

دوره ۵، شماره ۲

ناشر: دانشگاه زابل

سر دبیر:

تقی زهرایی صالحی؛ tsaleh@ut.ac.ir

مدیر مسئول:

داریوش سعادت؛ saadatdariush@uoz.ac.ir

مدیر اجرایی:

احمد راشکی؛ ah_rashki@usal.es



هیات دبیران:

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

زابل

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهرکرد

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد

افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی زاهدان

مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده

دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد جهانتیغ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه زابل

سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهید باهنر کرمان



کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

وبسایت: nfvm.uoz.ac.ir

پست الکترونیک: nfvm@uoz.ac.ir

پیشگفتار

به نام خدا

دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل در راستای اهداف پژوهشی خود اقدام به انتشار نشریه علمی تازه ها در میکروب شناسی دامپزشکی نموده است، این نشریه در پائیز سال ۱۳۹۶ موفق به اخذ مجوز از وزارت علوم گردید. در حال حاضر این مجله به صورت دو فصلنامه می باشد. زمینه ی کاری مجله مذکور گستره ی پژوهش های بنیادی، تحقیقات کاربردی، تحقیقات اپیدمیولوژیک و مطالعات بالینی در زمینه ی آخرین تحقیقات میکروب شناسی دامپزشکی می باشد. مقالات در حوزه های مختلف علم میکروبیولوژی از جمله باکتری شناسی، ویروس شناسی، قارچ شناسی، تک یاخته شناسی و ایمنی شناسی و در حوزه های مرتبط با بیماری های عفونی کلیه حیوانات اهلی، پرندگان، آبزیان و حیات وحش قابل پذیرش می باشند.

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

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه تازه‌ها در 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 ارسال گردد. جهت هرگونه سؤال و پیگیری با ایمیل مجله: nfvm@uoz.ac.ir می‌توانید در ارتباط باشید.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

نحوه رفرنس نویسی:

مقاله: نام خانوادگی و حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان (بین نام نویسندگان از کاما "،" استفاده شود). عنوان کامل مقاله. نام کوتاه شده مجله. سال انتشار؛ دوره(شماره مجله): شماره صفحات. در صورتی که تعداد نویسندگان از ۶ نفر بیشتر باشد پس از نام نفر ششم از عبارت "et al." استفاده شود.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می باشد:

گزارش موردی (Case Report) باید شامل بخش های زیر باشد:

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

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

* **بحث**

در تهیه این مقالات باید توجه داشت که در صورتی که محقق بر روی نمونه های انسانی کار می کند اسرار بیمار محرمانه بماند و همچنین یک فرم رضایت نامه از بیمار تهیه گردد و ضمیمه مقاله شود.

مقاله مروری (Review)

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

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

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

مقاله کوتاه (Short Communication)

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

نامه به سردبیر (Letter to Editor)

نامه به سردبیر دارای موضوعاتی مانند نقدهای 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

شیوع سرولوژی بروسلوز در گوسفندان در تبریز، ایران

ابوالفضل حاجی بمانی شورکی*

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

دریافت مقاله: ۲۱ مرداد ۱۴۰۱، بازنگری: ۳۰ مرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۰۱ شهریور ۱۴۰۱

چکیده

بروسلوز یا تب مالت یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که از جنبه اقتصادی و بهداشتی اهمیت فراوانی دارد و بعد از بیماری هاری مهم‌ترین بیماری مشترک انسان و دام است. در بعضی از مناطق جغرافیایی از جمله ایران به‌عنوان بیماری اندمیک و یکی از مشکلات مهم در دام و انسان مطرح است. نحوه کنترل این بیماری وابستگی زیادی به شیوع سرمی این بیماری در دام دارد. بنابراین هدف مطالعه حاضر ارزیابی سرولوژیکی بروسلوز در گوسفندان شهرستان تبریز به‌منظور کنترل بهتر این بیماری در این منطقه است. از ۲۰۰ رأس از گوسفندان این منطقه نمونه‌گیری و نمونه سرم جداسازی و تشخیص بروسلوز بر اساس آزمایش سرولوژی رزینگال انجام شد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان شیوع بروسلوز ۱۸/۵ درصد، در جنس نر ۲ درصد و در جنس ماده ۱۶/۵ درصد بود. شانس ابتلا به بروسلوز در گوسفندان بالای یک سال ۲ برابر از گوسفندان زیر یک سال بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان شیوع سرولوژی بروسلوز در منطقه تبریز بالا هست. عواملی مثل جنس و سن گوسفندان در میزان شیوع سرولوژی این بیماری نقش می‌توانند داشته باشد. در نتیجه اقدامات کنترلی و پیشگیرانه این بیماری در این منطقه بسیار مهم است.

واژگان کلیدی: بروسلوز، تبریز، شیوع سرولوژی، گوسفند

مقدمه

بروسلوز یا تب مالت یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که از جنبه اقتصادی و بهداشتی اهمیت فراوانی دارد و بعد از بیماری هاری مهم‌ترین بیماری مشترک انسان و دام است که سالانه حدود نیم میلیون نفر در جهان به آن مبتلا می‌شوند و از نظر اپیدمیولوژی آن در انسان ارتباط مستقیمی با میزان شیوع آن در حیوانات اهلی دارد (۱، ۲). نحوه کنترل این بیماری وابستگی زیادی به شیوع سرمی این بیماری در دام دارد. امروزه بروسلوز در خیلی از کشورهای جهان با برنامه‌های واکسیناسیون و سیاست‌های پیشگیرانه کنترل و محدود شده است ولی با این وجود در بعضی از مناطق جغرافیایی از جمله مناطق مدیترانه، جنوب و شرق آسیا، بخش‌هایی از مناطق آفریقا و آمریکای لاتین به‌عنوان بیماری اندمیک و یکی از مشکلات مهم این جوامع در دام و انسان مطرح است (۲). این یک بیماری باکتریایی مزمن است که توسط جنس بروسلا که یک کوکوباسیل داخل سلولی است، ایجاد می‌شود. بر اساس خصوصیات آنتی‌ژنیک، بیوشیمیایی و میزبان اختصاصی، ۱۲ گونه از این عامل شناسایی شده است (۳، ۴). گونه‌های مختلف این باکتری باعث گسترش این بیماری شده ولی بروسلا آپورتوس که عامل بروز بروسلا در گاوها است، عامل اصلی پخش و ماندن این بیماری در حیوانات اهلی در خیلی از کشورها است (۵). عامل اصلی انتقال بیماری بروسلوز به انسان بروسلا ملیتسنسیس است که در گوسفند و بز ایجاد بیماری می‌کند (۶، ۷). این بیماری باعث کاهش بازدهی تولید مثلی در حیوانات می‌شود. بیشترین اختلالاتی که در حیوانات ایجاد می‌کند شامل سقط، التهاب جفت، التهاب اپی‌دیدیم و تورم بیضه است (۸). در انسان این بیماری بیشتر به شکل حاد بروز می‌کند که همراه با تب به‌صورت منظم و مداوم همراه با

دوره‌های متناوب، تعریق مکرر، کاهش وزن و اشتها، خستگی، دردهای عضلانی و عمومی است. انتقال این بیماری در انسان از طریق تماس مستقیم و یا غیر مستقیم انسان‌ها با دام آلوده یا فرارورده‌های لبنی آلوده صورت می‌گیرد (۹).

در ایران که یکی از بزرگ‌ترین مراکز پرورش دهنده گوسفند و بز در آسیای مرکزی است، برنامه کنترل بروسلوز از طریق واکسیناسیون ملی انجام می‌شود (۱۰). با این وجود کنترل و ریشه‌کنی بروسلوز در مناطق اندمیک از جمله ایران، یکی از چالش‌های مهم و ریشه‌کنی بروسلوز خیلی هزینه‌بر است و نیاز به هزینه‌های خیلی زیاد و برنامه‌های بلند مدت واکسیناسیون و ریشه‌کنی دارد (۱۱). جدا از خسارت‌های بزرگ اقتصادی که بروسلوز بر صنعت دامپروری در ایران وارد می‌کند، بروسلوز حیوانی اثرات معناداری بر بهداشت عمومی و رخداد بروسلوز در جامعه انسانی ایران داشته به‌طوری که سالانه از هر ۱۰۰ هزار نفر، ۳۴ انسان دچار بروسلوز می‌شوند (۱۲). وقوع این بیماری در انسان به مقدار زیادی وابسته به مخازن دامی عامل و شیوع زیاد این بیماری در گوسفند و بز دارد. بنابراین در شرایط حال حاضر مطالعات اپیدمیولوژیکی، شناسایی مخازل اصلی دامی بروسلوز و ارزیابی‌های شیوع سرولوژی آن در سطح دام‌های منطقه برای برنامه‌ها و اقدامات کنترلی و ریشه‌کنی بسیار دارای اهمیت و خیلی موثر و مفید است.

با توجه به مطالعات انجام شده در ایران، بروسلوز در همه مناطق ایران به صورت اندمیک وجود دارد و اندمیک بودن این بیماری و سیر رو به رشد این بیماری در برخی از شهرها باعث شده است که این بیماری به‌عنوان یکی از چالش‌های بهداشتی مهم مطرح شود. میزان شیوع این بیماری در جمعیت دامی روستایی ۲/۹ گزارش شده است (۱۳). البته اطلاعات کاملی در مورد شیوع کلی بروسلوز در تمام

نتیجه مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش‌های آگلوتیناسیون با استفاده از یک منبع نوری خوب خوانده می‌شد (۱۴).

د-آنالیز آماری: به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۲ استفاده گردید. اثرات همزمان جنس و سن و اثر متقابلشان (interaction) روی نتیجه میزان وقوع بروسلوز با استفاده از مدل رگرسیون لجستیک چندگانه بررسی شد. برای مقایسه داده‌ها به‌صورت جداگانه از آزمون مربع کای (X²) استفاده گردید. برای محاسبه میزان شیوع از آمار توصیفی و با فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. $P < 0/05$ سطح آماری معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان شیوع بروسلوز در منطقه تبریز ۱۸/۵ درصد بود که از نمونه‌های مثبت میزان شیوع در جنس نر ۱۰/۸ درصد و در جنس ماده ۸۹/۲ درصد بود که هر چند در جنس ماده بیشتر بود ولی از نظر آماری تفاوت معناداری با جنس نر نداشت ($P > 0/05$). میزان شیوع کلی بروسلوز در جنس نر در منطقه تبریز ۲ درصد و در جنس ماده ۱۶/۵ درصد بود.

نتایج مطالعه نشان داد که میانگین سن گوسفندان بروسلوز مثبت $0/13 \pm 2/8$ و بروسلوز منفی $0/29 \pm 2/5$ بود و اختلاف معناداری بین سن و وجود یا عدم وجود بروسلوز وجود نداشت ($0/05 > P$) (جدول ۱).

سن گوسفندان مورد مطالعه به چهار دسته ۱ تا ۲ سالگی، ۲ تا ۳ سالگی، ۳ تا ۴ سالگی و ۴ تا ۸ سالگی طبقه‌بندی شد. نتایج مطالعه نشان داد که درصد نرهای مبتلا به بروسلوز مثبت در رده‌های سنی ۱ تا ۲ سالگی، ۲ تا ۳ سالگی و ۴ تا ۸ سالگی به یک میزان بود و بین آنها اختلاف آماری معناداری

جمعیت‌ها در ایران گزارش نشده است. در تبریز میزان شیوع بروسلوز در گوسفندهای سقط شده مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که ۱۲ درصد از این گوسفندان سقطی آلوده به بروسلا بودند (۱۳). ولی گزارشی از میزان شیوع بروسلوز در گوسفندان در این شهر نشده است. بنابراین هدف مطالعه حاضر ارزیابی سرولوژیکی بروسلوز در گوسفند در تبریز به‌منظور کنترل بهتر این بیماری در این منطقه است.

مواد و روش‌ها

الف-منطقه مورد مطالعه: این مطالعه در شهرستان تبریز واقع در استان آذربایجان شرقی در شمال غرب ایران با طول ۴۶/۲۵ و عرض ۳۸/۲ جغرافیایی انجام شد. آب و هوای این منطقه با تابستان‌های گرم و خشک و زمستان سرد است. پرورش گوسفند در این منطقه یکی از صنعت‌های مهم اقتصادی در این منطقه است که بخش اعظمی از جمعیت روستایی در این منطقه شغل آنها دامداری است.

ب-جمع‌آوری نمونه‌ها: از ۲۰۰ رأس از گوسفندان این منطقه نمونه‌گیری انجام شد. از هر گوسفند ۵ سی‌سی نمونه خون از ورید و داج گرفته شد. نمونه‌ها در کنار یخ با رعایت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه برای جداسازی سرم با دور ۱۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ شد.

ج-آزمایش سرولوژی: تشخیص بروسلوز بر اساس آزمایش سرولوژی رزینگال که رایج‌ترین آزمون غربالگری است، انجام شد. آزمون رزینگال با استفاده از آنتی‌ژن بروسلا ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام گرفت. یک قطره از آنتی‌ژن با میزان مساوی از سرم بر روی لام با همدیگر مخلوط شد. بعد از گذشت ۴-۲ دقیقه

وجود نداشت ($P > 0/05$). ۴۸/۳ درصد از ماده‌های بروسلوز مثبت در در رده سنی ۲ تا ۳ سالگی قرار داشتند که درصد بیشتری از ماده‌های بروسلوز مثبت در این رده سنی بودند. کمترین درصد از ماده‌های بروسلوز مثبت در گروه سنی ۱ تا ۲ سالگی بودند. البته درصد ماده‌های بروسلوز مثبت بین هیچ رده سنی تفاوت آماری معناداری وجود نداشت ($P > 0/05$) (نمودار ۱).

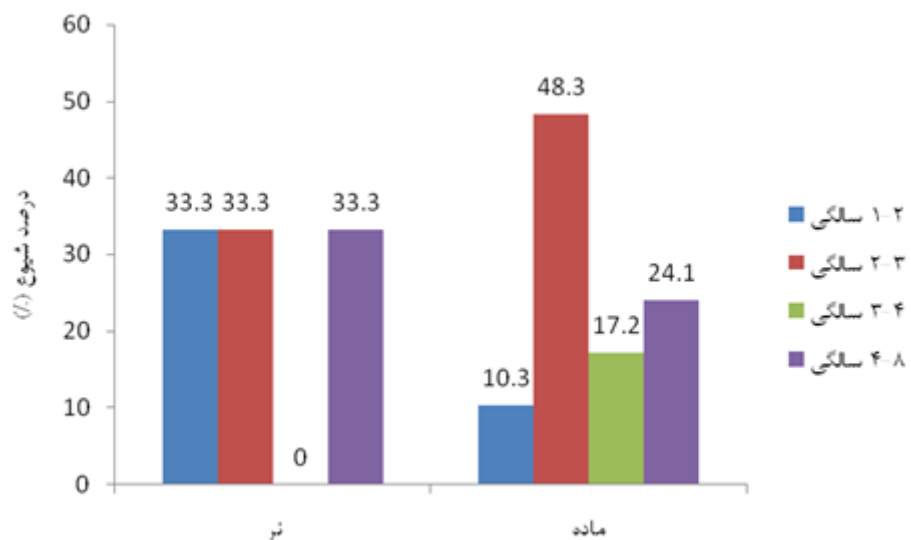
همان طوری که نمودار ۲ نشان می‌دهد بیشتر گوسفندان بروسلوز مثبت در رده‌های سنی مختلف، جنس ماده داشتند و درصد کمتری از آنها جنس نر داشتند اما بین آنها تفاوت آماری معناداری وجود نداشت ($P > 0/05$)

در میان دسته‌های سنی بالاترین درصد میزان شیوع بروسلوز در رده سنی ۲ تا ۳ سالگی و پایین‌ترین میزان شیوع در رده سنی ۱ تا ۲ سالگی بود. شانس ابتلا به بروسلوز در رده سنی بین ۲ تا ۳ سالگی ۲/۶ برابر از رده سنی بین ۱ تا ۲ سالگی بود ($OR = 2/6$) ولی در مجموع میزان شیوع بین رده‌های سنی تفاوت آماری معناداری نداشت ($P > 0/05$). شانس ابتلا به بروسلوز در گوسفندان بالای یک سال ۲ برابر از گوسفندان زیر یک سال بود (جدول ۲).

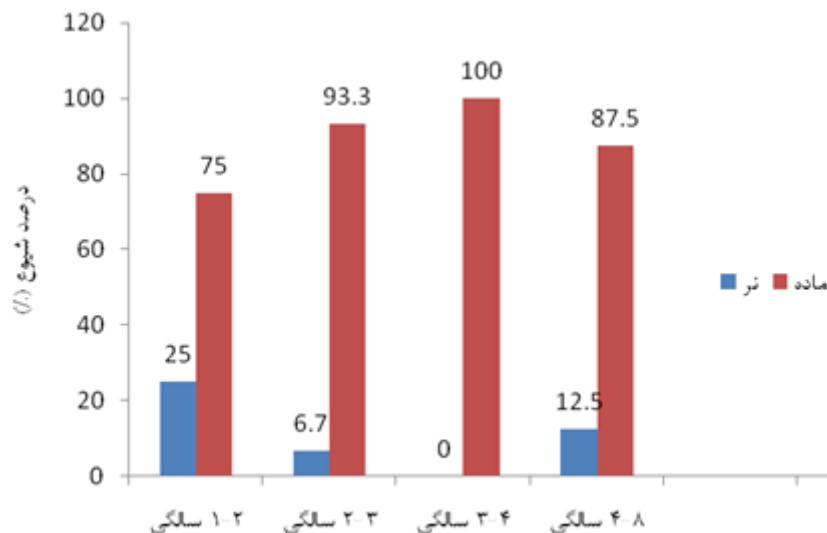
بر اساس نتایج مدل‌های رگرسیون لجستیک چندگانه با تعدیل اثر سن و جنس گوسفندان بر میزان شیوع بروسلوز، این تفاوت معنادار نبود.

جدول ۱- میانگین سن گوسفندان بروسلوز مثبت و منفی

بروسلوز	مثبت (میانگین \pm انحراف معیار)	منفی (میانگین \pm انحراف معیار)	<i>P value</i>
سن	۲/۸ \pm ۰/۱۳	۲/۵ \pm ۰/۲۹	۰/۳



نمودار ۱- توزیع پراکندگی بروسلوز در سنین مختلف در گروه‌های جنسی



نمودار ۲- توزیع پراکندگی بروسلوز در جنس نر و ماده در گروه‌های سنی مختلف

جدول ۲- نسبت شانس (odds ratios) متغیرهای مختلف در مدل لجستیک چندگانه برای میزان شیوع بروسلوز

گروه	میزان بروسلوز (%)	Odds ratio	P value	% 95 CI
نر	۲/۰	۱	-	-
ماده	۱۶/۵	۱/۵	۰/۵	۰/۴-۵/۸
۱-۲ سالگی	۱۵/۶	۱	-	-
۲-۳ سالگی	۳۳/۳	۲/۶	۰/۱	۰/۷-۹/۱
۳-۴ سالگی	۱۵/۲	۱	۰/۹	۰/۲-۴/۲
۴-۸ سالگی	۳۲/۰	۲/۶	۰/۱	۰/۶-۱۰/۱
≥ یک سالگی	۱۵/۴	۱	-	-
< یک سالگی	۲۷/۶	۲/۰۵	۰/۲	۰/۶-۶/۴

بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که علاوه بر مشکلات و خسارات اقتصادی که بر صنعت دامپروری وارد می‌کند، یکی از چالش‌های مهم بهداشت عمومی نیز محسوب می‌شود (۲، ۱۵). در ایران نیز شیوع این بیماری زیاد بوده و اندمیک است (۱۶). با توجه به این که مخزن آن دام‌ها از جمله گاو، گوسفند و بز هستند، بنابراین شناسایی و بررسی اپیدمیولوژی این بیماری

در دام‌ها نقش بسیار حیاتی در برنامه‌ریزی دقیق و بهتر برای کنترل، کاهش بروز و ریشه‌کنی این بیماری دارد (۱۷، ۱۸). در بین دام‌ها، گوسفند عامل اصلی انتقال بروسلوز به انسان است (۶، ۷). در نتیجه بررسی اپیدمیولوژی این بیماری در گوسفند می‌تواند کمک قابل توجهی به پیشگیری و کنترل انتقال آن به انسان و دام‌های دیگر کند.

میزان شیوع کلی بروسلوز در دام‌ها در ایران در طی ۵۰ سال از سال ۱۹۷۰ تا ۲۰۲۰ به‌طور میانگین ۱۰/۱۸ درصد گزارش شده است (۵). نتایج

مطالعه حاضر نشان داد که میزان شیوع بروسلوز در گوسفند در منطقه تبریز ۱۸/۵ درصد بود. در مطالعه‌ای در آذربایجان شرقی بر روی گوسفندان کشتارگاهی انجام شد. میزان شیوع سرولوژی بروسلوز در گوسفندان کشتارگاهی ۴/۵۳ درصد بود (۱۹). در مطالعه متا آنالیزی که در طی ۱۹۷۰ تا ۲۰۲۰ در جمعیت دامی کشور مورد بررسی شد، میزان شیوع بروسلوز در گوسفند در ایران تا سال ۲۰۲۰ میلادی به‌طور میانگین ۱۲/۸ درصد گزارش کرد (۵). در مطالعه‌ای میزان شیوع بروسلوز در گوسفند در جنوب شرقی ایران در کرمان در سال ۲۰۱۱ میلادی ۲/۷ درصد گزارش کرد (۱۲). در مطالعه‌ای دیگر میزان شیوع بروسلوز در گوسفند و بز در روستاهای استان بوشهر بین سال ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۴ میلادی ۳/۷ گزارش کرد (۲۰). در مطالعه بکائی و همکاران میزان شیوع در سال ۲۰۰۸ را ۳/۴ درصد گزارش کردند (۲۱). میزان شیوع بروسلوز در استان‌های مختلف در ایران متفاوت است. بعضی استان‌ها با شیوع کمتر و بعضی دیگر با شیوع بیشتر هستند. این تفاوت‌ها در مطالعات می‌تواند ناشی از فصل، نژاد، تعداد گله، سال انجام نمونه‌گیری، برنامه‌های کنترلی مثل واکسیناسیون و کشتار و نحوه تشخیص بیماری باشد (۱۰).

میزان شیوع بروسلوز در گوسفند در کشورهای دیگر با سطوح مختلفی گزارش شده است. در پاکستان ۱۶/۴ درصد، اتیوپی ۱۴/۶ درصد، سودان ۱۴ درصد، کنیا ۶/۰۱ درصد گزارش شده است (۲۲)، (۲۳). مطالعات اپیدمیولوژی در دیگر بخش‌های جهان هم شیوع سرولوژی بروسلوز در نشخوارکنندگان کوچک بین ۰/۵ تا ۱۲/۰ درصد گزارش کردند (۳۱-۲۴). البته شیوع بالای سرولوژی بروسلوز بین ۲۴ تا ۶۰ درصد در بعضی کشورها هم گزارش شد (۳۲، ۳۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شیوع بروسلوز

در جنس ماده ۱۶/۵ درصد و در جنس نر ۲ درصد بود. Hunduma و همکاران نشان دادند که میزان شیوع بروسلوز در بزهای ماده ۱۲/۲ درصد و در بزهای نر ۹/۸ درصد بود که در جنس ماده بیشتر از نر بود (۳۴). که در تطابق با مطالعه حاضر که میزان شیوع بروسلوز در جنس ماده بیشتر از نر بود. در مطالعه Kakar و همکاران میزان شیوع سرولوژی بروسلوز در گوسفند و بز در پاکستان مورد بررسی قرار دادند، نتایج مطالعه آنها نشان داد که میزان شیوع در گوسفندان ماده ۲۰ درصد و در نرها ۱۲/۸ درصد، در بزهای ماده ۱۵/۲ درصد و در بزهای نر ۸ درصد بود که در این مطالعه نیز شیوع بروسلوز در ماده‌ها بیشتر بود (۲۲). شبیه به این یافته‌ها در مورد شیوع سرولوژی بروسلوز به‌وسیله Wali و همکاران که شیوع سرولوژی بروسلوز در ماده‌ها ۱۳/۳۸ درصد و در نرها ۲ درصد ثبت کردند (۳۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شانس ابتلا به بروسلوز در جنس ماده ۱/۵ برابر بیشتر از جنس ماده بود ($OR = 1/5$). با توجه به شیوع بالاتر بروسلوز در ماده‌ها، ولی این تفاوت‌ها از نظر آماری معنادار نبودند ($P > 0/05$). در مطالعه‌ای میزان شیوع بروسلوز در گوسفند ماده (۸/۲۱ درصد) به‌طور معناداری ($p < 0/01$) بالاتر از جنس نر (۳ درصد) بود (۲۳). در مطالعه‌ای حساسیت جنس به بروسلوز در نشخوارکنندگان کوچک در هند در طی سال‌های ۲۰۱۷ تا ۲۰۱۸ مورد بررسی شد و نتایج نشان داد که در هر دو گونه گوسفند و بز میزان شیوع بروسلوز در جنس ماده به مراتب بالاتر از جنس نر است به‌طوری که در گوسفندان و بزهای ماده به‌ترتیب ۱۴/۸۵ و ۶/۲۶ درصد و در گوسفندان و بزهای نر ۳/۹۰ و ۳ درصد بود (۲۹). در مطالعه‌ای که در اتیوپی انجام شد و میزان شیوع بروسلوز گوسفندی و فاکتورهای خطر را مورد بررسی قرار دادند نتایج مطالعه آنها نشان داد که میزان شیوع

بروسلوز در جنس ماده ۳/۵ برابر بار بیشتر از جنس نر بود که میزان شیوع بروسلوز در جنس ماده ۷/۹ درصد و در جنس نر ۰/۹ بود (۲۸). در مطالعه ما میزان شیوع بروسلوز ۱/۵ برابر در جنس ماده بیشتر از جنس نر بود. نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر به این واقعیت اشاره می‌کنند که حیواناتی که جنس نر دارد به علت این که عوامل استرس‌زایی مانند فیزیولوژی بارداری در آنها مطرح نیست و همچنین عدم وجود اریتریتول در جنس نر، این جنس را کمتر مستعد به ابتلا به عفونت بروسلا می‌کند. همچنین ماده‌ها بیشتر در معرض نرها در حین جفت‌گیری هستند و مدت زمان بیشتری در مقایسه با نرها در گله برای اهداف تولید مثلی حضور دارند (۳۴، ۳۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان شیوع بروسلوز در گوسفندان با سنین یک سال به بالا در مقایسه با گوسفندان سنین یک سال به پایین بیشتر است و شانس ابتلا در سنین یک سال به بالا ۲ برابر است (۹۵ CI: ۰/۶-۶/۴)٪. در تطابق با مطالعه حاضر، Kamga و همکاران در مطالعه‌ای اقدام به شناسایی بروسلوز در حیوانات اهلی در کامرون کردند و نشان دادند که میزان بروسلوز در حیوانات مسن‌تر بیشتر از حیوانات جوان بود به طوری که در گاوهای زیر ۴ سال ۹ درصد، در گاوهای بین سنین ۴-۸ سال ۹/۷ درصد و در گاوهای بالای ۹ سال ۱۳/۸۴ درصد بود و همچنین در بزهای بالای یک سال ۱/۴ درصد و زیر یک سال صفر درصد گزارش کردند ولی در بین گوسفندان با سنین بالا افزایش شانس ابتلا بالاتر نبود (۲۵). در مطالعه‌ای میزان شیوع سرولوزی بروسلوز و فاکتورهای خطر در نشخوارکنندگان کوچک مود مطالعه قرار دادند و یکی از فاکتورهای خطر که مورد بررسی قرار گرفت سن بود که نشان داد که شانس ابتلا به بروسلوز در گوسفندان بالای ۸ ماه ۲ برابر بیشتر از گوسفندان

زیر ۸ ماه بود به طوری که ۸۱ درصد موارد ابتلا به بروسلوز سن بالای ۸ ماه داشتند (۴/۴۸-۱/۴۲ CI: ۹۵ %). همچنین در بزها نیز به همین ترتیب بود (۹۵ CI: ۰/۸۵-۷/۲۹) % که دلیل آن می‌تواند به خاطر این باشد که بروسلوز بیشتر حیواناتی را که از نظر تولید مثلی فعال هستند، مبتلا کند (۳۱). در مطالعه‌ای دیگر مانند مطالعه حاضر گوسفندان را از نظر سنی به دو دسته زیر یک سال و بالای یک سال طبقه‌بندی کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که ابتلا بالاتر سرولوزی بروسلوز در گوسفندان بالای یک سال (۶/۷ درصد) مشاهده شد و در صد کمتری (۲/۵۶ درصد) در گوسفندان زیر یک سال مشاهده شد. شانس ابتلا به بروسلوز در گوسفندان بالای یک سال ۲ برابر از گوسفندان زیر یک سال بود (۲۸) که در تطابق با مطالعه حاضر بود. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که حیواناتی که از نظر تولید مثلی به بلوغ رسیدند بیشتر نسبت به ابتلا به بروسلوز حساس‌ترند. حیوانات جوان به بروسلوز مقاوم‌ترند و مرتب خود را از آلودگی پاک می‌کنند و به عفونت مقاوم می‌شوند و از طرف دیگر هورمون‌های جنسی و اریتریتول که منجر به افزایش رشد و تکثیر بروسلا می‌شوند با افزایش سن و رسیدن به بلوغ غلظت آنها افزایش پیدا می‌کند (۲۸).

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان شیوع سرولوزی بروسلوز در منطقه تبریز بالا و به‌صورت اندمیک در این منطقه هست. عواملی مثل جنس و سن گوسفندان می‌تواند در میزان شیوع سرولوزی این بیماری نقش داشته باشد. از آن جایی که در ایران یکی از عوامل اصلی انتقال بروسلا به انسان و به خطر انداختن بهداشت عمومی، گوسفند است در نتیجه اقدامات کنترلی و پیشگیرانه این بیماری مثل شناسایی، واکسیناسیون و حذف در راستای مطالعات اپیدمیولوژیکی و اقدامات آگاهی بخشی و آموزشی به انسان‌ها و دامداران در این

References

- 1- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(2): 91-9.
- 2- Dadar M, Alamian S, Behrozikhah AM, Yazdani F, Kalantari A, Etemadi A, et al. editors. Molecular identification of Brucella species and biovars associated with animal and human infection in Iran. *Vet Res Forum.* 2019; 10(4): 315–21
- 3- Bagheri Nejad R, Krecek RC, Khalaf OH, Hailat N, Arenas-Gamboia AM. Brucellosis in the Middle East: Current situation and a pathway forward. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2020; 14(5): e0008071.
- 4- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J.* 2010; 51(4): 296-305.
- 5- Dadar M, Shahali Y, Fakhri Y. Brucellosis in Iranian livestock: A meta-epidemiological study. *Microb Pathog.* 2021; 155: 104921.
- 6- Redkar R, Rose S, Bricker B, DeVecchio V. Real-time detection of Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis. *Mol Cell Probes.* 2001; 15(1): 43-52.
- 7- Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol.* 2002; 90(1-4): 81-110.
- 8- Saxena N, Singh BB, Saxena HM. Brucellosis in sheep and goats and its serodiagnosis and epidemiology. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2018; 7(1): 1848-77.
- 9- Hashtarkhani S, Akbari M, Jarahi L, Etmnani K. Epidemiological characteristics and trend of incidence of human brucellosis in Razavi Khorasan province. *Med J Mashad Univ Med.* 2015; 58(9): 531-8.
- 10- Sharifi H, Mashayekhi K, Tavakoli MM. Risk facts of small ruminant brucellosis: a cross-sectional study in Southeast Iran 2012. *Hum Vet Med.* 2015; 7(1): 42-5.
- 11- Zhang N, Huang D, Wu W, Liu J, Liang F, Zhou B, et al. Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: a systematic review of experiences and lessons learned. *Prev Vet Med.* 2018; 160: 105-15.
- 12- Sharifi H, Tabatabaei S, Rashidi H, Kazeminia S, Sabbagh F, Khajooei P, et al. A cross-sectional study of the seroprevalence and flock-level factors associated with ovine and caprine brucellosis in southeastern Iran. *Iran J Vet Res.* 2014; 15(4): 370.
- 13- Behzadi Shahrabak MJ. A review on infectious agents of sheep and goats abortion in Iran. *NFVM.* 2019; 1(2): 102-13. [In Persian]
- 14- Garcia PB, Pelayo RR-C, Extremera BG, Martín AM, Huertas GG, Salguero AM, et al. Study of 1,595 brucellosis cases in the Almeria province (1972-1998) based on epidemiological data from disease reporting. *Rev Clin Esp.* 2002; 202(11): 577-82.
- 15- Godfroid J, Garin-Bastuji B, Saegerman C, Blasco J. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev sci tech Off int Epiz.* 2013; 32 (1): 27-42
- 16- Dmari B, Ahmadpour M, Hallajzadeh J, Hosseini S, Safiri S, Ghaderpoori M, et al. Designing an intersectional interventions model for brucellosis occurrence reduction in north-west of Iran. *J Occup Health.* 2015; 4(2): 76-83.
- 17- Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3(2): 213.
- 18- Cheslock MA, Embers ME. Human bartonellosis: an underappreciated public health problem? *Trop Med Infect Dis.* 2019; 4(2): 69.
- 19- Javadi A, Akrami Nojadedh G, Javadi M, Ahmad Khanli M. A serological survey of ovine and caprine brucellosis in slaughterhouses of East Azerbaijan province during 2004. *Vet Clin Pathol The Quarterly Scientific Journal.* 2007; 1(1): 15-9.
- 20- Semironi M, Bahrani M, Mehrabadi M, Ranjbar N, Absalanfard K, Makan M, et al. Seroprevalence of brucellosis in rural animals of Bushehr Province, Iran during 2012-2014. *Iran J Epidemiology.* 2018; 13(4).
- 21- Bokaie S, Sharifi L, Alizadeh H. A Seroepidemiologic Survey of Brucellosis in Human and Animals in Birjand, East of Iran. *Int J Infect Dis.* 2008; 12(1): e448.
- 22- Kakar N, Kakar A. Zoonotic brucellosis: Seroprevalence and different serological tests comparison in ovine and caprine population in district Quetta, Balochistan. *World J Pharm Pharm Sci.* 2020; 2(3): 044-50.
- 23- Addis SA, Desalegn AY. Comparative seroepidemiological study of brucellosis in sheep under smallholder farming and governmental breeding ranches of Central and North East Ethiopia. *J Vet Med Sci.* 2018; 2018.

24- Ebid M, El Mola A, Salib F. Seroprevalence of brucellosis in sheep and goats in the Arabian Gulf region. *Vet World*. 2020; 13(8): 1495.

25- Kamga RM, Silatsa BA, Farikou O, Kuate JR, Simo G. Detection of Brucella antibodies in domestic animals of southern Cameroon: Implications for the control of brucellosis. *Vet Med Sci*. 2020; 6(3): 410-20.

26- Kabagambe E, Elzer P, Geaghan J, Opuda-Asibo J, Scholl D, Miller J. Risk factors for Brucella seropositivity in goat herds in eastern and western Uganda. *Prev Vet Med*. 2001; 52(2): 91-108.

27- Jackson R, Ward D, Kennard R, Amirbekov M, Stack J, Amanfu W, et al. Survey of the seroprevalence of brucellosis in ruminants in Tajikistan. *Vet record*. 2007; 161(14): 476-82.

28- Sorsa M, Mamo G, Waktole H, Abunna F, Zewude A, Ameni G. Seroprevalence and Associated Risk Factors of Ovine Brucellosis in South Omo Zone, Southern Ethiopia. *Infect Drug Resist*. 2022; 15: 387.

29- Shome R, Kalleshmurthy T, Rathore Y, Ramanjinappa KD, Skariah S, Nagaraj C, et al. Spatial sero-prevalence of brucellosis in small ruminants of India: Nationwide cross-sectional study for the year 2017–2018. *Transbound Emerg Dis*. 2021; 68(4): 2199-208.

30- Tulu D, Gojam A, Deresa B. Serological investigation of brucellosis and its association with

abortion in sheep and goats in selected districts of Jimma zone, southwestern Ethiop. *Ethiop Vet J*. 2020; 24(1).

31- Natesan K, Kalleshmurthy T, Nookala M, Yadav C, Mohandoss N, Skariah S, et al. Seroprevalence and risk factors for brucellosis in small ruminant flocks in Karnataka in the Southern Province of India. *Vet World*. 2021; 14(11): 2855.

32- Al-Mariri A, Ramadan L, Akel R. Assessment of milk ring test and some serological tests in the detection of Brucella melitensis in Syrian female sheep. *Trop Anim Health Prod*. 2011; 43(4): 865-70.

33- Al-Hamada A. An epidemiological study of the impact of Toxoplasma gondii and Brucella melitensis on reproduction in sheep and goats in Dohuk Province, Iraq: Murdoch University; 2021.

34- Dinka H, Chala R. Seroprevalence study of bovine brucellosis in pastoral and agro-pastoral areas of East Showa Zone, Oromia Regional State, Ethiopia. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*. 2009; 6(5): 508-12.

35- Wali A. Seroprevalence of brucellosis in various districts of Khyber Pakhtunkhwa,(KP) M. Phil Thesis, Department of Biological Sciences Quaid-e-Azam University Islamabad. 2005: 22-54.

36- Olufemi OT, Dantala DB, Shinggu PA, Dike UA, Otolorin GR, Nwuku JA, et al. Seroprevalence of brucellosis and associated risk factors among indigenous breeds of goats in Wukari, Taraba State, Nigeria. *J Pathog*. 2018.

Seroprevalence of brucellosis in sheep in Tabriz, Iran

Abolfazl Hajibemani Shouraki

Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Receive: August 12, 2022; Revise: August 21, 2022; Accept: August 23, 2022

Summary

Brucellosis or Malta fever is a public health concern and an economically important disease with a world-wide distribution. After rabies, it is important zoonotic disease. The disease is endemic in some geographical areas, including Iran and it is one of the important problems in livestock and humans. The control of disease is highly dependent on the seroprevalence of this disease in livestock. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the seroprevalence of brucellosis in sheep in Tabriz to better control this disease in this region. A total of 200 serum samples were obtained from sheep and brucellosis were detected using the Rose Bengal test. The overall prevalence of brucellosis was 18.5% in sheep. The prevalence of brucellosis was 2% in male and 16.5% in female. The odds of brucellosis exposure in > 1 Year sheep (adult) were about 2 times higher than that of <1 Year sheep. The results of the present study showed that the prevalence of ovine brucellosis in the Tabriz Zone was relatively high. Age groups and sex were associated risk factors with the seroprevalence of this disease. Thus, a control and prevention programs of this disease are very important in this region.

Key words: *brucellosis, Tabriz, seroprevalence, sheep*

جداسازی و شناسایی پاستورلا مولتوسیدا از طیور بومی استان گلستان، ایران

پرستو پورغفور لنگرودی*^۱، مجید ولدان^۱، بهارک محمدیان^۱

۱- عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۷ مرداد ۱۴۰۱، بازنگری: ۰۵ شهریور ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۰۵ شهریور ۱۴۰۱

چکیده

بیماری پاستورلوز طیور، بیماری باکتریایی مسری و حاد پرندگان اهلی و وحشی است که موجب تلفات و خسارت‌های اقتصادی قابل توجه می‌شود. این مطالعه مقطعی به منظور جداسازی و شناسایی پاستورلا مولتوسیدا از پرندگان بومی انجام شد. بدین منظور در فاصله زمانی دو ساله، تعداد ۳۵۰ نمونه سواب حلقی از طیور بومی مشکوک به بیماری پاستورلوز در استان گلستان جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در محیط انتقالی پاستورلا قرار گرفته و به منظور انجام آزمایشات باکتریولوژی به مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی منتقل شدند. از ۳۵۰ نمونه بررسی شده فقط ۲ نمونه بر اساس کشت‌های باکتریایی، خصوصیات مورفولوژی و آزمایش‌های بیوشیمیایی، پاستورلا مولتوسیدا تشخیص داده شد. در مرحله بعد برای تعیین ژن اختصاصی *kmt1*، جدایه‌ها تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) قرار گرفتند. بر اساس نتایج PCR هیچ کدام از جدایه‌ها به‌عنوان پاستورلا مولتوسیدا تأیید نشدند. از آنجایی که طیور بومی مخازن باکتری‌های مهم از نظر اقتصادی و بهداشت عمومی هستند، اجرای برنامه‌های مراقبت و امنیت زیستی به منظور کنترل بیماری مفید می‌باشد.

واژگان کلیدی: ویای مرغان، جداسازی، شناسایی، پاستورلا مولتوسیدا، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

مقدمه

بیماری پاستورلوز یا وبای مرغان، بیماری عفونی حاد و کشنده‌ای است که بیش از ۱۰۰ گونه از پرندگان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به دلیل ایجاد تلفات و کاهش تولید باعث خسارت‌های فراوان در زمینه تولید ماکیان خانگی و تجاری در سراسر جهان می‌شود (۱). عامل این بیماری، پاستورلا مولتوسیدا، یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی، غیر متحرک، غیر همولتیک بدون اسپور می‌باشد. این باکتری بر اساس آنتی‌ژن‌های لیپو پلی ساکراید به ۱۶ سرگروپ پیکری (۱۶-۱) و بر اساس آنتی‌ژن‌های کپسولی به ۵ تیپ کپسولی A, B, D, E, F) طبقه‌بندی می‌شود و هر کدام میزبان اختصاصی خود را دارد (۲، ۳). سویه‌های تیپ کپسولی A شامل A1, A3, A4 از معمول‌ترین عوامل ایجاد بیماری پاستورلوز طیور در بیشتر کشورها از جمله ایران می‌باشند، هر چند تمامی ۱۶ سروتیپ پیکری پاستورلا مولتوسیدا و حتی برخی سویه‌های مربوط به تیپ کپسولی D و F نیز به‌عنوان عامل بیماری گزارش شده‌اند (۴).

پاستورلا مولتوسیدا عامل بیماری‌های مختلف از جمله وبای پرندگان اهلی و وحشی، سپتی‌سمی هموراژیک سم داران، تب حمل و نقل و پنومونی در گوسفند و بز، رینیت آتروفیک خوک و خرناس خرگوش‌ها می‌باشد (۴، ۵). بعلاوه این باکتری موجب استئومیلیت و سپتی‌سمی انسان در اثر گازگرفتگی به‌وسیله سگ و گربه می‌شود (۶، ۷). پرندگان در همه سنین به آلودگی با پاستورلا مولتوسیدا حساس هستند. بیماری به‌صورت فوق حاد/حاد و تحت حاد/ مزمن اتفاق می‌افتد. بوقلمون، قرقاول و کبک به فرم تحت حاد و حاد خیلی حساس هستند. ابتلا و تلفات پرندگان به‌خصوص جوجه‌ها و اردک‌ها زیاد است (۷، ۸).

تشخیص بیماری بر جداسازی ارگانیزم از

پرندگان دارای علائم و ضایعات ناشی از بیماری استوار است. روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری سخت و زمان‌بر است (۴) در حالی که استفاده از تکنیک‌های مولکولی، به‌ویژه PCR برای تشخیص مولکولی و شناسایی آنتی‌ژن‌های کپسولی پاستورلا جهت تشخیص و شناسایی سریع و اختصاصی ارگانیزم بسیار مهم است (۳).

به منظور پیشگیری از بیماری، واکسیناسیون انجام می‌شود. با توجه به وجود برخی مشکلات در استفاده از واکسن زنده، برای پیشگیری از پاستورلوز طیور از باکترین استفاده می‌شود. واکسن معمولاً به شکل چندگانه و مرکب از سروتیپ‌های سوماتیک ۱، ۳، ۴ تولید و استفاده می‌شود (۹). در ایران نیز مانند سایر کشورهایی که این بیماری در آنها وجود دارد، واکسیناسیون مهم‌ترین روش پیشگیری محسوب می‌شود. واکسیناسیون در مقابل هر سروتیپ باعث ایجاد محافظت در برابر سایر سروتیپ‌ها نمی‌گردد به همین دلیل برای ایجاد محافظت کامل در برابر سویه‌های عامل بیماری در عموم کشورها در تهیه واکسن پاستورلوز طیور، از تمام سروتیپ‌های موجود در منطقه استفاده می‌گردد (۹).

وجود تنوع در سروتیپ‌های عامل بیماری پاستورلوز طیور از یک سو و عدم ایجاد مقاومت کامل محافظت کننده به وسیله واکسن مونووالان در برابر تیپ‌های دیگر، انجام تحقیقات مرتبط با شناسایی عوامل ایمنی‌زای مشترک بین تیپ‌های مختلف را الزامی ساخته است. بر این اساس مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی عامل پاستورلوز از طریق نمونه‌گیری از طیور بومی و انجام آزمون‌های میکروبی‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی به‌منظور دستیابی به سوش (های) لازم برای انجام بررسی‌های مرتبط با تهیه واکسن پلی‌والان پاستورلوز طیور انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی انجام شد. متعاقب بروز پاستورلوز طیور در مناطق مختلف استان گلستان به مناطق گزارش شده مراجعه و از طیور مشکوک به بیماری نمونه سوآب حلقی اخذ و پس از قراردادن نمونه‌ها در Modified Stuart Transport Medium، در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. در مجموع ۳۵۰ نمونه از طیور بومی (۱۰ گونه/جنس) اخذ و آزمایش‌های لازم بر روی آنها انجام شد.

کشت و جداسازی: نمونه‌های سوآب دریافتی برای انجام آزمایشات میکروبی، در شرایط استریل در آگار خونی کشت و سپس با توجه به تنوع باکتری‌های رشد یافته روی محیط، اندازه، رنگ و شکل کلنی‌های پاستورلا، کشت مجدد روی آگار خونی و خالص‌سازی انجام شد. پس از رشد در محیط مذکور و بررسی‌های ظاهرشناسی، رنگ‌آمیزی گرم بر روی گسترش‌ها انجام شد. در

صورت گرم منفی بودن، رشد در محیط مایع آبگوشت قلب و مغز بررسی شد.

در مواردی که کشت در محیط مایع نیز موفقیت‌آمیز بود، آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز انجام شد. در صورت تطبیق نتایج آزمایشات انجام شده با استاندارد پاستورلا، آزمون‌های حساسیت به پنی‌سیلین و سپس اندل انجام و در صورت مثبت بودن نتیجه آزمایش اندل، برای تأیید پاستورلا مولتوسیدا، PCR انجام شد. به‌منظور استخراج DNA مربوط به جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا از کشت ۲۴ ساعته در محیط آگار خونی و از روش Boiling استفاده و آزمایشات براساس روش کار مطالعه حق نظری و همکاران (۱۳۹۵) انجام شد (۱۰). پرایمر و مواد به کار رفته در این آزمایش، توسط شرکت سیناژن سنتر گردید (۴). جدول شماره ۱ مشخصات پرایمر مورد استفاده، توالی و سایز آن را نشان می‌دهد.

جدول ۱- مشخصات پرایمر استفاده شده برای تشخیص پاستورلا مولتوسیدا

Primer name	Description	Primer sequence(5'-3')	Amplicon (size bp)
(KMT1)	Identification all <i>Pasteurella multocida</i>	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460

تعداد ۲ نمونه از جدایه‌های حاصل از کشت، جداسازی و آزمایشات بیوشیمیایی تحت آزمایش PCR قرار گرفت. هیچ یک از جدایه‌ها به‌عنوان پاستورلا مولتوسیدا تأیید نشد.

نتایج

آنالیز داده‌ها: داده‌های حاصل از آزمایشات انجام شده در نرم‌افزار اکسل ثبت و با نرم‌افزار SPSS ver21 و استفاده از آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شد.

نتایج آزمایش PCR: برای تشخیص پاستورلا مولتوسیدا از پرایمر PM (KMT1) استفاده شد.

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی خصوصیات کشت و مورفولوژی نمونه‌ها به تفکیک گونه

گونه	تعداد نمونه	رشد در بلاد آگار		همولیز		نتیجه رنگ آمیزی گرم		رشد در محیط مایع	
		مثبت	منفی	مثبت	منفی	گرم مثبت	گرم منفی	مثبت	منفی
مرغ و خروس محلی	۲۱۴	۲۶	۱۸۹	-	۲۱۴	۲۶	۱۸۹	۲۶	۱۸۹
مرغ و خروس لاری	۱۱	۳	۸	-	۱۱	۳	۸	۳	۸
بوقلمون	۱۴	۱	۱۳	-	۱۴	۱	۱۳	۱	۱۳
اردک	۷۱	۱۸	۵۳	-	۷۱	۱۸	۵۳	۱۸	۵۳
غاز	۱۷	۱	۱۷	-	۱۷	۱	۱۷	۱	۱۷
کبک	۱	-	۱	-	۱	-	۱	-	۱
مرغ شاخدار	۱۲	۴	۸	-	۱۲	۴	۸	۴	۸
قرقاول	۶	-	۶	-	۶	-	۶	-	۶
بلدرچین	۲	۱	۱	-	۲	۱	۱	۱	۱
طاووس	۲	-	۲	-	۲	-	۲	-	۲
جمع	۳۵۰	۵۴	۲۹۶	-	۳۵۰	۵۴	۲۹۶	۵۴	۲۹۶

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نمونه‌ها برحسب گونه

گونه	تعداد نمونه	اکسیداز		کاتالاز		حساسیت به پنی سیلین		اندل	
		مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
مرغ و خروس محلی	۲۱۴	۲۶	۱۸۹	۲۶	۱۸۹	۲۶	۱۸۹	-	۲۱۴
مرغ و خروس لاری	۱۱	۳	۸	۳	۸	۳	۸	-	۱۱
بوقلمون	۱۴	۱	۱۳	۱	۱۳	۱	۱۳	-	۱۴
اردک	۷۱	۱۸	۵۳	۱۸	۵۳	۱۸	۵۳	۲	۶۹
غاز	۱۷	۱	۱۷	۱	۱۷	۱	۱۷	-	۱۷
کبک	۱	-	۱	-	۱	-	۱	-	۱
مرغ شاخدار	۱۲	۴	۸	۴	۸	۴	۸	-	۱۲
قرقاول	۶	-	۶	-	۶	-	۶	-	۶
بلدرچین	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-	۲
طاووس	۲	-	۲	-	۲	-	۲	-	۲
جمع	۳۵۰	۵۴	۲۹۶	۵۴	۲۹۶	۵۴	۲۹۶	۲	۳۴۸

جدول ۴- تعداد نمونه‌ها و جدایه‌ها به تفکیک فصل

تعداد	بهار	تابستان	پاییز	زمستان	جمع
نمونه	۷۸	۳۲	۱۶۳	۷۷	۳۵۰
جدایه	-	-	۱	۱	۲
درصد	-	-	۰/۶۱	۱/۳۰	۰/۵۷

بحث و نتیجه گیری

بیماری پاستورلوز در اکثر کشورهای جهان وجود دارد و شیوع آن در حال افزایش است. این بیماری با ابتلا و مرگ و میر بالا، کاهش مصرف غذا و کاهش رشد شناسایی می شود. بر اساس مطالعات انجام شده بروز بیماری مذکور ۷۰-۳۰ درصد و مرگ و میر در اثر این بیماری ۸۰-۳۰ درصد می باشد (۶). بر اساس مطالعات مختلف در ایران، پاستورلوزیس طیور در مناطق شمالی کشور اندمیک است و طغیان های این بیماری از مناطق مختلف کشور به خصوص در مناطق اندمیک گزارش شده است (۱۱).

در این مطالعه ۳۵۰ نمونه سواب حلقی از طیور بومی مشکوک به بیماری پاستورلوز در استان گلستان با استفاده از روش های باکتریولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بررسی شد. از مجموع ۳۵۰ کشت اولیه در ۵۴ مورد (۱۵/۴۳ درصد) خالص سازی کلنی های پاستورلا ممکن شد. دلیل این مهم، صرفاً وجود عوامل میکروبی متعدد در کشت اولیه و اندک بودن توان پاستورلا در رقابت با سایر باکتری ها در رشد روی محیط کشت می باشد. علیرغم عدم رشد باکتری در محیط مک کانکی، تمام ۵۴ جدایه، در محیط مایع رشد کردند. نتایج آزمون های کاتالاز و اکسیداز در ۵۴ نمونه رشد کرده در محیط مایع مثبت بود و بررسی نمونه ها از نظر حساسیت به پنی سیلین نشان دهنده حساسیت همه نمونه ها بود. به دلیل اختصاصی بودن آزمایش اندل در تشخیص پاستورلا، آزمایش مذکور انجام و بر اساس نتایج دو نمونه (مربوط به اردک) اندل مثبت بود. علاوه بر آزمایشات مذکور، برای تشخیص پاستورلا مولتوسیدا از روش مولکولی با پرایمرهای اختصاصی ژن kmt1 این ارگانیسم استفاده شد و بر اساس نتایج هیچ کدام از جدایه ها به عنوان پاستورلا مولتوسیدا تأیید نشدند.

