

دوره ۶، شماره ۱  
ناشر: دانشگاه زابل

سر دبیر:

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

مدیر مسئول:

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

مدیر اجرایی:

احمد راشکی؛ [ah\\_rashki@usal.es](mailto:ah_rashki@usal.es)



## هیات دبیران:

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

زابل



افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران



محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران



محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی زاهدان



تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران



مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده

دامپزشکی، دانشگاه تهران



محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شیراز



محمد جهانتیغ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه زابل



محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهرکرد



سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز



رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد



محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهید باهنر کرمان



کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

وبسایت: [nfvm.uoz.ac.ir](http://nfvm.uoz.ac.ir)

پست الکترونیک: [nfvm@uoz.ac.ir](mailto:nfvm@uoz.ac.ir)

## پیشگفتار

### به نام خدا

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

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

## راهنمای تهیه مقاله برای نشریه تازه‌ها در میکروشناسی دامپزشکی

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

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

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

### شیوه نگارش مقاله:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **نحوه رفرنس نویسی:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می باشد:

**گزارش موردی (Case Report)** باید شامل بخش‌های زیر باشد:

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

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

\* **بحث**

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

**مقاله مروری (Review)**

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

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

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

#### **مقاله کوتاه (Short Communication)**

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

#### **نامه به سردبیر (Letter to Editor)**

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

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

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

### تعهد نامه

سر دبیر محترم مجله تازه ها در میکروبی شناسی دامپزشکی

با سلام؛

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

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

امضاء و تاریخ

عنوان مقاله: -----

مشخصات کلیه نویسندگان مقاله به ترتیب مندرج در مقاله

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

آدرس پستی و الکترونیک نویسنده مسئول:

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

## فرم تعارض منافع

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

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

.....

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

.....

عنوان مقاله:

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

امضاء و تاریخ

## مقایسه اثرات آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی برخی گیاهان دارویی علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا

ساناز حکمتی نیا<sup>۱</sup>، سیده‌ام‌البین قاسمیان<sup>۲\*</sup>، حمید محمودی پور<sup>۳</sup>

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

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

۳- گروه پرستاری و مامایی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.

دریافت مقاله: ۲۳ آبان ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۸ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۷ فروردین ۱۴۰۲

### چکیده

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یک باکتری فرصت‌طلب است که با استفاده از گیاهان دارویی می‌توان موجب کاهش روند استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی جهت مهار رشد آن در مواد غذایی گردید. با توجه به خاصیت آنتی‌باکتریال سه گیاه بومادران، اسطوخودوس و آویشن، این مطالعه با هدف بررسی اثرات آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی این سه گیاه علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* صورت گرفت. برای انجام این مطالعه ابتدا باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از نمونه‌های ماهی تهیه و با روش‌های بیوشیمیایی و PCR تأیید گردید. سپس عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شد و میزان حساسیت باکتری‌های جدا شده به روش انتشار از دیسک در محیط کشت مولر هینتون بررسی گردید. همچنین حداقل غلظت مهاری گیاهان دارویی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده میزان شیوع باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* ۵ درصد بود. باکتری‌های جدا شده نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت داشتند. کمترین غلظت مهاری و کمترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه بومادران بود که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر آن نسبت به دو گیاه دیگر دارد. بیشترین غلظت کشندگی برای گیاه اسطوخودوس گزارش شد که این اختلاف نسبت به دو گیاه دیگر از نظر آماری معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بود. به‌طور کلی ردیابی میزان شیوع این عوامل بیماری‌زا در آبزیان در کنار بررسی میزان شیوع مقاومت دارویی و بکارگیری درمان‌های جایگزین همچون استفاده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد میکروبی که بتواند بر مقاومت‌های دارویی غلبه نماید و از شیوع بیشتر این عوامل در صنعت پرورش آبزیان جلوگیری نماید ضروری به نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** آویشن شیرازی، *آئروموناس هیدروفیلا*، اسطوخودوس، بومادران، عصاره هیدروالکلی

