‌شود. ترشحات فیبرینی زیاد ممکن است منجر به تشکیل بافت فیروزه شده و این چسبندگی‌های فیروزه با اختلال در حرکات روده می‌تواند علت مرگ در اثر کولیک یا ایلئوس روده باشد (۱، ۱۵). جداسازی باکتری از ارگان‌های درگیر مثل گره‌های لنفی، کبد و محتویات روده، همچنان مطمئن‌ترین راه تشخیص بیماری است (۲۲). در دو مورد سالمونلوز مشاهده شده در کره اسب، مشاهده ضایعات قلبی به صورت نکروز و دژنراس فیبرینی میوکارد و وجود ترومبوس‌های فیبرینی در عروق قابل توجه بود.

علایم بالینی عمدتاً شامل دل‌درد، دپرشن، تاکی‌کاردی، کاهش حرکات و صداهای روده به همراه علایم ماکروسکوپی در کالبدگشایی شامل پرخونی و خونریزی شدید سطوح سروزی روده، اتساع سکوم و کولون و بزرگ شدن گره‌های لنفی مزانتریک و علایم هیستوپاتولوژیک شامل انتروکولیت فیبرینونکروتیک مشاهده شده در این بررسی با یافته‌های مطالعات قبلی در موارد سالمونلوز اسب مشابهت داشتند که علاوه بر جداسازی باکتری (در ۱۸ مورد)، این یافته‌ها نیز جهت تشخیص قطعی بیماری ضروری هستند.

## References

- 1- Ghara GMJ, Zahraei SM. A Pathological and Bacteriological Report of Salmonellosis in Caspianpony. *Pajouhesh-va-Sazandegi*. 2004;17(1): 46-48. [In Persian]
- 2- Guy, JS, Breslin JJ, Breuhaus B, Vivrette S, Smith LG. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. *J.Clinic.Microbiol*.

2000; 38(12): ۴۵۲۶-۴۵۲۳

- 3- Hassenin A, Durrani AZ, Goyal SM, Yousef FH, Selim AM, Abou-Zeid AA. Retrospective study on the cause of bacterial diarrhea in horses in Minnesota. *Res. J. Anim. Sci*. 2010. 4(2): 77-82.

- 4- Lester G, Madigan J. Diarrhea in Neonatal

foal. *Large animal medicene*. 2009; 315-319.

**5- Morse E, Duncan MA, Page EA, Fessler JF.** Salmonellosis in Equidae: a study of 23 cases. *The Cornell veterinarian*. 1976; **66**(2): 198-213.

**6- Begg A, Johnston KG, Hutchins DR, Edwards DA.** Some aspects of the epidemiology of equine salmonellosis. *Aust.Vet.J.* 1988; **65**(7): 221-223.

**7- Coburn BGA.** Grassl, and B. Finlay, Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immun.Cell.Biol.* 2007; **85**(2): 112-118.

**8- ÖZGÜR NY, Anzai T, Carioglu B, Bagcigil F, Ikiz S, Ilgaz A.** A Case of Death in a Foal Caused by Salmonella typhimurium. *Turk. J.Vet.&Anim.Sci.* 2001; **25**(5): 721-724.

**9- Walker RL, Madigan JE, Hird DW, Case JT, Villanueva MR, Bogenrief DS.** An outbreak of equine neonatal salmonellosis. *J.Vet.Diag.Invest.* 1991; **3**(3): 223-227.

**10- Smith B.** Atypical salmonellosis in horses: fever and depression without diarrhea. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 1979; **175**(1): 69-71.

**11- Juffo GD, Bassuino DM, Gomes DC, Wurster F, Pissetti C, Pavarini SP, Driemeier D.** Equine salmonellosis in southern Brazil. *Trop.Anim.Health & Produc.* 2017; **49**(3): 475-482.

**12- Smith B.** Equine salmonellosis: a contemporary view. *Eq.Vet.J.* 1981; **13**(3): 147-151.

**13- House JK, Mainar-Jaime RC, Smith BP, Kamiya DY.** Risk factors for nosocomial Salmonella infection among hospitalized horses. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 1999; **214**: 1511-1516.

**14- Mainar-Jaime RC, House JK, Smith PB, Hird DW, House AM, Kamiya DY.** Influence of fecal shedding of Salmonella organisms on mortality in hospitalized horses.

*J.Am.Vet.Med.Assoc.* 1998; **213**(8): 1162-1166.

**15- Foley S, Lynne A.** Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim.Sci.* 2008; **86**(14): 173-187.

**16- McKenzie III H, Mair T.** Equine salmonellosis. *Inf.Dis.Horse.* 2009: 172-186.

**17- Spier SJ.** Salmonellosis. *Vet.Clinics of North America: Equine Practice.* 1993; **9**(2): 385-397.

**18- Dargatz DA, Traub-Dargatz JL.** Multidrug-resistant Salmonella and nosocomial infections. *Vet.Clinics: Equine Practice.* 2004; **20**(3): 587-600.

**19- Smith BP.** Evolution of equine infection control programs. *Veterinary Clinics: Equine Practice.* 2004; **20**(3): 521-530.

**20- Traub-Dargatz JL, Dargatz DA, Morley PS, Dunowska M.** An overview of infection control strategies for equine facilities, with an emphasis on veterinary hospitals. *Vet. Clinics: Equine Practice.* 2004; **20**(3): 507-520.

**21- Burgess BA, Morley PS.** Managing Salmonella in equine populations. *Vet. Clinics: Equine Practice.* 2014; **30**(3): 623-640.

**22- Jones SL.** Medical disorders of the large intestine. *Large Animal Internal Medicine. Fourth edition,* Mosby Company. 2009: 749.

**23- Ward MP, Brady TH, Couetil LL, Liljebjelke K, Maurer JJ, Wu CC.** Investigation and control of an outbreak of salmonellosis caused by multidrug resistant Salmonella typhimurium in a population of hospitalized horses. *Vet.micob.* 2005; **107**(3-4): p. 233-240.

**24- Smith B, Reina-GuerraM, Hardy A.** Prevalence and epizootiology of equine salmonellosis. *J. American Vet. Med.Assoc.* 1978; **172**(3): 353-356.

## Salmonella Entero-Colitis in Horse Clubs of Kermanshah Province

Zahra Minoosh Siavosh Haghghi<sup>1\*</sup>, Seyyed Hossein Moaddab<sup>2</sup>

1- Assistant Professor, Department of basic sciences and pathobiology, Faculty of veterinary medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

2- DVM, DVSc. Equine Practitioner, Kermanshah, Iran.

Receive: July 22, 2022; Revise: July 29, 2022; Accept: September 4, 2022

### Summary

---

59 horses with diarrhea and abdominal pain were monitored over a 9-year period (2011-2020). 54% of horses died and others survived. 30% of animals were salmonella positive in bacterial culture. Bacterial isolation was performed on naso-gastric reflux in 2 cases, fecal samples from 9 cases and intestinal contents at necropsy in 7 cases. Before any treatments or death, animals showed clinical signs such as depression, tachycardia and tachypnea. Other symptoms including congested mucous membranes, increased CRT, fever, hypothermia, diarrhea, bloody diarrhea, abdominal pain, nasogastric reflux, ileus, reduced abdominal sounds, and gas distended intestines upon rectal examination were also recorded. Necropsy findings of 20 horses, revealed severe dilation of stomach, gas distention of cecum and colons, petechial and ecchymotic hemorrhages in serosal and mucosal surfaces of small intestine and colons. Pale and enlarged kidneys along with hemorrhagic adrenals were observed. Microscopic examinations revealed severe lesions including: lamina propria and submucosal edema, vascular congestion, large intravascular thrombi, hemorrhages, superficial coagulative necrosis of villi epithelium and mixed inflammatory cell infiltration within lamina propria of cecum and colon. Clinical, macroscopic and histopathological signs of this study were similar to previous studies, and bacterial isolation was used as the most reliable method for diagnosis of involved horses.

**Key words:** *Equine, entero-colitis, Salmonellosis, Histopathology*

## دسته بندی فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* به دست آمده از موارد عفونت ادراری شهرستان بجنورد به روش جدید گروه‌بندی کلرمونت

حمیدرضا فرزین<sup>۱</sup>، مجید جمشیدیان مجاور<sup>۱\*</sup>، محدثه امیری<sup>۲</sup>، کاوه اکبرزاده شعرباف<sup>۳</sup>، سیدالیاس طباطبایی زاده<sup>۱</sup>

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، مشهد، ایران.

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۳- استادیار، گروه مهندسی کامپیوتر، دانشگاه بین‌المللی امام رضا (ع)، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ اسفند ۱۴۰۰، بازنگری: ۷ اردیبهشت ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۱

### چکیده

عفونت‌های ادراری (UTI) یکی بارزترین عفونت‌ها در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان و همچنین *اشریشیاکلی* شایع‌ترین پاتوژن و همچنین مسئول ۸۵-۵۰ درصد عفونت‌های ادراری در جوامع و بیمارستان‌ها است. نوترکیبی‌ها، در جمعیت باکتری *اشریشیاکلی* منجر به تنوع در میان آنها و شکل‌گیری گروه‌های فیلوژنتیک می‌گردد. با تعیین هویت اجدادی سویه‌ها و گروهی که باکتری به آن تعلق دارد، می‌توان به ماهیت بیماری‌زا یا فلور طبیعی یا پاتوژن بودن باکتری پی برد. در این مطالعه در بازه‌ی زمانی ۴ ماهه تعداد ۵۰ نمونه از کشت‌های مثبت دارای عفونت ادراری ارجاع شده به آزمایشگاه مستقر در بیمارستان ثامن‌الائمه شهرستان بجنورد مورد بررسی قرار گرفت. پلیت‌های دارای باکتری که در محیط کشت مک‌کانکی آگار دارای کلنی‌های صورتی رنگ بودند به‌عنوان جدایه‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* انتخاب شدند و به‌وسیله آزمایش‌های بیوشیمیایی (IMVIC) تأیید جدایه‌ها صورت پذیرفت. در این مطالعه از روش PCR و پرایمرهای طراحی شده از چهار ژن *chuA*، *arpA* و *TspE4.C2* جهت تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی C، F، E، B1، B2، A و D استفاده گردید. در این مطالعه میزان فراوانی گروه‌های فیلوژنتیکی به ترتیب B2 (۲۴ درصد)، F (۲۲ درصد)، B1 (۱۸ درصد)، D (۱۶ درصد)، A (۸ درصد)، C (۶ درصد) و E (۶ درصد) مشاهده گردید. تمامی جدایه‌های مورد مطالعه با کمک روش جدید دسته‌بندی فیلوژنتیکی کلرمونت قابل دسته‌بندی بودند. در میان جدایه‌های مورد مطالعه طیف گوناگونی از گروه‌های فیلوژنتیکی مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی* اوروپاتوژنیک، عفونت مجاری ادراری، گروه‌بندی نیو کلرمونت

## مقدمه

عفونت ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های رایج در میان بیماری‌های عفونی با منشأ باکتریایی است. عفونت دستگاه ادراری به حضور پاتوژن‌های میکروبی درون دستگاه ادراری اطلاق می‌شود و یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان می‌باشد (۱). باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *پروتئوس میرابیلیس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی عفونت ادراری می‌باشند. این عفونت غالباً در بخش اعظمی از بیماران سرپایی و بیماران بستری در بیمارستان مشاهده می‌گردد. از عوامل مؤثر در این عفونت می‌توان به جنسیت افراد و سن افراد اشاره نمود غالباً کودکان در رده‌های سنی گوناگون بیشتر به این عفونت دچار می‌گردند (۲، ۳). باکتری *اشریشیاکلی*، شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری شناخته شده است. این ارگانیسم همچنین عامل ۹۰ درصد تمامی عفونت‌های ادراری شناخته شده در بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی است (۴، ۵).

فیلوژنوتایپینگ و آنالیز فیلوژنی جدایه‌های *اشریشیاکلی* روشی جهت تعیین سیر تکاملی و قابلیت بیماری‌زایی این باکتری است. بررسی‌های انجام شده بر روی سیر تکاملی و تغییرات ژنتیکی *اشریشیاکلی* نشان می‌دهد این باکتری از نظر ساختار ژنتیکی به میزان کمی در معرض تغییرات ناشی از نوترکیبی ژنتیکی است این ویژگی *اشریشیاکلی* باعث شده است که در بررسی پلی‌مورفیسم داخل گونه‌ای کاربرد فراوان پیدا کند (۶). برخی از محققین اعتقاد دارند که سویه‌های بیماری‌زای این باکتری از سویه‌های فرصت‌طلب منشأ گرفته‌اند. بدین معنی که این باکتری‌ها به دنبال موتاسیون و یا با اکتساب اپرن‌های حدت کروموزومی و یا پلاسمیدی قابلیت بیماری‌زایی را به دست می‌آورند، که نتیجه آن حضور

کلون‌های مختلف بیماری‌زا در جمعیت‌های *اشریشیاکلی* است (۶، ۷).

در سال ۲۰۰۰ کلمونت و همکاران یک آزمایش PCR سه‌گانه جهت شناسایی ژن‌های *chuA*، *yjaA*، *TspE4.C2* جهت دسته‌بندی فیلوژنتیکی باکتری *اشریشیاکلی* ابداع نمودند که بر این اساس باکتری *اشریشیاکلی* را می‌توان در یکی از گروه‌های A، B1، B2، D قرار داد (۸). پس از کشف این روش در سال ۲۰۰۰، به شکل گسترده‌ای به دلیل آسانی و سرعتش مورد استفاده قرار گرفت. این روش بر پایه‌ی PCR تریپلکس بوده که در آن دو ژن *chuA* (ژن کد کننده‌ی گیرنده‌ی آهن خارج‌شایی) و *yjaA* (کد کننده‌ی یک پروتئین شناخته نشده) و یک قطعه‌ی DNA که اخیراً به‌عنوان بخشی از یک ژن لیپاز استراز شناخته می‌شود، ردیابی می‌شود (۸). در این روش دسته‌بندی ۸۰ تا ۸۵ درصد سویه‌ها در میزبان‌ها و زیستگاه‌های گوناگون به‌طور صحیح دسته‌بندی می‌شدند اما کسری از سویه‌ها به‌طور اشتباه اختصاصی تشخیص داده می‌شدند. در سال ۲۰۱۳ کلمونت و همکارانش یک ژن هدف اضافی به نام *arpaA* را به سه ژن قبلی اضافه کردند (۹). در طی اضافه شدن این ژن جدایه‌های *اشریشیاکلی* در یکی از گروه‌های A، B1، B2، C، D، E، F قرار می‌گیرند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک در سراسر جهان نشان می‌دهد که سویه‌های خارج روده‌ای *اشریشیاکلی* بیشتر در گروه‌های B2 و مقدار کمتری در گروه D قرار می‌گیرند. سویه‌ی کامنسال این باکتری طبق این طبقه‌بندی در گروه‌های B1 و A قرار می‌گیرند (۹، ۱۰).

هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان پراکندگی گروه‌های فیلوژنتیکی و شناسایی گروه‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از موارد عفونت ادراری شهرستان بجنورد به روش جدید دسته‌بندی کلمونت می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه در بازه زمانی ۴ ماهه ۵۰ نمونه از کشت‌های مثبت دارای عفونت ادراری (پلیت‌های دارای باکتری که در محیط کشت محیط مک‌کانکی آگار (مرک-آلمان) دارای کلنی‌های صورتی رنگ بودند) ارجاع شده به آزمایشگاه مستقر در بیمارستان ثامن‌الائمه شهرستان بجنورد با رضایت بیماران فوق مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت تأیید جدایه‌ها (تست‌های TSI و سیترات، متیل رد، ووگس-پروسکوئر و سیترات (IMViC) (مرک-آلمان) صورت پذیرفت.

**استخراج DNA** برای استخراج DNA در این مطالعه از روش جوشاندن استفاده شد. در این روش ابتدا باکتری را روی محیط لوریا برتانی آگار (مرک-آلمان) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون برای استخراج DNA از تک کلنی‌های به دست آمده استفاده گردید (۱۱). ابتدا به میزان ۳۵۰ ماکرولیتر آب مقطر استریل به درون میکروتیوب‌های استریل انتقال داده شد و سپس یک کلنی در آن حل گردید. میکروتیوب‌ها در دستگاه هیتینگ بلاک (پندورف-آلمان) در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۱ دقیقه قرار داده شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد میکروتیوب‌ها سرد گردید و به مدت ۱۰ ثانیه میکروتیوب‌ها ورتکس شدند و در نهایت میکروتیوب‌ها به مدت ۲ دقیقه، با سرعت ۱۲ هزار دور سانترفیوژ (پندورف-آلمان) شدند. میکروتیوب‌ها به آرامی از دستگاه خارج شدند و ۲۵۰ ماکرو لیتر از مایع رویی آنها به داخل

میکروتیوب‌های استریل جدیدی منتقل گردید (۱۱).

## روش PCR جهت ردیابی ژن‌های مورد نیاز

**جهت گروه‌بندی فیلوژنتیکی:** در این مطالعه از پرایمرهای طراحی شده از چهار ژن *chuA*، *arpA* و *TspE4.C2* جهت تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی C، F، E، B2، B1، A و D استفاده گردید. تمامی واکنش‌های مربوط به این پژوهش در حجم ۲۰ میکرولیتر که شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس آماده (BIOFACT، کره)، ۰/۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (ژن فن‌آوران، ایران)، DNA باکتری‌های مورد نظر ۳ میکرولیتر و آب مقطر استریل تا حجم کلی واکنش اضافه گردید. تبدیل روش جدید به یک PCR چهارتایی با افزودن یک ژن هدف دیگر به نام *arpA* که دو هدف را دنبال می‌کند: (۱) این ژن به‌عنوان یک کنترل داخلی در واکنش عمل خواهد کرد چرا که با افزودن هر هشت فیلوگروه مورد مطالعه حداقل یک محصول PCR تولید خواهند کرد. (۲) بررسی این ژن جدید کمک خواهد کرد تا سویه‌هایی که متعلق به فیلوگروه F بوده و قبلاً به‌طور اشتباه در فیلوگروه D دسته‌بندی شده‌اند مشخص شوند، چرا که ژن *arpA* در تمام فیلوگروه‌ها به جز B<sub>2</sub> و F حضور دارد. برای تشخیص هر کدام از دو فیلوگروه E و C یک پرایمر اختصاصی طراحی شد (۸).

پس از طی برنامه‌ی زمانی مورد نظر محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردیدند و نتایج با ژل داک (Optigo ISOGENE) مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- توالی پرایمرها و اندازه محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده در این مطالعه

منبع	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر	ژن هدف	پرایمر
۱۸	۲۸۸	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCACTACCAAAGACA	<i>chuA</i>	chuA.1b chuA.2
۱۱	۲۱۱	CAAACGTGAAGTGTTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	<i>yjaA</i>	yjaA.1b yjaA.2b
۱۲	۱۵۲	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	TspE4.C2	TspE4C2.1b TspE4C2.2b
۱۹	۳۰۱	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	<i>arpA</i>	AceK.f ArpA1.r

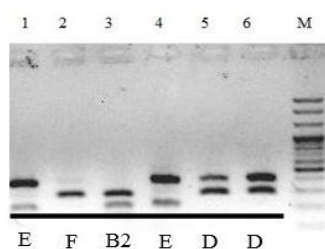
**نتایج گروه‌بندی فیلوژنتیکی:** نتایج به دست آمده از این پژوهش طبق جدول ۳ تفسیر گردید. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان فراوانی جدایه‌ها در گروه فیلوژنتیکی B2 بوده (۲۴ درصد) و گروه‌های فیلوژنتیکی F (۲۲ درصد)، B1 (۱۸ درصد)، D (۱۶ درصد)، A (۸ درصد)، C (۶ درصد) و E (۶ درصد) بعد از آن قرار گرفتند.

**الکتروفورز محصولات PCR** برای شناسایی سویه‌هایی که از نظر ژن‌ها و توالی‌های مورد نظر مثبت بودند، تمامی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد به همراه رنگ گرین ویور، الکتروفورز گردیدند. بدین منظور ابتدا بافر TBE تهیه شد، و پس از ساخت ژل آگارز، نمونه‌ها در آن الکتروفورز شدند.

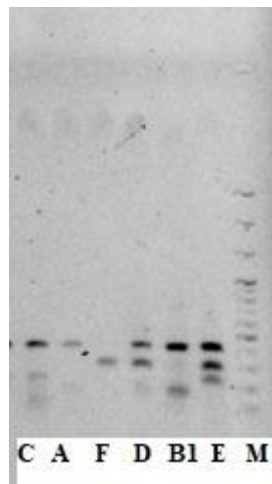
## نتایج

جدول ۳- تفسیر گروه‌بندی جدید فیلوژنتیکی (۲۰)

گروه	TspE4.C2 (152bp)	<i>yjaA</i> (211bp)	<i>chuA</i> (288bp)	<i>arpA</i> (400bp)
A	-	-	-	+
B1	+	-	-	+
F	-	-	+	-
B2	-	+	+	-
B2	+	+	+	-
B2	+	-	+	-
A or C	-	+	-	+
D or E	-	-	+	+
D or E	+	-	+	+



شکل ۱- گروه‌بندی فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه  
M: lad 100bp (کره، BIOFACT)



شکل ۲- گروه‌بندی فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه  
M: lad 100bp (کره، BIOFACT)

## بحث

عفونت ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی است. این بیماری توسط عوامل مختلف باکتریایی ایجاد می‌شود اما شایع‌ترین عامل اشریشیاکلی است (۱۲). عفونت ادراری توسط بسیاری از عوامل بیماری‌زای باکتریایی (گرم‌منفی و گرم‌مثبت) و قارچی در دستگاه ادراری ایجاد می‌گردد (۱۳). در حال حاضر، مدیریت بالینی UTI به دلیل افزایش عفونت‌های ناشی از سویه‌های *E. coli* که در برابر عوامل ضد میکروبی متداول مقاومت ایجاد کرده‌اند به یک مشکل عمده جهانی تبدیل شده است (۱۴). روش PCR سه‌گانه قبلی (روش کلرمونت) همه سویه‌های *E. coli* را به چهار گروه فیلوژنتیکی، A، B1، B2 و D تقسیم می‌کند (۱۵). تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داده است که سویه‌های باکتری خارج روده‌ای اشریشیاکلی معمولاً به گروه B2 و تعداد کمی به گروه D تعلق دارند (۱۵).

ایران‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بوشهر به بررسی گروه‌بندی فیلوژنتیکی در جدایه‌های اشریشیاکلی به دست آمده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری پرداختند. در مطالعه‌ی ایران‌پور تعداد ۱۴۰

جدایه مورد بررسی قرار گرفت و به روش جدید کلرمونت دسته‌بندی شدند. بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه ایران‌پور و همکاران بیشترین پراکندگی گروه‌های فیلوژنتیکی مربوط به گروه B2 (۳۹/۳ درصد) بوده و گروه‌های فیلوژنتیکی E (۹/۳ درصد)، C (۶/۴ درصد)، B1 (۵ درصد) و گروه‌های D و F (۲/۹ درصد) بعد از آن قرار گرفتند (۱۶).

اودوکی و همکاران در سال ۲۰۲۰ در اوگاندا به بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین مقایسه دو روش گروه‌بندی فیلوژنتیکی در جدایه‌های اشریشیاکلی به دست آمده از موارد عفونت ادراری به روش‌های کلرمونت و روش جدید کلرمونت پرداختند. در بین ۳۱ جدایه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشترین پراکندگی گروه‌های فیلوژنتیکی مطالعه اودوکی و همکاران مربوط به گروه A (۱۶/۱ درصد) و گروه‌های B2 (۱۲/۹ درصد)، B1 (۹/۷ درصد)، D (۶/۶ درصد) و E (۱/۱ درصد) به ترتیب بعد از گروه A قرار گرفتند (۱۷).

برومند و همکاران در سال ۲۰۱۷ در یاسوج به بررسی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین بررسی دسته‌بندی گروه‌های فیلوژنتیکی به روش جدید کلرمونت در جدایه‌های اشریشیاکلی به دست

اشریشیاکلی را تفکیک سازد و ایزوله به‌طور دقیق و مناسب در جایگاه خود قرار گیرد. از جمله معایب این پژوهش می‌توان به کم بودن تعداد نمونه و همچنین عدم مقایسه گروه‌بندی سویه‌های بیماری‌زا با سویه‌های غیر بیماری‌زا اشاره نمود.

#### سپاسگزاری

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

#### References

- 1- Basu S, Mukherjee SK, Hazra A, Mukherjee M. Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli*: nalidixic acid and ciprofloxacin resistance, virulent factors and phylogenetic background. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2013; 7(12): 2727.
- 2- Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*. 2011; 58(4): B4187.
- 3- Lee S, Yu JK, Park K, Oh EJ, Kim SY, Park YJ. Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with blaCTX-M. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2010; 40(4): 361-7.
- 4- Hamid-Farahani R, Tajik A, Noorifard M, Keshavarz A. Antibiotic resistance pattern of *E.coli* isolated from urine culture in 660 Army clinical laboratory center in Tehran 2008. *J Army Univ Med Sci*. 2012; 10(1): 45- 49. [In Persian]
- 5- Siyadati S, Ranjbar R, Badami N, nasr EM, karami A. Prevalence of urinary tract infection in spinal cord injury and disability with drug sensitivity of strains isolated. *Journal of Infectious Diseases*. 2008; 42(2): 52-49. [In Persian]
- 6- Dehdashti S, Ghanbarpour R, Hajikolaei MR. Molecular detection of Shiga toxin-producing and antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from buffaloes in southwest of Iran. *Tropical animal health and production*. 2019; 51(6):1725-36. [In Persian]

آمده از ۱۲۹ بیمار مبتلا به عفونت ادراری پرداختند. نتایج به‌دست آمده از پژوهش برومند نشان داد که بیشترین میزان پراکندگی گروه‌های فیلوژنتیکی مربوط به گروه فیلوژنتیکی B2 (۳۶/۴ درصد) بوده و گروه‌های فیلوژنتیکی C (۱۳/۲ درصد) گروه D (۹/۳ درصد)، گروه A (۳/۱ درصد) بعد از آن قرار گرفتند (۱۸).

#### نتیجه‌گیری

با توجه به گروه‌بندی جدید کلرمونت می‌توان گفت که این تکنیک می‌تواند با جزئیات و دقت و حساسیت بیشتری گروه‌بندی ایزوله‌های

- 7- Oliveira FA, Paludo KS, Arend LN, Farah SM, Pedrosa FO, Souza EM, et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet Mol Res*. 2011; 10(4): 4114-25.

- 8- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*. 2013; 5(1): 58-65.

- 9- Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, Gomes TA, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology*. 2010; 10(1): 1-10.

- 10- Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(8): 2529-34.

- 11- Askari Badouei M, Jajarmi M, Mirsalehian A. Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015; 3(8): 15-20. [In Persian]

- 12- Dadi BR, Abebe T, Zhang L, Mihret A, Abebe W, Amogne W. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in

Addis Ababa, Ethiopia. *BMC infectious diseases*. 2020; 20(1): 1-2.

**13- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ.** Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*. 2015; 13(5): 269-84.

**14- Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW.** Wide-spread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *New England journal of medicine*. 2001; 345(14): 1007-13.

**15- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*. 2000; 66(10): 4555-8.

**16- Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A.** Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *BioMed research international*. 2015; 2(5): 52-59. [In Persian]

**17- Odoki M, Aliero AA, Tibyangye J,**

**Onkoba SK, Alkali B, Maniga JN, et al.** Phylogenetic analysis of multidrug resistant *E. coli* isolates from the urinary tract in Bushenyi district, Uganda using the new Clermont phylotyping method. *African Journal of Microbiology Research*. 2020; 14(2): 51-64.

**18- Boroumand M, Naghmachi M, Ghatee MA.** Detection of Phylogenetic Groups and Drug Resistance Genes of *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infection in Southwest Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2021; 14(2): 1-9. [In Persian]

**19- Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A.** Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *BioMed research international*. 2015; 20(15). [In Persian]

**20- Hasanzadeh A, Pourmand MR, Gooran S, Hosainzadegan H, Tanomand A, Pourmand G.** Molecular typing of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* isolates from patients undergoing prostate biopsy. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*. 2018; 76(9): 629-36. [In Persian]

## Phylogenetic classification of *Escherichia coli* isolates obtained from urinary tract infections in Bojnourd city by the new Clermont grouping method

Hamidreza Farzin<sup>1</sup>, Majid Jamshidian-Mojaver<sup>1\*</sup>, Mohadeseh Amiri<sup>2</sup>, Kaveh Akbarzadeh-Sherbaf<sup>3</sup>, Seyed-Elias Tabatabaeizadeh<sup>1</sup>

1- Assistant Professor, Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

2- MSc in Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Computer Engineering, Imam Reza International University, Mashhad, Iran.

Receive: March 9, 2022; Revise: April 27, 2022; Accept: May 21, 2022

### Summary

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common infections in hospitalized patients and *Escherichia coli* is the most common pathogen and is also responsible for 50-85% of urinary tract infections in communities and hospitals. Recombinations in *Escherichia coli* bacterial populations lead to diversity among them and the formation of phylogenetic groups. By determining the ancestral identity of the strains and the group to which the bacterium belongs, the pathogenic nature or natural flora of the bacterium can be understood. In this study, in a period of 4 months, 50 samples of positive cultures with urinary tract infections were referred to the laboratory located in Samen Al-A'meh Hospital in Bojnourd. Bacterial plates containing pink colonies in McConkey agar medium were selected as suspected *Escherichia coli* isolates and, after confirmation by biochemical tests (IMVIC) was performed to confirm the isolates. In this study, four genes *yjaA*, *chuA*, *arpA* and *TspE4.C2* were used to determine phylogenetic groups C, F, E, B2, B1, A and D. In this study, the frequency of phylogenetic groups were B2 (24%), F (22%), B1 (18%), D (16%), A (8%), C (6%) and E (6%), respectively seen. All studied isolates could be classified using the new Clermont phylogenetic classification method. A variety of phylogenetic groups were observed among the studied isolate.

**Keywords:** *Uropathogenic Escherichia coli*, *Urinary tract infection*, *New Clermont grouping*

## بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه مرزه سهندیکا (*Satureja sahendica*) بر استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از ورم پستان گاو

امیر چراغی<sup>۱\*</sup>، محمد امین ترابی<sup>۲</sup>

۱- دانش‌آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- دانش‌آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۵ اردیبهشت ۱۴۰۱، بازنگری: ۳ خرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۹ خرداد ۱۴۰۱

### چکیده

ورم پستان یکی از پرهزینه‌ترین بیماری‌های موجود در صنعت دامپزشکی بوده که علاوه بر خسارات مالی، تبعات بهداشتی فراوانی را برای جامعه انسانی نیز به همراه داشته است. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین علل بروز این بیماری در دامداری‌ها بوده که به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود برخی خواص میکروبیولوژیک مقاومت بسیار بالایی به طیف وسیعی از داروهای صنعتی دارد. در این پژوهش از گیاه مرزه سهندیکا با نام علمی (*Satureja sahendica*) بدین منظور استفاده شد. برای انجام این پژوهش بعد از نمونه‌گیری از شیر دام‌های ورم پستانی، نمونه‌های اخذ شده تحت شرایط استریل و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شده و پس از کشت نمونه در محیط‌های کشت آزمایشگاهی و تأیید وجود باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای این گونه مشخص شد. نتایج حاصل مشخص کرد که اسانس این گیاه در غلظت  $2,3 \pm 0,82$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای (MIC) و  $10,14 \pm 3,66$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای (MBC) بر روی باکتری مذکور مؤثر است. نهایتاً مشخص شد می‌توان از اسانس گیاه مرزه سهندیکا برای جلوگیری از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به جهت کنترل بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ورم پستان، مرزه سهندیکا، MIC، MBC

## مقدمه

از گذشته تاکنون آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی و دامپزشکی به‌منظور درمان عفونت‌های باکتریایی کاربرد داشته‌اند، همین استفاده بی‌رویه از داروها سبب ایجاد معضلی به نام مقاومت دارویی شده است (۱).

التهاب بافت پارانشیم غدد پستانی که اصطلاحاً ورم پستان نامیده می‌شود علاوه بر کاهش ترشح شیر، ترکیب آن را نیز دستخوش تغییر می‌کند. بیماری ورم پستان گاو، پرهزینه‌ترین بیماری در صنعت دامداری محسوب می‌شود چرا که میزان کیفیت و کمیت شیر تولید شده توسط گاو ارتباط مستقیمی با بافت پستانی، کارایی سلول‌های ترشح کننده شیر و فراهم بودن مواد مغذی در جیره حیوان دارد (۲).

اثرات اقتصادی بیماری ورم پستان در صنعت شیر و لبنیات بر کسی پوشیده نیست. امروزه به اثبات رسیده است که این بیماری پرهزینه‌ترین بیماری گاو شیری می‌باشد، به طوری که خسارات اقتصادی آن در آمریکا سالانه حدود دو میلیارد دلار برآورد شده است و در اروپا نیز باعث خسارات اقتصادی مشابه می‌شود (۳).

ورم پستان ناشی از التهاب غدد پستانی است که عمدتاً ناشی از عفونت‌های باکتریایی است. باکتری‌های عامل این بیماری به دو دسته مسری شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه و مایکوپلاسما بوویس و عوامل محیطی شامل اش‌ریشیاکلی، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استرپتوکوکوس بوبریس تقسیم‌بندی می‌شوند. از بین تمامی عوامل مسبب ورم پستان در گاو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مهم‌ترین عامل ورم پستان و اگیردار می‌باشد که سلامت گاو را تهدید می‌کند. از این رو به سبب ممانعت از بروز بیشتر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یافتن ماده‌ای مؤثر و کم‌عارضه برای

درمان ورم پستان استافیلوکوکوس گاو ضروری به نظر می‌رسد (۴، ۵).

آمار جهانی نشان می‌دهد که مصرف سالانه گیاهان دارویی به دلیل افزایش مقاومت عوامل بیماری‌زا به داروهای صنعتی در کشورهای اروپایی و حتی کشورهای در حال توسعه در سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است. داروهای گیاهی به دلیل عواملی نظیر ارزش اقتصادی کم و کم هزینه بودن تولید آنها. نداشتن اثرات جانبی بر محیط زیست، کم بودن عوارض داروهای گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به داروی گیاهی، انحصاری بودن درمان برخی از بیماری‌ها با داروهای گیاهی و وجود تجربیات مختلف بالینی در رابطه با گیاهان دارویی سبب شده است که این منابع ارزشمند دارویی از جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (۶).

جنس مرزه متعلق به تیره نعنائیان است که عمدتاً بومی مناطق مدیترانه شرقی و غرب آسیا می‌باشد. به‌طور کلی برای این گیاه خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد التهاب و ضد تهوع و تقویت کننده معده گزارش شده. در مرزه سهندیکا، مهم‌ترین اجزاء تشکیل دهنده اسانس شامل بورنئول و ترکیبات فنولیک نظیر تیمول و کاروکرول می‌باشد. برای ترکیبات فنولیک اثرات ضد میکروبی شاخصی گزارش شده است. همچنین امروزه اثبات شده است که بورنئول خاصیت ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد قارچی دارد به طوری که در بسیاری از محصولات بهداشتی درمانی از آن استفاده می‌شود (۷).

در پژوهشی مشابه که به بررسی تأثیر سه گونه مرزه (*S. mutica*، *S. bachtiarica*، *S. edmondi*) بر سالمونلا پاراتیفی پرداخته شد، مشخص گردید که اسانس این گیاهان قدرت مهارکنندگی و میکروب‌کشی بالایی دارند. به نظر می‌رسد حضور

آزمایش با زاویه ۴۵ درجه نگهداشته شد تا مستقیماً عمل تخلیه در داخل لوله انجام گیرد و در هر لوله یک بار دوشش انجام شد. این عمل برای هر کارتیبه به صورت جداگانه انجام شد بدون اینکه لوله آزمایش با پستان برخوردی داشته باشد. در نهایت نمونه‌ها در کنار یخ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و ظرف مدت یک ساعت به آزمایشگاه منقل شدند.

**آزمایش باکتریایی:** جهت بررسی اثر ضد میکروبی گیاه مرزه سهندیکا، سویه استاندارد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) و تعداد ۲۱ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از ورم پستان گاو مورد آزمایش قرار گرفت. استوک باکتری‌ها ابتدا به منظور تقویت باکتری مورد نظر بر روی محیط کشت آبگوشت مغز و قلب (BHI) کشت شدند. سپس بر روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) دوباره کشت داده شده و از کلونی‌های مجزا بر روی محیط کشت مانیتول سالت آگار (MSA) کشت مجدد انجام گردید تا صحت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تأیید گردد. در مرحله بعد از باکتری‌های تأیید شده بر روی محیط کشت مولر هینتون برات (MHB) کشت گردید. بعد از گذشت ۱۸ ساعت، غلظت نیم مک فارلند که کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml ایجاد می‌کند با دستگاه اسپکتروفتومتر و کووت‌های استریل تهیه گردید (۱۱).