بر اساس تحقیقات متعدد جداسازی و شناسایی پاستورلا از پرندگان وحشی و طیور غیر صنعتی انجام شده و قرابت آنها با سویه های عامل بیماری وبا در طیور صنعتی و همچنین امکان ناقل بودن آنها، بررسی شده که به تعدادی از آنها اشاره می شود.

در مطالعه قدیمی پور و همکاران (۱۳۹۶)، از بررسی ۷۰۱ نمونه سواب نایی، با استفاده از روش های مبتنی بر کشت، ۱۲ (۱/۷ درصد) جدایه مظنون به پاستورلا مولتوسیدا از نمونه ها جداسازی گردید که با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی ژن kmt1 تعداد ۷ (۰/۹ درصد) جدایه ها تأیید مولکولی شدند. بر اساس آزمایش های تعیین بیوتیپ، تمامی جدایه ها متعلق به پاستورلا مولتوسیدا تحت گونه مولتوسیدا بودند (۱۱).

جباری و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از روش چندگانه تعیین تیپ کپسولی، ۳۹ جدایه پاستورلا مولتوسیدای طیور متعلق به تیپ کپسولی A را شناسایی و این گروه را عامل اکثر موارد وبای مرغی در ایران گزارش کردند (۱۲).

فریدونی و همکاران در سال ۲۰۰۶ عامل وبای مرغی را در پرندگان آبزی وحشی در شمال ایران (میانکاله) با کمک کشت های باکتریایی شناسایی کرده و باکتری جدا شده را پاستورلا مولتوسیدا تحت گونه مولتوسیدا تعیین هویت کردند (۱۳).

در برخی تحقیقات، مجموعه روش های میکروبی شناسی، ظاهرشناسی و آزمون های بیوشیمیایی را برای جداسازی و شناسایی پاستورلا، تشخیص گونه ها و حتی تیپ های کپسولی و آنتی ژن های پیکری آن کافی دانسته اند. از آن جمله می توان به پژوهش های جباری و همکاران (۱۴)، Rutkowska و همکاران (۱۵)، Kuczkowski و همکاران (۱۶)، Yakubu و همکاران (۱۷) اشاره نمود.

در بررسی Woo و همکاران (۲۰۰۶)، درصد

ایمنی متقاطع بین سروتیپ‌های مختلف پاستورلا در هاله‌ای از ابهام قرار دارد، بررسی مداوم سویه‌های عامل بیماری در منطقه و تولید واکسن پلی‌والان پاستورلوز طیور برای ایجاد محافظت کامل بر علیه بیماری، مطالعات گسترده روی جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدای بومی مناطق مختلف ایران و ارزیابی میزان بیماری‌زایی این جدایه‌ها در انواع جمعیت‌های طیور و تعیین تأثیر اقتصادی عفونت‌های ناشی از پاستورلا از جمله مواردی است که باید به آن توجه شود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی با کد ۹۶۰۴۸۷-۳۳-۱۸-۱۸-۲ می‌باشد. آزمایشات این کار تحقیقاتی در آزمایشگاه رفرنس پاستورلا در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شد که از همکاران محترم در این آزمایشگاه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

- 1- Li Z, Cheng F, Lan S, Guo J, Liu W, Li X, et al. Investigation of genetic diversity and epidemiological characteristics of *Pasteurella multocida* isolates from poultry in southwest China by population structure, multi-locus sequence typing and virulence-associated gene profile analysis. *J.Vet.Med.Sci.* 2018; 80(6): 921-929.
- 2- Jeong J, Kang MS, Jeong OM, Lee HJ, Lee JY, Kwon YK, et al. Investigation of genetic diversity of *Pasteurella multocida* isolated from diseased poultry in Korea. *BRAZ. J POULTRY SCI.* 2021; 23(2): 1-10.
- 3- Laban S, MR K, Moawad A, Rabie N, Sobhy N. Phenotypic, genotypic, multidrug resistance genes and disinfectant biocidal effect of *pasteurella multocida* isolated from chickens. *As-siut Vet.Med.J.* 2019; 21; 65(163): 10-18.
- 4- Ghadimipour R, Ghorbanpoor M, Gharibi D, Mayahi M, Jabbari A.R. Effects of Selected Adjuvants on Immunogenicity and Protectivity of *Pasteurella multocida* Bacterin Vaccine in Chick-

موفقیست بررسی‌های ظاهرشناسی و آزمایشات بیوشیمیائی استاندارد در تشخیص پاستورلا مولتوسیدا را ۹۹/۷ اعلام نمودند (۱۸) در حالی که در مطالعه حاضر هیچ کدام از جدایه‌های حاصل از آزمایشات میکروبیولوژی و بیوشیمیایی از نظر مولکولی تأیید نشدند.

پاستورلا مولتوسیدا به لحاظ تنوع بیماری‌هایی که ایجاد می‌کند، در دامپزشکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. تأیید این بیماری با روش‌های آزمایشگاهی به دلیل علائم بالینی متعدد این بیماری و زمان‌بر بودن این روش‌ها، مشکل می‌باشد علاوه بر این، به دست آوردن کشت خالص پاستورلا مولتوسیدا از جدایه‌های بالینی به دلیل آلاینده‌ها و یا مرگ ارگانسیم‌ها دشوار است در حالی که PCR به دلیل بالا بودن سرعت و اختصاصی بودن و همچنین عدم نیاز به کشت و حیوانات آزمایشگاهی روشی حساس‌تر و دقیق‌تر نسبت به روش‌های مرسوم می‌باشد (۱۷). با توجه به این که ایجاد

ens.Arch.Razi.Inst. 2021; 76(4): 741-749. [In Persian]

5- Haghazari S, Jabbari A.R, Tadayon K. Prevalence of adhesion virulence factor genes, antibiogram, and pathogenicity of avian *Pasteurella multocida* isolate from Iran.Arch.Razi.Inst. 2017; 72(2): 83-91. [In Persian]

6- Xiao J, Li Y, Hu Z, Zhang Y, Chang YF, Zhou Q, et al. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from ducks in China from 2017 to 2019. *Microbial pathogenesis.* 2021; 160: 105-196.

7- Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS. Microbiol.Lett.*2006; 265(1):1-10.

8- El-Ghany WAA, Ahmed HA, Qandoos AZ. Characterization of *Pasteurella multocida* in different Egyptian chicken flocks. *JAPS: J Anim Plant Sci.* 2018; 28(6): 1693-1700.

9- Jabbari A.R, Moazini Jula, Gh.R. Fowl cholera: Evaluation of a Trivalent *Pasteurella multocida* vaccine consisted of Serotypes 1, 3 and 4.

Arch Razi Inst. 2005; 59: 103-111.

10- Haghazari S, Jabbari A.R, Tadayon K. Molecular Study of Virulence Factors of *Pasteurella multocida* isolates from Poultry in Iran. *J Vet. Microbiol.* 2016; 12(1): 101-112. [In Persian]

11- Ghadimipour R, Ghorbanpoor M, Gharibi D, Mayahi M, Jabbari A.R. Pheno- and genotypic characteristics of *Pasteurella multocida* avian isolates in selected provinces of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences.* 2017; 11(1): 3-13. [In Persian]

12- Jabbari A.R, Esmaelzadeh M, Moazeni Jula Gh.R. Polymerase chain reaction typing of *Pasteurella multocida* capsules isolated in Iran. *Iran J Vet Res.* 2006; 7(3): 50-55.

13- Fereidouni S, Modir-rousta H, Azin F. The first report of avian cholera in Miankaleh wetland, southeast Caspian Sea. *Podoces J.* 2006; 1(1, 2): 71-75. [In Persian]

14- Jabbari A.R, Esmaily F, Vasfi Marandi M, Pourbakhsh S.A, Saharee A. Study on Biotyping and Serotyping Of *Pasteurella Multocida* Iso-

lated From Poultry in Iran. *Pajouhesh-Va-Sazandegi, in Animal and Fisheries Sciences.* 2001; 14(3): 64-67. [In Persian]

15- Rutkowska I.J, Borkowska BO. Biochemical properties of *Pasteurella multocida* strains isolated from poultry. *Bull.Vet. Inst. Pulawy.* 2000; 44: 161-167.

16- Kuczkowski M, Krol J, Wieliczko A, Gawel A, Schmidt J, Mazurkiewicz M. Prevalence of fowl cholera in poultry and characteristics of isolated *Pasteurella sp.* strains. *Med. Weter.* 2006; 62(5): 574-578.

17- Yakubu D, Moshood R, Paul A, Blessing O, Philip O, Peterside K, et al. Clinicopathological Manifestations of *Pasteurella Multocida* (Serotypes A: 1, 3 And 4) Infections in Commercial Chickens in Jos, Nigeria. *J. World's Poult. Res.* 2015; 5(4): 98-103.

18- Woo YK, and Kim JH. Fowl cholera outbreak in domestic poultry and epidemiological properties of *Pasteurella multocida* isolate. *J.Microbiol.* 2006; 44(3): 344-353.

Isolation and Identification of *Pasteurella multocida* from backyard poultry in Golestan Province, Iran

Parastoo poorghafour langeroodi¹, Majid Valadan¹, Baharak Mohamadiyan¹

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

Receive: August 8, 2022; Revise: August 27, 2022; Accept: August 27, 2022

Summary

Avian pasteurellosis, a highly contagious and severe bacterial disease of wild and domestic birds, causing mortality and important devastating economic losses. This cross sectional study was performed to isolate and identify *Pasteurella multocida* in backyard poultry. For the purpose of the study, a total of 350 pharyngeal swab specimens collected from backyard birds suspected of illness during two years in Golestan Province, Iran. Samples were packaged in modified Stuart's transport medium, and transferred to the Razi vaccine and Serum Research Institute for bacteriological examination. Out of 350 samples, two isolates were identified as *P. multocida* on the basis of bacterial cultures, morphological and biochemical characteristics. The isolates were subjected to polymerase chain reaction (PCR) for the detection of KMT1 species specific gene fragment. According to the results of PCR assay none isolates have been confirmed as *P. multocida*. Since Backyard birds may serve as source of public health and economically important bacteria, implementation of a pasteurellosis surveillance program and biosecurity measures will be helpful to develop disease control measures in the future.

Key words: *Fowl cholera, Isolation, Identification, Pasteurella multocida, PCR*

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ۴ گیاه دارویی بر ۱۰ باکتری استاندارد

بهمن فاضلی نسب^{۱*}، سعیده سعیدی^۲، فرزانه فاضلی^۳، فاطمه بیدرنامنی^۱، زهرا بیگمی^۴

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

۲- پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ایران.

۴- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

دریافت مقاله: ۱۷ شهریور ۱۴۰۱، بازنگری: ۱۸ مهر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۰ مهر ۱۴۰۱

چکیده

یکی از مشکلات کنونی درمان عفونت‌های باکتریایی، افزایش مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باعث مرگ و میر قابل توجهی در مقایسه با باکتری غیر مقاوم می‌شوند. بنابراین استفاده از گیاهان دارویی زیتون، لوفا و مریم‌گلی، به دلیل خاصیت ضد التهابی و ضد میکروبی آنها بر علیه ۱۰ پاتوزن انسانی مورد هدف تحقیق حاضر بود. بدین منظور آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. صفاتی مانند، فنل، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Statistix10 و تهیه نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. بیشترین میزان فلاونوئید (۳۹۸/۰۲ میکروگرم در گرم ماده خشک) در میوه زیتون و کمترین میزان (۲۵۵/۷۸ میکروگرم در گرم ماده خشک) در برگ مریم‌گلی به دست آمده است. عصاره متانولی برگ زیتون با میانگین ۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد هافنیا الوی داشته است. عصاره متانولی برگ مریم‌گلی با میانگین ۱۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشته است. عصاره متانولی بذر لوفا با میانگین ۱۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا داشته است. عصاره متانولی میوه زیتون با میانگین ۱۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد باسیلوس سرئوس داشته است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گیاهان لوفا، زیتون و مریم‌گلی و حتی بافت‌های مختلف آنها در درمان بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا مانند هافنیا الوی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و رشد باسیلوس سرئوس مؤثر بوده‌اند. همچنین، توصیه می‌شود با استخراج مواد مؤثر عصاره این گیاه و سایر گیاهان، تحقیقات بیشتری روی انواع ترکیبات عصاره این گیاهان صورت گیرد.

واژگان کلیدی: لوفا، هافنیا الوی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سرئوس

مقدمه

یکی از مشکلات کنونی درمان عفونت‌های باکتریایی افزایش مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باعث مرگ و میر قابل توجهی در مقایسه با باکتری غیر مقاوم می‌شوند (۲۰). اوایل قرن بیستم پیشرفت علم شیمی و کشف سیستم‌های پیچیده سنتز آلی منجر به توسعه صنعت داروسازی و جای‌گزینی داروهای صنعتی به جای داروهای گیاهی شد. اما همزمان با پیشرفت در تولید داروهای شیمیایی جدید و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، به تدریج اثرات مضر این داروها ظاهر شدند و از دهه ۱۹۵۰ باکتری‌های بیماری‌زای متعددی به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند که این مقاومت همچنان در حال گسترش است (۴).

از بین باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک که ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌کنند می‌توان به گونه‌های انتروباکتریاسه، سودوموناس، اسینتوباکتر و از بین باکتری‌های گرم مثبت می‌توان به گونه‌های استافیلوکوک، استرپتوکوک و انتروکوک اشاره کرد (۲۳). افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، تلاش در پی جایگزین کردن درمان‌های جدید در سراسر جهان در حال انجام است. این مورد از جمله موارد امیدبخش استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد که با بدن انسان سازگاری بالایی دارند (۱۶).

در سال‌های اخیر از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان عوامل ضد میکروبی استفاده می‌شود. یکی از این عصاره‌ها عصاره برگ زیتون بود که به دلیل وجود ترکیبات فنلی خاصیت ضد میکروبی دارد. یوروپین مهم‌ترین ترکیب فنلی در برگ زیتون است (۲۲). این ترکیب و سایر ترکیبات فنلی موجود در عصاره برگ زیتون مانند پاراتیکسوسکسیکروئیک،

فرولیکاسید، قهوه، وانیل کاسید، پروکاتوکوکال، سینرژیک کشید، پاراکومینیلین، اکتروتین، اکتروتین می‌باشد (۸). پلی‌فنول‌های برگ زیتون به دلیل چندین اثر مفید بر سلامت به دلیل فعالیت‌های ضد فشار خون، ضد دیابت، ضد سرطان، ضد آترواسکلروتیک، ضد التهابی و ضد میکروبی که دارند موضوع تحقیقات شدیدی هستند (۱۲، ۱۵).

لوفبا با نام علمی *Luffa cylindrica linn* متعلق به خانواده Cucurbitaceae معروف به "راجا کوشاتاکا" یک گیاه سنتی مهم با خواص دارویی بیشتر است (۱۳). لوفبا حدود هفت گونه دارد که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری در سراسر هند و حتی در زمین‌های بایر به‌ویژه در امتداد منطقه ساحلی یافت می‌شود (۷). گیاهان متعلق به این خانواده به تولید تعداد زیادی از اجزای مهم بیولوژیکی معروف هستند. به‌طور سنتی از این گیاه برای درمان طحال، جذام، هموروئید، تومور، برونشیت و سیفلیس استفاده می‌شود (۱).

تعداد فراوانی از گیاهان تیره نعناع دارای ویژگی‌های درمانی بوده و برخی نیز حاوی اسانس‌های مهمی هستند که در صنایع داروسازی، عطرسازی و فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی و نیز به‌عنوان طعم‌دهنده و چاشنی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مریم‌گلی (*Salvia*)، گونه گیاهی علفی، یکساله و چندساله دارد (۱۷). *Salvia officinalis L* همچنین به‌عنوان "گیاه نجات" شناخته می‌شود، از دیرباز در طب سنتی در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته و به خوبی مستند شده است. ترکیبات زیست‌فعال آن، و به ویژه مشخصات پلی‌فنول آن به‌طور گسترده مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است. با این حال، اثرات مفید مریم‌گلی بسیار فراتر می‌رود و امروزه با طیف وسیعی از تکنیک‌های استخراج جدید، در حال کشف اجزای جدید با اثرات درمانی جدید، به‌ویژه در

زمینه بیماری‌های عصبی و سرطان‌های مختلف هستند (۱۰). *S. officinalis*. به شکل یک بوته‌ی زیرخاکی چند ساله تا ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر رشد می‌کند. برگ‌ها متقابل و ساده با کرک‌های سفید در سطح پایین برگ و سبز یا خاکستری مایل به سبز در سطح بالایی هستند. ساقه‌ها به صورت ایستاده یا برآمده با شاخه‌های پرمویی سبز تیره هستند. برگ‌ها دراز و دم‌برگ با حاشیه دندان‌دار، سطحی زبر و گاهی با لوب‌های قاعده‌ای هستند. طول گل‌ها از ساقه ۲ تا ۴ میلی‌متر است و به صورت شبه قلیان با ۵ تا ۱۰ گل بنفش مایل به آبی هستند که خوشه‌های جعلی و مرکب را تشکیل می‌دهند. بسته به زیستگاه و شرایط آب و هوایی از مارس تا ژوئیه شکوفا می‌شوند (۱۰).

در سیستم‌های غذایی غلظت‌های بالاتری از اسانس‌ها برای داشتن اثرات ضد میکروبی مشابهی که در شرایط آزمایشگاهی به دست می‌آیند مورد نیاز است. استفاده از اسانس‌ها و اجزای جدا شده آنها رویکردهای جدیدی برای افزایش کارایی آنها با بهره‌گیری از اثرات هم‌افزایی و افزایشی آنهاست. احتمالاً مشخصات بیولوژیکی آنها نتیجه هم‌افزایی تمام مولکول‌های موجود در روغن است (۲). استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهی یکی از امیدوارکننده‌ترین پیشرفت‌ها در برابر میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو است (۲). از طرفی، پذیرش طب سنتی به‌عنوان یک درمان جایگزین برای عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۲۱). بنابراین، استفاده از گیاهان دارویی زیتون، لوف و مریم‌گلی، به دلیل خاصیت ضد التهابی و ضد میکروبی آنها بر علیه ۱۰ پاتوزن انسانی مورد هدف تحقیق حاضر بود.

مواد و روش کار

برگ‌های گیاه زیتون، مریم‌گلی کارواندري، بذر لوف و میوه زیتون از مزرعه دشت‌های استان

سیستان و بلوچستان - شهرستان زابل جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها در شرایط سایه و دمای معمولی اتاق خشک شده و آسیاب شدند. جهت عصاره‌گیری به روش ماسراسیون سرد، ۲۰ گرم از برگ گیاه پودر شده به‌طور جداگانه در حلال متانول خیسانده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر نگهداری شدند. بعد از یک روز، مواد از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شدند. سپس حلال‌ها توسط دستگاه روتاری خلاء از مواد فیلتر شده خارج شدند. عصاره غلیظ شده تا حاصل شدن عصاره خالص و زدوده شدن کامل حلال، به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت عصاره‌های به‌دست آمده خشک شده و پس از توزین، تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت:

سویه‌های باکتریایی از آزمایشگاه استاندارد گروه دامپزشکی دانشگاه زابل، زابل، ایران تهیه شد. سویه‌های باکتری شامل: *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™، *S. saprophyticus* ATCC® 15305، *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619، *Hafnia alvei* ATCC 51873، *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923، *Enterococcus Serratia marcescens* ATCC 274، *Proteus mirabilis faecalis* ATCC 29212، *Acinetobacter baumannii* ATCC 35659، *ATCC 19606* روی محیط کشت نوترینت آگار تکثیر و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

به‌منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازه و جوان باکتری، چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون برات منتقل شد. جهت یکسان نمودن کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک فارلند (کدورت

گردید (۲۴).

سنجش میزان فنل کل: مقادیر ترکیب‌های فنلی در عصاره متانولی گیاهی توسط روش لی و همکاران (۲۵) اندازه‌گیری گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره بیان شد. بر طبق این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، در لوله‌های آزمایش ریخته شد. ۴۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط فوق اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، مقدار فنل کل موجود در عصاره محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره (mg GAE/g) بیان شد. همه سنجش‌ها در سه تکرار انجام شد.

$$Y=0.004 X +0.1$$

Y: عدد جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتروفتومتر

X: میزان فنل کل

سنجش فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئیدی این عصاره‌ها به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد بر اساس محلول با غلظت‌های متفاوت (-250-350-450-550 mg/ml) (50-150) کوئرستین رسم شده و میزان محاسبه

معادل $10^8 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر، جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱ تنظیم گردید. برای رسیدن به غلظت $10^7 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به نسبت ۰/۱ رقیق گردید. اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش انتشار در آگار مورد بررسی قرار گرفت. به کمک سواب استریل از کدورت معادل $10^7 \times 1/5$ باکتری در میلی‌لیتر، روی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس در فاصله‌های مناسب، تعدادی چاهک به قطر شش میلی‌متر با عمق ۵ میلی‌متر ایجاد گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها درون چاهک مربوط به آن ریخته شد. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد نمونه‌های باکتریایی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. به منظور تأیید نتایج حاصل از آزمایش برای هر یک از عصاره‌ها و برای هر نمونه باکتریایی، سه بار تکرار گردید.

عصاره‌گیری جهت سنجش‌های فنل کل،

فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدانی: عصاره متانولی با روش ماسراسیون سرد و با نسبت ۱:۲۰ ماده خشک گیاهی و حلال متانول ۸۰ درصد تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون حلال و بر روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm خیسانده شد. پس از آن با کاغذ صافی واتمن No.1 صاف گردید و جهت تغلیظ به دستگاه روتاری اوپوراتور با دمای ۴۵ درجه انتقال یافت. یک ساعت پس از تغلیظ عصاره به زیر هود لامینار انتقال یافته تا مابقی حلال به تدریج تبخیر گشته و عصاره خشک حاصل شود. از این عصاره خشک جهت تهیه عصاره متانولی جهت سایر سنجش‌ها با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده

درصد مهار رادیکال‌های آزاد با فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (Ac-As)/Ac \times 100$$

AC: میزان جذب برای نمونه شاهد

میزان جذب نمونه گیاهی AS:

آنالیز آماری داده‌ها: برای هر تیمار سه تکرار مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد و داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف از معیار ارائه گردید.

نتایج

میزان فلاونوئید در زیتون (میوه)، زیتون (برگ)، لوف (بذر) و مریم‌گلی (برگ) متفاوت بوده است (p = ۰/۰۱) اما میزان فنل و آنتی‌اکسیدان متفاوت نبوده است (جدول ۱). بیشترین میزان فلاونوئید (۳۹۸/۰۲ میکروگرم در گرم ماده خشک) در میوه زیتون و کمترین میزان (۲۵۵/۷۸ میکروگرم در گرم ماده خشک) در برگ مریم‌گلی به دست آمده است (شکل ۱).

فلاونوئید معادل میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم پودر خشک گیاه (mgQUEg^{-1}) محاسبه و تعیین گردید ضمناً بلانک محلول نیز به همین صورت و بدون عصاره آماده شد (۲۶). تمامی سنجش‌ها در سه تکرار انجام شد.

$$Y = 2.1647x - 2.8775$$

Y: عدد جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتوفتومتر

X: میزان فلاونوئید کل

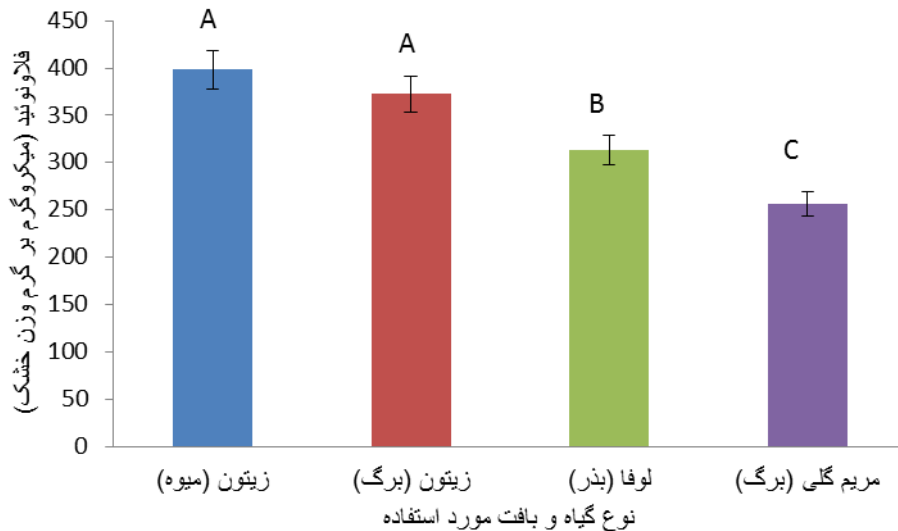
سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان: سنجش

فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به روش باروس و همکاران (۲۷) صورت گرفت. این روش بر اساس تغییر رنگ محلول متانولی بنفش رنگ ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل-هیدرازیل به محلول زردرنگ دی فنیل-پیکریل هیدرازین می‌باشد. ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH (دو میلی‌گرم DPPH در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد) مخلوط گردید. این نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد.

جدول ۱- آنالیز واریانس میزان فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان در زیتون (میوه)، زیتون (برگ)، لوف (بذر) و مریم‌گلی (برگ)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		آنتی‌اکسیدان	فلاونوئید
نوع باکتری	۳	۴۰۶/۱۴۱ ^{**}	۱۲۱۴۵/۱ ^{ns}
خطا	۸	۱۸۰۰/۰۰	۲۲۵/۰
کل	۱۱		

** معنی‌دار در سطح یک درصد؛ ns: غیر معنی‌دار



شکل ۱- میزان فلاتونوئید در زیتون (میوه)، زیتون (برگ)، لوف (بذر) و مریم گلی (برگ) حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف است

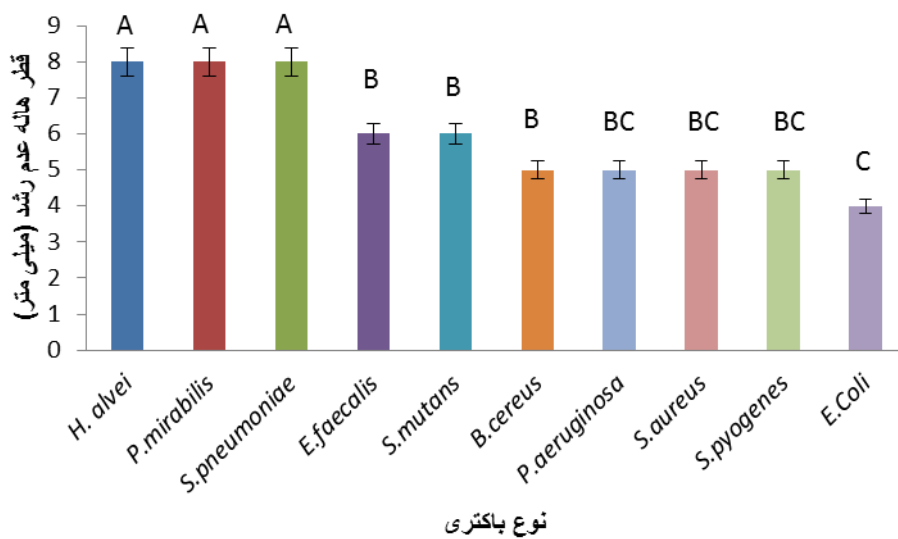
عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس و با ۱ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد انتروکوکوس فیکالیس داشته است (شکل ۳). عصاره متانولی بذر لوف با میانگین ۱۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا و با ۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد استرپتوکوکوس پنومونیه داشته است (شکل ۴). عصاره متانولی میوه زیتون با میانگین ۱۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد باسیلوس سرئوس و با ۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد استرپتوکوکوس پنومونیه داشته است (شکل ۵).

عصاره متانولی زیتون (برگ)، مریم گلی (گل)، لوف (بذر) و زیتون (میوه) برای کشتندگی و مهار رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس پایونز، استرپتوکوکوس موتانس، هافنیا الوی، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس و انتروکوکوس فیکالیس نتایج متفاوتی ارائه داده‌اند ($P=0/01$) (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که عصاره متانولی برگ زیتون با میانگین ۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد و هافنیا الوی با ۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد اشریشیاکلی داشته است (شکل ۲). عصاره متانولی برگ مریم گلی با میانگین ۱۴ میلی‌متر قطر هاله

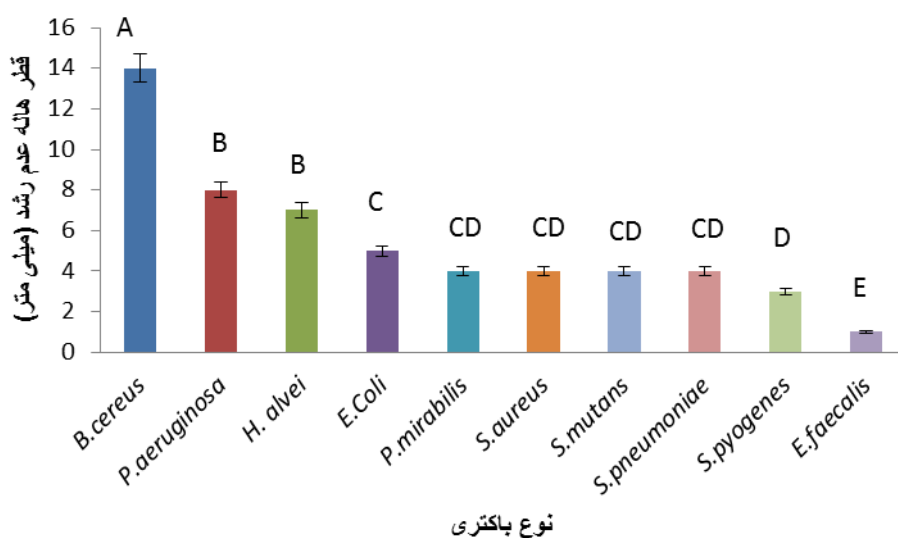
جدول ۲- بررسی میزان قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی گیاهان دارویی بر روی سوبه‌های بالینی (میلی‌متر)

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
زیتون (میوه)	لوف (بذر)	مریم گلی (گل)	زیتون (برگ)		
۷۰/۰۳**	۸۶۲۹**	۳۸/۸**	۶/۶۶**	۹	نوع باکتری
۱	۱	۱	۱	۲۰	خطا
				۲۹	کل

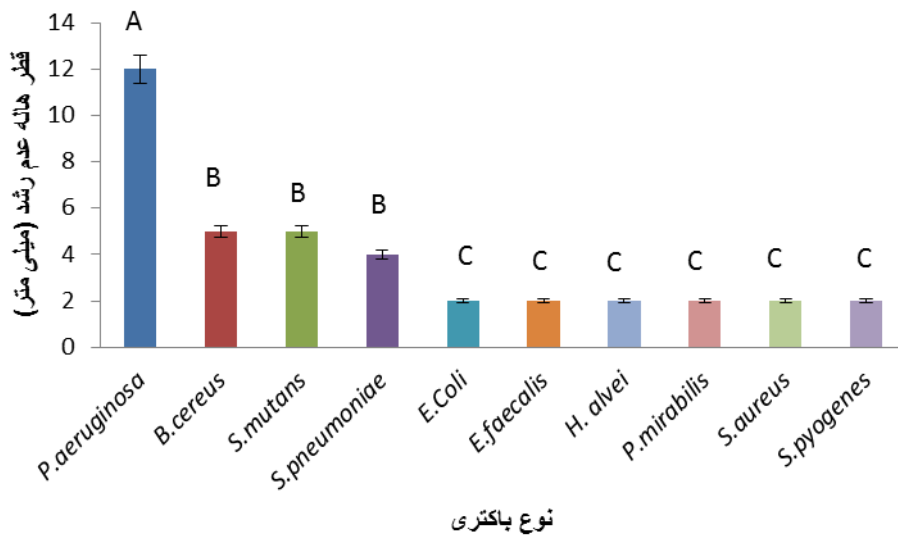
**معنی‌دار در سطح یک درصد



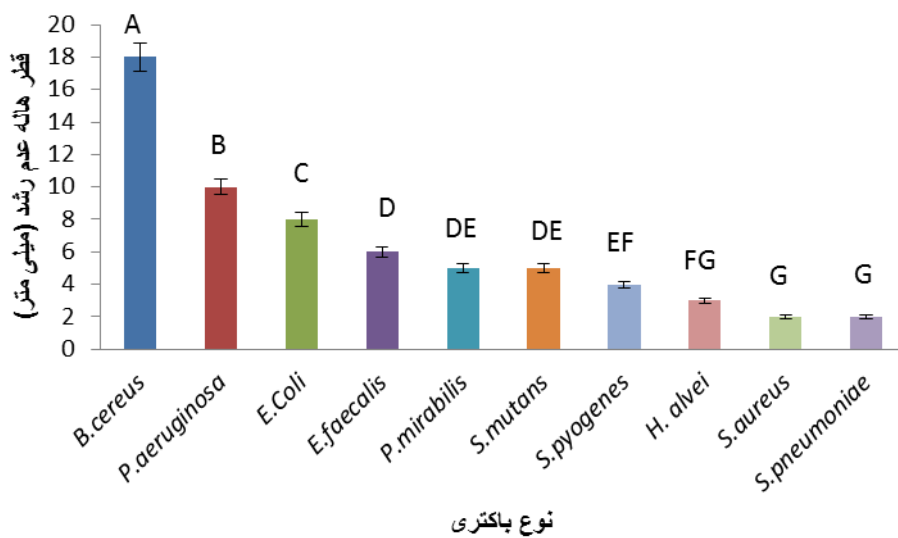
شکل ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی برگ زیتون بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی متر) حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف است.



شکل ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی برگ مریم‌گلی بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی متر) حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف است.



شکل ۴- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی بذر لوفافر بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی متر) حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف است



شکل ۵- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی میوه زیتون بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی متر) حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف است

دارای طیف (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae)

وسیع‌تری از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند اثرات ضد باکتریایی، قارچی، ویروسی، قابض، نشاط‌آور و ضد

بحث

گزارش شده است که برگ‌های مریم‌گلی

آب هستند (۶). اثر بازدارندگی اسانس مریم‌گلی بر روی کاندیدا آلبیکنس در حداقل زمان تماس و غلظت روغن کامل و قطعی بود. اما اسانس اثر باکتريواسـتاتیک موقـتی را روی اشـريشـيـاکلی، سالمونلا تیفی‌موریوم و همچنین سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. در مقایسه با اکثر آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده، کارایی اسانس S. officinalis به‌ویژه در برابر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بسیار بهتر بوده است (۱۱). کار یوفیلین اسانس‌های مریم‌گلی، فعالیت‌های باکتريواسـتاتیک و باکتری‌کشی قابل توجهی را علیه باسیلوس سرئوس، باسیلوس مگاتریوم، باسیلوس سوبتلیس، آئروموناس هیدروفیلا، آئروموناس سوپریا و کلبسیلا اکسیتوکا از خود نشان داده است (۵). بررسی اثرات ضد باکتریایی ترکیبات مختلف اسانس مریم‌گلی به تنهایی و همچنین با کمک برخی آنتی‌بیوتیک‌ها (سفالوسپورین‌ها)، علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشـريشـيـاکلی، سراتیا مارسـسنس، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و به روش میکرودیلوژن بررسی و مشخص شده است که اسانس‌ها در ترکیب با سایر مواد اثرات متفاوتی (بی‌تفاوت، افزایشی، متضاد و هم‌افزایی) بر علیه باکتری‌ها و رادیکال‌های آزاد DPPH از خود نشان داده که احتمالاً به دلیل مکانیسم‌های مختلف عمل در این مورد بوده است (۲). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره متانولی برگ مریم‌گلی با میانگین ۱۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشته است.

قابلیت استفاده از برگ‌های درخت زیتون رنگ‌شده بدون مواد رنگ‌زا بر علیه اشـريشـيـاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش شده و مشخص شده است که اثر ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر هر دو باکتری آزمایش شده ارائه داده و حداقل ۹۰ درصد کاهش باکتری مشاهده شده است. استفاده از

برگ‌های درخت زیتون بدون هیچ ماده‌ای نیز کارایی ضد باکتریایی را نشان داده و کاهش باکتریایی بهتری برای هر دو گونه باکتری در رنگ‌رزی‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است. علت کارایی ضد باکتریایی ناشی از برگ درخت زیتون با استفاده از آنالیز ICP-MS بررسی شده که علاوه بر محتوای اولئوروپئین عصاره، عناصر شناسایی شده توسط ICP-MS مسئول کاهش باکتری فرض گردیده‌اند (۲۲). قطر هاله عصاره زیتون در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس $17/6 \pm 0/45$ ، سالمونلا تیفی‌موریوم $10/8 \pm 0/36$ ، اشـريشـيـاکلی $14/3 \pm 0/3$ و باسیلوس سرئوس $10/7 \pm 0/18$ میلی‌متر بوده است (۱۸). فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون و اثر مفید برگ زیتون در کنترل عفونت‌های میکروبی گزارش شده است (۳). فعالیت ضد میکروبی عصاره تجاری Oleaeuropaea (زیتون) بررسی و مشخص شده است که برگ زیتون خواص ضد باکتریایی برای برخی گونه‌های باکتریایی نشان می‌دهد (۱۹). فعالیت ضد باکتریایی عصاره برگ *Olea europaea L*. در برابر چهار باکتری بیماری‌زا (اشـريشـيـاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس) بررسی و مشخص شده است که عصاره برگ زیتون مانع رشد این چهار پاتوژن شده است (۹). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره متانولی برگ زیتون با میانگین ۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد هافنیا الوی داشته است و همچنین عصاره متانولی میوه زیتون با میانگین ۱۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، نیز بیشترین تأثیر بر مهار رشد باسیلوس سرئوس داشته است.

تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره دانه‌های لوفاب بر روی برخی از میکروبی‌های بیماری‌زا انجام داد. نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌ها فعالیت ضد

آپیژنین را به‌عنوان اجزای کلیدی عصاره برگ L. cylindrica پیشنهاد کرد. این ترکیبات دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی هستند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره برگ گیاه L. cylindrica دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی است (۱۳). در تحقیق حاضر نیز مشخص شده که عصاره متانلی بذر لوف‌با میانگین ۱۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد سودوموناس داشته است.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گیاهان لوف‌با، زیتون و مریم‌گلی و حتی بافت‌ها مختلف آنها در درمان بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا مانند هافنیا الوی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و رشد باسیلوس سرئوس مؤثر بوده‌اند. همچنین توصیه می‌شود با استخراج مواد مؤثر عصاره این گیاه و سایر گیاهان، تحقیقات بیشتری روی انواع ترکیبات عصاره این گیاهان صورت گیرد.

میکروبی علیه اشیریشیاکلی نیز نشان دادند. کولی، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم و باسیلوس سوبتیلیس. محدوده بازدارداری بین ۶۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌متر بود (۱۴). عصاره اتانولی و اتیل استات L. cylindrica دارای خواص آنتی‌اکسیدانی متوسط در ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، با مهار ۵۳/۳۱ درصد و ۵۴/۷۳ درصد بوده است. عصاره اتانولی فعالیت ضد التهابی قابل توجهی را در ۵۰ mg/kg با مهار ۳۱/۱ درصد در مقایسه با ۳۹/۷ درصد ثبت شده برای کنترل (دیکلوفناک) نشان داده است. عصاره اتیل استات مهاری ۱۵ درصدی ایجاد کرد. در ارزیابی ضد میکروبی، عصاره‌های اتانولی و اتیل استات فعالیت ضد باکتریایی متوسطی را علیه استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم و باسیلوس سوبتیلیس نشان دادند. عصاره اتیل استات در مقایسه با عصاره اتانولی فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر جدایه‌های آزمایشی نشان داد. تجزیه و تحلیل HPLC-DAD عصاره اتیل استات وجود دو ترکیب فلاونوئیدی لوتئولین و

References

- 1- Aboh M I, Fidelis S, Oladosu O P, Adeshina G O, Olayinka B O, Olonitola S O. Antifungal potentials of *Luffa cylindrica* (Roem) ethyl acetate leaf extract. *J Ethnopharmacol*. 2020; 9(3): 118-178.
- 2- Adrar N, Oukil N, Bedjou F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Ind Crops Prod*. 2016; 88: 112-119.
- 3- Aliabadi M A, Darsanaki R K, Rokhi M L, Nourbakhsh M, Raeisi G. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Ann Biol Res*. 2012; 3(8): 4189-4191. [In Persion]
- 4- Berhane N, Abayneh T, Tesfaye S. Impacts of pathogen-host-drug interaction in the evolution and spread of antimicrobial-resistant pathogens. *MID*. 2022; 3(2): 286-295.
- 5- Delamare A P L, Moschen-Pistorello I T, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem*. 2007; 100(2): 603-608.
- 6- Eidi M, Eidi A, Zamanizadeh H. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(3): 310-313.
- 7- Garai S, Ghosh R, Bandopadhyay P, Mandal N, Chattopadhyay A. Anti-microbial and Anti-cancer Properties of Echinocystic Acid Extracted from *Luffa cylindrica*. *J Food Process Technol*. 2018; 9(2): 2-4.
- 8- Guo L, Gong S, Wang Y, Sun Q, Duo K, Fei P. Antibacterial activity of olive oil polyphenol extract against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*: Possible Mechanisms.

Foodborne Pathog Dis. 2020; 17(6): 396-403.

9- **Himour S, Yahia A, Belattar H.** Oleuropein and antibacterial activities of *Olea europaea* L. leaf extract. *Eur Sci J.* 2017; 13: 342-353.

10- **Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jašić M, Babić J, Jukić H, et al.** Bioactive profile of various *Salvia officinalis* L. preparations. *Plants.* 2019; 8(3): 55.

11- **Khalil R, Li Z-G.** Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10(42): 8397-8402.

12- **Nazzaro F, Fratianni F, Cozzolino R, Martignetti A, Malorni L, De Feo V, et al.** Antibacterial activity of three extra virgin olive oils of the Campania region, Southern Italy, related to their polyphenol content and composition. *Microorganisms.* 2019; 7(9): 321.

13- **Onyegbule F A, Okoye C I, Chukwunwejim C R, Umeokoli B O, Eze P M.** Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of the leaf extracts of *Luffa cylindrica*. *J Health Sci.* 2018; 8(2): 101.

14- **Oyetayo F, Oyetayo V, Ajewole V.** Phytochemical profile and antibacterial properties of the seed and leaf of the Luffa plant (*Luffa cylindrica*). *J Pharmacol Toxicol.* 2007; 2(6): 586-589.

15- **Pietrocola G, Ceci M, Preda F, Poggio C, Colombo M.** Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. *J Clin Exp Dent.* 2018; 10(11): e1103.

16- **Sarfraz I, Rasul A, Hussain G, Hussain S M, Samiullah K, Rasool B, et al.** Global and Temporal Trends in the Use of Antibiotics and Spread of Antimicrobial Resistance. In *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes: Environmental Occurrence and Treatment Technologies*, M.Z. Hashmi, ed. (Cham: Springer International Publishing). 2020; 81-94.

17- **Selim S, Almuhayawi M S, Alqhtani H, Al Jaouni S K, Saleh F M, Warrad M, et al.** Anti-Salmonella and Antibiofilm Potency of *Salvia officinalis* L. Essential Oil against Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica*. *Antibiotics.* 2022; 11(4): 489.

18- **Shariatifar N, Pirali-Hamedani M, Moazzen M, Ahmadloo M, Yazdani D.** Study of the Antimicrobial Effects of Aqueous Extract of

Olea europaea, Solanum nigrum, Artemisia sieberi, Teucrium polium, Glycyrrhiza glabra on some Food-borne Pathogenic Bacteria. *J Med Plant Res.* 2019; 18(72): 264-273.

19- **Sudjana A N, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, et al.** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(5): 461-463.

20- **Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet D L, et al.** Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(3): 318-327.

21- **Tiwari Pandey A, Pandey I, Zamboni P, Gemmati D, Kanase A, Singh A V, et al.** Traditional herbal remedies with a multifunctional therapeutic approach as an implication in COVID-19 associated co-infections. *Coatings.* 2020; 10(8): 761.

22- **Yılmaz F, Bahtiyari M İ.** Antibacterial finishing of cotton fabrics by dyeing with olive tree leaves fallen during olive harvesting. *J Clean Prod.* 2020; 270: 122068.

23- **Zouheir Y, Atany T, Boudebouch N.** Emergence and spread of resistant *N. meningitidis* implicated in invasive meningococcal diseases during the past decade (2008–2017). *J Antibiot.* 2019; 72(3): 185-188.

24- **Pourmorad F, Hosseini mehr S J, Shahabi majd N.** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* 2006; 5(11): 1142-1145. [In Persian]

25- **Li H, Deng Z, Wu T, Liu R, Loewen S, Tsao R.** Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem.* 2012; 130: 928–936. 2011.08.019.

26- **Chang C C, Yang M H, Wen H M, Chern J C.** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2002; 10(3).

27- **Barros L, Baptista P, Ferreira I C F R.** Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 1731–1737.

Investigation of antimicrobial and antioxidant activity of 4 medicinal plants on 10 standard strains

Bahman Fazeli-Nasab^{1*}, Saeide saeidi², Farzaneh Fazeli³, Fatemeh Bidarnamani¹, Zahra Beigomi⁴

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

2- Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O.Box, 19395-4697 Terhran, Iran.

4- Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Receive: September 8, 2022; Revise: October 10, 2022; Accept: October 12, 2022

Summary

One of the current problems of treating bacterial infections is increasing their resistance to antibiotics. Antibiotic-resistant bacteria cause significant mortality compared to non-resistant bacteria. Therefore, the use of olive, luffa, and sage medicinal plants, due to their anti-inflammatory and antimicrobial properties against 10 human pathogens, was the target of this research. For this purpose, a completely random experiment was conducted in three replications. Traits such as phenol, flavonoid, antioxidant and the diameter of the growth zone were measured. Data analysis was done using Statistix10 software and charts using Excel software. The highest amount of flavonoids (398.02 micrograms per gram of dry matter) was found in olive fruit and the lowest amount (255.78 micrograms per gram of dry matter) was obtained in sage leaves. Methanolic extract of olive leaf with an average diameter of 8 mm of non-growth zone had the greatest effect on inhibiting the growth of *Hafnia alvei*. Methanolic extract of sage leaves with an average diameter of 14 mm of non-growth zone had the greatest effect on inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*. Methanolic extract of luffa seed with an average diameter of 12 mm of non-growth zone had the greatest effect on inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Methanolic extract of olive fruit with an average diameter of 18 mm of non-growth zone had the greatest effect on inhibiting the growth of *Bacillus cereus*. The results of the present research showed that Luffa, olive and sage plants and even their different tissues were effective in treating some pathogenic bacteria such as *Hafnia alevi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and the growth of *Bacillus cereus*. Also, it is recommended to conduct more research on various compounds of these plant extracts by extracting the effective ingredients of this plant extract and other plants.

Keywords: *Luffa*, *H. alvei*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*

شناسایی جدایه‌های اشریشیاکلی کلی سینوزنیک از لاشه مرغ گوشتی و بررسی اثر مهاری آنها بر پاتوتیپ‌های اشریشیاکلی

محبوبه باقری^۱، مازیار جاجرمی^{۲*}، رضا قنبرپور^۳

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۳- استاد، گروه میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

دریافت مقاله: ۹ تیر ۱۴۰۱، بازنگری: ۳۰ مرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۸ شهریور ۱۴۰۱

چکیده

کلی‌سین‌ها ترکیباتی با خاصیت ضد باکتریایی هستند که توسط اشریشیاکلی تولید می‌شوند و به سویه‌های تولیدکننده، قابلیت رقابت اکولوژیک در برابر باکتری‌های دیگر را می‌دهند. هدف از انجام این مطالعه شناسایی سویه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده کلی‌سین جدا شده از لاشه مرغ گوشتی به روش PCR و بررسی اثر مهاری سویه‌های کلی‌سینوزنیک بر پاتوتیپ‌های مختلف اشریشیاکلی است. در این مطالعه، ۱۱۰ جدایه باکتری اشریشیاکلی از ۱۱۰ لاشه مرغ گوشتی از نظر حضور هفت گروه از ژن‌های تولیدکننده کلی‌سین شامل E1، Y.U، A.N.S4 و Ia.Ib، E2-9، 5.10.K، V مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۱۱۰ جدایه، ۵۴ جدایه (۴۹/۱ درصد) دارای یکی از ژن‌های تحت بررسی بودند. از میان نمونه‌ها، ۳۳ جدایه (۳۰ درصد) از نظر ژن Ia.Ib مثبت بودند. همچنین ژن‌های V و E1 با فراوانی به ترتیب ۲۰ درصد (۲۲ جدایه) و ۹ درصد (۱۰ جدایه) در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. فراوانی ژن A.N.S4 ۲/۹ درصد (۳ جدایه) بود و ژن‌های E2-9 و 5.10.K هر یک به تنهایی در ۱ جدایه (۰/۹ درصد) تشخیص داده شدند. گروه ژنی Y.U در این مطالعه فاقد فراوانی بود. از میان ۵۴ جدایه واجد ژن‌های کلی‌سین، ۱۸ جدایه (۳۳/۳ درصد) دارای اثر مهاری نسبت به حداقل یکی از پاتوتیپ‌های EIEC، ETEC، EAEC، EHEC و EPEC بود. از نظر فنوتیپی، بیشترین اثر مهاری سویه‌های کلی‌سینوزنیک، بر دو پاتوتیپ EAEC و ETEC مشاهده شد.

واژگان کلیدی: مرغ گوشتی، اشریشیاکلی، کلی‌سین، پاتوتیپ

مقدمه

یکی از ویژگی‌های باکتری/شریشیالکی به‌عنوان مهم‌ترین عضو میکروبیوتای دستگاه گوارش، تولید ترکیباتی موسوم به کلی‌سین می‌باشد. حداقل ۳۰ درصد از سویه‌های/شریشیالکی قادر به تولید یکی از انواع کلی‌سین‌ها هستند (۱). کلی‌سین‌ها و میکروسین‌ها از انواع باکتریوسین‌هایی هستند که توسط باکتری‌های گرم منفی خانواده‌ی انتروباکتریاسه تولید می‌شوند. این ترکیبات در واقع توکسین‌های سنتز شده‌ی ریبوزومی می‌باشند. کلی‌سین‌ها در مقایسه با میکروسین‌ها پروتئین‌هایی با سایز بزرگ‌تر (۴۰ تا ۸۰ کیلو دالتون) هستند (۲). این پروتئین‌ها غالباً تحت شرایط استرس نظیر مواجهه با میتوماپسین C تولید می‌شوند (۳). اختصاصیت باکتریوسین می‌تواند کاربرد مفیدی داشته باشد به این صورت که یک سویه‌ی باکتریایی خاص مورد هدف قرار می‌گیرد، بدون اینکه سایر جمعیت‌های میکروبی تخریب شوند (۴).

کلی‌سین‌ها بر اساس نحوه‌ی عمل و مسیرهای اثر آنها به سه گروه شامل کلی‌سین‌های دارای فعالیت نوکلئازی، کلی‌سین‌های دارای خاصیت تشکیل دهنده‌ی منفذ در غشای سلولی و نهایتاً کلی‌سین‌های مؤثر بر پپتیدوگلیکان دیواره سلولی تقسیم می‌شوند (۵). باکتری‌های تولیدکننده‌ی کلی‌سین از اثر نامطلوب کلی‌سین بر خودشان حفاظت می‌شوند چون به‌طور همزمان پروتئین ایمنی ویژه‌ی سنتز می‌کنند که قادر است بر خود ارگانسیم اثر حفاظتی داشته باشد. بعضی از سویه‌های اشریشیالکی فقط فاکتور ایمنی را سنتز می‌کنند که به‌عنوان یک مزیت رقابتی در برابر سویه‌های تولیدکننده‌ی کلی‌سین محسوب می‌شود (۶).

تا کنون ۲۵ نوع کلی‌سین مورد شناسایی قرار گرفته است که مکانیسم اثر متفاوتی دارند (۷).

کلی‌سین E1 و K سنتز ماکرومولکول‌ها را مهار می‌کنند، کلی‌سین E2 باعث شکستن DNA می‌شود و کلی‌سین E3 یک نوع RNase می‌باشد که توانایی ایجاد برش در 16srRNA را دارد. تا کنون فعالیت اندونوکلئازی تعداد زیادی از کلی‌سین‌ها مشخص شده است که هر کدام از آنها باعث ایجاد برش در یک ناحیه خاص و در یک نوکلئوتید خاص می‌شود. کلی‌سین‌های E2، E7، E8 و E9 سبب شکستن DNA می‌شوند. کلی‌سین‌های E4، E6 و DF13 سبب هیدرولیز tRNA می‌شوند و کلی‌سین D و E5 باعث شکستن tRNA می‌شوند. کلی‌سین M یک کلی‌سین منحصر به فرد است که روی سنتز پپتیدوگلیکان اثر می‌کند (۸).