## مقدمه

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یک باکتری فرصت‌طلب بیماری‌زا در انسان‌ها و آبزیان می‌باشد، که می‌تواند در مواد غذایی با منشأ آب همچون ماهی، صدف، میگو و ... مسمومیت ایجاد نماید. این باکتری یک کوکوباسیل گرم منفی و متحرک هوازی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد که در محیط‌های آبی و دستگاه گوارش ماهیان سالم یافت می‌شود (۱، ۲). بررسی متون علمی نشان داده که *آئروموناس*‌ها به‌عنوان پاتوژن‌های ماهی‌ها بوده و تشخیص پاتوژن اولیه از فرصت‌طلب یا آلاینده اغلب دشوار است. همچنین این باکتری از منابع متعددی همچون گوشت، آب، شیر خام و سبزیجات جدا شده است و به علت توانایی بالای تعدادی از سویه‌های آن در دماهای بسیار پایین، تعداد این ارگانیسم در شرایط سرد افزایش پیدا می‌کند، به شکلی که این باکتری‌ها قادر هستند قسمت مهمی از فلور میکروبی که سبب فاسد شدن گوشت می‌گردد را تشکیل دهند. اما لازم به ذکر است که باکتری مذکور در طی فرایند پخت حتی با حرارت ملایم نیز از بین می‌رود. لذا آلودگی ناشی از این باکتری به‌وسیله محصولات خام و یا آب آلوده به مواد غذایی منتقل می‌گردد. اما اصلی‌ترین منبع این باکتری محیط‌های آبی همچون دریاچه‌های آب شیرین، چشمه‌ها و سیستم فاضلاب است (۲-۵).

مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند بتالاکتاماز، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و تتراسایکلین‌ها در انسان و سایر جانداران موجب شکل‌گیری و پیشرفت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها شده است این فرایند از طریق کسب ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد (۶). در حال حاضر گزارشات متعددی مبنی بر وجود مقاومت چندگانه دارویی در بسیاری از گونه‌های باکتریایی وجود دارد. اخیراً موارد مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف همچون سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفتری‌زوکسیم که غالباً از گروه بتالاکتامازها هستند، در

حال افزایش است (۷). از زمان پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شاهد روند ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بوده‌ایم (۸، ۹). از این جهت شناس درمان بیماری‌ها با داروهای فعلی در حال کاهش است. از قرن‌ها پیش استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مختلف در جوامع بشری رواج داشته‌اند. به دنبال شکل‌گیری مقاومت دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج و وجود مشکلات معمول در ساخت داروهای نوین و همچنین عوارض پایین گیاهان دارویی، استفاده از درمان‌های طبیعی طی سال‌های گذشته روند افزایشی داشته است. در حال حاضر چنین برآورده می‌شود که ۸۰ درصد از جمعیت جهان در راستای بهبود سلامت خود از گیاهان دارویی منطقه جغرافیایی خویش بهره می‌گیرند (۸).

بومادران یک گیاه خودرو بوده و در دشت‌ها، مراتع، اطراف جاده‌ها، دامنه کوه و مناطق مرتفع کوهستانی نواحی مختلفی از دنیا شامل کشورهای اروپا و ایران رشد می‌کند (۱۰، ۱۱). عصاره به دست آمده از این گیاه دارای خواص دارویی از جمله خواص ضد باکتریایی و ضد التهابی و ضد تورم می‌باشد که در تهیه لوازم آرایشی و بهداشتی و دارویی از جمله کرم و پمادهای پوستی کاربرد دارد (۱۲). عصاره‌ای که از بومادران به دست می‌آید برای درمان طیف گسترده‌ای از عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های انسانی و حیوانی کاربرد دارد (۱۳).

اسطوخودوس یا لاوند با نام علمی *لاوندولا آگوستفولیا* غالباً به‌منظور برطرف نمودن اضطراب و بی‌خوابی، افسردگی، زوال عقل، درد پس از جراحی و موارد متعدد دیگری کاربرد دارد. امروزه گل و عصاره این گیاه جهت تهیه دارو به کار می‌رود. یکی از ترکیباتی که به‌طور معمول در گیاهان دارویی از جمله اسطوخودوس یافت می‌شوند فلاونوئیدها هستند. طبق مطالعات صورت گرفته، فلاونوئیدها اثرات دارویی متعددی مانند جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با وزن مولکولی کم، ممانعت از تجمع پلاکت‌ها و پایداری سلول‌های ایمنی

هستند، از این رو در برطرف نمودن مشکلات روحی، عفونت‌های ناشی از ویروس‌ها و باکتری‌ها، التهاب و آلرژی کارایی مناسبی دارند (۱۴-۱۶).