**تهیه اسانس گیاه مرزه سهندیکا:** به منظور اسانس‌گیری، ۱۰۰ گرم گیاه مرزه سهندیکا از دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران (شامل برگ‌های جدا شده بدون ساقه و ریشه) تهیه و در یک لیتر آب مقطر با حرارت ملایم به مدت ۳ الی ۴ ساعت با دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد. بعد از تهیه اسانس مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی استافیلوکوکوس

تیمول، کارواکرول، پاراسیمین و گاماترپینن در اسانس مورد مطالعه می‌تواند باعث وجود خواص ضد میکروبی در آنها باشد (۸).

غربالگری خواص ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک از روغن‌های فرار تقطیر شده از قسمت‌های هوایی گیاه مرزه باغی و سهندی علیه باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیاکلی انجام شده و نتایج حاکی از توقف رشد تمام میکروارگانیسم‌های کشت شده بود (۹).

در مطالعه دیگر نشان داده شده است که اسانس مرزه باغی از نظر مهارکنندگی رشد و کشندگی باکتری‌های مورد نظر بسیار قوی می‌باشد که این عملکرد احتمالاً به دلیل وجود کارواکرول موجود در این اسانس می‌باشد. کارواکرول عملکرد غشاء سلولی را از طریق تغییر در نفوذپذیری کانال‌های غشایی مختل می‌کند و با تغییر در شیب غلظت یونی منجر به توقف و اختلال در عملکرد سلول‌های باکتری و مرگ می‌شود (۱۰).

با توجه به مطالب فوق و با تأکید بر یافتن ماده‌ای کم عارضه به منظور جایگزینی با آنتی‌بیوتیک در درمان ورم پستان با منشاء استافیلوکوکوس اورئوس این پژوهش انجام شد، تا علاوه بر شفاف‌سازی کاربرد این گیاه، امکان کاربرد بالینی آن در مزارع را نیز ممکن سازد.

## مواد و روش‌ها

**تهیه نمونه شیر:** بدین منظور بعد از اطمینان از تمیز بودن دست ابتدا سرپستانک‌ها با آب شسته شده و سپس خشک گردید. پس از آماده سازی سرپستانک‌ها ۷ تا ۱۰ بار با پنبه آغشته به الکل، سرپستانک‌ها ضد عفونی شد. جهت خارج کردن باکتری‌های محیطی موجود در مجرا ۴ تا ۶ دوشش اول (پیش دوشش) دور ریخته شد و پس از آن لوله

اورئوس در میکروپلیت ۹۶ خانه استافیلوکوک با سه تکرار بررسی شد.

#### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC):

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری برای اسانس مرزه سهندیکا از روش برات میکروداپلوشن (Microdilution Broth) استفاده شد (۱۲).

بدین منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون برات به داخل هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مواد مورد آزمایش (اسانس مرزه سهندیکا حل شده در دی‌متیل سولفوکساید با غلظت نهایی ۱۰ درصد)، در چاهک اول اضافه شد و به صورت سریالی two-fold رقیق شد و در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند (600nm=0.1OD) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. پس از آن پلیت به وسیله پارافیلیم برای جلوگیری از دهیدره شدن پوشانده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون ۳۰ میکرولیتر از رزازورین ۰/۰۱ درصد به هر کدام از چاهک‌ها اضافه گردید و دوباره به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. تغییر رنگ محلول رزازورین از رنگ آبی به صورتی روشن نشان‌دهنده احیاء شدن رزازورین و در نتیجه رشد باکتری است.

بعد از انکوباسیون آخرین چاهک با کمترین غلظت از ماده مورد آزمایش که به رنگ آبی است، به عنوان مقدار MIC ثبت گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار گردید. لازم به ذکر است که برای هر میکروپلیت یک سری کنترل نیز در نظر گرفته شد که عبارتند از:

۱- کنترل مثبت (ردیفی که در آن به جای ماده مورد آزمایش، ۱۰۰ میکرولیتر سیپروفلوکساسین (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه گردید و

رقت‌سازی انجام شد شامل (محیط کشت+آنتی‌بیوتیک+باکتری)

۲- کنترل منفی (ردیفی که در آن به جای ماده مورد آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر حلال شامل (آب مقطر و دی‌متیل سولفوکساید ده درصد) در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام شد شامل (محیط کشت+حلال+باکتری)

۳- کنترل استریل بودن مواد مورد آزمایش (ردیفی که در آن ۱۰۰ میکرولیتر از مواد مورد آزمایش در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت شامل (محیط کشت+مواد مورد آزمایش)

۴- کنترل رشد باکتری (ردیفی که در آن ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت شامل (محیط کشت+باکتری).

#### تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC):

MBC کمترین غلظت از ماده مورد آزمایش است که قادر به کشتن ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های تلقیح شده طی ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. برای تعیین این مقدار، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی موجود در چاهک MIC و نیز چاهک‌های حاوی غلظت ماده مورد آزمایش بیشتر از MIC (یعنی همه چاهک‌های آبی‌رنگ)، برداشته شده و سوسپانسیون مربوط به هر یک از رقت‌های مذکور بر روی محیط مولر هینتون آگار متفاوت تلقیح گردید. پلیت‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از نظر رشد باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت چاهکی که قادر به کشتن ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های تلقیح شده بر روی محیط مولر هینتون آگار شده، به عنوان MBC ثبت گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار گردید، لازم به ذکر است در MHA از هر چاهک سه بار کشت

انجام شده است (۱۳).

**آنالیز آماری:** کلیه عملیات آماری این پژوهش به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آزمون Repeat measure ANOVA در سطح معناداری  $P \leq 0.05$  انجام گرفت.

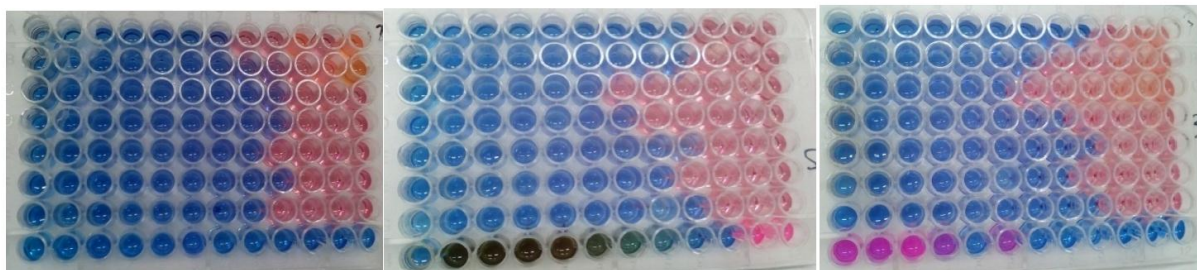
### نتایج

**حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC):** تمامی نمونه‌های پس از کشت در محیط آگوست مغز و قلب (BHI) و نوترینت آگار (NA) و انتقال کلنی‌ها بر روی محیط مانیتول سالت آگار (MSA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین تمامی باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش از نظر فنوتیپی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفتند. بدین صورت که هر نمونه باکتریایی که در محیط MSA رشد کرده و نیز توانسته بودند قند مانیتول را تخمیر کنند تحت عنوان باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس وارد مطالعه شدند.

نتایج حاصله با نتایج کشت سویه استاندارد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقایسه و ثبت گردید. نتیجه حاصل از تعیین MIC اسانس مرزه سهندیکا در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه با به کارگیری روش برات میکرودايلوشن در جدول شماره یک گزارش شده است.

بر این اساس، میزان MIC برای اسانس مرزه سهندیکا در جدایه استافیلوکوکوس اورئوس  $2,3 \pm 0,82$  میلی گرم در میلی لیتر بود. این مقدار برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۱/۲۵ الی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. نمونه‌ای از محاسبه MIC با استفاده از روش میکرودايلوشن برات و با کارگیری رزازورین در تصاویر شماره دو، سه و چهار گزارش شده است.



شکل ۱- نمونه‌ای از نتیجه تست MIC با استفاده از اسانس مرزه سهندیکا بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه پس از اضافه نمودن اجزاء کننده رزازورین

$10,14 \pm 0,366$  میلی گرم در میلی لیتر بود. این مقدار برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶۰ و  $160 <$  میلی گرم در میلی لیتر بود.

**نتیجه آزمایش حداقل غلظت کشندگی (MBC):** میزان MBC اسانس گیاه مرزه سهندیکا در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

جدول ۱- مقدار MIC و MBC عصاره گیاه مرزه سهندیکا بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

انحراف معیار	میانگین	استافیلوکوکوس اورئوس
۰,۸۲	۲,۳	MIC(mg/ml)
۳,۶۶	۱۰,۱۴	MBC(mg/ml)

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های سیستمیک تهدید کننده حیات می‌باشد، این باکتری از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی جامعه است و نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها و ماکرولیدها مقاومت نشان می‌دهد، که این مقاومت به دلیل استفاده بیش از حد از داروها، توانایی بالا در تبادلات ژنتیکی و حضور انواع پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۱).

این باکتری با تولید بتالاکتاماز نسبت به بسیاری از پنی‌سیلین‌ها مقاوم می‌شود و مقاومت این گونه به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام (نفسیلین، متی‌سیلین، آگازاسیلین) نیز به وسیله تغییر در پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین ایجاد می‌شود. مقاومت پلاسمیدی نسبت به تتراسایکلین‌ها، ماکرولیدها و آمینوگلیکوزیدها نیز در این باکتری شایع است (۱۴).

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اسانس‌های گیاهان دارویی نظیر سیر و رزماری با توجه به دارا بودن اثرات ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های اصلی مولد ورم پستان می‌تواند کاندیدای مناسبی به منظور جایگزین شدن در درمان ورم پستان باشد (۶).

در پژوهشی که برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاه مرزه و با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکروپلیت دایلوژن انجام شد نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن، با توجه به اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری، نشان داد اسانس مرزه خالص (غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر)، نسبت به اسانس با غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر، خاصیت ضد میکروبی قوی‌تری دارد. اسانس خالص بیشترین اثر مهاری را بر رشد استرپتوکوکوس سانگوئیس و ایکنلا کورودنس، به‌طور یکسان و پس از آن

به ترتیب، بر اکتینومایسس ویسکوز و انتروکوکوس فکالیس داشت، نتایج این پژوهش با پژوهش حاضر همپوشانی دارد چرا که در هر پژوهش گیاه مرزه اثر ضد باکتریایی خود را نشان داده و از تکثیر بیشتر گونه‌های کشت شده جلوگیری کرده است (۱۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس گیاه مرزه سهندیکا اثر مهاری خوبی بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با حداقل غلظت مهارکنندگی  $2,3 \pm 0,82$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی  $10,14 \pm 3,66$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارد، اگرچه کارایی اجزاء اسانس هر گیاه به عوامل مختلف جغرافیایی بستگی دارد با این حال این نتایج حاکی از این امر است که اسانس مرزه سهندیکا دارای فعالیت ضد میکروبی نسبتاً قوی در برابر جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. این نتایج با مطالعات قبلی همسو تلقی گشته و به نظر می‌رسد اثرات فوق ناشی از وجود کارواکرول و تیمول در اسانس این گیاه می‌باشد.

فعالیت بازدارندگی تیمول ناشی از وجود هیدروکسی فنولیک در آن می‌باشد. وجود گروه هیدروکسی فعال باعث شده که این ماده بتواند به آسانی با جایگاه فعال آنزیم‌ها پیوند هیدروژنی تشکیل دهد، همچنین تیمول سبب تخریب و از بین رفتن یکپارچگی غشاء باکتری و در نهایت مرگ آن خواهد شد (۱۶).

اثر ضد میکروبی عصاره مرزه بر روی برخی باکتری‌ها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و پروتئوس میرابیلیس مشاهده شده است. همچنین اثر ضد باکتریایی این گیاه بر علیه باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده است. نتایج مطالعات حاضر نیز تأیید کننده اثرات ضد باکتریایی اسانس مرزه سهندیکا بر روی باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس است که با مطالعه کنونی مطابقت دارد (۷).

در مطالعه دیگری اثرات ضد باکتری و ضد قارچ اسانس گیاه مرزه و آویشن بر جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد اسانس‌های مرزه و آویشن اثرات سمی حتی تا حداقل غلظت کشندگی ده برابر ندارد، بنابراین به نظر می‌رسد مواد مناسبی برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم هستند. نتایج حاصل از پژوهش ما، نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه مرزه بود. با توجه به اینکه باکتری‌های بررسی شده در این مطالعه با مطالعه ما متفاوت بود ولی، می‌توان گفت اسانس مرزه بر رشد طیف وسیع تری از باکتری‌ها اثر مهاری دارد (۱۷).

در مطالعه دیگری به بررسی قابلیت ضد باکتریایی و مهار تشکیل بیوفیلمی استرپتوکوکوس موتانس به وسیله عصاره متانولی مرزه خوزستانی پرداخته شد که نتایج این پژوهش نشان داد مرزه خوزستانی قابلیت ضد باکتریایی بالایی در برابر فرم منفرد استرپتوکوکوس موتانس داشته و گاماترپین و کارواکرول ترکیبات مؤثر این گیاه در بروز قابلیت مهار تشکیل بیوفیلم باکتری مذکور می‌باشد (۹).

در تحقیق دیگری که به بررسی اسانس مرزه پرداخته شد، با روش میکرودايلوشن بر اث فعالیت این گونه مرزه علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آیروجینوزا، اشیشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم ارزیابی شد. در این مطالعه سودوموناس آیروجینوزا به اسانس مرزه مقاومت بیشتری نشان داد، در حالی که استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیاکلی نسبت به آن حساس تر بودند به طوری که میزان MIC برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، اشیشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم یک میلی گرم بر میلی لیتر و سودوموناس آیروجینوزا ۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

مطالعه ما نیز با نتیجه این پژوهش در رابطه با اثر اسانس مرزه بر استافیلوکوکوس اورئوس همخوانی دارد (۱۸).

در مطالعه دیگری اثرات ضد میکروبی اسانس اکالیپتوس، زیره سبز و مرزه تابستانی بر استرپتوکوکوس موتانس بررسی شده است. نتایج این مطالعه نشان داد هر سه اسانس دارای اثر ضد باکتریایی در برابر استرپتوکوک موتانس هستند. اسانس مرزه در مقایسه با دو اساس دیگر قوی ترین اثر ضد باکتریایی را در همه زمان‌های قرارگرفتن در معرض اسانس و در تمام غلظت‌ها نشان داد. این مطالعه نیز با وجود تفاوت در گونه باکتری، تأییدی بر یافته‌های مطالعه ماست (۱۹).

در مطالعه مشابه دیگر که به بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی مرزه کوهی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس طی نگهداری گوشت چرخ کرده پرداخته شد، مشاهده شد که غلظت‌های ۰/۲۵ درصد به بالای مرزه می‌تواند باعث ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و شمارش کلی میکروب‌ها در گوشت چرخ کرده شود که نتایج پژوهش حاضر نیز بیانگر اثرات بازدارندگی رشد مرزه در برابر باکتری مذکور می‌باشد، البته در مورد مرزه سهندیکا این غلظت از مقدار ۰/۹ میلی گرم در میلی لیتر شروع می‌شود که این اختلاف در غلظت می‌تواند مربوط به تفاوت در ترکیبات مرزه کوهی و مرزه سهندیکا باشد (۲۰).

کارواکرول اثر ضد باکتریایی وسیع الطیف بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از جمله اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارد و با تعویض گروه هیدروکسیل خود با یون پتاسیم به عنوان حامل یون‌های یک ظرفیتی در غشاء عمل کرده و با برهم زدن شیب غلظتی در غشاء سیتوپلاسمی اثر ضد باکتریایی خود را اعمال می‌کند. هر چند اثر ضد باکتریایی، حاصل اثر

میکروبی مهمی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس تهیه شده از گیاه مرزه سهندیکا، اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از ورم پستان گاو دارد. این امر احتمالاً به علت وجود ترکیبات فنولیک (تیمول و کارواکرول) موجود در اسانس این گیاه می‌باشد، هرچند محتمل است که غلظت اسانس مورد استفاده نیز در خاصیت ضد میکروبی آن دخیل باشد. با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی روزافزون به داروهای صنعتی موجود، به نظر می‌رسد مطالعه بر روی گیاه مرزه سهندیکا برای درمان و جلوگیری از بروز مقاومت‌های دارویی راهگشا باشد.

### References

- 1- Shawky M, Suleiman WB, Farrag AA. Antibacterial resistance pattern in clinical and non-clinical bacteria by phenotypic and genotypic assessment. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2021; 15: 7220–7229.
- 2- Krishnamoorthy P, Goudar AL, Suresh KP, Roy P. Global and countrywide prevalence of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle and buffaloes by systematic review and meta-analysis. *Research in veterinary science*. 2021; 136: 561–586.
- 3- Libera K, Konieczny K, Witkowska K, Żurek K, Szumacher-Strabel M, Cieslak A, et al. The Association between Selected Dietary Minerals and Mastitis in Dairy Cows—A Review. *Animals*. 2021; 11: 2330.
- 4- Holmes MA, Zadoks RN. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2011; 16: 373–382.
- 5- Pereira UP, Oliveira DGS, Mesquita LR, Costa GM, Pereira LJ. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Veterinary microbiology*. 2011; 148: 117–124.
- 6- Al-Snafi AE. Medicinal plants alkaloids, as

ترکیبات اصلی و ترکیبات با مقادیر کم می‌باشد ولی اثر ضد باکتریایی بعضی ترکیبات از جمله کارواکرول و تیمول بیشتر است و قویتر بودن اثرات ضد باکتریایی مریم گلی نسبت به مرزه می‌تواند به مقدار بیشتر مجموع کارواکرول و تیمول در مریم گلی (۴۶/۸۱ درصد) نسبت به مرزه (۳۹/۹۵ درصد) مربوط باشد (۱۶).

از آنجایی که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم دخیل در ورم پستان محسوب می‌شود و مقاومت دارویی در این مورد در حال افزایش است، بنابراین استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با این باکتری در بیماری‌های مختلف از جمله ورم پستان در اولیت قرار می‌گیرند. نتایج این مطالعه نیز نشان داد مرزه سهندیکا از جمله گیاهانی است که اثرات ضد

promising therapeutics-A review (part 1). *IOSR J Pharm*. 2021; 11: 51–67.

7- Sefidkon F, Emami Bistgani Z. Integrative review on ethnobotany, essential oil, phytochemical, agronomy, molecular and pharmacological properties of *Satureja* species. *Journal of Essential Oil Research* 2021; 33: 114–132.

8- Sharchi R, Shayegh J, Hosseinzadeh S. Anti-quorum sensing and antibacterial activities of *Satureja sahendica* hydroalcoholic extract against avian isolate of *Salmonella Typhimurium*. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. 2020; 12: 71–79.

9- Khaleli A, Meskini M. A systematic review of the effects of *Satureja khuzestanica* Jamzad and *Zataria multiflora* Boiss against *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian journal of medical sciences*. 2020; 45: 83.

10- De Sousa R. Plant-based pesticides: Potential of apiaceae essential oils. 2016; 1: 110.

11- McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*. 1907; 49: 1176–1178.

12- Weseler A, Geiss HK, Saller R, Reichling

J. A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 60: 498–502.

13- **Owuama CI**. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African journal of microbiology research*. 2017; 11: 977–980.

14- **Ali T, Basit A, Karim AM, Lee J-H, Jeon J-H, Rehman S** *ur et al.* Mutation-based antibiotic resistance mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Pharmaceuticals*. 2021; 14: 420.

15- **Iranpour A, Bayani M, Arjmanzadeghan M, Nokhostin A**. Antibacterial activity and antibiofilm properties of safflower essential oil on bacteria involved in periodontal disease. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2019; 22: 16–27.

16- **Masocatto DC, Matsumoto MA, Coelho TMK, Jardim ECG, de Mendonça JCG, da Silva JCL** *et al.* Comparison of antimicrobial activity of thymol and carvacrol to chlorhexidine in sur-

gery. *Research, Society and Development*. 2021; 10: e4310716310–e4310716310.

17- **Sharifi A, Mohammadzadeh A, Zahraei Salehi T, Mahmoodi P**. Antibacterial, antibiofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of applied microbiology*. 2018; 124: 379–388.

18- **Ghadery L, Aliahmadi A, Ebrahimi SN, Rafati H**. Effective Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by *Satureja khuzistanica* essential oil nanoemulsion. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021; 61: 102260.

19- **Zomorodian K, Ghadiri P, Saharkhiz MJ, Moein MR, Mehriar P, Bahrani F** *et al.* Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections. *Jundishapur journal of microbiology*. 2015; 8.

20- **Cui H, Wang Y, Li C, Chen X, Lin L**. Antibacterial efficacy of *Satureja montana* L. essential oil encapsulated in methyl- $\beta$ -cyclodextrin/soy soluble polysaccharide hydrogel and its assessment as meat preservative. *Lwt*. 2021; 152: 112427.

## Antibacterial effect of (*Satureja sahendica*) essential oil on *Satureja sahendica* *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis

Amir Cheraghi<sup>1\*</sup>, Mohammad Amin Torabi<sup>2</sup>

1- Graduate in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Graduate in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University of Research Sciences, Tehran, Iran.

Receive: April 25, 2022; Revise: May 24, 2022; Accept: June 19, 2022

### Summary

---

Mastitis is one of the most costly diseases in the veterinary industry, which in addition to financial losses, has many health consequences for human society. *Staphylococcus aureus* is one of the most important causes of this disease in livestock, which has a very high resistance to a wide range of industrial drugs due to the indiscriminate use of antibiotics and the presence of some microbiological properties. In this study, the Sahendica sage plant with the scientific name (*Satureja Sahendica*) was used for this purpose. For this study, after sampling the milk of mastitis animals, the samples were taken under sterile conditions and transferred to the laboratory beside the ice, and after culturing the sample in laboratory culture media and confirming the presence of *Staphylococcus aureus*. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MBC) values were determined for this species. The results showed that the essential oil of this plant in the average concentrations of  $2.3 \pm 0.82$  mg/ml for (MIC) and  $10.14 \pm 3.66$  mg / ml for (MBC) is effective on the bacterium. Finally, it was found that Sahandika safflower essential oil can be used to prevent the growth of *Staphylococcus aureus* to control the development of antibiotic resistance.

**Keywords:** *Mastitis, Satureja sahendica, MIC, MBC*

## مقایسه دو روش خالص‌سازی بتا توکسین کلاستریدیوم پرفرنزئس تیپ B

راضیه جعفری خوشن‌آبادی<sup>۱</sup>، محسن فتحی نجفی<sup>۲\*</sup>، محمد مومن هروی<sup>۱</sup>، محمدرضا بزرگمهر<sup>۱</sup>

۱- گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۲- گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. و مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۲۶ فروردین ۱۴۰۱، بازنگری: ۲ اردیبهشت ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳ اردیبهشت ۱۴۰۱

### چکیده

کلاستریدیوم پرفرنزئس یک باکتری بی‌هوازی است که از بین سویه‌های آن فقط تیپ B و C می‌توانند بتا توکسین را تولید کنند. بتا توکسین نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌های انسان و حیوان دارد و تأثیر مهلکی بر روده می‌گذارد. مطالعه‌ی حاضر با هدف مقایسه دو روش خالص‌سازی برای استخراج بتا توکسین از کلاستریدیوم پرفرنزئس تیپ B انجام شد. به‌عنوان روش اول، بتا توکسین با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی ستونی (سفادکس G-25) و کروماتوگرافی تعویض یونی خالص‌سازی شد، در حالی که در روش دوم از کروماتوگرافی افینیتی استفاده شد. فعالیت همولیزی و مقدار پروتئین در هر مرحله از خالص‌سازی اندازه‌گیری شد. خلوص بتا توکسین در هر مرحله با استفاده از الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شد. با توجه به نتایج مقایسه این دو روش نشان داد که بازده روش اول ۸۲/۸ درصد و بازده روش دوم ۹۰/۱ درصد بود. مقادیر فعالیت ویژه برای روش اول و دوم به ترتیب ۲۳۶۸/۱ U/mg و ۱۶۴/۵ U/mg محاسبه شد. نتایج ما نشان می‌دهد که کروماتوگرافی افینیتی می‌تواند برای خالص‌سازی بتا توکسین از کلاستریدیوم پرفرنزئس تیپ B با خلوص بالا و نسبت فعالیت به پروتئین (۴۳۷۰ HU/mg) استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** کلاستریدیوم پرفرنزئس تیپ B، بتا توکسین، کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی افینیتی

## مقدمه

کلستریدیوم پرفرنزئوس باکتری گرم‌مثبت، میله‌ای شکل و غیرمتحرک است که قادر به تشکیل اسپورهای مقاوم در برابر عوامل زیست محیطی است (۱، ۲). سویه‌های پرفرنزئوس چهار سم عمده به نام‌های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا که دارای فعالیت کشنده و نکروز هستند را دارد که به پنج گروه ایزوتایپ (A, B, C, D, E) تقسیم می‌شوند (۳). نوع مورد مطالعه در این تحقیق بتا توکسین می‌باشد که فقط توسط تیپ B و C تولید می‌شود (۴). بتا توکسین به‌عنوان یک عامل اصلی نکروز کننده آنتروکولیت و آنتروتوکسمی در انسان و حیوان شناخته شده است بنابراین برای بالا بردن کیفیت واکسن آنتروتوکسمی، خالص‌سازی مناسب بتا توکسین بسیار اهمیت دارد (۵).

روش‌های مختلفی به‌منظور خالص‌سازی پروتئین‌ها وجود دارد از جمله این روش‌ها می‌توان روش‌های مدرن و کلاسیک خالص‌سازی نظیر رسوب‌گیری با نمک آمونیوم سولفات، حلال‌های آلی، الکتروفورز، ژل فیلتراسیون و انواع کروماتوگرافی و... را نام برد (۶). اغلب فرایندهای کروماتوگرافی ترجیح داده می‌شوند، و از آنها می‌توان به‌طور اختصاصی برای اتصال و دفع پروتئین با خلوص بالا استفاده کرد (۷). به همین منظور روش‌های مختلف کروماتوگرافی توسعه یافته‌اند که شامل کروماتوگرافی ستونی، کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی نفوذ ژل، کروماتوگرافی با فشار بالا و کروماتوگرافی افینیتی می‌باشد (۸). اولویت‌های صنعتی برای استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، ستون‌های با جریان بالا است که در طول تعادل و شستشو نمونه حفظ شود (۹). مبنای کروماتوگرافی جذب سطحی میل ترکیبی فاز ساکن کروماتوگرافی است (۱۰).

کروماتوگرافی تعویض یونی یک تکنیک تاریخی است که به‌طور گسترده برای خالص‌سازی پروتئین‌های درمانی استفاده می‌شود (۱۱). به این صورت که پروتئین‌ها را بر اساس اختلاف در بار سطح مولکول‌ها از هم جدا می‌کند (۱۲). در سال ۲۰۱۲ Adalgisa Milach و همکارانش بتا توکسین کلستریدیوم پرفرنزئوس تیپ C تولید شده در *Escherichia coli* را با استفاده از روش کروماتوگرافی جذب سطحی خالص کردند (۱۳). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ انجام شد پروتئین بتا نوترکیب از کلستریدیوم پرفرنزئوس تیپ B نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA استخراج شد (۱۴). صیادمنش و همکارانش در سال ۲۰۱۳، با کمک روش کروماتوگرافی تمایلی (ستون نیکل) موفق به خالص‌سازی نروتوکسین بتولنیوم از کلستریدیوم بتولنیوم شدند (۱۵). در سال ۲۰۱۴ زائر زاده و همکارانش، با تلفیق چهار روش غلیظ‌سازی با آمونیوم سولفات، کاتیون کروماتوگرافی (CM)، آنیون کروماتوگرافی (DEAE) و در نهایت با ژل فیلتراسیون (G-100) بتا توکسین را از کلستریدیوم پرفرنزئوس تیپ C خالص‌سازی کردند. در سال ۲۰۱۱ فتحی نجفی، در پروژه‌ای با کمک رسوبدهی با PEG و سپس با استفاده از کروماتوگراف ستونی آلفا توکسین را از باکتری کلستریدیوم نووی خالص‌سازی کرد (۱۶). در سال ۲۰۱۱ جانسون اریک و همکارانش با بهره‌گیری از روش کروماتوگرافی یونی موفق به خالص‌سازی نروتوکسین BoNT/A3 از کلستریدیوم بتولنیوم شدند (۱۷). در این مطالعه، کروماتوگرافی روش کروماتوگرافی افینیتی با روش تلفیقی (رسوبدهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی تعویض یونی) برای خالص‌سازی بتا توکسین مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم و روش: کلستریدیوم

پرفرنزس تیپ B از مؤسسه تحقیقات واکسن و محاسبه درصد همولیز:  $100 \times \frac{\text{همولیز}}{\text{همولیز}} = \%$  سرم سازی رازی مشهد، اینزین کنترل شدت این باکتری

در محیط کشت عصاره کبد به مدت ۱۶ ساعت رشد داده شد. سپس در محیط پپتون پروتئوز برای تولید سم قرار گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۶-۵ ساعت در شرایط بسیار لطیف یعنی همولیزیت سانتریفوژ شد و مایع رویی برای مراحل خالص سازی استنفاده شد. فعالیت همولیزی و غلظت پروتئین در تمام مراحل اندازه گیری شد. سپس مایع رویی کشت به دو قسمت تقسیم شد تا در دو روش خالص سازی استفاده شود.

**تست همولیزین:** یک میلی لیتر خون با دور (۲۰۰۰rpm) به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب (گلبول قرمز) با دو برابر حجم اولیه توسط بافر PBS شستشو داده شد و برای ادامه آزمایش به آن ۱۰ برابر بافر PBS اضافه گردید.

۰/۲ میلی لیتر نمونه را با ۱ میلی لیتر RBC به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباتور قرار دادیم و سپس با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ انجام شد و جذب محلول رویی در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

**کنترل مثبت واکنش:** ۰/۲ میلی لیتر بافر PBS را با ۱ میلی لیتر RBC به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و رسوب حاصل با ۱/۲ میلی لیتر آب مخلوط و جذب در ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

**کنترل منفی واکنش:** ۰/۲ میلی لیتر PBS را با ۱ میلی لیتر RBC به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی را در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری کردیم. سپس فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول های زیر محاسبه شد.

فعالیت همولیزین: مقدار آنزیمی که قادر است ۱ درصد لیز سلولی RBC در واحد زمان و حجم ایجاد نماید:

**سنجش مقدار پروتئین:** غلظت پروتئین با روش برادفورد اندازه گیری شد که در آن از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. در این روش ۱۰۰ میلی گرم کوماسی برلیانت بلو G-250 در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد. سپس ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد (وزنی/حجمی) به مخلوط اضافه شد. هنگامی که رنگ به طور کامل حل شد، حجم مخلوط به ۱ لیتر تنظیم شد. پس از آن، نمودار استاندارد در برابر غلظت های مختلف (BSA ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) ترسیم شد. در نهایت ۲۵ میکرولیتر از نمونه به ۱۲۵ میکرولیتر از محلول برادفورد اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. میزان پروتئین هر نمونه با استفاده از شیب خط نمودار استاندارد محاسبه شد.

**خالص سازی بتا توکسین روش اول:** روش اول برای خالص سازی بتا توکسین در سه مرحله، یعنی رسوب دهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد (مراحل در زیر توضیح داده شده است). پس از هر مرحله، مقدار پروتئین و فعالیت آن با توجه به روش هایی که در بخش های قبل توضیح داده شد، تعیین شد. علاوه بر این، حضور بتا توکسین در هر مرحله با استفاده از الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شد.

**رسوب آمونیوم سولفات:** آمونیوم سولفات

فعالیت و مقدار پروتئین آنها سنجیده شده و در نهایت حضور بتا توکسین و میزان خلوص آن با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۲/۵٪ تأیید شد.

**روش دوم خالص‌سازی:** در روش دوم خالص‌سازی محلول رویی سانتریفوژ شده پس از پروتئین سنجی و تعیین میزان فعالیت با استفاده از روش کروماتوگرافی افینیتی خالص‌سازی شد و در انتها نیز میزان فعالیت و مقدار پروتئین تعیین گردید و همچنین بتا توکسین با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۲/۵ درصد ردیابی شد.

**کروماتوگرافی افینیتی:** پس از تعیین فاز ساکن (ما از لسیتین به‌عنوان فاز ساکن استفاده کردیم) آن را با بافر تریس  $\text{pH}=7$  به تعادل رساندیم و سپس ۲۵ میلی‌لیتر محلول رویی سانتریفوژ شده که حاوی پروتئین کلاستریدیوم پرفرژنس نوع B اضافه کردیم برای انجام عمل اتصال پروتئین مورد نظر بر روی لیگاند (لسیتین) به مدت ۱۵ دقیقه آن را در حمام آب سرد قرار دادیم. سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور  $12000 \text{ rpm}$  و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای خارج ساختن کامل ناخالصی‌ها عمل شستشو با ۲۵ میلی‌لیتر بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار  $\text{pH}=7$  در حمام آب سرد و سانتریفوژ با دور  $12000 \text{ rpm}$  و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دو بار انجام شد. در مرحله آخر برای جداسازی پروتئین هدف از فاز ساکن (لسیتین) به آن ۵ میلی‌لیتر بافر با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس با دور  $12000 \text{ rpm}$  و زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید این عمل نیز دو بار تکرار شد.

**الکتروفورز (SDS PAGE):** برای ارزیابی کیفی و بررسی مراحل خالص‌سازی، نمونه‌های هر مرحله

جامد (تا ۷۰ درصد اشباع) به مایع رویی کشت در حمام آب سرد اضافه شد و سپس با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌طور مداوم هم‌زده شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای رسوب بهتر پروتئین مورد نظر نگهداری شد. سپس با سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور در دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه) پروتئین رسوب شده. با حل کردن مخلوط حاصل در بافر تریس (۲۰ میلی‌مولار،  $\text{pH}=7$ ) جمع‌آوری شد.

**کروماتوگرافی ستونی:** بتا توکسین به‌دست آمده از مرحله قبل بر روی ستون Sephadex G-25 ( $1.2 \times 135$  سانتی‌متر)، از قبل متعادل‌شده با بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار ( $\text{pH}=7$ ) با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر بر ساعت بارگذاری شد. نمونه‌هایی با حجم ۳ میلی‌لیتر جمع‌آوری شدند و آنهایی که دارای فعالیت همولیزی بالا بودند، ادغام شدند و برای کروماتوگرافی تبادل یونی استفاده شدند.

**کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE سفادکس:** ستون کروماتوگرافی تعویض یونی با ابعاد ( $10 \text{ cm} \times 2$ ) در دمای اتاق بارگذاری شد. ابتدا رزین DEAE سفادکس اضافه شد و بعد برای به تعادل رساندن  $\text{pH}$  و مولاریته ستون با بافر تریس  $100 \text{ mM}$ ،  $\text{pH}=7$  شسته شد تا زمانی که میزان  $\text{pH}$  ورودی و خروجی ستون یکسان شد. سپس ستون از بافر کاملاً خالی شد و جریان خروجی ستون بسته شد و ۱ ml نمونه فعال به‌دست آمده از مرحله قبل وارد ستون شد و بعد از گذشت یک ساعت خروجی ستون باز شد و محلول خروجی جمع‌آوری شد. در مرحله بعد ستون DEAE سفادکس با ۲۰ ml بافر تریس ( $100 \text{ mM}$ ،  $\text{pH}=7$ ) شسته شد و سپس با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول  $\text{NaCl}$  ( $400$ ،  $500$ ،  $600$ ،  $800$ ،  $1000 \text{ mM}$ ) شسته شد. نمونه‌های شسته شده جمع‌آوری و میزان

سنجش سمیت سلولی نشان داد که بتا توکسین ماندگاری پایینی دارد و نگهداری طولانی مدت نقش مهمی در غیر فعال کردن بتا توکسین دارد.

### خالص سازی بتا توکسین: مقایسه خواص

مختلف فیزیکی و شیمیایی بین دو روش به کار برده شده خالص سازی بتا توکسین با دو روش مختلف انجام شد و شرایط خالص سازی در جدول ۱ خلاصه و مقایسه شد.

توسط الکتروفورز بررسی شد. ابتدا از ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵ درصد SDS-PAGE و سپس رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

### نتایج

#### میکروارگانایسم و رشد: با توجه به نتایج

SDS-PAGE و سنجش سمیت سلولی، بتا توکسین در مراحل اولیه رشد باکتری تشخیص داده شد.