قابلیت تولید کلی‌سین می‌تواند هم در سویه‌های غیر بیماری‌زا و هم بیماری‌زا وجود داشته باشد. میکروارگانسیم کلی‌سینوزنیک فارغ از فاکتورهای حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، می‌تواند دارای مزیت رقابتی باشد زیرا می‌تواند باکتری‌های رقیب را از چرخه اکولوژیک حذف کند و فرصتی را برای بقا و تکثیر خود فراهم کند (۹). به‌عنوان مثال یک روش پیشنهادی برای کنترل سروتیپ O157:H7 استفاده از حذف رقابتی و جلوگیری از کلونیزاسیون/شریشیالکی‌های پاتوژن روده‌ای و یا حتی سایر اعضاء خانواده/انتروباکتریاسه می‌باشد (۱۰).

سویه‌های بیماری‌زای روده‌ای/شریشیالکی را می‌توان بر اساس فاکتورهای حدت و نوع آسیب‌زایی طبقه‌بندی کرد. سویه‌های ایجادکننده‌ی بیماری‌های روده‌ای شامل پاتوتیپ‌های انتروتوکسیژنیک/شریشیالکی (EPEC)، وروتوکسیژنیک/شریشیالکی (VTEC) یا اشریشیالکی تولیدکننده‌ی شیکاگوکسین (STEC)، اشریشیالکی مهاجم روده‌ای (EIEC)، اشریشیالکی مجتمع شونده‌ی روده‌ای (EAEC یا EAaggEC) و اشریشیالکی چسبنده‌ی منتشر (DAEC) می‌باشد.

میکروبیولوژی منتقل شدند. جهت جداسازی و تأیید بیوشیمیایی اشریشیاکلی در آزمایشگاه سواب‌ها در محیط مک‌کانکی کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب تا صبح انکوبه شدند. کلنی‌های مشکوک به اشریشیاکلی در محیط مک‌کانکی (صاف، گرد، متوسط و صورتی رنگ) جهت تأیید بیوشیمیایی انتخاب شدند و با آزمایش IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer, citrate) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج DNA از باکتری‌ها: برای استخراج

DNA در این پژوهش از روش لیز سلولی با کمک NaOH نیم‌نرمال استفاده گردید. از کشت تازه‌ی باکتریایی یک کلنی انتخاب و به میکروتیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم‌نرمال، اضافه گردید و به صورت سوسپانسیون در آمد. پس از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر محلول تریس بیس ۱ مولار به سوسپانسیون اضافه شد تا عمل لیز باکتری توسط NaOH متوقف گردد و pH نهایی به ۷/۵ برسد. با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، حجم سوسپانسیون به ۵۰۰ میکرولیتر رسیده و جهت انجام آزمایش PCR آماده شد.

شناسایی ژن‌های کدکننده کلی‌سین و

سویه‌های کلی‌سینوزنیک: در این مطالعه برای شناسایی ژن‌های کدکننده کلی‌سین از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول شماره ۱ جهت انجام آزمایش PCR استفاده گردید.

برنامه‌ی دمایی برای انجام PCR عبارت بود از:

- ۱- ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۲- ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه،
- ۳- ۵۳°C به مدت ۱ دقیقه، ۴- ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه،
- ۵- تکرار از مرحله ۲ برای ۳۸ مرتبه و ۶- ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه.

مجموع EPEC ها و EHEC ها را در پاتوتیپی قرار می‌دهند به نام اشریشیاکلی اتصالی و محو کننده (AEEC). گروهی از STEC یا VTEC ها را که ضایعات اتصالی و محوکننده نیز ایجاد می‌کنند، انتروهموراژیک/اشریشیاکلی (EHEC) می‌نامند (۱۱).

گوشت مرغ به دلیل در دسترس بودن و ارزان بودن نسبت به گوشت قرمز، از منابع مهم پروتئین حیوانی در جیره غذایی اکثر جوامع به شمار می‌رود. سویه‌های اشریشیاکلی بیماری‌زا مکرراً از نمونه‌های گوشت مرغ جدا می‌شوند (۱۲). تاکنون در ایران مطالعه‌ای در خصوص شناسایی سویه‌های کلی‌سینوزنیک با منشأ گوشت طیور انجام نشده است. شناسایی کلی‌سین‌ها در این جدایه‌ها به ما این امکان را می‌دهد که به شناخت بهتری از تنوع و نحوه انتشار ژن‌های کدکننده این ترکیبات در جمعیت‌های مختلف باکتریایی دست یابیم و بعضی از این جدایه‌ها ممکن است قادر به مهار سویه‌های انتروپاتوژنیک باشند. در این مطالعه جدایه‌های اشریشیاکلی به دست آمده از لاشه مرغ گوشتی سالم ذبح شده در کشتارگاه صنعتی، مورد ارزیابی قرار گرفت. فراوانی ژن‌های کدکننده هر یک از انواع کلی‌سین‌ها در جدایه‌ها تعیین شد و اثر مهارتی جدایه‌های کلی‌سینوزنیک بر برخی سویه‌های انتروپاتوژنیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها، جداسازی و تأیید

بیوشیمیایی اشریشیاکلی: از تعداد ۱۱۰ لاشه طیور در کشتارگاه صنعتی طیور از سطوح داخلی و خارجی هر لاشه نمونه سواب تهیه گردید و سواب‌ها بلافاصله با کمک محیط انتقالی به آزمایشگاه

جدول ۱- ژن‌های مربوط به کلی‌سین‌های مختلف، پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصولات PCR

هدف	نام پرایمر	توالی	سایز محصول (bp)
A.N.S4	NS4: r	CGTAGCTATAATGAAGCAATGGCTTCA	۲۲۵
	NS4: f	ACC TCC AAC AGG AGA GGT CCC CAG TT	
V	V: f	CAC GCC CTG AAG CAC CAC CA	۴۰۰
	V: r	CCG TTT TCC AAG CGG ACC CC	
Ia.Ib	Iab: f	GCA CAA CAG GCC CGT CTG CTC	۳۸۵
	Iab: r	CAC CTT CCA CAT CCT CTG TCA CC	
E2.E3.E4E5	E2-9: f	CGA CAG GCT AAA GCT GTT CAG GT	۲۱۹
E6.E7E8.E9	E2-9: r	TGC AGC AGC ATC AAA TGC AGC CT	
Y.U	Yu: f	GTG AAC GGA CAG AAA CCC GCC	۲۴۳
	Yu: r	CAA TCT GTC TGA CAG CCT CTC CC	
5.10.K	510K: f	AAA GCT GAA CTG GCG AAG GC	۸۰۳
	510K: r	CAA CTC ATC ATC CCC TAT GTA AGA AG	
E1	E1: f	ACG GGA GTG GCT CTG GCG G	۳۸۹
	E1: r	CTC TTT ACG TCG TTG TTC TGC TTC CTG	

ژن A.N.S4 ۲/۹ درصد (۳ جدایه) بود و ژن‌های E2-9 و 5.10.K هر یک به تنهایی در ۱ جدایه (۰/۹ درصد) تشخیص داده شدند. گروه ژنی Y.U در این مطالعه فاقد فراوانی بود (شکل ۱). همچنین نتایج الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۲ قابل مشاهده است.

پروفایل ژنی و اثر مهارى سوبه‌های واجد

ژن کلی‌سین بر پاتوتیپ‌های اشریشیاکلی: در این مطالعه مجموعاً ۱۰ پروفایل مختلف از گروه‌های ژنی کلی‌سین مورد شناسایی قرار گرفت. بیشترین فراوانی مربوط به پروفایل Ia.Ib (۲۲ جدایه) و V (۱۲ جدایه) بود (جدول ۲). در این مطالعه از میان ۵۴ جدایه واجد ژن‌های کلی‌سین، ۱۸ جدایه (۳۳/۳ درصد) دارای اثر مهارى نسبت به حداقل یکی از پاتوتیپ‌های ETEC، EIEC، EHEC، EAEC و EPEC بود. از نظر فنوتیپی، بیشترین اثر مهارى سوبه‌های کلی‌سینوژنیک، بر دو پاتوتیپ ETEC و EAEC مشاهده شد. با این وجود دو جدایه اثر مهارى قابل توجهی بر تمامی پاتوتیپ‌های مورد بررسی از خود نشان دادند که دارای پروفایل‌های ژنی V و V/Ia.Ib/5.10.K بودند (شکل ۳).

بررسی اثر مهارى کلی‌سین بر پاتوتیپ‌های

اشریشیاکلی به صورت فنوتیپی: جهت بررسی

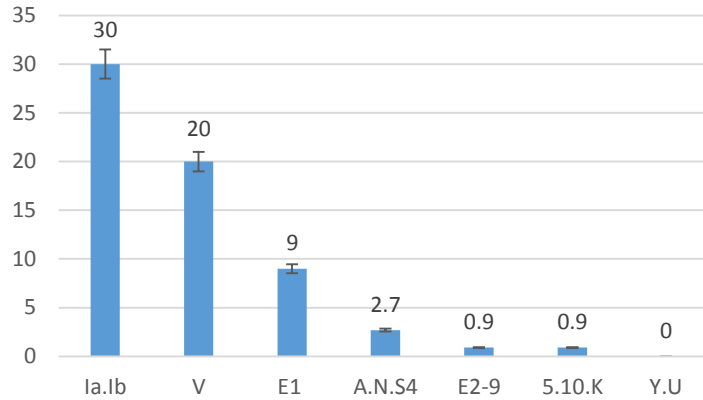
اثر مهارى کلی‌سین بر پاتوتیپ‌های اشریشیاکلی، سوبه‌های مثبت از نظر ژن کلی‌سین در محیط LB مایع کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری گردید. سپس هر پاتوتیپ بر روی LB جامد به صورت چمنی کشت داده شد (پلیت‌های LB جامد حاوی میتومیسین C بودند) سپس ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون سوبه مثبت از نظر ژن کلی‌سین به صورت Spot بر روی پلیت گذاشته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری گردید.

نتایج

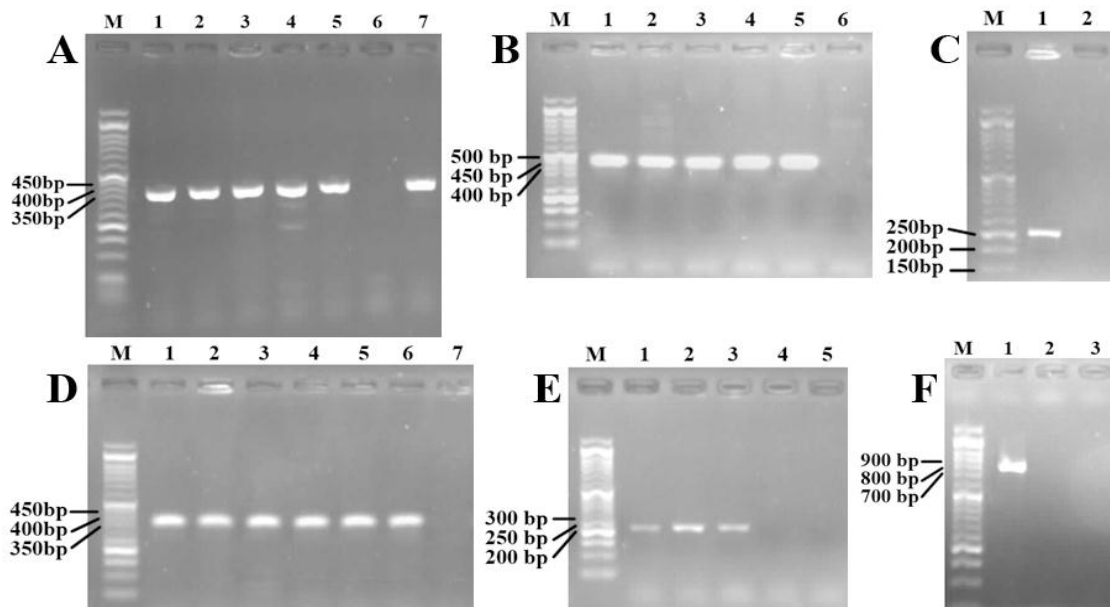
فراوانی ژن‌های کدکننده کلی‌سین و

سوبه‌های کلی‌سینوژنیک: در این مطالعه از میان

۱۱۰ جدایه، ۵۴ جدایه (۴۹/۱ درصد) از نظر حداقل یکی از ژن‌های تحت بررسی مثبت ارزیابی شد. از میان کل نمونه‌ها، ۳۳ جدایه (۳۰ درصد) از نظر ژن Ia.Ib مثبت بودند. همچنین ژن‌های V و E1 با فراوانی به ترتیب ۲۰ درصد (۲۲ جدایه) و ۹ درصد (۱۰ جدایه) در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. فراوانی



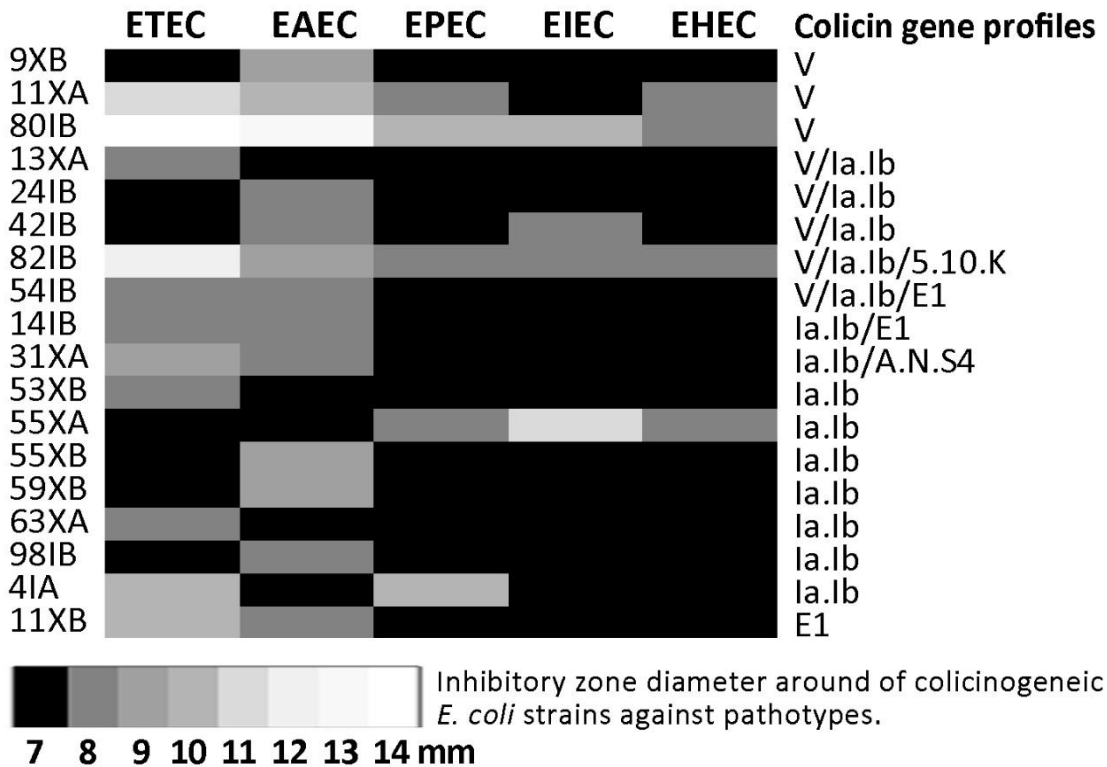
شکل ۱- فراوانی جدایه‌های مثبت از نظر ژن‌های Ia.Ib، E1، V، A.N.S4، 5.10.K و Y.U



شکل ۲- الکتروفورز نمونه‌های مثبت و منفی از نظر گروه‌های ژنی Ia.Ib (A)، V (B)، E2-9 (C)، E1 (D)، A.N.S4 (E) و 5.10.K (F)

جدول ۲- انواع و فراوانی پروفایل‌های ژنی در جدایه‌های مثبت از نظر ژن‌های کلی‌سین مورد بررسی

Colicin gene groups							Prevalence (%)	95% CI
V	Ia.Ib	E1	E2-9	A.N.S4	5.10.K	U.Y		
+		+					1/54 (1.85)	0%-5.45%
+							12/54 (22.22)	11.13%-33.31%
+	+						5/54 (9.26)	1.53%-1.69%
+	+				+		1/54 (1.85)	0%-5.45%
+	+	+					1/54 (1.85)	0%-5.45%
	+	+					1/54 (1.85)	0%-5.45%
	+						22/54 (40.74)	27.64%-53.85%
	+			+			3/54 (5.56)	0%-11.67%
		+					5/54 (9.26)	1.53%-1.69%
			+				1/54 (1.85)	0%-5.45%



شکل ۳- اثر جدایه‌های کلی‌سینوزنیک بر پاتوتیپ‌های مختلف/شیریشی‌کلی و پروفایل ژن‌های کدکننده کلی‌سین در این جدایه‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

یک مزیت مشخص تولید باکتریوسین‌های متعدد، طیف وسیع‌تر فعالیت علیه باکتری‌های رقیب و در نتیجه تقویت تطابق با محیط‌های مختلف است (۶). تاکنون دو مکانیسم اصلی و اولیه برای مقاومت به کلی‌سین شناسایی شده‌اند: (۱) مکانیسمی که نتیجه جهش و یا عدم حضور یک رسپتور خاص کلی‌سین می‌باشد (۲) مقاومتی که مرتبط با عدم حضور یک سیستم جابجایی کلی‌سین می‌باشد (۱۴).

شامبرگر و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای در آمریکا ۲۳ سویه باکتری/شیریشی‌کلی جدا شده از نمونه‌های مدفوع انسان، گاو، گوسفند، گربه و اردک را از نظر تولید کلی‌سین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فاکتورهای ویروالانس و توانایی مهار سویه‌های شیریشی‌کلی پاتوژن مورد بررسی قرار دادند. هفت نوع کلی‌سین B، E1، E2/E7، E7، Ia/Ib، K و M

شناسایی شد که نیمی از سویه‌ها دارای چند نوع کلی‌سین مختلف بودند. بعضی از کلی‌سین‌ها در چند سویه دیده شد (Ia/Ib در چهار سویه، E7 و K در دو سویه) و بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به کلی‌سین B، E2/E7 و M و کمترین فراوانی مربوط به کلی‌سین E1 گزارش شد. چهارده سویه کلی‌سینوزنیک از نظر توانایی مهار ۱۰ سویه پاتوژن/شیریشی‌کلی مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۶ سویه کلی‌سینوزنیک توانستند تمام سویه‌های پاتوژن را مهار کنند (۱۵).

در مطالعه‌ای که توسط چاریکچی و همکاران (۲۰۰۱) در کشور ترکیه بر روی ۱۲۹ جدایه باکتری/شیریشی‌کلی عامل عفونت ادراری که از نمونه ادرار افراد بیمار مراجعه کننده به بیمارستان‌های دو شهر از میبر و مانيسا جدا شده بودند، انجام گرفت. تعداد ۳۳ جدایه (۵/۲۵ درصد) کلی‌سینوزنیک و ۲۰ نوع کلی‌سین مختلف شناسایی گردید. تعداد ۶ جدایه

کلی‌سین در یک سویه به عوامل مختلفی مانند: انتقال ژنتیکی مؤثر در اجتماع باکتری‌ها، ناهمگنی پایین در زیستگاه و صرف انرژی نسبتاً کم برای تولید کلی‌سین بستگی دارد (۲۰).

کاتلر و همکاران (۲۰۰۷) اثر رژیم غذایی حاوی کلی‌سین E1 را بر روی اشریشیاکلی انتروتوکسیکوژنیک F18 عامل اسهال بعد از شیرگیری در خوک‌های جوان بررسی کردند که بر اساس این مطالعه کلی‌سین E1 باعث کاهش شدت و بروز اسهال پس از شیرگیری ناشی از سویه F18 گردید (۲۱). در پژوهشی دیگر پاتون و همکاران (۲۰۰۶) اثر بازدارندگی کلی‌سین E1 را بر باکتری لیستریا منوسایتوتوژن در سوپ و غذاهای آماده مصرف گزارش کردند (۲۲). همچنین اثرکاهشی کلی‌سین E1 بر سویه‌های یورپاتوژنیک عامل عفونت ادراری در انسان در مطالعه ریجاوک و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شده است (۲۳).

گوردون و همکاران (۲۰۰۶)، ۲۶۶ جدایه اشریشیاکلی از مدفوع انسان را بررسی کردند. بر اساس نتایج، ۱۰۲ جدایه (۳۸ درصد) کلی‌سین و میکروسین تولید کردند (۲۴) درصد جدایه‌ها حداقل یک نوع کلی‌سین و ۲۰ درصد جدایه‌ها حداقل یک میکروسین تولید کردند. چهارده جدایه کلی‌سین E1 (۵/۳ درصد) و ۲۲ جدایه (۸/۳ درصد) میکروسین V تولید کردند. تنها یک جدایه هر سه کلی‌سین E1، V و Ia را تولید کرد (۲۴). مطالعات نشان می‌دهد میکروسین V در سویه‌های اشریشیاکلی یورپاتوژنیک ممکن است یک فاکتور حدت باشد و فراوانی ژن‌های میکروسین V با افزایش پاتوژنیستی^۵ سویه‌های اشریشیاکلی افزایش یافته است (۱۹).

تهمتن و همکاران (۲۰۱۱) در شهرستان شیراز

(۴/۶۵ درصد) کلی‌سین E1 و ۲۲ جدایه (۱۷ درصد) کلی‌سین V تولید کردند و بیشترین فراوانی مربوط به کلی‌سین‌های گروه E (بیش از ۵۰ درصد) گزارش شد (۱۶).

خلف و همکاران (۲۰۱۵) در کشور عراق ۳۰ جدایه باکتری اشریشیاکلی که از ۱۰۵ نمونه ادرار، مدفوع و سواب گوش بیماران در پنج بیمارستان شهر بغداد جدا شده بودند، از نظر ژن‌های تولیدکننده ۴ کلی‌سین E1، E3، E9 و M مورد بررسی قرار دادند. چهار جدایه (۱۳/۳۳ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین E1 و ۱۵ جدایه (۵۰ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین M بودند. در بین جدایه‌های واجد ژن E1، ۳ جدایه مربوط به نمونه‌های ادراری و در بین جدایه‌های واجد ژن M، ۱۲ جدایه مربوط به نمونه‌های ادراری بودند. هیچ یک از جدایه‌ها دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین E3 و E9 نبودند. بنابراین جدایه‌های اشریشیاکلی عامل عفونت‌های دستگاه ادراری فراوانی بالایی از کلی‌سین M (۸۰ درصد) و کلی‌سین E1 (۷۵ درصد) نشان دادند (۱۷).

سام جیس و همکاران (۲۰۱۰) در جمهوری چک گزارش کردند که ژن کلی‌سین‌های E1، Ia و V در اغلب سویه‌ها با هم حضور دارند (۱۸). حضور مشترک کلی‌سین Ia و V در سویه‌ها که به‌وسیله پلاسمیدهای قابل انتقال یکسان کد می‌شوند، نتیجه ادغام اپران میکروسین V و چند ژن دیگر در پلاسمید تولیدکننده کلی‌سین Ia است. اگر چه تولید بیش از یک کلی‌سین به‌وسیله سویه‌های اشریشیاکلی معمول است، اما اغلب کلی‌سین‌هایی که معمولاً با هم تولید می‌شوند، ارتباط معنی‌داری دارند و به صورت تصادفی تولید نمی‌شوند (۱۹). در مطالعه‌ی حاضر ۶ جدایه از نظر بیش از یک ژن تولیدکننده کلی‌سین مثبت بودند. وجود همزمان چند نوع ژن کدکننده‌ی

⁵ Pathogenicity

عوامل مختلفی مانند نوع گونه حیوانی، جیره غذایی، کیفیت زیستگاه، ویژگی‌های میزبان، ویژگی‌های جغرافیایی، اثربخشی ارگانوسم‌های پروبیوتیک و استفاده از دیگر روش‌های آزمایشی می‌تواند نوع کلی‌سین را در جدایه‌های حیوانی و انسانی تحت تأثیر قرار دهد (۱۳).

با توجه به نقش مهم اکولوژیک سویه‌های کلی‌سینوزنیک در دستگاه گوارش، مهم‌ترین کلی‌سین‌های مربوط به *اشریشیاکلی* در دستگاه گوارش مرغ گوشتی E1، V و Ia.Ib بود و بیشترین اثر مهاري سویه‌های کلی‌سینوزنیک، بر دو پاتوتیپ ETEC و EAEC مشاهده شد. اکولوژی محیط‌های طبیعی پیچیده‌تر از رقابت دو سویه در محیط آزمایشگاهی است. گاهی پس از کاهش اولیه سویه متأثر از کلی‌سین در محیط طبیعی، این سویه‌ها دچار ریکواری بعد از مواجهه می‌شوند. مواجهه مداوم با کلی‌سین، می‌تواند منجر به غلبه بر محدودیت‌ها شود و سویه‌ی متأثر بیشتر با محیط تطابق یافته و زنده‌مانی آن افزایش یابد. از طرفی بیشتر ژن‌های کدکننده‌ی باکتریوسین‌ها بر روی پلاسمیدهای خود منتقل شونده قرار دارند. استفاده از سویه‌های کلی‌سینوزنیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند مخاطره آمیز باشد، زیرا ممکن است عامل کدکننده کلی‌سین و ژن ایمنی همراه با آن به سویه‌های پاتوژن منتقل شود. این موضوع نشان می‌دهد که خالص‌سازی باکتریوسین، مسیر بهتری برای توسعه‌ی استفاده از باکتریوسین‌هاست نسبت به استفاده از میکروارگانسیم زنده.

References

- 1- Samuels AN, Roggiani M, Smith KA, Zhu J, Goulian M, Kohli RM. Deciphering the Role of Colicins during Colonization of the Mammalian Gut by Commensal *E. coli*. *Microorganisms*. 2020; 8(5): 664.
- 2- Calcuttawala F, Pal A, Nath P, Kar R, Hazra D, Pal R. Structural and functional insights

سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از ۳۰۰ نمونه مدفوع گاوهای سالم و اسهالی را از نظر ژن تولیدکننده کلی‌سین‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. از ۳۰۰ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* ۱۱۵ نمونه کلی‌سینوزنیک بودند و ۶ نوع کلی‌سین (E1، V، Ia Ib، UY، 5.10.k و A.N.S4) شناسایی شد. تقریباً ۱۰۰ درصد جدایه‌ها حداقل دارای یک ژن تولیدکننده کلی‌سین بودند. ۳۰ جدایه (۱۰ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین V و ۲۶ جدایه (۸/۶۷ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین E1 بودند. بیشترین فراوانی مربوط به ژن Ia.Ib و کمترین فراوانی مربوط به ژن A.N.S4 گزارش گردید (۴۴). این نتایج با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (۱۳).

بر اساس مطالعه‌ای که توسط تقوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در شهرستان یاسوج برای شناسایی تیپ‌های کلی‌سین بر روی *اشریشیاکلی* کامنسال جدا شده از نمونه‌های مدفوع کودکان انجام دادند، از ۱۲۰ نمونه *اشریشیاکلی* ۸۵ جدایه (۷۰/۸ درصد) کلی‌سینوزنیک بودند، به طوری که ۳۴/۱۱ درصد از نمونه‌ها دارای یک ژن، ۴۵/۸۹ درصد دو نوع و ۲۰ درصد دارای بیش از دو نوع ژن کلی‌سین بودند. تعداد ۳۳ جدایه (۲۲/۵ درصد) ژن V، ۱۴ جدایه (۱۱/۷ درصد) ژن E1 و تعداد ۴ جدایه (۴/۷ درصد) هر دو ژن E1 و V را داشتند. یک سویه با شش نوع کلی‌سین در بین نمونه‌ها مشاهده شد. بیشترین و کمترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن‌های Ia.Ib و A.N.S4 گزارش شد (۲۵).

into colicin: a new paradigm in drug discovery. *Archives of Microbiology*. 2022; 204(1): 1-9.

3- Daw MA, Falkiner FR. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*. 1996 1; 27(6): 467-479.

4- Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, et al. Colicin

biology. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2007; 71(1): 158-229.

5- Cursino L, Chartone-Souza E, Nascimento A. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002; 33(3): 185-195.

6- Cameron A, Zaheer R, Adator EH, Barberi R, Reuter T, McAllister TA. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater. *Toxins*. 2019; 11(8): 475.

7- Bosák J, Micenková L, Hrala M, Pomorská K, Kunova Bosakova M, Krejci P, et al. Colicin FY inhibits pathogenic *Yersinia enterocolitica* in mice. *Scientific reports*. 2018 16; 8(1): 1-2.

8- Cramer WA, Sharma O, Zakharov SD. On mechanisms of colicin import: the outer membrane quandary. *Biochemical Journal*. 2018; 475(23): 3903-3915.

9- Millstein RL. Natural selection as a population-level causal process. *The British Journal for the Philosophy of Science*. 2020; 57(4): 627-653.

10- Askari N, Ghanbarpour R. Molecular investigation of the colicinogenic *Escherichia coli* strains that are capable of inhibiting *E. coli* O157:H7 in vitro. *BMC veterinary research*. 2019; 15(1): 1-8. [In Persian]

11- Jesser KJ, Levy K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Current opinion in infectious diseases*. 2020; 33(5): 372.

12- Al-Marri T, Al-Marri A, Al-Zanbaqi R, Al Ajmi A, Fayez M. Multidrug resistance, biofilm formation, and virulence genes of *Escherichia coli* from backyard poultry farms. *Veterinary World*. 2021; 14(11): 2869.

13- Tahamtan Y, Shirazi Z, Pourbakhsh A, Kargar M, Hyati M, Namvari MM, et al. Detection of Colicin genes by PCR in *Escherichia coli* isolated from cattle in Shiraz-Iran. *Archives of Razi Institute*. 2012; 67(1): 63-67. [In Persian]

14- Alonso G, Gomes C, González C, Rodríguez Lemoine V. On the mechanism of resistance to channel-forming colicins (PacB) and tellurite, encoded by plasmid Mip233 (IncHI3). *FEMS microbiology letters*. 2000; 192(2): 257-261.

15- Schamberger GP, Diez-Gonzalez F. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of food protection*. 2004; 67(3): 486-492.

16- Çarıkçı Aİ, Coşar G. Colicin production and colicin Typing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2001; 31(6): 483-486.

17- Khalaf ZZ, Flayyih MT. The genotypic identification of colicins produced by clinical isolates of *Escherichia coli* in Iraq. *World Journal of Environmental Biosciences*. 2015; 3: 94-9.

18- Šmajš D, Micenková L, Šmarda J, Vrba M, Ševčíková A, Vališová Z, et al. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC microbiology*. 2010; 10: 288.

19- O'Brien GJ, Chambers ST, Peddie B, Mahanty KH. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Microbial pathogenesis*. 1996 1; 20(3):185-190.

20- Schamberger GP, Diez-Gonzalez F. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of food protection*. 2004; 67(3): 486-492.

21- Cutler SA, Lonergan SM, Cornick N, Johnson AK, Stahl CH. Dietary inclusion of colicin E1 is effective in preventing postweaning diarrhea caused by F18-positive *Escherichia coli* in pigs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51(11): 3830-3835.

22- Patton BS, Dickson JS, Lonergan SM, Cutler SA, Stahl CH. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*. 2007; 70(5): 1256-1262.

23- Rijavec M, Budič M, Mrak P, Müller-Premru M, Podlesek Z, Žgur-Bertok D. Prevalence of ColE1-like plasmids and colicin K production among uropathogenic *Escherichia coli* strains and quantification of inhibitory activity of colicin K. *Applied and environmental microbiology*. 2007; 73(3): 1029-1032.

24- Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006; 152(11): 3239-3244.

25- Taghavi S, Kargar M, Doosti A. Molecular Identification of the colicin types in *Escherichia coli* in the Yasuj city. *Armaghane danesh*. 2014; 19(4): 371-9. [In Persian]

Identification of colicinogenic *Escherichia coli* isolates from broiler carcasses and their inhibitory effect on *E. coli* pathotypes

Mohboubeh Bagheri¹, Maziar Jajarmi^{2*}, Reza Ghanbarpour³

1- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bardsir Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

2- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

3- Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Receive: June 30, 2022; Revise: August 21, 2022; Accept: August 30, 2022

Summary

Colicins are antibacterial compounds produced by *Escherichia coli* which give the producing strains the ability to compete ecologically against other bacteria. The aim of this study was to identify *Escherichia coli* strains producing colicin isolated from broiler carcasses by PCR and to investigate the inhibitory effect of colicinogenic strains on different *Escherichia coli* pathotypes. In this study, swab sample was obtained from 110 carcasses of broiler carcasses slaughtered in Kerman industrial slaughterhouse. one confirmed *Escherichia coli* isolate was selected from each carcass. Seven groups of colicin genes including Y.U, E1, V, 5.10.K, E2-9, Ia.Ib and A.N.S4 were screened using PCR and specific primers. Strains containing at least one colicin encoding gene were studied for their inhibitory effect on the growth of various *Escherichia coli* pathotypes. In this study, out of 110 isolates, 54 isolates (49.1%) were positive for at least one of the studied genes. Of the total samples, 33 isolates (30%) were positive for Ia.Ib gene. Also, V and E1 genes with frequencies of 20% (22 isolates) and 9% (10 isolates) were in the next ranks, respectively. The prevalence of A.N.S4 gene was 2.9% (3 isolates) and E2-9 and 5.10.K genes were only detected in 1 isolate (0.9%). The U.Y gene group was not detected in this study. Among 54 isolates with colicin genes, 18 isolates (33.3%) had an inhibitory effect on at least one of the ETEC, EIEC, EHEC, EAEC and EPEC pathotypes. Phenotypically, the most inhibitory effect of colicinogenic strains was observed on ETEC and EAEC pathotypes.

Key words: Broiler, *Escherichia coli*, colicin, pathotypes

مطالعه انگل‌های خونی در گاوهای استان گیلان، ایران

زهرا دربندی^۱، حسین جوان بخت^{۲*} و حمید حسین خضری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳- دانش‌آموخته، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

دریافت مقاله: ۵ اردیبهشت ۱۴۰۱، بازنگری: ۶ تیر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳۱ تیر ۱۴۰۱

چکیده

Theileria Theiler 1906 و *Babesia* Starcovici 1893 از شایع‌ترین انگل‌های خونی در حیوانات اهلی هستند که به‌وسیله کنه‌ها منتقل می‌شوند. این انگل‌ها باعث بروز بایزوزیس و تیلریوزیس شده که به‌وسیله تب و کم‌خونی همولتیک مشخص می‌شوند و ممکن است مرگ فرد آلوده را به دنبال داشته باشند. بنابراین هدف این مطالعه تعیین نرخ آلودگی به انگل‌های *Theileria* spp. و *Babesia* spp. در استان گیلان از ایران بود. در مجموع ۴۰ نمونه خون از ۴۰ گاو مختلف جمع‌آوری شد. اسمیرهای خونی تهیه و رنگ‌آمیزی توسط محلول گیمسا (۱۰ درصد) انجام شد و توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مجموع ۷ نمونه آلوده به انگل بودند. بین آنها ۳ نمونه (۷/۵ درصد) آلوده به انگل *Babesia* spp. و ۲ نمونه (۵ درصد) آلوده به انگل *Theileria* spp. بود و همچنین ۲ نمونه (۵ درصد) آلوده به انگل باکتریایی *Anaplasma* Theiler 1910 بود. در پایان پیشنهاد می‌شود جهت نتایج بهتر هر دو روش مولکولی و مورفولوژی بکار رود.

واژگان کلیدی: *Anaplasma*, *Theileria*, *Babesia* گاو

مقدمه

پاتوژن‌هایی که توسط کنه‌ها منتقل می‌شوند به‌طور گسترده‌ای در دنیا، به‌خصوص در نقاطی که شرایط مناسب برای تکوین و تکمیل چرخه زندگی کنه‌ها وجود دارد، توزیع شده‌اند. این کنه‌ها می‌توانند انسان و سایر جانوران را در معرض گونه‌های مختلف انگل‌های خونی قرار دهند (۱). جنس *Theileria* Starcovici 1893 و *Babesia* Theiler 1906 پروتوزوآهایی هستند که در شاخه آپی کمپلکسا، رده پیروپلازما، و به ترتیب در خانواده *Babesidae* و *Theileridae* قرار می‌گیرند (۲). همه گونه‌های *Theileria* و *Babesia* توسط کنه‌های خانواده ایکسودیپه منتقل می‌شوند. این انگل‌ها دارای یک میزبان بی‌مهره و یک میزبان مهره‌دار هستند و باعث مرگ و میر دام‌ها و ایجاد خسارات اقتصادی زیادی می‌شوند. *Babesia* بازوفیلیک، گلابی شکل و انگل‌های داخل گلبول قرمز بوده که از لحاظ مورفولوژی به دو گونه کوچک و بزرگ قابل تمایز هستند. *Babesia bovis* پیروپلاسمای کوچکی بوده و از لحاظ مورفولوژیکی به سادگی از *Babesia bigemina* که پیروپلاسمای بزرگ‌تری است قابل تشخیص می‌باشد (۱). *Babesia* می‌تواند انسان، گاو، اسب، الاغ و سگ را آلوده کند. از طرف دیگر *Theileria* از لحاظ دامپزشکی دارای اهمیت بیشتری بوده و نشخوارکنندگان را آلوده می‌کند. اسپوروزوئیت‌های *Theileria* از طریق خون‌خواری کنه، وارد خون میزبان مهره‌دار شده و سپس به سلول‌های تک‌هسته‌ای خون (لنفوسیت‌ها) حمله کرده و شیزوگونی را در آن انجام می‌دهند و سپس مرزوئیت‌های حاصل از شیزوگونی به گلبول‌های قرمز حمله کرده و شکل مروگونی را به‌صورت گرد، بیضی یا حلقوی شکل اندازه ۱/۵-۰/۵ میکرومتر در گلبول قرمز ایجاد می‌کنند و سپس با تقسیم دوتایی

دو سلول دختر را ایجاد می‌کنند. همچنین گاهگاهی تقسیم ادامه یافته و ساختار چهارتایی را ایجاد می‌کنند (۳).

Anaplasma Theiler 1910 ارگانیسیم‌هایی کوچک به شکل اجسام کروی، قرمز تا قرمز تیره هستند که در خارج یا داخل گلبول‌های سفید گاو، گوسفند و بز دیده می‌شوند. آنها معمولاً با قطر ۰/۲ تا ۰/۵ میکرون، فاقد سیتوپلاسم هستند. این ارگانیسیم‌ها توسط کنه منتقل می‌شوند. همچنین انتقال ممکن است توسط مگس‌های تابانید و پشه‌ها نیز اتفاق بیفتد. این ارگانیسیم‌ها باعث تب و گاهگاهی کشندگی در میزبان می‌شوند. در زمان تب ۳۰-۴۸ درصد سلول‌ها آلوده به این انگل می‌شوند (۳).

محدوده پراکنش کنه‌های ناقل انگل‌های خونی در حال گسترش بوده و گزارشات جدیدی از شیوع بیماری‌های وابسته به آنها در انسان، حیوانات خانگی و حیوانات وحشی ارائه شده است (۴). دامداری در ایران سابقه دیرینه دارد؛ اما علی‌رغم قدمت طولانی هنوز درصد بالایی از دام‌های کشور به‌صورت سنتی نگهداری می‌شوند که آنها را مستعد به آلودگی به انگل‌های خونی می‌سازد. علی‌رغم مطالعاتی که حاکی از پراکنندگی وسیع انگل‌های خونی بیماری‌زا در ایران است (۵)، هنوز مطالعات کافی از میزان شیوع این انگل‌ها در بیشتر نقاط کشور از جمله در استان گیلان وجود ندارد. لذا در این مطالعه با روش‌های میکروسکوپی انگل‌های خونی و شیوع آنها در جمعیتی از گاوهای استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی بر روی گاوهای منطقه چمخاله از استان گیلان در سال ۱۳۹۹ به‌صورت تصادفی صورت گرفت. در گاوها علائم کلینیکی خاصی دیده نمی‌شد. بلافاصله بعد از خونگیری، گسترش‌های

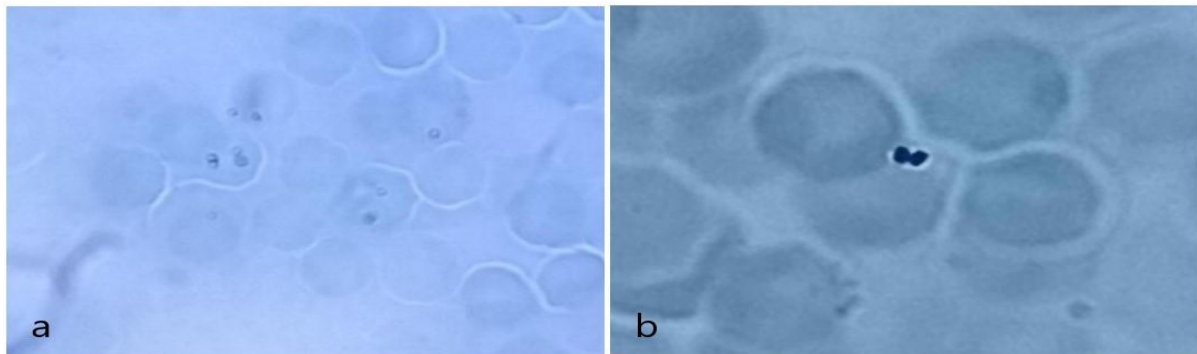
در مجموع از ۴۰ رأس گاو، ۷ رأس آلوده به انگل تشخیص داده شدند (جدول ۱). بررسی انگل *Babesia* spp. نشان داد ۳ رأس گاو آلوده به این انگل بودند (۷/۵ درصد) (شکل ۱a). همچنین بررسی نمونه‌ها نشان داد که ۲ رأس از گاوها آلوده به انگل *Theileria* spp. بودند (۵ درصد). (شکل ۱b) همچنین بررسی جهت انگل‌های باکتریایی نشان داد ۲ رأس گاو آلوده به انگل *Anaplasma* spp. (شکل ۲). هیچ یک از گاوها همزمان آلوده به بیش از یک انگل نبودند. نتایج مربوط به سن و جنسیت در جدول ۱ آمده است.

خونی تهیه شد. گسترش‌ها در هوا خشک شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در متانول مطلق فیکس شد. بعد از آن به مدت ۴۵ دقیقه در گیمسا ۱۰ درصد قرار گرفت. سپس لام‌ها با آب مقطر شسته شدند و در هوای آزاد خشک شدند. لام‌های رنگ شده در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. گونه‌های مختلف انگل خونی طبق Soulsby (۳) مورد شناسایی قرار گرفتند. درصد شیوع، با توجه به تعداد میزبان‌های آلوده محاسبه شد.

نتایج

جدول ۱- نمونه‌های گاوهای آلوده به انگل خونی به تفکیک جنسیت و سن در استان گیلان

<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Theileria</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.	تعداد	
-	-	-	۲	نمونه گاو نر زیر دو سال
-	-	-	۱	نمونه گاو نر بالای ۲ سال
-	-	-	۱۰	نمونه گاو ماده زیر دو سال
۲	۲	۳	۲۷	نمونه گاو ماده بالای دو سال



شکل ۱- گلبول‌های قرمز گاو آلوده به تروفوزوئیت انگل a. *Babesia* spp. و b. *Theileria* spp. در استان گیلان



شکل ۲- گلبول سفید خونی گاو آلوده به انگل *Anaplasma* spp. در استان گیلان

بحث و نتیجه‌گیری

مشکل اساسی برای سلامتی سم‌داران اهلی در ایران بیماری‌هایی است که توسط کنه منتقل می‌شوند (۶). در بین این بیماری‌ها بابزیوز و تیلریوز گاوی در زمره پرشیوع‌ترین و مهم‌ترین از لحاظ اقتصادی می‌باشند. بابزیوز و تیلریوز به‌عنوان بیماری شناخته می‌شوند که توسط کنه‌ها منتقل می‌شوند و کنه‌های آلوده به پروتوزوآهای انگلی که می‌توانند چندین نسل در کنه باقی بمانند و به میزبان‌های مستعد منتقل شوند و در میزبان‌هایی که در شرایط حساس مانند حاملگی، گرسنگی یا سایر بیماری‌ها را دارند می‌توانند به شدت بیماری‌زا و کشنده باشند (۷). بابزیوز و تیلریوز در بیشتر حیوانات اهلی ایران گزارش شده است. بنابراین در مطالعه حاضر تلاش شد گونه‌های انگل خونی به‌خصوص انگل *Theileria* و *Babesia* مورد بررسی قرار گیرند.

در مطالعه حاضر ۷/۵ درصد گاوها آلوده به انگل *Babesia* مورد شناسایی قرار گرفتند. درصد شیوع گزارش شده در این مطالعه پایین‌تر از شیوع انگل خونی *Babesia* در شمال غرب کشور در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی است که ۲۴/۸۳ درصد از نمونه‌ها آلوده به انگل *Babesia bovis* و ۱/۳ از نمونه‌ها آلوده به انگل *Babesia bigemina* بودند (۵). با توجه به اینکه مطالعه پیشین از معنی‌دار بودن شرایط اقلیمی منطقه، فصل نمونه‌برداری، نژاد دام، مجاورت با حیوانات وحشی، نحوه تغذیه و تولید شیر بر روی شیوع *Babesia* در گاوها دارد، شیوع پایین‌تر انگل در استان گیلان می‌تواند تحت تأثیر هر یک از این فاکتورها قرار داشته باشد. با این حال مطالعه مورفولوژیکی بر روی انگل‌های خونی ۳۷۶۱ حیوان اهلی (شامل گاو، گوسفند و بز) در استان مازندران نشان داد که درصد آلودگی به *Babesia* بر روی گاو، گوسفند و بز به ترتیب ۱۸/۱۳ درصد،

۱۶/۰۳ درصد و ۲۲/۲۷ درصد می‌باشد (۸).

بررسی نتایج ارتباط آلودگی به انگل خونی با سن نشان داد که تمام نمونه‌های آلوده، سنی بالای ۲ سال داشته‌اند (جدول ۱)، در حالی که نتایج حاصل از بررسی گاوهای منطقه شمال غرب ایران، آلودگی به انگل خونی با درصد پایین‌تر در نمونه‌های زیر دو سال گزارش شد (۹). همچنین بررسی انگل‌های خونی در گوسفندان پارس‌آباد مغان نشان داد آلودگی در سنین بالا و زیر دو سال تفاوت معنی‌داری نداشت (۱۰). لذا به نظر می‌رسد تعداد کمتر نمونه‌های این مطالعه، دلیل عدم آلودگی به انگل خونی در سنین زیر دو سال باشد.

تیلریوز که به‌وسیله گونه‌های مختلف *Theileria* spp منتقل می‌شود در نشخوارکنندگان، اسب، موش‌های جنگلی و روباه‌ها گزارش شده است که باعث تب و مرگ و میر در این جانوران می‌شود (۱). مطالعه مولکولی بر روی گاوهای استان اصفهان نشان داد که ۴۲ نمونه از ۱۷۶ گاو مورد آزمایش قرار گرفته آلوده به *Theileria* بودند در حالی که هیچ نمونه‌ای آلوده به *Babesia* نشان داده نشد (۱۱). در مطالعه حاضر ۲ نمونه از ۴۰ (۵ درصد) گاو آزمایش شده آلوده به انگل *Theileria* بودند که شیوع پایین‌تر این انگل را منطقه مورد مطالعه استان گیلان نشان می‌دهد.

جنس *Anaplasma* متعلق به خانواده *Anaplasmataceae* به‌طور گسترده‌ای در نقاط گرمسیر، نیمه گرمسیر و حتی معتدله گزارش شده است. این گونه در آفریقا، خاور میانه، خاور دور، جنوب اروپا و در قاره آمریکا گزارش شده است. تا کنون ۶ گونه در جنس *Anaplasma* شناسایی شده که مسئول بیماری همولیتیک آناپلاسموزیس در انسان و حیوان هستند (۳). مطالعه‌ای که توسط واحدی نوری و همکاران (۱۲) در استان گیلان صورت گرفت نشان داد ۳۳ درصد گاوها و ۵ درصد

بیماری‌زای خونی در گاوهای استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف در میزان شیوع این انگل‌های خونی در استان‌های مختلف می‌تواند ناشی از میزان و تنوع ناقل‌ها، همچنین آب و هوا و شرایط نگهداری دام‌ها بستگی داشته باشد (۵). به‌طور معمول گسترش میکروسکوپی به دلیل سریع و ارزان بودن جهت شناسایی آلودگی به انگل‌های خونی استفاده می‌شود. اما در بسیاری از موارد ممکن است آلودگی با شدت پایین در گسترش‌های میکروسکوپی مشاهده نشود (۹). در نتیجه اگر بررسی‌های میکروسکوپی عدم وجود آلودگی به انگل را نشان دهد، جهت اطمینان آزمایشات مولکولی ضروری به نظر می‌رسد.

گوسفندان آزمایش شده، آلوده به انگل *Anaplasma phagocytophilum* بودند. همچنین گاوها از سنین مختلف آلوده به این انگل بودند و با افزایش سن، درصد آلودگی افزایش می‌یافت. با این حال آلودگی با انگل *Anaplasma phagocytophilum* در گوسفندان زیر سه سال مشاهده نشد (۱۲). این انگل عموماً در سلول‌های گرانولوسیت به‌ویژه در نوتروفیل‌ها مشاهده می‌شود. گاو به‌عنوان میزبان اصلی این انگل شناخته می‌شود. در مطالعه حاضر ۵ درصد گاوها آلوده به انگل *Anaplasma* بودند. همچنین آلودگی در سلول‌های نوتروفیل مشاهده شد. در این مطالعه شیوع سه گونه از انگل‌های

References

- 1- Almazan C, Scimeca RC, Reichard MV, Mosqueda J. Babesiosis and Theileriosis in North America. *Pathogens*. 2022; 11:168.
- 2- Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of Cattle. *Parasitol*. 2004; 129: 247–269.
- 3- Soulsby EJJ. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7th ed. Bailliere Tindall, London, UK. 1982; 706-728.
- 4- Bullard JM, Ahsanuddin AN, Perry AM, Lindsay LR, Iranpour M, Dibernardo A, et al. The First Case of Locally Acquired Tick-Borne Babesia Microti Infection in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2014; 25(6): 87–89.
- 5- Rajabi S, Esmailnejad B, Tavassoli M. A molecular study on *Babesia* spp. in cattle and ticks in West-Azerbaijan province, Iran. *Vet Res Forum*. 2017; 8(4): 299-306.
- 6- Terkawi MA, Alhasan H, Huyen NX, Sabagh A, Awier K, Cao S, et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from central region of Syria. *Vet Parasitol*. 2012; 187: 307-311.
- 7- Blood DC, Radostitis OM, Gay CC. Veterinary Medicine. 8th ed., Bailliere Tindall, London, England, 1994, pp: 1171-1179.
- 8- Ziapour SP, Esfandiari B, Youssefi MR. Study of the prevalence of Babesiosis in domesticated animals with suspected signs in Mazandaran province, north of Iran, during 2008. *J Anim Vet Adv*. 2011; 10(6): 712-714.
- 9- Ghadimipour R, Noaman V, Taghizadeh M. Prevalence and risk factors of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle in north-western Iran. *Vet Clin Pathol*. 2020; 54(14): 155-168.
- 10- Dastouri Dastgir Sh, Davoudi J, Bahman Shabestari A. A Study on Babesia Infection in Sheep of Pars Abad Moghan Region, Ardabil Province. *JArUMS*. 2016. 16(2): 151-158.
- 11- Noaman VA. Molecular study on *Theileria* and *Babesia* in cattle from Isfahan province, Central Iran, *J Parasit Dis*. 2013; 37(2): 208-210.
- 12- Vahedi Nouri N, Noaman V, Rahim Abadi E. Molecular identification of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and sheep of Gilan province. *Vet clin pathol*. 2020; 55(3):263-283.

Study of blood parasites in cattle of Guilan province from Iran

Zahra Darbandi¹, Hossein Javanbakht^{2*}, Hamid Hossein khezri³

1- MSC student, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- Graduated, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

Receive: April 25, 2022; Revise: June 27, 2022; Accept: July 22, 2022

Summary

Babesia Starcovici 1893 and *Theileria* Theiler 1906 are the most important endemic blood parasites in domesticated animals. These parasites are transmitted by ticks and can cause clinical babesiosis and theileriosis both characterized by fever, hemolytic anemia which may lead to death. Therefore, the aim of our study is to determine the infection rates of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in Guilan province from Iran. A total number of 40 blood smears were collected from 40 different randomly selected cattle. The blood smears prepared and stained by Gimsa solution (10%) and light microscopic was used to examination of blood smears. The results showed that the number of 7 samples were infected by parasites. Among these, 3 samples (7.5%) were infected with *Babesia* spp. and 2 samples (5%) with *Theileria* spp. Along as 2 samples (5%) with bacterial parasites *Anaplasma* Theiler 1910. In the end, we recommend using both morphological and molecular methods together to get better results.