آویشن گیاهی علفی است که شاخه‌های متعدد و چوبی دارد. گیاه آویشن به شکل محدود و برای مصارف دارویی در برخی مناطق ایران کشت می‌گردد. این گیاه به علت تأثیرات ضدگرفتگی و خلط‌آور در اختلالات تنفسی و سرماخوردگی کاربرد دارد (۱۷). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که گیاه آویشن یک ضد قارچ، ضد درد و التهاب، برطرف کننده آفت‌های دهانی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و مؤثر بر مشکلات گوارش و قلبی است. به علاوه مشخص شده است که آویشن دارای خاصیت آنتی‌باکتریال، ضد ویروسی و ضد انگلی نیز می‌باشد (۱۸).

با توجه به خاصیت آنتی‌باکتریال سه گیاه بومادران، اسطوخودوس و آویشن این مطالعه با هدف بررسی و مقایسه اثرات آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی این سه گیاه دارویی علیه باکتری زئونوز آئروموناس هیدروفیلا صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

**تهیه عصاره‌های مورد مطالعه:** جهت به دست آوردن عصاره از گیاهان بومادران، اسطوخودوس و آویشن از روش ماسراسیون استفاده شد (۱۹). به این منظور بعد از تأیید اصالت و کیفیت، گیاهان توسط آسیاب برقی پودر شدند و بعد از اضافه نمودن آب به میزان کافی اتانول ۷۰ درصد به نسبت ۱ به ۴ اضافه گردید، سپس محلول به‌دست آمده به مدت ۳ روز نگهداری گردید. در مرحله بعد با استفاده از دستگاه روتاری از محلول حاصله عصاره‌گیری صورت گرفت و از طریق گرمخانه‌گذاری خشک و تراشیده شدند. در مرحله آخر برای به‌دست آوردن غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره میزان مناسبی از عصاره در محلول نرمال سالین حل گردید.

**تهیه باکتری و ذخیره سازی:** باکتری آئروموناس

هیدروفیلا از نمونه‌های ماهی تهیه و با روش‌های بیوشیمیایی و PCR تأیید گردید، تعداد چهار تا پنج کلنی از باکتری به محیط TSB که به آن مقدار ۲۰ درصد گلیسرول افزوده شده است، انتقال داده شد و به مدت زمان ۲ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، کدر شدن محیط کشت نشانگر رشد باکتری بود. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- نگهداری شدند.

## بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش

**دیسک دیفیوژن:** روش دیسک دیفیوژن آگار که یک روش معمولی و رایج برای ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی است. به این منظور پس از تهیه سوسپانسیون باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش نیم مک فارلند آن را بر روی پلیت مولر هینتون آگار منتقل نموده و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را به ترتیب به‌وسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه مقاومت یا حساسیت را بر اساس اندازه‌گیری منطقه عدم رشد بررسی نمودیم (۲۰).

تعیین کمترین غلظت کشندگی (MIC) عصاره حاصل از سه گیاه بومادران، آویشن شیرازی و اسطوخودوس بر مبنای نتایج به‌دست آمده در روش MIC و بر اساس روش توصیه شده CLSI صورت پذیرفت و پایین‌ترین غلظت از آنتی‌بیوتیک که مانع رشد باکتری می‌شد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

## بررسی اثرات هم‌افزایی گیاهان دارویی و

**آنتی‌بیوتیک:** اثرات آنتی‌باکتریال عصاره حاصل از سه گیاه دارویی بومادران، اسطوخودوس و آویشن شیرازی با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل علیه باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا جداسازی شده در سه تکرار بررسی گردید. جهت ارزیابی اثرات هم‌افزایی عصاره‌های مذکور، از روش صفحه شطرنجی بهره گرفتیم. در این روش اثرات آنتی‌باکتریال ترکیب داروهای مختلف با آنتی‌بیوتیک‌های

انجام شده ضریب اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

### نتایج

در کل از ۶۰ مزرعه بررسی شده در ۳ مورد میزان شیوع باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی قزل‌آلا با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی ردیابی شد و مورد تأیید PCR قرار گرفت. همچنین از کل نمونه‌ها تنها در ۳ نمونه تشخیص قطعی *آئروموناس هیدروفیلا* داده شد.

**میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار از دیسک:** آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین، تتراسایکلین و تریمتوپریم و سولفامتوکسازول به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های معمول در صنعت آبزیان و تأثیرگذار بر باکتری‌های گرم‌منفی مورد سنجش قرار گرفت، که نتایج مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در سه دسته حساس، متوسط و مقاوم در جدول شماره ۱ ارائه شده است. میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که دو مورد از سه باکتری جدا شده حساسیت به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل داشته، در خصوص انروفلوکساسین یک سویه حساس یک سویه با مقاومت نسبی و یک سویه مقاوم بوده و برای آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین دو سویه دارای مقاومت نسبی و یک سویه مقاوم بوده است و در نهایت برای آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول هر سه سویه به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند.