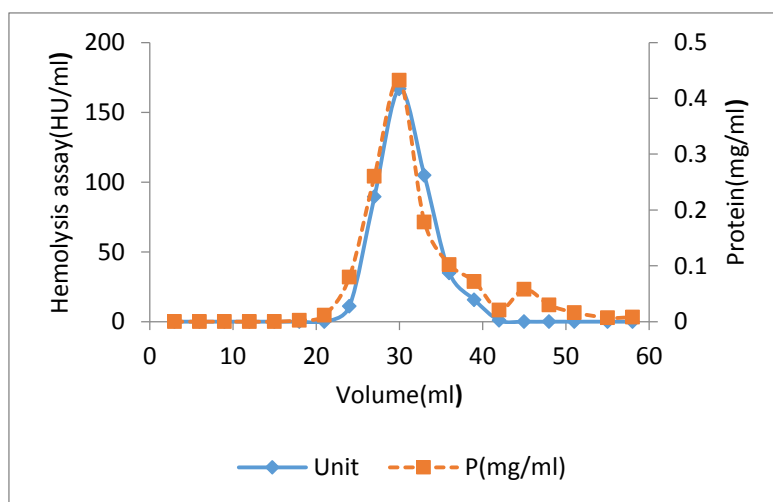
جدول ۱- شرایط خالص سازی بتا توکسین

مراحل	حجم (ml)	PH	زمان (h)	دما (°C)
سفادکس G-25	۱	۶	۳/۵	۲۵
سفادکس-DEAE	۳	۶	۲	۲۵
کروماتوگرافی جذب سطحی	۲۰	۷	۱	۴

نمک زدایی و حذف پروتئین های با وزن مولکولی کم خالص شد (شکل ۱).

#### روش اول خالص سازی (کروماتوگرافی

ترکیبی): بتا توکسین توسط آمونیوم سولفات و سپس کروماتوگرافی ستونی (سفادکس G-25) برای



شکل ۱- خالص سازی بتا توکسین با کروماتوگرافی ستون ژل (سفادکس G-25).

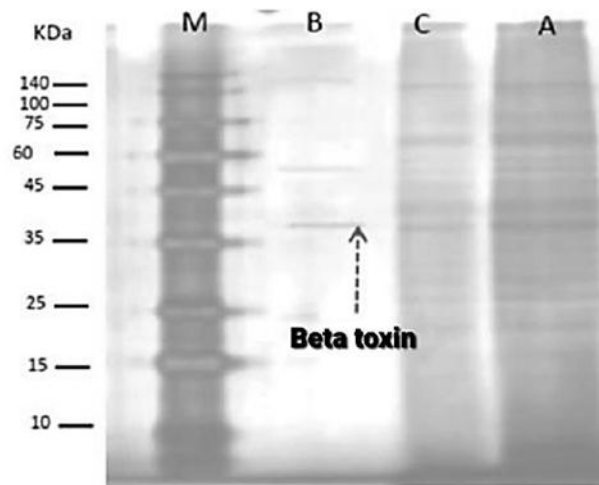
خاص استفاده شد. در نهایت، بتا توکسین همگن با فعالیت ویژه 2370U/mg، و ضریب خالص سازی

کروماتوگرافی تبادل یونی (DEAE سفادکس) برای حذف برخی پروتئین های دیگر و تعیین فعالیت

۱۴/۳ برابر خالص‌سازی و بازده ۸۲/۸ درصد خالص‌سازی شد. نتایج خالص‌سازی در جدول ۲ خلاصه شده است. پروتئین‌های خالص شده در هر

جدول ۲- مراحل خالص‌سازی کلستری‌دیوم پرفرژنس تیپ B (روش اول)

مرحله	پروتئین کل (mg)	فعالیت کل (U)	نسبت فعالیت به پروتئین (U/mg)	ضریب خالص‌سازی	بازده %
کشت	۵۶۰	92100	۱۶۴/۵	۱	۱۰۰
آمونیم سولفات	۴۸۸	۹۱۴۷۰	۱۸۷/۴	۱/۱	۹۹/۳
کروماتوگرافی ستونی	۱۰۹	89340	۸۱۹/۷	۴/۹	۹۷/۷
کروماتوگرافی تعویض یونی	۳۲	75780	۲۳۶۸/۱	۱۴/۳	۸۲/۸



شکل ۲- تجزیه و تحلیل ژل الکتروفورز مراحل خالص‌سازی بتا توکسین. A: نمونه رسوب آمونیم سولفات. C: نمونه خروجی از کروماتوگرافی ستون G-25. B: نمونه خروجی از کروماتوگرافی تعویض یونی. M: مارکر

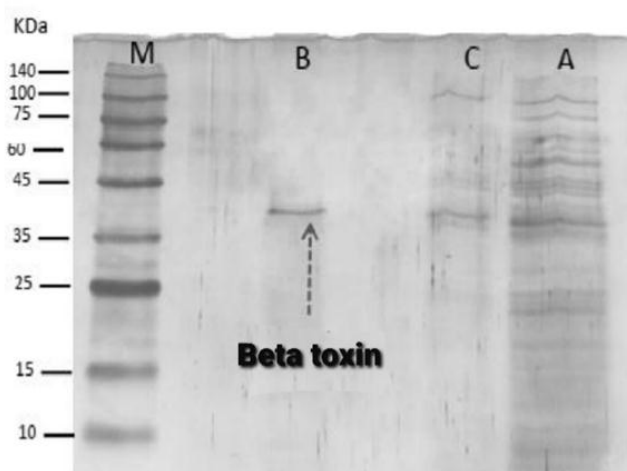
از بستر جدا شد. در نهایت، بتا توکسین همگن با فعالیت ویژه 4372U/mg و ۲۶/۵ برابر خالص‌سازی و بازده ۹۰/۱ درصد خالص‌سازی شد. بتا توکسین به صورت یک نوار در SDS PAGE ظاهر شد (شکل ۳). همان‌طور که در SDS-PAGE نشان داده شده است، بتا توکسین استخراج شده از کلستری‌دیوم

روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی جذب سطحی): بتا توکسین با استفاده از کروماتوگرافی جذب سطحی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با اتصال بتا توکسین به لسیتین به عنوان یک سوبسترا خالص شد. در این روش ناخالصی‌ها حذف و بتا توکسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

پرفرنزس نوع B در کروماتوگرافی جذب سطحی یک مرحله ای به خلوص بالا رسیده است.

جدول ۲- خالص سازی کلستریدیوم پرفرنزس تیپ B

مرحله	پروتئین کل (mg)	فعالیت کل (U)	نسبت فعالیت به پروتئین (U/mg)	ضریب خالص سازی	بازده %
کشت	۵۶۰	۹۲۱۰۰	۱۶۴/۵	۱	۱۰۰
کروماتوگرافی جذب سطحی	۱۹	۸۳۰۵۰	۴۳۷۱/۵	۲۶/۵	۹۰/۱



شکل ۳- تجزیه و تحلیل دو روش خالص سازی: A: سوپر ناتانت بتا توکسین. C: نمونه خروجی کروماتوگرافی تعویض یونی. B: نمونه خروجی کروماتوگرافی جذب سطحی. M: مارکر

## بحث

باکتری کلستریدیوم پرفرنزس به طور گسترده در خاک و محیط وجود دارد، و به عنوان جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و در حیوانات خونگرم نیز مشاهده می شود. کلستریدیوم پرفرنزس تحت شرایط خاصی می تواند به عنوان یک پاتوژن عمل نماید (۱۸). بتا توکسین کلستریدیوم پرفرنزس تیپ B یکی از علت های عمده بیماری روده در کشورهای توسعه یافته است (۱۹). به نظر می رسد واکسیناسیون مؤثرترین روش برای کنترل کلستریدیوز روده است (۲۰). به منظور سنجش ایمنی زایی واکسن و نیز سایر مطالعات مانند الیزا

که دارای دقت بالایی می باشند، در اختیار داشتن توکسین خالص بسیار اهمیت دارد. به همین دلایل انتخاب روش خالص سازی مناسب بسیار اهمیت دارد. اگر چه بتا توکسین چند بار با موفقیت خالص شده است (۲۱)، اما برخی از تلاش ها برای خالص سازی به خلوص بالا نرسیده است (۲۲). در این مطالعه برای اولین بار، ترکیب دو روش کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص بتا توکسین استفاده گردید و نتایج حاصل با روش کروماتوگرافی افینیتی نسبت به فاکتورهای مانند سرعت بالاتر، هزینه کمتر و سادگی نسبت به سایر مطالعات مقایسه گردید. و در

کنار این فاکتورها مهم‌ترین فاکتور که فعالیت توکسین می‌باشد مورد توجه قرار گرفت.

نتایج حاصل از روش اول این پژوهش (ابتدا ستون کروماتوگرافی سفادکس G-25 و سپس کروماتوگرافی تعویض یونی) در شرایط  $\text{PH}=7$  و دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) برای بتا توکسین کلاستریدیوم پرفرنزئس تیپ B نسبت فعالیت به مقدار پروتئین  $2368/1 \text{ U/mg}$  نشان داد. این در حالی است که در روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی افینیتی) با یک مرحله خالص‌سازی این کمیت برابر با  $4371/5 \text{ U/mg}$  به دست آمد.

بتا توکسین کلاستریدیوم پرفرنزئس نوع C توسط Sakurai و همکارانش با انجام متناوب چهار روش خالص‌سازی (اضافه کردن آمونیوم سولفات، ژل فیلتراسیون با سفادکس G-100، isoelectrofocusing در محدوده ۳ تا  $\text{PH}=6$  و سپس کروماتوگرافی immunoaffinity خالص شد، نتایج حاصل از پژوهش Sakurai بیانگر این بود که پروتئین مورد بررسی آنها نهایت به خلوص ۸۰ درصد رسید (۲۳). در مطالعه حاضر با استفاده از کروماتوگرافی ستون سفادکس G-25 بتا توکسین به خلوص حدود ۳۰ درصد رسید و بعد از آن با انجام متناوب کروماتوگرافی تعویض یونی خلوص بتا توکسین به حدود ۷۰ درصد رسید. اما با استفاده از کروماتوگرافی افینیتی در یک مرحله خلوص توکسین به بیش از ۹۰ درصد رسید که نشان دهنده‌ی کارایی و سرعت بالای این روش می‌باشد. در مقایسه‌ای که در سال ۲۰۰۴ در آزمایشگاه ایمونوپاتولوژی Keizo-Asam انجام شد روش کروماتوگرافی ایمنی (immunoaffinity chromatography) با درصد بازده ۲۴ درصد به‌عنوان روش برتر برای خالص‌سازی بتا توکسین معرفی شد (۲۴). در حالی که روش کروماتوگرافی افینیتی انجام شده در این مطالعه درصد بازده  $90/1$

درصد را نشان می‌دهد. Bharti و همکاران در سال ۲۰۱۴ بتا توکسین را ابتدا با رسوبدهی آمونیوم سولفات و سپس با استفاده از ستون فسفات سلولز خالص کردند (۲۱). البته روش کروماتوگرافی افینیتی انجام شده در مطالعه حاضر در مقایسه با روش Bharti دو مزیت عمده دارد که شامل هزینه کمتر و مراحل کمتر روش مورد استفاده و قابلیت تولید بیشتر توکسین در مقیاس صنعتی می‌باشد. از آن جایی که در خالص‌سازی حجم نمونه بسیار اهمیت دارد مطابق با جدول (۱) در روش کروماتوگرافی ستونی حجم نمونه مورد استفاده در یک مرحله خالص‌سازی ۱ ml می‌باشد و در کروماتوگرافی تعویض یونی حجم نمونه سه برابر کروماتوگرافی ستونی می‌باشد، اما در روش کروماتوگرافی افینیتی حجم نمونه در یک مرحله ۲۰ ml می‌باشد که خود نشان‌دهنده کارایی این روش در حجم زیاد و مقادیر صنعتی می‌باشد. همچنین روش کروماتوگرافی افینیتی از نظر دسترسی به مواد و هزینه انجام شده مقرون به صرفه می‌باشد. از دیگر پارامترهای مهم در خالص‌سازی مدت زمانی است که برای خالص‌سازی یک نمونه مورد نیاز است که مطابق با جدول (۱) مدت زمان خالص‌سازی در روش کروماتوگرافی جذب سطحی حدود یک سوم کروماتوگرافی ستونی و یک دوم کروماتوگرافی تعویض یونی می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

کروماتوگرافی افینیتی یک روش مقرون به صرفه و کارآمد برای خالص‌سازی بتا توکسین تولید شده توسط کلاستریدیوم پرفرنزئس تیپ B از نظر خلوص بالا، زمان کمتر مورد نیاز برای خالص‌سازی و حجم تولید زیاد در مقایسه با روش‌های دیگر است.

### سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد بابت تأمین منابع بیولوژیکی برای این مطالعه

## References

- 1- Milach A, de los Santos JRG, Turnes CG, Moreira AN, de Assis RA, Salvarani FM, *et al.* Production and characterization of Clostridium perfringens recombinant  $\beta$  toxoid. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 363-5.
- 2- Juneja VK, Marks H, Thippareddi HH. Predictive model for growth of Clostridium perfringens during cooling of cooked ground pork. *Innovative food science & emerging technologies*. 2010; 11(1): 146-54.
- 3- Sakurai J, Nagahama M. Clostridium perfringens beta-toxin: characterization and action. *Toxin Reviews*. 2006; 25(1): 89-108.
- 4- Bakhshi F, Langroudi RP, Eimani BG. Enhanced expression of recombinant beta toxin of Clostridium perfringens type B using a commercially available Escherichia coli strain. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2016; 83(1): 1-4.
- 5- Zayerzadeh E, Fardipour A, Jabbari A. A New Purification Method for Beta-Toxin of Clostridium perfringens Type C Vaccinal Strain. *Journal of Medical Bacteriology*. 2014; 3(3-4): 8-13.
- 6- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLD, Pessoa Junior A. Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas*. 2004; 40(2): 151-64.
- 7- Xiong N, Yu R, Chen T, Xue Y-P, Liu Z-Q, Zheng Y-G. Separation and purification of l-methionine from E. coli fermentation broth by macroporous resin chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2019; 1110: 108-15.
- 8- Coskun O. Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*. 2016;3(2):156.
- 9- Gagnon P. Technology trends in antibody purification. *Journal of chromatography A*. 2012; 1221: 57-70.
- 10- Zhao X, Li G, Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of analytical methods in chemistry*. 2013; 2013.
- 11- Fekete S, Beck A, Veuthey J-L, Guillarme D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015; 113: 43-55.
- 12- Schmidt M, Hafner M, Frech C. Modeling of salt and pH gradient elution in ion-exchange chromatography. *Journal of separation science*. 2014; 37(1-2): 5-13.
- 13- Milach A, de los Santos JR, Turnes CG, Moreira AN, de Assis RA, Salvarani FM, *et al.* Production and characterization of Clostridium perfringens recombinant beta toxoid. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 363-5.
- 14- Bakhshi F, Langroudi RP, Eimani BG, JoVR. Enhanced expression of recombinant beta toxin of Clostridium perfringens type B using a commercially available Escherichia coli strain. 2016; 83(1): 1-4.
- 15- Sayadmanesh A, Ebrahimi F, Hajizade A, Rostamian M, Keshavarz H. Expression and purification of neurotoxin-associated protein HA-33/A from Clostridium botulinum and evaluation of its antigenicity. *Iranian Biomedical Journal*. 2013; 17(4): 165.
- 16- Fathi Najafi M, Hemmati M, Jabbari AR, Mehrvarz M, Aghaipour K. Purification and characterization of alpha-toxin from vaccinal strain of Clostridium novyi. 2011.
- 17- Johnson E, Tepp W, Lin G. Purification, characterization, and use of Clostridium botulinum neurotoxin BoNT/A3. Google Patents; 2016.
- 18- Poursoltani M, Mohsenzadeh M, Razmyar JJJ, JoMM. Toxinotyping of Clostridium perfringens strains isolated from packed chicken portions. 2014; 8(1): 9-17.
- 19- Gkogka E, Reij MW, Gorris LG, Zwietering MHJFC. Risk assessment of Clostridium perfringens in Cornish pasties in the UK. 2020; 108: 106822.
- 20- Nijland R, Lindner C, van Hartskamp M, Hamoen LW, Kuipers OP. Heterologous production and secretion of Clostridium perfringens beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. *Journal of biotechnology*. 2007; 127(3): 361-72.
- 21- Bhatia B, Solanki AK, Kaushik H, Dixit A, Garg LCJPe, purification. B-cell epitope of beta toxin of Clostridium perfringens genetically conjugated to a carrier protein: expression, purification and characterization of the chimeric protein. 2014; 102: 38-44.

**22- Kouguchi H, Watanabe T, Sagane Y, Ohyama TJEJoB.** Characterization and reconstitution of functional hemagglutinin of the Clostridium botulinum type C progenitor toxin. 2001; 268(14): 4019-26.

**23- Sakurai J, Duncan CJI, Immunity.**

Purification of beta-toxin from Clostridium perfringens type C. 1977; 18(3): 741-5.

**24- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLD, Pessoa Junior AJRBdCF.** Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. 2004; 40(2): 151-64.

## Comparison of two methods of purification of *Clostridium perfringens* beta toxin type B

Raziyeh Jafari Khoshanabadi<sup>1</sup>, Mohsen Fathi Najafi<sup>2\*</sup>, Mohammad Momen Heravi<sup>1</sup>,  
Mohammad Reza Bozorgmehr<sup>1</sup>

1- Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

2- Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran and Education and Extension Organization (AREEO), Agricultural Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad Branch, Mashhad, Iran.

Accept: April 15, 2022, Receive: April 23, 2022, Revise: April 22, 2022

### Summary

---

*Clostridium perfringens* is an anaerobic bacterium that among its strains, only types B and C can produce beta-toxin. Beta-toxin plays an important role in many human and animal diseases and has detrimental effects on the intestine. The present study aimed to compare two purification methods for the extraction of beta-toxin from *C. perfringens* type B. As the first method, beta-toxin was purified using ammonium sulfate precipitation, column chromatography (Sephadex G-25), and ion-exchange chromatography (DEAE Sephadex), while the second method employed affinity chromatography. Hemolysis activity and protein content were measured in each step of purifications. The purity of beta-toxin was monitored in each step using SDS-PAGE. According to the results, a comparison of these two methods indicated that the yield of the first method was 82.8%, and the yield of the second method was 90.1%. The specific activity values for the first and second methods were calculated to be 2368.1 U/mg and 164.5 U/mg, respectively. Our results show that affinity chromatography could be used to purify beta-toxin from *clostridium perfringens* type B with high purity and specific activity (4370 HU/mg).

**Keywords:** *Clostridium Perfringens* type B, Beta-toxin, Ion exchange chromatography, Affinity chromatography

## بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس (*Pseudomonas aeruginosa*) به آنتی‌بیوتیک جدید Ceftolozane/Tazobactam

یعثوب شیرى\*<sup>۱</sup>، زینب محکمی<sup>۱</sup>، فاطمه بیدرنامنی<sup>۱</sup>

۱- استادیار گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۷ تیر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۹ تیر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱ مرداد ۱۴۰۱

### چکیده

*Pseudomonas aeruginosa* یک باکتری میله‌ای گرم‌منفی و هوازی است که باعث عفونت در دستگاه ادراری، سیستم تنفسی، غشای میانی پوست، بافت‌های نرم، باکتری‌می و غیره می‌شود. سفتولوزان-تازوباکتام (C/T) یک آنتی‌بیوتیک مؤثر در کنترل این باکتری می‌باشد. اما اخیراً گزارش‌هایی مبنی بر ظهور سویه‌های مقاوم نسبت به این آنتی‌بیوتیک چالشی جدی را در راه مبارزه با عفونت‌های ناشی از *P. aeruginosa* ایجاد کرده است. ژن *ampC* یکی از ژن‌های اصلی سنتز بتالاکتاماز می‌باشد. مطالعات نشان داده سفتولوزان-تازوباکتام نفوذپذیری غشای خارجی بهتر و پایداری بیشتری در برابر *ampC* بتالاکتاماز کروموزومی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. با توجه به اهمیت ژن *ampC* در فرایند مقاومت باکتری *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک ترکیبی سفتولوزان-تازوباکتام شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* بازسازی شده و فرایند بروز مقاومت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تعداد ۳۱ ژن در فرایند بتالاکتامازی در باکتری *P. aeruginosa* با ژن *ampC* همبستگی نشان دادند. آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد به‌ترتیب پنج ژن *ampC*، *ampD*، *ampB*، *ampR* و *nagZ* بالاترین اهمیت را در شبکه دارا می‌باشند. ژن *ampC* با ۱۶ ارتباط، بالاترین تعداد ارتباط مستقیم با سایر ژن‌های موجود در شبکه را دارا بود. تعداد هشت فرایند سلولی بالاترین تعداد نماینده را در میان ژن‌ها دارا بودند. بر اساس آنالیز آماری فرایندهای سلولی معنادار در میان ژن‌های مورد مطالعه، به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین متابولیسم پیرووات و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود داشته باشد. نتایج نشان داد ژن اصلی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام *ampC* می‌باشد. علی‌رغم اینکه مطالعات نشان داده دو ژن *poxA* و *poxB* تأثیر قابل توجهی در مقاومت باکتری *P. aeruginosa* ندارند. اهمیت این دو ژن در شبکه بازسازی شده تأکید می‌کند که مطالعات بیشتری بر روی آنها صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: شبکه ژنی، ژن آنتولوژی، پروکاریوت، بتالاکتاماز



## مقدمه

سودوموناس (*Pseudomonas aeruginosa*) یک باکتری میله‌ای گرم‌منفی و هوازی از خانواده سودوموناداسه (*Pseudomonadaceae*) است. این خانواده شامل ۱۲ عضو دیگر نیز می‌باشد که همگی معمولاً در خاک و آب و همچنین در گیاهان و انسان یافت می‌شوند (۱). در حالی که باکتری سودوموناس یکی از معدود پاتوژن‌های واقعی برای گیاهان است، به یک پاتوژن فرصت‌طلب در حال ظهور در کلینیک‌ها تبدیل شده است. مطالعات اپیدمیولوژیک اخیر آن را جزو پاتوژن‌های بیمارستانی نشان می‌دهد، به‌ویژه وجود سویه‌هایی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی (۲). به همین دلیل باکتری سودوموناس توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان یک پاتوژن الویت‌دار در نظر گرفته می‌شود که نیازمند راه‌حل‌های درمانی جدید در برابر آن می‌باشیم. این باکتری می‌تواند باعث عفونت در دستگاه ادراری، سیستم تنفسی، غشای میانی پوست، بافت‌های نرم، باکتری (bacteraemia) (حضور باکتری در خون)، استخوان و مفاصل، دستگاه گوارش و خون شود، به‌ویژه در بیماران مبتلا به سوختگی شدید، سل، سرطان و ایدز (۲). نکته مهم افزایش ۵۰ درصدی احتمال مرگ بیماران بستری سرطان، سوختگی و انسداد کیستیک روده‌های گوارشی و مجاری تنفسی (Cystic fibrosis) در صورت آلودگی بیمار به این باکتری می‌باشد. بروز کلی عفونت‌های *P. aeruginosa* در بیمارستان‌های ایالات متحده به‌طور متوسط حدود ۰/۴ درصد بوده، و این باکتری چهارمین پاتوژن شایع جدا شده بیمارستانی است و ۱۰ درصد از کل عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد (۳).

سودوموناس - تازوباکتام (Ceftolozane/Tazobactam) و سفازیدیم - آوی‌باکتام (Ceftazidime/Avibactam) دو

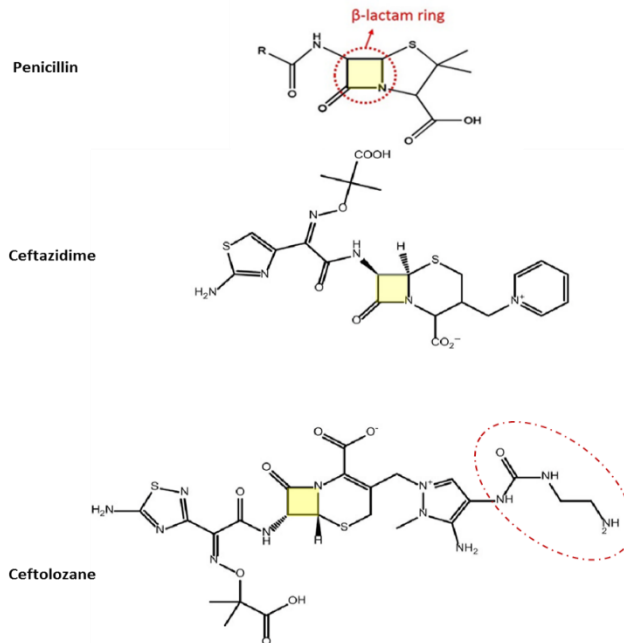
## بازسازی شبکه هم‌بندی ژن ampC به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس ...

آنتی‌بیوتیک جدید ترکیبی بتالاکتام/ بتالاکتاماز هستند (۴). اخیراً ترکیب سفتولوزان- تازوباکتام (C/T) به‌عنوان مهارکننده آنزیم بتالاکتام/ بتا-لاکتاماز که عامل اصلی مقاومت باکتری در مقابل آنتی‌بیوتیک هست معرفی شده است و به نظر می‌رسد یک گزینه ارزشمند برای درمان بیماران شدیداً آلوده به *P. aeruginosa* مقاوم به چند دارو می‌باشد (۵). به دلیل یک گروه حجیم پیوند شده در زنجیره جانبی ۳ موقعیت حلقه بتالاکتام (شکل ۱)، که یک مانع فضایی ایجاد می‌کند در نتیجه سفتولوزان در برابر حمله آنزیم‌های بتالاکتاماز کلاس C بهتر از ترکیب اصلی خود سفتازیدیم مقاومت می‌کند (۴). بتالاکتامازها بر اساس توالی اسید آمینه‌های اولیه به چهار کلاس، A، B، C و D تقسیم می‌شوند (۶). هر چهار کلاس در *P. aeruginosa* ثبت شده است (۶، ۷). با وجود مقاومت در برابر آنزیم‌های بتالاکتاماز کلاس C، سفتولوزان هیچ مزیتی نسبت به سفتازیدیم در هنگام مواجهه با بتالاکتامازهای (ESBL-Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases) و کارباپنمازها (Carbapenemases) ندارد (۸).

آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در ساختار مولکولی خود دارای یک حلقه بتالاکتام می‌باشند (شکل ۱). این آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصال به آنزیم ترانس‌پپتیداز در باکتری‌های گرم‌منفی و گرم‌مثبت از فعالیت آن که مسئول سنتز دیواره باکتریایی می‌باشد جلوگیری می‌کنند (۹). در نتیجه باکتری از بین می‌رود. در مقابل باکتری‌ها از سه طریق مختلف نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت می‌کنند. اولین مکانیسم جلوگیری از ورود آنتی‌بیوتیک به داخل باکتری از طریق تغییر در ساختار منافذ موجود در دیواره باکتری (Porin) می‌باشد که در باکتری‌های گرم‌منفی مشاهده می‌گردد. دومین مکانیسم که در هر دو گروه باکتری‌های گرم‌منفی و مثبت وجود

نهایتاً سومین مکانیسم تغییر در ساختار آنزیم ترانس پپتیداز و ممانعت از اتصال آنتی بیوتیک به آن می باشد (۱۰، ۱۱).

دارد، فعالیت آنزیم های بتالاکتاماز می باشد که قابلیت شکستن پیوند C-N در حلقه بتالاکتام را داشته و از این طریق آنتی بیوتیک را خنثی می کنند.



شکل ۱- مقایسه ساختار مولکولی آنتی بیوتیک های سفتولوزان و سفتازیدیم با آنتی بیوتیک پنی سیلین که هر سه جزو آنتی بیوتیک های خانواده بتا-لاکتام هستند. گروه پیوند شده در زنجیره جانبی حلقه بتالاکتام یک مانع فضایی ایجاد کرده و سفتولوزان را در برابر حمله آنزیم های بتالاکتاماز کلاس C مقاوم می کند

۱۲). در سال ۲۰۱۴ محققین امکان ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام را در سویه های وحشی و جهش یافته *P. aeruginosa* بررسی کردند. نتایج نشان داد سویه های وحشی به راحتی با این آنتی بیوتیک نبود شدند و میزان مقاومت در سویه های جهش یافته بسیار ناچیز است. بررسی دقیق تر ترانس کریپتوم سویه های دارای مقاومت نسبی به آنتی بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام نشان داد جهش های متعدد ضمن تغییرات ساختاری در توالی ژن *ampC* منجر به افزایش بیان آن شده است. لذا تنها احتمال بروز مقاومت به آنتی بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام جهش در ژن *ampC* معرفی شد (۱۳). نهایتاً در سال ۲۰۱۷ در کارولینای جنوبی عفونت باکتری *P. aeruginosa*

آنزیم بتالاکتاماز یکی از مکانیسم های اصلی مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در بسیاری از باسیل های گرم منفی مانند *E. coli*, *A. baumannii* و *P. aeruginosa* است. ژن *ampC* یکی از ژن های اصلی سنتز بتالاکتاماز می باشد. دو ویژگی عمده که *ampC* بتالاکتامازها را از سایر بتالاکتامازها مانند بتالاکتامازهای ESBL متمایز می کند عبارت است از مقاومت آنها در برابر مهارکننده هایی مانند کلوالانات که ESBLها را مهار می کنند و ویژگی دوم توانایی آنها در هیدولیز کردن سفامایسین ها (Cephamycins). مطالعات نشان داده سفتولوزان-تازوباکتام نفوذپذیری غشای خارجی بهتر و پایداری بیشتری در برابر *ampC* بتالاکتاماز کروموزومی نسبت به سایر آنتی بیوتیک های بتالاکتام دارد (۴).

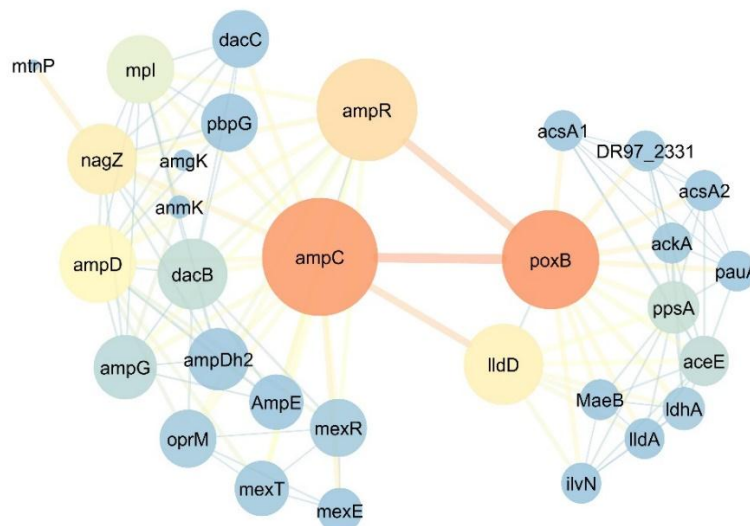
## بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس ...

مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام در پیرمرد ۷۵ ساله‌ای مشاهده شد (۱۴). بررسی‌ها نشان داد یک تغییر کوچک ساختاری در ژن *ampC* سبب ایجاد مقاومت در باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام گردیده است (۱۴).

با توجه به اهمیت ژن *ampC* در فرایند مقاومت باکتری *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک ترکیبی سفتولوزان-تازوباکتام در این مطالعه با بررسی پایگاه‌های اطلاعاتی ژنوم باکتریایی و بهره‌مندی از ابزارهای بیوانفورماتیکی جدید، شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* بازسازی شده و فرایند بروز مقاومت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه با استفاده از پایگاه داده Uniprot اطلاعات جامع در خصوص ژن *AmpC* به‌عنوان ژن کلیدی درگیر در فرایند سنتز آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری *P. aeruginosa* جمع‌آوری شد (۱۵). بر اساس پارامترهای Text Co-Expression



شکل ۲- شبکه ژن‌های درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتالاکتاماز در باکتری *P. aeruginosa* اندازه *node* بر اساس میزان *Betweenness Centrality* (اندازه کوچک برای مقادیر کمتر)، و رنگ از *node* از آبی (*Closeness Centrality* پایین) تا قرمز (*Closeness Centrality* بالا) متغیر می‌باشد. رنگ و ضخامت خطوط ارتباطی بر مبنای *Edge Betweenness* از قرمز و ضخیم برای مقادیر زیاد تا آبی و نازک برای مقادیر کم متغیر است

نتايج

از منظر مؤلفه Betweenness Centrality  
 ژنهای *ampR*، (0.375) *ampC*، (0.386) *poxB* به ترتیب  
 بالاترین مقادير را دارا بودند. همچنين با توجه به  
 میزان Closeness Centrality به دست آمده،  
 بیشترین مقادير به ترتیب به ژنهای *ampC*  
 (0.681)، *ampR* (0.625)، *poxB* (0.612)، *lldD*  
 (0.545) و *ampD* (0.535) اختصاص یافت (جدول  
 ۱).

تعداد ۳۱ ژن در فرایند بتالاكتامازی در باکتری  
*P. aeruginosa* با ژن *ampC* همبستگی نشان دادند  
 (شکل ۲). بر اساس آنالیزهای توپولوژی شبکه ژن  
*ampC* با ۱۶ ارتباط، *ampD* با ۱۵ ارتباط و *poxB* با  
 ۱۴ ارتباط دارای بیشترین تعداد ارتباط با سایر  
 ژنهای شبکه همبستگى بودند. همچنين در ادامه  
 ژنهای *ampR*، *nagZ*، *dacB* و *ppsA* هر کدام با ۱۲  
 ارتباط همبستگى با سایر ژنها در ردیف بعدی قرار  
 گرفته‌اند.

جدول ۱- نتایج آنالیز توپولوژی شبکه ژنهای درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتالاكتاماز در باکتری *P. aeruginosa*. بر اساس نتایج به دست آمده در آنالیز شبکه، ژن *ampC* بالاترین ضریب تأثیر را در القای مقاومت دارا می‌باشد.

Gene Name	Number Of Directed Edges	Betweenness Centrality	Closeness Centrality
<i>ampC</i>	16	0.375413	0.681818
<i>ampD</i>	15	0.070241	0.535714
<i>poxB</i>	14	0.386918	0.612245
<i>ampR</i>	12	0.162529	0.625
<i>nagZ</i>	12	0.097531	0.508475
<i>dacB</i>	12	0.015402	0.508475
<i>ppsA</i>	12	0.017953	0.447761
<i>mpl</i>	11	0.030865	0.5
<i>aceE</i>	11	0.014559	0.441176
<i>ampG</i>	9	0.012397	0.483871
<i>lldD</i>	8	0.087356	0.545455
<i>ampDh2</i>	8	0.001149	0.47619
<i>ldhA</i>	8	0.003394	0.422535
<i>oprM</i>	7	0.003087	0.461538
<i>mexR</i>	7	0.003087	0.461538
<i>ackA</i>	7	0.002299	0.416667
<i>acsA1</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>acsA2</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>pauA</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>DR97_2331</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>MaeB</i>	7	0	0.416667
<i>ilvN</i>	7	0	0.416667
<i>lldA</i>	7	0	0.416667
<i>dacC</i>	6	0	0.461538
<i>pbpG</i>	6	0	0.461538
<i>mexT</i>	6	0.001861	0.454545
<i>AmpE</i>	6	0	0.454545
<i>mexE</i>	4	0	0.428571
<i>anmK</i>	4	0	0.37037
<i>amgK</i>	3	0	0.365854
<i>mtnP</i>	1	0	0.340909
<b>Average amounts</b>	<b>8.193548387</b>	<b>0.041527516</b>	<b>0.463967645</b>

## بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن ampC به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس ...

تقسیم کرد. گروه ژن‌های اصلی بتالاکتامازی که عبارتند از (*ampG*, *mexR*, *oprM*, *ampC*, *ampR*, *nagZ*) و گروه دوم ژن‌های درگیر در متابولیسم پیرووات که ۱۲ ژن غیر از شش ژن فوق‌الذکر را شامل می‌شوند که عبارتند از (*ldhA*, *acsA1*, *ackA*, *ppsA*, *acsA2*, *lldD*, *DR97\_2331*, *aceE*, *MaeB*, *poxB*, *lldA*, *pauA*). به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین متابولیسم پیرووات و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود داشته باشد. هر چند در مطالعه‌ای که اثر آنتی‌بیوتیک کلروتراسایکلین بر روی تغییرات پروتئوم باکتری *Aeromonas hydrophila* صورت گرفته به نظر می‌رسد تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک، بسیاری از مسیرهای متابولیسم متابولیکی مانند متابولیسم کربن، متابولیسم پیرووات و گلیکولیز/گلوکونئوژنز روند کاهشی دارند در حالی که مقاومت بتالاکتام، تخریب RNA و فرآیندهای بیوسنتز اسیدهای آمینه احتمالاً افزایش یابد (۲۳).