Keywords: *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, cattle

تالاب میقان استان مرکزی، مرکز ورود ویروس آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5، ایران، ۱۳۹۵

مینو مطهر^۱، هادی کیوانفر^{۲*}، عبدالحمید شوشتری^۳، محمد حسین فلاح مهرآبادی^۳، غلامرضا نیکبخت بروجنی^۴

۱- دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استادیار، بخش بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۴- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۲۲ تیر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۷ تیر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۸ تیر ۱۴۰۱

چکیده

طی دو دهه گذشته، ویروس آنفلوآنزای فوق حاد طیور سویه H5 به دلیل ماهیت زئونوتیک بودن و ایجاد جهش فراوان مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. هدف از مطالعه پیش رو بررسی خصوصیات فیلوژنتیک و مولکولی ژن هم‌اگلوتینین (HA) سویه H5N8 وارد شده به ایران در سال ۱۳۹۵ در تالاب میقان شهرستان اراک استان مرکزی بود. بدین منظور نمونه‌های مربوطه به تخم‌مرغ‌های ۱۴-۱۰ روزه تلقیح شده و پس از استخراج مایع آلانتوئیک و استخراج RNA و انجام PCR و تعیین توالی ژن‌ها، درخت‌های فیلوژنتیک توسط برنامه Mega7 رسم شده و خصوصیات مولکول شامل محل شکست (Cleavage Site) محل اتصال به گیرنده (Receptor binding Site)، محل گلیکوزیل (Glycosylation Site)، محل آنتی‌ژنیک (Antigenic Site) و جهش‌های مرتبط با ژن HA بررسی گردید. بر اساس آنالیز توالی اسید آمینه ژن HA، شامل محل شکست موتیف اسید آمینه پلی‌بازیک PLREKRRKR/GLF، که مشخصه ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد بوده و جهش‌های T156A، S123P، S133A مرتبط با افزایش اتصال به اسید سیالیک پستانداران بود تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن HA، بیانگر طبقه‌بندی این ویروس در کلد (Clade) ۲،۳،۴،۴b بوده و به نظر می‌رسد که ورود این سویه به ایران احتمالاً از طریق مسیر پروازی پرندگان وحشی مهاجر، از غرب آسیا به شرق آفریقا افتاده است.

واژه‌های کلیدی: آنفلوآنزای پرندگان، ایران، فوق حاد

مقدمه

ویروس‌های آنفوآنزای فوق حاد (HPAI) H5N1 (Highly pathogenic avian influenza) آسیایی اولین بار در سال ۱۹۹۶ در چین جدا شدند. (۱) این ویروس‌ها به اوراسیا و آفریقا گسترش پیدا کرده و باعث مرگ و میرهای زیادی در طیور و پرندگان وحشی شده‌اند (۲). ویروس HPAI H5N8 A/duck/Jiangsu/k1203/2010 از دودمان H5N1 آسیایی (ژن HA متعلق به کلد ۲,۳,۴) ابتدا در سال ۲۰۱۰ در بازار پرندگان زنده در شرق چین از اردک‌ها جدا شد (۳, ۴). در سال ۲۰۱۳، بازارهای طیور زنده در شرق چین اولین مکان برای جداسازی ویروس‌های جدید نوتریب H5N8 HPAI بود و سپس ویروس در طیور و پرندگان وحشی در جمهوری کره و ژاپن تشخیص داده شد (۵). در اواخر سال ۲۰۱۴، دوباره به کره جنوبی و ژاپن وارد شدند و سپس در اروپا و آمریکای شمالی شناسایی شدند (۶). گزارش‌های متعددی در مورد ورود HPAI به ایران از سال ۲۰۰۶ منتشر شده است: (H5N8 و H5N1). ساب تایپ H5N1 اولین بار در ۱۳ فوریه ۲۰۰۶ در قوهای وحشی در دو تالاب شمال ایران (مازندران) شناسایی و تأیید شد (۷). در سال ۲۰۱۱ مورد دیگری در روستای بالازرین کلای شهرستان جویبار استان مازندران در اردک‌های اهلی و مرغ‌ها گزارش شد (۸). در سال ۲۰۱۵ ورود مجدد ویروس از طیور بومی روستای نوگردن شهرستان آمل استان مازندران گزارش گردید (۹). همچنین، در نوامبر ۲۰۱۶، HPAI H5N8 اولین بار ورود این ویروس در یک مرغداری تخم‌گذار در استان تهران و سپس در تالاب میقان استان مرکزی شناسایی شد (۱۰).

ویروس‌های آنفلوانزا مرغی نه تنها پاتوژن‌های مهمی برای پرندگان محسوب می‌شوند بلکه در بهداشت عمومی به علت ایجاد عفونت در

جمعیت‌های انسانی نیز مهم هستند (۱۱). بنابراین، نظارت و توصیف مداوم ویروس‌های HPAI که ممکن است تهدیدی برای صنعت طیور تجاری و بهداشت عمومی باشد، برای هرگونه شیوع احتمالی قابل توجه است.

از این رو در این مطالعه برای نخستین بار ژن کامل HA ویروس آنفلوانزای A/goose/Iran-meighan/180/2016 وارد شده به ایران در سال ۱۳۹۵ را از نظر مولکولار فیلوژنتیک و اپیدمیولوژیک مورد بررسی قرار دادیم تا تجزیه و تحلیل این مولکول اطلاعاتی در مورد جزئیات مولکولی، ارتباط با ویروس‌های دیگر جهان و مسیر ورود آنها به کشور و همچنین خطر بالقوه‌ای که ممکن است در برابر صنعت طیور و بهداشت عمومی داشته باشد، فراهم کند و جزء تاریخچه کشور باقی بماند.

مواد و روش کار

الف) نمونه‌برداری و استخراج RNA: در سال ۱۳۹۵ تلفات در تالاب میقان استان مرکزی اتفاق افتاد. مشاهده بالینی و نمونه‌برداری از بافت‌های طحال، نای، ریه، سکوم، مغز و کبد با رعایت پروتکل انجام شد. نمونه‌ها تحت شرایط کنترل شده به آزمایشگاه برده شد. پس از آماده کردن نمونه‌ها، به تخم‌مرغ SPF شرکت Venky هندوستان تلقیح شد. پس از تلفات مایع آلتوئیک برای تعیین سبب تاپینگ این ویروس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از نمونه‌های اصلی هموژنیزه شده برای استخراج RNA با استفاده از کیت (Roche HighPure Viral Nucleic Acid Germany) طبق پروتکل انجام شد. تمام مراحل در زیر هود LEVEL 3 شرکت RADLAB ساخت ایران انجام شد. RNA الیکوت شده و تا هنگام استفاده در ۷۰- ذخیره شد.

ب) RT-PCR و تعیین توالی ژنوم: تکثیر قطعه

گرفت (۱۹-۱۶) شکل‌های محل‌های آنتی‌ژنیک و محل‌های اتصال به گیرنده موجود در ژن HA توسط EzMol webserver رسم شدند (۲۰).

نتایج

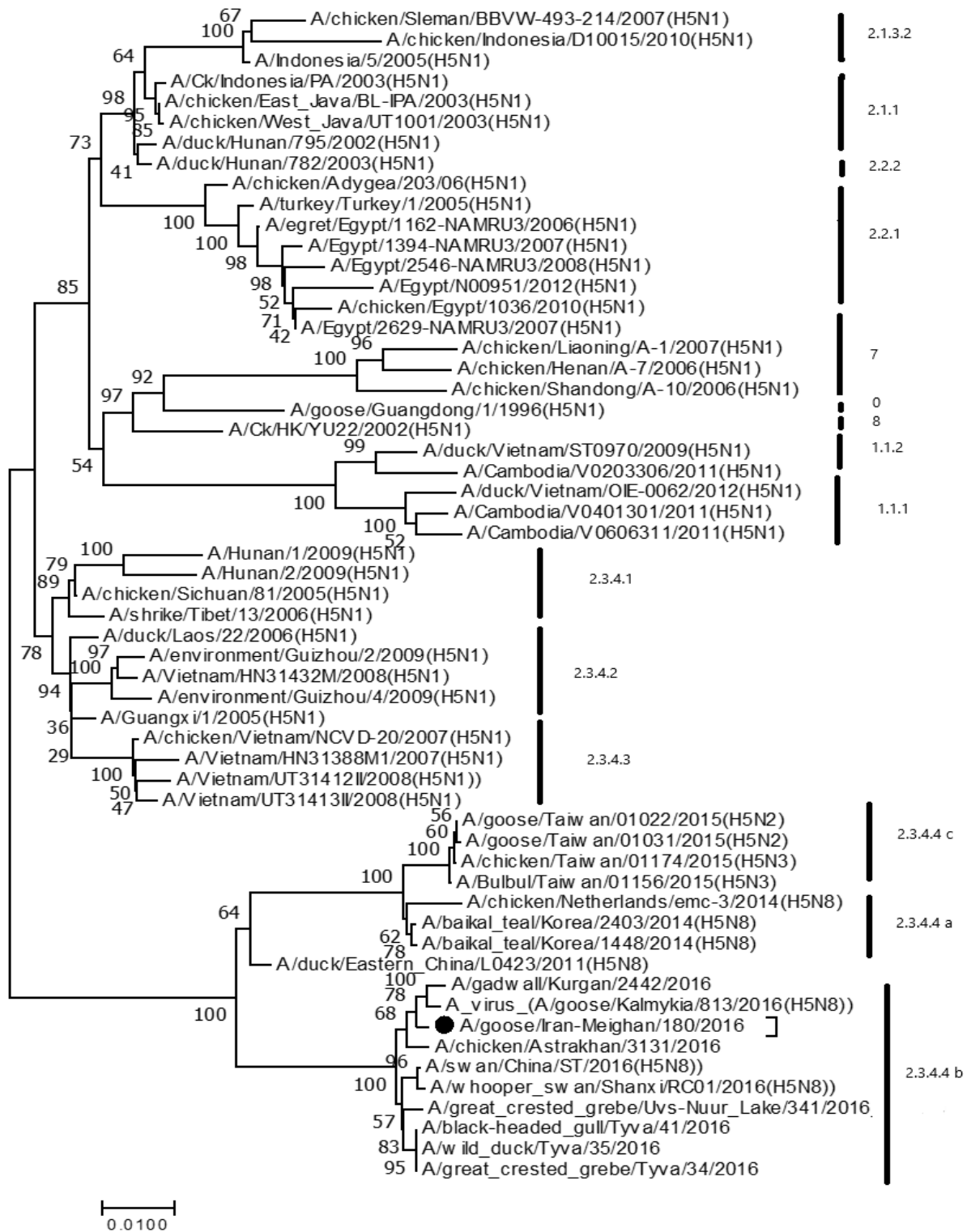
آنالیز فیلوژنیک: تحلیل فیلوژنیک ژن HA ویروس A/goose/Iran-meighan/180/2016 نشان داد که متعلق به کلد b ۴، ۳، ۲ بوده و بررسی درخت فیلوژنیک ژن HA این ویروس نشان داد که ایزوله متعلق به ایران همراه ایزوله‌های جدا شده از شهرهای روسیه A/gadwall/Kurgan/2442/2016، A/goose/Kalmykia/813/2016، و A/chicken/Astrakhan/3131/2016 در یک زیرشاخه قرار گرفت و طبق نتایج Blast بیشترین شباهت توالی نوکلئوتیدی را با ایزوله A/goose/Kalmykia/813/2016 Identity (شناسایی) ۹۰ درصد داشت (شکل ۱).

خصوصیات مولکولی: بر اساس آنالیز توالی اسید آمینه، ویروس A/goose/Iran-meighan/180/2016 دارای یک موتیف اسید آمینه polybasic (PLREKRRKR/GLF) در محل شکست ژن HA در موقعیت اسید آمینه ۳۴۵-۳۳۷ بود. هفت محل گلیکوزیله با موتیف N-X-T/S در موقعیت‌های ۲۷، ۳۹، ۱۸۱، ۲۰۹، ۳۰۲ در قسمت HA1 سر پروتئین‌ها و ۴۹۹ و ۵۵۸ در قسمت HA2 ساقه پروتئین HA شناسایی شد. پروتئین HA دارای اسید آمینه گلوتامین در موقعیت ۲۲۲ و گلايسين در موقعیت ۲۲۴ بوده که از خصوصیات ویروس‌های آنفلوآنزای طیور است. سه جهش S133A، S123P، T156A مرتبط با امکان افزایش اتصال ویروس به گیرنده‌های اسید سیالیک انسان یعنی Gal-6، a2 (SA) در پروتئین HA ویروس مشاهده شد.

کامل ژن HA با استفاده از سیستم تک مرحله RT-PCR با استفاده از کیت RT-PCR titan one step tube شرکت (Roche) آلمان با استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse عمومی Hoffmane انجام شد (۱۲). قطعه DNA توسط کیت Product Purification (Roche, Germany) High Pure PCR kit خالص و تعیین توالی به روش سنگر انجام شد و به ژن بانک ارسال شد (شماره دسترسی: OM980739). همه نمونه‌ها با روش‌های مولکولی توصیه شده توسط سیستم اطلاعات بهداشت جهانی حیوانات (OIE) تست شدند (۱۳).

ج) آنالیز فیلوژنیک: بعد از دریافت جواب سکانس‌ها با استفاده از برنامه BLAST مربوط به NCBI جایگاه هر کدام از ژن‌ها از لحاظ نوع subtype مشخص شد. برنامه Editseq 5.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA) برای مونتاژ و ترجمه توالی نوکلئوتید به توالی پروتئین استفاده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از برنامه MEGA7.0 تراز چندگانه (multiple sequence alignment) شدند و با استفاده از روش Neighbor joining با ۵۰۰ bootstrap درخت‌های فیلوژنیک رسم شدند. برای اطمینان بیشتر از لحاظ نوع کلدها و شماره‌گذاری رزیدوهای (Residues) توالی HA (H5 numbering) با اطلاعات موجود در وبسایت Influenza Resaerch Database (IRD) بررسی شد.

د) آنالیز مولکولی: برای شناسایی محل‌های گلیکوزیله موجود در ژن HA از سیستم NetNGlyc 1.0 server استفاده شد (۱۴). برای شناسایی محل‌های اتصال به گیرنده (Receptor Binding Site) موجود در ژن HA (H3 numbering) (۱۵) و همچنین محل‌های آنتی‌ژنیک (Antigenic Site) موجود در ژن HA (H3 numbering) مورد مطالعه، بر اساس پژوهش‌های انجام شده مورد بررسی قرار



شکل ۱- درخت فیلوژنیک بر اساس ژن HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 روش Neighbor Joining و Bootstarp 500 کشیده شده است.

مطابق با محل Ca در HA H1 و محل A در HA

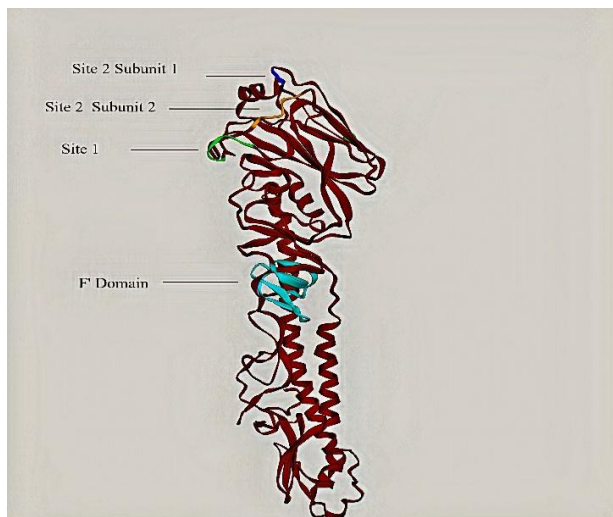
Site 2 و H3 مطابق با محل Sa در HA H1 و محل

محل‌های آنتی‌ژنیک موجود در قسمت HA1

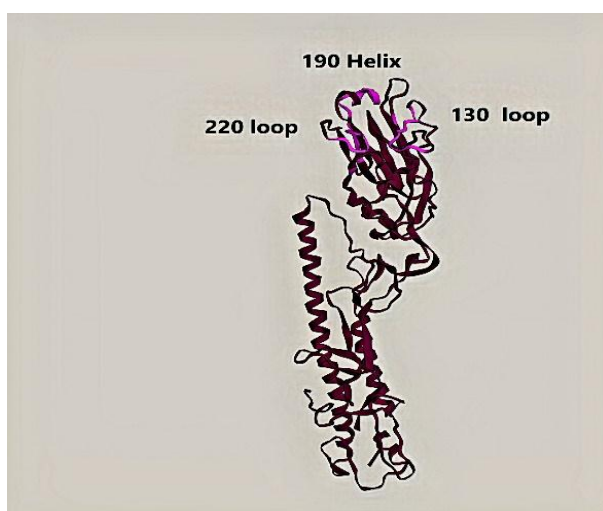
پروتئین HA ویروس مورد مطالعه شامل Site 1

ویروس مورد مطالعه شامل سه فاکتور 130-loop، 190- Helix و 220-Loop قسمت کناره و رزیدوهای محافظت شده Y98, W153, H183 Y195 (H3numbering) پایه را تشکیل می‌دهد. این دو قسمت یک حفره کم‌عمق برای اسید سیالیک تشکیل می‌دهند (شکل ۳ و جدول ۲).

B در HA H3 می‌باشد. علاوه بر این، تحت دامنه ادغام F' (Fusion Subdomain) (ساب دومین β -sheet دو لایه در ناحیه ساقه، رزیدوهای ۲۷۵-۳۰۷) یکی از محل‌های آنتی‌ژنی در HA H5 است. (شکل ۲ و جدول ۱). محل‌های اتصال به گیرنده موجود در قسمت HA1 پروتئین HA



شکل ۲- محل‌های آنتی‌ژنیک موجود در پروتئین مونومر نواری HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16 که با استفاده از برنامه EzMol webserver رسم شده است



شکل ۳- محل اتصال گیرنده موجود در پروتئین مونومر نواری HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16 که با استفاده از برنامه EzMol webserver رسم شده است

جدول ۱ - محل‌های آنتی‌ژنیک موجود در پروتئین HA (H3 numbering) ویروس GS/Iran-meighan/180/16

	(HA1 Head) Site 1 (رزیدو ۱۴۵ - ۱۴۰)	(HA1 Head) Site 2 (رزیدو ۱۵۷ - ۱۵۶) Subunit 1	(HA1 Head) Site 2 (رزیدو ۱۲۳ - ۱۲۹) Subunit 2	F' Domain (HA1 stem)
محل‌های آنتی‌ژنیک				
توالی محل‌های آنتی‌ژنیک	PYQGTP	KK	NHETS	رزیدو ۳۰۷ - ۲۷۵)

جدول ۲ - محل‌های اتصال گیرنده موجود در پروتئین HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16

	130- loop	190- Helix	220- Loop
محل‌های اتصال گیرنده	رزیدو ۱۳۰ - ۱۴۰ (H3numbering)	رزیدو ۱۹۰ - ۱۹۹ (H3numbering)	رزیدو ۲۲۰ - ۲۳۰ (H3numbering)
توالی محل‌های اتصال گیرنده	HETSGVSAACP	EQTNLKYNPT	RSQVNGQRGRM

بحث و نتیجه‌گیری

توصیف صفات اختصاصی ویروس‌های شناسایی شده در هنگام شیوع یک بخش اساسی نظارت بر آنفلوانزا است. از زمان ورود و شناسایی اولین ویروس‌های آنفلوانزای فوق حاد به کشور (۱۳۸۴) تاکنون حدود ۱۶ سال گذشته است. ویروس آنفلوانزای طیور فوق حاد H5 آسیایی اولین بار در سال ۱۹۹۶ در Guangdong چین از غازها جدا شد و در سال ۱۹۹۷ در هنگ‌کنگ دوباره ظاهر شد. (۲۱) نگرانی عمده‌ای به جامعه علمی و بهداشتی جهان تحمیل شد، نگرانی به دلیل این واقعیت بود که ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان پس از سال‌ها گردش در بین میزبان‌های معمول خود، سد گونه‌ای را شکسته و قدرت سازگاری با میزبان جدید یعنی انسان را پیدا کرده‌اند. از هنگام حرکت امواج این ویروس‌های نو ظهور توسط پرندگان مهاجر که نقش کلیدی در گسترش ویروس‌های HPAI ایفا می‌کنند از آسیای جنوب شرقی به طرف غرب (شامل آسیای مرکزی، خاورمیانه، آفریقا و اروپا)، کشور ما نیز ورود این ویروس‌ها (بنا به نوع ویروس غالب در هر موج) را تجربه کرده است. ویروس‌های ایجادکننده شیوع

سال ۲۰۰۶ در ایران متعلق به کلد ۲، ۲ بودند (۷). سال‌های ۲۰۱۱ و ۲۰۱۵ توسط سویه‌های زیرگروه C ۴،۳،۲،۱ جایگزین شدند (۸، ۹). شناسایی ویروس‌های HPAI H5 در سه مرحله‌ی مذکور در این منطقه گویای این مطلب است که شمال ایران می‌تواند به‌عنوان دروازه‌ی ورودی این ویروس‌ها به کشور مطرح باشد. در سال ۲۰۱۶ گزارش تلفات در یک مرغداری تخم‌گذار شهرستان ملارد استان تهران بر اثر HPAI H5N8 دریافت شد و همزمان طغیان دیگری از ویروس‌های HPAI H5N8 کلد b ۴، ۴، ۳، ۲ در تالاب میقان شهرستان اراک استان مرکزی گزارش شد که باعث تلفات غازهای وحشی شد. و همچنین به دنبال آن در سال ۲۰۱۶ مواردی از مشاهده این ویروس در استان‌های قم، کرمانشاه، آذربایجان شرقی، قزوین، گیلان، مازندران و گلستان گزارش شده است (۱۰). کلد ۲،۳،۴ که یکی از ژنوتیپ‌های اصلی در آسیا است همچنان به‌عنوان تحت کلد تغییر و تحول می‌یابد و منجر به تولید کلدهای ۲،۳،۴،۱ و ۲،۳،۴،۲ و ۲،۳،۴،۳ و ۲،۳،۴،۴ می‌شود (۲۲). علاوه بر این، کلد ۲،۳،۴ در ساب‌تایپ‌های مختلف NA (Neuraminidase) مانند

کنند (۲۶). یک مطالعه در مورد تغییر و تحول ژن‌های هم‌گلوپتینین و نورآمینیداز در استان Quebec کانادا طی سه فصل آنفلوآنزا (۲۰۰۰-۱۹۹۷) نشان داد که جایگزینی اسیدهای آمینه در (۱-۴۵/۰ درصد) NA با سرعت کمتری نسبت به (۲-۱ درصد) HA رخ می‌دهد (۲۷). Sandbulte و همکاران نشان دادند که دریافت آنتی‌ژنیک در NA کندتر و متفاوت از دریافت آنتی‌ژنیک HA در میان ویروس‌های واکسن آنفلوآنزای فصلی H1N1 و H3N2 است (۲۸). یک مطالعه در مورد سکانس‌های کامل ژنوم ویروس‌های آنفلوآنزای (H3N2) A که بین سال‌های ۱۹۶۸ تا ۲۰۱۱ در گردش بودند ثابت کرده است که تعویض اسید آمینه در زیرواحد HA1 با حداکثر میزان ۳-۱۰ × ۱۴/۹ سایت / سال در مقایسه با ۳-۱۰ × ۹/۱ سایت / سال میزان جایگزینی در NA رخ داده است (۲۹).

محل شکست (Fusion Peptide) دارای بیش از دو اسید آمینه بازی (Polybasic) مشخصه سویه‌های فوق حاد، در ژن HA ویروس شناسایی شده ما چنین موتیفی داشت (PLREKRRKR/GLF) اما با ایزوله‌های فوق حاد سال‌های قبل ایرانی ۲۰۱۵ و ۲۰۱۱ (PQRERRRK-R/GLF) (۸، ۹) و ۲۰۰۶ (PQGERRRKKR G) (۷) متفاوت بود. پیش از این در طیور از جمله مرغابی، مرغ، قرقاول، حواصیل، غاز و بلدرچین میزبان ویروس‌های حاوی موتیف RERRR-KR نشان داده شده است، اما اثر حذف یک رزیدو در موتیف پلی‌بازیک بر روی محدوده میزبان ناشناخته است (۳۰، ۳۱). همچنین این نتایج با یافته‌های هیستوپاتولوژیک و مشاهده ضایعات گسترده به‌ویژه در اندام‌های حیاتی مانند مغز و قلب پرندگان مرده که ویروس‌ها از آنها شناسایی شد مطابقت داشت. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ گزارش شد که ویروس‌های کلد ۱،۱ و

H5N2، H5N5 و H5N8 ظاهر می‌شود (۲۳). مطالعه فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که ویروس‌های جدید HPAI H5N8 ممکن است در چین منشأ گرفته و در نتیجه انتشار جغرافیایی جهانی ویروس از طریق مهاجرت پرندگان وحشی به سمت غرب گسترش یافته باشند (۲۴). آزمایش نمونه‌های جمع‌آوری شده در اواخر ماه می و اوایل ژوئن ۲۰۱۶ طی یک بررسی برای ویروس‌های بیماری آنفلوآنزای طیور و نیوکاسل در Ubsu-Nur، در مرز بین مغولستان غربی و جمهوری Tyva در روسیه، منجر به شناسایی ویروس HPAI H5N8 متعلق به کلد ۲،۳،۴،۴ شد (۲۵). طبق یافته‌های فیلوژنتیک ویروس‌های وارد شده به ایران در سال ۲۰۱۶ در کلد ۲،۳،۴،۴ گروه b قرار گرفتند محل ورود اولیه ویروس A/goose/Iran-Meighan /180/2016 تالاب میقان استان مرکزی بوده است و شباهت ژن HA ویروس مد نظر ما با ایزوله‌های A/gadwall/Kurgan/2442/2016، A/goose/Kalmykia/813/2016 و A/chicken/Astrakhan/3131/2016 روسیه نشان می‌دهد که این ویروس‌ها توسط پرندگان مهاجر از مسیر هوایی شرق آسیا به سمت آفریقا، در مسیر احتمالاً وارد کشور شده‌اند (شکل ۱). جالب است که از سال ۲۰۱۶، بیشتر ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی H5 که در کشور کشف شده است دیگر با N1 همراه نیست (۱۰) توضیح علمی این است که H5 و N1 به‌طور مساوی جهش نکرده‌اند و هم‌گلوپتینین‌های جدید H5 نمی‌توانند تعادل عملکردی با نورآمینیداز N1 داشته باشند، بنابراین، ساب‌تایپ‌های تازه ظهور یافته مانند H5N6 و H5N8 به واریانت‌های غالب تبدیل شده‌اند. تغییرات در پروتئین‌های غشایی HA و NA باعث می‌شود که سویه‌های واکسن به‌طور مداوم به روز شوند و چالش‌هایی برای طراحی واکسن‌های مؤثر ایجاد

۲،۳،۲،۱ و ۲،۳،۴ و ۲،۳،۴،۴، و ۲،۳،۴،۴ الگوهای واکنش متفاوتی به پنل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Monoclonal Antibodies) داشتند و آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های کلد ۲،۳،۴،۴ مشابه بوده اما با کلد‌های دیگر به‌ویژه، آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های کلد ۲،۳،۴،۴ با ویروس‌های کلد ۲،۳،۴ و ۲،۳،۲،۱ متفاوت بود، که نشان می‌دهد H5HPAIV اخیر از نظر تفاوت آنتی‌ژنیکی تغییر و تحول یافته‌اند. علاوه بر این، واکنش آنتی‌سرم نشان داد که آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های کلد ۲،۳،۴،۴ اندکی بین گروه‌های A، B و C تفاوت داشت (16). مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ در مورد نقشه‌برداری اپی‌توپ مولکول HA یک ویروس آنفلوآنزا فوق حاد H5N1 با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تغییرات آمینو اسید سه گروه آنتی‌بادی مونوکلونال را نشان داد چهار آنتی‌بادی مونوکلونال با مجموعه اپی‌توپ مطابق با محل آنتی‌ژنیک H3 B و محل H1 Sa، دو آنتی‌بادی مونوکلونال با مجموعه اپی‌توپ مطابق با محل آنتی‌ژنیک H3 A و دو آنتی‌بادی مونوکلونال با دو محل آنتی‌ژنیک کاملاً متمایز واکنش نشان دادند (۱۷). همچنین مطالعه دیگری بر روی ساختار محل‌های آنتی‌ژنیک در مولکول هم‌گلوتینین ویروس آنفلوآنزای مرغی H5 و تنوع فنوتیپی موتانت‌های فراری انجام گرفت، تعیین توالی نشان داد که تغییرات آمینو اسید به دو محل آنتی‌ژنیک تقسیم شدند. همچنین مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۲ بر روی ساختار محل‌های آنتی‌ژنیک در مولکول هم‌گلوتینین ویروس آنفلوآنزای مرغی H5 و تنوع فنوتیپی موتانت‌های فراری انجام گرفت، تعیین توالی نشان داد که تغییرات آمینو اسید به دو محل آنتی‌ژنیک تقسیم شدند، یکی با محل A در H3 HA مطابقت داشت و دیگری شامل مناطقی بود که در توالی اسیدهای آمینه از هم جدا شده‌اند اما از نظر توپوگرافی در ساختار سه بعدی نزدیک هستند و تا حدی در واکنش با mAbs همپوشانی داشتند. این

سایت تا حدی با سایت B در ساختار H3 مطابقت داشت. همچنین شامل منطقه ای بود که در محل B دخیل نبوده و تا حدی با محل Sa در HA H1 و یک منطقه آنتی‌ژنی در HA H2 هم‌پوشانی داشت (۱۸). بنا به استناد مطالعات انجام شده توالی محل‌های آنتی‌ژنیک ژن HA در جدول ۱ نشان داده شده است. در مطالعه مروری که در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، گزارش شده است که اگرچه توالی بخش‌های 130-loop و 190-helix و 220-loop قسمت کناره و رزیوهای محافظت شده 98-Tyr، 183-His، 153-Trp و 195-Tyr قسمت مرکز در محل‌های اتصال به گیرنده در رأس دیستال غشاء هر مونوم در بین ساب‌تایپ‌ها و میزبان‌های مختلف، متفاوت است اما ساختار هر یک از این سه قسمت مشابه هستند (۱۵) بنا به استناد مطالعات انجام شده توالی محل‌های اتصال به گیرنده ژن HA در جدول ۲ نشان داده شده است طبق گزارشات برخی جهش‌ها مانند Q222L، T156A G224S در ژن HA که امکان اتصال ویروس به گیرنده‌های اسیدسیالیک مربوط به انسان SA-a-2,6، Gal را افزایش می‌دهند (۳۹-۳۲). ویروس وارد شده به ایران در سال ۲۰۱۱ دارای جهش D94N (۸) و ویروس وارد شده ۲۰۱۵ دارای جهش‌های S133A و T156A بودند (۹) بررسی ما نشان داد که ویروس شامل سه جهش S133A، S123P و T156A که باعث تغییر میل اتصال HA به گیرنده‌های پستانداران می‌شود بوده، ترجیحاً به اسیدسیالیک متصل به 2,3- α متصل شده و جزء ویروس‌های آنفلوآنزای طیور می‌باشد.

کرد و همکاران شش محل گلیکوزیله با موتیف N-X-T/S (۸) و یگانی و همکاران هفت محل گلیکوزیله در موقعیت‌های ۳۰۲، ۱۸۱، ۱۵۶، ۳۹، ۲۶ و ۵۵۸ در ژن HA گزارش کردند (۹). ویروس شناسایی شده ما دارای هفت

شده با کاهش میل اتصال گیرنده HA جبران می‌شود که پروتئین HA ما در این موقعیت دارای گلیکوزیلاسیون نبود.

نتیجه‌گیری

در نتیجه بررسی فیلوژنیک نشان داد ویروس A/goose/Iran-meighan/180/2016 کلد H5N8 ۲،۳،۴،۴ b پرندگان مهاجر از مسیر هوایی شرق آسیا به سمت آفریقا، در مسیر احتمالاً وارد کشور شده‌اند. بررسی جهش‌ها نشان می‌دهد که این ویروس‌ها هنوز هم میزبان طیور را ترجیح داده و احتمالاً تا حدی در برابر داروهای ضد ویروسی مقاوم هستند. نظارت مستمر هم در طیور و هم در پرندگان وحشی به ویژه در شمال ایران برای جلوگیری از شیوع بیشتر لازم است. علاوه بر این، بررسی الگوهای موجود که قبل از وقوع آنها در ایران قابل پیش‌بینی است، پیشنهاد می‌شود.

محل glycosylation در موقعیت‌های ۲۷، ۳۹، ۱۸۱، ۲۰۹، ۳۰۲ (HA1) و همچنین ۴۹۹ و ۵۵۸ (HA2) بود. مشخص شده است که کربوهیدرات اضافی می‌تواند اثرات مثبت و منفی بر روی ویروس داشته باشد (۴۰). وابستگی متقابل بین گلیکوزیلاسیون HA و طول ساقه NA وجود دارد (۴۱) یک ویروس دارای HA با کربوهیدرات کم می‌تواند محکم به گیرنده‌ای که برای انتشار ذرات نیاز به فعالیت NA بیشتر دارد، متصل شود. متقابلاً، HA با گلیکوزیلاسیون گسترده تر، به‌طور ضعیف با گیرنده‌ها اثر متقابل دارد و به فعالیت NA کمتری نیاز دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که ویروس‌های آنفلوآنزا H5N1 با حذف ۲۰ اسید آمینه در منطقه ساقه دارای گلیکوزیلاسیون در ۱۷۰aa یا ۱۶۹aa هستند که میل اتصال HA را برای اسیدهای سیالیک کاهش می‌دهد (۴۲). بنابراین، کمبود فعالیت NA اعطا شده توسط ساقه پروتئین کوتاه

References

- 1- Xu X, Subbarao K, Cox NJ, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology*. 1999; 261(1): 15-9.
- 2- Cattoli G, Fusaro A, Monne I, Capua I. H5N1 virus evolution in Europe—an updated overview. *Viruses*. 2009; 1(3): 1351-63.
- 3- Zhao K, Gu M, Zhong L, Duan Z, Zhang Y, Zhu Y, et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Veterinary microbiology*. 2013; 163(3-4): 351-7.
- 4- Li J, Gu M, Liu D, Liu B, Jiang K, Zhong L, et al. Phylogenetic and biological characterization of three K1203 (H5N8)-like avian influenza A virus reassortants in China in 2014. *Archives of virology*. 2016; 161(2): 289-302.
- 5- Wu H, Peng X, Xu L, Jin C, Cheng L, Lu X, et al. Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses in domestic ducks, eastern China. *Emerging infectious diseases*. 2014; 20(8): 1315.
- 6- Lee EK, Lee YN, Song BM, Heo GB, Lee HS, Lee YJ. Pathogenesis of Multiple Subgroups of Clade 2.3. 4.4. *Influenza A (H5N8) Virus in Mice and Ferrets*. 2016: 274-5.
- 7- Vascellari M, Hablolvarid M, Shoushtari A, Hedayati A. Mortality of wild swans associated with naturally infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Iran. *Archives of Razi Institute*. 2007; 62(4): 207-13.
- 8- Kord E, Kaffashi A, Ghadakchi H, Eshratbadi F, Bameri Z, Shoushtari A. Molecular characterization of the surface glycoprotein genes of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses detected in Iran in 2011. *Tropical animal health and production*. 2014; 46(3): 549-54.
- 9- Yegani S, Shoushtari A-H, Eshratbadi F, Molouki A. Full sequence analysis of hemagglutinin and neuraminidase genes and proteins of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus detected in Iran, 2015. *Tropical animal*

health and production. 2019; 51(3): 605-12.

10- OIE. World Organisation for Animal Health, 2018. OIE Situation Report for Avian Influenza. 2018

11- Qi X, Li X, Rider P, Fan W, Gu H, Xu L, et al. Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from raccoon dogs in China. *PLoS one*. 2009; 4(3): e4682.

12- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster R, Perez D. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*. 2001; 146(2275): 89.

13- Stear MJ. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) 5th Edn. Volumes 1 & 2. World Organization for Animal Health 2004. ISBN 92 9044 622 6. € 140. *Parasitology*. 2005; 130(6): 727.

14- Gupta R, Brunak S, editors. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*. 2001.

15- de Graaf M, Fouchier RA. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO journal*. 2014; 33(8): 823-41.

16- Ohkawara A, Okamatsu M, Ozawa M, Chu DH, Nguyen LT, Hiono T, et al. Antigenic diversity of H5 highly pathogenic avian influenza viruses of clade 2.3. 4.4 isolated in Asia. *Microbiology and immunology*. 2017; 61(5): 149-58.

17- Kaverin NV, Rudneva IA, Govorkova EA, Timofeeva TA, Shilov AA, Kochergin-Nikitsky KS, et al. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *Journal of virology*. 2007; 81(23): 12911-7.

18- Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Varich NL, Lipatov AS, Smirnov YA, et al. Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *Journal of General Virology*. 2002; 83(10): 2497-505.

19- Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *Embo j*. 2002; 21(5): 865-75.

20- Reynolds CR, Islam SA, Sternberg MJ. EzMol: a web server wizard for the rapid visualization and image production of protein and

nucleic acid structures. *Journal of molecular biology*. 2018; 430(15): 2244-8.

21- Sonnberg S, Webby RJ, Webster RG. Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus research*. 2013; 178(1): 63-77.

22- WHO/OIE/FAO. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): Updated nomenclature. Influenza and Other Respiratory Viruses 6,1-5. H5N1 Evolution Working Group (2012)

23- Smith GJ, Donis RO. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015; 9(5): 271-6.

24- Lee D-H, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song C-S, Swayne DE. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds. *Journal of virology*. 2015; 89(12): 6521-4.

25- FAO. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations 2016. H5N8 highly pathogenic avian influenza (HPAI) of clade 2.3.4.4 detected through surveillance of wild migratory birds in the Tyva Republic, the Russian Federation – potential for international spread 2016. Rome: FAO. pdf. Accessed 11 Nov 2016 2016.

26- Shil P, Chavan SS, Cherian SS. Antigenic variability in Neuraminidase protein of Influenza A/H3N2 vaccine strains (1968–2009). *Bioinformatics*. 2011; 7(2): 76.

27- Abed Y, Hardy I, Li Y, Boivin G. Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A: H3N2 viruses isolated in Canada. *Journal of medical virology*. 2002; 67(4): 589-95.

28- Sandbulte MR, Westgeest KB, Gao J, Xu X, Klimov AI, Russell CA, et al. Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(51): 20748-53.

29- Westgeest KB, Russell CA, Lin X, Spronken MI, Bestebroer TM, Bahl J, et al. Genomewide analysis of reassortment and evolution of human influenza A (H3N2) viruses circulating between 1968 and 2011. *Journal of virology*. 2014; 88(5): 2844-57.

30- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens,

and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of virology*. 1999; 73(2): 1146-55.

31- Li K, Guan Y, Wang J, Smith G, Xu K, Duan L, *et al*. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 2004; 430(6996): 209-13.

32- Su Y, Yang H-Y, Zhang B-J, Jia H-L, Tien P. Analysis of a point mutation in H5N1 avian influenza virus hemagglutinin in relation to virus entry into live mammalian cells. *Archives of virology*. 2008; 153(12): 2253-61.

33- Burke DF, Smith DJ. A recommended numbering scheme for influenza A HA subtypes. *PloS one*. 2014; 9(11): e112302.

34- Gohrbandt S, Veits J, Hundt J, Bogs J, Breithaupt A, Teifke JP, *et al*. Amino acids adjacent to the haemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5. *Journal of General Virology*. 2011; 92(1): 51-9.

35- Ibrahim E, Sirawan A, El-Bazzal B, El Hage J, Abi Said M, Zaraket H, *et al*. Complete genome sequence of the first H5N1 avian influenza virus isolated from chickens in Lebanon in 2016. *Genome announcements*. 2016;4(5):e01062-16.

36- Linster M, van Boheemen S, de Graaf M, Schrauwen EJ, Lexmond P, Mänz B, *et al*. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*. 2014; 157(2): 329-39.

37- Lee C-W, Suarez DL, Tumpey TM, Sung H-W, Kwon Y-K, Lee Y-J, *et al*. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *Journal of virology*. 2005; 79(6): 3692-702.

38- Yang H, Carney PJ, Mishin VP, Guo Z, Chang JC, Wentworth DE, *et al*. Molecular characterizations of surface proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent H5Nx avian influenza viruses. *Journal of virology*. 2016; 90(12): 5770-84.

39- Nguyen HT, Nguyen T, Mishin VP, Sleeman K, Balish A, Jones J, *et al*. Antiviral susceptibility of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses isolated from poultry, Vietnam, 2009–2011. *Emerging infectious diseases*. 2013; 19(12): 1963.

40- Vigerust DJ, Shepherd VL. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in microbiology*. 2007; 15(5): 211-8.

41- Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk H-D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *Journal of virology*. 2000; 74(14): 6316-23.

42- Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, *et al*. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PloS one*. 2009; 4(7): e6277.

Meighan Wetland of Markazi Province, Entrance Center of Avian Influenza Highly pathogenic virus H5, Iran, 2016

Minoo Motahhar¹, Hadi Keyvanfar^{2*}, Abdolhamid Shoushtari³, Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi³, Gholamreza Nikbakht Brujeni⁴

1- PhD Student in Virology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

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

3- Assistant Professor, Department of Avian Diseases Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

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

Receive: July 13, 2022; Revise: July 18, 2022; Accept: July 19, 2022

Summary

During the past two decades, the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus has received considerable attention due to its zoonotic and mutative features. Purpose of the leading study is molecular and phylogenetic characteristics of hemagglutinin (HA) gene of H5N8 strain identified in Meighan wetland of Arak city, Markazi province were investigated. For this purpose, samples were inoculated with embryonic eggs of 14-10 days and after extraction of allantoic fluid and RNA extraction and PCR and sequencing of genes, phylogenetic trees were drawn by Mega7 program and molecular properties including Cleavage site, Glycosylation site, Antigenic site, Receptor Binding site and HA gene-related mutations were investigated. Based on the analysis of the amino acid sequence of the HA genes, the cleavage site of the gene includes the PLREKRRKR / GLF polybasic amino acid motif, which is a characteristic of highly pathogenic influenza viruses. The HA gene of two viruses had T156A, S123P, S133A mutations associated with the increased mammalian sialic acid binding. Phylogenetic analysis of the HA gene of the virus studied in this study indicated the classification of this virus in the 2.3.4.4 b Clade. It seems that the introduction of these H5N8 HPAI strains in Iran probably occurred through the West Asia-East African flyway by wild migratory aquatic birds.

Key words: Avian influenza, Highly pathogenic, Iran

بررسی شیوع سه ژن NDM-1، oqxA و oqxB در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه (*Klebsilla pneumoniae*) جدا شده از نمونه‌های ادراری

راضیه زاهدی نسب^۱، سیده پریسا حسنین^{۲*}، احمد راشکی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

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

دریافت مقاله: ۲۹ مهر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۰ آبان ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۷ آبان ۱۴۰۱

چکیده

بتالاکتامازها و پمپ‌های ترشحی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری کلبسیلا پنومونیه هستند. با توجه به شیوع بالای ژن‌های ایجاد کننده مقاومت و گسترش عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت ادراری ناشی از آن، هدف از این مطالعه بررسی میزان فراوانی ژن‌های NDM-1، oqxA و oqxB در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های ادراری با استفاده از روش PCR بود. استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر روی DNA ۹۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که فراوانی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شامل oqxA، oqxB و NDM-1 به ترتیب ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴ درصد)، ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴ درصد) و ۸۴ ایزوله (۸۸/۴۲ درصد) ارزیابی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که شیوع ژن‌های مرتبط با مقاومت به آنتی‌بیوتیک در این مطالعه نگران کننده است و مدیریت تجویز آنتی‌بیوتیک برای کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار باکتری‌های مقاوم و شناسایی ایزوله‌های مقاوم به دارو با استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR ضروری است.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت ادراری، NDM-1، oqxA، oqxB

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به عنوان فلور نرمال در دستگاه گوارش یافت می‌گردد (۱). از بین گونه‌های مختلف این باکتری، کلبسیلا پنومونیه شایع‌ترین و مهم‌ترین گونه می‌باشد. این گونه یکی از مهم‌ترین علل عفونت‌های بیمارستانی (۲) به خصوص عفونت ادراری است (۳). عفونت دستگاه ادراری شایع‌ترین عفونت ثانویه در انسان است. باکتری‌های روده بزرگ، از جمله کلبسیلا پنومونیه عامل اصلی عفونت‌های دستگاه ادراری هستند. وقوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشکل اصلی در درمان عفونت‌ها است. بتالاکتامازها و پمپ‌های افلاکس مکانیسم‌های دفاعی اصلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی کلبسیلا پنومونیه را تشکیل می‌دهند (۴). مقاومت آنتی‌بیوتیکی، توانایی یک میکروارگانیسم برای توقف اثر یک آنتی‌بیوتیک و یک علت عمده شکست در درمان بیماری‌های عفونی است که سبب افزایش شیوع بیماری، مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمان است (۵). بتالاکتامازها، به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی، نمونه عالی از تکامل مکانیسم مقاومت هستند (۶). در دهه‌های گذشته استفاده بیش از حد و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام امکان تکامل و انتشار بتالاکتامازهایی مانند NDM* را فراهم کرده است اولین NDM-1، برای اولین بار در یک سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمار سوئدی هندی تبار که به دلیل عفونت ادراری در دهلی نو هند بستری شده بود شناخته شد. ژن کدکننده آنزیم NDM-1 بر روی کروموزوم باکتریایی شناخته شده است با این حال، عناصر متحرک مانند پلاسمیدها نقش عمده‌ای در گسترش این ژن دارند (۷). NDM-1 آنزیمی با دو یون روی در جایگاه

فعال خود است که پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را می‌شکند و در برابر کلاس‌های اصلی بتالاکتام مقاومت ایجاد می‌کند (۸). یون‌های روی با فعال کردن یک مولکول آب شروع به هیدرولیز می‌کنند و منجر به تشکیل پروتون و یون هیدروکسید فعال می‌شوند که این یون هیدروکسید به گروه کربونیل بتالاکتام حمله می‌کند که منجر به هیدرولیز آن می‌شود (۷). علاوه بر آنزیم NDM-1، پمپ افلاکس OqxAB به‌عنوان مکانیسم مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کلبسیلا پنومونیه نقش مهمی دارد (۹). پمپ‌های افلاکس از دیگر عوامل اصلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها هستند که به‌طور مؤثری در هنگام درمان عفونت‌های باکتریایی فعالیت می‌کنند. پمپ‌های افلاکس پمپ‌های پروتئینی هستند که مواد سمی تقریباً تمام کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی را از درون سلول به فضای خارج سلولی منتقل می‌کنند (۱۰). OqxAB (پمپ دفعی کینولون/اکیندوکس) در ابتدا بر روی پلاسمید pOLA52 در سویه اشرشیاکلی شناسایی شد (۱۱). وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون دارد و قابل انتقال به سایر باکتری‌ها می‌باشد (۱۲). OqxAB، پمپ افلاکس غالب موجود در کلبسیلا پنومونیه است که در برابر چندین آنتی‌بیوتیک از جمله کینوکسالین، کینولون‌ها، فلوروکینولون‌ها، کلرامفنیکل، تری‌متوپریم، نیتروفورنتوئین و تیجسیکلین مقاومت ایجاد می‌کند (۱۳). پمپ افلاکس OqxAB به خانواده RND[□] تعلق دارد (۱۴). این پمپ از دو ژن oqxA و oqxB تشکیل شده است که هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید قرار دارند و قابل انتقال به باکتری‌های دیگر می‌باشد (۱۵). بیان پمپ توسط RarA به‌عنوان یک فعال‌کننده و OqxR به‌عنوان یک مهارکننده تنظیم می‌شود (۱۶). بنابراین هدف از

†Resistant Nodulation Division

*New-delhi-methallo-B-lactamase

اساس توالی پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ میزان فراوانی ژن‌های NDM-1، oqxA و oqxB با استفاده از واکنش PCR انجام پذیرفت.

انجام مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های NDM-1، oqxA و oqxB در ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه جدا شده از نمونه‌های ادراری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: ۹۵ ایزوله کلبسیلاپنومونیه که قبلاً از نمونه‌های ادراری جدا شده‌اند و در دمای ۸۰- نگهداری شده بودند در محیط مک‌کانکی آگار (Merk، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و برای استخراج DNA استفاده شد.

استخراج DNA و انجام PCR ابتدا ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB* به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. از باکتری‌های رشد یافته DNA ژنومیک به روش جوشاندن استخراج گردید. بدین صورت که ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری را به مدت ۱ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از دور ریختن مایع رویی رسوب حاصل دو بار با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر PBS1x شستشو داده شد. در این مرحله به رسوب، ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد داخل ترمومیکسر (اپندورف، آلمان) قرار گرفت. مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی DNA به تیوب استریل منتقل و برای آزمایشات بعدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کیفیت DNA استخراج شده و غلظت با استفاده از دو روش الکتروفورز نمونه‌های DNA ژنومیک بر روی ژل آگارز ۱ درصد و اندازه‌گیری جذب نوری آنها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. بر

* Luria-Bertani broth

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵'-۳')	طول
OqxA – F	TAACGGTCGCATTGAAGC	۱۸
OqxA – R	GA GACGAGGTTGGTATGGAC	۲۰
OqxB – F	ACGACTCGCTGTATATGC	۱۸
OqxB – R	GCGTTAATGGAGATCAGGAA	۲۰
NDM-1 – F	TGGCAGCACACTTCCTATCTC	۲۱
NDM-1 – R	GGCAAGCTGGTTCGACAA	۱۸

دقیقه الکتروفورز شدند و سپس با دستگاه gel doc (اپندورف، آلمان) بررسی شدند. اندازه قطعات تکثیر شده با کمک مارکر ۱۰۰bp تولید شرکت سیناکلون مقایسه و مشخص شد. برای تحلیل داده‌های آماری در این مطالعه از نرم‌افزار Excell استفاده شد.

بدین منظور ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۸ میکرولیتر میکس ماستر مخلوط و واکنش PCR طبق شرایط برنامه دمایی برای هر سه ژن در ۳۰ سیکل انجام شد. سپس محصولات PCR در ژل آگاروز ۲ درصد قرار گرفته و با ولتاژ ۷۵ به مدت ۶۰

جدول ۳ - شرایط چرخه دمایی انجام واکنش PCR ژن‌های oqxA، oqxB و NDM-1

مراحل	دما (درجه)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
Intital Denaturing	۹۴° C	۵Min	۱
Denaturing	۹۴° C	۱Min	۳۰
Annealing	oqxA ۵۴° C oqxB ۵۵/۵° C NDM-1 ۵۷/۹° C	۳۵s	۳۰
Extension	۷۲° C	۲۵s	۳۰
Final Extension	۷۲° C	۱۰Min	۱

بین ایروله‌های مورد بررسی ژن کدکننده آنزیم NDM-1 بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. شکل ۱، فراوانی هر یک از ژن‌ها را در بین ۹۵ نمونه ایزوله کلبسیلا پنومونیه و شکل ۲ تصویر ژل الکتروفورز ۲ درصد محصولات PCR را نشان می‌دهد.