رایج در سه تکرار بررسی می‌شود. غلظت‌های مورد نظر شامل ۳ غلظت کمتر از MIC، مساوی با آن و ۳ غلظت بیشتر از آن در نظر گرفته می‌شوند. در روش صفحه شطرنجی، اثر هم‌افزایی با محاسبه اندیس کمترین غلظت کسری مهاری (FIC) تعیین می‌گردد. نتایج به این روش محاسبه می‌گردند: کمترین غلظت کسری مهاری برای داروی اول مساوی است با کمترین غلظت مهاری داروی اول در ترکیب تقسیم بر کمترین غلظت مهاری داروی دوم به تنهایی. کمترین غلظت کسری مهاری برای داروی دوم مساوی است با کمترین غلظت مهاری داروی دوم در ترکیب تقسیم بر کمترین غلظت مهاری داروی اول به تنهایی. اندیس کمترین غلظت کسری مهاری مساوی است با جمع کمترین غلظت کسری مهاری داروی اول به‌اضافه کمترین غلظت کسری مهاری داروی دوم. در صورتی که این مقدار کمتر از ۰/۵ باشد شاهد اثر هم‌افزایی بوده و در صورتی که این مقدار بیشتر از ۴ باشد شاهد اثرات آنتاگونیسم هستیم (۱۴).

**تجزیه تحلیل داده‌ها:** پس از اتمام گردآوری داده‌ها و کسب اطمینان از صحت ورود داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نسخه ۲۵ نرم‌افزار SPSS انجام شد. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد ارائه شد. همچنین داده‌ها کمی با استفاده از واریانس یک طرفه از نظر معنی‌دار بودن مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون‌های

جدول ۱- وضعیت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد سنجش (تعداد: ۳)

مقاوم	مقاومت نسبی	حساس	نام آنتی‌بیوتیک
۰	۱	۲	فلورفنیکل
۱	۱	۱	انروفلوکساسین
۱	۲	۰	تتراسایکلین
۳	۰	۰	تریمتوپریم + سولفامتوکسازول

می‌شود و متوسط آن برای باکتری‌های جدا شده محاسبه می‌گردد. لازم به ذکر است باکتری‌هایی که در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی در دسته متوسط قرار می‌گیرند،

**اندیس مقاومت چندگانه یا Multiple antibiotic resistance:** اندیس مقاومت چندگانه به نسبت آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به تعداد کل آنتی‌بیوتیک‌ها گفته

مقاومت چندگانه را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در سه باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول مقاوم بوده‌اند.

در اندیس مقاومت چندگانه به‌عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند. مقادیر بالاتر از ۰/۲ نشانه‌ای از وجود مقاومت چندگانه باکتریایی تلقی می‌شود. جدول شماره ۲ اندیس

جدول ۲- اندیس مقاومت چندگانه در آنتی‌بیوتیک‌های مورد سنجش علیه باکتری *اثروموناس هیدروفیلا*

نام آنتی‌بیوتیک	تعداد باکتری‌های مقاوم	تعداد کل باکتری‌ها	اندیس مقاومت چندگانه
انروفلوکساسین	۲	۳	۰/۶۶
فلورفنیکل	۱	۳	۰/۳۳
تتراسایکلین	۳	۳	۱
تریمتوپریم + سولفامتوکسازول	۳	۳	۱

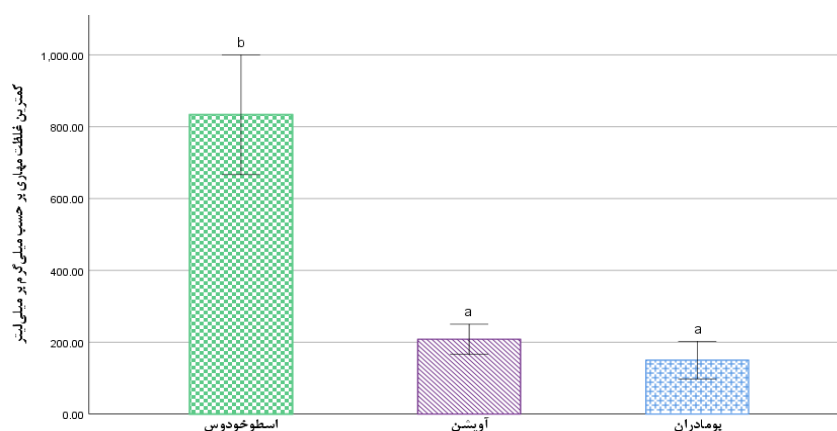
است که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. همچنین بیشترین غلظت مهاری مربوط به گیاه اسطوخودوس است، به طوری که این اختلاف نسبت به گیاهان دیگر معنادار ( $p < 0/05$ ) بوده است. بنابراین گیاه اسطوخودوس کمترین خواص آنتی‌باکتریال را نسبت به گیاهان دیگر دارد.