میزان بالای مقادیر به‌دست آمده Betweenness Centrality و Closeness برای یک ژن در آنالیز شبکه، بیانگر اهمیت بالای آن ژن در فرایند بیولوژیکی مربوطه و نقش کلیدی آن می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد ژن *ampC* کلیدی‌ترین ژن موجود در شبکه می‌باشد.

شکل ۳ فرایندهای سلولی، عملکردهای مولکولی و مسیرهای بیولوژیکی معنادار که ژن‌های تشکیل‌دهنده شبکه مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفنولوزان-تازوباکتام را در باکتری *P. aeruginosa* نشان می‌دهد. در فرایندهای سلولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک خانواده بتالاکتام بالاترین سطح معنی‌داری و ضریب قدرت 1.65 را دارا بود (جدول ۲). این امر به روشنی نشان می‌دهد شبکه بازسازی شده به درستی مسیر مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد. به‌طور کلی ژن‌های موجود در شبکه را به دو گروه اصلی می‌توان

جدول ۲- آنالیز آماری فرایندهای سلولی کلیدی در شبکه هم‌بیانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفنولوزان-تازوباکتام در باکتری *aeruginosa*

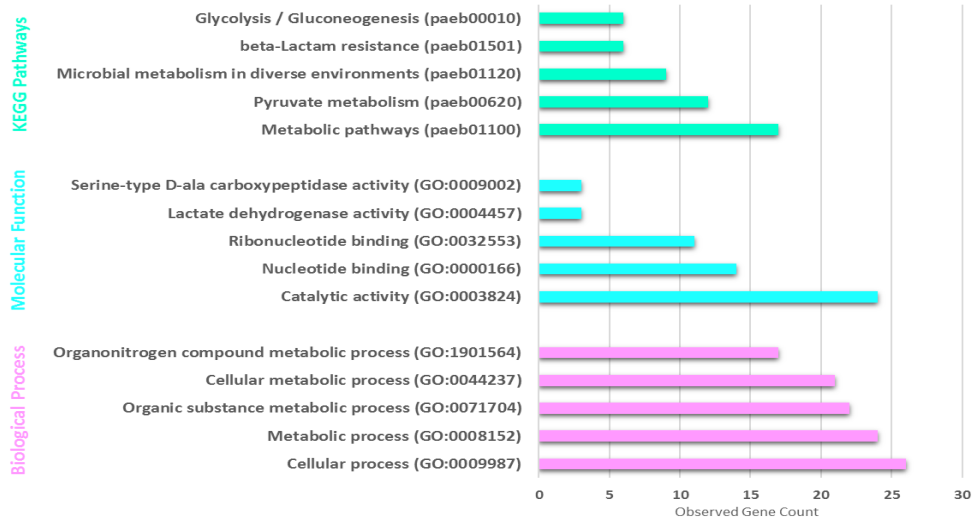
Term ID	Term Description	observed gene count	Background gene count	Strength	p-value	Matching proteins in your network (labels)
paeb01501	beta-Lactam resistance	6	27	1.65	5.07E-07	<i>ampG</i> , <i>mexR</i> , <i>oprM</i> , <i>ampC</i> , <i>ampR</i> , <i>nagZ</i>
paeb00620	Pyruvate metabolism	12	61	1.6	3.12E-14	<i>ldhA</i> , <i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>lldD</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i> , <i>poxB</i> , <i>lldA</i> , <i>pauA</i>
paeb00680	Methane metabolism	4	26	1.49	0.0002	<i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i>
paeb00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	6	40	1.48	2.73E-06	<i>acsA1</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>pauA</i>
paeb00640	Propanoate metabolism	5	48	1.33	0.00012	<i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>acsA2</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>pauA</i>
paeb01200	Carbon metabolism	6	123	1	0.00047	<i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i>
paeb01120	Microbial metabolism in diverse environments	9	274	0.82	0.00012	<i>ldhA</i> , <i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i> , <i>pauA</i>
paeb01100	Metabolic pathways	17	968	0.55	1.49E-05	<i>ldhA</i> , <i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>ilvN</i> , <i>acsA2</i> , <i>lldD</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i> , <i>poxB</i> , <i>amgK</i> , <i>dacC</i> , <i>nagZ</i> , <i>mntP</i> , <i>lldA</i> , <i>pauA</i>

carboxypeptidase activity در زمره عملکردهای مولکولی فعال نشان می‌دهد که بیانگر فعالیت‌های

شکل ۳- همچنین عملکردهای Lactate و D-ala dehydrogenase activity

سفتولوزان- تازوباكتام يك فرايند هوشمند باكتريايى و نيازمند تغييرات بياني در مجموعه اى از ژن هاى كروموزومى مى باشد.

آنزيم هاى بتالاكتامازى مى باشد. همچنين ميزان بالاى عملكرد Nucleotide binding و Ribonucleotide binding اين نكته را نشان مى دهد كه مكانيسم مقاومت در برابر آنتى بيوتيك



شكل ۳- نمودار بررسى ژن هاى درگير در فرايند مقاومت باكتري *P. aeruginosa* به آنتى بيوتيك سفتولوزان-تازوباكتام

مى باشد (۲۵). به طور معمول، پروتئين تنظيم كننده *ampR* بيان *ampC* را به سطوح بسيار پايين کاهش مى دهد. مطالعات نشان داده برخى از اجزاي محلول جدا شده از ديواره باكتريايى تحت عنوان موروپپتيد Muropeptides ضمن تشكيل كمپلكسى با *ampR* افزايش يا کاهش بيان *ampC* را تنظيم مى كنند (۲۶). ژن هاى *ampR* و *ampC* يك اپرون واگرا را با پروموترهاى همپوشانى تشكيل مى دهند و قطعه اى كه در بين آنها قرار دارد به عنوان يك محل اتصال *ampR* عمل مى كند (۲۷). براى درك دقيق مكانيسم عمل اين دو ژن لازم است فرايند سنتز ديواره باكتريايى را مرور كنيم. در فرايند رشد باكتري، اندازه باكتري افزايش يافته و زيرواحدهاى موروپپتيد ديواره باكتريايى به مرور توسط آنزيم هاى هيدروليتيك hydrolytic enzymes از هم جدا مى شوند (۲۸). اين موروپپتيدها به وسيله *ampG*- پرماز جهت بازيافت به سيتوپلاسم منتقل شده در

## بحث و نتيجه گيرى

مكانيسم هاى القاي مقاومت به آنتى بيوتيك به وسيله ژن *ampC* را مى توان به سه گروه تقسيم كرد. گروه اول؛ مقاومت القايى از طريق بيان ژن هاى *ampC* كروموزومى (مانند *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* و غيره)، گروه دوم؛ مقاومت كروموزومى غير قابل القاي ناشى از جهش هاى پروموتر و يا تضعيف كننده ( promoter and/or attenuator mutations) (مانند *Escherichia coli*, گونه هاى *Shigella* و *Acinetobacter baumannii*، گروه سوم؛ مقاومت با واسطه پلاسميد (مانند *Escherichia coli*, گونه هاى *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae* و غيره) (۲۴).

توليد بيش از حد *ampC* كروموزومى، مكانيسم اصلى ايجاد مقاومت به بتالاكتام در سودوموناس

## بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس ...

به‌طور قابل توجهی با سایر آنزیم‌های شناخته شده متفاوت است (۳۶). مطالعات نشان داده ژن‌های *poxA* و *poxB* بر روی کروموزوم باکتری تنها ۴۹ باز با یکدیگر فاصله داشته و یک اپرون را تشکیل می‌دهند (۳۵). از آنجایی که *poxA* و *poxB* بخشی از یک اپرون واحد هستند، به‌طور بالقوه می‌توانند عملکردهای مرتبطی داشته باشند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داده که توالی‌های نوکلئوتیدی تشکیل‌دهنده این اپرون در هیچ جای دیگری به جز *P. aeruginosa* یافت نمی‌شوند (۳۵). با این حال، از مطالعات بیانی، ما می‌دانیم که محصول *poxA* یک آنزیم بتالاکتاماز نیست همچنین در جهش یافته‌های فاقد ژن‌های *poxA* و *poxB* فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مختل نشد، اما در حضور این دو و فقدان فعالیت ژن *ampC* باکتری‌ها به شدت حساس به آنتی‌بیوتیک بودند (۳۵). این نشان می‌دهد ژن اصلی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام *ampC* می‌باشد.

بروز کلی عفونت‌های *P. aeruginosa* در بیمارستان‌های دنیا و مشاهده مقاومت اکتسابی سویه‌های مختلف در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها زنگ خطر است که سازمان بهداشت جهانی را بر آن داشته تا آن را به‌عنوان یک پاتوژن الویت‌دار در نظر گیرد و امروزه نیازمند راه‌حل‌های درمانی جدید در برابر آن هستیم. سفتولوزان-تازوباکتام (C/T) به نظر می‌رسد یک گزینه ارزشمند برای درمان بیماران شدیداً آلوده به *P. aeruginos* مقاوم به چند دارو باشد. ژن *ampC* یکی از ژن‌های اصلی سنتز بتالاکتاماز می‌باشد. مطالعات نشان داده سفتولوزان-تازوباکتام نفوذپذیری غشای خارجی بهتر و پایداری بیشتری در برابر *ampC* بتالاکتاماز کروموزومی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. با توجه به اهمیت ژن *ampC* در فرایند مقاومت باکتری *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک ترکیبی

سیتوزول به‌وسیله *NagZ* زیرواحدهای N-آستیل-گلوکزآمین و در ادامه به‌وسیله آنزیم *ampD*-آمیداز ساقه پپتیدی آن جدا می‌شود (۲۸، ۲۹). منوساکاریدهای باقیمانده و پپتیدهای به‌دست آمده مجدداً در فرایند سنتز دیواره جدید باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این زیرواحدها که به اختصار UDP-NAM-P5 (Uridine 5'-pyrophosphoryl-) نامیده می‌شوند در شرایط نرمال به *ampR* متصل شده و کمپلکس حاصل بیان *ampC* را سرکوب می‌کند (۲۹). اما وقتی باکتری در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نظیر سفتولوزان-تازوباکتام قرار می‌گیرد، پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin Binding Protein) PBP سبب افزایش اتولیز پپتیدوگلیکان‌ها و در نتیجه افزایش ناگهانی میزان موروپپتیدها در سیتوزول می‌گردند (۳۰). این امر سبب می‌شود میزان موروپپتیدها از ظرفیت فعالیت آنزیم‌های *NagZ* و *ampD* فراتر رفته موروپپتیدهای آزاد جایگزین زیرواحدهای UDP-NAM-P5 بر روی پروتئین‌های *ampR* گردند. نهایتاً کمپلکس جدید موروپپتید-*ampR* افزایش بیان آنزیم بتالاکتامازی *ampC* را تحریک می‌کند (۳۳-۳۱). علاوه بر این فرایند برای القای مقاومت به آنتی‌بیوتیک، جهش در ژن *ampD* و کاهش فعالیت آن منجر به افزایش بیان دائمی در ژن *ampC* می‌گردد که مکرراً در باکتری سودوموناس گزارش شده است (۳۴).

*poxB* متعلق به کلاس D بتالاکتامازها است و به دلیل توانایی برخی از اعضای این کلاس در تجزیه ایزوکسازولیل پنی‌سیلین‌ها (Isoxazolyl penicillins)، مانع از گزاسیلین (Oxacillin) و متی‌سیلین (Methicillin)، از گزاسیلیناز (Oxacillinase) نیز نامیده می‌شوند (۳۵). به نظر می‌رسد *poxB* نوع جدیدی از گزاسیلیناز است که

داشته باشد. بررسی‌ها نشان داد ژن اصلی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام *ampC* می‌باشد. علیرغم اینکه مطالعات نشان داده دو ژن *poxB* و *poxA* تأثیر قابل توجهی در مقاومت باکتری *P. aeruginosa* ندارند. اهمیت این دو ژن در شبکه بازسازی شده تأکید می‌کند که مطالعات بیشتری بر روی آنها صورت گیرد.

#### سپاسگزاری

ضمن قدردانی از همکاران حوزه معاونت محترم پژوهشی پژوهشگاه زابل اعلام می‌گردد این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه زابل انجام شده است.

#### References

- 1- Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton IR, Schwartzman JD. Chapter 1- Molecular Medical Microbiology – The Expanding Concept. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Boston: Academic Press. 2015: 1-4.
- 2- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7.
- 3- Jones P, Palsler S, Pravle A, Hurley M, Smyth A. WS20. 1 Secular trends in *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in the United Kingdom: a registry study. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2016;1(15): S31.
- 4- van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime /Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Infect Dis*. 2016; 63(2): 234-41.
- 5- Gallagher JC, Satlin MJ, Elabor A, Saraiya N, McCreary EK, Molnar E, et al. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Multicenter Study. *Open Forum Infect Dis*. 2018; 5(11): 280.
- 6- Kong K-F, Jayawardena SR, del Puerto A, Wiehlmann L, Laabs U, Tümmmler B, et al. Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene*. 2005; 358: 82-92.
- 7- Tawfik AF, Shibl AM, Aljohi MA, Altammami MA, Al-Agamy MH. Distribution of Ambler class A, B and D  $\beta$ -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Burns*. 2012; 38(6): 855-60.
- 8- Ortiz de la Rosa JM, Nordmann P, Poirel L. ESBLs and resistance to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74(7): 1934-9.
- 9- Shiri Y, Karimiyan Ma. Reconstitution of Gene Network on Penicillin Resistance in *E.coli* Using Databases Information. *New Findings in Veterinary Microbiology*. 2020; 2(2): 1-9.
- 10- Patterson J, Tsilimigras M, Livesay D, Jacobs D. Evolution of Stability/Flexibility Relationships in Beta-Lactamase. *Biophysical Journal*. 2019; 116: 472.
- 11- Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom*. 2018; 101(2): 162-71.
- 12- Shortridge D, Castanheira M, Pfaller MA, Flamm RK. Ceftolozane-Tazobactam Activity against *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from U.S. Hospitals: Report from the PACTS Antimicrobial Surveillance Program, 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(7).
- 13- Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, Zamorano L, Moyà B, Juan C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ceftolozane-tazobactam

سفتولوزان-تازوباکتام شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* بازسازی شده و فرایند بروز مقاومت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تعداد ۳۱ ژن در فرایند بتالاکتامازی در باکتری *P. aeruginosa* با ژن *ampC* همبستگی نشان دادند. آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد به ترتیب پنج ژن *ampC*، *ampD*، *ampR*، *poxB* و *nagZ* بالاترین اهمیت را در شبکه دارا می‌باشند. بر اساس آنالیز آماری فرایندهای سلولی معنادار در میان ژن‌های مورد مطالعه، به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین متابولیسم پیرووات و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود

resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of AmpC. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6): 3091-9.

14- MacVane SH, Pandey R, Steed LL, Kreiswirth BN, Chen L. Emergence of Ceftolozane-Tazobactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* during Treatment Is Mediated by a Single AmpC Structural Mutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(12).

15- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic acids research.* 2004; 32(Database issue): 115-9.

16- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research.* 2017; 45(Database issue): D362-D8.

17- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research.* 2003; 13(11): 2498-504.

18- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics.* 2008; 24(2): 282-4.

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

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

21- Jiao X, Sherman BT, Huang DW, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2012; 28(13): 1805-6.

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

23- Li W, Yao Z, Zhang X, Huang F, Lin W, Lin X. Global protein expression profile response of planktonic *Aeromonas hydrophila* exposed to chlortetracycline. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2017; 33(4): 68.

24- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(1): 161-82, Table of Contents.

25- Torrens G, Hernández SB, Ayala JA, Moya B, Juan C, Cava F, et al. Regulation of AmpC-Driven  $\beta$ -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Different Pathways, Different Signaling. *mSystems.* 2019; 4(6).

26- Irazoki O, Hernandez SB, Cava F. Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Frontiers in Microbiology.* 2019; 10.

27- Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic  $\beta$ -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41(6): 781-815.

28- Vermassen A, Leroy S, Talon R, Provot C, Popowska M, Desvaux M. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Front Microbiol.* 2019; 10: 331.

29- Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, et al. NagZ inactivation prevents and reverts beta-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(9): 3557-63.

30- Lee M, Heseck D, Blázquez B, Lastochkin E, Boggess B, Fisher JF, et al. Catalytic spectrum of the penicillin-binding protein 4 of *Pseudomonas aeruginosa*, a nexus for the induction of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance. *J Am Chem Soc.* 2015; 137(1): 190-200.

31- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(4): 582-610.

32- Dik DA, Fisher JF, Mobashery S. Cell-Wall Recycling of the Gram-Negative Bacteria and the Nexus to Antibiotic Resistance. *Chem Rev.* 2018; 118(12): 5952-84.

33- Fisher JF, Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the  $\beta$ -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Chem.* 2014; 56: 41-8.

34- López-Causapé C, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A. The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front*

*Microbiol.* 2018; 9: 685.

**35- Zincke D, Balasubramanian D, Silver LL, Mathee K.** Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme, PoxB, in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.*

2016; 60(2): 936-45.

**36- Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A.** Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenua*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4): 1330-5.

# Reconstruction of co-expression network of *ampC* gene as the main factor of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to the new antibiotic Ceftolozane/Tazobactam

Yasoub Shiri<sup>\*1</sup>, Zeynab Mohkami<sup>1</sup>, Fatemeh Bidarnamani<sup>1</sup>

1- Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture Research Center, Zabol Research Institute, Zabol, Iran.

Receive: July 8, 2022; Revise: July 20, 2022; Accept: July 23, 2022

## Summary

*Pseudomonas aeruginosa* is a Rod-shaped Gram-negative and strict aerobic bacterium that can cause infection in the urinary system, respiratory system, middle membrane of the skin, soft tissues, bacteremia, etc. Ceftolozan-tazobactam (C/T) is an effective antibiotic in controlling of this bacterium. But recently, reports of the emergence of resistant strains have created a serious challenge in the fight against infections caused by *P. aeruginosa*. *ampC* is one of the main genes for  $\beta$ -lactamase synthesis. Studies have shown that Ceftolozane-tazobactam has better outer membrane permeability and improved stability against chromosomal *ampC*  $\beta$ -lactamase than do other  $\beta$ -lactam antibiotics. Considering the importance of *ampC* in the process of *P. aeruginosa* resistance to the Ceftolozane-tazobactam antibiotic, the co-expression network of *ampC* was reconstructed and the resistance emerging process was analyzed. 31 genes in the beta-lactamase process in *P. aeruginosa* showed correlation with *ampC*. Network topology analyzes showed that five genes *ampC*, *ampD*, *poxB*, *ampR* and *nagZ* have the highest importance in the network. *ampC* gene had the highest number of direct connections with other genes in the network with 16 connections. Eight pathways had the highest number of representatives among genes. Based on the statistical analysis of the significant pathways among the studied genes, it seems there is a direct relationship between pyruvate metabolism and resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Results showed *ampC* is the main gene for resistance to Ceftolozane-tazobactam. Although studies have shown that *poxA* and *poxB* genes do not have a significant effect on *P. aeruginosa* resistance to the antibiotics, the importance of these two genes in the reconstructed network emphasizes that more studies should be conducted on them.

**Key words:** gene network, gene ontology, prokaryote, beta-lactamase

## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور

مرضیه حاج محمدی<sup>۱،۳</sup>، احسان کریمی<sup>۲\*</sup>، پریسا شکریزدان<sup>۲</sup>، احسان اسکوئیان<sup>۲</sup>، محمدفاصله جهرمی<sup>۳</sup>، مجتبی معین جهرمی<sup>۳</sup>، رضا نورا<sup>۴</sup>

۱- دانش‌آموخته دکتری تغذیه دام، گروه تغذیه دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۳- بخش تحقیق و توسعه، گروه خوشه صنعتی آرکا، مشهد، ایران.

۴- گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۴ خرداد ۱۴۰۱، بازنگری: ۳۱ خرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱۲ تیر ۱۴۰۱

### چکیده

امروزه سموم قارچی یک مشکل اساسی در صنعت خوراک و ایمنی زنجیره غذایی محسوب می‌شوند، که می‌توانند طیف وسیعی از محصولات کشاورزی و زراعی را آلوده کنند، و در نتیجه بر سلامت و تولیدات دام و طیور، و به تبع آن بر سلامت انسان، اقتصاد کشورها و حتی تجارت بین‌المللی تأثیر منفی بگذارند. از آنجایی که نمی‌توان از آلودگی میکوتوکسین به‌طور کامل قبل یا بعد از برداشت محصولات زراعی جلوگیری کرد، آگاهی دقیق از نحوه حذف سموم قارچی در طی فرآیندهای تکنولوژیکی و استراتژی‌های پاک‌سازی خوراک بسیار مهم است. امروزه کنترل زیستی سموم قارچی توسط میکروارگانیسم‌ها و سایر فاکتورهای بیولوژیک، در حال تبدیل شدن به یک راهکار قابل اعتماد برای محافظت از محصولات غذایی در برابر آلودگی این سموم است، که باعث افزایش ایمنی و کیفیت محصولات زراعی و خوراک دام، و در نهایت کاهش سموم در محصولات با منشأ حیوانی (شیر، گوشت و تخم‌مرغ) و افزایش امنیت زنجیره غذایی می‌شود.

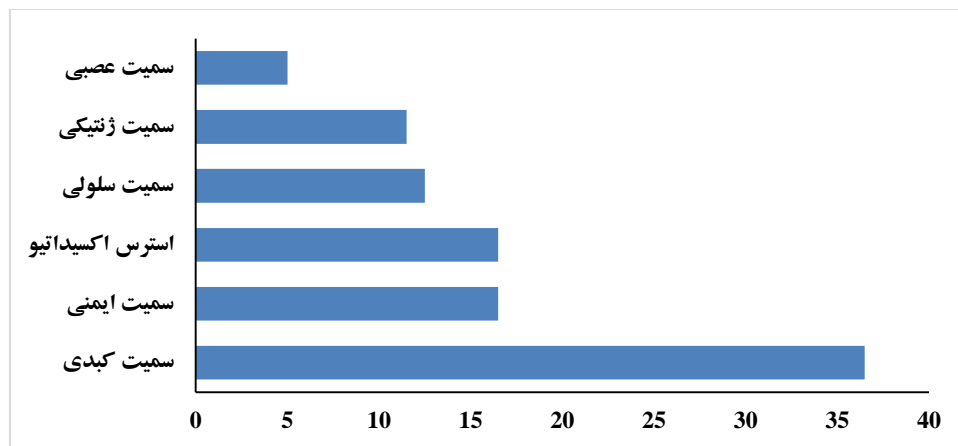
**واژه‌های کلیدی:** میکوتوکسین، کنترل زیستی، میکروارگانیسم، آنزیم، مخمر، اسانس، گیاهان دارویی

## مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سمی تولید شده توسط قارچ‌های رشته‌ای هستند که بر روی محصولات کشاورزی مختلف در طی مراحل برداشت، ذخیره و فرآوری رشد می‌کنند (۱). از آنجایی که مراقبت در مقابل این نوع از آلودگی مشکل است، سموم قارچی به‌طور طبیعی تحت عنوان "تهدیدات غیر قابل اجتناب" در نظر گرفته می‌شوند، اما به هر حال وجود آنها در محصولات کشاورزی و محصولات دامی یک مشکل جدی برای سلامت مصرف‌کنندگان در سطح جهانی است. در کشورهای پیشرفته، سموم قارچی در خوراکی‌ها به‌طور مداوم مورد بررسی قرار می‌گیرند تا از سلامت حیوانات و بهبود بهره‌وری و همچنین درآمد کشاورزان و دامپروران محافظت شود (۲). ارقام واقعی و دقیقی در مورد ضایع شدن خوراک و غذا

در اثر رشد قارچ‌ها و تولید مایکوتوکسین در جهان وجود ندارد، اما سازمان خواربار و کشاورزی (FAO) تخمین زده است که تقریباً ۲۵ درصد از خوراک و غذا سالانه در جهان به دلیل قارچ‌ها و سموم قارچی مرتبط از بین می‌رود (۳).

بقایای سمی سموم قارچی در محصولات حیوانی عمدتاً مربوط به مصرف خوراک یا علوفه آلوده است، که موجب می‌شود متابولیت‌های سمی جذب جریان خون حیوان شوند و ممکن است بعداً از طریق شیر، ادرار و مدفوع دفع شوند، سمومی که دفع نمی‌شوند در اندام‌های بدن و ماهیچه‌های دام باقی می‌مانند. به‌طور کلی، اثرات سمی اصلی مایکوتوکسین‌ها برای همه گونه‌ها عبارتند از سمیت کبدی، مشکلات ایمنی، استرس اکسیداتیو، و سمیت سلولی، ژنتیکی و عصبی (شکل ۱) (۴).



شکل ۱- درصد اثرات عمومی مایکوتوکسین‌ها بر تمام گونه‌های موجودات. اقتباس از کیمبالو و همکاران (۲۰۲۰) (۴)

و فرآوری شده (۶) و تخم‌مرغ آب‌پز (۷) پایدار هستند. به گفته باتا و لاستیتی (۸)، سه راه برای کاهش خطرات سموم قارچی وجود دارد که شامل پیشگیری از آلودگی غذا و خوراک، کاهش یا رفع آلودگی سموم قارچی از غذا و خوراک، و جلوگیری از جذب سموم قارچی توسط دستگاه گوارش

متأسفانه سموم قارچی را نمی‌توان به راحتی با حرارت دادن، و روش‌های شیمیایی و فیزیکی از بین برد. اگرچه استفاده از عملیات حرارتی مانند پاستوریزاسیون یا دمای فوق‌العاده بالا ممکن است برخی از متابولیت‌های آفلاتوکسین M1 (AFM1) را کاهش دهد (۵)، اما باقی‌مانده‌های سم در شیر خام

مصرف‌کننده می‌باشند. پیشگیری از آلودگی از طریق اصلاح محصولاتی که در برابر کپک مقاوم هستند، موفق بوده است. با این حال، محصولات پس از برداشت انبارش می‌شوند و پتانسیل آلودگی در طول حمل و نقل و ذخیره‌سازی بسیار زیاد است. برای رفع این مشکل، جاذب‌های تجاری وجود دارند که به سموم قارچی متصل می‌شوند و غلظت آنها را در خوراک کاهش می‌دهند. این محصولات ضد مایکوتوکسین معمولاً برای سم‌زدایی غلات آلوده استفاده می‌شود، ولی برای همه‌ی محصولات مؤثر نیستند. جلوگیری از جذب سموم قارچی توسط جاذب‌های تجاری موجود، روشی جدید برای کاهش تأثیر سمی سموم قارچی در دستگاه گوارش نیز می‌باشد (۹)، هر چند در این روش امکان جذب و حذف ریزمغذی‌های ارزشمند نیز وجود دارد.

جدیداً به دلیل یافته‌های مثبت در نتایج تحقیقات مختلف، استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک سموم قارچی در سراسر جهان محبوبیت پیدا کرده است (۱۰). این عوامل شامل برخی میکروارگانیزم‌ها، متابولیت‌های آنها، آنزیم‌ها، و ترکیبات گیاهی هستند. انواع مختلفی از میکروارگانیزم‌ها وجود دارند که ممکن است به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در برابر قارچ‌های تولیدکننده سموم قارچی استفاده شوند که شامل گونه‌های مختلف مخمر، قارچ و باکتری می‌باشند (۱۱). به گفته ویلسون و ویسنیفسکی (۱۲)، ویژگی‌های اصلی یک کنترلگر زیستی ایده‌آل عبارتند از ثبات ژنتیکی (برای میکروارگانیزم‌ها)، کارایی در غلظت‌های پایین، مؤثر بودن در برابر طیف وسیعی از قارچ‌ها و سموم قارچی، دوام بالا در شرایط نامساعد محیطی، رشد روی بسترهای ارزان قیمت (برای میکروارگانیزم‌ها)، عدم بیماری‌زایی برای میزبان، عدم تولید متابولیت‌های بالقوه سمی برای انسان، مقاومت در برابر آفت‌کش‌های رایج

(برای میکروارگانیزم‌ها) و سازگاری با سایر روش‌های شیمیایی و فیزیکی. به‌طور خلاصه، در انتخاب روش‌های کنترل زیستی سموم قارچی، مهم این است که این روش‌ها: (۱) از لحاظ فنی و اقتصادی مناسب و قابل اجرا باشند (۲) باعث تغییر قابل توجه در ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی نشوند (۳) متابولیت‌های سمی و پسماندهای خطرناک تولید نکنند (۱۳). بسته به نحوه‌ی عملکرد آنها، این فاکتورهای زیستی ممکن است با کاهش زیست‌فراهمی سموم قارچی یا با تجزیه‌ی آنها یا تبدیل آنها به متابولیت‌هایی که سمیت کمتر دارند، عمل کنند.

علیرغم این واقعیت که بسیاری از عوامل کنترل زیستی مفید برای اولین بار از طریق تست‌های مهارتی آزمایشگاهی شناسایی شده‌اند، بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند که هیچ ارتباطی بین تست‌های مهارتی آزمایشگاهی و عملکرد میدانی عوامل کنترل زیستی در مقابله با سموم قارچی وجود ندارد (۱۴). دلیل وجود این تناقض معمولاً در شرایط محیطی مختلف توضیح داده می‌شود که ممکن است بر عملکرد آنتاگونیستی تأثیر بگذارد (۱۵). به هر حال امروزه در صنایع خوراک و مواد غذایی، تعداد محصولات کنترل زیستی موجود در بازار رو به افزایش است (۱۴) و در آینده نزدیک، انتظار می‌رود که موارد جدیدی از قارچ‌کش‌های زیستی برای کنترل کپک‌های انبار و سموم قارچی به بازار ارائه شوند. به واسطه اهمیت موضوع این مقاله به بررسی و گزارش یافته‌های اخیر در حوزه راهکارهای زیستی برای مبارزه با سموم قارچی می‌پردازد.

### راهکارهای زیستی برای مبارزه با سموم قارچی

#### فرآیند متابولیزه شدن سموم قارچی در

**کبد:** کبد ارگان اصلی تجمع و متابولیسم

آفلاتوکسین‌ها است. برای مثال آفلاتوکسین B1

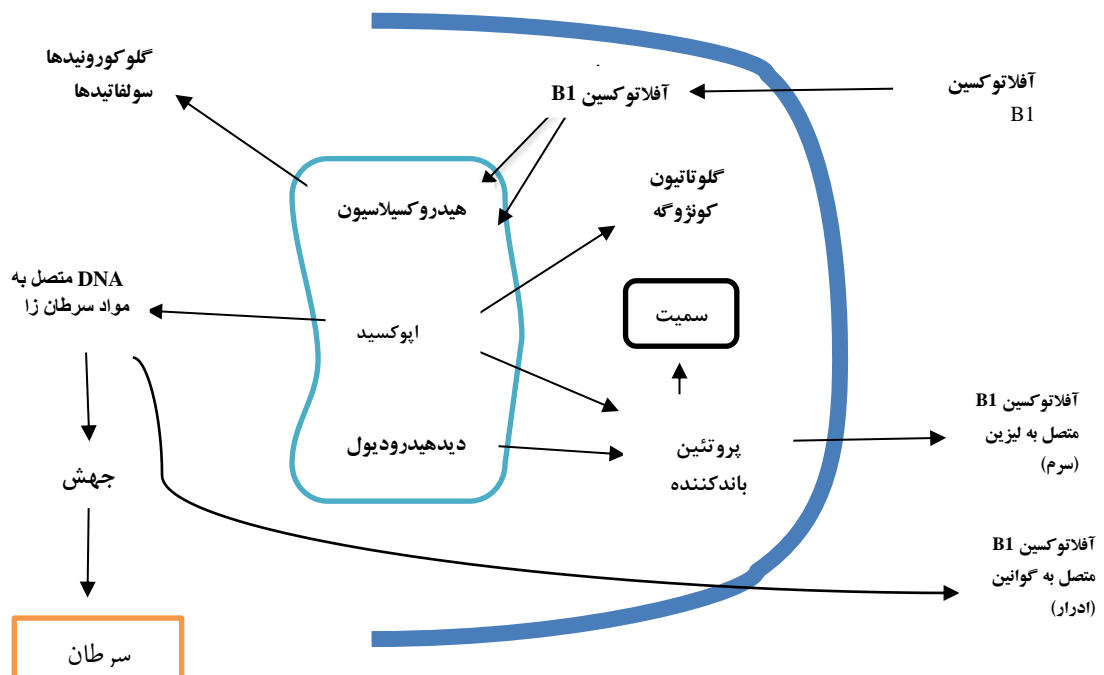
## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور ...

طیوری که در معرض جیره‌های آلوده به AFB1 قرار گرفته‌اند، AFB1، AFM1 و آفلاتوکسیکل در کبد، کلیه‌ها و عضلات ران شناسایی شده‌اند (۱۷). علاوه بر این، آفلاتوکسین B2 (AFB2) نیز در کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره آلوده به مخلوطی از آفلاتوکسین‌ها (۸۰ درصد AFB1)، (۲/۶ درصد AFB2)، (۱۶/۸ درصد AFG1) و (۰/۱ درصد AFG2) شناسایی شده است (۱۶).

در شبکه آندوپلاسمی، AFB1 به متابولیت‌های هیدروکسیله (از طریق مونو اکسیژنازها) تبدیل می‌شود که سپس به ترکیبات گلوکورونید و سولفات متابولیزه می‌گردد. یک مسیر جایگزین، اکسیداسیون AFB1 برای تشکیل اشکال اپوکسید است که می‌تواند بیشتر تحت هیدرولیز قرار گیرد تا دی‌هیدرودیول (Dihydrodiol) را تشکیل دهد. اپوکسید همچنین می‌تواند کونژوگه شود و در نتیجه توسط گلوکوتاتیون استرانسفرآزها سم‌زدایی می‌شود (۱۹).

(AFB1) در کبد متابولیزه می‌شود و متابولیت‌ها به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها متصل می‌شوند. همچنین کلیه‌ها در سم‌زدایی آفلاتوکسین‌ها شرکت می‌کنند و این دو جزء ارگان‌هایی هستند که بیشتر باقیمانده‌های آفلاتوکسین در آنها شناسایی می‌شوند (۱۶). به‌طور خلاصه، آنزیم‌های سیتوکروم P450 (CYP) در کبد و سایر بافت‌ها، AFB1 را به اشکال اپوکسید تبدیل می‌کنند و سپس به AFM1، آفلاتوکسین P1 (AFP1)، آفلاتوکسین Q1 (AFQ1)، و شکل با سمیت کمتر آن آفلاتوکسیکل تبدیل می‌شود (شکل ۲).

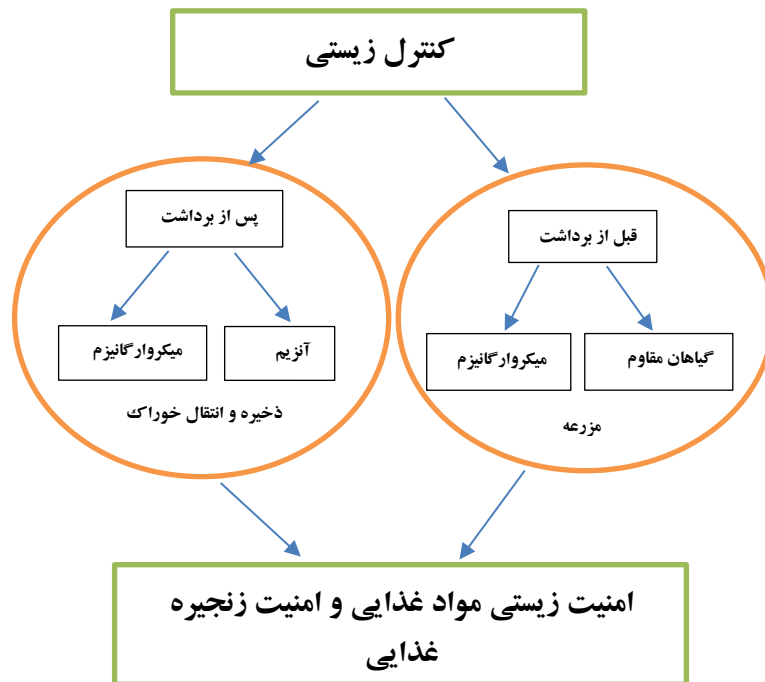
برخی اشکال اپوکسید می‌توانند پیوندهای کووالانسی با DNA و آلبومین سرم ایجاد کنند که به ترتیب منجر به ایجاد ترکیب‌های اضافی گوانین و لیزین می‌شوند. در نهایت این ترکیبات اضافی گوانین و لیزین در ادرار ظاهر می‌شوند. متابولیت‌های AFP1، AFQ1 و آفلاتوکسیکل غیر فعال هستند و در ادرار و یا به شکل کونژوگه‌های گلوکورونیل صرفاً در مدفوع دفع می‌شوند. در مورد



شکل ۲- مکانیسم‌های سمیت AFB1 در شبکه آندوپلاسمی (۱۹)

سلول‌های میکروبی، تخریب مایکوتوکسین توسط متابولیت‌های میکروبی، استفاده از ترکیبات مؤثر گیاهی و یا آنزیم‌ها است. شکل ۳ یک نمای شماتیک از استراتژی‌های زیستی قبل و بعد از برداشت محصول را نشان می‌دهد (۲۰).