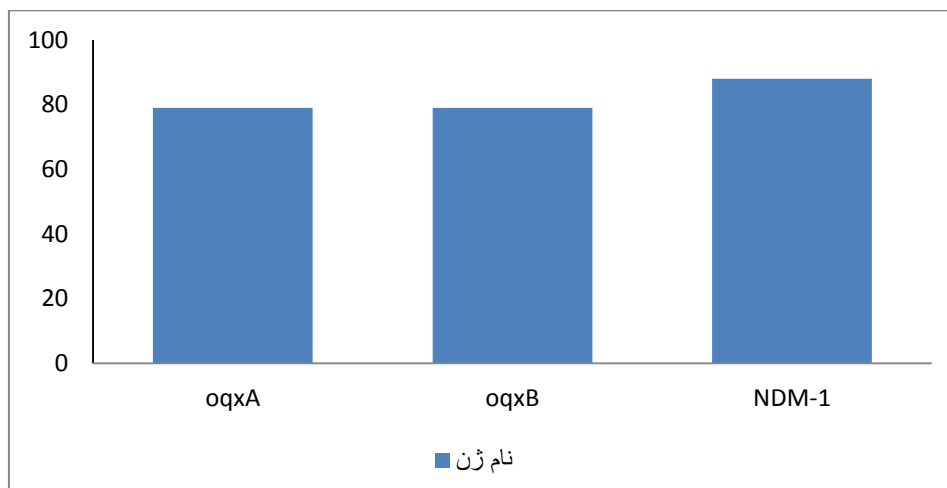
نتایج

با انجام PCR روی DNA های استخراج شده از ۹۵ ایزوله مورد بررسی به ترتیب ۸۴ ایزوله (۸۸/۴۲)، ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴) و ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴) حاوی ژن NDM-1، oqxA و oqxB بودند. نتایج حاصل از PCR ژن‌های NDM-1، oqxA و oqxB در جدول ۵ نشان داده شده است. این مطالعه نشان داد که در

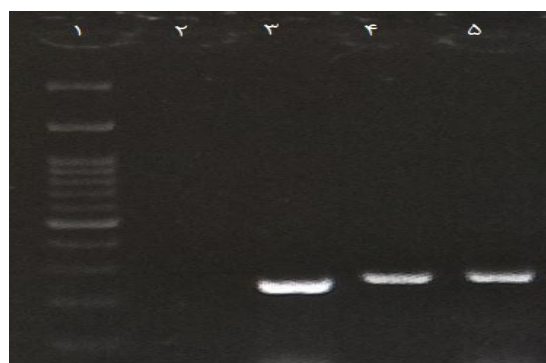
جدول ۵ - درصد فراوانی ژن‌های مورد مطالعه

تعداد نمونه	فراوانی	اندازه توالی	ژن
-------------	---------	--------------	----

NDM-1	۲۷۳	۸۸/۴۲	۹۵
oqxA	۲۴۹	۷۸/۹۴	۹۵
oqxB	۲۶۵	۷۸/۹۴	۹۵



شکل ۱ - درصد فراوانی ژن‌های مورد مطالعه



شکل ۲- تصویر ژل آگارز ۲ درصد محصول PCR برای ژن‌های oqxA، oqxB و NDM-1. چاهک اول Ladder، چاهک دوم کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)، چاهک سوم باند مربوط به ژن oqxA، چاهک چهارم باند مربوط به ژن oqxB و چاهک پنجم باند مربوط به ژن کدکننده آنزیم NDM-1

بحث و نتیجه‌گیری

متأسفانه در دهه‌های اخیر، استفاده نادرست و بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عوامل اجتماعی و اقتصادی، گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را تسریع کرده و درمان دارویی را بی‌اثر کرده است. در حال حاضر، سالانه حداقل ۷۰۰۰۰۰ نفر در سراسر جهان به دلیل مقاومت ضد میکروبی جان خود را از دست می‌دهند. بدون درمان‌های جدید و بهتر، سازمان بهداشت جهانی (WHO)

پیش‌بینی می‌کند این تعداد تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون نفر افزایش یابد و این نشان‌دهنده یک نگرانی بهداشتی و اهمیت این موضوع می‌باشد (۱۷). کلبسیلاپنومونیه معمولاً بیماران بستری در بیمارستان را درگیر می‌کند و باعث عفونت‌های خارج روده‌ای مانند عفونت دستگاه ادراری، عفونت خون (سپتی‌سمی) و ذات‌الریه می‌شود (۱۸). مخازن اصلی برای انتقال کلبسیلاپنومونیه دستگاه گوارش و دست پرسنل بیمارستان است. به دلیل

انتشار سریع در محیط بیمارستان، این باکتری تمایل به ایجاد بیماری‌های بیمارستانی دارد (۲). باکتری‌های گرم‌منفی تولیدکننده NDM-1 می‌توانند به هر آنتی‌بیوتیک بتالاکتام، از جمله کارباپنم که یکی از آخرین خطوط درمان آنتی‌بیوتیکی علیه باکتری‌های مقاوم به چند دارو است، مقاوم باشند (۱۹). گسترش جهانی ژن blaNDM-1 در میان پاتوژن‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو تهدیدی برای انسان است که همه بیماران سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد هنوز هیچ واکسنی برای جلوگیری از عفونت‌های تولید شده توسط باکتری‌های دارای کارباپنماز وجود ندارد بنابراین، بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ الگوی مقاوم NDM-1 در سراسر جهان ضروری است (۲۰). پمپ افلاکس oqxAB از دو ژن oqxA و oqxB تشکیل شده است که هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید قرار دارند و قابل انتقال به باکتری‌های دیگر می‌باشد. این پمپ‌ها عامل ایجاد مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها و بیوسایدهایی از قبیل تریکلوسان، کلروهگزیدین و اتیدیوم بروماید هستند (۱۵). نتایج این مطالعه نشان داد که ژن NDM-1 با ۸۸/۴۲ درصد بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارد و فراوانی ژنی برای ژن‌های oqxA و oqxB ۷۸/۹۴ درصد مشاهده گردید. همسو با نتایج مطالعه حاضر در مطالعه‌ای Thapa و همکاران در سال ۲۰۲۱ در نپال بر روی ۵۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، شیوع ژن blaNDM-1 ۸۰ درصد گزارش شد (۲۱). در مطالعه‌ای که طالب‌زاده و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سفالوسپورین‌ها انجام دادند، فراوانی ژن‌های oqxA و oqxB به ترتیب ۷۲ و ۶۸ درصد گزارش شد (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط لطیفی و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی ۱۵۱ ایزوله کلبسیلا پنومونیه صورت گرفت نتایج PCR

نشان داد که ژن blaNDM-1، ۹۶/۶ درصد ایزوله‌ها را تشکیل می‌دهد (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Shinu و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی ۷۴ ایزوله کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت، نتایج PCR نشان داد که ۵۸ (۸۴/۰۶ درصد) و ۶۲ (۸۹/۸۶ درصد) ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب دارای ژن‌های oqxA و oqxB بودند (۲۴). در مطالعه‌ای که توسط زمردی و همکاران در سال ۱۳۹۸ بر روی ۱۰۰ سویه کلبسیلا پنومونیه انجام شد، شیوع ژن‌های oqxA و oqxB در بین سویه‌های مقاوم به ترتیب ۶۹/۷۶ و ۷۲/۱ درصد ارزیابی شد (۴)، که نتایج این مطالعه با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد. در مطالعه‌ای که توسط Politi و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی ۴۸۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت، نتایج PCR وجود ژن blaNDM-1 را در ۳۴۱ (۷۱ درصد) ایزوله کلبسیلا پنومونیه تأیید کرد (۲۷). علاوه بر آن یافته‌های مطالعه حاضر بیشتر از نتایج به دست آمده از مطالعات دهنمکی و همکاران و رشید و همکاران در سال ۲۰۲۰ در ایران و پاکستان که به ترتیب روی ۱۰۰ و ۷۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه انجام شد می‌باشد (۲۵، ۲۶). علت تفاوت مطالعه حاضر با مطالعه‌های دیگر می‌تواند استفاده از روش‌های مختلف و تفاوت میزان مقاومت در نقاط مختلف جهان باشد. نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر تقریباً همخوانی دارد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از شیوع بالای باکتری‌های مقاوم در جامعه است لذا شناسایی سویه‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه در آزمایشگاه‌ها جهت تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مناسب و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها به افزایش سرعت در شروع درمان و در نتیجه به بهبود سریع‌تر بیماران کمک می‌کند، همچنین محدود کردن تجویز آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها در جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضروری است. تشخیص دقیق

تحقیقات منجر به این نتایج بودجه‌ای را از دانشگاه زابل بر اساس توافق‌نامه گرنت شماره IR-UOZ-GR-9452 دریافت کرده است.

ژن‌های مقاومت با روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره پلی‌مرز برای کنترل انتشار سویه‌های مقاوم ضروری است.

منبع مالی

References

1- Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infections. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2013; 23(105): 20-7. [In Persian]

2- Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*. 1998; 11(4): 589-603.

3- Izadi G, Zandi H, Dehghan Benadkoki A, Emadi S, Al Sadat. Vakili, M, and Astani, A. Investigation of the frequency of quinolone resistance plasmid genes qepA and aac (6)-Ib-cr in Klebsiella Pneumoniae isolates from patients with urinary tract infections in Yazd. *Journal of Isfahan Medical School*. 2017; 35(454): 1579-86.[In Persian]

4- Zomorodi A, Zargar M, Noroozi J. Evaluation of antibiotic resistance associated with ophthalmic oqxAB pumps in Klebsiella pneumoniae causing urinary tract infection. *Medical Science Journal of Islamic Azad University- Tehran Medical Branch*. 2019; 29(2): 163-70. [In Persian]

5- Mahluji F, Farzaneh F, Khurshidi A, Zibai M. Investigating the abundance of class I integrons in Klebsiella pneumoniae strains with multidrug resistance isolated from clinical samples by polymerase chain reaction. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2016; 21(3): 68-78. [In Persian]

6- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995; 39(6): 1211-33.

7- Oloni M. New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) plasmid predictions. 2020.

8- Abdullahi SA, Arzai AH, Yusuf I, Adamu SM, Adamu S, Koki YA, et al. Molecular

detection of New Delhi metallo beta lactamase 1 (NDM-1) producing bacterial isolates in Kano-Northwestern Nigeria. *Annual Research & Review in Biology*. 2017:1-6.

9- Razavi S, Mirnejad R, Babapour E. Involvement of AcrAB and OqxAB efflux pumps in antimicrobial resistance of clinical isolates of Klebsiella pneumonia. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2020; 7(4): 251-7.[In Persian]

10- Kumar S, Varela MF. Biochemistry of bacterial multidrug efflux pumps. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012; 13(4): 4484-95.

11- Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(9): 3332-7.

12- Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in Escherichia coli and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60(1): 145-7.

13- Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, Hao H. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019; 8(1) :1-3.

14- Jacoby GA. Plasmid-mediated quinolone resistance, in *Antimicrobial Drug Resistance*. 2017; 265-268.

15- Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanimanesh S, Taki E. Evaluation of genetic pattern and determination of oqxA gene expression levels among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae strains. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2014; 24(119): 48-61. [In Persian]

16- Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence

in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015; 70(1): 81-8.

17- Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*. 2021; 10(10): 1310.

18- Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *MSphere*. 2016;1(5): e00261-16.

19- Armin S, Fallah F, Azimi L, Kafil HS, Ghazvini K, Hasanzadeh S, et al. Warning: spread of NDM-1 in two border towns of Iran. *Cellular and Molecular Biology*. 2018; 64(10): 125-9. [In Persian]

20- Fallah, F, Taherpour A, Hashemi A. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2011; 6(4): 171-7. [In Persian]

21- Thapa S, Adhikari N, Shah AK, Lamichhane I, Dhungel B, Shrestha UT, et al. Detection of NDM-1 and VIM genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary health-care center in Kathmandu, Nepal. *Chemotherapy*. 2021; 66(5-6): 1-1.

22- Talebzadeh H, Mellali H, Solgi H. Association of fluoroquinolone resistance and ESBL production in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST893 in Iran. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*.

2022. [In Persian]

23- Latifi B, Tajbakhsh S, Askari A, Yousefi F. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Bushehr province, Iran. *Gene Reports*. 2020; 21: 100932. [In Persian]

24- Shinu P, Bareja R, Nair AB, Mishra V, Hussain S, Venugopala KN, et al. Monitoring of Non-β-Lactam Antibiotic Resistance-Associated Genes in ESBL Producing Enterobacterales Isolates. *Antibiotics*. 2020; 9(12): 884.

25- Dehnamaki M, Ghane M, Babaekhou L. Detection of OqxAB and QepA efflux pumps and their association with antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infection. *International Journal of Infection*. 2020; 7(4). [In Persian]

26- Rashid, F, Masood R, Faiz M. Prevalence of New Delhi Metallo Beta-Lactamase (NDM) Producing Gram-Negative Bacteria from Different Tertiary Care Hospitals in Lahore, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 2020; 52(3): 1209 [In Persian]

27- Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, Zarkotou O, Poulou A, Skoura L, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; 74(8): 2197-2202.

Prevalence of three NDM-1, oqxA and oqxB genes in *Klebsilla pneumoniae* isolates isolated from urine samples

Razieh Zahedi-Nesab¹, Seyedeh Parisa Hasanin^{2*}, Ahmad Rashki³

1- MSC student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

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

Receive: October 21, 2022; Revise: November 11, 2022; Accept: November 18, 2022

Summary

Beta-lactamases and secretory pumps are the most important factors causing antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* bacteria due to the high prevalence of genes causing resistance and the spread of hospital infections, especially urinary tract infections caused by them, in In this study, *Klebsiella pneumoniae* isolates, isolated from urine samples were examined for the frequency of NDM-1, oqxA and oqxB genes using PCR technique. DNA extraction was extracted by boiling method. PCR was done on 95 isolates of *Klebsiella pneumoniae* using the primers designed in this study. The showed that the prevalence of genes encoding antibiotic resistance including oqxA, oqxB and NDM-1 genes in 75 isolates (% 78.94), 75 isolates (78.94%) and 84 isolates (88.42%) respectively were evaluated. Prevalence of antibiotic resistance genes in this study is worrying and management of antibiotic prescription is necessary to control infection and prevent the spread of resistant bacteria and identify drug resistant isolates using molecular methods such as PCR.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, urinary tract infection, NDM-1, oqxA, oqxB

فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در *انتروکوکوس* های جدا شده از مواد غذایی شهر قم

هما طباطبایی^۱، محسن زرگر^۲، عباس مروتی^۳، علی جوادی^۴، اشکان دیربازیان^۵، مهرداد معماریان^{۶*}

- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
- ۳- دانشجوی دکترای ویروس‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
- ۴- دانشجوی دکترای باکتری‌شناسی، گروه علوم پزشکی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
- ۵- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
- ۶- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ شهریور ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۲ شهریور ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۳ شهریور ۱۴۰۱

چکیده

انتروکوکوس ها باکتری‌های فلور نرمال دستگاه گوارش انسان می‌باشند و این باکتری‌ها عامل آلوده کننده مواد غذایی نیز به شمار می‌روند. هدف از این مطالعه غربالگری جدایه‌های *انتروکوکوس* با توجه به وجود ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین از نمونه‌های جدا شده مواد غذایی در شهر قم است. جمع‌آوری و کشت ۱۰۰ نمونه (گوشت و لبنیات)، در سطح شهر قم که بعد از کشت نمونه‌ها، *انتروکوکوس* ها جداسازی شدند و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی در سطح جنس تأیید هویت شدند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به کمک روش PCR میزان فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. در این مطالعه از ۵۳ جدایه *انتروکوکوس*، (۴۵ درصد) *انتروکوکوس فاسیوم* و (۵۵ درصد) *انتروکوکوس فیکالیس* تشخیص داده شد. فراوانی ژن‌های مقاومت *tetL*، *ermB*، *tetS*، *tetM* و *tetO* به ترتیب ۳، ۷، ۶، ۱۷ و ۱۲ درصد گزارش شد. به‌منظور کاستن عفونت با این ارگانسیم و پیشگیری و کنترل شیوع و مرگ و میر ناشی از آن، بررسی اپیدمیولوژی و تعیین فراوانی مقاومت به تتراسایکلین به کمک PCR امری مهم در جهت شناسایی و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *انتروکوکوس*، PCR، تتراسایکلین، مقاومت

انتروکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت جز فلور نرمال روده انسان و بعضی حیوانات می‌باشند که در شرایط خاص توانایی تهاجم و گاهی ایجاد بیماری‌های خطرناک را نیز دارند. در گذشته این ارگانیزم‌ها غیر بیماری‌زا تلقی می‌شدند ولی بعد از جداسازی این باکتری از بیماران با بیماری زمینه‌ای و پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف اهمیت آن مورد توجه قرار گرفت (۱). امروزه بیماری‌های منتقله از راه غذا معضل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه با مصرف هزینه‌های چند میلیون دلاری، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و یا بستری شدن در بیمارستان می‌شوند (۲). انتروکوک‌ها عامل شایع سیستیت*، پروستاتیت[†] و اپیدیدیمیت[‡] در افراد مسن می‌باشند که در این افراد، عفونت‌های دستگاه ادراری فوقانی می‌تواند منجر به باکتری می‌گشته و در مورد خانم‌های جوان، عامل سیستیت مزمن غیر شایع می‌باشد (۳). انتروکوک‌ها جهت افزایش ویرولانسی، با مواد تجمع دهنده و سیتولیزین به‌طور سینرژیستیک از طریق سیستم درک حد نصاب[§] با تنظیم ترشح سیتولایزین منجر به آسیب بافتی بیشتر در موارد اندوکاردیت می‌گردند (۴). از ۱۲ گونه انتروکوک‌کال عفونت‌زای شناسایی شده تنها دو گونه انتروکوکوس فکالیسی و انتروکوکوس فاسیوم بیشترین گونه‌های بیماری‌زا در انسان را تشکیل می‌دهند (۵). بروز مقاومت در انتروکوک‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که باعث بروز عفونت‌های خطرناک بالینی می‌شوند اهمیت ویژه‌ای دارد (۶). دلیل

* Cystitis

† Prostatitis

‡ Epididimitis

§ Quorum-sensing

مقاومت VRE به آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپتیدی، که یکی از اعضای این خانواده آنتی‌بیوتیکی ونکومایسین است، به خاطر وجود ۶ خوشه‌ی ژنی *van* مختلف به نام‌های *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanA*, *vanB* و *vanG* است که دلیل مقاومت انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین را توجیه می‌کند (۷). بیشترین و رایج‌ترین فنوتیپ مقاومت انتروکوک‌ها به ونکومایسین به دلیل خوشه‌های ژنی *vanA* و *vanB* و در مراحل بعدی *vanC* می‌باشد که ژن *vanA* عامل اصلی مقاومت سطح بالای انتروکوک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین (MICs > 64 µg/ml) و تایکوپلانیس (> 16 µg/ml) و ژن *vanB* صرفاً عامل مقاومت سطح بالای باکتری به ونکومایسین (MICs 32 to 64 µg/ml) بوده اما همچنان به تایکوپلانیس حساس است (۸). مهم‌ترین و شایع‌ترین مکانیسم مقاومتی آمینوگلیکوزیدها در انتروکوک‌ها غیر فعال‌سازی دارو با استفاده از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی است که توسط سه گروه از آنزیم‌های استیل ترانسفراز (ACC)، آدنیلیل ترانسفراز (ANT) و فسفوترانسفراز (APH) ایجاد می‌شود (۹). ژن‌های مقاومت در برابر تتراسیکلین *tetK* و *tetL* هستند. ژن *tetL* عامل مقاومت به کلیه تتراسیکلین‌ها به جز مینوسیکلین بوده و بر روی پلاسمید کونژوگه انتروکوک فکالیسی و یا روی کروموزوم قرار دارد. ژن *tetK* با منشأ استافیلوکوک اورئوس، در ایزوله‌های اورونیتال انتروکوک شناسایی شده است (۱۰). شاخص *tetM* که بارزترین ژن مقاومت در برابر تتراسیکلین می‌باشد، از طریق ترانسپوزون کونژوگه قابل انتقال می‌باشد که از نظر ساختمان شبیه *Tn916* است. این ترانسپوزون به همراه شاخص *tetM* در انتروکوک فکالیسی و فاسیوم یافت شده است. این شاخص در بین سایر جنس‌های باکتریایی نیز شایع است. گلاپسیل سایکلین که از مشتقات جدید

حاوی ۵ درصد خون گوسفندی، باکتری‌های رشد یافته در محیط بلاد آگار جهت شناسایی و افتراق سویه‌های انتروکوک کشت داده شدند. با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، رشد بر روی محیط بایل اسکولین آگار، رشد بر روی محیط ۶/۵ درصد نمک و در نهایت تست (Pyrrolidonyl Aminopeptidase) انجام شد.

واکنش PCR: از جدایه‌های خالص شده جهت استخراج DNA با استفاده از کیت DNP استخراج شرکت سیناکلون استفاده گردید. برای بررسی نمونه‌های استخراج شده ارزیابی کیفی و کمی انجام شد. برای انجام واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش در یک حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد، به این صورت که مقادیر لازم ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش و ۱ میکرولیتر از پرایمر جلویی و عقبی و ۵ میکرولیتر از DNA و ۵/۵ میکرولیتر آب به ازای هر میکروتیوب آماده گردید، و ۲ میکروتیوب که یکی برای کنترل مثبت و دومی کنترل منفی که به جای DNA، حجم معادل آن آب اضافه می‌شود تهیه گردید. کنترل منفی برای چک کردن عدم آلودگی مواد شرکت کننده در PCR است که در هر واکنش کنار تست‌ها انجام شد (۲۲). پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های *ermB* و *tetO* *detL* *detS* *detM* با استفاده از توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری گردید و سپس در نرم‌افزار CLC sequence Viewer (ورژن ۹) این توالی‌ها زیر هم قرار گرفتند. برای ژن *tetL* ۲ سکانس، برای ژن *tetO* ۳ سکانس، برای ژن *tetS* ۳ سکانس و برای ژن *tetM* ۳ سکانس از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شد سپس بر اساس نواحی ثابت هر یک از این ژن‌ها، توالی‌های مورد نظر پرایمرها انتخاب و سپس برای بررسی اختصاصیت پرایمرها در بخش primer Blast بانک اطلاعاتی NCBI بررسی گردید که پرایمرها فقط به

تتراسایکلین می‌باشد به دلیل مقاومت در برابر هر دو مکانیسم، جهت درمان انتروکوک‌های با مقاومت چند دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). روش‌های مرسوم تشخیص میکروبی صرفاً بر ویژگی‌های فنوتیپی ارگانسیم تکیه می‌کنند. اگرچه برخی از ویژگی‌های فنوتیپی مانند پروفایل ایزو آنزیم، حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی اسیدهای چرب سلولی، دارای ویژگی‌های کافی برای تشخیص سویه میکروبی هستند، اما با این وجود اغلب ویژگی‌های فنوتیپی مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی، حساسیت کافی برای تشخیص سویه را ندارند (۱۲). در سال‌های اخیر، توسعه و استفاده از روش‌های تشخیصی مولکولی انقلابی در تشخیص و کنترل بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است. سیستم‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص مستقیم عوامل بیماری‌زای نمونه‌های بالینی و بدون نیاز به کشت، در تشخیص سریع میکروارگانسیم‌های غیر قابل کشت و یا سخت رشد حائز اهمیت می‌باشند. علاوه بر این تجزیه و تحلیل تکثیر توالی DNA میکروبی، شناسایی و توصیف بهتر پاتوژن را میسر می‌سازد. با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در روش‌های تشخیص مولکولی در سالیان اخیر و همچنین کاهش خطر آلودگی، کاهش هزینه‌ها و سریع‌تر بودن این روش‌ها نسبت به روش‌های مرسوم، روش‌های مولکولی پتانسیل جایگزینی روش‌های تشخیصی مرسوم در میکروبی‌شناسی را دارند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌عنوان یک مطالعه مقطعی (cross sectional) است که در این بخش از مطالعه با مراجعه به بخش فروش گوشت و لبنیات ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری گردید و با نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد ظرف مدت ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از کشت نمونه‌ها در محیط بلاد آگار

ژن‌های مورد نظر در این باکتری‌ها متصل می‌شوند.
بر اساس توالی پرایمرهای طراحی شده برای
ژن‌های *tetS tetM ermB tetO tetL* قطع‌ات

انتظار تکثیر می‌دهد.

جدول ۱- توالی‌های مربوط به پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

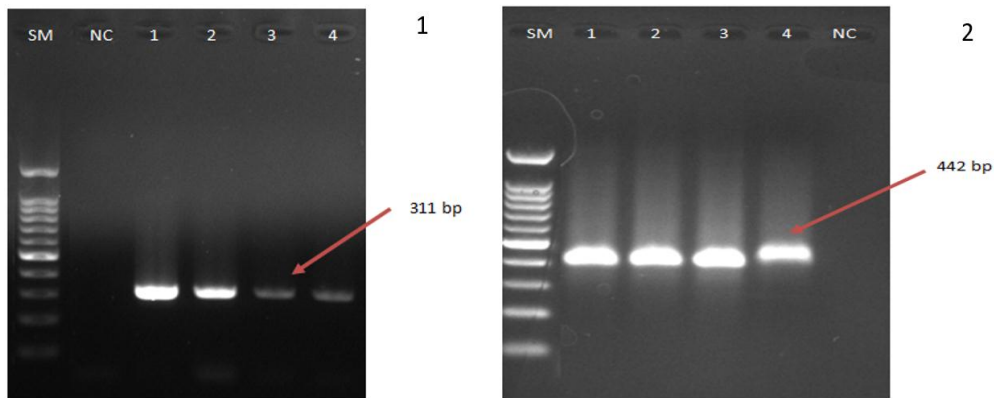
Primer name	Sequence	TM(C°)	PCR product
<i>erm B-F</i>	CGAAATTGGAACAGGTTAAAAGGG	53	311 bp
<i>erm B-R</i>	GTTTACTTTGGCGTGTTCATTG		
<i>tet(O)-F</i>	CACGTTGACGCAGGAAAAGAC	53	442 bp
<i>tet(O)-R</i>	CCTTTTGCTTCACTATAATTTCCG		
<i>tetM-F</i>	CTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTAC	51	373 bp
<i>tetM-R</i>	CGGTAAGTTCGTCACACACAT		
<i>tetL-F</i>	CAATTATCACTGTTCCGTTTCTTATG	53	306 bp
<i>tetL-R</i>	GAACCATAGAGACAAACCCTGC		
<i>tetS-F</i>	AGAGTTAGGAAGTGTAGATAGCGG	51	647 bp
<i>tetS-R</i>	CTGAATTGAGTTGTGTGGGTG		

رنگ‌آمیزی گرم کوکسی‌های گرم مثبت را نشان دادند و نتایج تست‌های رشد بر روی بایل اسکولین آگار، رشد روی محیط ۶/۵ درصد نمک، تست PYR مثبت و تست کاتالاز منفی گردید. از این ۵۳ ایزوله حاوی انتروکوک، ۵۵ درصد انتروکوک فکالیس و ۴۵ درصد انتروکوک فاسیوم تشخیص داده شد. فراوانی ژن *ermB* بر اساس پرایمرهای طراحی شده که بایستی باند ۳۱۱ جفت بازی (طبق تصویر ۱) بر روی ژل ایجاد کند از ۵۳ ایزوله مورد بررسی تنها ۷ درصد حامل این ژن بودند. ژن *tetO* بر اساس محصول PCR ۴۲۲ جفت باز (تصویر ۲) تنها ۱۲ درصد حامل ژن *tetO* بودند. فراوانی ژن *tetM* ۱۷ درصد بر اساس پرایمرهای طراحی شده دارای محصول ۳۷۳ جفت باز بودند (تصویر ۳). فراوانی ژن *tetS* و *tetL* بر اساس پرایمرهای طراحی شده برای این ژن‌ها به ترتیب باندهای ۶۴۷ و ۳۰۶ جفت بازی بر روی ژل ایجاد می‌کند که به ترتیب ۶ و ۵ بودند (تصویر ۴ و ۵) (نمودار ۱).

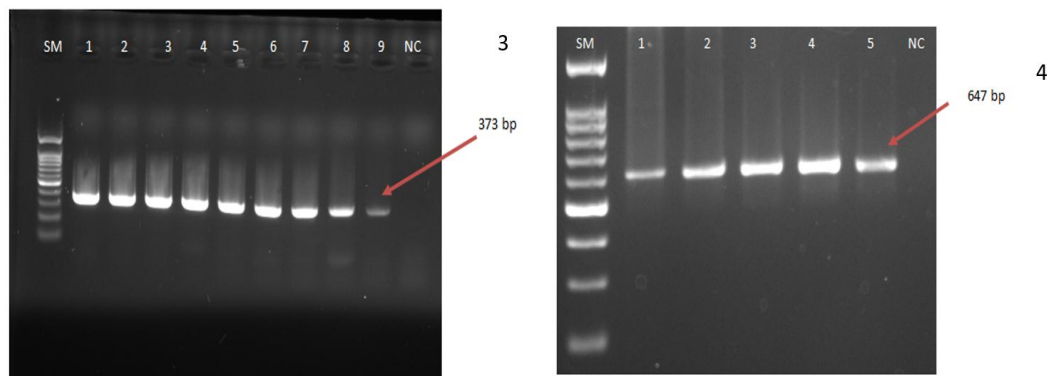
واکنش PCR برای ژن‌های *tetL ermB tetO* در شرایط ۹۵ درجه در ۳ دقیقه، ۹۵ درجه در ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه در ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه در ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه پایانی در ۵ دقیقه انجام شد. واکنش PCR ژن *tetM* و *tetS* در شرایط ۹۵ درجه در ۳ دقیقه، ۹۵ درجه در ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه در ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه در ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه پایانی در ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها پس از انجام واکنش برای مشاهده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل شدند.

نتایج

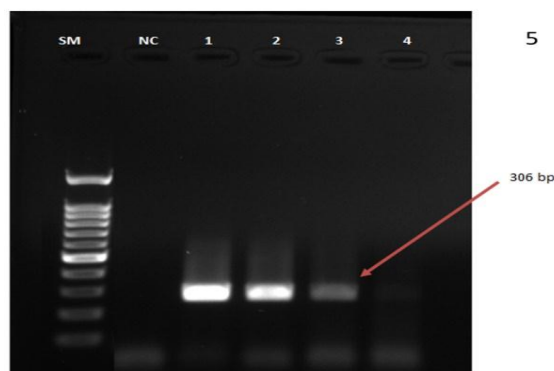
در این مطالعه ۱۰۰ نمونه از مواد غذایی که شامل گوشت و لبنیات بود به‌طور تصادفی از هر کدام ۵۰ نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بر روی محیط بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی کشت داده شد و بعد از سپری شدن دوره انکوباسیون پرگنه‌های مشکوک به انتروکوک مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. تست‌های تأییدی در سطح جنس برای شناسایی این باکتری انجام شد. ۵۳ نمونه به این باکتری آلوده بودند و در



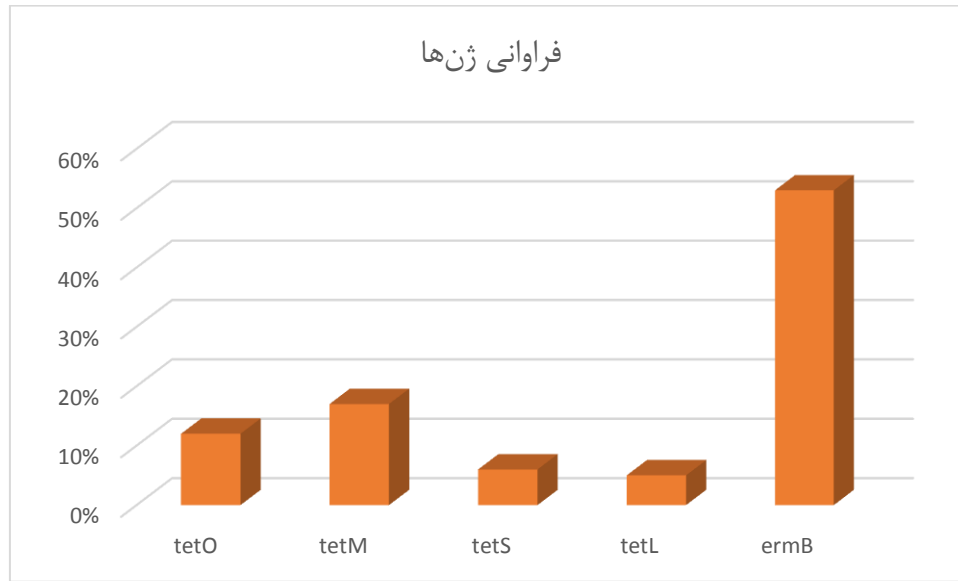
شکل ۱- ژل الکتروفورز ژن *ermB* از چپ سایز مارکر 100 bp چاهک شماره ۱ کنترل مثبت، چاهک‌های شماره ۲، ۳ و ۴ نمونه‌های دارای ژن و چاهک NC کنترل منفی، شکل ۲- ژل الکتروفورز ژن *tetO* از چپ سایز مارکر 100 bp چاهک شماره ۱ کنترل مثبت، چاهک‌های ۲ و ۳ و ۴ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر و NC کنترل منفی



شکل ۳- ژل الکتروفورز ژن *tetM* از چپ سایز مارکر 100 bp چاهک شماره ۱ کنترل مثبت، چاهک‌های ۲ تا ۹ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر و NC کنترل مثبت، شکل ۴- ژل الکتروفورز ژن *tets* از چپ سایز مارکر 100 bp چاهک‌های ۱ تا ۴ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر چاهک شماره ۵ کنترل مثبت و NC کنترل منفی



شکل ۵- ژل الکتروفورز ژن *tetL* از چپ سایز مارکر 100 bp NC کنترل منفی چاهک شماره ۱ کنترل مثبت و چاهک‌های ۲ تا ۴ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر



نمودار ۱- درصد فراوانی مقاومت ژن‌ها

میکروارگانیزم‌ها و یا سایر گونه‌ها درمان بیماری‌های ناشی از آن را به مشکلی جدی تبدیل نموده است (۱۹). با مقاومت روزافزون به ونکومايسين و ابتلا و مرگ و میر بالای آن، کنترل انتروکوک مشکل‌تر شده و تعیین اپیدمیولوژی و عوامل خطر ساز مؤثر در گسترش آن حیاتی به نظر می‌رسد. تعیین فراوانی فنوتیپ مولکولی مقاومت انتروکوک نیز اهمیت فراوان دارد چرا که مشخص شدن این میزان فراوانی در هر بیمارستان، باعث درک اهمیت برنامه‌های غربالگری یا ارزیابی روزمره و پیشگیری و درمان به موقع بیماران شده که باعث کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی ناشی از آن می‌گردد (۱۸). مهم‌ترین و شایع‌ترین مکانیسم مقاومتی آمینوگلیکوزیدها در انتروکوک‌ها غیر فعال‌سازی دارو با استفاده از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی است که توسط سه گروه از آنزیم‌های استیل ترانسفراز (ACC)، آدنیلیل ترانسفراز (ANT) و فسفو ترانسفراز (APH) ایجاد می‌شود. این آنزیم‌ها بر اساس تغییر سایت هدف و

بحث و نتیجه‌گیری

انتروکوک‌ها در گذشته از لحاظ بالینی جزو باکتری‌های کم‌اهمیت تلقی می‌شدند چرا که به دلیل فقدان توکسین‌های قوی و عوامل بیماری‌زای قابل توجه، پتانسیل کمی در ایجاد بیماری‌زایی بعد از مشاهده نقش کلیدی آنها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در سال ۱۹۷۰ و گزارش نخستین انتروکوک مقاوم به ونکومايسين در سال ۱۹۸۸ از کشور انگلستان، توجه به این باکتری‌ها رو به فزونی گذاشت به طوری که امروزه انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين به‌عنوان دومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی در نظر گرفته می‌شوند (۶، ۱۲، ۱۴). بروز مقاومت در انتروکوک‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که باعث بروز عفونت‌های خطرناک بالینی می‌شوند اهمیت ویژه‌ای دارد (۹). استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها طی ۵۰ سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای انتروکوک‌ها برای کسب و انتشار عوامل ایجادکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتقال ژن‌های مقاومت بین این

طیف مقاومتی در کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی به چندین زیرگروه تقسیم‌بندی شده‌اند (۵). آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی توسط ژن‌های مقاومتی متفاوتی کد می‌شوند. این آنتی‌بیوتیک‌ها در گروه‌های آمینو توسط آنزیم‌های AAC، در گروه‌های هیدروکسیل توسط ANT یا آنزیم‌های APH تغییر می‌یابند و قابلیت اتصال به ریبوزوم و مهار پروتئین‌سازی در آنها از بین می‌رود (۱۶).

استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های کشاورزی و صنایع غذایی منجر به انتشار ژن‌های مقاومت در باکتری‌های پاتوژن و فلور طبیعی، انتقال به انسان و ایجاد بیماری خواهد شد. امروزه این وضعیت به یک تهدید جدی برای بهداشت و سلامت انسان تبدیل شده و توجه بیشتر دست اندرکاران را طلب می‌کند. زنجیره‌ی غذایی به‌عنوان یک منبع انتروکوکوی مقاوم به عوامل ضد میکروبی شناخته شده است و این باکتری‌ها در غذاهای با منشأ حیوانی مانند گوشت و شیر وجود دارند (۱۱). از آنجایی که زیستگاه اصلی این باکتری‌ها دستگاه گوارش می‌باشد، پتانسیل قابل توجهی برای آلودگی گوشت‌ها در زمان کشتار دارند. مرحله تخلیه احشاء در کشتارگاه‌ها از نقاط بحرانی در آلودگی گوشت به مواد روده‌ای است. در میان محصولات غذایی، گوشت یکی از حساس‌ترین مواد غذایی فسادپذیر به شمار می‌آید، زیرا محیطی بسیار مساعد جهت فعالیت میکروب‌ها، مخمرها و کپک‌ها است. این باکتری‌ها اکثراً ترموتولرانت بوده که اسپور تولید نمی‌کنند و این موضوع نشان‌دهنده‌ی بقای آنها در گوشت‌های خام و پخته شده است (۲).

انتروکوکوس‌ها سبب اکتساب و نیز انتقال ژن‌های عامل مقاومت می‌شوند. آنها می‌توانند عوامل مقاومت را از چندین گونه کسب کنند و نگران‌کننده‌تر این که سبب انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری‌های مهم بالینی همچون: *کلستریدیوم دیفیسیل*، *اشریشیاکلی*،

استافیلوکوکوس اورئوس، *استرپتوکوکوس‌ها* و گونه‌های *لیستریا* شوند از جمله مقاومت‌هایی که در انتروکوکوس‌ها ایجاد شده است می‌توان به مقاومت نسبت به دوزهای بالای آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد. با توجه به مطالب ذکر شده‌ی فوق و به‌منظور کاستن عفونت با این ارگانسیم و پیشگیری و کنترل شیوع و مرگ و میر ناشی از آن، بررسی اپیدمیولوژی و تعیین فراوانی مقاومت به ونکومايسين و آمینوگلیکوزیدها به کمک PCR امری مهم در جهت شناسایی و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد.

اغلب مطالعات انجام شده بر روی انتروکوک‌ها، بر روی ژن‌های مربوط به ونکومايسين و آمینوگلیکوزیدها می‌باشد و بررسی‌های کمتری در مورد ژن‌های مربوط به تتراسایکلین انجام گرفته است. در این مطالعه از ۵۳ باکتری جدا شده، ۴۵ درصد از نمونه‌ها انتروکوکوس فاسیوم و ۵۵ درصد مربوط به انتروکوکوس فکالیس می‌باشد که بر اساس پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای هر ژن میزان این ژن‌ها در نمونه‌ها انتروکوکوس فکالیس برای ژن *tetO* ۱۲ درصد، برای *tetS* ۶ درصد، ژن *tetM* ۱۷ درصد، ژن *tetL* ۵ درصد و برای ژن *ermB* ۷ درصد در باکتری‌های جدا شده مشخص شد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات مشابه مشاهده می‌شود که فراوانی و شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت می‌باشد لذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات فوق باشد.

در مطالعه‌ای که توسط حسینی‌دوست و همکارانش در سال ۱۳۹۱ بر روی بررسی ژن *vanA* در انتروکوک فاسیوم و انتروکوک فکالیس جدا شده از گوشت ماکیان با متد PCR انجام شد، فراوانی ژن

ana با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در میان سویه‌های *انتروکوک فاسیوم* و *انتروکوک فکالیس* ردیابی شد. در خلال این مطالعه ۱۰۰ نمونه گوشت ماکیان متشکل از ۷۰ نمونه گوشت مرغ و ۳۰ نمونه گوشت بوقلمون مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین نمونه‌ها تعداد ۶۰/انتروکوک جدا شدند که حدود ۶۸ درصد به نمونه‌های گوشت مرغ و حدود ۳۱ درصد به نمونه‌های گوشت بوقلمون متعلق بودند. در میان ۶۰ گونه *انتروکوک* ۳۰ درصد *انتروکوک فاسیوم*، ۱۶/۶ درصد *انتروکوک فکالیس* و ۸/۳ درصد *انتروکوک گالیناروم* بودند. در کل ۶۱/۱ درصد از بین گونه‌های *انتروکوک فاسیوم* و ۴۰ درصد از بین گونه‌های *انتروکوک فکالیس* نسبت به ونکوماپسین مقاومت سطح بالا ($MIC > 128 \mu g/ml$) نشان دادند. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۵ در لرستان بر روی ژن‌های بتالاکتاماز در *انتروکوکوس* جدا شده از گوشت قرمز که به جنتامایسین مقاوم بودند انجام گرفت، از ۱۸۱ نمونه گوشت‌های مصرفی کشتارگاه‌های شهرستان با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی باکتری‌ها انجام شد، سپس تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی این جدایه‌ها با روش دیسک دیفیوژن انجام و در نهایت فراوانی ژن‌های *TEM* و *SHV* در سویه‌های مقاوم به جنتامایسین با PCR انجام گردید. از ۱۸۱ نمونه، ۸۱ نمونه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شد. با آزمایش آنتی‌بیوگرام مشخص شد ۹۶/۲۹ درصد از سویه‌ها به اریتروماپسین، ۵۶/۷۹ درصد به پنی‌سیلین، ۴۱/۹۶ درصد به تتراسیکلین، ۳۹/۵۰ درصد به آمپی‌سیلین، ۳۹/۵۰ درصد به کلرامفنیکل، ۸۶/۱۵ درصد به لینزولید، ۸/۶۴ درصد به جنتامایسین، ۴/۳۸ درصد به استرپتوماپسین، ۳/۷۰ درصد به سیپروفلوکساسین و ۲/۴۶ درصد به مروپنم مقاوم بودند و در بین ۷ سویه مقاوم به جنتامایسین ژن‌های *tem bla* و *shv bla* مشاهده نشد (۵).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ که توسط پاپویا و همکارانش بر روی ۱۰۰ نمونه گوشت خام انجام گرفت از ۶۵ درصد نمونه‌ها، *انتروکوک* جدا شد و ۷۶ درصد نمونه‌ها به ونکوماپسین مقاوم بودند، از این نمونه‌ها ۳۵ درصد *فاسیوم* و ۳۳ درصد *فکالیس* بود. ۸۰ درصد نمونه‌ها به آمپی‌سیلین و ۹ درصد نمونه‌ها به متی‌سیلین مقاوم بودند و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی رشد باکتری‌ها ریفامپین و ایمپی‌پنم بود. بیشترین میزان مقاومت به استرپتوماپسین با ۸۹ درصد و تتراسایکلین ۸۵ درصد و اریتروماپسین ۷۶ درصد از نمونه وجود داشت (۱۳). در مطالعه‌ای توسط جونگ‌می‌چوی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی *انتروکوکوس فکالیس*‌های جدا شده از مواد غذایی میزان ژن‌های مورد بررسی (۱۹/۶ درصد) *tet(M)* و (۶/۸ درصد) *tet(L)* قرار گرفت (۱۷). در مطالعه‌ای توسط روزانسکا و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی *انتروکوک فکالیس* جدا شده از گوشت ماکیان ۶۵ نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین ۴۰ باکتری به اریتروماپسین مقاوم بوده و تمامی سویه‌ها به جنتامایسین، ونکوماپسین و پنی‌سیلین حساس بودند (۸). در مطالعه‌ای توسط ورزچوسکا و همکارانش در سال ۲۰۱۶ بر روی نمونه‌های *انتروکوک* جدا شده از گوشت‌های آماده به مصرف میزان ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین (۳۲/۱ درصد) *tetL* (۴۳/۷ درصد)، *tetM* (۰/۳ درصد) *tetO* (۰/۷ درصد)، *tetW* (۱۴/۶ درصد) *tetK* بیان گردید (۱۵). در مطالعه‌ای توسط شهرکی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در زاهدان بر روی نمونه‌های جدا شده از بیماران، میزان ژن *tetM* ۴۸ درصد که بیشترین میزان نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند آمینوگلیکوزیدها در این مطالعه بود و همچنین ژن‌های بیماری‌زا موجود در *انتروکوک*‌ها نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار

آنتی‌بیوتیکی در این مناطق و بروز مکانیزم‌های مختلف مقاومت انتخاب و انتشار کلون‌های مقاوم تحت فشار مصرف آنتی‌بیوتیکی باشد. شاید این دلیلی دیگر برای انجام این‌گونه مطالعات باشد تا بتوان الگوی مقاومتی هر منطقه را شناسایی کرده و در راستای آن شیوه‌های کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار مقاومت و مهم‌تر از همه کمک به انتخاب شیوه‌های مناسب درمانی برای رهایی بیماران از عفونت‌های ناشی از این پاتوژن مهم و بسیار مقاوم / انتروکوک را شناسایی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد بوده که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و آزمایشگاه مواد غذایی مهر آریا آزما به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از مسئولین پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و سرکار خانم مهندس دهقانی که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم می‌آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- 1- Al-Ahdal MN, Abozaid SM, Al-Shammary HF, Bohol MF, Al-Thawadi SI, Al-Jaberi AA, et al. Characterization of Enterococcus faecium isolates and first report of vanB phenotype-van A genotype incongruence in the Middle East. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012; 31(11): 3223-9.
- 2- Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Review Microbiology*. 2012, 10(4): 266-78.
- 3- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13(4): 686-707.
- 4- Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45(1): 88-94.
- 5- Facklam R, Collins M. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.*

گرفت (۷). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ توسط آروموگان و همکارانش در هندوستان بر روی نمونه‌های بیمارستانی میزان ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین *tetL* , *tetK* به ترتیب ۱۳ و ۱۶ درصد گزارش شد (۱۱).

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و ونکومايسين به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها تشخیص سریع و به‌موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد. شناسایی سریع ژن‌های کدکننده آنزیم‌های AME با استفاده از روش PCR از مزیت‌های ویژه‌ای مثل دقت و سرعت بالا برخوردار است. تفاوت‌های موجود بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر دلیلی بر تفاوت در فراوانی و شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین کشورهای مختلف یک جامعه می‌باشد. همچنین می‌تواند مرتبط با میزان مصرف

1989; 27(4): 731-4.

- 6- Farivar TN, Najafipour R, Johari P, Aslanimehr M, Peymani A, Hashemi HJ, et al. Development and evaluation of a Quadruplex Taq Man real-time PCR assay for simultaneous detection of clinical isolates of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium and their vanA and vanB genotypes. *Iranian journal of microbiology*. 2015; 6(5): 335-40.[In Persian]

- 7- Jahan M, Krause DO, Holley RA. Antimicrobial resistance of Enterococcus species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 163(2): 89-95.

- 8- Rózańska H, Lewtak-Pilat A, Osek J. Antimicrobial resistance of Enterococcus faecalis isolated from meat. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2014; 59: 229-233.

- 9- Giridhara Upadhyaya P, Ravikumar K, Umopathy B. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen.

Indian journal of medical microbiology. 2009; 27(4): 301

10- Guodarzi A, Zolfaghari MR, Rezazadeh M, Amouzandeh-Nobaveh A, Arjmandzadegan M, Ghaznavi-Rad E. Phenotypic and genotypic determination of aminoglycoside resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nosocomial infections. *Urmia Medical Journal*. 2014; 24(11):883-93. [In Persian]

11- Klare I, Heier H, Claus H, Witte W. Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides. *FEMS Microbiol. Lett*. 1993; 106(1): 23-9.

12- Li W, Li J, Wei Q, Hu Q, Lin X, Chen M, et al. Characterization of aminoglycoside resistance and virulence genes among *Enterococcus* spp. isolated from a hospital in China. *International journal of environmental research and public health*. 2015; 12(3): 3014-25.

13- Pavia M, Nobile C G. A, Salpietro L, I F. Angelillo, Vancomycin Resistance and Antibiotic Susceptibility of *Enterococci* in Raw Meat. *Journal of Food Protection*. 2000; 63 (7): 912-915.

14- Mohsenzadeh M, Nasiri M, Kolalian Moghadam M. Detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from meat and hamburgers supplied in Mashhad. *7th National Congress of Biotechnology*. 2011. [In Persian]

15- Mohammadi F, Tabaraie B, Sadeghifard N. Evaluation of drug resistance frequency among *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* strains and

detection of *vanA/B* genes in vancomycin resistance isolated by PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. *Sci J Ilam Unive Med Sci*. 2010; 19: 1-8. [In Persian]

16- Mokta KK, Verma S, Chauhan D, Ganju SA, Singh D, Kanga A, et al. Inducible Clindamycin Resistance among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Sub Himalayan Region of India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2015; 9(8): DC20.

17- Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol Rev*. 1990; 3(1): 46-65.

18- Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resistance Updates. 2010; 13(6): 151-71.

19- Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *The American journal of medicine*. 2006; 119(6): 11-9.

20- Sood S, Malhotra M, Das B, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian Journal Medical Research*. 2008; 128(2): 111-21.

21- Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerging Infectious Diseases*. 1998; 4(3): 416-20.

22- Zargar M, A Javadi A, Morovvati A. Detection of *Clostridium Difficile* Associated Diarrhea in Disease Based on Polymerase Chain Reaction and Bacterial Culture and Toxin A, B Frequency. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2019; 9(3). [In Persian]

Frequency of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolated from food

Homa Tabatabaei¹, Mohsen Zargar², Abbas Morovvati³, Ali Javadi⁴, Ashkan Dirbazian⁵, Mehrdad Memarian^{6*}



1- MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

2- Associate professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

3- PhD Student in Virology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

4- PhD Student in Bacteriology, Department of Medical Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

5- PhD Student in Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

6- Assistant professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Receive: September 11, 2022; Revise: September 13, 2022; Accept: September 14, 2022

Summary

Enterococcus as a part of the normal flora of human gastrointestinal tracts can cause infections in foods. Aim of this study was to determine tetracycline resistance in *Enterococcus* isolated from food. In this laboratory study, one hundred samples of food from different parts of Qom were collected. After determining the type, they were tested for their resistance against tetracycline genes by specific primer PCR. Out of 53 isolates, 45% isolates belonged to *Enterococcus faecium* 55% isolates were *Enterococcus faecalis*. Size band of this genes were *tetS* 647bp, *tetO* 442 bp, *tetM* 373 bp, *tetL* 306bp, *ermB* 311 bp. Among this samples *tetO* (12 %), *tetS* (6 %), *tetM* (17 %), *tetL* (5%) and *ermB* (7%) isolate. Considering the results, increasing antibiotic resistant strains, especially tetracycline among *Enterococcus*, is a serious threat to the general public, Molecular method could help rapid diagnosis this resistance genes and help to treatment.

Key words: *Enterococcus*, tetracycline, PCR, Resistance

بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما+نقره بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی و بررسی سمیت نانوکمپلکس بر رده‌ی سلولی ورو

فائزه شکوهی^۱، مجید جمشیدیان مجاور^{۲*}، حمید رضا فرزین^۲، سیدالیاس طباطبایی‌زاده^۲، سمیرا کدوغنی ثانی^۳،
محدثه امیری^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

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

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

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

دریافت مقاله: ۱۰ اردیبهشت ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۰ خرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۴ خرداد ۱۴۰۱

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌باکتریال نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما+نقره بر روی باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی اعم از استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی پرداخته شده است. در پژوهش حاضر در ابتدا نانوذره نقره بر روی عصاره قارچ گانودرما بارگذاری شد. سپس جهت تأیید بارگذاری نانوذرات نقره بر روی عصاره قارچ گانودرما تست‌هایی از قبیل FTIR و بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام گرفت. سپس اثرات نانوکمپلکس بر روی رده‌ی سلولی ورو بررسی شد تا سمیت این ترکیب بر روی سلول مشخص گردد همچنین خاصیت ضد باکتریایی نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما+نقره بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی بررسی گردید. نتایج MIC نانوکمپلکس عصاره قارچ+نقره بر باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز و آسینتوباکتر بومانی به ترتیب به میزان ۸۷۵، ۷۵، ۲۱۸، ۳۷۵، ۱۰۹، ۶۸ و ۵۴ مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که این کمپلکس اثر سمیت بر رده سلول یوکاریوتی ندارد. بنابراین سنتز نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما+نقره می‌تواند در زمینه پزشکی و صنایع غذایی به‌عنوان عامل ضد میکروبی نوآورانه، اقتصادی و محیط زیست قابل استفاده باشد.

واژه‌های کلیدی: قارچ گانودرما، نانوذره نقره، خاصیت ضد باکتریایی

مقدمه

یکی از مشکلات رایج در درمان بیماری‌های عفونی و عفونت‌های بیمارستانی در سرتاسر جهان درمان عفونت‌های باکتریایی با افزایش مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد (۱). باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بیماری‌های عفونی سبب مرگ و میر چشمگیری در مقایسه با سایر باکتری‌های غیر مقاوم در سرتاسر جهان می‌شوند. در بین باکتری‌های گرم منفی شایع مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در عفونت‌های گوناگون می‌توان به سودوموناس، اسینتوباکتر و انتروباکتریاسه اشاره نمود و در بین باکتری‌های گرم مثبت شایع در ایجاد عفونت‌ها و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به گونه‌های استافیلوکوک، استرپتوکوک و انتروکوک اشاره کرد (۲). امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی به یک چالش مهم در درمان و کنترل بیماری‌های عفونی تبدیل شده است (۳). مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یک تهدید برای سلامتی عمومی تلقی می‌گردد و تلاش در پی جایگزین کردن درمان‌های نو و خلاقانه در سراسر جهان در حال انجام است. از جمله درمان‌های نو می‌توان به استفاده از نانوذرات و یا استفاده از گیاهان دارویی سازگار با بدن انسان‌ها اشاره نمود (۴، ۵).