### کمترین غلظت مهاری یا *Minimum inhibitory concentrations*

نتایج اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان دارویی اسطوخودوس، بومادران و آویشن به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز گردید و نتایج در جدول شماره ۳ و نمودار شماره ۱ ارائه شده است. کمترین غلظت مهاری مربوط به گیاه بومادران بوده

جدول ۳- کمترین غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی علیه باکتری *اثروموناس هیدروفیلا*

نام گیاه	کم‌ترین غلظت مهاری بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	خطای استاندارد	P-value
اسطوخودوس	۸۳۳/۳	۱۶۶/۶	$< 0/05$
آویشن	۲۰۸/۳	۴۱/۶	
بومادران	۱۵۰/۰	۹۰/۱	



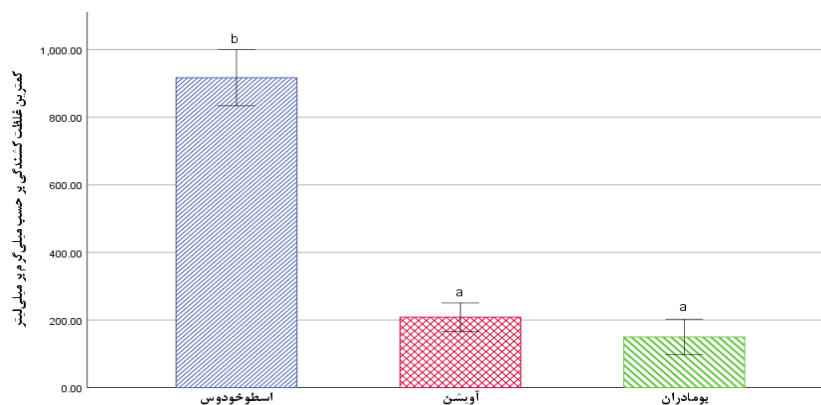
نمودار ۱- کمترین غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس، بومادران و آویشن علیه باکتری *اثروموناس هیدروفیلا* جداسازی شده ( $p < 0/05$ ).

بوده است که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. همچنین بیشترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه اسطوخودوس بود، به طوری که این اختلاف نسبت به دیگر گیاهان دارویی معنادار ( $p < 0.05$ ) بوده است.

**کمترین غلظت کشندگی یا *Minimum bactericidal concentrations***: اثر کشندگی باکتریایی، پس از آنالیز آماری به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه در جدول شماره ۴ و نمودار شماره ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده کمترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه بومادران

جدول ۴- کمترین غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی علیه باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* جدا شده

نام گیاه	کم‌ترین غلظت مهاری برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	خطای استاندارد	P-value
اسطوخودوس	۹۱۶/۷	۸۳/۳	$< 0.05$
آویشن	۲۰۸/۳	۴۱/۶	
بومادران	۱۵۰/۰	۹۰/۱	



نمودار ۲- کمترین غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس، بومادران و آویشن علیه باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* جداسازی شده ( $p < 0.05$ ).

اندیس مقاومت چندگانه آن نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بوده است. بر اساس نتایج به دست آمده در بین ترکیبات مورد سنجش اثر هم‌افزایی مشاهده نشد. جدول شماره ۵ نتایج این بخش را نشان می‌دهد.