**سم‌زدایی زیستی سموم قارچی:** سم‌زدایی زیستی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته، و به روند اصلی تحقیقات سم‌زدایی سموم قارچی تبدیل شده است. روش سم‌زدایی زیستی عمدتاً شامل جذب مایکوتوکسین بر روی دیواره



شکل ۳- یک نمای شماتیک از استراتژی‌های زیستی قبل و بعد از برداشت محصول (۲۰)

میکروارگانیزم از جمله قارچ رایزوپوس (*Rhizopus* sp)، کورینه باکتریوم‌ها روبروم (*Corynebacterium rubrum*)، کاندیدا لیپولیتیکا (*Candida lipolytica*)، آسپرژیلوس نیجیر (*Aspergillus niger*)، تریکودرما ویریدی (*Trichoderma viride*)، موکور امبیگوس (*Mucor ambiguous*)، نئوسروپورا (*Neurospora spp*)، ارمیلاریلا (*Armillariella tabescens*) و باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) را برای سم‌زدایی سموم قارچی بررسی کردند و نتایج مثبتی نیز به‌دست آوردند. باکتری‌هایی مانند باسیلوس و سودوموناس، مخمر و قارچ‌های متعلق به جنس تریکودرما امیدوارکننده‌ترین عوامل کنترل زیستی هستند که در برابر طیف وسیعی از

سم‌زدایی میکروبی به‌عنوان روشی برای تبدیل سموم قارچی به ترکیبات کمتر سمی یا غیر سمی شناخته می‌شود (۹). میکروارگانیزم‌هایی که برای سم‌زدایی استفاده می‌شوند، باید معیارهای خاصی داشته باشند، مانند توانایی تخریب سموم قارچی، ایمن و غیر بیماری‌زا بودن، عدم تولید متابولیت‌های پایدار، تشکیل کمپلکس‌های غیر قابل تجزیه، حفظ فعالیت در زمان انبارش، عدم تداخل با ارزش غذایی، عدم تغییر بو و یا طعم خوراک، و نیاز به حداقل هزینه برای تولید. قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها میکروارگانیزم‌هایی هستند که برای سم‌زدایی از خوراک و غذا استفاده می‌شوند (۲۱). جی و همکاران (۲۰۱۶) (۲۲)، پتانسیل استفاده از چندین

## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور ...

مختلف به آن اشاره شده است. مشخص شده است که پیتیدوگلیکان‌ها و پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتریایی مسئول جذب مایکوتوکسین هستند (۲۷). با توجه به اینکه اثرات تریکوتسن‌ها، به خوبی شناخته شده است و حلقه ۱۲، ۱۳ اپوکسید مسئول فعالیت سمی آنها است، بنابراین حذف این گروه اپوکسید باعث کاهش قابل توجه سمیت این ترکیبات می‌شود (۲۸). سنگار و همکاران (۲۹) خاصیت سم‌زدایی سودوموناس آئروژینوزا را مورد بررسی قرار دادند، که قادر بود چندین آفلاتوکسین از جمله آفلاتوسین B1، B2 و M1 را در مواد مغذی تجزیه کند. باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) (۳۰)، باکتری دیوزیا موتنس (*Devosia Eubacterium 17-2-E-8 mutans*) (۳۱)، اباکتریوم (*BBSH797 sp.*) و کنسرسیوم باکتریایی خاک (به نام DX100) نیز تجزیه‌کننده دئوکسی نیوالنول (۳۲) گزارش شده‌اند. باکتری‌های متعلق به گروه آرگوباکتریوم ریزوبیوم (*Agrobacterium Rhizobium*) جدا شده از خاک قادر به تبدیل دئوکسی نیوالنول به یک متابولیت کمتر سمی به نام ۳-کتو دی اوکسی نیوالنول بودند. باکتری دیوزیا موتنس (*Devosia mutans 17-2-E-8*) دئوکسی نیوالنول را به دو ترکیب متابولیت اصلی (۳-پی دی اوکسی نیوالنول) و متابولیت فرعی (۳-کتو نیوالنول) با سمیت کمتر تجزیه کرد (۳۱). برخی از سویه‌های باسیلوس نیز توانایی جذب زیرالنون را دارند (۳۸)، (۳۹).

به نظر می‌رسد که یک اثر هم‌افزایی بین سویه‌های تخریب‌کننده وجود دارد که سم‌زدایی مؤثر سموم قارچی را ترویج می‌کند. برای مثال نشان داده شده است که یک جامعه میکروبی متشکل از انواع باکتری‌های تجزیه‌کننده مایکوتوکسین قادر به تجزیه همزمان AFB1 و زیرالنون هستند (۳۳). زمانی که زیرالنون (۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) با

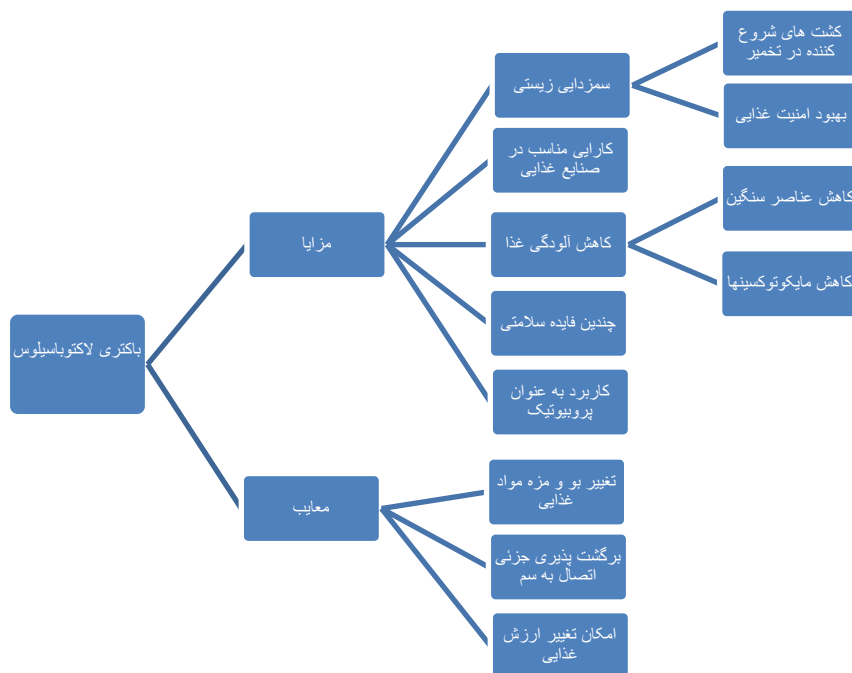
پاتوژن‌های گیاهی به شیوه‌ای سازگار با محیط زیست عمل می‌کنند (۲۳). در بخش‌های بعدی این مقاله، اثرات سم‌زدایی گروه‌های مهم میکروبی به‌طور مفصل بررسی می‌گردند.

### فعالیت سم‌زدایی باکتری‌ها: استفاده از

باکتری‌ها جهت سم‌زدایی سموم قارچی در دهه ۱۹۸۰ آغاز شد. فلاوباکتریوم اورانتیاکام (*Flavobacterium aurantiacum*) یکی از اولین باکتری‌هایی بود که برای تجزیه AFB1 در خوراک مورد استفاده قرار گرفت و مشاهده شد که فعالیت آن مربوط به آنزیم‌های باکتریایی است (۲۴). فلاوباکتریوم اورانتیاکام می‌تواند به‌طور قابل توجهی AFB1 را از محیط مایع و انواع محصولات غذایی بدون باقی گذاشتن محصولات جانبی سمی حذف کند (۲۵). همچنین باکتری اباکتریوم (*Eubacterium BBSH 797*) از جمله اولین سویه باکتری‌هایی بوده است که قادر به تبدیل زیستی گروه اپوکسید تریکوتسن‌ها بود. این سویه که از مایع شکمبه گاوی منشاء می‌گیرد توسط آنزیم اپوکسیداز، دئوکسی نیوالنول (DON) را به متابولیت غیر سمی د-اپوکسی-دئوکسی نیوالنول (DOM-1) تبدیل می‌کند. گفته می‌شود این اولین میکروارگانیزمی بوده که به‌عنوان افزودنی غیر فعال‌کننده مایکوتوکسین در خوراک استفاده شده است. برخی از میکروارگانیزم‌ها می‌توانند سموم قارچی را با آنزیم‌های خود تجزیه کرده و از آنها به‌عنوان منبع کربن استفاده کنند. فنیلوباکتریوم نشان داده است که اکرآتوکسین A (OTA) و گلیوکلادیوم روزوم را تجزیه می‌کند و زیرالنون را از طریق باز شدن حلقه آن و با استفاده از روش دکربوکسیلاسیون سم‌زدایی می‌کند (۲۶). سم‌زدایی AFB1 توسط انتروکوکوس فاسیوم نتیجه چسبیدن مایکوتوکسین به اجزای دیواره سلولی باکتریایی است، روشی که بیشتر در مطالعات

باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) به دلیل سابقه ایمنی بالا در کاربردهای غذایی، در صدر فهرست میکروارگانیزم‌ها برای تخریب سموم قارچی قرار دارند. LAB نسبت به سایر میکروارگانیزم‌ها ترجیح داده می‌شود زیرا برای استفاده در غذا بسیار ایمن هستند، به‌طور طبیعی در روده انسان رشد می‌کنند، عملکرد خوبی در حذف سموم قارچی دارند، و سویه‌های متعددی از آن وجود دارد که به راحتی کشت و نگهداری می‌شوند (۴۰). مزایا و معایب کاربرد لاکتوباسیلوس‌ها به صورت یک نمودار شماتیک در شکل ۴ نشان داده شده است (۴۱).

هر یک از سویه‌های رامنوسس (*L. rhamnosus*) در محیط کشت انکوبه شد، نسبت قابل توجهی (۳۸ تا ۴۶ درصد) از سم زیرالنون از باکتری‌ها بازیابی شد (۳۴). اگرچه از رامنوسس فقط به‌عنوان یک افزودنی غذایی استفاده می‌شود، اما توانسته به‌طور مؤثری سموم قارچی را از خوراک حذف کند و سیستم ایمنی میزبان را تقویت کند (۳۵). به‌طور کلی باکتری رامنوسس یک جاذب زیرالنون با پتانسیل بالا است (۳۶). با استفاده از تست‌های حرارتی و اسیدی بر دیواره‌های سلولی، مشخص شد که ضخامت دیواره سلولی با ظرفیت جذب زیرالنون همبستگی مثبت دارد (۳۷).



شکل ۴- مزایا و معایب کلی سویه‌های لاکتوباسیلوس (۴۱)

متابولیت‌های تولیدی LAB را نشان داده‌اند (شکل ۵).

LAB چندین متابولیت زیست فعال تولید می‌کند که می‌توانند رشد قارچ‌ها را محدود کرده و از تولید سموم قارچی در غذا جلوگیری کنند. ترکیبات زیست فعال LAB شامل اسیدها،

مکانیسم‌های تخریب و حذف مایکوتوکسین توسط سلول‌ها و متابولیت‌های LAB هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند، هر چند تحقیقات سه مکانیسم احتمالی شامل تخریب سموم قارچی توسط آنزیم‌های تولیدی LAB، جذب سموم قارچی توسط سلول‌های LAB و تعامل سموم قارچی با

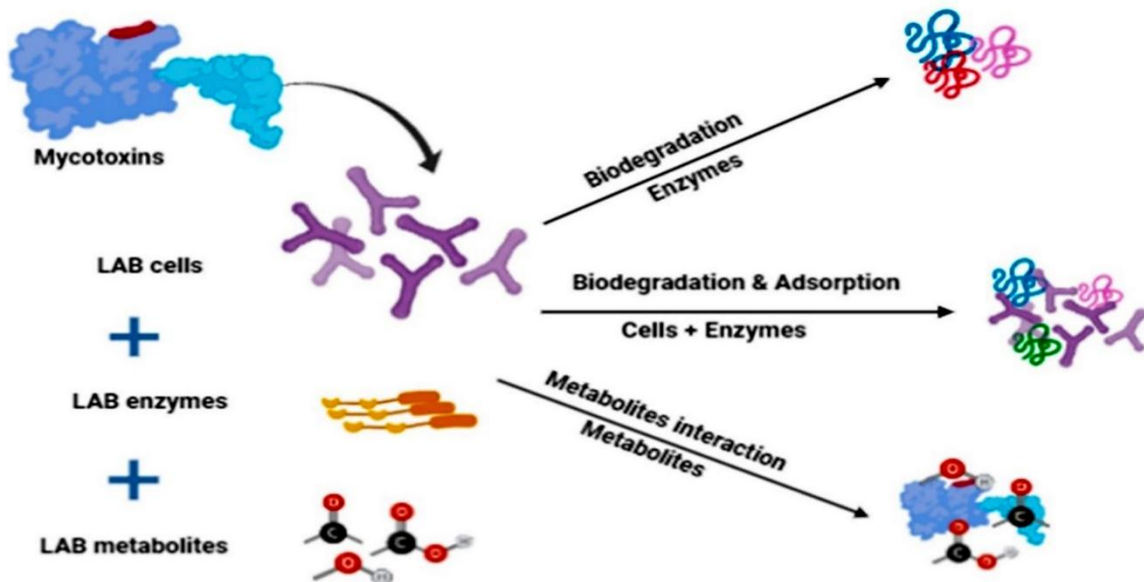
## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور ...

جایگاه‌های اتصال)، افزایش یافت. این مطالعه پیشنهاد کرد که اجزای اصلی درگیر در جذب پاتولین، پلی ساکارید و پروتئین هستند. در مطالعه دیگری، میزان اتصال سموم قارچی به سلول‌های LAB به عوامل خاصی مانند غلظت اولیه سموم قارچی، تعداد سلول‌های LAB، سوپه LAB، pH غذا و دمای انکوباسیون بستگی داشت (۳۲). به گفته دالی و همکاران (۲۰۱۰) (۴۵)، در این فرآیند زنده بودن سلول‌های باکتری چندان ضروری نیست زیرا برای مثال آفلاتوکسین AFB1 به یک آنتی‌بادی مونوکلونال خاص موجود در دیواره سلولی متصل می‌شود.

یکی دیگر از مکانیسم‌های کاهش میکوتوکسین در مواد غذایی به دلیل تعامل بین سموم قارچی و متابولیت‌های تولید شده توسط سوپه‌های LAB مانند اسیدها، ترکیبات فنلی، اسیدهای چرب، و پپتیدهای زیست فعال با وزن مولکولی کم می‌باشد (۴۶). این متابولیت‌ها می‌توانند به سموم قارچی متصل شوند و منجر به کاهش سمیت شوند.

دی‌اکسیدکربن، پراکسید هیدروژن، اسید فنیلاکتیک و پپتیدهای زیست فعال با وزن مولکولی پایین می‌باشند (۴۲). LAB آنزیم‌های پروتئولیتیک متعددی از جمله پروتئیناز تولید می‌کند که پروتئین را به پلی‌پپتید هیدرولیز می‌کند، ناقلین پپتیدی که پپتیدها را به داخل سلول منتقل می‌کنند و پپتیدازهای فراوان درون سلولی، پپتیدهای منتقل شده را به اسیدهای آمینه تجزیه می‌کنند (۴۰). آنزیم‌های پروتئولیتیک LAB مهم‌ترین نقش را در فرآیند سم‌زدایی سموم قارچی در مواد غذایی ایفا می‌کنند (۴۳).

جذب سموم قارچی توسط دیواره سلولی سوپه‌های LAB به حضور پلی‌ساکاریدها، پروتئین و پپتیدوگلیکان‌ها در دیواره سلولی باکتری مرتبط است (۴۴). وانگ و همکاران (۲۰۱۵) (۳۲) کاهش سم پاتولین در محیط کشت را به دلیل اتصال به دیواره سلولی گزارش کردند. همچنین فعالیت اتصال با استفاده از سوپه‌های دارای بالاترین سطح ویژه و حجم دیواره سلولی (به دلیل افزایش تعداد



شکل ۵- مکانیسم‌های تخریب میکوتوکسین توسط سوپه‌های باکتری اسید لاکتیک (۴۷)

جدول ۱- کاربرد باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تخریب سموم قارچی در مواد غذایی و خوراک (اقتباس از موهی‌الدین و همکاران ۲۰۱۹) (۴۷)

میکروارگانیزم‌ها	سموم قارچی	درصد تخریب سم	رفرنس
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	آفلاتوکسین B1	۸۰	۴۹
لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس آمیلوروس	آفلاتوکسین B1	۵۰	۵۰
لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلنتاروم	آفلاتوکسین‌ها (G2, G1, B2, B1)	۵۰	۵۱
لاکتوباسیلوس پلنتاروم، لاکتوباسیلوس لاکتیس	آفلاتوکسین B1	۸۱	۵۲
لاکتوباسیلوس پلنتاروم، لاکتوباسیلوس بلگاریکس، استروپتوکوکوس ترموفیلوس	آفلاتوکسین M1	۳۴-۱۱	۵۳
لاکتوباسیلوس کازئی	آفلاتوکسین B1	۴۹/۲	۵۴
لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس پلنتاروم	آفلاتوکسین B1	۵۵-۳۹	۵۵
لاکتوباسیلوس پلنتاروم	آفلاتوکسین B1	۶۰	۵۶
گونه‌های لاکتوباسیلوس	آفلاتوکسین‌های B1 و B2	ND	۵۷
لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس پلنتاروم	A اکرانوکسین	۵۰	۵۱
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم انیمالیس	A اکرانوکسین	۹۵	۵۸
پدیوکوکوس پروالس	پاتولین	۸۰	۵۹
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	A اکرانوکسین	۹۰	۶۰
لاکتوباسیلوس برویس	پاتولین	۹۷	۶۱
لاکتوباسیلوس پلنتاروم	دئوکسی نیوالنول	ND	۶۲
گونه‌های لاکتوباسیلوس	B1، دئوکسی نیوالنول، فومونیزین	۶۶-۵۶	۶۳
	B2، فومونیزین‌های	۸۲، ۵۵، ۱۰۰	
مخلوط باکتری اسیدلاکتیک	B1 فومونیزین	۶۷-۵۶	۶۴
لاکتوباسیلوس پلنتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس	زرالنون	۷۵-۶۸	۶۵
لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس لاکتیس	زرالنون	ND	۶۵
ND، مشخص نشده	زرالنون	۵۵	۶۶

کرده‌اند. بنابراین، استفاده از مخمرها در روش‌های مختلف فن‌آوری ممکن است یا اثر مستقیم بازدارنده بر سنتز سموم توسط قارچ‌های خاص داشته باشد، یا اینکه سموم قارچی را از محصولات کشاورزی حذف کند و در نتیجه آنها را با موفقیت سم‌زدایی کند (۴۸).

از جمله مزیت این میکروارگانیزم‌ها این است که آنها نیازهای غذایی مقرون به صرفه‌ای دارند و می‌توانند در مدت زمان طولانی‌تری روی سطوح خشک بنشینند و همچنین تحمل آفت‌کش‌های مختلف مورد استفاده در شرایط پس از برداشت را دارند (۴۹). بر خلاف بسیاری از قارچ‌های میسلیوم، مخمرها عمدتاً هاگ‌ها یا سموم قارچی آلرژی‌زا تولید نمی‌کنند و همچنین قادر به سنتز متابولیت‌های شبه آنتی‌بیوتیکی که توسط برخی

گزارش‌های زیادی در مورد توانایی LAB در مهار پتانسیل جهش‌زایی سموم قارچی وجود دارد. به‌عنوان مثال نشان داده شده است که سویه‌های LAB پتانسیل جهش‌زایی AFB1، AFB2 و AFG1 را در محدوده ۵۶/۶ - ۷۷/۴ درصد مهار می‌کنند. در حال حاضر انواعی از سویه‌های LAB گزارش شده‌اند که می‌توانند برای سم‌زدایی سموم قارچی استفاده شوند (جدول ۱) (۴۷).

**فعالیت سم‌زدایی مخمرها:** مخمرها (به‌صورت پروبیوتیک یا محصولات حاوی دیواره سلولی مخمر) نیز برای تجزیه و جذب سموم قارچی به‌عنوان یک روش کنترل زیستی به کار گرفته شده‌اند که در تبدیل سموم به محصولات غیر سمی یا حداقل با سمیت کمتر، مؤثر بوده‌اند، و برخی از آنها نیز رشد قارچ‌های تولیدکننده میکوتوکسین را سرکوب

## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور ...

شده از طریق جذب فیزیکی نیز ثابت شده است. در یک مطالعه متفاوت، مخمر یارویالیپولیتیکا (*Yarrowia lipolytica*) تقریباً نیمی از غلظت اولیه اعمال شده‌ی اکراتوکسین را کاهش داد (۵۶). همچنین بیش از ۵۰ درصد تجزیه پاتولین توسط رودوترولا موسیلیاژ نوزا (*Rhodotorula mucilaginosa* JM19) انجام شد که نشان‌دهنده مفید بودن این مخمر در سم‌زدایی غذاها و مواد خام است (۵۷).

هنگامی که غذا یا خوراک برای تعیین ایمنی آن ارزیابی می‌شود، یافتن بیش از یک نوع میکوتوکسین در یک نمونه خاص غیر معمول نیست. بنابراین، هدف‌گذاری برای تخریب همزمان انواع سموم قارچی مهم است (۵۸). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که مخمرها عوامل جذب میکوتوکسین نسبتاً پایدار هستند و عامل اصلی این جذب، کربوهیدرات‌های کاربردی در دیواره سلولی آنها است. یانیکورپس و همکاران (۲۰۰۴) همبستگی بین مقدار دی-بتا-گلوکان در دیواره سلولی مخمر و توانایی اتصال سموم قارچی را بررسی کردند و دریافتند که دی-بتا-گلوکان نقش عمده‌ای در جذب زیرالنون ایفا می‌کند (۵۹). آزمایش‌های دیگری برای مقایسه توانایی عصاره دیواره سلولی مخمر و آلومینوسیلیکات کلسیم هیدراته برای جذب زیرالنون انجام شد. مشخص شد که عصاره دیواره سلولی مخمر به‌طور مؤثرتری زیرالنون را در دستگاه گوارش حیوانات تک معده جذب می‌کند. این عصاره توانست ۴۰ درصد از کل محتوای زیرالنون را در روده‌ها جذب کند (۶۰).

در سال‌های اخیر، مخمر ساکارومایسس به‌طور مداوم به‌عنوان یک افزودنی تغذیه‌ای توسعه یافته است و به خوراک اضافه شده است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که کلونیزاسیون مخمر ساکارومایسس در دستگاه گوارش نه تنها بهره‌وری و سلامت حیوانات

آنتاگونیست‌های باکتریایی تولید می‌شوند، نیستند (۵۰). از آنجا که مخمرها می‌توانند روی بسترهای مقرر به صرفه به سرعت رشد کنند، برای تولید در مقادیر زیاد مناسب هستند (۵۱). استفاده از مخمرها برای انسان، حیوانات، گیاهان میزبان یا محیط زیست بی‌ضرر است و بعید است که در موجودات هدف (میزبان) مقاومت ایجاد کنند (۵۲). در مطالعه‌ای چهار سویه از مخمر ساکارومایسس سرورزیه (*Saccharomyces cerevisiae* AUMC 3875)، پیکیا آنومالا (*Pichia anomala* AUMC 2674)، پیکیا گیلرmondii (*Pichia guilliermondii* AUMC 2663) و کاندیدا کروسی (*Candida krusei* AUMC 8161) به‌عنوان عوامل کنترل زیستی مختلف قارچی انتخاب شدند. نتایج نشان داد که کاندیدا کروسی به‌طور مطلق از توسعه و تولید سموم توسط تمام ۱۱ قارچ سم‌زای مورد آزمایش جلوگیری کرد. پیکیا آنومالا به‌طور کامل توسعه و سنتز سموم حاصل از شش قارچ را سرکوب کرد، و رشد و همچنین تولید سموم سایر قارچ‌های سم‌زا را نیز به شدت کاهش داد. پیکیا گیلرmondii رشد و سموم سنتز شده توسط ۱۱ قارچ را به شدت کاهش داد. ساکارومایسس سرورزیه کاملاً از رشد پنج قارچ جلوگیری کرد و رشد سایر قارچ‌ها را تا حد زیادی کاهش داد.

به گفته لیو و همکاران (۵۴)، ساکارومایسس سرورزیه یک مخمر پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند به‌طور قابل ملاحظه‌ای DON را تجزیه کند و میزان انتشار لاکتات دهیدروژناز (LDH) را در سلول‌های تحریک شده توسط DON کاهش دهد. همچنین، موفقیت‌هایی در زمینه کاهش اثرات اکراتوکسین A و آفلاتوکسین B1 با استفاده از دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرورزیه در خوراک مرغ گزارش شده است (۵۵). کارایی مخمر برای حذف پاتولین در غذاهای تخمیر

که ابزار خوبی برای توسعه پایدار دامپروری مدرن هستند.

جدول ۲ برخی میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا که اختصاصاً برای سم‌زدایی زیرالنون (ZEA) استفاده شده‌اند را نشان می‌دهد.

را بهبود می‌بخشد، بلکه دسترسی زیستی سموم قارچی را در دستگاه گوارش به حداقل می‌رساند (۶۱). بنابراین، از نظر عوامل جاذب مایکوتوکسین، عصاره‌های دیواره سلولی و سلول‌های زنده مخمر ساکارومایسس سرویزیه کانون تحقیقات سم‌زدایی مایکوتوکسین شده‌اند. آنها همچنین ثابت کرده‌اند

جدول ۲- برخی میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا که می‌توانند برای سم‌زدایی زرالنون (ZEA) استفاده شوند (اقتباس از وانگ و همکاران ۲۰۱۹)

میکروارگانیسم‌ها	رفرنس
باسیلوس	۶۲
باسیلوس سوبتیلیس	۶۲
باسیلوس لیکنیفورمیس	۳۸
باسیلوس آمیلولیکفاسینس	۳۹
باسیلوس ولزنسیس	۳۲
باسیلوس سرئوس	۳۲
لاکتوباسیلوس	۶۳
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۶۳
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳۶
لاکتوباسیلوس روتری	۵۶
لاکتوباسیلوس پاراکاژی	۳۷
لاکتوباسیلوس موکوزی	۶۳
مخمر ساکارومایسس	۶۴
ساکارومایسس سرویزیه	۶۴

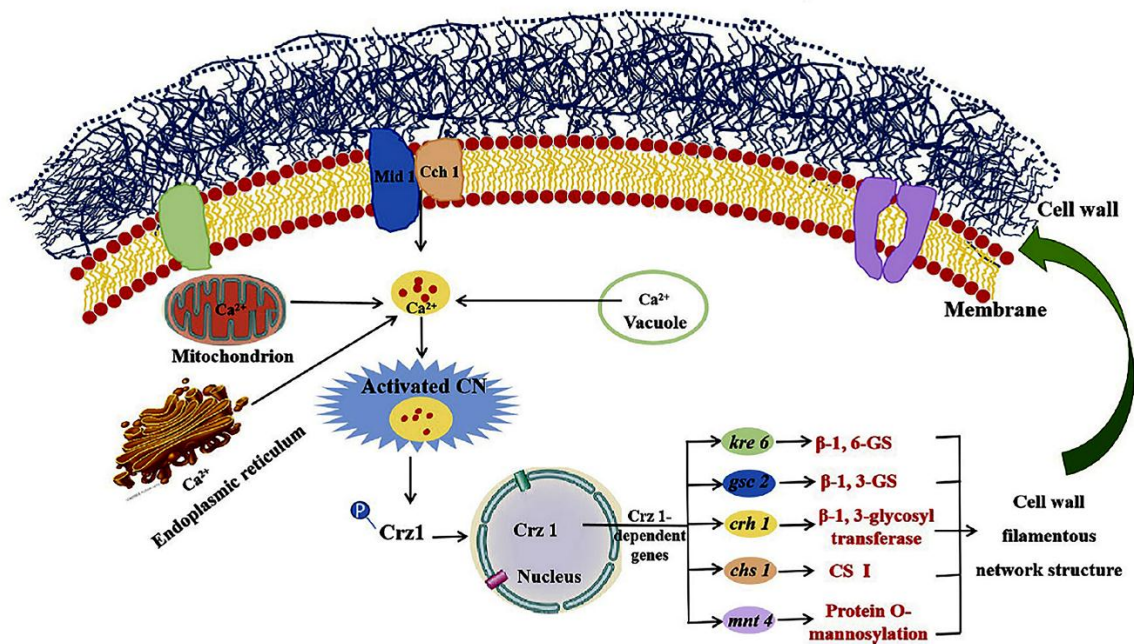
حضور سم در حمل و نقل و انبارها منجر می‌شود. به این ترتیب، تولیدکنندگان، سم کمتری وارد انبار می‌کنند و عوامل کنترل زیستی اعمال شده تا زمان استفاده نهایی روی محصول باقی می‌مانند (۶۶). همچنین قارچ‌های دیگری مانند ریزوپوس (*Rhizopus*)، تریکودرما (*Trichoderma*)، کلونوس تاکیس (*Clonostachys*) و پنسی‌سیلیوم (*Penicillium spp*) وجود دارند که ممکن است برای کنترل زیستی سموم قارچی مناسب باشند (۶۷). قارچ‌های رایزوپوس اوریزا (*Rhizopus oryzae*) و تریکودرما ریسسی (*Trichoderma reesei*) آفلاتوکسین‌های AFG1، AFG2، AFB1، AFB2 و AFG2 را کاهش می‌دهند. سویه‌های تریکودرما همچنین توانایی ضد انگلی قابل توجهی را نشان داده‌اند، که استفاده از آنها برای جلوگیری از رشد فوزاریوم سمی، و تشکیل حلقه‌هایی در اطراف هیف فوزاریوم و نفوذ به آن را مناسب می‌سازد (۶۸).

**فعالیت سم‌زدایی قارچ‌ها:** در مورد قارچ‌ها و توانایی‌های سم‌زدایی آنها، مشخص شده است که گونه‌هایی که قادر به سنتز سموم قارچی هستند، اغلب می‌توانند سموم مایکوتوکسین را نیز تخریب کنند، حتی استفاده از سویه‌های غیر سمی آسپریژیلوس پارازیتیگوس (*A. parasiticus*) و آسپریژیلوس فلاووس (*A. flavus*) بر روی گیاهان (ذرت، بادام‌زمینی، پسته و پنبه) نتایج استثنایی در حذف آفلاتوکسین‌ها به دست آمده است. این امر به این دلیل است که این قارچ‌ها معمولاً توانایی تجزیه و احتمالاً تبدیل و استفاده از محصولات تخریب را دارند (۶۵). استفاده از دوزهای بالای تلقیح‌های غیر سمی در خاک اطراف محصولات در حال رشد، رقابت کافی با سویه‌های سم‌زا در مکان‌های آلوده گیاه در حال رشد را فراهم می‌کند. این روش همچنین اثرات مثبتی را در طول انبارش به همراه دارد، زیرا حذف رقابتی در مزارع به کاهش خطر

**مکانیسم جذب زیستی سموم قارچی:** در سال‌های اخیر، تعداد زیادی از مطالعات نشان داده‌اند که رفتار جذب سلول‌های میکروبی را نمی‌توان تنها با ساختار فیزیکی یا ترکیب شیمیایی توضیح داد. تئوری تعاملات اجزا و ساختار ممکن است فرآیند جذب را بهتر توضیح دهند. سنجش جذب زیرالنون نشان داده است که ساختار دیواره سلولی میکروبی سه بعدی متشکل از هر دو بتا-۱،۳-گلوکان و بتا-۱،۶-گلوکان نقش عمده‌ای در مکانیسم‌های جذب ایفا می‌کند. نسبت بتا-۱،۳-گلوکان نامحلول به بتا-۱،۶-گلوکان محلول می‌تواند سازماندهی شبکه سه بعدی را تغییر دهد و این تغییر ساختاری می‌تواند باعث تغییر میزان جذب در هنگام تماس زیرالنون و دیواره سلولی شود. اخیراً یانیکوریس و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای رفتار جذب سلولی مخمر را به روشی عمیق‌تر و خاص‌تر نشان دادند، که به‌طور عمده رابطه بین تشکیل شبکه دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه (ATCC18824) و قابلیت جذب پاتولین را از منظر تنظیم ژن مورد بحث قرار داده است. این مطالعه نشان داد که کلسیم اگزوزن ( $10 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ ) می‌تواند تشکیل ساختار شبکه‌ای دیواره سلولی را توسط بتا-۱،۳-گلوکان و بتا-۱،۶-گلوکان و کیتین با تنظیم مثبت ژن (CFZ) برای تولید دو آنزیم کلیدی ضروری، بتا-۱،۳-گلوکاناز و بتا-۱،۳-گلیکوزیل ترانسفراز تنظیم کند (شکل ۶). این نتیجه تاکید داشت که فناوری اصلاح ژنتیکی می‌تواند ترکیب شیمیایی دیواره سلولی، ضخامت دیواره سلولی، و پیکربندی فضایی ساختارهای شبکه‌ای را برای ایجاد یک رابطه «ساختاری فعال» با سموم قارچی تنظیم کند (۷۱، ۵۷). شکل ۶ تشکیل شبکه دیواره سلولی مخمر از دیدگاه تنظیم ژن را نشان می‌دهد (۷۲).

فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس (*Fusarium verticillioides*) غیر سمی به نظر می‌رسد و یک گونه امیدوارکننده در برابر سویه‌های فوزاریوم تشکیل دهنده فومونیسین باشد، اما متأسفانه در عین حال یک پاتوژن گیاهی است (۶۹). در پژوهش‌های آزمایشگاهی، تلقیح گونه‌های میکروسفروسیس (*Microsphaerosis*) بر روی دانه‌های ذرت و گندم، تولید بیماری پوسیدگی (*Gibberella zae*) را تا ۷۳ درصد کاهش داد، و در آزمایش دیگری، در شرایط گلخانه‌ای، با تلقیح قارچ فومابتا (*Phoma betae*) بر روی خوشه‌های گندم، شیوع فوزاریوم تا حدود ۶۰ درصد کاهش یافت (۷۰). مشخص شده است که قارچ کلونوستاکیس روزه‌آ (*Clonostachys rosea*)، زیرالنون را با آنزیم لاکتوناز مخصوص که حلقه لاکتون زیرالنون را هیدرولیز و به دنبال آن دکربوکسیلاسیون خود به خودی را کاتالیز می‌کند، تخریب می‌کند (۵۷).

**تجزیه زیستی در مقایسه با جذب زیستی:** در مطالعات متعدد نشان داده شده است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند آلاینده‌ها را از طریق مسیرهای تجزیه زیستی یا جذب زیستی حذف کنند. تجزیه زیستی برگشت ناپذیر است و در مقایسه با جذب زیستی طولانی‌تر است، اما می‌تواند ساختار سم را تغییر دهد و همچنین منجر به تولید متابولیت‌های ناخواسته شود (به‌عنوان مثال، تولید آفلاتوکسیکل از تجزیه آفلاتوکسین B1) که می‌تواند برای میزبان مضر باشد. جذب زیستی اتصال مستقیم سریع سم را فراهم می‌کند که ممکن است به سادگی آزاد شود و بستگی به میل اتصال باکتری به سم دارد (Solis-Cruz 2019). آفلاتوکسین، زیرالنون، دثوکسی نیوالنول، اکراتوکسین و پاتولین از جمله سموم قارچی هستند که می‌توانند توسط LAB جذب شوند، اما این جذب بسته به سویه مورد استفاده در مقادیر متفاوتی صورت می‌گیرد (۷۱).