نانوذرات نقره به دلیل تاثیر ضد میکروبی بالایی که در برابر باکتری‌ها و ویروس‌ها دارند به‌عنوان یکی از نانوذرات پرکاربرد در عرصه‌های گوناگون مانند پزشکی و بیوتکنولوژی، شیمی مواد غذایی و کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). افزایش استفاده از این نانوذره پرکاربرد به دلیل کاربردهای گوناگون آن در پزشکی مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کمبود اثربخشی بعضی از باکتری‌ها نسبت به طیفی از آنتی‌بیوتیک‌ها حائز اهمیت می‌باشد. استفاده از این نانوذرات باید به طور صحیح و در مقداری تعیین شده در درمان بیماری‌های عفونی

مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردد تا برای سلامتی بیمار خطر آفرین نباشد (۸). به سبب سهولت انجام کار با قارچ‌ها و فراوانی و همچنین سازگاری با محیط، امروزه مطالعات گوناگونی در زمینه اثر ضد میکروبی قارچ‌ها و نانوذرات انجام شده است. قارچ گانودرما به لحاظ دارا بودن خواص درمانی متعدد مانند کاهش قند خون، کاهش کلسترول خون، خواص آنتی‌اکسیدان، خواص ضد میکروبی و غیره به‌عنوان بهترین و موثرترین قارچ دارویی شناخته شده است. این قارچ یکی از مهم‌ترین قارچ‌های دارای خواص دارویی است که به شاخه بازیدیومیست‌ها تعلق دارد (۹).

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌باکتریال نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما +نقره بر روی باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی اعم از استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

بارگذاری نانوذره نقره بر عصاره قارچ گانودرما: جهت بارگذاری نانوذره نقره بر عصاره قارچ گانودرما ابتدا ۲۵ گرم قارچ گانودرما با ۱۰۰ سی‌سی آب استریل فیلتر شد سپس ۰/۸۳ گرم از نیترات نقره (مرک_آلمان) با ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط شد و مقدار ۰/۵ سی‌سی از نقره با ۹/۵ سی‌سی عصاره قارچ به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ (پندورف آلمان) شد و پس از چند بار شستشو از رسوب حاصله برای انجام تست‌های تعیین حساسیت استفاده گردید. به‌منظور بررسی ترکیبات آلی احتمالی موجود در عصاره قارچ گانودرما از دستگاه سنجی مادون قرمز (FT-IR، ساخت کشور آلمان) و جهت اندازه‌گیری ابعاد و اشکال نانوذرات به دست آمده از

میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM)، ساخت کشور چک) استفاده گردید.

سویه‌های باکتریایی و روش بررسی اثر

نانوذرات نقره و قارچ بر آنها: در این مطالعه اثر ضد میکروبی نانوکمپلکس قارچ نقره بر روی سوش‌های استاندارد (انسیتو پاستور ایران)، *استریپتوکوکوس پیوژنز* (ATCC 19615)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: 6538)، سوش استاندارد *سودوموناس آئروژینوز* (ATCC: 27853) و سوش استاندارد *آسینتوباکتر بومانی* (ATCC: BAA-747) به روش میکرودايلوشن و هاله عدم رشد (چاهک) مورد بررسی قرار گرفت.

همچنین جهت بررسی اثر عصاره قارچ +نقره بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده انجام می‌شود که نتایج حاصله به صورت میزان بقایای سلولی و غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود که به عنوان IC₅₀ لحاظ می‌گردد.

روش تهیه محلول سوسپانسیون میکروبی:

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط سترون باز و به محیط کشت مایع مولر هینتون برات (مرک-آلمان) انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. از سوسپانسیون به دست آمده برای انجام آزمون میکرودايلوشن و هاله عدم رشد (چاهک) استفاده گردید.

تعیین MIC به روش میکرودايلوشن:

روش از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای سطح استریل استفاده گردید. بعد از درست کردن کدورت نیم مک فارلند باکتری‌های مورد مطالعه، درون هر ردیف از شماره‌های ۲ تا ۱۱ مقدار ۵۰ ماکرولیتر محیط

مولر هینتون برات (مرک-آلمان) استریل ریخته شد. از شماره ۲ تا ۹ به تمام چاهک‌ها مقدار ۵۰ ماکرولیتر از عصاره قارچ +نقره پاساژ داده شد و به تمام چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۰ مقدار ۵۰ ماکرولیتر سوسپانسیون میکروبی اضافه شد، سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان میکروپلیت‌ها از انکوباتور خارج و هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه قرائت‌گر الیزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردیدند. چاهکی که مانع رشد باکتری مورد نظر گردیده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین MBC: جهت مشخص کردن MBC از چاهک‌ها مقدار ۱ ماکرولیتر برداشته و به محیط مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) انتقال داده و کشت داده شدند. عدم رشد باکتری در هر غلظت نشان‌دهنده‌ی MBC می‌باشد.

انتشار در چاهک: در این روش سوسپانسیون میکروبی را در سطح پلیت آگار طوری پخش نموده که به‌طور یکنواخت تمام سطح پلیت را بپوشاند. سپس یک سوراخ با قطر ۸-۶ میلی‌متر در شرایط استریل با پانچ استریل در روی پلیت ایجاد شد، غلظت معین عامل ضد میکروبی تهیه شده و داخل حفره‌ها ریخته شد.

پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده و سپس نتیجه بر اساس هاله‌های ایجاد شده اطراف حفره‌ها بررسی می‌شود.

تست MTT: جهت انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی از رده‌ی سلولی ورو در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM داخل پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند، پس از طی مدت زمان انکوباسیون میکروپلیت را در زیر میکروسکوپ بررسی نموده تا از اتصال سلول‌ها به کف میکروپلیت اطمینان حاصل نماییم. از ردیف اول میکروپلیت

به‌عنوان شاهد و از ردیف دوم به‌عنوان کنترل استفاده شد.

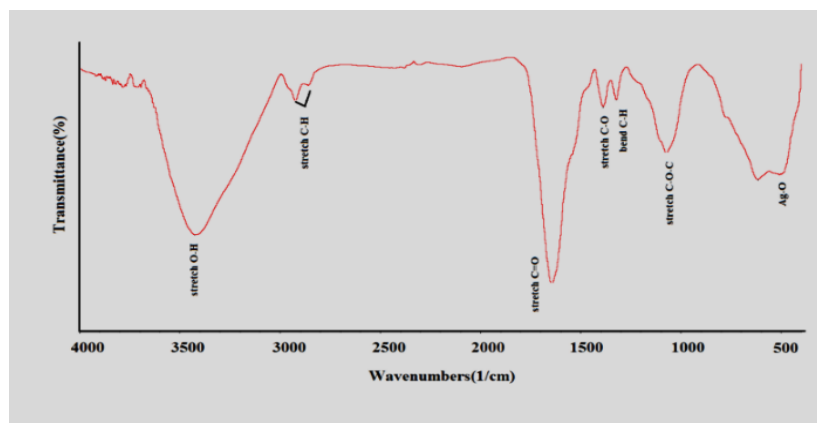
در این پژوهش از غلظت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی قارچ و نانوذره تهیه شد و میکروپلیت را به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید پس از طی مدت زمان مذکور محیط کشت درون پلیت ۹۶ خانه‌ای تخلیه گردید و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد FBS (سرم جنین گاو) به همراه ۱۵ میکرولیتر محلول MTT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

نتایج

طیف سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریر

(FTIR): طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریر FTIR برای قدرتمند برای مطالعات بیولوژیک است. پیک‌های نشانگر مورد بحث از انجام یک سری معادلات ریاضی بر روی طیف FTIR به‌منظور کسب منحنی دوز پاسخ حاصل شده و با روشی سریع و ساده اطلاعات فارماکولوژیک و توکسیکولوژی کمی

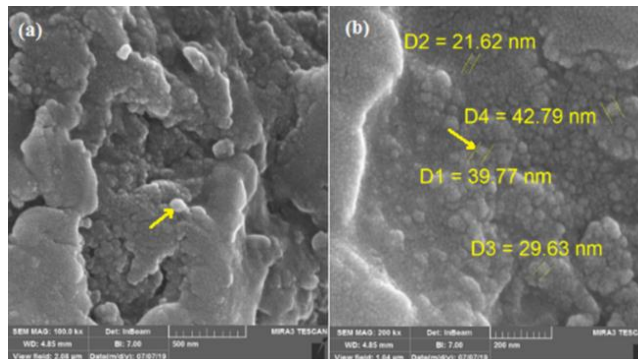
را فراهم آورده است (شکل شماره ۱). نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز اجزای اصلی سازنده عصاره قارچ +نقره را نشان می‌دهد. آنالیز FT-IR به‌منظور بررسی گروه‌های عاملی در ساختار و بررسی تغییرات پس از اصلاح ساختار انجام می‌گیرد. طیف IR نمونه عصاره قارچ گانودرما/ذرات نقره در شکل ۱ نشان داده شده است. پیک پهن در ناحیه 3422 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی O-H می‌باشد. پیک مشاهده شده در ناحیه 2924 cm^{-1} ناشی از ارتعاشات کششی C-H می‌باشد. پیک‌های موجود در ناحیه $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ از نمونه قارچ گانودرما به ارتعاشات پیوند آمیدی اشاره دارد که ناشی از ساختار پروتئینی است. باند مشاهده شده در ناحیه 1644 cm^{-1} و 1538 cm^{-1} به ارتعاشات کشش C=O و نیز ارتعاشات خمشی N-H مربوط است. پیک‌های دوتایی مشاهده شده در ناحیه $400\text{--}900$ به ساختار کربوهیدراتی نمونه بر می‌گردد. پیک در ناحیه 1389 cm^{-1} و 1072 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاش کششی C-O و ارتعاش خمشی C-H و ارتعاش کششی C-O-C اشاره دارد. مشاهدات تأیید می‌کند که گروه‌های عاملی C=O و O-H مسئول تولید نانوذرات نقره هستند. پیک تیز در ناحیه $450\text{--}550\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی Ag-O می‌باشد.



شکل ۱- طیف‌سنجی مادون قرمز اجزای اصلی سازنده عصاره قارچ +نقره

شده و در میان گونه زیستی با مورفولوژی صفحه‌ای قرار گرفته است. نتایج حاصل از شکل SEM در شکل ۲b نشان می‌دهد که ذرات نقره سنتزی دارای اندازه در محدوده ۲۰-۴۵ نانومتر می‌باشد (شکل ۲).

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM: نمونه سنتزی در شکل ۲ نشان داده شده است. شکل ۲a نانوذرات نقره را با مورفولوژی ذره‌ای نشان می‌دهد که در شکل با فلش زرد رنگ مشخص



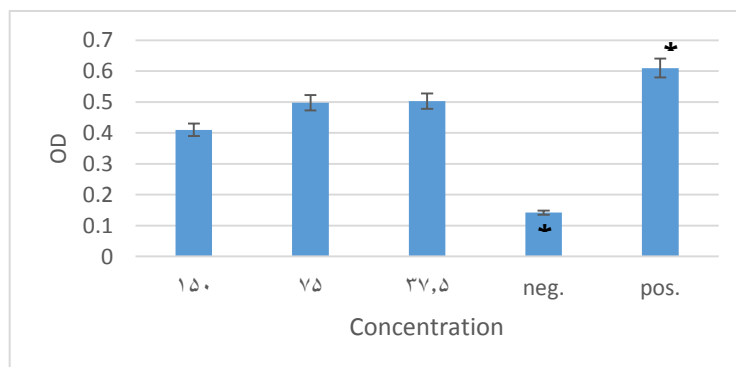
شکل ۲- نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM

سلولی ورو آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. نتایج تحلیل آماری نشان داد که سطح معناداری برای عصاره قارچ+نقره کمتر از ۰/۰۵ بود و بنابراین عصاره قارچ+نقره اثر کشندگی بر سلول‌ها نداشتند. نتایج در ادامه بیان شده است (جدول ۱).

نتایج MTT: برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره قارچ+نقره بر رده‌های سلولی مختلف از نرم‌افزار SPSS و تست آماری ANOVA استفاده شد. برای بررسی اثر کشندگی نانوکمپلکس بر رده

جدول ۱- نتایج آنالیز عصاره قارچ+نقره بر رده‌ی سلولی با استفاده از نرم‌افزار SPSS

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

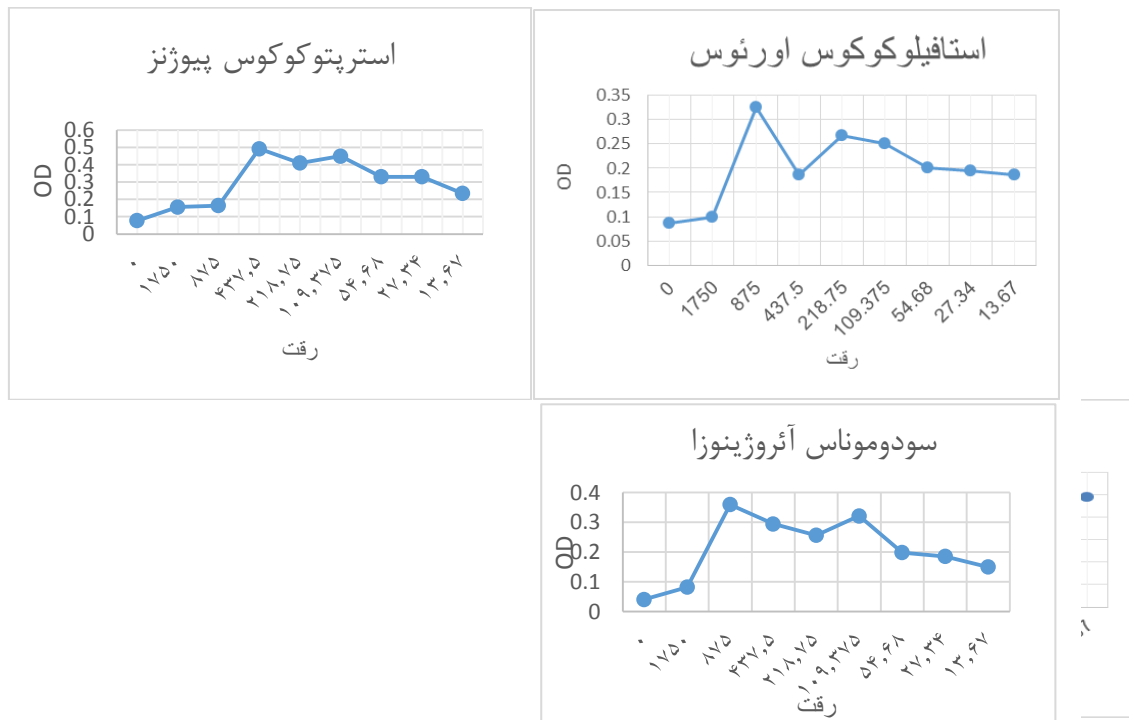


نمودار ۱- نتایج تاثیر عصاره قارچ+نقره بر روی رده سلولی در غلظت‌های مختلف به همراه گروه کنترل

به‌عنوان MBC گزارش می‌شود که نتایج آن بدین‌گونه دیده شد، مقدار MIC باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۸۷۵ و در غلظت ۲۱۸/۷۵ مقدار MBC، مقدار MIC باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* در غلظت ۴۳۷/۵ و در غلظت ۱۰۹/۳۷۵ مقدار MBC، مقدار MIC باکتری *آسینتوباکتر بومانی* در غلظت ۴۳۷/۵ و در غلظت ۵۴/۶۸ مقدار MBC، مقدار MIC باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت ۸۷۵ و در غلظت ۱۰۵/۳۷۵ مقدار MBC تعیین گردید.

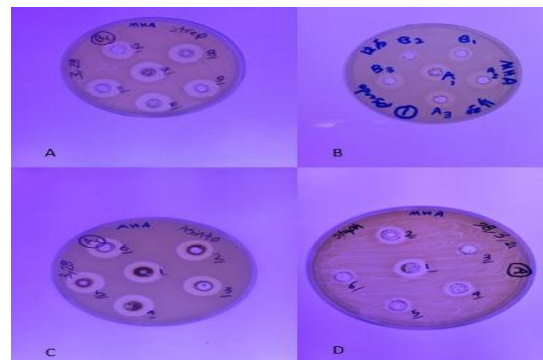
نتایج MIC به روش میکرودایلوشن: MIC سوش باکتری‌ها به روش میکرودایلوشن تعیین شد. چاهک‌های شماره ۱ که حاوی باکتری است به‌عنوان کنترل منفی و چاهک‌های شماره ۱۱ که حاوی محیط است به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

نتایج MBC: برای تعیین MBC، بعد از تعیین MIC (آخرین چاهک شفاف)، رقت‌های قبل و بعد از آن بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) منتقل و کشت داده شد. بعد از زمان انکوباسیون اولین رقتی که در پلیت آگار رشدی نداشته باشد



نمودار ۲- نتایج MIC و MBC برای باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسینتوباکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

نتایج انتشار در چاهک سویه‌های مور و مطالعه:



شکل ۳- انتشار در چاهک: هاله‌ی عدم رشد باکتری‌های: *استرپتوکوکوس پیوژنز* (A)، *سودوموناس آئروژینوزا* (B)، *آسینتوباکتر بومانی* (C) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (D)

بحث

باکتری‌های مقاوم در برابر داروهای رایج در درمان عفونت‌های گوناگون یک مشکل جدی در سلامت عمومی در سرتاسر جهان است. گسترش ظهور مقاومت در باکتری‌ها و هزینه‌های بالای داروهای ضد میکروبی، پژوهشگران را تشویق به جستجو برای داروهای با طیف گسترده با خاصیت ضد باکتری و مؤثر و اقتصادی می‌کند. بنابراین، توسعه ترکیبات قوی ضد میکروبی جدید بسیار مهم است (۱۰).

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوکمپلکس عصاره قارچ +نقره بر روی باکتری‌های بیماری‌زا خاصیت ضد باکتری دارد. میزان نتایج MIC نانوکمپلکس عصاره قارچ+نقره بر باکتری‌های *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، به ترتیب میزان ۸۷۵، ۷۵، ۲۱۸، ۳۷۵، ۱۰۹، ۶۸ و ۵۴ مشاهده شد.

نانوکمپلکس عصاره قارچ+نقره بیشترین اثر کشندگی را بر باکتری *آسینتوباکتر بومانی* داشته است. همچنین نتایج آنالیزهای MTT نشان داد که نانوکمپلکس عصاره قارچ+نقره بر روی رده سلول‌های یوکاریوتی خاصیت کشندگی و اثر سمیت ندارد.

مفاخری و همکاران در سال ۲۰۱۹ در قزوین به بررسی تولید زیستی و اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره تولید شده به وسیله عصاره متانولی گیاه دارویی میخک هندی پرداختند. در این مطالعه اثر ضد باکتری و ضد قارچی نانوذرات نقره تولید شده به دو روش دیسک و چاهک مورد آزمایش قرار گرفت و برای برای تأیید تولید نانوذرات نقره از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج 300 تا 600 نانومتر استفاده شد. همچنین به منظور بررسی (SEM) ابعاد و شکل نانوذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شده بود. نتایج حاصل از FTIR نشان

داد که ترکیبات آلی احتمالی در سنتز نانوذرات دخالت دارند همچنین نانوذرات تولید شده به وسیله عصاره متانولی میخک هندی، کروی بوده و در محدوده ۲۷ تا ۶۹ نانومتر قرار داشتند و نانوذرات تولید شده، فعالیت ضد میکروبی مؤثری علیه باکتری‌های این پژوهش داشته است (۱۱).

اعظمی و همکاران در سال ۲۰۱۸ در شاهرود به بررسی تولید و بررسی خواص آنتی‌باکتریال نانو ذرات نقره توسط قارچ *Fusarium oxysporum* در شرایط مختلف محیطی پرداختند. در این مطالعه خواص آنتی‌باکتریال نانوذرات روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* بررسی شد. در این مطالعه توسط اسپکتروفتومتر، میکروسکوپ الکترونی عبوری و پراش اشعه ایکس ویژگی‌ها و اندازه نانوذرات تولید شده بررسی و تایید شد. نتایج اسپکتروفتومتری بدین صورت بود که نانوذرات نقره دارای حداکثر پیک جذب در حدود طول موج ۴۰۰ - ۴۵۰ بودند. عکس‌های TEM حاکی از شکل کروی، مثلثی چند ضلعی نانوذرات بودند (۱۲).

Shamkar و همکاران در سال ۲۰۰۴ از عصاره گیاه چریش جهت سنتز نانوذرات نقره در مطالعه‌ی خود استفاده کردند. اندازه نانوذرات در مطالعه‌ی Shamkar بین ۵ تا ۳۵ نانومتر و شکل نانوذرات کروی گزارش گردیده است (۱۳).

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، لزوم جستجو برای ترکیبات جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها احساس می‌شود. قارچ گانودرما به لحاظ دارا بودن خواص درمانی متعدد به‌عنوان بهترین و موثرترین قارچ دارویی نامگذاری شده است و بر روی طیف گسترده‌ای از گونه‌های گرم مثبت و منفی تأثیرگذار می‌باشد. کمپلکس عصاره قارچ+نقره بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*،

اقتصادی و محیط زیست قابل استفاده باشد.

تشکر و قدردانی

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

استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز و آسینتوباکتر بومانی خاصیت آنتی‌باکتریال داشت. نتایج مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌باکتریایی کمپلکس عصاره قارچ+نقره را نشان می‌دهد و از طرفی نتایج نشان داد که این کمپلکس اثر سمیت بر رده سلولی یوکاریوتی ندارد. بنابراین سنتز نانوکمپلکس عصاره قارچ گانودرما+نقره می‌تواند در زمینه پزشکی و صنایع غذایی به‌عنوان عامل ضد میکروبی نوآورانه،

References

- 1- Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum β -lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian Journal of medical microbiology*. 2004; 22(3): 172-4.
- 2- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American journal of infection control*. 2006; 34(5): 20-8.
- 3- Bhatta DR, Hamal D, Shrestha R, Supram HS, Joshi P, Nayak N, Gokhale S. Burden of multidrug resistant respiratory pathogens in intensive care units of tertiary care hospital. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2019; 10(2): 14-9.
- 4- Amiri M, Jajarmi M, Ghanbarpour R. Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of qnr genes among *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection. *International Journal of Enteric Pathogens*. 2017; 5(4): 100-5.
- 5- Mandal C, Sahu M. Application of Metal and Metal Oxide Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. In *Nanomaterials and Nanocomposites for Environmental Remediation*. 2021: 121-140.
- 6- Gholami A, Arabestani MR, Ahmadi M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of *Allium Jesdianum* plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. *Pajouhan Scientific Journal*. 2016; 14(4): 18-26. [In Persian]
- 7- Caratto V, Ball L, Sanguineti E, Inorsi A, Firpo I, Alberti S, Ferretti M, Pelosi P. Antibacterial activity of standard and N-doped titanium dioxide-coated endotracheal tubes: an in vitro study. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2017: 55-62.
- 8- Kolodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T. Zinc oxide—from synthesis to application: a review. *Materials*. 2014; (4): 2833-81.
- 9- Moghaddam K. An introduction to microbial metal nanoparticle preparation method. *Journal of Young Investigators*. 2010; 19(1).
- 10- Keypour S, Riahi H, Rafati H. A Review on the Biological Active Compounds and Medicinal Properties of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Medicinal Plants*. 2013; 12(46): 13-24. [In Persian]
- 11- Kadoughani SS, Jamshidian MM, Farzin HR, Amiri M. Investigation of the effect of fungal and copper nanocomplexes on bacteria causing nosocomial infections. [In Persian]
- 12- Ahmed AA, Hamzah H, Maarroof M. Analyzing formation of silver nanoparticles from the filamentous fungus *Fusarium oxysporum* and their antimicrobial activity. *Turkish Journal of Biology*. 2018; 42(1): 54-62.
- 13- Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of colloid and interface science*. 2004; 275(2): 496-502.

Antibacterial effect of Ganoderma+silver nanocomplex extract on *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* and Evaluation of nanocomplex toxicity on Vero cell line

Faezeh Shokouhi¹, Majid Jamshidian mojaver^{2*}, Hamid Reza Farzin², Seyed-Elias Tabatabaeizadeh², Samira Kadughani Sani³, Mohadeseh Amiri⁴

1- Graduated of Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

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

3- Master of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

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

Accept: April 30, 2022, Receive: June 10, 2022, Revise: June 14, 2022

Summary

The aim of this study was to investigate the antibacterial effects of Ganoderma+silver extract complex nanocomplex on bacteria causing nosocomial infections including *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. In the present study, silver nanoparticles were first loaded on Ganoderma extract. Then, tests such as FTIR and scanning electron microscopy were performed to confirm the loading of silver nanoparticles on Ganoderma extract. Then, the effects of nanocomplexes on Vero cell line were investigated to determine the toxicity of this compound on the cell. Also, the antibacterial properties of nanocomplexes of Ganoderma+silver extract on the studied bacteria were investigated. The MIC results of the fungus+silver nanocomplex were observed on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Acinetobacter baumannii* at 875, 218.75, 109.375 and 54.68, respectively. The results of this study showed that this complex has no toxic effect on eukaryotic cell line. Therefore, the synthesis of Ganoderma+silver nanocomplex can be used in medicine and food industry as an innovative, economical and environmental antimicrobial agent.

Key words: *Ganoderma fungus, silver nanoparticles, antibacterial properties*

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی‌درماتیس (ATCC 10231) و مقایسه‌ی آن با کلوتریمازول

آرین نعمتی نژاد^۱، عیسی غلام‌پور عزیزی^{۲*}

۱- دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.
۲- استادیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ شهریور ۱۴۰۱، بازنگری: ۷ آبان ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۸ آبان ۱۴۰۱

چکیده

مالاسزیا پکی‌درماتیس به‌عنوان یک مخمر فرصت‌طلب، بر روی پوست انسان و حیوان به صورت فلور طبیعی وجود دارد و در صورت ضعف سیستم ایمنی ایفای نقش می‌کند. گل بیدمشک (*Salix egyptica*) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، کاهنده کلسترول و نیز برای درمان درد و التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه اثر مهاری عصاره‌ی آبی، اتانولی و متانولی گل این گیاه بر مالاسزیا پکی‌درماتیس مورد بررسی قرار گرفت. این مخمر از مرکز کلکسیون میکروبی شهریار با کد مشخصه (ATCC 10231) تهیه گردید. در این مطالعه تجربی، از گل بیدمشک با دستگاه سوکسله، عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تهیه گردید. روش انتشار دیسک و چاهک، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC)، جهت ارزیابی اثرات ضد قارچی این عصاره‌ها بر مالاسزیا پکی‌درماتیس در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. میانگین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر روی قارچ مالاسزیا پکی‌درماتیس برای عصاره اتانولی $8/3 \times 10^3$ ، برای عصاره متانولی $1/2 \times 10^4$ و برای آبی $1/4 \times 10^4$ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. میانگین میزان حداقل غلظت کشندگی (MFC) در عصاره اتانولی $20/8 \times 10^4$ ، برای عصاره متانولی $1/6 \times 10^4$ و برای عصاره آبی 5×10^4 میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، عصاره‌های الکلی و آبی گل بیدمشک دارای فعالیت ضد مالاسزیا پکی‌درماتیس می‌باشد. با این وجود از کلوتریمازول وضعیت تر می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: چاهک، دیسک، کلوتریمازول، گل بیدمشک، مالاسزیا پکی‌درماتیس

مقدمه

پیشرفت‌های حاصله در شناسایی عوامل باکتریال و ویروسی بیماری‌زا و همچنین کنترل و درمان بیماری‌های حاصله از آنها، در دو دهه اخیر برجسته و تحسین برانگیز بوده است. بیماری‌های قارچی، همه ساله خسارات سنگینی به بهداشت جامعه بشری وارد می‌کند. مصرف داروهای ضد قارچ، احتمال مسمومیت دارویی یا مقاومت دارویی را سبب می‌شود (۱، ۲). استفاده از عصاره‌های گیاهی، جهت حفظ مواد غذایی در برابر فساد، توسط عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل قارچی، مورد توجه قرار گرفته است. متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی، مانند عصاره‌های گیاهی، از نظر اثرات ضد میکروبی‌شان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مشخص شده است که اغلب عصاره‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی، دارای خواص ضد قارچ، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می‌باشند (۳-۷).

بیدمشک (*Pussy willow*) درخت یا درختچه‌ای زینتی است که سنبله‌های آن پر مانند بوده و در آغاز فصل بهار به عمل می‌آید. نام علمی آن *Salix egyptica* بوده و دارای گل‌های زرد کم‌رنگ دم‌گره‌ای است (۸). این گیاه بومی منطقه خاورمیانه است و برخلاف نام علمی آن (بید مصری) بسیاری از گیاه‌شناسان منشأ آن را ایران معرفی کرده‌اند. خاستگاه بیدمشک در جهان: ایران، جنوب شرقی آناتولی، جنوب شرقی ماورای قفقاز، عراق، افغانستان و پاکستان است و در ایران در مناطق آذربایجان، شمال ایران (گرگان، مازندران و گیلان)، اصفهان، کرمان، شیراز و یزد می‌روید. از گذشته، گیاه بیدمشک به دلیل دارا بودن خواص دارویی خود مورد استفاده قرار گرفته است، که از جمله این خواص می‌توان به در مان دارویی برای کم‌خونی و سرگیجه که به‌عنوان یک کاردیوتونیک عمل می‌کند، اشاره کرد و اخیراً متوجه خاصیت

آنتی‌اکسیدانی این گیاه شده‌اند. همچنین کاهنده کلسترول می‌باشد و برای درمان درد و التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طب سنتی عصاره پوست بیدمشک خاصیت تب‌بر، ضد التهاب و ضد درد دارد که به‌طور عمده مربوط به وجود گلیکوزیدهای سالیسیلیک، یعنی سالیسین و سالیکورتین است (۹-۱۱). در واقع، تجویز خوراکی عصاره برای تسکین کم‌ر درد توصیه می‌شود. همچنین این گیاه دارای اثرات ضد دیابت، ضد سرطان، ضد باکتری، ضد التهاب، ضد هیپاتیت، ضد چاقی، سیستم‌توکسیک، ضد انگل می‌باشد و دارای ترکیباتی از جمله سالیسیلیک اسید، فلاونول، فلاوین، فنولیک گلیکوزید می‌باشد (۱۲).

مالاسزیا پکی‌درماتیس گونه‌ای از مخمرهای لیپوفیلی و غیر وابسته به لیپوبلی است. در پوست سگ‌ها، گربه‌ها و سایر حیوانات اهلی و وحشی و نیز انسان وجود دارد. بر اثر عدم تعادل میکروبی و اختلالات سیستم ایمنی میزبان، این مخمر ممکن است بیماری‌زا شود، عمدتاً باعث اوتیت خارجی و درماتیت سبورئیک در سگ‌ها و گربه‌ها و نیز بیماری پوستی انسانی می‌شود. مشتقات آزول (نظیر کلوتریمازول) به‌طور گسترده‌ای برای درمان ضایعات مرتبط با این مخمر مورد استفاده واقع می‌شود. با این حال، آزمایشات نشان داده است که حساسیت این مخمر نسبت به این داروهای ضد قارچی کاهش یافته است (۱۳، ۱۴).

با بررسی پژوهش‌های انجام شده در داخل و خارج کشور، در خصوص آنتی‌باکتریال بیدمشک، پژوهش‌هایی به ثبت رسیده، اما در خصوص فعالیت ضد قارچی این گیاه کم کار شده است (۱۵، ۱۶). البته تحقیقاتی در زمینه خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه انجام شده است. تحقیق اثرات آنتی‌باکتریال عصاره‌های آبی و اتانولی پوست ساقه این گیاه روی سه گونه باکتریایی گرم‌مثبت:

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی درماتیس ...

متانولی و اتانولی آن تهیه گردید. بعد از عصاره‌گیری آنها را در انکوباتور ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا به‌طور کامل خشک شوند (۱۸). عصاره‌ها با ۰/۵ گرم پودر و ۴/۵ سی‌سی دی‌متیل سولفوکساید رقیق شدند (۱۹).

تهیه سوسپانسیون مخمیری: مالاسزیا

پکی‌درماتیس از مرکز کلکسیون میکروبی شهریار با کد مشخصه (ATCC 10231) تهیه گردید. سوسپانسیون این مخمر از کشت تازه در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک تهیه شد که در واقع در هر سی‌سی آن 1×10^6 سلول مخمیری (10^6 cfu/ml) وجود دارد (۲۰، ۲۱). برای انجام تست حساسیت مخمر به عصاره‌ها و داروی کلوتریمازول، با استفاده از انتشار دیسک با مقادیر ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکرولیتر، ابتدا ۱۰ میکرولیتر مخمر به محیط کشت سابورو دکستروز آگار به‌صورت کشت سفراهی اضافه شد و بدین طریق تست حساسیت با استفاده از چاهک برای عصاره‌ها و داروی کلوتریمازول، با مقادیر ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر هم انجام شد (۴، ۲۲).

باسیلیوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس مقاوم به متیسیلین و سه گونه باکتریایی گرم‌منفی: اشریشیاکلی، سودونامو آئروژینوزا و سالمونلا تیفی‌موریوم انجام شده است که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌باکتریال آن می‌باشد (۱۷).

با توجه به اهمیت روزافزون عفونت‌های فرصت‌طلب مالاسزیا به‌ویژه در میزبانان با ایمنی تضعیف شده و قدرت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی و با توجه به عوارض داروهای شیمیایی و مقاومت میکروارگانیسم‌ها، این تحقیق با هدف تعیین اثر مهاری عصاره‌های گل بیدمشک روی این مخمر انجام شد. در این تحقیق عصاره‌های آبی و الکلی گل بیدمشک بر روی مالاسزیا پکی‌درماتیس به روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفتند و MIC و MFC این عصاره‌ها همراه با مقایسه داروی کلوتریمازول مورد آزمایش قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و عصاره‌گیری: بعد از تهیه گل بیدمشک و گرفتن تأییدیه آن از دانشکده کشاورزی ساری، در سایه خشک و با آسیاب برقی، پودر آن تهیه شد. به‌وسیله دستگاه سوکسله عصاره آبی،



تصویر ۱- تست حساسیت عصاره‌های گل بیدمشک و دارو در انتشار دیسک



تصویر ۲- تست حساسیت عصاره‌های گل بیدمشک و دارو در انتشار چاهک

کشت سابورو دکستروز براس (SDB) صورت گرفت
(۳، ۲۳) (جدول ۱).

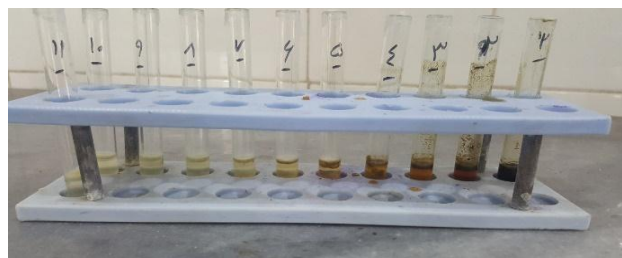
تعیین MIC: کمترین غلظت مهارکنندگی رشد
(MIC) به حداقل غلظت ماده ضد مخمری با محیط

جدول ۱- روش انجام MIC

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
محیط SDB	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی	۱ سی سی
عصاره ۱/۱۰ رقیق شده ماده مؤثره مربوطه	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-
سوسپانسیون مخمری	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل	۱۰ ل
تمام لوله‌ها در انکوباتور ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت تقریباً ۷۲ ساعت قرار داده شدند و بعد از این مدت کدورت لوله‌ها را با لوله شماره بازده که به‌عنوان لوله شاهد می‌باشد سنجیده شده و جواب لوله‌ها گزارش شدند.											
تیتراژ یا مقدار ماده مؤثر g	5×10^4	25×10^3	125×10^2	۶۲۵۰	۳۱۲۵	۱۵۶۲/۵	۷۸۱/۲۵	۳۹۰/۶۲	۱۹۵/۳۱	۹۷/۶۵	۰

تیتراژ لوله اول 1×10^5 تقسیم بر ۲ می‌شود یعنی 5×10^4 میکروگرم بر میلی‌لیتر. برای تیتراژ لوله دوم این مقدار نصف شد. اگر عصاره‌ها با رقت ۱/۵ رقیق شوند، برای لوله اول تیتراژ برابر است با 1×10^5 و تیتراژ لوله دوم 5×10^4 می‌باشد (۵).

از آنجایی که مقدار ماده مؤثره عصاره 1×10^6 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. چون عصاره‌ها ۱/۱۰ رقیق شدند پس 1×10^6 میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۱۰ میلی‌لیتر است. در نتیجه برای ۱ میلی‌لیتر، 1×10^5 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. پس در لوله اول این مقدار نصف شدند و نتیجه می‌گیریم که



تصویر ۳- تعیین MIC عصاره گل بیدمشک روی مالا سزیاپیکی در ماتیس

(عکس ضریب رقت) ضرب می‌نماییم. به این ترتیب تعداد مخمرها در پلیت‌ها به دست می‌آید. کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد یا به عبارتی کمترین غلظتی را که تعداد مخمرها از یک هزارم تعداد اولیه کمتر شده باشد، به‌عنوان MFC در نظر گرفته می‌شود (۶، ۲۴).

آنالیز آماری: در این مطالعه برای بررسی

تعیین MFC: جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC) مخمر، مقدار ۱۰ ل (که واجد 10^4 مخمر می‌باشد) از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت برداشته و در محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar کشت داده می‌شود و پس از گذشت زمان لازم در پلیت‌ها CFU تعیین می‌شود، به این ترتیب که کلونی‌ها را شمرده و در ۱۰۰

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی درماتیس ...

Tukey مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر $p \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (۲۵).

اختلاف میانگین میان گروه‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. اختلاف میان گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و تست تعقیبی



تصویر ۴- تعیین MFC عصاره اتانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

در روش چاهک (با مقادیر ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر)، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد، برای عصاره اتانولی به ترتیب ۱۰/۶۷، ۱۲، ۱۲ و ۱۴/۶۷ تعیین شد (جدول ۴). برای عصاره متانولی ۸/۶۷، ۱۰/۳۳، ۱۰/۶۷ و ۱۳ میلی‌متر (جدول ۵)، برای عصاره آبی ۱۰، ۱۲/۳۳، ۱۳ و ۱۴/۶۷ میلی‌متر (جدول ۶)، و برای داروی کلوتریمازول ۳۸/۳۳، ۴۴/۳۳، ۴۸/۳۳ و ۵۴ میلی‌متر تعیین شدند (جدول ۱۱). هیچ‌کدام از عصاره‌ها در حجم‌های مختلف از نظر قطر هاله عدم رشد، تفاوت معنی‌داری با همدیگر نشان ندادند ولی در مقایسه با کلوتریمازول به‌طور معنی‌داری هاله کوچکتری داشتند (جدول ۱۲ تا ۱۵).

نتایج

نتایج MIC برای عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی بیدمشک با سه تکرار و میانگین آنها در جدول ۲ و نیز نتایج MFC برای این عصاره‌ها در جدول ۳ آمده است. MIC و MFC این عصاره‌ها، تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند. در روش دیسک (با مقادیر ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ میکرولیتر)، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد، برای عصاره اتانولی به ترتیب ۱۰/۶۷، ۱۰/۶۷، ۱۲، ۱۴۳/۳۳ و ۱۷ میلی‌متر (جدول ۷)، و برای عصاره متانولی به ترتیب ۱۱، ۱۳/۳۳، ۱۴/۳۳ و ۱۵ میلی‌متر (جدول ۸)، و برای عصاره آبی ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۱/۶۷ میلی‌متر (جدول ۹)، و برای داروی کلوتریمازول به ترتیب ۴۶، ۴۸، ۵۰/۶۷ و ۵۰/۳۳ میلی‌متر تعیین شدند (جدول ۱۰).

جدول ۲- نتایج MIC عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

MIC بار اول	عصاره اتانولی	لوله شماره ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره متانولی	لوله شماره ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	لوله شماره ۲ تیترا آن $25 \times 10^3 \mu g$
MIC بار دوم	عصاره اتانولی	لوله شماره ۴ تیترا آن $6250 \mu g$
	عصاره متانولی	لوله شماره ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	لوله شماره ۴ تیترا آن $6250 \mu g$
MIC بار سوم	عصاره اتانولی	لوله شماره ۴ تیترا آن $6250 \mu g$
	عصاره متانولی	لوله شماره ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	لوله شماره ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
MIC میانگین	عصاره اتانولی	$8/3 \times 10^3 \mu g$
MIC میانگین	عصاره متانولی	$1/2 \times 10^4 \mu g$

MIC میانگین	عصاره آبی	$\mu\text{g } 1/4 \times 10^4$
جدول ۳- نتایج MFC عصاره های آبی، اتانولی، متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس		
MFC بار اول	عصاره اتانولی	پلیت ۲ تیترا آن $25 \times 10^3 \mu\text{g}$
	عصاره متانولی	پلیت ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu\text{g}$
	عصاره آبی	پلیت ۱ تیترا آن $5 \times 10^4 \mu\text{g}$
MFC بار دوم	عصاره اتانولی	پلیت ۲ تیترا آن $25 \times 10^3 \mu\text{g}$
	عصاره متانولی	پلیت ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu\text{g}$
	عصاره آبی	پلیت ۱ تیترا آن $5 \times 10^4 \mu\text{g}$
MFC بار سوم	عصاره اتانولی	پلیت ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu\text{g}$
	عصاره متانولی	پلیت ۲ تیترا آن $25 \times 10^3 \mu\text{g}$
	عصاره آبی	پلیت ۱ تیترا آن $5 \times 10^4 \mu\text{g}$
MFC میانگین	عصاره اتانولی	$20/8 \times 10^4 \mu\text{g}$
MFC میانگین	عصاره متانولی	$1/6 \times 10^4 \mu\text{g}$
MFC میانگین	عصاره آبی	$5 \times 10^4 \mu\text{g}$

چاهک عصاره اتانولی	80 لاندا	90 لاندا	100 لاندا	110 لاندا
جدول ۴- نتایج سه بار تکرار چاهک عصاره اتانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس				
بار اول	12mm	13mm	13mm	14mm
بار دوم	12mm	14mm	13mm	16mm
بار سوم	8mm	9mm	10mm	14mm
میانگین	10.6mm	12mm	12mm	14.6mm

چاهک عصاره متانولی	80 لاندا	90 لاندا	100 لاندا	110 لاندا
جدول ۵- نتایج سه بار تکرار و میانگین چاهک عصاره متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس				
بار اول	9 mm	12mm	12mm	14mm
بار دوم	8mm	10mm	10mm	12mm
بار سوم	9mm	9mm	10mm	13mm
میانگین	8.6mm	10.3mm	10.6mm	13mm

چاهک عصاره آبی	80 λ	90 λ	100 λ	110 λ
جدول ۶- نتایج سه بار تکرار و میانگین چاهک عصاره آبی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس				
بار اول	8mm	11mm	11mm	13mm
بار دوم	12mm	13mm	14mm	15mm
بار سوم	10mm	13mm	14mm	16mm
میانگین	10mm	12.3mm	13mm	14.6mm

دیسک عصاره اتانولی	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
جدول ۷- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک عصاره اتانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس				
بار اول	12mm	12mm	15mm	19mm

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی درماتیس ...

بار دوم	12mm	14mm	15mm	17mm
بار سوم	8mm	10mm	13mm	15mm
میانگین	10.6mm	12mm	14.3mm	17mm

جدول ۸- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک عصاره متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

دیسک عصاره متانولی	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
بار اول	12mm	13mm	13mm	14mm
بار دوم	11mm	14mm	15mm	16mm
بار سوم	10mm	13mm	15mm	15mm
میانگین	11mm	13.3mm	14.3mm	15mm

جدول ۹- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک عصاره آبی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

دیسک عصاره آبی	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
بار اول	8mm	9mm	10mm	12mm
بار دوم	9mm	11mm	12mm	12mm
بار سوم	10mm	10mm	11mm	11mm
میانگین	9mm	10mm	11mm	11.6

جدول ۱۰- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک کلوتریمازول روی مالاسزیا پکی درماتیس

کلوتریمازول دیسک	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
بار اول	41mm	46mm	47mm	50mm
بار دوم	50mm	50mm	55mm	62mm
بار سوم	47mm	48mm	50mm	54mm
میانگین	46mm	48mm	50.6mm	55.3mm

جدول ۱۱- نتایج سه بار تکرار و میانگین چاهک کلوتریمازول روی مالاسزیا پکی درماتیس

کلوتریمازول چاهک	80 λ	90 λ	100 λ	110 λ
بار اول	35mm	40mm	45mm	50mm
بار دوم	40mm	45mm	50mm	56mm
بار سوم	40mm	48mm	50mm	56mm
میانگین	38.3mm	44.3mm	48.3mm	54mm

یکسان بود و نشان داد که کمترین هاله عدم رشد در حجم ۸۰ میکرولیتر بود. اثر حجم ۸۰ بر هاله عدم رشد تنها با حجم ۱۱۰ تفاوت معنی‌داری نشان داد. به عبارت دیگر بیشترین هاله عدم رشد برای حجم ۱۱۰ مشاهده شد ولی این افزایش تنها با حجم ۸۰ تفاوت معنی‌داری داشت و این مقدار هاله

تحلیل چاهک: در دو عصاره متانولی و آبی هاله عدم رشد روند افزایشی با تغییرات حجم مورد استفاده نشان داد. آنالیز آماری با آزمون ANOVA تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ برای عصاره‌ی متانولی و سطح ۰/۰۴۶ برای عصاره‌ی آبی نشان داد. آنالیز Tukey برای هر دو عصاره متانولی و آبی

کمترین هاله برای حجم ۸۰ مشاهده شد اما قطر هاله برای حجم ۸۰ تفاوت معنی داری با حجم ۹۰ نشان نداد ولی در مقایسه با غلظت های ۱۰۰ و ۱۱۰ به طور معنی داری کوچکتر بود. قطر هاله عدم رشد برای حجم ۹۰ تنها با حجم ۱۱۰ تفاوت معنی داری نشان داد. حجم ۱۱۰ بیشترین هاله عدم رشد را نشان داد ولی تنها در مقایسه با حجم های ۸۰ و ۹۰ افزایش معنی داری داشت.

با حجم های ۹۰ و ۱۰۰ تفاوت معنی داری نشان نداد. هاله عدم رشد برای حجم های ۹۰ و ۱۰۰ تفاوت معنی داری با دیگر حجم های مورد استفاده نشان نداد. در عصاره اتانولی هاله عدم رشد با تغییرات حجم مورد استفاده روند افزایشی نشان داد ولی این تغییرات معنی دار نبود. به عبارت دیگر تمام حجم ها اثر یکسانی بر هاله عدم رشد داشتند. در کلوتریمازول تفاوت معنی داری در هاله عدم رشد بین حجم های مختلف مشاهده شد به نحوی که

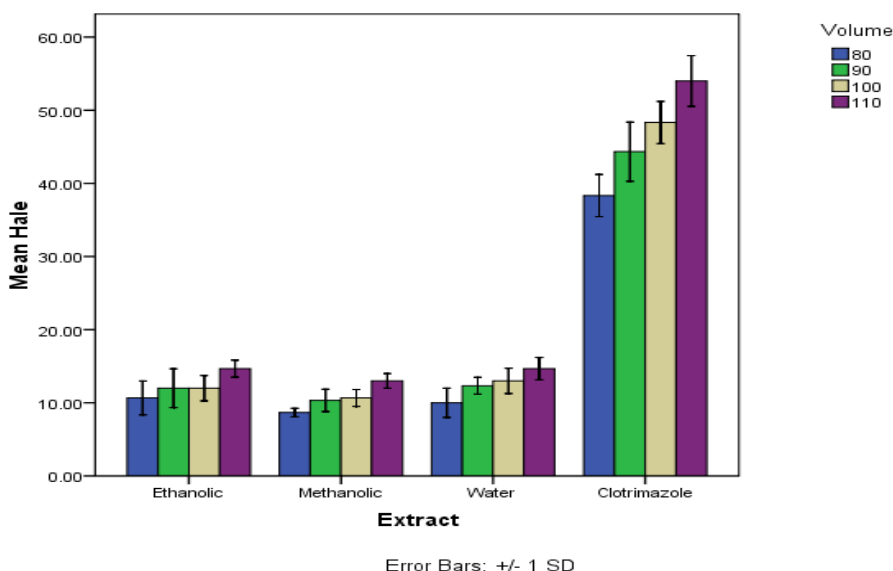
جدول ۱۲- مقایسه اثر غلظت های مختلف عصاره های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در روش چاهک

p-Value	۱۱۰	۱۰۰	۹۰	۸۰	
0.189	14.67±1.15	12.00±1.73	12.00±2.65	10.67±2.31	اتانول
0.01	13.00±1.00 ^b	10.67±1.15 ^{a,b}	10.33±1.53 ^{a,b}	8.67±0.58 ^a	متانل
0.046	14.67±1.53 ^b	13.00±1.73 ^{a,b}	12.33±1.15 ^{a,b}	10.00±2.00 ^a	آبی
0.003	54.00±3.46 ^c	48.33±2.89 ^{b,c}	44.33±4.04 ^{a,b}	38.33±2.89 ^a	کلوتریموزول

* ردیف هایی که با حروف متفاوت نشان داده شدند تفاوت معنی داری در سطح ۰,۰۵ دارند

ندادند ولی در مقایسه با کلوتریمازول به طور معنی داری هاله کوچکتری داشتند.

هیچیک از عصاره ها در حجم های مختلف از نظر هاله عدم رشد تفاوت معنی داری با همدیگر نشان



نمودار ۱- بررسی هاله عدم رشد روش چاهک

جدول ۱۳- مقایسه عصاره های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در هر کدام از حجم ها

p-Value	کلوتریموزول	متانل	اتانول	آبی
---------	-------------	-------	--------	-----

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیاپکی درماتیس ...

<0.001	38.33±2.89 ^b	8.67±0.58 ^a	10.67±2.31 ^a	10.00±2.00 ^a	۸۰
<0.001	44.33±4.04 ^b	10.33±1.53 ^a	12.00±2.65 ^a	12.33±1.15 ^a	۹۰
<0.001	48.33±2.89 ^b	10.67±1.15 ^a	12.00±1.73 ^a	13.00±1.73 ^a	۱۰۰
<0.001	54.00±3.46 ^b	13.00±1.00 ^a	14.67±1.15 ^a	14.67±1.53 ^a	۱۱۰

حجم‌ها نشان ندادند. در عصاره متانولی نیز حجم ۴۰ کمترین هاله را به‌طور معنی‌داری نشان داد. ولی حجم ۴۰ با حجم‌های ۶۰ و ۷۰ تفاوت معنی‌داری نشان داد و با حجم ۵۰ تفاوت معنی‌داری نشان نداد. از سوی دیگر قطر هاله عدم رشد برای حجم ۵۰ تفاوت معنی‌داری با حجم‌های ۶۰ و ۷۰ نشان نداد. آنالیز آماری با آزمون ANOVA در کلوتریمازول تفاوت معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد بین حجم‌های مختلف نشان نداد (p=0.135).

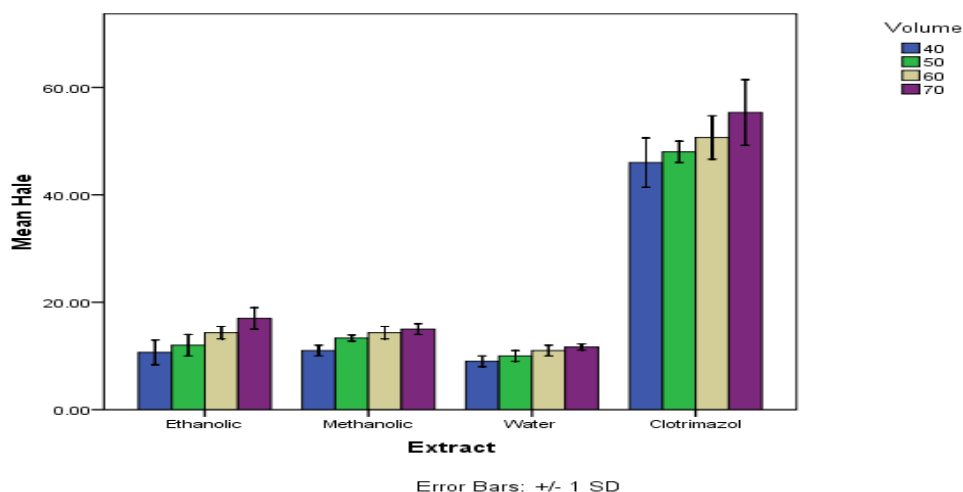
تحلیل دیسک: در تمامی عصاره‌ها یک روند افزایشی در هاله عدم رشد با افزایش حجم عصاره‌های مصرفی مشاهده شد و حجم ۴۰ کمترین هاله را به‌طور معنی‌داری نشان داد. در عصاره اتانولی و آبی تغییرات مشابهی در قطر هاله عدم رشد مشاهده شد به نحوی که علی‌رغم روند افزایشی در هاله عدم رشد تفاوت معنی‌دار تنها بین حجم‌های ۴۰ و ۷۰ مشاهده شد. حجم‌های ۵۰ و ۶۰ تفاوت معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد با یکدیگر و دیگر

جدول ۱۴- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در روش دیسک

p-Value	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	
0.017	17.00±2.00 ^b	14.33±1.15 ^{a,b}	12.00±2.00 ^{a,b}	10.67±2.31 ^a	اتانول
0.004	15.00±1.00 ^b	14.33±1.15 ^b	13.33±0.58 ^{a,b}	11.00±1.00 ^a	متانل
0.032	11.67±0.58 ^b	11.00±1.00 ^{a,b}	10.00±1.00 ^{a,b}	9.00±1.00 ^a	آبی
0.135	55.33±6.11	50.67±4.04	48.00±2.00	46.00±4.58	کلوتریموزول

ندادند ولی در مقایسه با کلوتریمازول به‌طور معنی‌داری هاله کوچکتری داشتند.