شکل ۶- تشکیل شبکه دیواره سلولی مخمر از دیدگاه تنظیم ژن (۷۲)

گسترده آن (که در سطح جهان رایج‌ترین میکوتوکسین کشاورزی شناسایی شده) و ماهیت شیمیایی آن (داشتن بخش کوچک قطبی)، یافتن عواملی که قادر به اتصال برگشت‌ناپذیر با این سم باشند دشوار است. این امر آن را به یک چالش برای تحقیقات نوآورانه متعدد برای کشف راه‌حل‌های تخریب زیستی عملی و پایدار این سم تبدیل کرده است. در حالی که مکانیسم عمل آنزیم‌ها نسبت به زیرالنون به‌طور مفصل و کامل توسط چندین تیم علمی مورد مطالعه قرار گرفته است (۷۴) و استراتژی‌های سم‌زدایی توسعه‌یافته‌ای نیز برای مختل کردن فعالیت استروژنی آن در نظر گرفته شده است. حالت رایج سم‌زدایی زیرالنون که تاکنون شرح داده شده است، برش حلقه لاکتون است که توسط استرازها کاتالیز می‌شود. این واکنش برگشت‌ناپذیر است زیرا هیدروکسی کتون‌های حاصل به‌طور خود به خود دکربوکسیله می‌شوند (۷۵). آنزیم‌های مورد نیاز برای کنترل سموم قارچی

**فعالیت سم‌زدایی آنزیم‌ها:** اخیراً تلاش‌های قابل توجهی برای یافتن آنزیم‌هایی که قادر به تجزیه و متابولیزه کردن سموم قارچی باشند، شده است. از چنین روش‌های بیوتکنولوژیکی خاصی انتظار می‌رود محصولات بی‌ضرر تولید کنند که ترجیحاً منجر به سم‌زدایی کامل شوند، و دوستدار محیط‌زیست باشند. مسیرهای اصلی تبدیل سموم قارچی به متابولیت‌های بی‌ضرر توسط آنزیم‌ها عبارتند از هیدروکسیلاسیون، هیدروژناسیون، هیدرولیز، اکسیداسیون، استریفیکاسیون، گلوکورونیداسیون و گلیکوزیلاسیون، داپوکسیداسیون، متیلاسیون، سولفاتاسیون، دمتیلاسیون و دامیناسیون (۷۳) که انجام شدن هر یک از آنها به نوع و ماهیت سموم قارچی بستگی دارد. راه‌حل‌های امیدوارکننده‌ای برای هدف قرار دادن آفلاتوکسین‌ها، فومونیزین‌ها و اکراتوکسین‌ها به این روش گزارش شده است (۷۴). در مورد دکوکسی نیوالنول به نظر می‌رسد به دلیل شیوع

## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور ...

محدودی می‌توانند اینگونه باشند. سیتوکروم‌ها قادر به تغییر در آفلاتوکسین‌ها، تریکوتسن‌ها و استریگماتوسیستین هستند، آنزیم آفلاتوکسین اکسیداز (AFO)، که بر روی آفلاتوکسین‌ها و استریگماتوسیستین عمل می‌کند و آنزیم آلدوکتوردوکتاز (AKR18A1) تریکوتسن‌ها و زرانون را تغییر می‌دهد. علاوه بر این، سموم قارچی متعددی (مانند استریگماتوسیستین و آلکالوئیدهای ارگوت) وجود دارند که فقط توسط تعداد بسیار محدودی از آنزیم‌ها سم‌زدایی می‌شوند. از طرفی، بسیاری از آنزیم‌ها (لیازها، ایزومرازها، لیگازها و ترانسلوکازها) هستند که تأثیرشان بر همه با برخی از سموم قارچی ناشناخته است (۷۷).

رایج، همراه با تولیدکنندگان آنها، همان‌طور که توسط لوی و همکارانش خلاصه شده است) در جدول ۳ آورده شده‌اند (۷۵).

از آنجایی که معمولاً چندین مایکوتوکسین به‌طور همزمان ایجاد آلودگی می‌کنند، لیازین و اففرمنکو (۲۰۱۹) (۷۷) توسعه عوامل کنترل زیستی را پیشنهاد کردند که حاوی چندین آنزیم کارآمد باشند. برای انتخاب دقیق آنزیم‌های مناسب برای چنین ترکیب‌هایی، هم درک کامل فرآیندهای کاتالیزوری و هم تجزیه و تحلیل مناسب خواص آنزیم مورد نیاز است. راه‌حل‌های مفید برای این منظور آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند چندین سم قارچی را به‌طور همزمان تجزیه کنند، اما تعداد

جدول ۳- آنزیم‌های رایج مورد استفاده برای کنترل سموم قارچی (اقتباس از لوی و همکاران ۲۰۱۷)

مایکوتوکسین	آنزیم	تولیدکننده
آفلاتوکسین	آنزیم آفلاتوکسین اکسیداز	<i>Armillariella tabescens</i>
	پراکسیداز	<i>Horseradish (Armoracia rusticana)</i>
	لاکاز	<i>Trametes versicolor</i>
	لاکاز	<i>Streptomyces coelicor</i>
	ردوکتازهای وابسته به F420H2	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
	پراکسیداز منگنز	<i>Pleurotus ostreatus</i>
	آنزیم تخریب آفلاتوکسین	<i>Pleurotus ostreatus</i>
	آنزیم تجزیه‌کننده آفلاتوکسین میکسوباکتیریا	<i>Myxococcus fulvus</i>
	لاکاز	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
	Ery4	<i>Pleurotus eryngii</i>
فومنسین	کربوکسی استراز و آمینوترانسفراز	<i>Sphingomonas sp.</i>
	کربوکسیل استراز B و آمینوترانسفراز	<i>Sphingopyxis sp.</i>
	فومونیزین استراز	<i>Sphingopyxis sp.</i>
تریکوتسن	سیستم سیتوکروم P450	<i>Sphingomonas sp.</i>
	UDP-گلیکوزیل ترانسفراز	<i>Arabidopsis thaliana</i>
زیرانون	لاکاز	<i>Trametes versicolor</i>
	لاکاز	<i>Streptomyces coelicolor</i>
	لاکتونو هیدرولاز	<i>Clonostachys rosea</i>
	۲ سیس پراکسیردوکسین	<i>Acinetobacter sp.</i>
اکراتوکسین	کربوکسی پیتیداز	<i>Bovine pancreas</i>
	کربوکسی پیتیداز	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	لیپاز	<i>Aspergillus niger</i>
	پرتناز	
	آمیلاز	

دیده شود. خواص فیزیکی شیمیایی غذا (محتوای چربی، رطوبت، اسیدیته، بافت) نیز ممکن است تحت تأثیر فرآیند سم‌زدایی قرار گیرد. علاوه بر این،

استفاده از آنزیم‌ها هم از نظر فناوری و هم از نظر اقتصادی مفید است. هرچند گاهی کاهش اثربخشی آنها به دلیل تأثیر ماتریس ممکن است

ممکن است اجزای بازدارنده‌ای در مواد خام وجود داشته باشند که سموم قارچی را پوشانده و از دسترس آنزیم‌ها دور کنند. چنین شرایطی ممکن است نیاز به پیش تصفیه و صرف هزینه و زمان اضافی را در پی داشته باشد، که باید در هنگام صنعتی‌سازی پروژه‌ها به دقت در نظر گرفته شوند (۷۵).

**کنترل بیولوژیکی مایکوتوکسین با کمک ترکیبات مؤثر گیاهی:** استفاده از اسانس و ترکیبات گیاهی به‌عنوان روش زیستی جدیدی در کنترل رشد قارچ‌های سم‌زا مورد توجه قرار گرفته است. اسانس‌ها (EO) مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات فرار و معطر هستند که دارای اجزای آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشند (۷۸). مطالعات نشان داده‌اند که اسانس‌ها بو و خوش طعمی خوراک را بهبود می‌بخشند، بنابراین مصرف داوطلبانه‌ی خوراک توسط حیوانات را افزایش می‌دهند (۵۶). این ترکیبات می‌توانند از مواد غذایی با کنترل زیستی در برابر قارچ‌ها و سموم قارچی محافظت کنند. ماهیت فیزیکی اسانس‌ها (یعنی وزن مولکولی کم همراه با خاصیت چربی دوستی) به آنها اجازه می‌دهد تا سریع‌تر از سایر مواد به غشای سلولی نفوذ کنند (۷۹). چندین مطالعه بر استفاده از اسانس‌های مختلف به‌عنوان محرک‌های زیستی در برابر قارچ‌های آفلاتوکسیژنیک تمرکز کرده‌اند (۸۰). این ترکیبات شیمیایی طیف گسترده‌ای از اثرات را در برابر طیف وسیعی از آفات (حشرات، قارچ‌ها و ویروس‌ها) نشان داده‌اند (۸۱). اسانس‌های گیاهان به‌عنوان ضد تب، حشره‌کش، ضد مالاریا، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس و عامل درمان لپتوسپیروز استفاده شده‌اند (۸۲) همچنین برای بهبود رشد گیاه و کنترل زیستی کپک‌ها نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند و از آنجایی که سمیت کمی هم برای پستانداران دارند (۸۱) پتانسیل بالایی برای

استفاده به‌عنوان فاکتورهای کنترل زیستی قارچ‌ها و سموم قارچی دارند (۸۳).

مشخص شده است که عصاره‌های گیاهان مصری مانند لوپین آلبوس (*Lupinus albus*)، آمی ویسناگا (*Ammi visnaga*) و زانتیم پونگنز (*Xanthium pungens*) رشد آسپرژیلوس فلاووس (*A. flavus*) را به‌صورت وابسته به دوز مهار می‌کنند (۸۴). اثرات مهاری اعمال شده توسط ادویه‌ها و گیاهان ممکن است حداقل تا حدی به ترکیبات فنلی مانند کومارین‌ها و فلاونوئیدها وابسته باشد (۸۵). فعالیت‌های ضد تب، ضد تومور، ضد مالاریا و ضد قارچ برای قسمت‌های مختلف درخت چریش، هسته‌های چریش، و عصاره‌های برگ و هسته‌های آن گزارش شده است (۸۶).

در مطالعه‌ای دیگر اثر برخی از ترکیبات گیاهی بر رشد گونه‌های سمی دیگر آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*Aspergillus parasiticus*) مورد مطالعه قرار گرفت، که روغن چریش در غلظت ۰/۵ درصد فعالیت ضد قارچی قابل قبولی داشت (۸۴) درصد کاهش در مقابل تیمار شاهد، و در غلظت ۰/۲ و ۰/۱ درصد، به ترتیب موجب ۵۲ و ۳۶ درصد کاهش در زیست توده قارچی شد (۸۷). مهار کامل تولید اکرآتوکسین (OTA) با افزودن ۰/۱ و ۰/۳ درصد روغن چریش برای چهار سوبه قارچ جدا شده از انگور گزارش شد. نتایج رزاقی آبیانه و همکاران (۲۰۰۵) (۸۸) با تحقیقات قبلی موافق است زیرا آنها گزارش کردند که عصاره برگ و دانه چریش می‌تواند باعث تغییرات مورفولوژیکی در میسلیم‌ها شود، که این تغییرات منجر به تخریب سلولی آنها می‌شود. سیتارا و همکاران (۸۹) گزارش کردند که چریش رشد یا تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس را مهار نمی‌کند. تناقضات بین این نتایج و مطالعات دیگر احتمالاً به دلیل تفاوت در مسیرهای بیوشیمیایی است که سنتز سموم قارچی

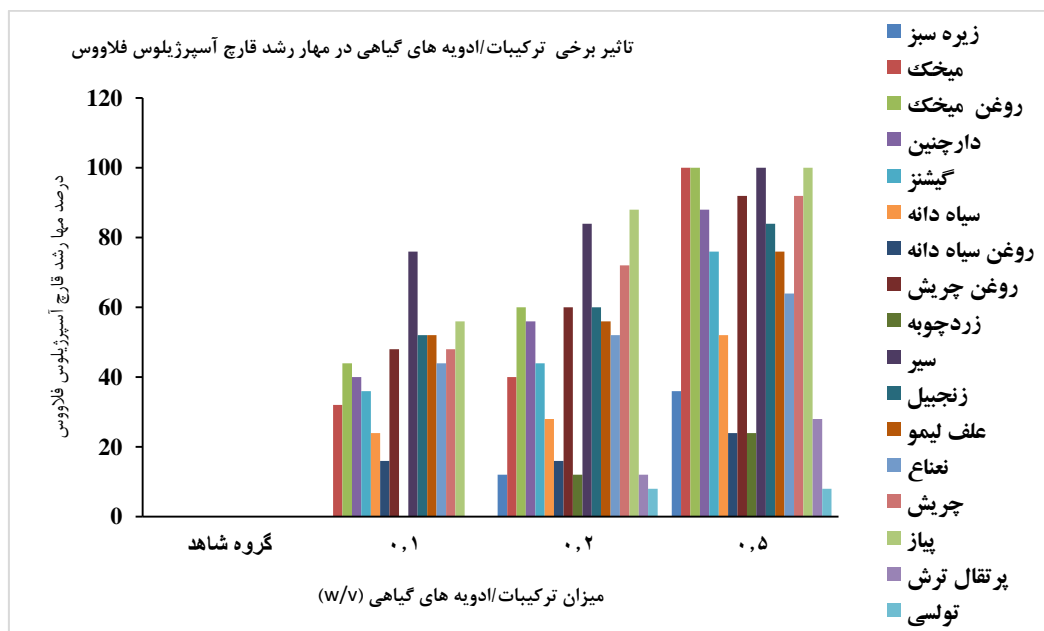
## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور ...

به‌خصوص در برابر آسپرژیلوس کاربوناریس (A. carbonarius) است.

در پژوهشی چندین ماده گیاهی به‌منظور کاهش تولید آفلاتوکسین و رشد کپک مورد آزمایش قرار گرفتند که طبق نتایج، برخی از این ترکیبات گیاهی قادر به مهار رشد قارچ آسپرژیلوس و کاهش سنتز آفلاتوکسین بودند. در این پژوهش برخی از مواد مانند ترکیبات گیاهی/ ادویه‌ها اثر بازدارندگی بر رشد آسپرژیلوس فلاووس و یا آسپرژیلوس پارازیتیکوس نشان دادند. در میان این ترکیبات گیاهی/ ادویه‌ها، میخک، روغن میخک، سیر، پیاز، چریش، روغن چریش، دارچین، زنجبیل، علف لیمو و گشنیز عملکرد نسبتاً بهتری را در غلظت ۰/۵ درصد برای مهار رشد قارچ نشان دادند (شکل ۷) (۹۱).

مختلف تولید شده توسط گونه‌های آسپرژیلوس را تنظیم می‌کنند و نیز به دلیل تفاوت در ترکیب و خواص هر بخش از روغن چریش می‌باشد. احتمال دیگر این است که روغن چریش در غلظت‌های بالا ممکن است منجر به تشدید وضعیت استرس اکسیداتیو توسط قارچ و افزایش تولید اکراتوکسین شود.

در حالی که بسیاری از ترکیبات و مواد به‌طور مؤثری رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین را مهار می‌کنند، برخی دیگر دارای خواص تحریک‌کننده هستند و بر بیوسنتز یا تنظیم زیستی آفلاتوکسین‌ها تأثیر می‌گذارند (۹۰). هنوز اطلاعات در مورد مکانیسم‌های عمل این ترکیبات بر روی گونه‌های قارچی محدود است، اما می‌توان اطمینان داد که روغن چریش دارای خواص ضد قارچی مهمی

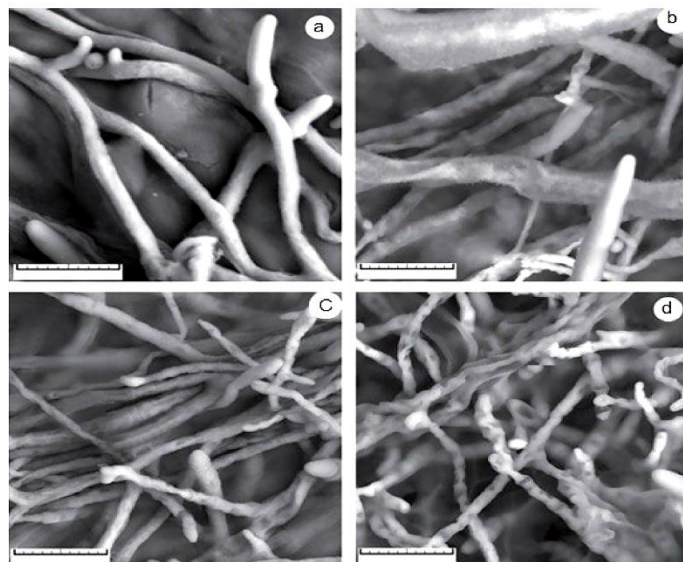


شکل ۷- اثر بخشی ترکیبات/ادویه‌های گیاهی در مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس (۹۱)

آفلاتوکسین را به صفر رساندند (۹۳). تولید AFB1، AFB2 و AFG2 توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس به‌طور کامل در غلظت ۰/۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر میخک مهار شد و تولید AFG1 تا ۶۶

در مطالعه‌ای دیگر کاهش فعالیت‌های سمی قارچی توسط چندین عصاره گیاهی گزارش شده است که برخی از آنها مانند میخک، دارچین، کاسیا چینی و آویشن همراه با مخلوط آنها تولید

فلاووس در شکل ۸ نشان داده شده است. هیف‌های رشد کرده روی تیمار بدون اسانس دارای شکلی متورم با سطح صاف و یکنواخت هستند. در حالی که در حضور ۵۰ پی پی ام اسانس، هیف‌ها تا حدی یکنواختی خود را از دست دادند و این تغییرات در غلظت‌های بالاتر اسانس افزایش یافت. حتی ۱۰۰ پی پی ام اسانس باعث انقباض هیف‌ها و تشکیل حفره در طول میسلیموم‌ها شد. شدت آسیب با ۲۰۰ پی پی ام اسانس افزایش یافت و هیف‌ها اغلب فرو ریختند که تخریب آنها کاملاً مشهود است (۹۶).



شکل ۸- میکروگراف‌های الکترونی  $\times 2000$ ، میسلیموم آسپرژیلوس فلاووس: (a) تیمار کنترل، (b) تیمار شده با ۵۰ پی پی ام اسانس آویشن شیرازی (EO)، (c) تیمار شده با ۱۰۰ پی پی ام EO (d) تیمار شده با ۲۰۰ پی پی ام EO (۹۶)

نشان داده شده است، پس از درمان با اسانس، رشد آسپرژیلوس فلاووس در محیط به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. به‌طور مشابه، کاهش درصد جوانه‌زنی اسپور با افزایش غلظت اسانس مشهود است. همان‌طور که شکل ۹ (C) نشان می‌دهد تقریباً همه اسپورهای قارچ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در گروه شاهد جوانه زدند، اما بیشترین غلظت اسانس (۴ میکرولیتر در میلی‌لیتر) باعث کاهش جوانه‌زنی اسپور شد. اثرات بازدارندگی اسانس زردچوبه بر

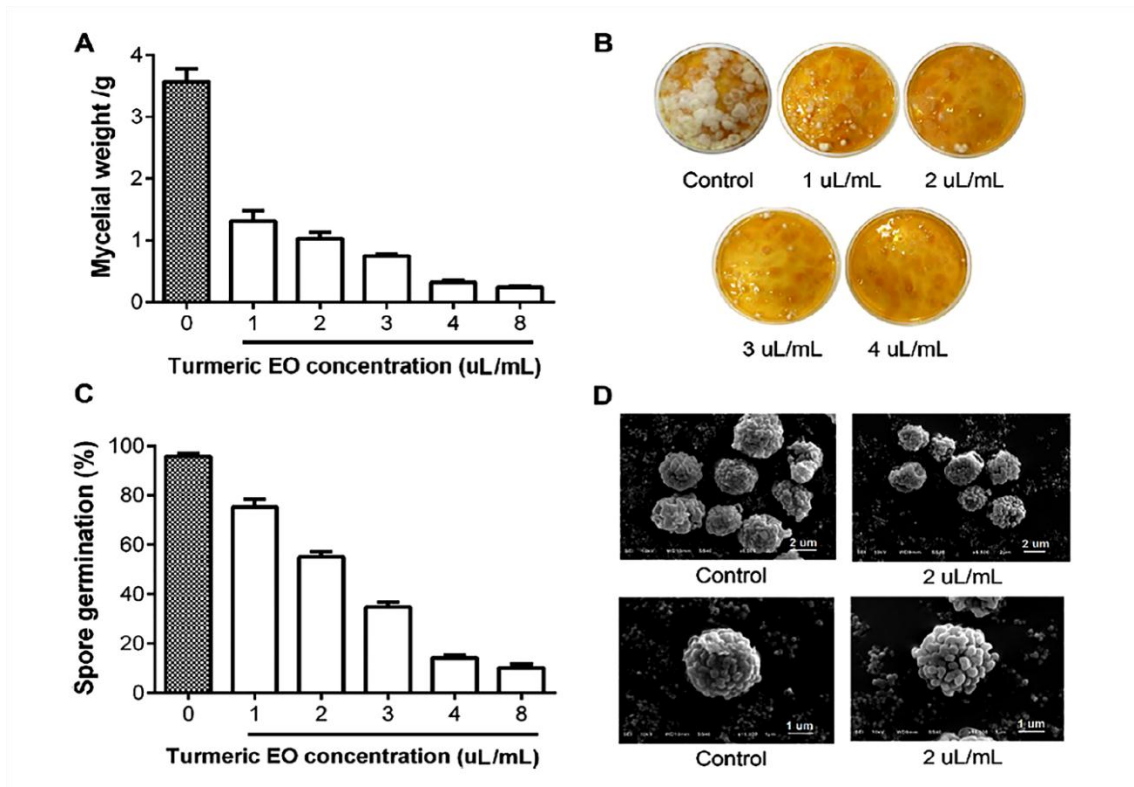
درصد کاهش یافت. در تحقیقی دیگر اسانس‌های ۱۲ گیاه دارویی مختلف و به‌ویژه آویشن و دارچین، رشد و تولید مایکوتوکسین حاصل از آسپرژیلوس پارازیتیکوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس اکراسئوس و فوزاریوم مونیلیفورم را مهار کردند (۹۴). همچنین عصاره گیاهانی مانند پیاز و سیر رشد و سنتز آفلاتوکسین B1 را مهار کرده‌اند (۹۵). تصویر میکروسکوپ الکترونی اثر اسانس آویشن شیرازی (*Z. multiflora*) بر مورفولوژی آسپرژیلوس

اثر ضد قارچی غلظت‌های مختلف اسانس زردچوبه بر رشد میسلیموم و جوانه‌زنی اسپور آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. پس از ۵ روز انکوباسیون در مقایسه با گروه شاهد بدون اسانس، نرخ مهار معنی‌داری برای میسلیموم آسپرژیلوس فلاووس در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۸ میکرولیتر در میلی‌لیتر در بدست آمد (به ترتیب ۶۳/۳۱، ۷۱/۱۵، ۷۸/۹۹، ۹۱/۰۳ و ۹۳/۴۱٪). همان‌طور که در شکل

## راهکارهای مبارزه با سموم قارچی به روش‌های زیستی در صنعت دام و طیور ...

میلی‌لیتر اسانس زردچوبه، هاگ‌ها با دیواره‌های ناهموار و حتی فرورفتگی دیواره هستند. بنابراین، کاملاً مشهود است که اسانس زردچوبه فعالیت ضد قارچی قابل‌توجهی را بر روی رشد قارچ‌ها و جوانه‌زنی اسپورها به‌صورت وابسته به دوز نشان داده است (۹۷).

جوانه‌زنی اسپور اسپریژیلوس فلاووس در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۸ لیتر در میلی‌لیتر از ۱۷/۰۱ تا ۸۵/۴۷ درصد متغیر بود. تأثیر بر مورفولوژی اسپور در شکل (D) نشان داده شده است، که در آن هاگ‌ها در گروه کنترل به‌صورت گرد با دیواره‌های بیرونی صاف هستند، اما در تیمار ۲ میکرولیتر در



شکل ۹- (A) اثرات غلظت‌های مختلف اسانس زردچوبه بر وزن میسلیم خشک، (B) تصاویری از اثرات بازدارندگی در برابر رشد (اسپریژیلوس فلاووس) پس از انکوباسیون در محیط کشت در غلظت‌های مختلف اسانس زردچوبه به مدت ۵ روز (C) اثرات غلظت‌های مختلف اسانس زردچوبه بر جوانه‌زنی اسپور اسپریژیلوس فلاووس (D) تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) از اسپریژیلوس فلاووس با یا بدون تیمار اسانس زردچوبه (۹۷)

به یک راهکار قابل اعتماد برای کاهش سموم قارچی در مواد غذایی است، تا بتواند به امنیت غذایی کمک نماید. البته اثربخشی یک روش به ماهیت غذا و همچنین نوع میکوتوکسین و غلظت آن بستگی دارد. از این‌رو، انتخاب میکروارگانیزم مناسب، بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید متابولیت، و استفاده از تکنیک‌های نوین، تأثیر به‌سزایی در موفقیت

## نتیجه‌گیری

آلودگی میکوتوکسین در مواد غذایی خطرات جدی برای سلامتی مصرف‌کننده دارد. سم‌زدایی زیستی به‌عنوان یک راهکار بسیار امیدوارکننده در کاهش میزان آلودگی سموم قارچی با استفاده از میکروارگانیزم‌ها و متابولیت‌های آنها، ترکیبات گیاهی، و آنزیم‌ها می‌باشد، که در حال تبدیل شدن

درک بیشتری در مورد مسیرهای زیستی تبدیل سموم قارچی به سایر متابولیت‌ها، ویژگی‌های سم‌شناسی محصولات حاصل، تأثیر بر ارزش غذایی خوراک و ایمنی حیوانات مورد نیاز است. همچنین برای استفاده از آنزیم‌ها، تکنولوژی تجویز مناسب به منظور کارایی مطلوب آنزیم ضروری است. به علاوه داشتن قوانین مناسب، هم در صنایع غذایی و هم برای خوراک دام و طیور، که امکان درمان مسمومیت‌ها را فراهم کند مهم است.

کاربرد این روش‌ها در صنایع غذایی و خوراک دام و طیور دارد. از مزایای روش‌های کنترل زیستی سموم قارچی می‌توان به کم هزینه بودن، وسیع‌الطیف بودن، کم بودن عوارض جانبی و تأثیرشان بر مواد مغذی، نیاز داشتن به حداقل آموزش فردی، و مناسب بودن برای طیف وسیعی از غذاهای مایع و جامد اشاره کرد. هرچند که استفاده از عوامل زیستی برای کنترل سموم قارچی می‌تواند محدودیت‌هایی نیز به همراه داشته باشد. برای اینکه این روش‌ها بتوانند به‌طور گسترده استفاده شوند،

## References

- 1- **Anklam E, Stroka J, Boenke A.** Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*. 2002; 13: 173-83.
- 2- **Gambacorta L, Olsen M, Solfrizzo M.** Pig urinary concentration of mycotoxins and metabolites reflects regional differences, mycotoxin intake and feed contaminations. *Toxins*. 2019; 11: 378.
- 3- **Moretti A, Logrieco AF, Susca, A.** Mycotoxins: An underhand food problem. In *Mycotoxigenic Fungi*; Humana Press: New York, NY, USA. 2017; 3-12.
- 4- **Cimbalo A, Alonso-Garrido M, Font G, Manyes L.** Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food Chem. Toxicol*. 2020; 111-161.
- 5- **Jawaid S, Talpur FN, Nizamani SM, Afridi HI.** Contamination profile of aflatoxin M1 residues in milk supply chain of Sindh, Pakistan. *Toxicol*. 2015; 2: 1418-1422.
- 6- **Mohammadi H.** A review of aflatoxin M1, milk, and milk products, Aflatoxins. *Biochem. Mol. Biol*. 2011; 397-414. [In Persian]
- 7- **Aly SA, Anwer W.** Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of aflatoxin B residues in table eggs. *Pakistan J. Nutr*. 2009; 8: 181-186.
- 8- **Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G.** Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. *Toxins*. 2019; 11: 375.
- 9- **Deshpande SS. (Ed.)** Toxic metals, radionuclides, and food packaging contaminants. In *Hand Book of Food Toxicology*; Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA. 2002; 783-810.
- 10- **Liang J, Xu Y, Sui D, Zhang L, Huang Y, Ma Y, Li F, Chen Y.** Flexible, magnetic, and electrically conductive graphene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> paper and its application for magneticecontrolled switches. *J. Phys. Chem. C*. 2010; 114: 17465-17471.
- 11- **De Cal A, Larena I, Linan M, et al.** Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, abiocontrol agent against brown rot in stone fruit. *J. Appl. Microbiol*. 2009; 106: 592-605.
- 12- **Wilson CL, Wisniewski M.** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol*. 1989; 27: 425-441.
- 13- **Kohl J, Postma J, Nicot P, Ruocco M, Blum B.** Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plantepathogenic fungi and bacteria. *Biol. Control*. 2011; 57:1-12.
- 14- **Frave DR.** Commercialization and implementation of biocontrol, *Annu. Rev. Phytopathol*. 2005; 43: 337-359.
- 15- **Celik K, Denli M, Savas T.** Reduction of toxic effects of aflatoxin B1 by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chick's diets. *Rev. Bras. Zootec*. 2003; 32: 615-619.
- 16- **Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos JJ, Gomez J.** Aflatoxin and its metabolites in tissues from laying hens and broiler chickens fed

a contaminated diet. *J. Sci. Food Agric.* 1994; 65: 407–414

**17- Micco C, Miraglia M, Onori R, Brera C, Mantovani A, Ioppolo A, et al.** Long-term administration of low doses of mycotoxins to poultry. 1. Residues of aflatoxin B1 and its metabolites in broilers and laying hens. *Food Addit. Contam.* 1988; 5: 303–308.

**18- Diaz G, Murcia HW, Cepeda SM.** Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of aflatoxin B1 in chickens and quail. *Poult. Sci.* 2010; 89: 2461–2469.

**19- Eaton DL, Gallagher EP.** Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1994; 34: 135–17.

**20- Nešić K, Habschied K, Mastanjević K.** Possibilities for the Biological Control of Mycotoxins in Food and Feed. *Toxins.* 2021; 13: 198.

**21- Varga J, Tóth B.** Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A review. *Acta Vet. Hung.* 2005; 53: 189–203.

**22- Ji C, Fan Y, Zhao L.** Review on biological degradation of mycotoxins. *Anim. Nutr.* 2016; 2: 127–133.

**23- Afshar P, Shokrzadeh M, Raeisi SN, Ghorbani-HasanSarai A, Nasiraii, LR.** Aflatoxins biodegradation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon.* 2020; 178: 50–58. [In Persian]

**24- Smiley RD, Draughon FA.** Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *J. Food Prot.* 2000; 63: 415–418.

**25- Bulent K, Alan DW, IS ILV.** Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006; 46: 593–619.

**26- Schatzmayr G, Zehner F, Täubel M, Schatzmayr D, Klimitsch A, Loibner AP, Binder EM.** Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50: 543–551.

**27- Umesha S, Manukumar HMG, Chandrasekhar B, Shivakumara P, Kumar JS, Raghava S, et al.** Aflatoxins and food pathogens: Impact of biologically active aflatoxins and their control strategies. *J. Sci. Food Agric.* 2017; 97: 1698–1707.

**28- Foroud NA, Baines D, Gagkaeva TY, Thakor N, Badaea A, Steiner B, et al.** Trichothecenes in Cereal Grains—An Update. *Toxins.* 2019; 11: 634.

**29- Sangare L, Zhao Y, Folly Y, Chang J, Li J, Selvaraj J, Liu Y.** Aflatoxin B1 degradation by

a *Pseudomonas* strain. *Toxins.* 2014; 6: 3028–3040.

**30- Farzaneh M, Shi ZQ, Ghassempour A, Sedaghat N, Ahmadzadeh M, Mirabolfathy M, et al.** Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control.* 2012; 23: 100–106. [In Persian]

**31- He JW, Bondy GS, Zhou T, Caldwell D, Boland GJ, Scott PM.** Toxicology of 3-epideoxynivalenol, a deoxynivalenol transformation product by *Devosia mutans* 17–2-E-8. *Food Chem. Toxicol.* 2015; 84: 250–259.

**32- Wang L, Wang Z, Yuan Y, Cai R, Niu C, Yue T.** Identification of key factors involved in the biosorption of patulin by inactivated lactic acid bacteria (LAB) cells. *Plos One.* 2015; 10: 131–143.

**33- Wang Y, Zhao C, Zhang D, Zhao M, Zheng D, Peng M, et al.** Simultaneous degradation of aflatoxin B1 and zearalenone by a microbial consortium. *Toxicon.* 2018; 146: 69–76.

**34- El-Nezami H, Polychronaki N, Salminen S, Mykkänen H.** Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -Zearalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 3545–3549.

**35- Murphy LYW, Paul CT, Kevin JA, Hani EN.** *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates intestinal mucosal barrier and inflammation in mice following combined dietary exposure to deoxynivalenol and zearalenone. *J. Funct. Foods.* 2016; 22: 34–43.

**36- Vega MF, Dieguez SN, Riccio B, Aranguren S, Giordano A, Denzoin L, et al.** Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs. *Braz. J. Microbiol.* 2017; 48: 715–723.

**37- Long M, Li P, Zhang WK, Li XB, Zhang Y, Wang Z, Liu GW.** Removal of zearalenone by strains of *Lactobacillus* sp. isolated from rumen in vitro. *J. Anim. Vet. Adv.* 2012; 11: 2417–2422.

**38- Hsu TC, Yi PJ, Lee TY, Liu JR.** Probiotic characteristics and zearalenone removal ability of a *Bacillus licheniformis* strain. *Plos One.* 2018; 13: 0194866.

**39- Lee A, Cheng KC, Liu JR.** Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential. *Plos One.* 2017; 12: 182–220.

**40- Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K.** Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab. Rev.* 2009; 41: 1–7.

**41- Zoghi A, Massoud R, Todorov SD,**

**Chikindas ML, Popov I, Smith S, et al.** Role of the lactobacilli in food bio-decontamination: Friends with benefits. *Enzyme microb technol.* 2021; 150: 109861.

**42- Gerez CL, Torino MI, Rollán G, de Valdez GF.** Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control.* 2009; 20: 144–148.

**43- Abrunhosa L, Paterson RR, Venâncio A.** Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins.* 2010; 2: 1078-1099.

**44- Juodeikiene G, Bartkiene E, Cernauskas D, Cizeikiene D, Zadeike D, Lele V, et al.** Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for Fusarium mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT. Food Sci. Technol.* 2018; 89: 307–314.

**45- Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F.** Lactic acid bacteria—Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control.* 2010; 21: 370–380.

**46- Niderkorn V, Boudra H, Morgavi DP.** Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 101: 849–856.

**47- Muhialdin BJ, Saari N, Meor Hussin AS.** Review on the Biological Detoxification of Mycotoxins Using Lactic Acid Bacteria to Enhance the Sustainability of Foods Supply. *Molecules.* 2020; 25(11): 2511-2655.

**48- Pfliegler WP, Pusztahelyi T, Pócsi I.** Mycotoxins—Prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.* 2015; 55: 805–818.

**49- El-Tarabily KA, Sivasithamparam K.** Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience.* 2006; 47: 25–35.

**50- Farbo MG, Urgeghe PP, Fiori S, Marcello A, Oggiano S, Balmas V, et al.** Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2018; 284: 1–10.

**51- Druvefors U.** Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Mold. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 2004.

**52- Díaz MA, Pereyra MM, Picón-Montenegro E, Meinhardt F, Dib JF.** Killer Yeasts for the Biological Control of Postharvest Fungal Crop Diseases. *Microorganisms.* 2020; 8: 1680.

**53- Zohri AA, Abdel-Kareem MM.** Four strains of yeasts: As effective biocontrol agents

against both growth and mycotoxins formation by selected 11 toxigenic fungi. *Glo. Adv. Res. J. Microb.* 2018; 7: 132–135. [In Persian]

**54- Liu Y, Chang J, Wang P, Yin Q, Huang W, Liu C, et al.** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on alleviating cytotoxicity of porcine jejunal epithelia cells induced by deoxynivalenol. *AMB Express.* 2019; 9: 137.

**55- Mendieta CR, Gómez GV, Del Río JCG, Cuevas AC, Arce JM, Ávila EG.** Effect of the Addition of *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast Cell Walls to Diets with Mycotoxins on the Performance and Immune Responses of Broilers. *J. Poult. Sci.* 2018; 55: 38–46.

**56- Yang Q, Wang J, Zhang H, Li C, Zhang X.** Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products. *World Mycotoxin J.* 2016; 9: 269–278.

**57- Li X, Tang H, Yang C, Meng X, Liu B.** Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Control.* 2019; 96: 47–52.

**58- Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L.** Biodegradation of mycotoxins: Tales from known and unexplored worlds. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 561.

**59- Yiannikouris A, François J, Poughon L, Dussap CG, Bertin G, Jeminet G, et al.** Alkali extraction of beta-d-glucans from *S. cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 3666–3673.

**60- Yiannikouris A, Kettunen H, Apajalahti J, Pennala E, Moran CA.** Comparison of the sequestering properties of yeast cell wall extract and hydrated sodium calcium aluminosilicate in three in vitro models accounting for the animal physiological bioavailability of zearalenone. *Food Addit Contam Part. A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 2013; 30: 1641–1650.

**61- Liu N, Wang J, Liu Z, Wang Y, Wang J.** Effect of supplemental yeast cell walls on growth performance, gut mucosal glutathione pathway, proteolytic enzymes and transporters in growing broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 2018; 96: 1330–1337.

**62- Cho JI, Kang, GJ.** Control of aflatoxin B1 production of *Aspergillus parasiticus* using antagonistic microorganisms and its application in Meju. *Food Sci and Biotechnol.* 2000; 9: 151-156.

**63- Abbès S, Salah-Abbès JB, Sharafi H, Jebali R, Noghbi KA, Oueslati R.** Ability of

Lactobacillus rhamnosus GAF01 to remove AFM1 in vitro and to counteract AFM1 immunotoxicity in vivo. *J. Immunotoxicol.* 2013; 10: 279–286

**64- Armando MR, Pizzolitto RP, Dogi CA, Cristofolini A, Merkis C, Poloni V, et al.** Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *S. cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *J. Appl. Microbiol.* 2012; 113: 256–264.

**65- Horn BW, Dorner JW.** Effect of nontoxic Aspergillus flavus and A. parasiticus on aflatoxin contamination of wounded peanut seeds inoculated with agricultural soil containing natural fungal populations. *Biocontrol. Sci. Technol.* 2009; 19: 249–262.

**66- Alberts JF, Lilly M, Rheeder JP, Burger HM, Shephard GS, Gelderblom WCA.** Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. *Food Control.* 2017; 73: 101–109.

**67- Hackbart HCS, Machado AR, Christ-Ribeiro A, Prietto L, Badiale-Furlong E.** Reduction of aflatoxins by Rhizopus oryzae and Trichoderma reesei. *Mycotoxin Res.* 2014; 30: 141–149.

**68- Błaszczuk L, Basin´ska-Barczak A, C´wiek-Kupczyn´ska H, Gromadzka K, Popiel D, Stepien Ł.** Suppressive Effect of Trichoderma spp. on Toxicogenic Fusarium Species. *Pol. J. Microbiol.* 2017; 66: 85–100.

**69- Wagacha J, Muthomi J.** Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 2008; 124: 1–12.

**70- Vekiru E, Hametner C, Mitterbauer R, Rechthaler J, Adam G, Schatzmayr G, et al.** Cleavage of Zearalenone by Trichosporon mycotoxinivorans to a Novel Nonestrogenic Metabolite. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76: 2353–2359.

**71- Luo Y, Liu X, Li J.** Updating techniques on controlling mycotoxins—A review. *Food Control.* 2018; 89: 123–132.

**72- Luo Y, Liu X, Yuan L, Li J.** Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. *Trends Food Sci. Technol.* 2019; 96: 127–134.

**73- Zhang Z, Li M, Wu C, Peng B.** Physical adsorption of patulin by Saccharomyces cerevisiae during fermentation. *J. Food Sci. Technol.* 2019; 56: 2326–2331.

**74- Vekiru E, Frühauf S, Hametner C, Schatzmayr G, Krska R, Moll WD, et al.** Isola-

tion and characterisation of enzymatic zearalenone hydrolysis reaction products. *World Mycotoxin J.* 2016; 9: 353–363.

**75- Loi M, Fanelli F, Liuzzi VC, Logrieco AF, Mulè G.** Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins.* 2017; 9: 111.

**76- Ferrara M, Haidukowski M, D’Imperio M, Parente A, De Angelis E, Monaci L, et al.** New insight into microbial degradation of mycotoxins during anaerobic digestion. *Waste Manag.* 2020; 119: 215–225.

**77- Lyagin I, Efremenko E.** Enzymes for Detoxification of Various Mycotoxins: Origins and Mechanisms of Catalytic Action. *Molecules.* 2019; 24: 2362.

**78- Calo JR, Crandall PG, O’bryan C, Ricke ASC.** Essential oils as antimicrobials in food systems, A review. *Food Control.* 2015; 54: 111–119.

**79- Pawar VC, Thaker VS.** In vitro efficacy of 75 essential oils against Aspergillus niger. *Mycoses.* 2007; 49: 316–323.

**80- El-Nagerabi SAF, Al-Bahry SN, Elshafie AE, AlHilali S.** Effect of Hibiscus sabdariffa extract and Nigella sativa oil on the growth and aflatoxin B1 production of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus strains. *Food Control.* 2012; 25: 59–63.

**81- Roychoudhury R.** Chapter 18—Neem Products. In *Ecofriendly Pest Management for Food Security*; Omkar, Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 2016; 545–562.

**82- Brahmachari G.** Neem—An Omnipotent Plant: A Retrospection. *Chem Bio Chem.* 2004; 5: 408–421.

**83- Regulation (EC) No 1332/2008** of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Food Enzymes and Amending Council Directive 83/417/EEC, Council Regulation (EC) No 1493/1999, Directive 2000/13/EC, Council Directive 2001/112/EC and Regulation (EC) No 258/97.

**84- Mahmood AL.** Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis by Aspergillus flavus by extracts of some Egyptian plants. *Letters Applied. Microbiol.* 1999; 29: 334–336.

**85- Juglal S, Govinden R, Odhav B.** Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *J. Food Prot.* 2002; 65: 683–687.

**86- Bagchi GD, Singh AS, Khanuja PS, Bansal RP, Singh SC, Kumar S.** Wide spectrum antibacterial and antifungal activities in the seeds

of some co- prophilous plants of north Indian plains. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 64: 69–77.

**87- Zeringue HJ, Bhatnagar D.** Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60: 3543–3547.

**88- Razzaghi-Abyaneh M, Allameh A, Tiraishi T, Shams-Ghahfarokhi M, Ghorbanian M.** Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopathologia.* 2005; 159: 565–570. [In Persian]

**89- Sitara U, Niaz I, Naseem J.** Antifungal effect of essential oils on in vitro growth of pathogenic fungi. *Pak. J. Bot.* 2008; 40: 409–414.

**90- Zaika LL, Buchanan RL.** Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *J. Food Prot.* 1987; 50: 691–708.

**91- Hussain A, Shafqatullah JA, Ziaur R.** Inhibition of aflatoxin producing fungus growth using chemical, herbel compounds/spices and plants. *Pure Appl. Bio.* 2012; 1(1): 8-13.

**92- Morsi NM.** Antimicrobial effect of crude

extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol Policy.* 2000; 49: 63 - 74

**93- El-Maraghy SSM.** Effect of some spices as preservatives for storage of Lentil (*Lens esculenta* L.) Seeds. *Folia Microbiol.* 1995; 40: 490–492.

**94- Solimar KM, Badeaa RI.** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 1669-1675.

**95- Prescott LM, Harley JP, Klein DA.** Microbiology. McGraw-Hill, USA. 2005.

**96- Shokri H, Sharifzadeh A.** *Zataria multiflora* Boiss. A review study on chemical composition, anti-fungal and anti-mycotoxin activities, and ultra-structural changes. *J. Herbmed Pharmacol.* 2017; 6(1): 1-9. [In Persian]

**97- Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M.** Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chem.* 2017; 220: 1–8.

## The biological control of fungal toxins in the livestock and poultry industry

Marzieh Hajmohammadi<sup>1,3</sup>, Ehsan Karimi<sup>2\*</sup>, Parisa Shokryazdan<sup>3</sup>, Ehsan Oskoueian<sup>3</sup>,  
Mohammad Faseleh Jahromi<sup>3</sup>, Mojtaba Moein Jahromi<sup>3</sup>, Reza Noora<sup>4</sup>

1- PhD, Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

3- Research and Development Department, Arka Industrial Group and Ariana knowledge-based company, Mashhad, Iran.

4- Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Receive: May 25, 2022; Revise: June 21, 2022; Accept: July 3, 2022

### Summary

Today, fungal toxins or mycotoxins are a major problem in the food industry and food chain safety, which can contaminate a wide range of agricultural products, and thus they have negatively affect on health and production of livestock and poultry, and consequently human health, the economies of countries and even international trade. Since mycotoxin contamination cannot be completely prevented before or after harvest, it is important to know exactly how to remove mycotoxins during technological processes and feed clearance strategies. Today, the biological control of mycotoxins by microorganisms and other biological factors is becoming a valid approach to protect food products from contamination by these toxins, which increases the safety and quality of crops and animal feed, and ultimately reduces toxin concentration in animal products (milk, meat and eggs), and increase food chain security.

**Keywords:** *Mycotoxin, Biological control, Microorganism, Enzyme, Yeast, Herbal bioactive compounds/spices*

## مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های VII.2 و VII.1.1 و ویروس نیوکاسل در جوجه‌های SPF و تجاری تخم‌گذار

آرش قلیان چی لنگرودی<sup>۱</sup>، حمیده نجفی<sup>۱</sup>، نیوشا حاجی زمانی<sup>۱</sup>، ناصر صدری<sup>۱</sup>، زهرا ضیافتی کافی<sup>۱</sup>، علی هژبر راجعونی<sup>۱</sup>، شبنم آفاجان تبار<sup>۱</sup>، محمد عبدالشاه<sup>۲</sup>، حسین حسینی<sup>۳\*</sup>

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- مؤسسه تحقیقات واکس و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۹ دی ۱۴۰۰، بازنگری: ۲۰ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۶ فروردین ۱۴۰۱

### چکیده

با وجود واکسیناسیون گسترده علیه ویروس بیماری نیوکاسل (NDV)، این ویروس همچنان در مزارع طیور در گردش است. مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی تفاوت تغییرات هیستوپاتولوژیکی و وضعیت آنتی‌بادی محافظتی در جوجه‌های آزمایشی آلوده شده با ژنوتیپ‌های VII.2 و VII.1.1 ویروس نیوکاسل فوق‌حد انجام شد. در این مطالعه جوجه‌های تجاری تخم‌گذار و SPF (Specific Pathogen-Free) توسط ژنوتیپ‌های VII.1.1 و VII.2 ویروس نیوکاسل از طریق چشمی-بینی تلقیح گردید. سواب‌های و کلواک از تمامی جوجه‌ها در روز چهارم بعد از چالش اخذ و سپس تمامی جوجه‌ها برای نمونه‌گیری بافتی کشته شدند. نمونه‌های بافت‌های بفت‌های، پیش‌معدة، قلب، کلیه، ریه، طحال، مغز، روده و کبد برای بررسی و درجه‌بندی هیستوپاتولوژی انتخاب گردید. همه‌ی جوجه‌های SPF در ۴۸ ساعت اول آزمایش تلف شدند. نتایج آزمایش HI در روز قبل از چالش، سطح آنتی‌بادی در گروه جوجه‌های تجاری را ۶/۴۶ و در گروه جوجه‌های SPF را، صفر نشان داد. در نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی، آسیب شدیدی در بافت پیش‌معدة و قلب مشاهده نشد. در بافت‌های دو گروه جوجه SPF آلوده شده با دو ژنوتیپ، خونریزی مشاهده گردید. بیشترین جراحات در بافت ریه و کلیه مشاهده شد که در گروه جوجه‌های SPF شدیدتر بوده و همچنین جراحات حاصل از ویروس VII.2 شدیدتر از سویه VII.1.1 بود. در مجموع با توجه به تیتراژ آنتی‌بادی محافظ و جراحات هیستوپاتولوژی کمتر در گروه جوجه‌های تجاری، می‌توان نتیجه گرفت که آنتی‌بادی موجود در گله‌های تجاری تا حد بالایی از تکثیر ویروس جلوگیری می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری نیوکاسل، هیستوپاتولوژی، VII.2، VII.1.1، جوجه‌های تجاری



مقدمه

پارامیکسوویروس‌های تیپ ۱ پرندگان Avian paramyxovirus type 1 (APMV-1) باعث ایجاد بیماری مسری نیوکاسل (Newcastle disease (ND) در سراسر جهان بوده که قادر به آلوده نمودن اغلب گونه‌های پرندگان از جمله پرندگان وحشی، اهلی و پرندگان قفسی می‌باشند، با این حال ماکیان حساس‌ترین و مهم‌ترین میزبان این ویروس هستند (۱-۴).

APMV-1، متعلق به جنس آوولاویروس، خانواده‌ی پارامیکسوویریده Paramyxoviridae و راسته‌ی ویروس‌های مونونگاواایرال‌ها Mononegavirales هستند که این راسته شامل ویروس‌هایی دارای RNA تک رشته‌ای یکپارچه و کپسید مارپیچی می‌باشند (۱، ۳، ۵، ۷). APMV-1 فقط دارای یک سروتیپ است (۸).

بر اساس تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیک ژن F سویه‌های نیوکاسل، این ویروس‌ها به دو کلاس I و II، تقسیم می‌شوند. سویه‌های کلاس I حاوی تنها یک ژنوتیپ شامل سویه‌های غیر حاد هستند که پرندگان وحشی را آلوده می‌نمایند. در حالی که سویه‌های کلاس II شامل ۱۸ ژنوتیپ از I الی XVIII بوده و سویه‌های غیر حاد و بسیار حاد را شامل می‌شوند، کلاس II شامل ویروس‌های واکسینال و ویروس‌های فوق حاد هستند. به دلیل تنوع بالا در ژنوتیپ‌های کلاس II، این ژنوتیپ‌ها به تحت ژنوتیپ‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. ویروس‌های کلاس II از پرندگان وحشی و ماکیان جدا شده‌اند، در حالی که اکثر ویروس‌های حاد نیوکاسل از ماکیان جدا شده‌اند (۲، ۵، ۷، ۹، ۱۲).

اخیراً ژنوتیپ سویه‌ی VII در بسیاری از همه‌گیری‌های آسیا و شرق خاور میانه جدا شده است. این ویروس‌ها قادر به ایجاد ضرر اقتصادی قابل توجهی حتی در گله‌های واکسینه هستند،

حتی گاهی اوقات باعث ایجاد بیماری در پرندگان آبی‌زی نیز می‌شوند (۷، ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴). در کشورهای در حال توسعه مثل کشورهای قاره آسیا و آفریقا علی‌رغم استفاده‌ی زیاد از واکسیناسیون گسترده، ویروس نیوکاسل دائماً در حال چرخش می‌باشد و بیماری نیوکاسل همچنان به‌عنوان یک مشکل جدی در صنعت طیور باقی مانده است (۳، ۴، ۵، ۸). به دلیل عدم اقدامات کافی امنیت زیستی، ویروس‌های نیوکاسل به احتمال زیاد بین ماکیان و پرندگان وحشی در هر دو جهت رد و بدل می‌شود و اجازه می‌دهد گونه‌های جدید ویروسی بالقوه ظهور نمایند. متعاقباً، طیور صنعتی نقش اساسی را در تکامل ویروس‌های نیوکاسل در کشور بازی می‌کنند (۹، ۱۳).

پاسخ ایمنی ذاتی میزبان به عفونت ویروسی، به‌عنوان پاسخ بالقوه جهت آهسته نمودن روند رونویسی ویروس و حمایت میزبان در تکامل محافظت مخصوص پاسخ ایمنی سازگار، طراحی شده است (۲، ۱۵). ویروس نیوکاسل جراحات و تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت‌ها و ارگان‌های پرندگان آلوده به عفونت ایجاد می‌کند. این جراحات منجر به تضعیف ایمنی میزبان می‌شوند (۲، ۱۶). سویه‌های بسیار حاد باعث ایجاد جراحات سیستمیک در بافت‌های لنفوئیدی، نکروز و تخلیه‌ی شدید لنفوئیدها می‌شود. سویه‌های غیر حاد باعث نکروز نمی‌گردند (۲، ۱۷).

در تغییرات هیستوپاتولوژیک ویروس‌های فوق حاد در ماکیان و بوقلمون‌ها، می‌توان به نکروز همراه با تخلیه لنفوئیدی لوزه‌های سکومی، طحال، تیموس، و بورس اشاره کرد. همچنین التهاب کیسه‌های هوایی هیستوسایتیک، گلیوز و التهاب اطراف عروقی در ساقه مغز، مخچه و مدولا، التهاب ماهیچه قلب نکروتیک، نکروز مغز استخوان، نکروز کبد، نکروز پانکراس و تیموس، نکروز و زخم

## مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های ...

سلول‌های اپیتلیوم روده‌ای و زخم هموراژیک نای مشاهده می‌شوند (۲، ۵، ۱۷).

بیماری نیوکاسل باعث وقوع چهار پانزوتیک کلی شده است. پانزوتیک چهارم مربوط به ژنوتیپ VII بود و در دهه‌ی ۱۹۸۰ در آسیای جنوب شرقی آغاز شد که به سرعت به آفریقا و اروپای غربی و در نهایت در سال ۲۰۰۸ به آمریکای جنوبی گسترش یافت (۱۸، ۱۹). مطالعاتی بر اساس سکناس کامل یا منطقه‌ای از ژن F یا HN، وجود تحت ژنوتیپ VII.1.1 و VII.2 را در ایران نشان داده‌اند (۷، ۱۳، ۲۰). مطالعه حاضر با هدف توصیف تمایز اثرات هیستوپاتولوژیکی تحت ژنوتیپ VII.2 و VII.1.1 و ویروس عامل نیوکاسل در جوجه‌ها انجام شد.

### مواد و روش کار

**جوجه‌ها و ویروس‌ها:** تعداد ۳۲ قطعه جوجه، ۱۶ قطعه جوجه SPF (Specific Pathogen-Free)، ۴۲ روزه و ۱۶ قطعه جوجه‌ی تجاری تخم‌گذار LSL تهیه گردید. جوجه‌ها به مدت یک هفته در اتاق‌های جداگانه نگهداری شدند و آب و غذا به صورت ad libitum در اختیار آنها قرار گرفت. دما، نور و موقعیت محیطی طبق استاندارد توصیه شده نگهداری جوجه‌های تجاری بود. جوجه‌ها در هر یک از گروه‌های تخم‌گذار یا SPF به دو گروه ۵ تایی تقسیم شده و برای هر گروه ۳ قطعه جوجه به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. دو ژنوتیپ ویروس نیوکاسل ولونژنیک (MG871466.1) VII.2 و VII.1.1 (JX131356.1) از آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی تهران تهیه شد. نمونه‌های ویروسی با استفاده از رقت‌های دهگانه از  $10^{-6}$  الی  $10^{-1}$  در بافر فسفات رقیق شده و به جنین‌های ۱۰ روزه به اندازه ۰/۱ میلی‌لیتر از راه آلانتوییک تلقیح گشتند. تخم مرغ‌ها تا ۵ روز مانیتور شده و نسبت جنین‌های عفونی به سالم

تعیین شد و با توجه به روش رید و مانچ EID50 تعیین گردید. در روز اول آزمایش، ۵ قطعه جوجه‌ی SPF تحت عنوان گروه SPF1 و ۵ قطعه جوجه‌ی تخم‌گذار تحت عنوان گروه C1 توسط ۰/۱ میلی‌لیتر از ویروس حاد بیماری نیوکاسل ژنوتیپ VII.2 با دوز  $10^5$  EID<sub>50</sub>/0.1 mL به روش داخل چشمی-بینی تلقیح شدند و همچنین در همان روز، ۵ قطعه جوجه‌ی SPF تحت عنوان گروه SPF2 و ۵ قطعه جوجه‌ی تخم‌گذار تحت عنوان گروه C2 با ۰/۱ میلی‌لیتر از ویروس VII.1.1 با دوز و روش مشابه تلقیح گشتند.

**سرولوژی:** نمونه‌های سرم قبل از انجام چالش جهت بررسی سطح آنتی‌بادی در جوجه‌های تجاری و SPF با استفاده از آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون Haemagglutination inhibition (HI) طبق روش OIE مورد بررسی قرار گرفتند (۳). در این روش میزان ۲۵ میکرولیتر بافر فسفات به هر یک از گوده‌های میکروپلیت تیتراسیون افزوده و سپس به همین میزان سرم اخذ شده از جوجه‌ها به اولین گوده هر ردیف اضافه گردید. سرم در هر ردیف در رقت‌های دوگانه رقیق شد. ۴ واحد هماگلوتیناسیون از ویروس‌های مورد چالش به هر گوده اضافه و پلیت به مدت سی دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز جوجه به هر پلیت اضافه و ۴۰ دقیقه دیگر انکوباسیون در دمای اتاق انجام گرفت. تیتراژ HI برابر با بیشترین رقتی از سرم است که باعث ممانعت از هماگلوتیناسیون ۴ واحد هماگلوتیناسیون از هر کدام از ویروس‌ها شود.

**آزمایشات مولکولی:** نمونه سواب نای و کلواک جهت آزمایشات مولکولی Real time RT-PCR در روز چهارم بعد از تزریق، از جوجه‌های SPF مرده و جوجه‌های تجاری زنده اخذ شد. RNAی نمونه‌ها توسط کیت ستونی شرکت سیناکلون (One Pure

شدند.

### نتایج

#### علائم بالینی و کالبدگشایی: جوجه‌های SPF

در هر دو گروه ظرف ۴۸ تا ۷۲ ساعت تلف شدند. در این مدت در هر دو گروه علائم بالینی شامل اسهال سبز آبکی، کزکردگی و خواب آلودگی، علائم تنفسی شامل نفس نفس زدن، سرفه و ترشحات بینی و تغییر جهت و چرخش سر به زیر شکم دیده شد. در جوجه‌های تجاری تا سه روز هیچ علامتی مشاهده نگردید. از روز سوم در برخی از جوجه‌ها در هر دو گروه تجاری، شاهد کزکردگی بودیم. همچنین هیچ تلفاتی در هیچ‌یک از دو گروه جوجه‌های تجاری مشاهده نشد.

#### سرولوژی: نتایج آزمایش HI در روز قبل از

چالش، سطح آنتی‌بادی در گروه جوجه‌های تجاری را ۶/۴۶ و در گروه جوجه‌های SPF را صفر نشان داد.

#### آزمایشات مولکولی: نمونه سواب نای و کلواک

اخذ شده از دو گروه جوجه‌های SPF از ۴۸ ساعت بعد از عفونت، مثبت گردید. در جوجه‌های تجاری نمونه نای و کلواک اخذ شده از گروه آلوده با ژنوتیپ VII.1.1 مثبت، اما نمونه‌های آلوده با ژنوتیپ VII.2 منفی بودند.

#### یافته‌های هیستوپاتولوژی: در روز چهارم بعد

از چالش، ۴۱ عدد لام هیستوپاتولوژی از بافت نای، پیش‌معدده، قلب، کلیه، ریه، طحال، مغز، روده و کبد جوجه‌های SPF مرده و سواب کام و کلواک از جوجه‌های تجاری زنده نمونه‌گیری شد. در نمونه‌های نای هر دو گروه جوجه‌های SPF آلوده شده با دو ژنوتیپ، همورازی مشاهده گردید و در مورد جوجه‌های تجاری بافت‌های ریه طبیعی و قرمز رنگ بودند و نشانه‌ای از خونریزی در پیش‌معدده و قلب یافت نشد. نتایج حاصل از ضایعات و

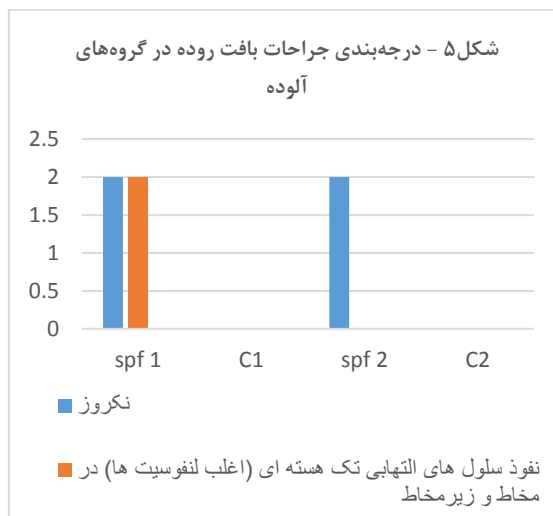
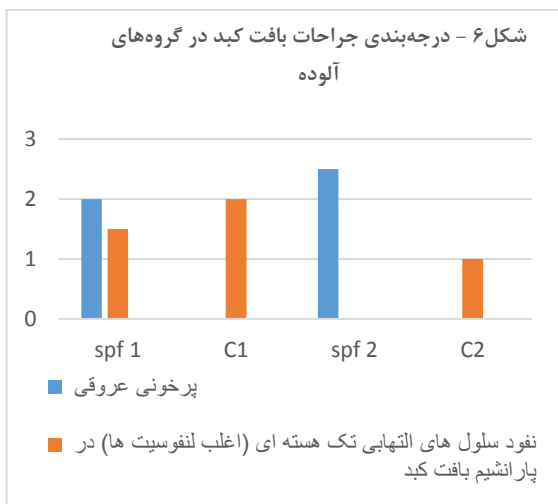
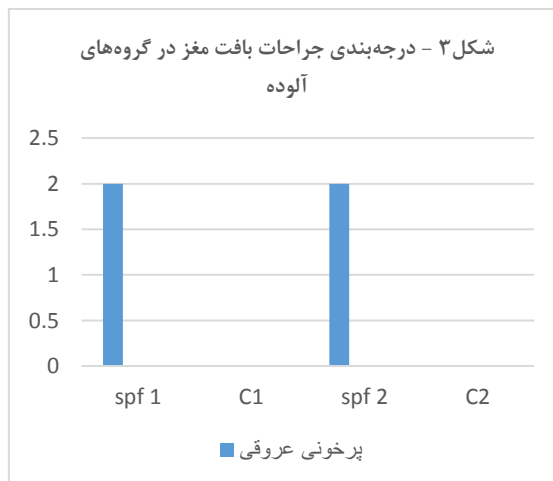
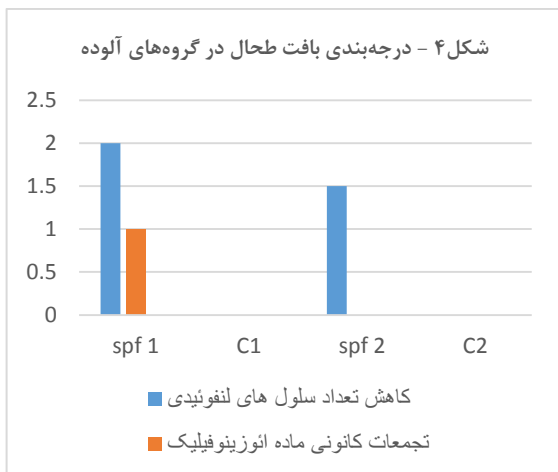
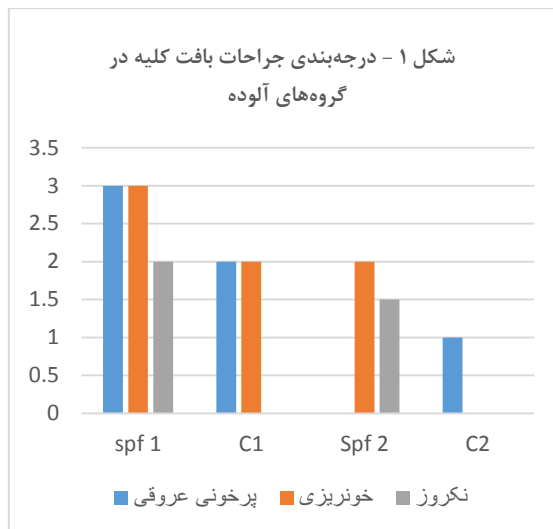
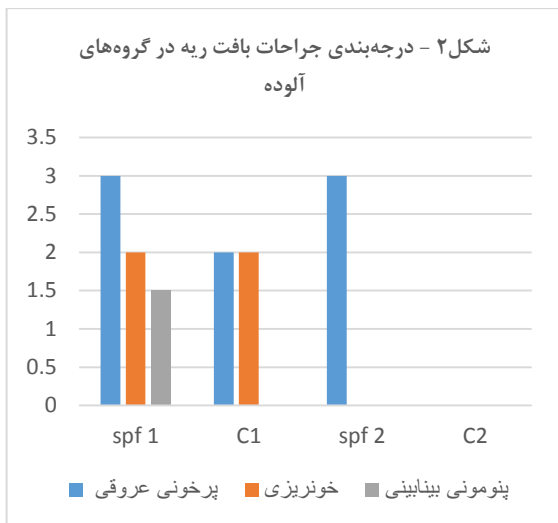
RNA extraction kit) استخراج گردید و سپس سنتز cDNA با استفاده از پرایمر رندوم هگزامر به روش ارجاع داده شده توسط کیت شرکت ترموفیشر ساخته شد (۲۳). آزمون Real Time PCR جهت ردیابی سویه فوق حاد نیوکاسل توسط روشی که Farkas ارائه نموده بود، انجام داده شد (۲۴). توالی پرایمرفوروارد شامل GAY TCY ATC CGY AGG ATA CAA GRG TC و پرایمرهای معکوس شامل AAC CCC AAG AGC TAC ACY RCC و GAC CCC AAG AGC TAC ACY RCC و توالی پراب‌ها شامل AAR CGT YTC TGY CTC و C و AGA RAC GCT TTR TAG GTG C شامل PCR Sina Green HS-qPCR Mix (سیناکلون، ایران)، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد و معکوس، ۱/۵ میکرولیتر از پراب و ۱ میکرولیتر از DNA و در نهایت آب مقطر استریل بود. برنامه دمایی ریل تایم شامل  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه، سپس  $45^{\circ}\text{C}$  سیکل  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه، و  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه بود.

#### آزمایش هیستوپاتولوژی: جوجه‌ها هر روز

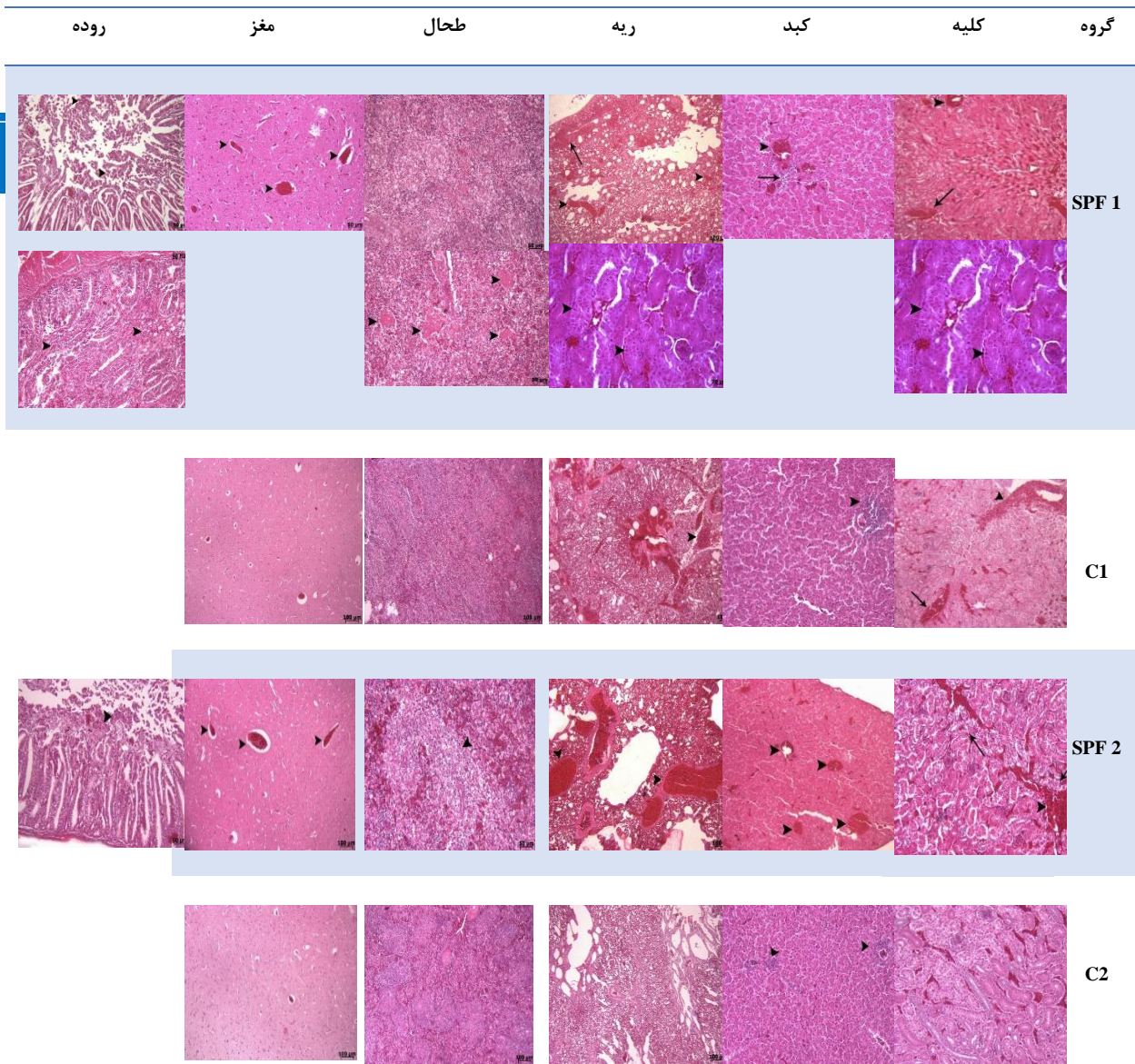
برای ضبط علائم بالینی و جراحات تحت نظر قرار گرفتند. برای نمونه‌های هیستوپاتولوژی، جوجه‌ها توسط جدا کردن گردن، در روز چهارم بعد از تزریق (۹۶ ساعت بعد) کشته شدند. بافت‌های نای، پیش‌معدده، قلب، کلیه، ریه، طحال، مغز، روده و کبد در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و سپس پروسس و مقطع‌برداری گردید و در نهایت با ائوزین-هموتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند (۲۱). نمونه‌های بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. سیستم درجه‌بندی جراحات بافت‌های آلوده به ویروس با استفاده از مطالعات قبلی تعیین شد (۲، ۲۲). به طور خلاصه جراحات در ۳ درجه =۰ نرمال، ۱=کم، ۲=متوسط، ۳=شدید طبقه‌بندی

هیستوپاتولوژی در نمودارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ و

شکل ۷ به صورت خلاصه آمده است.

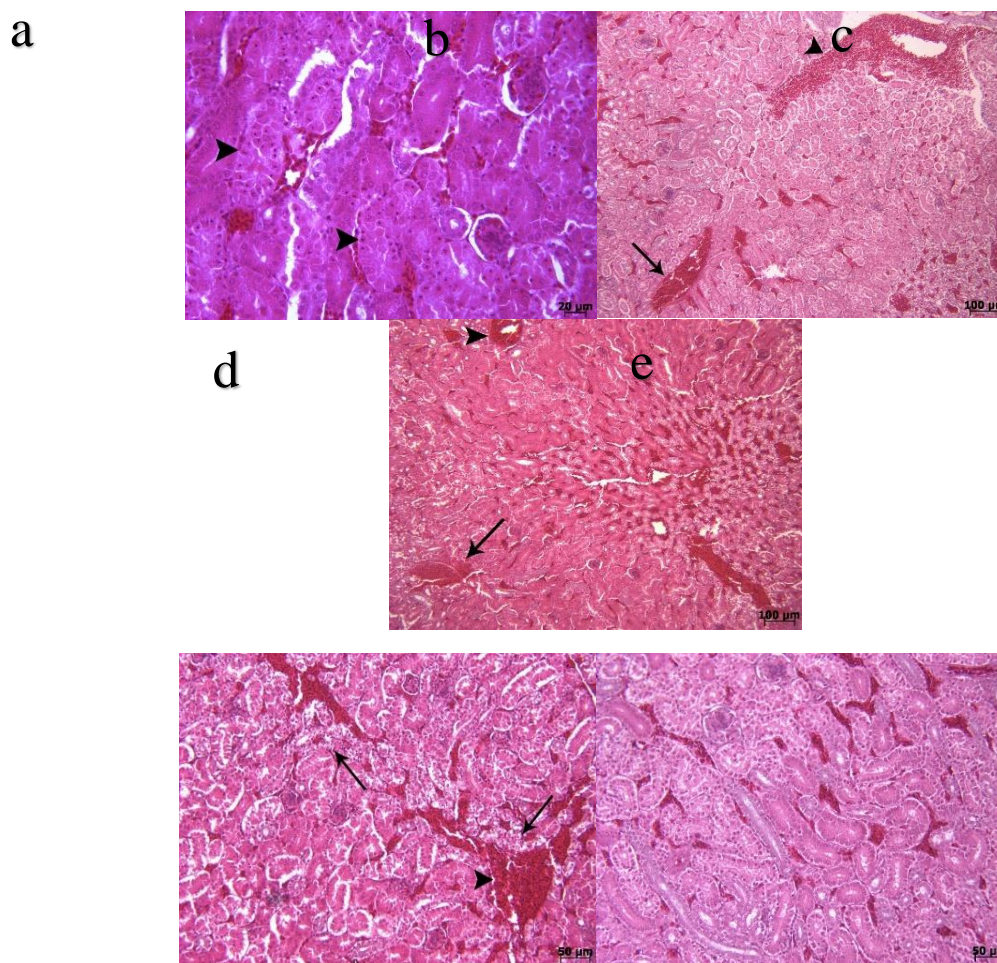


شکل ۷- تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت‌های مختلف در گروه‌های آزمایشی ۱-۴ در نتایج حاصل از بررسی مقاطع هیستوپاتولوژی نمونه‌ی بافت‌ها



**بافت کلیه:** در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس عامل نیوکاسل ژنوتیپ VII.2 پرخونی عروقی و خونریزی شدید در پارانشیم کلیه (شکل ۸.a)، نکروز متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری (شکل ۸.b) و در گروه جوجه‌های تجاری C1 پرخونی عروقی و خونریزی متوسط در پارانشیم کلیه

(شکل ۸.c) مشاهده گردید. بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 خونریزی متوسط در پارانشیم کلیه، نکروز اندک تا متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری (شکل ۸.d) و در گروه جوجه‌های تجاری C2 میزان اندکی پرخونی عروقی مشاهده شد (شکل ۸.e).