هیچ یک از عصاره‌ها در حجم‌های مختلف از نظر هاله عدم رشد تفاوت معنی‌داری با همدیگر نشان



نمودار ۲- بررسی هاله عدم رشد روش دیسک

جدول ۱۵- مقایسه عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در هر کدام از حجم‌ها

p-Value	کلوتریموزول	متانل	اتانول	آبی
---------	-------------	-------	--------	-----

<0.001	46.00±4.58 ^b	11.00±1.00 ^a	10.67±2.31 ^a	9.00±1.00 ^a	۴۰
<0.001	48.00±2.00 ^b	13.33±0.58 ^a	12.00±2.00 ^a	10.00±1.00 ^a	۵۰
<0.001	50.67±4.04 ^b	14.33±1.15 ^a	14.33±1.15 ^a	11.00±1.00 ^a	۶۰
<0.001	55.33±6.11 ^b	15.00±1.00 ^a	17.00±2.00 ^a	11.67±0.58 ^a	۷۰

بحث

پیشگیری از خسارات ناشی از مالا سزیا یکی درماتیس نیازمند یک برنامه و کنترل همه جانبه و وسیع است. به دلیل اینکه مشکلات ناشی از این قارچ می تواند خطرات جدی برای بهداشت انسان ها و حیوانات ایجاد کند و با توجه به این که این قارچ هم در انسان و هم در حیوانات بیماری زایی ایجاد می کند و به عنوان بیماری مشترک شناخته می شود، بنابراین از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. بررسی عوامل تأثیر گذار بر آنها با انجام آزمایشات گسترده می تواند در پیشگیری و درمان آن کمک کننده باشد و همچنین از نظر اقتصادی نیز دارای اهمیت است چرا که هزینه ها جهت درمان آن صرف می شود. پس با یافتن ترکیبی ارزان و کارآمد و از همه مهم تر ایمن برای درمان آن دارای اهمیت است.

با توجه به طرح کلی آزمایش و رعایت تمامی نکات اصولی، قارچ مالا سزیا یکی درماتیس در تست حساسیت به عصاره گل بیدمشک با استفاده از دیسک و چاهک توانست هاله های ممانعت از رشد ایجاد کند. با در نظر گرفتن خواص مفید عصاره بیدمشک در مطالعات مختلف، در این مطالعه نیز تأثیر قارچ کشی آن در رقت های بالا در تست تعیین MIC و MFC مشخص شده است. تست دیسک و چاهک نیز نتایج قابل توجهی داشته است.

در مقایسه با پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط ستی (۲۶) که عصاره اتانولی بیدمشک روی *Fusarium oxysporum* انجام شد در غلظت های ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد، اندازه های هاله ها ۷/۹۵، ۷/۶۰، ۷/۶۲ و ۶/۳۷ میلی متر مشاهده گردید، در دیسک که به میزان ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ لاندا از عصاره

اتانولی با رقت ۰/۱ گرم بر میلی لیتر استفاده شد اندازه هاله به طور میانگین ۱۰/۶۷، ۱۲، ۱۴/۳۳ و ۱۷ میلی متر گزارش شد که جواب معنی داری در هر دو تحقیق به دست آمد. پس می توان گفت عصاره ای اتانولی اثر ضد قارچی مناسبی نشان داد که با تحقیق حاضر مطابقت داشت. در تحقیقی که توسط پوپووا و کالوا (۱۵) با عصاره آبی بیدمشک روی برخی باکتری های گرم مثبت و منفی و کاندیدا آلبیکنس انجام شد، در انتشار دیسک با مقادیر ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ لاندا به ترتیب به طور میانگین ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۱/۶۷ میلی متر، هاله ممانعت از رشد گزارش شد و تفاوت معنی دار مشاهده شد. در صورتی که در گزارش حاضر در حجم های مختلف (p=0.032) تفاوت معنی داری مشاهده نشد. اما در رابطه با روش چاهک در تمام حجم ها تفاوت معنی داری مشاهده شد. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ توسط زرجر (۱۶) انجام شد، مشخص شد که عصاره ای متانولی بیدمشک اثر ضد قارچی مناسبی از خود نشان داد که در مقایسه با این تحقیق تفاوت معنای داری در مقایسه با حجم های ۴۰، ۶۰ و ۷۰ از خود نشان داد. همچنین در روش چاهک در همه غلظت ها تغییرات معنی دار بود. گونزالس الامیلا و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر این گیاه را روی اشریشیا کلی، استافیلوکوک اورئوس و لیستریا منوسیتوزنز بررسی کردند که بالاترین اثر مربوط به استافیلوکوک و لیستریا بود (۲۷). بنابراین این تحقیق هم همانند مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی عصاره های بیدمشک را نشان داد.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر اثر ضد مخمری

پژوهشگران بسیاری را منعطف کرده است. لذا با بروز مقاومت‌های دارویی و تأثیرات جانبی داروهای سنتتیک و شیمیایی، گل بیدمشک به‌عنوان یک ضد قارچ می‌تواند به جوامع بشری سودرسان باشد. استفاده از این ترکیب نیازمند بررسی‌های بیشتر و استفاده از تجهیزات گسترده‌تری دارد که از عوامل محدودکننده در این مطالعه بود.

سپاسگزاری

این تحقیق پایان‌نامه دانشجویی دکتری دامپزشکی می‌باشد. از تمامی کسانی که ما را در اجرای این پژوهش یاری رسانده‌اند، به‌خصوص عوامل و کارکنان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل تشکر به عمل می‌آید.

References

- 1- Banerjee S, Banerjee R, Pradhan N. A comparative study on antimicrobial activity of leaf extract of five medicinal plants and commonly used antibiotics. *Am J Phytomed Clin Ther.* 2014; 2(6): 788-95.
- 2- Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS pathogens.* 2015; 11(1):e1004523.
- 3- Azam TA, Gholampour AI, Hashemi M, Farhadi L, Servatyari K, Rouhi S. Inhibitory effect of aquatic and alcoholic extracts of *Artemisia sieberi* on growth of *Candida albicans*: an in vitro study. *Qom University Medical Science Journal.* 2018; 12(6): 39-47. [In Persian]
- 4- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology.* 2008; 2(46): 446-75.
- 5- Gholampourazizi I, Rouhi S, Zandi S, Kashefi H, Hassanzadeh Miandasteh S. Antifungal effect of *Melia azedarach* alcoholic and aquatic extract on *Malassezia furfur*. *Current Research in Medical Sciences.* 2016; 1(2): 11-7.
- 6- Najafi M, Gholampourazizi I, Hashemi

گل بیدمشک را روی مالاسزیا پکی درماتیس ثابت کرد. تمام غلظت‌های استفاده شده از عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تأثیر مهاری بر رشد این مخمر داشتند، بنابراین عصاره‌های مذکور حاوی ترکیبات ضد قارچی می‌باشند. گمان می‌شود که این گیاه می‌تواند اثرات ضد قارچی نیز داشته باشد و با توجه به اینکه طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی همواره شامل مزیت‌هایی است که مورد توجه قرار می‌گیرد، امید است تا در پیشگیری و درمان عفونت‌های قارچی بتوان از این گیاه بهره جست. با توجه به حضور همیشگی قارچ‌ها به‌ویژه خانواده مالاسزیا در محیط زیست و خطر بیماری‌زایی در انسان و حیوان، پیشگیری و کنترل رشد این قارچ مد نظر همگان قرار دارد. استفاده از ترکیبات فاقد عوارض جانبی و مؤثر با منشاء گیاهی همواره دیدگاه

- Karouei M, Khani D, Rouhi S. Investigation of the anti-growth effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia deserti* on *Malassezia furfur* isolated from clinical specimen. *Razi Journal of Medical Sciences.* 2018; 25(1): 100-6. [In Persian]
- 7- Yazdani M, Jookar Kashi, F., Toluei, Z., Rahimi-Moghaddam, A. Evaluation of phytochemical, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. from Marivan region. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants.* 2020; 8(1): 16-30. [In Persian]
- 8- MA. F. Plants and Gardens: Tehran; Karang. 2007. [In Persian]
- 9- Bonaterra GA, Kelber O, Weiser D, Metz J, Kinscherf R. In vitro anti-proliferative effects of the willow bark extract STW 33-I. *Arzneimittelforschung.* 2010; 60(06): 330-5.
- 10- Ebrahimian J, Khayatkashani M, Soltani N, Yousif QA, Salavati-Niasari M. Catechin mediated green synthesis of Au nanoparticles: Experimental and theoretical approaches to the determination HOMO-LUMO energy gap and reactivity indexes for the (+)-epicatechin (2S, 3S). *Arabian Journal of Chemistry.* 2022; 15(5): 103758.
- 11- Enayat S, Banerjee S. Comparative

antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food Chemistry*. 2009; 116(1): 23-8.

12- Tawfeek N, Mahmoud MF, Hamdan DI, Sobeh M, Farrag N, Wink M, et al. Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses of plants of the genus *Salix*: an updated review. *Frontiers in pharmacology*. 2021; 12: 593856.

13- Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, de los Ángeles Sosa M, Diez GO, Espada CM, et al. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *M. alassezia* species. *Mycoses*. 2013; 56(5): 571-5.

14- Lee J-H, Lee J-S. Inhibitory effect of plant essential oils on *Malassezia pachydermatis*. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2010; 53(3): 184-8.

15- Popova TP, Kaleva MD. Antimicrobial effect in vitro of aqueous extracts of leaves and branches of willow (*Salix babylonica* L.). *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2015; 4: 146-52.

16- Zarger MSS, Khatoun F, Akhtar N. Phytochemical investigation and growth inhibiting effects of *Salix alba* leaves against some pathogenic fungal isolates. *World J Pharm Pharmacol*. 2014; 3: 1320-30.

17- Gandamkarzadeh M GMA, Kamalinejad M., Mahboubi A. Antibacterial effects of ethanolic and aqueous extracts of *Salix aegyptiaca* L on three species of gram-positive and gram-negative bacteria. *2nd International Conference on Medicinal Plants, Organic Agriculture, Natural Resources and Pharmaceutical*. 2007.

18- Tarbatinejad P, Seyede, M. Mirtaghi, F. L., Hanieh, B. Comparison of antibacterial effect of ethanolic extract of *Mentha longifolia* leaves in different habitats of northern Iran. *Journal of Medicinal Plants Ecophytochemistry*. 2014; 7(3): 57-67.

19- Alhasan DA, Husein HA, Dawood AQ. In Vitro Antimicrobial Activity of The Filtrate Crude Extract Produced by *Aspergillus niger*. *University of Thi-Qar Journal of Science*. 2019; 7(1): 66-71.

20- Ashrafi Tamai I, Zahraei Salehi T, Khosravi A, Sharifzadeh A, Balal A. Chemical

composition and anti-candida activity of *Trachyspermum ammi* essential oil on azoles resistant *Candida albicans* isolates from oral cavity of HIV+ patients. *Journal of Medicinal Plants*. 2013; 12(46): 137-49. [In Persian]

21- Michael A, Vishnu C, Ana E, Mahmoud A, Linda L, Frank C. NCCLS, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, M27-A2. Wayne, PA: CLSI. 2002.

22- Espinel-Ingroff A, Pfaller M. Susceptibility test methods: Yeasts and filamentous fungi. *Manual of clinical microbiology*. 2006; 9(2):1972-86.

23- Safarkar R, Bonabi R, Massiha A, Rezaei Nazifi M, Sotoudeh R. An Evaluation of the Inhibitory and Synergistic Effects of Alcoholic Extract of *Stachys Byzantina* on Standard Strains under in vitro Conditions. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2017; 19(5): 39-46. [In Persian]

24- Ghada A, Fawzy Areej M, Al-Taweel, Nahla AM. In Vitro Antimicrobial and Anti-Tumor Activities of Intracellular and Extracellular extracts of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* var. *Columinari Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 1(3): 980-7.

25- Sajadi Kabodi P, Bakhshi D, Moghadamnia A, Sefidgar A. The antibacterial effects of methanol extract of *Ammi majus* on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2017; 19(1): 36-42. [In Persian]

26- Sati S, Singh H, Badoni P, Sati M. Screening of fungicidal activity of *salix* and *triumfetta* species of garhwal himalaya. *AJPCT*. 2013; 1: 486-9.

27- González-Alamilla EN, Gonzalez-Cortazar M, Valladares-Carranza B, Rivas-Jacobo MA, Herrera-Corredor CA, Ojeda-Ramírez D, et al. Chemical constituents of *Salix babylonica* L. and their antibacterial activity against gram-positive and gram-negative animal bacteria. *Molecules*. 2019; 24(16): 2992.

The Antifungal Effect of *Salix egyptica* Extract on *Malassezia pachydermatis* (ATCC 10231) and its Comparison with Clotrimazole

Arian Nematinezhad¹, Issa Gholampour Azizi^{2*}

1- Graduate student, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

2- Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Receive: September 11, 2022; Revise: October 29, 2022; Accept: October 30, 2022

Summary

Malassezia pachydermatis, as an opportunistic yeast, exists on the skin of humans and animals and takes effect if the immune system is weak. *Salix egyptica* flower has antioxidant and cholesterol-lowering properties, and it is also used to relieve pain and inflammation. In the study, the inhibitory effects of aqueous, ethanolic, and methanolic extracts of this plant on this yeast were investigated. Aqueous, ethanolic, and methanolic extracts were prepared with a Soxhlet extractor. The disk and well diffusion, the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), and the determination of minimum fungal concentration (MFC) were studied in the laboratory to evaluate the antifungal effects of these extracts on *Malassezia pachydermatis*. This yeast prepared of the collection microbial center shahriar with code ATCC 10231. The mean minimum inhibitory concentrations (MIC) on *Malassezia pachydermatis* were 8.3×10^3 $\mu\text{g/ml}$ for ethanolic extract, 1.2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ for methanolic, and 1.4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ for aqueous. MFC 20.8×10^4 $\mu\text{g/ml}$ was in ethanolic extract, 1.6×10^4 $\mu\text{g/ml}$ in methanolic extract, 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ in aqueous extract. Findings indicate that alcoholic and aqueous extracts of Pussy willow have anti- *Malassezia Pachydermatis* effects, however, lower than Clotrimazole.

Key words: Clotrimazole, Disc, *Malassezia Pachydermatis*, *Salix egyptica* flower, Well

تشخیص سرووار O157:H7 باکتری اشریشیاکلای با استفاده از نانوحسگر زیستی مبتنی بر توری Si_3N_4

مهدی راشکی^{۱*}، محمدرضا رخشانی^۲

۱- استادیار، گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- استادیار، گروه مهندسی برق، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۲ آذر ۱۴۰۱، بازنگری: ۱۴ آذر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲ بهمن ۱۴۰۱

چکیده

برای شناسایی باکتری‌ها روش‌های متفاوتی وجود دارد. یکی از راه‌های شناسایی، استفاده از نانوحسگرهای زیستی است. این نانوحسگرها با توجه به نوع تشخیص غیر تهاجمی و سریع، در سال‌های اخیر به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. نانوحسگرهای زیستی که بر اساس مواد دی‌الکتریک طراحی شده‌اند، به دلیل پهنای بسیار باریک پرتوهای انعکاسی حساسیت خیلی خوبی در تشخیص انواع باکتری‌ها دارند. در این مقاله برای تشخیص زیرسرووار O157:H7 باکتری اشریشیاکلای از حسگر مبتنی بر نانو توری سیلیکون نیتريد استفاده شده است. شبیه‌سازی‌ها نشان می‌دهد طیف بازتاب موج الکترومغناطیسی در ساختار پیشنهادی پهنای بسیار باریک ۶nm دارد و ضریب شایستگی و حساسیت اندازه‌گیری شده این حسگر وقتی در معرض این باکتری قرار می‌گیرد به ترتیب $17/\Delta\text{RIU}$ و $105\text{nm}/\text{RIU}$ به‌دست آمده است که نشان‌دهنده دقت و حساسیت زیاد این حسگر زیستی است. از این حسگر می‌توان برای تشخیص باکتری‌هایی که ضریب شکست‌شان در محدوده این باکتری است، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: شناسایی سرووار O157:H7 باکتری اشریشیاکلای، نانو حسگر زیستی، حسگر سیلیکون نیتريد

یکی از این روش‌ها استفاده از حسگرهای زیستی می‌باشد.

در سال‌های اخیر، حسگرهای زیستی مبتنی بر مبدل‌های الکتروشیمیایی، پیزوالکتریک یا نوری و فیبرهای نوری (۸) در تشخیص باکتری‌های موجود در مواد غذایی جایگاه خود را به دست آورده‌اند. در مورد حسگرهای ایمنی الکتروشیمیایی، دستگاه‌هایی با استفاده از اصول تشخیص آمپرومتری، پتانسیومتری، مقاومت سنجی و رسانایی برای تشخیص باکتری‌ها به‌طور وسیعی گسترش یافته‌اند (۹-۱۲). اگرچه این حسگرها ادعا می‌کنند که تجزیه و تحلیل ارزان و امکان کوچک‌سازی دارند، اما اغلب به برچسب‌هایی برای افزایش سیگنال نیاز دارند تا محدودیت‌های تشخیص خود را بهبود بخشند. حسگرهای ایمنی مبتنی بر پدیده‌های پیزوالکتریک قادر به تشخیص بدون برچسب باکتری‌ها هستند اما فاقد حساسیت هستند (۱۳). از سوی دیگر، حسگرهای زیستی (Bio-Sensors) نوری که از اصول انتقال متفاوتی مانند جذب نور، تشدید پلاسمون سطحی (SPR)، فلورسانس، قطبش نور و پراکندگی رامان استفاده می‌کنند، ابزارهای قدرتمندی برای تشخیص باکتری‌های موجود در مواد غذایی هستند (۱۴). تشخیص نوری مزایای متعددی را نسبت به سایر اصول شناسایی باکتری فراهم می‌کند، این فواید شامل تداخل کمتر نمونه و توانایی تشخیص مستقیم عوامل بیماری‌زا در ماتریس‌های پیچیده با حداقل باکتری می‌شود (۱۵).

اخیراً برای شناسایی سریع و غیر تهاجمی باکتری‌های مختلف از نانوحسگرهای زیستی استفاده می‌شود. لذا برای تشخیص باکتری‌ها و آلودگی‌های باکتریایی در نمونه‌ها با استفاده از نانوحسگرهای زیستی، نیازمند شناسایی و اندازه‌گیری ضریب شکست باکتری‌ها است. در مطالعات مختلف برای برخی از باکتری‌ها ضریب شکست اندازه‌گیری شده

اشریشیاکلاهی (*Escherichia coli*) یا به اختصار *E.coli* نوعی باسیل گرم‌منفی بدون اسپور و میله‌ای شکل متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده‌ی جانوران خون‌گرم یافت می‌شود (۳-۱). این باکتری در شرایط بی‌هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی‌اکسید کربن را تولید می‌کند (۴). بیشتر سرووارهای اشریشیاکلاهی، بی‌آزار هستند اما برخی از سروتیپ‌ها مانند O157:H7 موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند (۵). در بین حیوانات اهلی، نشخوارکنندگان مخزن این باکتری هستند و نقش مهمی در انتشار عفونت‌های انسانی ایفا می‌کنند. روده حیوانات و انسان بهترین شرایط را برای رشد و تکثیر باکتری فراهم می‌کنند. مطالعات نشان داده است که مدفوع حیوانات از منابع گسترش باکتری در محیط و ایجاد عفونت‌های روده‌ای در انسان محسوب می‌شود (۶). عفونت‌های ادراری شایع‌ترین علت عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری و دومین عفونت رایج در انسان است (۷). اشریشیاکلاهی انتروهمورژیک یکی از باکتری‌های بیماری‌زای مهمی است که در انسان و حیوانات موجب اسهال خونی شدید می‌شود. گاو و گوسفند به‌عنوان مخزن اصلی اشریشیاکلاهی انتروهمورژیک هستند و این ارگانیسم در انسان باعث اسهال آبکی و خونی می‌شود و از عوارض بعدی عفونت با سروتیپ O:157 H:7 می‌توان به التهاب روده خونریزی دهنده و سندرم اورمیک همولیتیک اشاره کرد. شناسایی این سرووارها به‌طور روتین در آزمایشگاه انجام نمی‌گیرد و پژوهشگران در صدد یافتن راه‌های ساده و کم‌هزینه و سریع برای غربالگری این باکتری‌ها هستند. هموژن بودن این سرووارها از نظر ژنتیکی سبب یافتن روش‌های زیادی برای جداسازی این سرووارها شده است که

است (۱۶، ۱۷). به عنوان مثال لیو و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۳ با استفاده از روش انکسارسنجی غوطه‌وری (optofluidic) باکتری موجود در محیط مورد نظر را توسط یک میکروسکوپ اختلاف فاز (Phase contrast) تصویربرداری و ضریب شکست سرووار O157:H7 باکتری اشریشیاکلای را اندازه‌گیری و مقدار آن را ۱/۳۸۸ گزارش کردند.

روش‌های فعلی غربالگری آلودگی باکتریایی شامل استفاده از معرف‌های گران‌قیمت مانند آنتی‌بادی‌ها یا استفاده از روش‌های متعارف آزمایشگاهی (کشت و انجام تست‌های بیوشیمیایی) وقت‌گیر و پرهزینه است. یکی از روش‌های تشخیصی سریع باکتری‌های پاتوژن، تصویربرداری تشدید پلاسمون سطحی است. این روش یک روش حساس و بدون برچسب است که می‌تواند اتصال آنالیت به سطح حسگر را با تغییرات ضریب شکست که هنگام اتصال رخ می‌دهد، تشخیص دهد (۱۸). حسگرهای تشدید پلاسمون سطحی موضعی مبتنی بر نانومیله‌های طلا به‌طور گسترده در زمینه‌های مختلف از جمله زیست‌شناسی، محیط زیست و تشخیص ایمنی مواد غذایی استفاده شده‌اند، اما حساسیت وابسته به اندازه و شکل آنها کاربرد عملی آنها را در سنجش و تشخیص بیولوژیکی محدود می‌کند (۱۹، ۲۰).

در این مطالعه یک تشخیص سریع و بدون برچسب با استفاده از ساختار مبتنی بر نانو توری سیلیکون-نیتريد (Silicon-Nitride Nano Grating) ارائه شده است. برخلاف حسگرهای مبتنی بر تشدید پلاسمون سطحی، در این حسگر هیچ قطعه متحرک یا رسوب فلز نیاز نیست، و این خاصیت، حسگر پیشنهادی را بسیار دقیق، فشرده و مقرون به صرفه می‌کند.

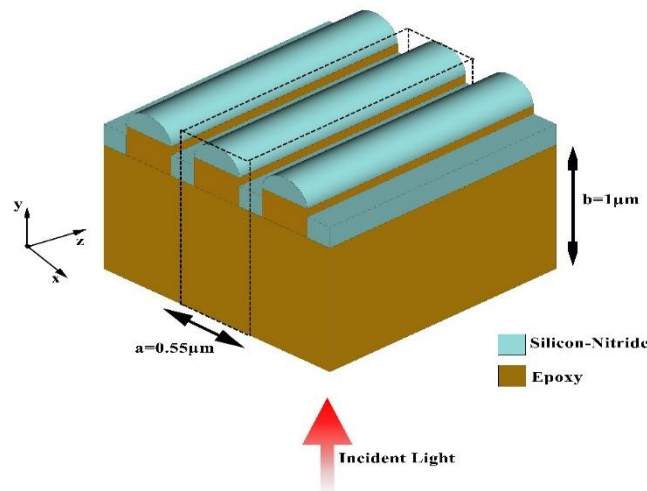
مواد و روش‌ها

در این تحقیق برای تشخیص باکتری سرووار

O157:H7 از حسگر زیستی سیلیکون-نیتريد که دارای ساختار سه بعدی توری شکل است، استفاده شده است. شکل (۱) نمای کلی سه بعدی این ساختار را نشان می‌دهد که سلول واحد آن برای انجام شبیه‌سازی با خط‌چین نمایش داده شده است. طول و عرض سلول واحد به ترتیب $a=0.55\mu m$ و $b=1\mu m$ است. در ساختار این حسگر دو ماده دی‌الکتريک اپوکسی (Epoxy) با ضریب شکست ۱/۵، و سیلیکون-نیتريد با ضریب شکست ۲/۰۵ بکار رفته است. لایه‌های آبی‌رنگ در شکل (۱) هر کدام از نوارهای سیلیکون-نیتريد با طول ۲۷۵nm و عرض ۱۲۰nm و نیم استوانه‌های سیلیکون-نیتريد نیز با شعاع ۱۴۰nm تشکیل شده‌اند. این شبیه‌سازی با استفاده از نرم‌افزار لومریکال با ماژول FDTD و به صورت دو بعدی انجام شده است. با فرض اینکه در محیط بالایی این حسگر باکتری سرووار O157:H7 قرار گرفته باشد، ضریب شکست فضای بالای نانو توری Si_3N_4 برابر ضریب شکست این باکتری (۱/۳۸۸) در نظر گرفته شده است. شرایط مرزی در محیط شبیه‌سازی در راستای x به صورت متناوب و در راستای y از لایه‌های جاذب PML انتخاب شده است. مدت زمان شبیه‌سازی ۲۵۰۰۰ فمتو ثانیه و دمای محیط بر روی ۳۰۰ درجه کلوین تنظیم شده است. برای پرتودهی از موج الکترومغناطیسی تخت در راستای y استفاده شده که از پایین ساختار تابیده می‌شود.

جذب امواج الکترومغناطیسی از لحاظ تئوری در یک محیط زمانی صورت می‌گیرد، که در اجزای تشکیل‌دهنده آن ساختار از فلز استفاده شده باشد، زیرا فلزات در برخی طول موج‌ها به دلیل موهومی شدن ضریب شکست‌شان جاذب امواج الکترومغناطیسی می‌شوند. با توجه با اینکه ساختار حسگر انتخاب شده در این مطالعه از جنس دی‌الکتريک است، ضریب شکست هر دو ماده

حقیقی است. لذا انتظار می‌رود هیچ‌گونه جذب موج الکترومغناطیسی در ساختار مشاهده نشود.

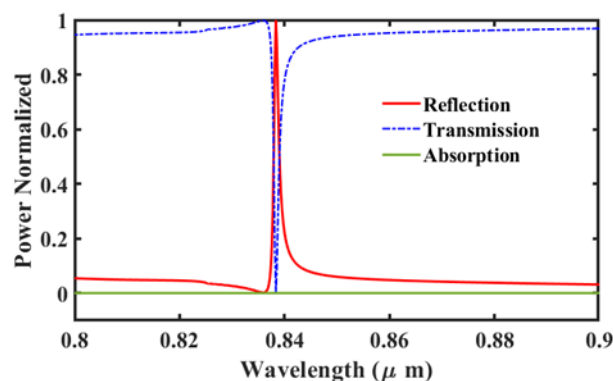


شکل ۱- ساختار حسگر زیستی مبتنی بر توری‌های سیلیکون-نیتريد

نتایج

مقدار آن صفر است. بیشترین بخش از طول موج الکترومغناطیسی تابیده شده به ساختار عبور می‌کند که با خط‌چین‌هایی به رنگ آبی نشان داده شده است، اما به ازای پهنای بسیار باریکی از طول موج، بازتاب کامل رخ می‌دهد که با رنگ قرمز مشخص شده است.

شکل (۲) نمودارهای جذب، عبور و بازتاب ساختار حسگر زیستی مبتنی بر نانو توری Si_3N_4 را پس از انجام شبیه‌سازی نشان می‌دهد. همان‌طور که از این شکل ملاحظه می‌شود پروفایل جذب با رنگ سبز نشان داده شده، که به ازای همه طول موج‌ها



شکل ۲- طیف بازتاب، عبور و جذب حسگر پیشنهادی در معرض سرووار O157:H7 باکتری /شریشیاکلای با ضریب شکست ۱/۳۸۸

انعکاس موج الکترومغناطیسی بازتابیده از ساختار بر حسب طول موج را آورده‌ایم. برای سرووار O157:H7 باکتری /شریشیاکلای با ضریب شکست ۱/۳۸۸ در طول موج تشدید ۸۳۸nm بازتاب کامل

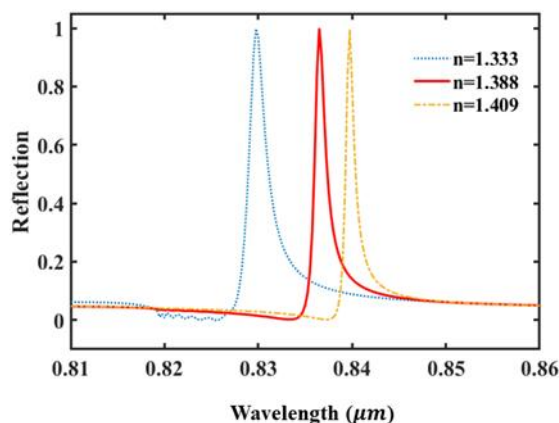
برای نشان دادن حساسیت بالای این حسگر زیستی، آن را به ازای تغییر ضریب شکست‌های مختلف بررسی کرده‌ایم. در شکل (۳) به ازای سه ضریب شکست ۱/۳۳۳ و ۱/۳۸۸ و ۱/۴۰۹، توان

اشریشیاکلای با ضریب شکست $1/388$ طیف خروجی با رنگ قرمز نشان داده شده است.

کمیت پهنا در نصف مقدار بیشینه (FWHM) با دقت اندازه‌گیری حسگر رابطه معکوس دارد. هر چه مقدار این کمیت کمتر باشد نشان‌دهنده دقت بیشتر در اندازه‌گیری حسگر است. در این ساختار، مقدار FWHM برای طیف بازتاب مورد مطالعه قرار گرفت و مقدار 6nm برای این کمیت به دست آمد. علاوه بر این، کمیت دیگری که نشان‌دهنده دقت اندازه‌گیری است حساسیت حسگر است که از رابطه $S = \Delta\lambda / \Delta n$ به دست می‌آید. در این معادله $\Delta\lambda$ تغییرات طول موج تشدید در طیف خروجی بر حسب نانومتر و Δn تغییرات ضریب شکست متناظر با این تغییر طول موج است. با توجه به شبیه‌سازی انجام شده مقدار حساسیت حسگر زیستی طراحی شده در این مقاله برابر $105\text{nm}/\text{RIU}$ به دست می‌آید.

حال با استفاده از این دو پارامتر، می‌توان ضریب شایستگی این حسگر زیستی را که با رابطه $FOM = S/\text{FWHM}$ محاسبه می‌شود را به دست آورد. مقدار ضریب شایستگی به دست آمده برای این باکتری در ساختار پیشنهادی برابر $17/5\text{RIU}^{-1}$ است.

رخ می‌دهد. با تغییر ضریب شکست، بیشینه تشدید تغییر می‌کند به طوری که برای ضریب شکست $1/333$ تشدید در طول موج 833nm و برای ضریب شکست $1/409$ تشدید در طول موج 841nm اتفاق می‌افتد. بنابراین در محیطی با گونه‌های متفاوت از باکتری‌ها، با توجه به متفاوت بودن ضرایب شکست، مقدار تغییر در طول موج تشدید باعث شناسایی گونه‌های مختلف باکتری‌ها می‌شود. به عنوان مثال، اگر در آب شرب که ضریب شکست آن $1/333$ است سرووار O157:H7 باکتری اشریشیاکلای با ضریب شکست $1/388$ وجود داشته باشد، می‌توان این نمونه را در قسمت حسگری ساختار قرار داده و پس از تابش موج الکترومغناطیسی در محدوده طول موج 820 تا 850 نانومتری، پرتوهای بازتاب و انتقال موج الکترومغناطیسی را بررسی کرد. با توجه به تغییر طول موج تشدید بازتاب و یا انتقال می‌توان به وجود یا عدم وجود این نوع باکتری در نمونه پی برد. همان‌طور که در شکل (۳) نشان داده شده است به ازای ضرایب شکست مختلف طول موج تشدید بازتاب به سمت طول موج‌های بزرگتر انتقال پیدا می‌کند. به طوری که برای سرووار O157:H7 باکتری



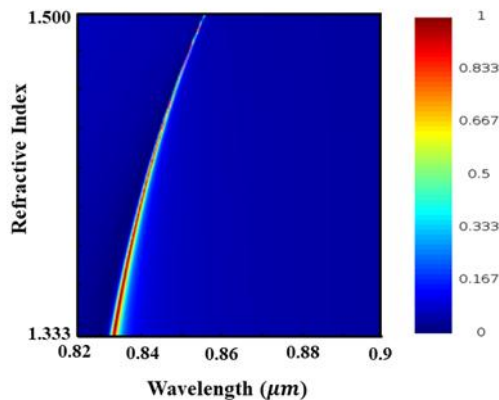
شکل ۳- مقایسه طیف بازتاب برای ضرایب شکست مختلف بر حسب طول موج

برای ضریب شکست‌های $1/333$ تا $1/500$ به ازای

در شکل (۴) توان بازتاب این حسگر زیستی

بزرگتر را نشان می‌دهد. نکته حایز اهمیت در این شبیه‌سازی این است که طول موج استفاده شده در محدوده نور مرئی است.

۱۵۰ نقطه متوالی بر حسب طول موج جاروب شده است. با توجه به این شکل، با افزایش ضریب شکست، انتقال طول موج به سمت طول موج‌های



شکل ۴- نمودار جاروب توان بازتاب شده بر حسب ضریب شکست و طول موج

سطحی که به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند، هیچ قطعه متحرک یا رسوب فلز در این حسگر نیاز نیست، و این مشخصه حسگر سیلیکون-نیتريد را بسیار دقیق، فشرده و مقرون به صرفه کرده است. با توجه به شبیه‌سازی‌های انجام شده برای سرووار O157:H7/شریشیاکلای، مشاهده شد که با قرار دادن این باکتری بر روی سطح بالایی حسگر در طول موج ۸۳۸nm بازتاب کامل با پهنای بسیار باریک رخ می‌دهد، که این پهنای باریک نشان از دقت بالای این ساختار در اندازه‌گیری طرفی ضریب شایستگی و حساسیت اندازه‌گیری شده برای این باکتری به ترتیب $17/\Delta RIU$ و $105nm/RIU$ به دست آمده است، که نشان‌دهنده دقت خوب و حساسیت زیاد این حسگر زیستی است.

سپاسگزاری

این کار با حمایت از پژوهانه دانشگاه زابل با شماره‌های UOZ-GR-6230 و UOZ-GR-8357 انجام شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از روش‌های سریع، کم‌هزینه و غیر تهاجمی تشخیص باکتری‌ها استفاده از نانوحسگر زیستی است. باکتری/شریشیاکلای نوعی باسیل گرم‌منفی بدون اسپور و میله‌ای شکل است که به طور شایع در روده‌ی جانوران خون‌گرم وجود دارد. سرووار O157:H7 یکی از صدها سرووار شناسایی شده از باکتری/شریشیاکلای است، که بیماری‌زایی آن در انسان به اثبات رسیده است. نوشیدن شیر خام و آبمیوه آلوده و شنا در آب آلوده ممکن است موجب ایجاد این عفونت باکتریایی شوند. نانوحسگرهای زیستی متنوع زیادی ارائه شده است که برخی از آنها بر اساس تشدید پلاسمون سطحی در فلزات است. از معایب این نوع حسگرها حساسیت وابسته به اندازه و شکل آنها است که کاربرد عملی آنها را در سنجش و تشخیص بیولوژیکی محدود می‌کند. در این مقاله سعی شده است که یک تشخیص پایدار، بدون برچسب مبتنی بر نانو توری Si_3N_4 بررسی شود. برخلاف حسگرهای مبتنی بر تشدید پلاسمون

References

- 1- **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*. 2010; 8(3): 207-17.
- 2- **Singleton P.** Bacteria in biology, biotechnology and medicine. *John Wiley & Sons*. 2004.
- 3- **George M.** Garrity, "The Gammaproteobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*". 2B (2nd ed.), 2005; New York: *Springer*. p: 1108.
- 4- **Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L.** Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology*. An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms. 2005; 45(5): 403-4.
- 5- **Bentley R, Meganathan R.** Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological reviews*. 1982; 46(3): 241-80.
- 6- **Vogt RL, Dippold L.** *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002. *Public health reports*. 2005; 120(2): 174-8.
- 7- **Lee DS, Lee SJ, Choe HS.** Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance. *BioMed research international*. 2018.
- 8- **Zibaii MI, Kazemi A, Latifi H, Azar MK, Hosseini SM, Ghezelaigh MH.** Measuring bacterial growth by refractive index tapered fiber optic biosensor. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010; 101(3): 313-20.
- 9- **Migula W: Bacteriaceae (Stabchenbacterien).** In: **A. Engler and K. Prantl** (eds): *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, W. Engelmann, Leipzig, Teil I, Abteilung Ia, 1895; p: 20–30.
- 10- **Castellani A, Chalmers AJ.** *Manual of Tropical Medicine*, 3rd ed. *Williams Wood and Co.* New York. 1919.
- 11- **George M.** The Gammaproteo bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2B (2nd ed.). New York: *Springer*. p: 1108.
- 12- **Madigan MT, Martinko JM, Parker J.** *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. 2006.
- 13- **Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L.** Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. 2005; 45(5): 403-4.
- 14- **Darnton NC, Turner L, Rojevsky S, Berg HC.** On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2007; 189(5): 1756-64.
- 15- **Angelopoulou M, Petrou P, Misiakos K, Raptis I, Kakabakos S.** Simultaneous Detection of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157: H7 in Drinking Water and Milk with Mach-Zehnder Interferometers Monolithically Integrated on Silicon Chips. *Biosensors*. 2022; 12(7): 507.
- 16- **Liu Y, Chin LK, Ser W, Ayi TC, Ho WM, Yap PH, et al.** A single living bacterium's refractive index measurement by using optofluidic immersion refractometry. *17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. 2013.
- 17- **Balaev AE, Dvoretzki KN, Doubrovski VA.** Refractive index of *Escherichia coli* cells. In-Saratov Fall Meeting 2001: *Optical Technologies in Biophysics and Medicine*. 2002; SPIE.
- 18- **Zordan MD, Grafton MM, Acharya G, Reece LM, Cooper CL, Aronson AI, et al.** Detection of pathogenic *E. coli* O157: H7 by a hybrid microfluidic SPR and molecular imaging cytometry device. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009; 75(2): 155-62.
- 19- **Song L, Zhang L, Huang Y, Chen L, Zhang G, Shen Z, et al.** Amplifying the signal of localized surface plasmon resonance sensing for the sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 1-8.
- 20- **Ali MA, Eldin TS, Moghazy GE, Tork IM, Omara II.** Detection of *E. coli* O157: H7 in feed samples using gold nanoparticles sensor. *Int. J. Curr. Microbiol*. 2014; 3(6): 697-708.

E. coli bacteria Detection O157:H7 Using Si₃N₄ based Nano Biosensors

Mahdi Rashki^{1*}, Mohammad Reza Rakhshani²

1- Assistant professor, Department of Physics, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Assistant professor, Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: December 3, 2022; Revise: December 5, 2022; Accept: January 22, 2023

Summary

There are different methods to identify bacteria. One of the ways of identification is the use of nano bio sensors. Recently, these nano bio sensors have been widely used due to their non-invasive and rapid detection. The silicon nitride-based bio sensor, which is designed based on dielectric materials, has a very high sensitivity in detecting bacteria. In this paper, we have used nano bio sensor based on silicon nitride grating to detect *Escherichia coli* serotype O157:H7. The simulations show that the electromagnetic wave reflection spectrum in the proposed structure has a very narrow width of 6nm, and the measured FOM (Figure of Merit) and sensitivity of this bio sensor when exposed to this bacterium are 17.5RIU⁻¹ and 105nm/RIU has been obtained, respectively, which shows the high accuracy and sensitivity of this bio sensor. This sensor can be used to detect bacteria whose refractive index is within the range of this bacteria.

Key words: Identifying serotype O157:H7 *E. coli* Bacteria, Nano Biosensors, Silicon Nitride based Sensor



مقایسه روش‌های متداول در تشخیص تک‌یاخته‌های خونی نشخوارکنندگان منطقه سیستان، ایران

رضا نبوی*

دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

دریافت مقاله: ۵ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۱۶ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱۸ دی ۱۴۰۱

چکیده

تیلریوزیز و آناپلاسموزیز در جمعیت نشخوارکنندگان بومی منطقه سیستان بسیار شایع می‌باشند. بابزیوزیز گاوان اگرچه با شیوعی بسیار کمتر ولی در منطقه قابل رؤیت است. همچنین بیماری سورا با عاملیت *تریپانازوما اونسی* جمعیت قابل توجهی از شترهای منطقه را رنج می‌دهد. مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه روش‌های متداول در تشخیص این اجرام عفونی با تکیه بر روش‌های بالینی، رنگ‌آمیزی گیمسا و تکنیک‌های مولکولی طراحی و در طول یک بازه زمانی ۵ ساله (۱۳۹۷-۱۳۹۲) انجام پذیرفته است. نمونه خون تعداد ۶۳۶ راس گاو، ۸۰ راس گوسفند و ۲۱۳ نفر شتر با هدف ردیابی اجرام عفونی ذکر شده با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا و همچنین انواع تکنیک‌های مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین تشخیص درمانگاهی این بیماری‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاضر نشانگر این است که روش‌های تشخیصی مولکولی به‌طور معناداری از حساسیت و ویژگی بیشتری نسبت به سایر روش‌ها بهره‌مند هستند ولی این موضوع بیانگر ارجحیت آنها در تشخیص نیست بلکه هر کدام از روش‌های تشخیصی مطالعه شده دارای مزایا و معایب خاص خود هستند که کاربرد هر روش بر اساس نوع انگل، نوع میزبان و شرایط حاکم بر منطقه سیستان به‌طور مفصل مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: تیلریا، بابزیا، آناپلازما، گیمسا، مولکولی

مقدمه

منطقه سیستان یکی از مناطق مهم در پرورش و نگهداری نشخوارکنندگان اهلی در شرق فلات ایران می‌باشد. جمعیت قابل توجهی از گاوهای نژادهای هلشتاین و سیستانی، شتر تک‌کوهانه و نژادهای مختلف گوسفند و بز به‌صورت سنتی در بافت روستایی این منطقه در حال پرورش هستند. اقلیم سیستان گرم و خشک به همراه بادهای ۱۲۰ روزه در انتهای فصل بهار و تابستان می‌باشد. آب و هوای گرم همراه با پرورش سنتی نشخوارکنندگان در منطقه باعث گردیده که انواع کنه‌های ناقل تک‌یاخته‌های خونی از جمله کنه‌های سخت هیالوما، ریپی سفالوس، هموفیزالیس و درماسنتور با شیوع بالایی میزبانان مهره‌دار خود را مورد هجوم قرار دهند (۱). با آغاز ماه اسفند تا انتهای تابستان تیلریوزیز بالینی گاو (تیلریا آنولاتا) و گوسفندان (تیلریا لستوکوردی) در منطقه جولان می‌دهد. به‌طوری که می‌توان این بیماری را شایع‌ترین بیماری عفونی این دام‌ها در ماه‌های ذکرشده محسوب نمود (۲، ۳). در طول سال‌های حضور خود در منطقه سیستان متوجه گردیدم که آنپلاسموزیز ناشی از آنپلازما مارژیناله از شکل بدون علامت تا آنپلاسموزیز بسیار حاد و شدید در جمعیت نشخوارکنندگان منطقه دیده می‌شود (۴). همچنین موارد نادر و با شیوع اندک تب تگزاس گاو ناشی از *بابریا بایجمینا* (در حال انتشار) نیز مشاهده شده است. از قدیم‌الایام بیماری سورا با عاملیت *تریپانازوما اوانسی* را به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم شتر در جنوب شرق ایران معرفی می‌کردند (۵). در کنار این موارد حضور احتمالی گونه‌های کم‌اهمیت‌تر اجرام ذکرشده را نیز می‌توان در نظر گرفت. از آنجایی که جمعیت روستایی منطقه سیستان از شرایط اقتصادی نسبتاً ضعیفی برخوردار هستند و درمان اصولی و به موقع بیماری‌های دامی

کمک شایانی به کاهش هزینه‌های مصرفی این افراد خواهد کرد، لذا تشخیص دقیق و صحیح بیماری‌های ذکرشده بسیار حایز اهمیت است. باید به این نکته توجه نمود که درمان بیماری‌های مورد بحث در این مقاله متفاوت بوده و هزینه قابل توجهی را به دامدار تحمیل می‌کند و همین موضوع اهمیت آزمایشگاه را در تشخیص دقیق این بیماری‌ها دو چندان می‌کند. مطالعه حاضر با هدف مقایسه و تحلیل روش‌های متداول در تشخیص اجرام عفونی ذکرشده با تکیه بر روش‌های بالینی، رنگ‌آمیزی گیمسا و تکنیک‌های مولکولی، در طول یک بازه زمانی ۵ ساله (۱۳۹۷-۱۳۹۲) انجام شده است.

مواد و روش کار

تیلریوزیز گرمسیری: در سال ۱۳۹۲، تعداد ۱۶۰ نمونه خون وریدی از گاوهای بدون علامت بالینی جهت شناسایی حاملین بدون علامت *تیلریا آنولاتا*، اخذ شد. تمامی نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی گیمسا و بررسی میکروسکوپی با استفاده از روش PCR معمولی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی N516، N517 مورد ارزیابی قرار گرفتند (۶).

تیلریوزیز و بابریوزیز گوسفندی: در سال ۱۳۹۳، به جهت ارزیابی میزان شیوع تک‌یاخته‌های خونی جنس *تیلریا* و *بابریا* در گوسفندان منطقه سیستان تعداد ۸۰ نمونه خون وریدی مورد آزمایش قرار گرفت. تمامی نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی گیمسا و ارزیابی مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیرکننده قطعه 18S rRNA مورد بررسی قرار گرفتند (۷).

سورا: در سال ۱۳۹۴، مطالعه مولکولی به جهت برآورد میزان شیوع *تریپانازوما اوانسی* در شترهای شهرستان زابل انجام شد. تعداد ۱۱۵ نمونه با استفاده از آزمون PCR و روش مشاهده میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند (۸).

آماری $P < 0.001$ معنادار است.

نتایج مولکولی مطالعه بعدی در سال ۱۳۹۳ بیانگر شیوع آلودگی گوسفندان منطقه سیستان با تیلریا در ۶۶/۲۵ درصد موارد و بازیرا در ۳/۷۵ درصد موارد بود. مطالعه میکروسکوپی نمونه‌های بررسی شده تنها در ۱۰ درصد موارد آلودگی با این اجرام خونی را تأیید کرد. لازم به ذکر است تشخیص میکروسکوپی بازیرا/اوویس به‌عنوان بازیرای کوچک گوسفند از تیلریا/لستوکوردی بسیار مشکل بوده و در بسیاری موارد مقدور نیست. نتایج این مطالعه بیانگر اختلاف زیاد حساسیت روش تشخیص مولکولی و میکروسکوپی در تشخیص تیلریا و بازیرای گوسفند است $P < 0.001$.

نتایج مطالعه سال ۱۳۹۴ در خصوص اپیدمیولوژی سورا نشان داد که از تعداد ۱۱۵ نمونه خون شتر آزمایش شده با روش PCR، ۶/۱۹ درصد آنها آلوده به *تریپانازوما/اونسی* بودند. مشاهده میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گیمسا قادر به تشخیص هیچ‌گونه آلودگی در این نمونه‌ها نبود.

مطالعه سال ۱۳۹۵، به دنبال یافتن بازیرا باجمینا عامل ایجادکننده بیماری تب تگزاس گاو و طراحی و انجام شد. با اینکه تعداد قابل توجهی نمونه خون از گاوهای مراجعه‌کننده به کلینیک‌های منطقه اخذ شد (۲۴۶ عدد)، بررسی میکروسکوپی نتوانست حضور این آلودگی را نشان دهد. اگرچه در سال‌های بعد در یک مطالعه موردی توانستیم حضور این انگل را در منطقه اثبات نماییم. نتایج این مطالعه نشان داد که نحوه مواجهه و ارزیابی بازیوز گاو با تیلریوز و آناپلاسموز در منطقه سیستان بسیار متفاوت است.

مطالعه انجام شده در سال ۱۳۹۷، حاکی از این بود که از تعداد ۱۰۰ نفر شتر آزمایش شده در مطالعه میکروسکوپی ۲۶ درصد موارد شواهدی دال بر آلودگی با آناپلازما را داشتند. در حالی که

تب تگزاس گاو: در سال ۱۳۹۵، از تعداد ۲۴۶ راس گاو مراجعه‌کننده به کلینیک‌های منطقه سیستان به‌صورت تصادفی گسترش خون تهیه شد. هدف از انجام این مطالعه بررسی میکروسکوپی این نمونه‌ها به جهت یافتن تک‌یاخته بازیرا بوده است (۹).

آناپلاسموز در شتر: در سال ۱۳۹۷، تعداد ۱۰۰ نفر شتر تک‌کوهانه در شهرستان‌های زابل و زاهدان به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. از این حیوانات نمونه خون محیطی جهت بررسی میکروسکوپی (با استفاده از گیمسا) و همچنین نمونه خون وریدی جهت ارزیابی مولکولی گونه‌های مختلف آناپلازما با استفاده از روش Nested PCR اخذ شد (۱۰).

آناپلاسموز در گاو: در سال ۱۳۹۷، مطالعه‌ای جامع به جهت شناسایی گونه‌های آناپلازما در جمعیت گاوهای منطقه سیستان انجام شد. در این مطالعه تعداد ۸۰ نمونه خون از گاوهای دارای علایم بالینی و ۱۵۰ نمونه از موارد بدون علامت اخذ شد. بررسی میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گیمسا) و ارزیابی گسترده مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی متنوع در راستای تعیین گونه‌های آناپلازما در منطقه انجام پذیرفت (۴).

حدود اطمینان ۹۵ درصد برای شیوع آلودگی در تحقیقات مختلف از روش توزیع دو جمله‌ای محاسبه شد.

نتایج

نتایج مولکولی مطالعه سال ۱۳۹۲ نشان داد که میزان شیوع تیلریا/آنولاتا در گاوهای بدون علامت منطقه سیستان ۲۷/۵ درصد (نژاد سیستانی) و ۴۷/۵ درصد (نژاد هلشتاین) می‌باشد. در حالی که ارزیابی میکروسکوپی آلودگی به این انگل را تنها در ۶/۲۵ درصد موارد نشان داد. این تفاوت از نظر

آزمون Nested PCR انجام شده آلودگی با *آناپلاسما* کملی و *آناپلاسما پلاتیس* را در ۳۹ درصد موارد اثبات نمود. نتایج این مطالعه نشان داد که تشخیص گونه *آناپلاسما* در این حیوانات با روش میکروسکوپی بسیار مشکل بوده و استفاده از روش‌های مولکولی بسیار کارآمدتر است.

مطالعه شماره ۶ در سال ۱۳۹۷ با هدف ارزیابی جامع آلودگی با *آناپلاسما* در جمعیت گاوهای منطقه سیستان انجام شد. بررسی میکروسکوپی میزان شیوع *آناپلاسما مارچیناله* را در این جمعیت

۳۲/۶ درصد برآورد نمود. در حالی که روش Nested PCR، *آناپلاسما مارچیناله* را در ۷۲/۱۷ درصد موارد و *آناپلاسما پلاتیس* را در ۶۶/۵۲ درصد موارد رهگیری کرد. نتایج این مطالعه بیانگر این موضوع بود که *آناپلاسما* در اغلب موارد همراه با تظاهرات بالینی نیست. به طوری که در تعداد ۸۰ رأس گاو دارای علائم درمانگاهی ۳۱/۲۵ درصد آلوده به *آناپلاسما مارچیناله* بودند در حالی که میزان آلودگی در ۱۵۰ رأس گاو بدون علائم بالینی ۹۴ درصد بود.