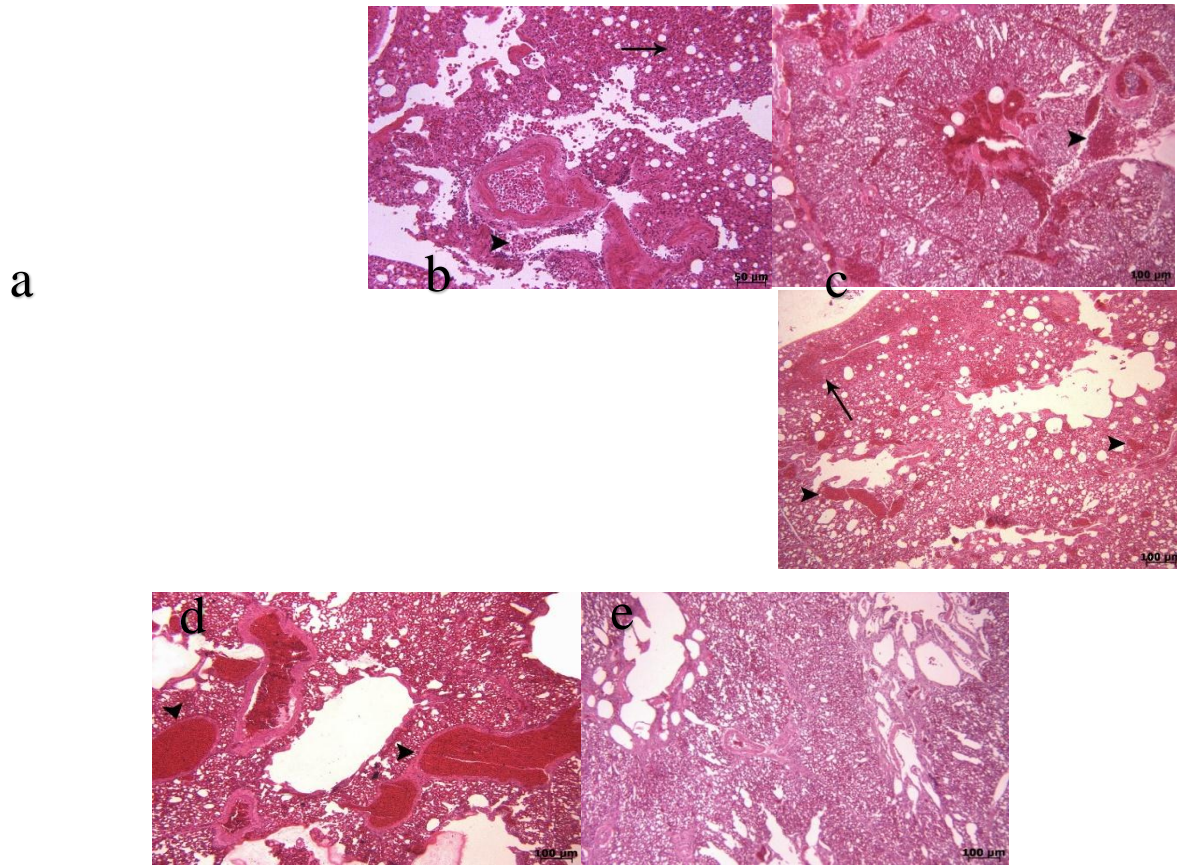


شکل ۸- پاتولوژی مقاطع بافت کلیه جوجه‌ها. a: گروه SPF1: پرخونی عروقی و خونریزی در پارانشیم بافت کلیه؛ b: گروه SPF1، نکروز سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری؛ c: گروه C1، پرخونی عروقی و خونریزی در پارانشیم بافت کلیه؛ d: گروه SPF2، خونریزی در پارانشیم کلیه و نکروز سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری؛ e: گروه C2، پرخونی عروقی اندک

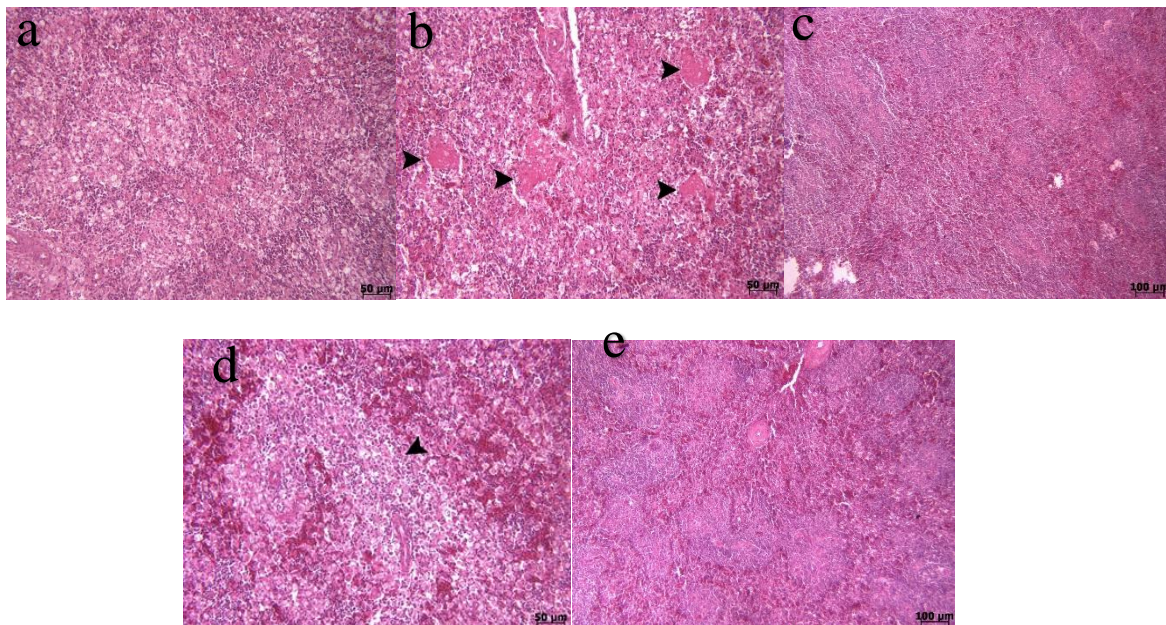
ویروس VII.2 کاهش متوسط در تعداد سلول‌های لنفوئیدی و همچنین تجمعات کانونی از ماده ائوزینوفیلیک در بافت طحال دیده شد (شکل ۱۰. a و b). در گروه جوجه‌های تجاری C1 ضایعه پاتولوژیک مشاهده نگردید (شکل ۱۰. c). بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 کاهش اندک تا متوسط در تعداد سلول‌های لنفوئیدی مشاهده شد (شکل ۱۰. d)، در صورتی که در گروه جوجه‌های تجاری C2 ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نگردید (شکل ۱۰. e).

**بافت ریه:** در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 پرخونی عروقی شدید، خونریزی متوسط در پارانشیم ریه و پنومونی بینابینی کم تا متوسط (شکل ۹. a و b) و در گروه جوجه‌های تجاری C1 خونریزی و پرخونی عروقی متوسط مشاهده گردید (شکل ۹. c). بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 فقط پرخونی عروقی شدید مشاهده گردید (شکل ۹. d)، در صورتی که در گروه جوجه‌های تجاری C2 ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نشد (شکل ۹. e).

**بافت طحال:** در گروه SPF1 بعد از تزریق



شکل ۹- پاتولوژی مقاطع بافت ریه جوجه‌ها. a: گروه SPF1، پرخونی عروقی و پنومونی بینابینی در بافت ریه؛ b: گروه SPF1، خونریزی در پارانشیم ریه و پنومونی بینابینی؛ c: گروه C1، خونریزی در بافت ریه؛ d: گروه SPF2، پرخونی عروقی شدید؛ e: گروه C2، بافت نرمال ریه

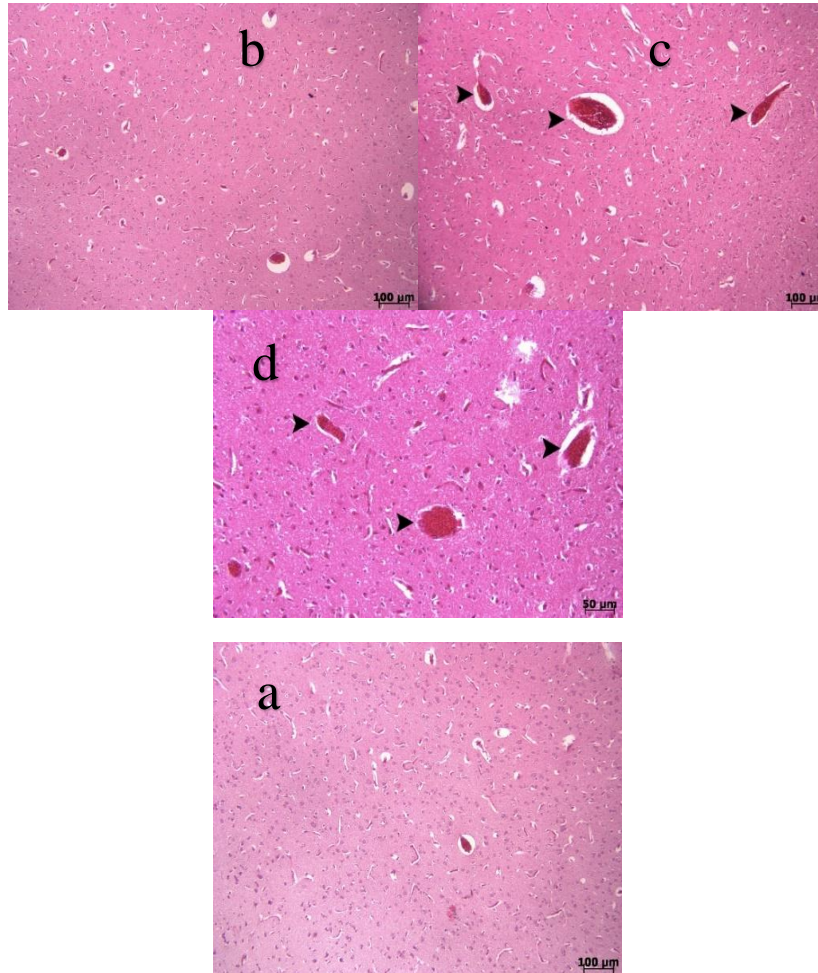


شکل ۱۰- پاتولوژی مقاطع بافت طحال جوجه‌ها. a: گروه SPF1، کاهش تعداد سلول‌های لنفوسیتی در بافت طحال؛ b: گروه SPF1، تجمعات کانونی ماده ائوزینوفیلیک در بافت طحال؛ c: گروه C1، بافت نرمال طحال؛ d: گروه SPF2، کاهش در تعداد سلول‌های لنفوسیتی در بافت طحال؛ e: گروه C2، بافت نرمال طحال

## مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های ...

تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 پرخونی عروقی متوسط دیده شد (شکل c.۱۱)، و در گروه جوجه‌های تجاری C2 ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نگردید (شکل d.۱۱).

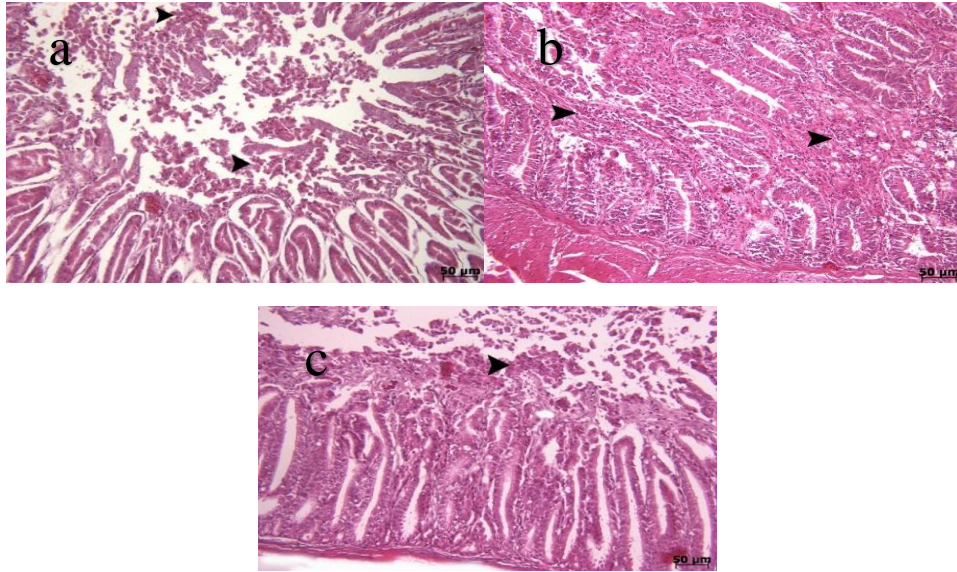
**بافت مغز:** در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 پرخونی عروقی متوسط دیده شد (شکل a.۱۱)، و در گروه جوجه‌های تجاری C1 ضایعه پاتولوژیک مشاهده نگردید (شکل b.۱۱). بعد از



شکل ۱۱- پاتولوژی مقاطع بافت مغز جوجه‌ها. a: گروه SPF1، پرخونی عروقی در بافت مغز؛ b: گروه C1، بافت نرمال مغز؛ c: گروه SPF2، پرخونی عروقی در بافت مغز؛ d: گروه C2، بافت نرمال مغز

زیرمخاط (شکل a.۱۲ و b) و همچنین بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها دیده شد (شکل c.۱۲).

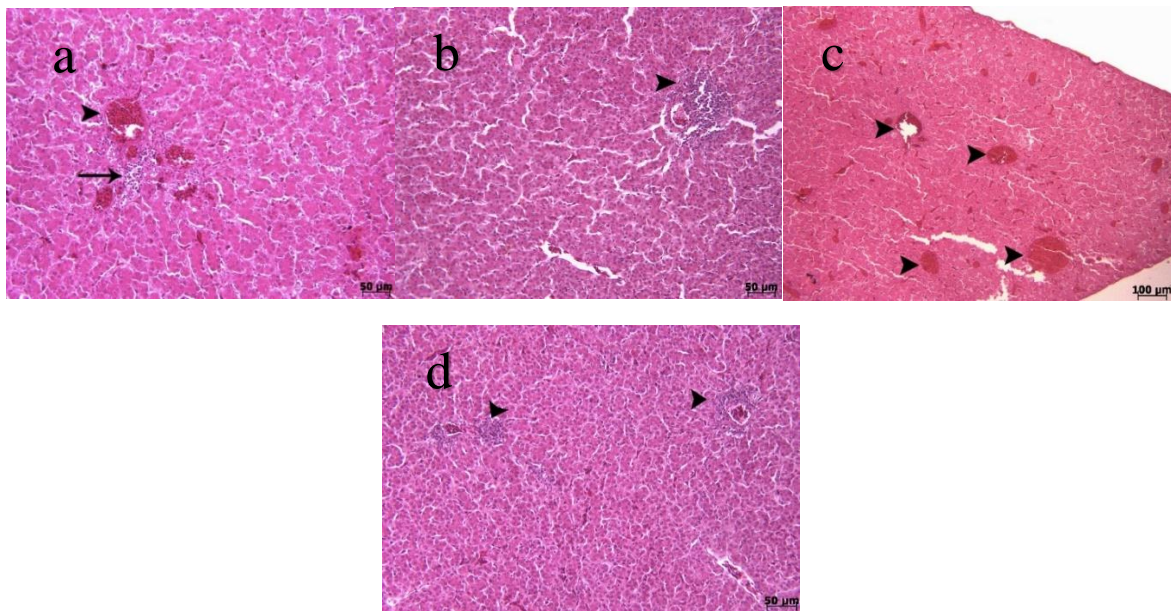
**بافت روده:** در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها و نیز نفوذ متوسط سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای (اغلب لنفوسیت‌ها) در مخاط و



شکل ۱۲- پاتولوژی مقاطع بافت روده جوجه‌ها. a: گروه SPF1، نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها در بافت روده؛ b: گروه SPF1، نکروز و نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در مخاط و زیرمخاط بافت روده؛ c: گروه SPF2، نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌های بافت روده.

کانونی متوسط مشاهده شد (شکل ۱۳. b). بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 پرخونی عروقی متوسط تا شدید دیده شد (شکل ۱۳. c). در گروه جوجه‌های تجاری C2 هپاتیت لنفوسیتیک کانونی مشاهده گردید (شکل ۱۳. d).

**بافت کبد:** در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 پرخونی عروقی متوسط، نفوذ کم تا متوسط از سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای (اغلب لنفوسیتی) در پارانشیم بافت کبد (هپاتیت لنفوسیتیک کانونی) مشاهده شد (شکل ۱۳. a). در گروه جوجه‌های تجاری C1 هپاتیت لنفوسیتیک



شکل ۱۳- پاتولوژی مقاطع بافت کبد جوجه‌ها. a: گروه SPF1، پرخونی عروقی و نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در پارانشیم کبد؛ b: گروه C1، هپاتیت لنفوسیتیک کانونی در بافت کبد؛ c: گروه SPF2، پرخونی عروقی؛ d: گروه C2، هپاتیت لنفوسیتیک کانونی.

## بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به خسارت اقتصادی سنگینی که بیماری نیوکاسل هر ساله به صنعت طیور کشور و جهان وارد می‌نماید، این بیماری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های طیور مطرح می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر با تمرکز بر روی ژنوتیپ‌های اخیر در حال گردش در کشور، شامل جدایه‌ی VII.2 و VII.1.1 به بررسی جراحات هیستوپاتولوژی و سطح تیترا آنتی‌بادی در جوجه‌های تجاری تخم‌گذار و جوجه‌های SPF پرداخته شد.

علائم بالینی حاصل از این آزمایش، در گروه SPF، در ۷۲ ساعت (۳ روز) بعد از تزریقات، اسهال سبز آبکی بدبو، کزکردگی و خواب‌آلودگی، علائم تنفسی، تغییر جهت و چرخش سر به زیر شکم دیده شد؛ در حالی که در گروه جوجه‌های تجاری هیچ علائم بالینی مشاهده نگردید. این نتایج نشان‌دهنده این بود که جوجه‌های تجاری به این ویروس‌ها مقاوم‌تر از جوجه‌های SPF بوده‌اند. در مطالعه‌ی Kumbish و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی اثر بیماری نیوکاسل بر روی پرندگان بومی و وحشی، علائم بالینی مشاهده شده در پرندگان زنده به‌طور کلی شامل ضعف، اسهال آبکی مایل به سبز، مشکل تنفسی، بی‌اشتهایی و سرفه، کجی گردن، افتادگی بال‌ها، فلج جزئی پا و اپیستوتونوس بود (۲۵). El-Mandrawy (۲۰۱۷) نیز در مطالعه‌ی خود بر روی جوجه‌های گوشتی، سیانوز، ترشحات بینی، ورم پلک و اسهال خمیری سفید به همراه علائم عصبی مشاهده کرد (۲۶). اثر ویروس بر روی ارگان‌های لنفوئیدی، اهمیت آن را در کشورهایی که طیور صنعتی را واکسینه می‌نمایند، افزایش می‌دهد، زیرا واکسیناسیون می‌تواند منجر به کاهش تولید و افزایش حساسیت به سایر عفونت‌ها شود (۲۲). در مطالعه‌ی Mousa و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی تفاوت تیترا آنتی‌بادی ایمنی و بافت‌شناسی اندام‌های

## مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های ...

ایمنی و همچنین بیان آنتی‌ژن ویروس در اندام‌های ایمنی بین گروه‌های سنی مختلف جوجه‌های گوشتی (جوجه‌های ۳ و ۱۵ روزه) حاصل از تزریق نیوکاسل ولوژن ژنوتیپ VII پرداختند. نتایج حاکی از این بود که ویروس NDV باعث کاهش ایمنی پرندگان توسط کاهش تیترا آنتی‌بادی و ایجاد تغییرات شدید هیستوپاتولوژیک در اندام‌های ایمنی بدن می‌شود که با بیان بالای آنتی‌ژن ویروس در اندام‌های ایمنی در ارتباط می‌باشد. علاوه بر این میان سن جوجه‌ها هنگام تزریق و شدت ضایعات ایجاد شده، و متعاقب آن وضعیت ایمنی پرنده‌ها رابطه‌ای مستقیم وجود دارد (۲). سایرین مشاهده نمودند ژنوتیپ VII ویروس نیوکاسل در بافت‌های لنفاوی رونویسی کرده و به آنها آسیب جدی می‌رساند (۲، ۲۷). Senne و Alexander (۲۰۰۸) نیز تغییرات هیستولوژی در بافت‌های لنفاوی را متعاقب عفونت جوجه‌ها با ویروس نیوکاسل ولوژن ثابت نمودند (۸). در نتایج بافت‌شناسی مطالعه‌ی حاضر، در بافت کلیه، در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 پرخونی عروقی و خونریزی شدید، نکروز متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری مشاهده گردید، در صورتی که در گروه جوجه‌های تجاری فقط پرخونی عروقی و خونریزی متوسط در پارانشیم کلیه دیده شد. در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1، شاهد خونریزی متوسط عروقی در پارانشیم کلیه و نکروز کم تا متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری بودیم، اما جوجه‌های تجاری فقط مختصری پرخونی عروقی نشان دادند.

پرخونی کلیه در مطالعه‌ی Kumbish و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیان شده بود. علاوه بر این پرخونی ریوی، خونریزی پتشی در سطح موکوس پیش‌معدده و التهاب نای هموراژیک، پرخونی و بزرگ شدن متوسط پانکراس، بزرگ شدن متوسط قلب، تغییرات

هیستوتولوژیکی شامل تخلیه‌ی لنفوئیدی و پرولیفراسیون بافت همبندی، التهاب روده و التهاب طحال نیز مشاهده شد. این محققین نشان دادند که آنتی‌ژن‌های NDV در پرندگان وحشی و جوجه‌های بومی بیشتر در طحال، پانکراس، نای و پیش‌معه متمرکز می‌شوند (۲۵). در بافت ریه در مطالعه‌ی حاضر، در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 پرخونی عروقی شدید، خونریزی متوسط در پارانشیم ریه و پنومونی بینابینی کم تا متوسط، اما در گروه جوجه‌های تجاری خونریزی و پرخونی عروقی متوسط دیده شد؛ در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1 فقط پرخونی عروقی شدید مشاهده شد، در حالی که جوجه‌های تجاری هیچ جراحی از خود نشان ندادند. در نتایج بافت‌شناسی بافت طحال در مطالعه‌ی حاضر، در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 کاهش متوسط تعداد سلول‌های لنفوئیدی و تجمع کانونی ماده ائوزینوفیلیک و در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1 فقط کاهش اندک تا متوسط تعداد سلول‌های لنفوئیدی مشاهده شد، در صورتی که در هیچ کدام از گروه‌های جوجه‌های تجاری، هیچ ضایعه‌ای در بافت طحال دیده نشد. ضایعات پاتولوژیک طحال در برخی از مطالعات قبلی نیز مشاهده شده بود (۱۵، ۲۵). در مطالعاتی دیگر، درجات آسیب بافت‌شناسی به دست آمده برای هر عضو در گروه غیر واکسینه نسبت به گروه واکسینه شده به طور قابل توجهی بالاتر بود. در بافت مغز التهاب اطراف عروقی لنفوسیتیک، در بافت روده‌ی کوچک، نکروز مخاط و زیر مخاط و پوسته شدن ویلی‌ها، نکروز توبولار و پرخونی عروق خونی بین لوله‌ای در بافت کلیه و پرخونی سیاهرگ‌ها در بافت کبد مشاهده شدند. در جوجه‌های غیر واکسینه آلوده شده با ND، توبول‌های کلیوی منتشر و نکروز انعقادی گلمرولی با گشاد شدن کیستیک و یا تغییر مورفولوژیکی

برخی از لوله‌های کلیوی علاوه بر آسیب رساندن به غشای پایه و پرخونی شدید رگ‌های خونی بین لوله‌ای دیده شد (۲۶، ۲۸). در نتایج هیستوپاتولوژی مطالعه‌ی حاضر، در بافت مغز، در گروه SPF آلوده شده با ویروس‌های VII.2 و VII.1.1 فقط شاهد پرخونی عروقی متوسط بودیم، در حالی که گروه جوجه‌های تجاری جراحی نشان ندادند. در بافت روده‌ی گروه‌های SPF آلوده شده با ویروس‌های VII.2 و VII.1.1 نکروز و کنده شدن متوسطی از سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها دیده شد اما در گروه‌های تجاری جراحی مشاهده نگردید. در بافت کبد در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 پرخونی عروقی متوسط، نفوذ کم تا متوسط از سلول‌های التهابی تک هسته‌ای (اغلب لنفوسیتی) در پارانشیم بافت کبد (هپاتیت لنفوسیتیک کانونی) و در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1 فقط هپاتیت لنفوسیتیک کانونی متوسط مشاهده شد، در صورتی که در هیچ کدام از گروه‌های جوجه‌های تجاری، هیچ ضایعه‌ای در بافت کبد دیده نشد. Kumbish و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ی خود هپاتومگالی مشاهده نمودند (۲۵). در نتایج سرولوژی مطالعه‌ی حاضر، تغییر سطح آنتی‌بادی به صورت افزایش تیتراژ در گروه جوجه‌های تجاری در مقایسه با تیتراژ گروه جوجه‌های SPF نشان داده شد. با توجه به این نتیجه، می‌توان بیان کرد که جوجه‌های تجاری مقاوم‌تر از جوجه‌های SPF بودند. جوجه‌های SPF در ۴۸ ساعت بعد از تزریق همگی تلف شدند. در روز چهارم بعد از تزریق، در نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی، آسیب شدیدی و یا خونریزی در پیش‌معه و قلب هیچ کدام از گروه‌ها مشاهده نگردید. فقط در نای دو گروه از جوجه‌های SPF (SPF1 و SPF2) خونریزی مشاهده شد. در مجموع، بیشترین جراحات در بافت ریه و کلیه مشاهده شد که در گروه جوجه‌های SPF شدیدتر

خونریزی در معده و لوزه‌های سکومی و در پیش‌معه نیز تورم همراه با خونریزی در زیر مخاط و پاپیلا مشاهده گردید (۲۹).

علائم بالینی فقط در جوجه‌های SPF مشاهده شد. با توجه به نتایج آزمایش HI در روز قبل از چالش، سطح آنتی‌بادی در گروه جوجه‌های تجاری ۶/۴۶ و در گروه جوجه‌های SPF صفر بود. در نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی، بیشترین جراحات در بافت ریه و کلیه مشاهده شد که در گروه جوجه‌های SPF شدیدتر بوده و همچنین جراحات حاصل از ویروس VII.2 شدیدتر از سویه VII.1.1 بود. در مجموع با توجه به تیتراژ آنتی‌بادی محافظ و جراحات هیستوپاتولوژی کمتر در گروه جوجه‌های تجاری، می‌توان نتیجه گرفت که آنتی‌بادی موجود در گله‌های تجاری تا حد بالایی از تکثیر ویروس جلوگیری می‌نماید.

## References

- 1- Vegad J. Poultry diseases: a guide for farmers and poultry professionals: IBDC Publishers; 2008.
- 2- Mousa M, Mohammed F, Khalefah H, El-Deeb A, Ahmed K. Comparative serological, histopathological and immunohistochemical evaluation of immune status of broiler chickens experimentally infected with velogenic Newcastle disease virus in different ages. *Int J Vet Sci.* 2019;8(3):143-50.
- 3- Manual O. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals of the World Organisation for Animal Health (OIE). *Chapters.* 2012;2(4):441-2.
- 4- Wang Y, Duan Z, Hu S, Kai Y, Wang X, Song Q, et al. Lack of detection of host associated differences in Newcastle disease viruses of genotype VIIId isolated from chickens and geese. *Virology.* 2012;9(1):197.
- 5- Miller PJ, Koch G. Newcastle disease. *Diseases of poultry.* 2013;13:89-138.
- 6- Afonso CL, Amarasinghe GK, Bánayai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales. *Arch Virol.* 2016; 161(8): 2351-60.

بود، و در حالت کلی جراحات حاصل از ویروس VII.2 شدیدتر از VII.1.1 دیده شد. در کل با توجه به تیتراژ آنتی‌بادی محافظ و جراحات هیستوپاتولوژی کمتر در گروه جوجه‌های تجاری، می‌توان نتیجه گرفت که جوجه‌های تجاری به این دو ویروس مقاوم‌ترند. در آزمایش بافت‌شناسی مطالعه‌ی Imran و همکاران (۲۰۱۹) پاتوژن متوسط تا بسیار شدید عفونت ویروس نیوکاسل و ویروس برونشیت عفونی در بافت‌های ریه‌ها، پیش‌معه، کلیه و سگال تانسیل در روزهای صفر، دو، چهار و شش بعد از تزریق ویروس‌ها، دیده شدند. با توجه به علائم بالینی شدیدتر بین روزهای ۴ الی ۶ بعد از تزریق، بیشترین ضایعات در بافت‌های جمع‌آوری شده نیز، در روز ۶ بعد از تزریق مشاهده شد. در بافت‌شناسی عموماً التهاب‌های هموراژیک و پرخونی‌های هیپریمی در ریه‌ها، بزرگ شدن کلیه‌ها، تورم و

- 7- Ghalyanchilangeroudi A, Hosseini H, Jabbarifakhr M, Fallah Mehrabadi MH, Najafi H, Ghafouri SA, et al. Emergence of a virulent genotype VIIi of Newcastle disease virus in Iran. *Avian Pathol.* 2018; 47(5): 509-19. [In Persian]
- 8- Alexander D, Senne D. Newcastle Disease: Diseases of poultry. *Iowa State University Press.* USA; 2008.
- 9- Miller PJ, Haddas R, Simanov L, Lublin A, Rehmani SF, Wajid A, et al. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features. *Infect Genet Evol.* 2015; 29: 216-29.
- 10- Diel DG, da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(8): 1770-9.
- 11- Soltani M, Peighambari S, Pourbakhsh S, Ashtari A, Far AR, Abdoshah M. Molecular characterization of haemagglutinin-neuraminidase gene among virulent Newcastle disease viruses isolated in Iran. *Iran J Vet Res.* 2019; 20(1): 1. [In Persian]

**12- Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J, Berg M, et al.** Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infect Genet Evol.* 2019; 74: 103917.

**13- Sabouri F, Vasfi Marandi M, Bashashati M.** Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathol.* 2018; 47(1): 90-9. [In Persian]

**14- Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL.** Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect Genet Evol.* 2016; 39: 22-34.

**15- Rue CA, Susta L, Cornax I, Brown CC, Kapczynski DR, Suarez DL, et al.** Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *J Gen Virol.* 2011; 92(4): 931-9.

**16- Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C.** Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diag Invest.* 2011; 23(4): 637-56.

**17- Harrison L, Brown C, Afonso C, Zhang J, Susta L.** Early occurrence of apoptosis in lymphoid tissues from chickens infected with strains of Newcastle disease virus of varying virulence. *J Comp Pathol.* 2011; 145(4): 327-35.

**18- Suarez D.** Avian encephalomyelitis. In (eds: Swayne DE, glisson Jr, McDougald Lr, Nolan LK, Suarez DL, Nair V) *Diseases of Poultry* 13th edn, Ames. *Wiley-Blackwell.* 2013.

**19- Perozo F, Marcano R, Afonso CL.** Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela: efficacy of field vaccination. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4): 1204-8.

**20- Hosseini H, Langeroudi AG, Torabi R.** Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease viruses isolated in Iran, 2010–2012. *Avian Dis.* 2014; 58(3): 373-6. [In Persian]

**21- Bancroft JD.** Histochemical techniques: Butterworth-Heinemann; 2013.

**22- Merino R, Villegas H, Quintana JA, Calderon N.** Comparison of the virulence of pathogenic Newcastle disease viruses belonging to

the same or different genotypes. *Int J Poult Sci.* 2011; 10(9): 713-20.

**23- Seger W, Langeroudi AG, Karimi V, Madadgar O, Marandi MV, Hashemzadeh M, editors.** Prevalence of avian infectious bronchitis virus in broiler chicken farms in south of Iraq, 2014–2015. *Vet Res Forum;* 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

**24- Farkas T, Szekely E, Belak S, Kiss I.** Real-time PCR-based pathotyping of Newcastle disease virus by use of TaqMan minor groove binder probes. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(7): 2114-23.

**25- Kumbish PR, Oladele SB, Esievo KAN, Ibrahim NDG, Ahmed JS, Moses GD, et al.** Clinico-pathological and Immunohistochemistry of Newcastle Disease in Indigenous Chickens and Some Wild Birds in Plateau State, Nigeria. *J Adv Microbiol.* 2019: 1-15.

**26- El-Mandrawy SA, Ismail SA.** Selective hematological, biochemical and pathological alterations of Newcastle virus in naturally infected and vaccinated broilers in Damietta Governorate of Egypt. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine.* 2017; 74(2): 139-48.

**27- Nakamura K, Ito M, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, et al.** Pathogenesis of Newcastle disease in vaccinated chickens: pathogenicity of isolated virus and vaccine effect on challenge of its virus. *J Vet Med Sci.* 2013: 13-0284.

**28- El-Bahrawy A, Zaid A, Sunden Y, Sakurai M, Ito H, Ito T, et al.** Pathogenesis of renal lesions in chickens after experimental infection with 9a5b Newcastle disease virus mutant isolate. *Vet Pathol.* 2017; 54(1): 94-8.

**29- Imran M, Aslam A, Tipu M, Yaqub T.** Evaluating the infection potential of field prevailing newcastle disease virus and infectious bronchitis virus alongwith associated microscopic changes in commercial poultry. *japs, J Anim Plant Sci.* 2019; 29(5): 1290-8.

## Comparison of histopathological changes induced by the VII.2 and VII.1.1 genotypes of Newcastle disease virus in SPF chicks and commercial layers

Arash Ghalyanchi langeroudi<sup>1</sup>, Hamideh Najafi<sup>1</sup>, Niusha haji zamani<sup>1</sup>, Naser Sadri<sup>1</sup>, Zahra Ziafati Kafi<sup>1</sup>, Ali Hojabr Rajeouni<sup>1</sup>, Shabnam Aghajan Tabar<sup>1</sup>, Mohammad Abdoshah<sup>2</sup>, Hossein Hosseini<sup>3\*</sup>

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

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

3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Karaj, Karaj, Iran.

Receive: January 9, 2022; Revise: February 9, 2022; Accept: April 5, 2022

### Summary

Despite the widespread use of vaccination against Newcastle disease virus (NDV), the virus is still circulating in poultry farms. The present study was conducted to measure different histopathological effects and protective antibody levels in experimentally infected chickens with VII.2 and VII.1.1 NDV virulent strains. In this study, commercial layers and SPF(Specific Pathogen-Free) chickens were challenged with NDV genotypes VII.1.1 and VII.2 via oculo-nasal route. Tracheal and cloacal swabs were collected from all chickens on the fourth day after challenge, then chicks were euthanized in order to collect tissue samples. Tissue specimens were chosen from trachea, proventriculus, heart, kidney, lung, spleen, brain, intestine and liver for evaluation and histopathological grading. All SPF chicks were died within the first 48h of experiment. The HI results of a day before challenge revealed the antibody titer of 6.46 in commercial layers and 0 in SPF chicks. The histopathological results did not show any severe damage in tissues of proventriculus and heart. Both SPF groups showed hemorrhages in tracheal tissues. The most lesions were observed in lung and kidney tissues with more severity in SPF chickens and also more severe in VII.2 infected groups rather than the two VII.1.1 infected groups. In conclusion, according to higher antibody titers and lower histopathological lesions in commercial layers, it can be concluded that antibodies in commercial flocks can prohibit viral replication to a great extent.

**Key words:** Newcastle disease, Histopathology, VII.2, VII.1.1, Commercial chickens

# New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 5, No. 1, Spring & Summer 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