جدول ۱- مقایسه نتایج به دست آمده در مطالعات میکروسکوپی و مولکولی در نشخوارکنندگان منطقه سیستان در طول سال‌های ۹۷-۱۳۹۲

شماره مطالعه	سال انجام مطالعه	انگل خونی مورد بررسی	تعداد و نوع حیوان مورد بررسی	آلودگی در روش میکروسکوپی		آلودگی در روش مولکولی	
				تعداد (درصد)	حدود اطمینان ۹۵٪	تعداد (درصد)	حدود اطمینان ۹۵٪
۱	۱۳۹۲	تیلریا آنولانا	۱۶۰ رأس گاو	۱۰ (۶/۲۵)	۳٪ - ۱۱/۲٪	۶۰ (۳۷/۵)	۳۰٪ - ۴۵/۵٪
۲	۱۳۹۳	تیلریا ویاوزیا	۸۰ رأس گوسفند و بز	۸ (۱۰)	۴/۴٪ - ۱۸/۸٪	۵۶ (۷۰)	۵۸/۷٪ - ۷۹/۷٪
۳	۱۳۹۴	تریپانازوما اوانسی	۱۱۵ رأس شتر	۰ (۰)	۰٪ - ۳/۳٪	۷ (۶/۳)	۲/۵٪ - ۱۲/۱٪
۴	۱۳۹۵	بابزیا باجمینا	۲۴۶ رأس گاو	۰ (۰)	۰٪ - ۱/۵٪	*	*
۵	۱۳۹۷	آناپلاسما	۱۰۰ رأس شتر	۲۶ (۲۶)	۱۷/۷٪ - ۳۵/۷٪	۳۹ (۳۹)	۲۹/۴٪ - ۴۹/۳٪
۶	۱۳۹۷	<i>آناپلاسما مارچیناله</i>	۲۳۰ رأس گاو	۷۵ (۳۲/۶)	۲۶/۶٪ - ۳۹/۱٪	۱۶۶ (۷۲/۱۷)	۶۵/۹٪ - ۷۷/۹٪
		<i>آناپلاسما پلاتیس</i>		۰ (۰)	۰٪ - ۱/۶٪	۱۵۳ (۶۶/۵۲)	۶۰/۱٪ - ۷۲/۶٪

*: آزمایش مربوطه انجام نشده است.

بحث

مهم‌ترین و اساسی‌ترین وظیفه دامپزشکان طب داخلی دام‌های بزرگ تشخیص و درمان بیماری‌های دامی یک منطقه جغرافیایی و ارائه راهکارهای کنترل و پیشگیری در خصوص بیماری‌های شایع و مهم منطقه می‌باشد. اطلاع از اپیدمیولوژی بیماری‌های مهم یک ناحیه جغرافیایی، مقوله‌ای بسیار مهم در تشخیص محسوب می‌شود. همچنین استفاده از روش‌های متنوع و متعدد آزمایشگاهی ابزاری مهم در تشخیص این بیماری‌ها بوده و لزوم استفاده از پاراکلینیک برای هر دامپزشک حاذق و مجرب محسوب است. برای استفاده از این روش‌ها باید به امکانات آزمایشگاهی، نحوه نمونه‌گیری،

شرایط دسترسی به آزمایشگاه و همچنین وضعیت اقتصادی حاکم بر منطقه توجه نمود. به‌عنوان مثال اگر در یک منطقه جغرافیایی خاص امکان استفاده از تکنیک‌های پیچیده مولکولی و ایمونولوژیک میسر نباشد باید از روش‌های ساده، ارزان و در دسترس بهره برد.

بیماری‌های عفونی منتقله از طریق بندپایان به‌عنوان مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های نشخوارکنندگان در منطقه سیستان محسوب می‌شوند. جهت تشخیص تیلریوز، بابزیوز، *آناپلاسما* و تریپانازومیاز می‌توان از علائم درمانگاهی، مشاهده میکروسکوپی (استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا) و همچنین تکنیک‌های متنوع

مولکولی بهره‌مند شد (۱۱). نتایج مطالعه حاضر بیانگر این موضوع است که برای تشخیص همه بیماری‌های انگلی ذکر شده نمی‌توان از یک برنامه تشخیصی یکسان استفاده نمود و کاربرد هر کدام از تکنیک‌های آزمایشگاهی نامبرده بر اساس نوع انگل و میزبان متفاوت است. در ادامه به بحث پیرامون این موضوع خواهیم پرداخت.

کاربرد علایم درمانگاهی در تشخیص:

برخی موارد علایم بالینی واضح و برجسته بوده و دامپزشک را به سمت تشخیص قطعی سوق می‌دهند. به‌عنوان مثال در خصوص تیلریوز گرمسیری و همچنین تب تگزاس گاوان علایم درمانگاهی در تشخیص موارد حاد بیماری بسیار کمک‌کننده هستند (۱۲). اغلب دامپزشکان متبحر منطقه سیستان با مشاهده تورم عقده‌های لنفاوی، بی‌رنگی مخاطات و تب بالا به تیلریوز مشکوک خواهند شد (۶). تب بالا و هموگلوبینوری در کنار زردی مخاطات چشم در تشخیص تب تگزاس با عاملیت *بازیلا باجمینا* بسیار کمک‌کننده است (مشاهدات بالینی تب تگزاس در سیستان، در حال انتشار). این در حالیست که در موارد مزمن بیماری‌های ذکر شده و همچنین آناپلاسموز نشخوارکنندگان علایم بالینی ممکن است مبهم بوده و دامپزشک را در تشخیص گمراه کنند (۴). بیماری سورا در شتر نیز با لاغری پیشرفته، کم‌خونی و تب همراه است که در بسیاری از بیماری‌ها دیده می‌شود و جهت تشخیص قطعی آن حتماً نیاز به تأیید آزمایشگاه است (۸). تیلریوز و بازیوز نشخوارکنندگان کوچک تظاهرات بالینی مشابه ارائه می‌کنند که بیشتر شامل تب، درجاتی از کم‌خونی و علایم تنفسی است لذا توصیه می‌شود در این دام‌ها نیز از روش‌های آزمایشگاهی برای تشخیص استفاده شود (۷، ۱۴).

مشاهده میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی

گیمسا: از زمانی که ویکتور بابز دانشمند رومانیایی و آرنولد تیلر سوئدی بازیلا و تیلریا را کشف نمودند بیش از یک قرن می‌گذرد در طول این سال‌های متمادی مشاهده میکروسکوپی گسترش‌های خونی با رنگ‌آمیزی گیمسا به‌عنوان ساده‌ترین و در دسترس‌ترین روش تشخیص آزمایشگاهی به کار رفته است (۱۵). از مزایای این روش می‌توان به ارزان بودن آن و عدم نیاز به امکانات پیشرفته آزمایشگاهی اشاره نمود. همچنین در این روش می‌توان شدت آلودگی به اجرام انگلی را مشخص کرد که یک امکان بسیار مفید و کاربردی در تحلیل بیماری محسوب می‌شود (۱۱). سرعت بالای جوابدهی این تکنیک نیز بسیار جذاب است. دامپزشک به راحتی می‌تواند قبل از آغاز درمان به جواب آزمایش دسترسی پیدا کند. از معایب این روش می‌توان به پایین بودن حساسیت آن اشاره نمود. این مسأله در نتایج مطالعه حاضر کاملاً ملموس است (جدول ۱). در بسیاری از آلودگی‌های انگلی تعداد جرم موجود در گسترش خون پایین بوده و کاملاً محتمل است که از دید آزمایشگر مخفی بمانند. به‌عنوان مثال در تیلریوز مزمن یا آلودگی به بازیلا ممکن است تعداد اجرام بیماری‌زا کم بوده و جواب منفی کاذب ارائه شود (۶). همچنین در قرائت اسلایدهای میکروسکوپی رنگ شده تجربه بالای فرد آزمایشگر مورد نیاز است. به کرات شاهد این امر بوده‌ایم که آزمایشگاه‌های تشخیصی رسوبات رنگ گیمسا، اجسام هاول ژولی یا سایر اشکال غیر مرتبط را به جای اجرام انگلی گزارش نموده‌اند. با این حال با توجه به میزان شیوع بالا و تنوع گسترده اجرام انگلی خونی در منطقه سیستان استفاده از این روش را قبل از درمان توصیه می‌کنیم. تیلریوز گرمسیری و تب تگزاس در گاوان خصوصاً در مراحل حاد به راحتی با این تکنیک قابل شناسایی هستند. تشخیص

گران بودن وسایل و مواد مصرفی، حضور نیروی متخصص با علم و تجربه کافی و طولانی بودن زمان جوابدهی اشاره نمود. همچنین معمولاً این روش‌ها از نوع آزمون‌های کیفی بوده و شدت آلودگی را بیان نمی‌کنند. در راستای تشخیص تیلریوزیز گرمسیری و تب تگزاس گاوان و همچنین آناپلاسموزیز حاد نیازی به استفاده از این روش‌های پیچیده و پرهزینه نیست (۴، ۶). ولی در تشخیص قطعی بیماری سورا، تشخیص موارد مزمن و پنهان آلودگی به تیلریا، بابزیا و آناپلاسما، تشخیص تفریقی تیلریا و بابزیای گوسفندی و همچنین تشخیص گونه‌های متنوع و کم‌اهمیت‌تر اجرام ذکرشده، استفاده از تکنیک‌های مولکولی بسیار کارآمد است (۴، ۱۴). در حال حاضر استفاده از این روش‌ها در منطقه سیستم محدود به تحقیقات بوده و کاربرد تجاری - تشخیصی ندارند. با توجه به شرایط حاکم بر منطقه و حجم بالای دام‌های آلوده به انواع اجرام انگلی خونی پیشنهاد می‌شود دامپزشکان بخش خصوصی و همچنین شبکه‌های دامپزشکی منطقه سیستم از امکانات کافی و نیروی متخصص موجود در مراکز دانشگاهی شهرستان زابل در راستای بهره‌مندی از تشخیص بهتر و در نهایت کنترل علمی و صحیح بیماری‌های موجود استفاده کنند.

میکروسکوپیک تیلریا لستوکوردی و بابزیا اویس در گوسفندان با استفاده از این روش بسیار مشکل بوده و اجرام به هم شبیه هستند (۷، ۱۴). آناپلاسموزیز ناشی از آناپلاسما مارژیناله با این روش قابل تشخیص است ولی به هیچ عنوان استفاده از این روش را به دلیل دشواری در تشخیص برای یافتن سایر گونه‌های آناپلاسما مانند سنتراله، پلاتیس و فاگوسایتوفیلوم توصیه نمی‌کنیم (۴). تریپانازوما اوانسی در گسترش خون شتر، با توجه به شکل منحصر به فردی که دارد، با هیچ جرم دیگری اشتباه نمی‌شود. ولی به دلیل تعداد بسیار پایین انگل در موارد مزمن بیماری تقریباً با رنگ‌آمیزی گیمسا قابل رهگیری نیست (۸).

کاربرد روش‌های تشخیص مولکولی: با توجه به وجود مراکز دانشگاهی در منطقه سیستم استفاده از انواع تکنیک‌های مولکولی در تشخیص آلودگی‌های انگلی میسر است. از مزایای این روش‌ها می‌توان به حساسیت بسیار بالای آنها اشاره نمود. همچنین در تمامی مواردی که در روش رنگ‌آمیزی گیمسا امکان بررسی وجود ندارد، این روش‌ها گره‌گشا بوده، می‌توانند انواع گونه‌ها و سویه‌های انگلی را با دقت بسیار بالایی رصد کنند (۱۵)، ولی معایب و ایراداتی نیز به همراه دارند که استفاده از آنها را بسیار محدود می‌کند از جمله می‌توان به

References

- 1- Ganjali M, Dabirzadeh M, Sargolzaie M. Species diversity and distribution of ticks (Acari: Ixodidae) in Zabol county, eastern Iran. *Journal of Arthropod Borne Disease*. 2014; 8(2): 219-223. [In Persian]
- 2- Soosaraei M, Haghi MM, Etemadifar F, Fakhar M, Teshnizi SH, Hezarjaribi HZ, et al. Status of theileriosis among herbivores in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary World*. 2018; 11(3): 332-341. [In Persian]
- 3- Zarei F, Ganjali M, Nabavi R. Identification of *Theileria* species in sheep and vector ticks

using PCR method in Zabol, eastern Iran. *Journal of Arthropod Borne Disease*. 2019; 13(1): 76-82. [In Persian]

4- Fathi A. Molecular detection of anaplasma species in cattle of Sistan region. DVM Thesis. University of Zabol, Iran. 2018. [In Persian]

5- Sazmand A, Joachim A. Parasitic diseases of camels in Iran (1931-2017) - a literature review. *Parasite*. 2017; 24: 21.

6- Majidani H, Nabavi R, Ganjali M, Saadati D. Detection of *Theileria annulata* carriers in Holstein-Friesian (*Bos taurus taurus*) and Sistani

(*Bos taurus indicus*) cattle breeds by polymerase chain reaction in Sistan region, Iran. *Journal of Parasitic Disease*. 2016; 40(4): 1184-1188. [In Persian]

7- Sharifi N, Ganjali M, Nabavi R, Saadati D. A study on prevalence and identification of ovine *Theileria* and *Babesia* infection in Zabol using PCR method. *Journal of Parasitic Disease*. 2016; 40(4): 1535-1539. [In Persian]

8- Zangoie F, Ganjali M, Keighobadi M, Nabavi R. Molecular detection of *Trypanosoma evansi* based on ITS1 rDNA gene in *Camelus dromedarius* in Sistan Region, Iran. *Tropical Biomedicine*. 2018; 35(4): 1140-1147. [In Persian]

9- Nouri-Sadegh M. Study of the prevalence of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in native cattle with anemia in veterinary clinics of Sistan zone. MS Thesis. University of Zabol, Iran. 2016. [In Persian]

10- Zeinali R. Molecular study of *Anaplasma* species in camels of Zahedan, Saravan -Iran. MS Thesis. University of Zabol, Iran. 2018. [In Persian]

11- Lempereur L, Beck R, Fonseca I, Marques C, Duarte A, Santos M, et al. Guide-

lines for the detection of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vector Borne and Zoonotic Disease*. 2017; 17(1): 51-65.

12- Esteve-Gasent MD, Rodríguez-Vivas RI, Medina RF, Ellis D, Schwartz A, Cortés Garcia B, et al. Research on integrated management for Cattle fever ticks and bovine babesiosis in the United States and Mexico: current status and opportunities for binational coordination. *Pathogens*. 2020; 9(11): 871.

13- Ma Q, Liu J, Li Z, Xiang Q, Wang J, Liu A, et al. Clinical and pathological studies on cattle experimentally infected with *Theileria annulata* in China. *Pathogens*. 2020; 9(9): 727.

14- Jalali SM, Jolodar A, Rasooli A, Darabifard A. Detection of *Theileria lestoquardi* cross infection in cattle with clinical theileriosis in Iran. *Acta Parasitologica*. 2016; 61(4): 756-761. [In Persian]

15- Khattak RM, Rabib M, Khan Z, Ishaq M, Hameed H, Taqddus A, et al. A comparison of two different techniques for the detection of blood parasite, *Theileria annulata*, in cattle from two districts in Khyber Pukhtoon Khwa Province (Pakistan). *Parasite*. 2012; 19(1): 91-5.

Comparison of Common Available Methods in Identification of Ruminant's Blood Protozoa, Sistan Region of Iran

Reza Nabavi

116

Associate professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Receive: December 26, 2022; Revise: January 6, 2023; Accept: January 8, 2023

Summary

Theileriosis and Anaplasmosis are very prevalent in native ruminants of Sistan region of Iran. Bovine babesiosis could be found with fewer prevalence. Also, *Trypanosoma evansi* induce the *Surra* disease in the camels of the region. The objective of present study is study and comparison of common available methods in identification of such infective organisms including clinical appearance, giemsa staining and molecular techniques (2013-2018). The blood specimens of 636 cattle, 80 sheep and 213 camels have been investigated with giemsa staining and molecular methods. Also, the clinical features were evaluated. The current results indicated that molecular PCR amplification is a more sensitive tool as compared to smear scanning for the detection of blood protozoa. However, it doesn't mean that molecular techniques could be considered more preferable. The advantages and disadvantages of each identification method is discussed comprehensively based on the type of the parasites, hosts and economical condition in the area.

Key words: *Theileria, Babesia, Anaplasma, Giemsa, Molecular*

تأثیر نیسین و عصاره الکلی چای ترش بر جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC1113 تلقیح شده در فیله چرخ شده میگو وانامی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

سعیده سرگزی^۱، محمد رهنما*^۲، مجید علیپور اسکندانی^۲، داریوش سعادت^۲، افسانه نوری جنگی^۳، محمود
کهنه‌پوشی^۴

- ۱- دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، اداره شیلات شهرستان زهک، زهک، ایران.
- ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۰۸ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۳۰ بهمن ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۴۰۱

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن مواد غذایی است که برای انسان خطری جدی محسوب می‌شود این مطالعه به‌منظور ارزیابی اثرات ضد باکتریایی چای ترش[†] در مهار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*[‡] به تنهایی و توأم با نیسین در گوشت چرخ شده میگو وانامی انجام گردید. استخراج عصاره گیاه مورد مطالعه با استفاده از روش تبخیر درخلاء و به کمک دستگاه روتاری صورت پذیرفت. اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی چای ترش (۰، ۱، ۲/۵، ۳/۵، ۵ درصد) و نیسین (۰، ۰/۵، ۲/۵ میکروگرم بر گرم) و ترکیب مقادیر مختلفی از نیسین (میکروگرم بر گرم) و عصاره (٪): (۳/۵+۰/۲۵)، (۵+۰/۲۵)، (۲/۵+۰/۵)، (۱+۰/۵)، (۲/۵+۰/۵)، (۱+۲/۵)، (۲/۵+۲/۵) بر رفتار رشد باکتری مذکور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی ۲۱ روز بررسی گردید. نتایج نشان داد که رشد باکتری در غلظت‌های پایین عصاره‌ی چای ترش (۱ و ۲/۵ درصد) در مهار رشد باکتری از اختلاف معنی‌دار برخوردار نبودند تیمارهای ترکیبی عصاره به همراه نیسین توانستند از روز ۶ به بعد رشد باکتری را متوقف نمایند با توجه به یافته‌های این تحقیق می‌توان گفت عصاره‌ی چای ترش و باکتریوسین نیسین به تنهایی دارای خاصیت مهارکنندگی بوده و به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی مواد غذایی به جای انواع شیمیایی و صنعتی آن معرفی می‌شوند بکارگیری توأم این ترکیبات اثرات سینرژیست آنها را در کنار هم به اثبات رساند.

واژه‌های کلیدی: میگو وانامی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، چای ترش، نیسین، عصاره الکلی

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

[†] *Hibiscus sabdariffa*

[‡] *Staphylococcus aureus*

مقدمه

میگو یکی از لذیذترین غذاهای دریایی است و نسبت به سایر غذاها حاوی پروتئین زیادی بوده و کالری کمتری دارد (۱). استفاده از نگهدارنده‌های ضد میکروبی در بسیاری از محصولات غذایی به منظور جلوگیری از آلودگی ماده غذایی پس از تولید بسیار رایج است و باعث حفظ کیفیت غذا و افزایش زمان ماندگاری می‌شود (۲، ۲۳). باکتریوسین‌ها اغلب به عنوان ابزارهای بیولوژیکی با ارزشی جهت ارتقای ایمنی غذا و کاهش شیوع بیماری‌های ناشی از غذاهای فاسد مطرح هستند (۳). نیسین باکتریوسین پلی‌پپتیدی مقاوم به حرارت تولیدشده به وسیله سویه‌های معینی از لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه‌ی لاکتیس می‌باشد که مورد تأیید سازمان جهانی سلامت به عنوان یک ترکیب محافظت کننده‌ی ضد میکروبی طبیعی در مواد غذایی قلمداد شده و همین‌طور چای ترش از قدیم‌الایام به عنوان دارو استفاده می‌شده است و هم‌اکنون نیز به عنوان دارو گیاهی دارویی مورد توجه است (۴). *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل ایجاد عفونت و مسمومیت غذایی در انسان می‌باشد و فلور طبیعی پوست است و باعث بیماری‌هایی نظیر پنومونی و سپتی‌سمی می‌شود (۵). بشر از دیرباز برای افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی با استفاده از روش‌های مختلف به فکر کاهش یا حذف عوامل میکروبی بیماری‌زا در مواد غذایی بوده است. لذا نیاز به استفاده از نگهدارنده‌ها برای افزایش طول دوره‌ی نگهداری مواد غذایی ضروری به نظر می‌رسد (۶). نگهدارنده‌های طبیعی که نه تنها دارای عوارض جانبی نیستند بلکه باعث بهبود بو، طعم و مزه ماده غذایی شده و زمان ماندگاری محصول را نیز افزایش می‌دهند (۷). امروزه استفاده از روش‌های نوین نگهداری نظیر استفاده از باکتریوسین‌ها و عصاره‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان که دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است (۳). استفاده از مواد مناسب با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی به منظور بهبود کیفیت، افزایش عمر

ماندگاری گوشت و در عین حال جلوگیری از ضررهای اقتصادی، ضروری و مفید به نظر می‌رسد (۸).

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره: گیاه خشک‌شده‌ی چای ترش از پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد و جهت تهیه عصاره الکلی چای ترش میزان ۲۰ گرم از گیاه پودر شده، با ۱۰۰ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد مخلوط گردید و به مدت ۷۲ ساعت به صورت مداوم هم زده شد و سپس توسط کاغذ واتمن صاف گردید. خارج کردن اتانول از محلول عصاره با روش تبخیر در خلأ و توسط دستگاه روتاری صورت پذیرفت. جهت اطمینان از استریل بودن عصاره، عصاره در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت داده شد و عدم رشد میکروارگانیسم نشان‌دهنده استریل و مورد تأیید بودن عصاره اتانولی چای ترش بود (۹).

آماده‌سازی و محاسبه میزان تلقیح باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس: کشت لیوفلیزه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 1113 تهیه‌شده از بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در محیط برات BHI در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، دو مرتبه به‌طور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان یک به پنج با گلیسرین استریل مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندورف استریل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در ادامه، باکتری نگهداری شده در لوله‌های اپندورف دو بار متوالی در محیط آب‌گوشت BHI به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تجدید کشت شد و به منظور محاسبه میزان باکتری لازم $(1 \times 10^3 \text{ CFU/g})$ جهت تلقیح در گوشت چرخ شده میگو از دستگاه اسپکتروفوتومتر (ساخت شرکت Pharmacia انگلستان) در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد و به دست آوردن فاز سکون رشد باکتری از

($5+0.25$)، ($0+0.5$)، ($1+0.5$)، ($2.5+0.5$)، ($0+2.5$) و ($1+2.5$)، ($2.5+2.5$) می‌باشد. برای هر تیمار سه نمونه مورد آزمایش قرار گرفت. همه تیمارها در کیسه‌ها در طول دوره‌ی آزمایش در یخچال ($4 \pm 1^\circ C$) نگهداری شدند و شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در روزهای ۰، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: به جهت آن که رشد باکتری‌ها در طی زمان به صورت تصاعدی و نمایی است. لذا برای نرمال کردن داده‌ها، از لگاریتم تعداد باکتری استفاده شد. برای مقایسه تیمارهای مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way analysis of variance) و آزمون تکمیلی Tukey استفاده شد. تغییرات تعداد باکتری در طی مدت زمان آزمایش با استفاده از آزمون آماری Repeated Measures بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره چای ترش در گوشت چرخ‌شده میگو و انامی در روز صفر 1×10^3 CFU/g بود که با گذر زمان تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در گروه شاهد افزایش یافت.

طریق شمارش باکتریایی به کمک کشت سطحی، استفاده گردید (۱۰).

تهیه ماهی و تیمارها: برای انجام این پژوهش میگو و انامی از بازار ماهی‌فروشان زاهدان خریداری شده و به آزمایشگاه انتقال داده شد و جهت استریل‌سازی، فیله‌ها به سازمان انرژی اتمی ایران ارسال و با اشعه گاما با دوز ۱.۵ کیلوگری استریل گردید. جهت اطمینان از استریل بودن نمونه‌ها از روش کشت سطحی و محیط BHI استفاده شد. فیله‌ها در شرایط استریل چرخ شد و در وزن ۴۰ گرم در داخل کیسه‌های استریل استومیکر توزیع شد. برای بررسی نمونه‌ها از نظر میزان باکتری زنده از روش رقت‌سازی دهی و آزمون کشت سطحی بهره گرفته شد. از این رو هرکدام از تیمارهای مورد آزمایش، به همراه غلظت‌های مورد نظر عصاره الکلی چای ترش (۰، ۱، ۲/۵، ۳/۵، ۵، ۰، ۰/۵، ۲/۵) و دوز تعیین شده باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (1×10^3 CFU/g) داخل کیسه‌های استومیکر قرار داده شد و در شرایط کاملاً استریل توسط دستگاه استومیکر (مدل Interscience، فرانسه) به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق کاملاً هموزن گردید (۱۱، ۱۲). از گوشت تلقیح شده برای تهیه همه تیمارهای مورد آزمایش استفاده شد.

تیمارهای این تحقیق شامل شاهد (گوشت چرخ‌شده)، گوشت تلقیح شده با نیسین ($\mu g/g$) و عصاره (۰/): ($0+0$)، ($1+0$)، ($2.5+0$)، ($3.5+0$)، ($5+0$)، ($3.5+0.25$).

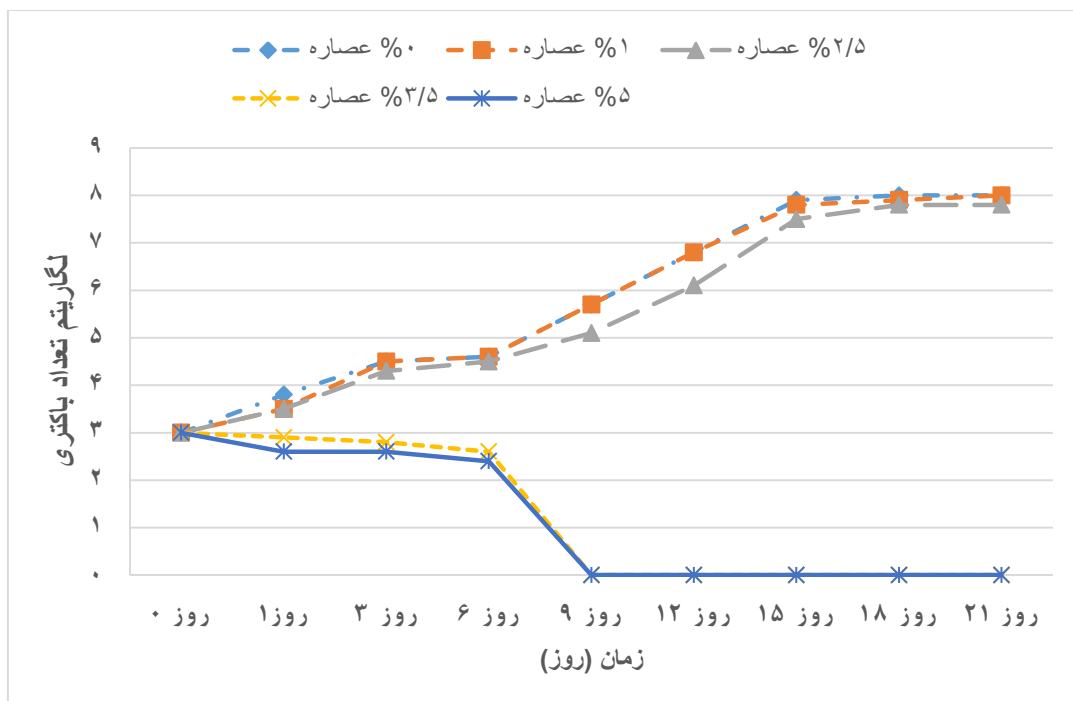
جدول ۱- میانگین و انحراف معیار ($Mean \pm SD$) لگاریتم تعداد باکتری در گوشت چرخ شده میگو و انامی با غلظت‌های مختلف عصاره چای ترش در طی مدت آزمایش

مقدار عصاره (%)	لگاریتم تعداد باکتری								
	روز ۰	روز ۱	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲	روز ۱۵	روز ۱۸	روز ۲۱
۰	3 ± 0	3.8 ± 0.1^e	4.5 ± 0.1^d	4.6 ± 0.1^d	5.7 ± 0.2^d	6.8 ± 0.1^d	7.9 ± 0.1^d	8 ± 0.1^d	8 ± 0.1^c
۱	3 ± 0	3.5 ± 0.1^d	4.5 ± 0.1^d	4.6 ± 0.1^d	5.7 ± 0.1^c	6.8 ± 0.1^c	7.8 ± 0.1^c	7.9 ± 0.1^c	8 ± 0.1^c
۲/۵	3 ± 0	3.5 ± 0.1^c	4.3 ± 0.2^c	4.5 ± 0.1^c	5.1 ± 0.1^b	6.1 ± 0.1^b	7.5 ± 0.1^b	7.8 ± 0.1^b	7.8 ± 0.1^b
۳/۵	3 ± 0	2.9 ± 0.1^b	2.8 ± 0.1^b	2.6 ± 0.1^b	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a
۵	3 ± 0	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a	2.6 ± 0.1^a

در هر ستون حروف انگلیسی نامتشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد

آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که از روز ۱ تا روز ۲۱، میانگین لگاریتم تعداد باکتری در بین تیمارهای حاوی عصاره چای ترش، تفاوت آماری معنی‌داری دارد. در تمام روزها $P < 0.05$ بود. از روز دوازدهم به بعد لگاریتم تعداد باکتری در تیمار شاهد به حد فساد و بیماری‌زایی آن رسید. غلظت ۳/۵ درصد عصاره چای ترش از روز دوازدهم و غلظت ۵ درصد آن از روز نهم نگهداری تا روز آخر به‌طور

کامل رشد باکتری را متوقف نمود. همچنین آزمون آماری Repeated Measures نشان داد که میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در تیمارهای حاوی عصاره چای ترش در طول مدت آزمایش تغییرات معنی‌داری دارد ($P < 0.05$). میانگین لگاریتم تعداد باکتری در طول مدت آزمایش در تیمارهایی که فقط حاوی عصاره چای ترش بودند، در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱- لگاریتم تعداد باکتری در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف عصاره (بدون استفاده از نیسین)

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) لگاریتم تعداد باکتری در گوشت چرخ شده میگو وانامی با غلظت‌های مختلف نیسین در طی مدت آزمایش

مقدار نیسین (µg/g)	روز ۰	روز ۱	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲	روز ۱۵	روز ۱۸	روز ۲۱
۰	۳±۰	۳٫۸±۰٫۱ ^c	۴٫۵±۰٫۱ ^c	۴٫۶±۰٫۱ ^c	۵٫۷±۰٫۲ ^b	۶٫۸±۰٫۱ ^b	۷٫۹±۰٫۱ ^b	۸±۰٫۱ ^b	۸±۰٫۱ ^b
۰٫۵	۳±۰	۳٫۷±۰٫۱ ^b	۲٫۹±۰٫۱ ^b	۲٫۸±۰٫۱ ^b	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a
۲٫۵	۳±۰	۳٫۵±۰٫۱ ^a	۲٫۵±۰٫۱ ^a	۲٫۳±۰٫۱ ^a	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a	۰±۰ ^a

در هر ستون حروف انگلیسی نامتشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد

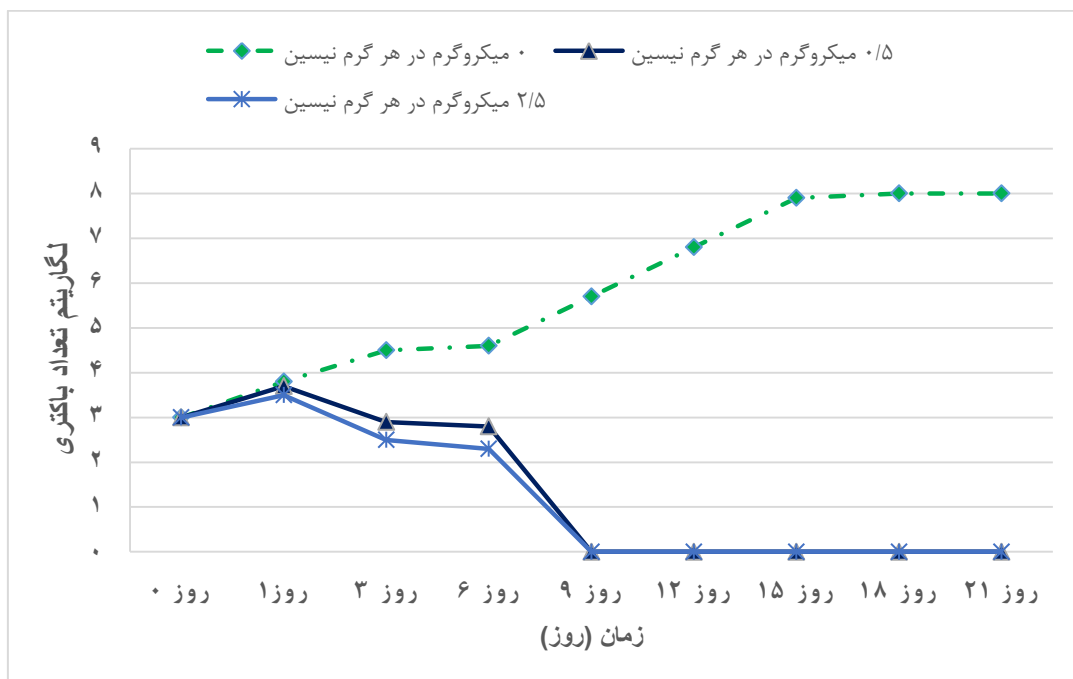
تفاوت آماری معنی‌داری دارد. در تمام روزها $P < 0.001$ بود.

آزمون آماری نشان داد که از روز ۱ تا ۲۱، میانگین لگاریتم تعداد باکتری در بین تیمارهای حاوی نیسین،

تا آخرین روز دوره نگهداری رشد باکتری را به طور کامل متوقف نمودند ($P < 0.05$).

همچنین آزمون آماری Repeated Measures نشان داد که میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در تیمارهای حاوی نیسین در طول مدت آزمایش تغییرات معنی‌داری دارد ($P < 0.05$).

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که میانگین تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت چرخ شده میگو وانامی در روز صفر 1×10^3 CFU/g بود. با گذر زمان تعداد باکتری در نمونه شاهد فاقد نیسین افزایش رشد داشت. در روز اول نگهداری تعداد باکتری‌های تیمارهای حاوی نیسین نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت. تیمارهای ۰/۵ و ۲/۵ میکروگرم بر گرم نیسین به ترتیب از روز نهم و ششم



نمودار ۲- لگاریتم تعداد باکتری در تیمارهای فقط حاوی غلظت‌های مختلف نیسین (بدون استفاده از عصاره)

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) لگاریتم تعداد باکتری در گوشت چرخ شده میگو با غلظت‌های مختلف عصاره چای ترش و نیسین در طی مدت آزمایش

مقدار نیسین (μg/g)	مقدار عصاره (%)	روز ۰	روز ۱	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲	روز ۱۵	روز ۱۸	روز ۲۱
۰	۰	۳±۰	۳.۸±۰.۱ ^g	۴.۵±۰.۱ ^f	۴.۶±۰.۱ ^e	۵.۷±۰.۲ ^b	۶.۸±۰.۱ ^b	۷.۹±۰.۱ ^b	۸±۰.۱ ^b	۸±۰.۱ ^b
۰/۲۵	۳.۵	۳±۰	۲.۸±۰.۱ ^b	۲.۷±۰.۱ ^d	۲.۵±۰.۱ ^d	۱.۸±۰.۱ ^a	۱.۸±۰.۱ ^a	۱.۸±۰.۱ ^a	۱.۸±۰.۱ ^a	۱.۸±۰.۱ ^a
۰/۵	۵	۳±۰	۲.۵±۰.۱ ^a	۲.۴±۰.۱ ^c	۲.۵±۰.۱ ^d	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c
۲/۵	۱	۳±۰	۳.۳±۰.۱ ^f	۲.۴±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c	۲.۳±۰.۱ ^c
۲/۵	۱	۳±۰	۳.۱±۰.۱ ^d	۲.۳±۰.۱ ^b	۲.۳±۰.۱ ^b	۲.۳±۰.۱ ^b	۲.۳±۰.۱ ^b	۲.۳±۰.۱ ^b	۲.۳±۰.۱ ^b	۲.۳±۰.۱ ^b
۲/۵	۲.۵	۳±۰	۳.۱±۰.۱ ^c	۲.۱±۰.۱ ^a	۲.۱±۰.۱ ^a	۲.۱±۰.۱ ^a	۲.۱±۰.۱ ^a	۲.۱±۰.۱ ^a	۲.۱±۰.۱ ^a	۲.۱±۰.۱ ^a

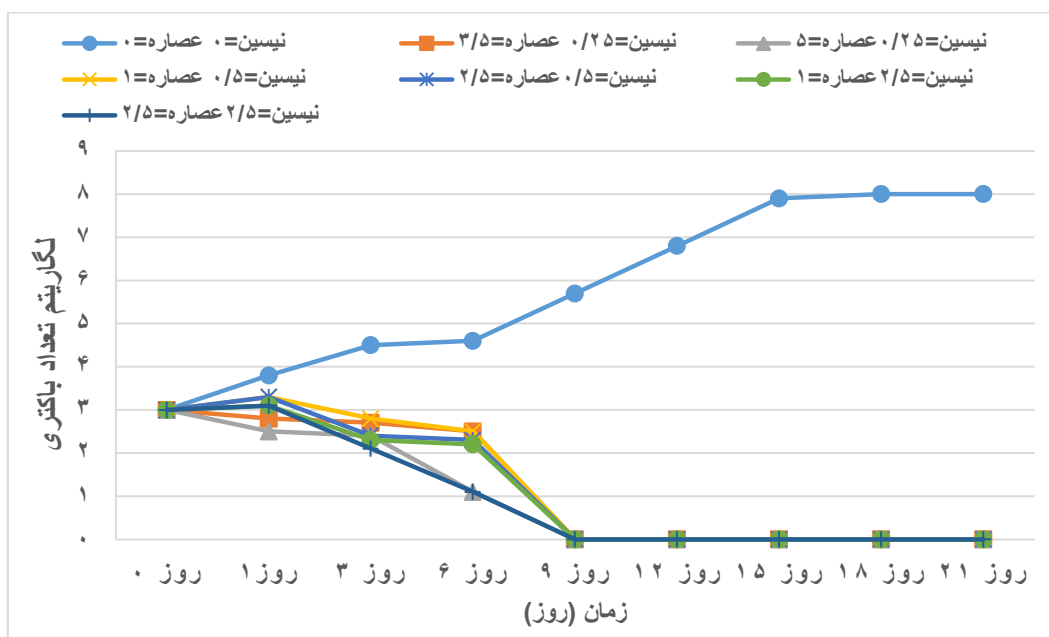
در هر ستون حروف انگلیسی نامتشابه اختلاف آماری معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت چرخ شده میگو

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که میانگین تعداد

تیمارهای حاوی عصاره و نیسین به صفر رسید. همچنین آزمون آماری Repeated Measures نشان داد که میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در تیمارهای ترکیبی در طول مدت آزمایش تغییرات معنی‌داری دارد ($P < 0.05$). میانگین لگاریتم تعداد باکتری در طول مدت آزمایش در تیمارهای ترکیبی عصاره و نیسین در نمودار ۳ نشان داده شده است.

وانامی در روز صفر $CFU/g \times 10^3$ بود. در روز اول تعداد باکتری در تیمارهای دارای نیسین و چای ترش نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$). آزمون آماری آنوا نشان داد که از روز یک تا روز ۲۱، میانگین لگاریتم تعداد باکتری در بین تیمارهای ذکر شده در جدول ۳، تفاوت آماری معنی‌داری دارد. در تمام روزها $P < 0.05$ بود. از روز نهم به بعد تعداد باکتری در تمامی



نمودار ۳- لگاریتم تعداد باکتری در تیمارهای ترکیبی نیسین و عصاره

در مطالعه انجام گرفته توسط Fullerton و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر تأثیر عصاره متانولی چای ترش علیه باکتری اشیریشیاکلی (*Esherichia coli* O157:H7) جدا شده از مواد غذایی دامپزشکی و نمونه‌های بالینی، مشاهده گردید که جمع میانگین هاله مهار برای عصاره متانولی چای ترش ۱۲/۶۶ میلی‌متر برای غلظت ۱۰ درصد، ۱۷/۷۵ میلی‌متر برای غلظت ۵ درصد، ۸/۹ میلی‌متر برای غلظت ۲/۵ درصد بود. بالاترین هاله عدم رشد ۱۱/۱۶ میلی‌متر در نمونه دامپزشکی و کمترین ۱۰/۷۵ میلی‌متر در مواد غذایی مشاهده شد (۱۴). در مطالعه انجام گرفته توسط جوادیان و همکاران در

بحث

استفاده از چند نگهدارنده با مقادیر کم بر مصرف یک نگهدارنده به تنهایی با مقدار زیاد ارجحیت دارد که این موضوع از نظر ماندگاری، حفظ خواص ظاهری، ارزش تغذیه‌ای و هم از نظر اقتصادی بهتر است (۱۳، ۱۹). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره الکلی چای ترش در غلظت ۳/۵ و ۵ و نیسین در غلظت های ۰/۵ و ۲/۵ اثر مهارکنندگی و باکتری‌کشی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ شده میگو وانامی دارند و تیمارهای ترکیبی عصاره به همراه نیسین از روز ۶ به بعد رشد باکتری را مهار کردند.

سال ۲۰۱۵، اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ چای ترش بر روی سویه‌های کلبسیلا پنومونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان داد که عصاره گیاهی چای ترش در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر مهارکنندگی در برابر کلبسیلا پنومونه داشته است (۱۵). در بررسی اثر ضد میکروبی عصاره چای ترش بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی در مدل غذایی گوشت مرغ آماده طبخ که توسط چوبکار، شاملو و همکاران در سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۶ انجام گرفت، مشاهده کردند که عصاره چای ترش اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر روی باکتری‌های مورد بررسی دارد (۱۷، ۲۶). در بررسی اثر ضد میکروبی و ضد اکسیداسیونی نیسین بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در فیله کپور نقره‌ای، شور سبک و سنگین (۴ و ۸ درصد نمک) آخوندزاده بستی، علیزاده دوغیکلایی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشاهده کردند که اثر نیسین باغلظت‌های مختلف در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در جلوگیری از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$) (۲۴، ۱۷). Delves, Solomakos و همکاران در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۰۵ اثر نیسین را بر روی سوسیس تهیه شده از گوشت گوسفندی نگهداری شده در دمای ۷ °C بررسی کردند که نتیجه این تحقیق نشان داد در تیمارهای حاوی نیسین روند رشد میکروبی تا روز پنجم کاهش و از روز پنجم به بعد روند رشد به آرامی افزایشی بوده است. (۱۸، ۲۵). عبدالله زاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ به تأثیر نیسین بر روی لیستریا مونوسیتوزنز در گوشت گاو چرخ شده پرداختند که در نتیجه این تحقیق تیمارهای حاوی نیسین تا روز دوم روند کاهش بار میکروبی از خود نشان دادند و از روز دوم تا پایان دوره ماندگاری (۱۶ روز) روند افزایشی بار میکروبی مشاهده شد ولی این روند افزایشی هم کمتر از نمونه شاهد گزارش گردید (۱۹). در مطالعه انجام گرفته توسط Delves در سال ۲۰۰۵ نتایج نشان داد که عصاره آبی چای ترش مهارکننده باکتری‌های استافیلوکوکوس

اورئوس، اشیریشیاکلی، کلبسیلا و سودوموناس در غلظت‌های ۱۰-۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (۲۵، ۱۹). در بررسی دیگری توسط طباطبایی یزدی و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات ضد میکروبی اسانس آویشن و ترکیب کارواکرول و تیمول بر روی باکتری‌های شیگلا فلکسنری و شیگلا سونی تأیید شد (۲۰). عباس زاده و همکاران در سال ۲۰۱۹ آثار مهارکنندگی ۲۸ نوع اسانس گیاهی انتخاب شده را بر روی چهار باکتری پاتوژن شامل اشیریشیاکلی، سالمونلا تیفی‌موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوزنز بررسی کردند، عصاره‌ها به محیط BHI تلقیح شدند و دیده شد که غلظت ۰/۴ درصد تمام گیاهان دارای اثرات ضد میکروبی علیه هر چهار میکروارگانیزم بودند (۲۱). در مطالعه انجام گرفته توسط فرشباغ در سال ۲۰۱۸ بر روی عصاره تعدادی از گیاهان دارویی از جمله فلفل سیاه مشخص شد که عصاره این گیاه اثر بازدارندگی بر روی سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس دارد (۲۲).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق خواص ضد میکروبی عصاره الکی چای ترش و نیسین به‌صورت تنها و توأم در رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت چرخ‌شده میگو و انامی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد غلظت‌های پایین عصاره (درصد): ۱ و ۲/۵ نمی‌تواند باکتری را به‌طور کامل مهار کند ولی با افزایش غلظت عصاره ۳/۵ و ۵ درصد و افزودن نیسین ۰/۵ و ۲/۵ میکروگرم به‌تنهایی و ترکیب نیسین و عصاره به‌صورت: (۲۵+۰/۲۵)، (۳/۵+۰/۲۵)، (۵+۰/۲۵)، (۱+۰/۵)، (۲/۵+۰/۵)، (۱+۲/۵)، (۲/۵+۲/۵) دارای اثرات ممانعت‌کنندگی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس بوده است. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که از عصاره چای ترش و نیسین می‌توان به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در کنترل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود.

سپاسگزاری

در تحقیق حاضر از حمایت مالی معاونت پژوهش و

References

- 1- Mohibi M, Akbarzadeh Totunchi MR, Shahidi F, Pourshahabi MR. Investigating the possibility of using machine vision and artificial neural network in predicting the moisture content of dried shrimp. *In the fourth conference on machine vision and image processing in Iran*. 2007, February. [In Persian]
- 2- Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SM. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*. 2010; 120(1): 193-8.
- 3- de Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, Penna TC. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009; 20(3-4): 146-54.
- 4- Aziz EE, Gad N, Badran NM. Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of Hibiscus sabdariffa L. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2007; 1(2): 73-8.
- 5- Eshraghi S, Salehipour Z, Pourmand MR, Rahimi Forushani A, Zahrai Salehi MT, Agha Amiri S, et al. Studying the frequency distribution of tst gene with entC, entA and entA/C genes in Staphylococcus aureus isolates isolated from different foods. *Journal of Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences*. 2009; 67(7): 6-470. [In Persian]
- 6- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 2004; 85(2): 231-7.
- 7- Zhou GH, Xu XL, Liu Y. Preservation technologies for fresh meat—A review. *Meat Science*. 2010; 86(1): 119-28.
- 8- Kashiri H, Haghparast S, Shabanpour B. Effects of sodium salt solutions (sodium acetate, lactate and citrate) on physicochemical and sensory characteristics of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fillets under refrigerated storage. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2011; 13(1): 89-98. [In Persian]
- 9- Alizadeh-Behbahani B, Tabatabaei-Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antifungal effect of edible film (CMC) containing aqueous and ethanolic mangrove plant extract on Citrus pathogens *in vitro*. *Scientific Journal of Agricultural*. 2013; 2(1): 47-52. [In Persian]
- 10- Akhundzadeh Basti A, Misaghi A, Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on Salmonella typhimurium and *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*. 2007; 40(6): 973-81. [In Persian]
- 11- Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MR. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry*. 2010; 120(3): 765-70. [In Persian]
- 12- Zarin Qalam Moghadam M, Sattari M, Zarin Qalam Moghadam J, Rezazadeh Sh. Effect of alcoholic extract of black pepper, red pepper and Shirazi thyme on inhibition of Staphylococcus aureus DNase enzyme. *Quarterly scientific journal of medicinal plants*. 2007; 6(24): 17-21. [In Persian]
- 13- Leistner L, Gorris LG. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*. 1995; 6(2): 41-6.
- 14- Fullerton AH, Burnett KM, Steel EA, Flitcroft RL, Pess GR, Feist BE, et al. Hydrological connectivity for riverine fish: measurement challenges and research opportunities. *Freshwater Biology*. 2010; 55(11): 2215-37.
- 15- Javadian F, Sepehri Z, Amrayy M, Kiani Z, Shahraki Mujahid M, Shahi Z, et al. Investigating the antimicrobial effect of the ethanolic extract of sour tea leaves (*Hibiscus sabdariffa*) against *Klebsiella pneumoniae* resistant to different antibiotics. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2015; 22(4): 565-70. [In Persian]
- 16- Tabatabai Yazdi F, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Moradi S, Tabatabai Yazdi F, Jafarian S. A comparative study of the effect of different types of sour tea extracts and selected antibiotics on clinical and standard strains of the infection agent in the culture environment. *Infectious and tropical diseases of Iran*. 2015; 20(69): 31-40 [In Persian]
- 17- Chobkar N, Akhundzadeh Basti A, Soltani M, Sari A, Malekshahi A, Nemati Gh, et al. Study of growth of *Staphylococcus aureus* bacteria in silver carp fish fillets processed with salt and nisin. *Journal of Veterinary Research*. 2010; 65(3): 193-198 [In Persian]
- 18- Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Bot-

soglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*. 2008; 25(1): 120-7.

19- **Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H, Safari R.** The effect of nisin and Shirazi thyme essential oil alone and in combination with each other on the population of *Listeria monocytogenes* inoculated in minced meat of phytophagous fish. *Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran*. 2012; 6(4): 13-20 [In Persian]

20- **Tabatabai Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Vasiei A, Mortazavi SA, Moradi S.** Antibacterial effect of sour tea extracts on some antibiotic-resistant pathogenic bacteria in vitro. *Journal of Food Science & Technology*. 2016; 13(55) [In Persian]

21- **Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Bagheri M.** Investigating the antibacterial effect of thymol, carvacrol, eugenol and menthol on four spoilage bacteria in agricultural and dairy products. *Journal of Food Science & Technology*. 2019; 16(91): 283-290. [In Persian]

22- **Farshbaf Derhamis S, Qiami Rad M, Mahmoudi R, Asadi Nadari MR.** Comparative investigation of antibacterial effects of alcoholic extracts of coriander and *bolag oti* against some food pathogenic bacteria. *Scientific Research Journal of Veterinary Microbiology*. 2018; 13(2): 47-55. [In Persian]

23- **Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H.** Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*. 2014; 35(1): 177-83.

24- **Alizadeh Doghikolai E, Asghari M, Safari R, Arshadi A.** The effect of bacteriocin Z on shelf life of silver carp fillets during refrigerated storage. *Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran*. 2011; 6(3): 31-8. [In Persian]

25- **Delves-broughton J.** Nisin as a food preservative. *Food Australia*. 2005; 57(12): 525-7.

26- **Shamlou M, Yavarmanesh M.** Evaluation of antimicrobial activity of aqueous and ethanol extracts of aloe vera on pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*). *Iran Food Science and Industry-Iran Food Science and Industry Association*. 2016; 13. [In Persian]

27- **Rumiani L, Rokni N.** Investigating the inhibitory effect of cumin essential oil and nisin on the growth rate of *Streptococcus iniae* in salmon fillet using combined technology. *Iranian Journal of Food Science and industry*. 2015; 12(48): 37-46. [In Persian]

28- **Cabo ML, Pastoriza L, Bernárdez M, Herrera JJ.** Effectiveness of CO₂ and Nisaplin on increasing shelf-life of fresh pizza. *Food Microbiology*. 2001; 18(5): 489-98.

The effect of nisin and *Hibiscus sabdariffa* alcoholic extract on the population of *Staphylococcus aureus* ATCC1113 inoculated in minced Vanami shrimp fillet at 4 degrees Celsius

Saede Sarghazi¹, Mohammad Rahnama^{2*}, Majid Alipuor Eskandani², Darioush Saadati², Afsaneh Noori Jangi³, Mahmoud Kohneh Poushi⁴

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

2- Associate Professor Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Zabol University, Zabol, Iran.

3- MSc in fisheries products Processing, Zahak fisheries office, Zahak, Iran.

4- MSc in Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: December 29, 2022; Revise: February 19, 2023; Accept: March 11, 2023

Summary

Staphylococcus aureus is a food pathogen and is a serious threat to humans. This study was conducted in order to evaluate the antibacterial effects of *Hibiscus sabdariffa* in inhibiting *Staphylococcus aureus* bacteria alone and together with nisin in Vanami shrimp minced meat. The plant was extracted using a vacuum evaporation method with the help of a rotary machine. The effect of different concentrations of alcoholic extract of *Hibiscus sabdariffa* (0, 1, 2.5, 3.5, 5%) and nisin (0, 0.5, 2.5 micrograms/gram) and the combination of different amounts of nisin (micrograms per gram) and extract (%) (0.25+3.5), (0.25+5), (0.5+1), (2.5+1), (2.5+2.5) were investigated on the growth behavior of the bacteria at a 4°C during 21 days. The results showed that bacterial growth in low concentrations of *Hibiscus sabdariffa* extract (2.5.1%) had no significant difference in inhibiting bacterial growth. Combined treatments of the extract with nisin could stop the growth of bacteria from the 6th day onwards. According to the findings of this research, it can be suggested that *Hibiscus sabdariffa* extract and nisin have inhibitory effects and are introduced as a natural food preservative instead of its chemical and industrial types. The combined use of these compounds proved their synergistic effects.

Key words: Vanami shrimp, *Staphylococcus aureus*, *Hibiscus sabdariffa*, Nisin, Alcoholic extract

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 5, No. 2, Autumn & Winter 2023

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