**بررسی اثرات هم‌افزایی گیاهان دارویی و آنتی‌بیوتیک:** اثرات آنتی‌باکتریال گیاهان دارویی با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل علیه باکتری‌های *اثرموناس هیدروفیلا* در سه تکرار بررسی گردید. علت انتخاب فلورفنیکل از بین داروهای مورد بررسی پایین بودن

جدول ۵- بررسی خواص هم‌افزایی گیاهان دارویی مختلف در ترکیب با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل

نام	ترکیبات دارویی	کمترین غلظت مهاری برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر		اندیس کمترین غلظت کسری مهاری
		در ترکیب	به تنهایی	
ترکیب اول	فلورفنیکل	۰/۰۰۰۷۵	۰/۰۰۰۷۵	۱/۹۱
	اسطوخودوس	۷۵۵/۲	۸۳۳/۳	
ترکیب دوم	فلورفنیکل	۰/۰۰۰۷۵	۰/۰۰۰۵۰	۱/۶۳
	بومادران	۲۰۸/۳	۲۰۰/۹	
ترکیب سوم	فلورفنیکل	۰/۰۰۰۷۵	۰/۰۰۰۷۵	۱/۸۴
	آویشن	۱۵۰/۰	۱۲۵/۳	

حیوانی است (۲۷). همچنین در داخل کشور فدایی‌فرد *آئروموناس هیدروفیلا* را در ماهیان قرمز آکواریومی و قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی استان چهارمحال و بختیاری شناسایی کردند (۲۸). گیلانی و همکاران با مراجعه به ۷۱ مزرعه پرورش ماهی گرم مختلف استان گیلان ۱۵ مورد *آئروموناس هیدروفیلا* را شناسایی نمودند (۲۹). نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان‌دهنده شیوع ۵ درصدی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در میان ماهیان می‌باشد. به‌طور کلی تراکم بسیار ماهی‌ها، تغییرات ناگهانی درجه حرارت آب، دستکاری ماهی، حمل و نقل، کم شدن اکسیژن، کمبودهای تغذیه‌ای، آلودگی انگلی و قارچی در پوست ماهی‌ها زمینه‌ساز حمله *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد، که در صورت رعایت نکردن اصول مدیریت بهداشتی در آبرزی پروری این باکتری می‌تواند منجر به شیوع تلفات ماهی‌ها و همچنین انتقال آنها به انسان‌ها گردد (۳۰).

احمدی و همکاران نشان دادند که بیش از نیمی از باکتری‌های جدا شده از مدفوع ۹ بیمار (۸/۸ درصد) به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آموکسی‌کلاو، سفوتاکسیم، سفازیدیم، سفیکسیم، کانامایسین، تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. تمامی سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک ایمینیم حساس بوده و پس از آن آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفتری‌اکسون، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین و تریمتوپریم سولفامتوکسازول در رده‌های بعدی قرار داشتند (۳۱). در مطالعه دیگری Roges و همکاران ۳۰ ایزوله باکتریایی *آئروموناس هیدروفیلا* از نمونه‌های انسانی شامل خون، مدفوع، ریه، ترشحات چرکی و ترشحات مفصلی و ۲۸ ایزوله از نمونه‌های خوراک شامل گوشت، مرغ، ماهی و حلزون جدا نمودند. در نمونه‌های انسانی بیشترین تعداد باکتری را از مدفوع بیماران درگیر با مشکلات گوارشی جدا نمودند که میزان آن به ۸۶/۷ درصد می‌رسد. در بین نمونه‌های خوراکی بیشترین میزان آلودگی مربوط به پستانداران مهاجر با میزان آلودگی ۸۱/۱ درصد و پس از

عفونت‌های باکتریایی از جمله عوامل اصلی مرگ و میر در آبزیان می‌باشند. باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از این عوامل است که در گونه‌های متعددی از ماهیان آب شیرین موجب بیماری می‌گردد. عفونت ناشی از این باکتری در همه نقاط جهان شایع است. شیوع جهانی این باکتری در کنار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی که به شکل روزافزونی در حال افزایش است، لزوم طرح‌ریزی سیاست‌های کارآمد درمانی را مشخص می‌نماید (۲۱). با توجه به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی می‌توان از این گیاهان به‌عنوان ترکیباتی جایگزین برای مهار باکتری‌ها در صنایع غذایی استفاده نمود (۲۳). نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان‌دهنده شیوع ۵ درصدی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد. میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که هر سه سویه جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول مقاوم بودند. همچنین نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت چندگانه باکتریایی داشتند. کمترین غلظت مهاری و کمترین اثر کشندگی باکتریایی مربوط به گیاه بومادران بود که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. همچنین بیشترین غلظت مهاری و بیشترین اثر کشندگی باکتریایی مربوط به گیاه اسطوخودوس بود، آنالیز آماری نشان داد که اسطوخودوس به‌طور معنی‌داری کمترین خواص آنتی‌باکتریال را نسبت به دو گیاه دیگر دارد. در نهایت در بین ترکیبات مورد سنجش، اثر هم‌افزایی مشاهده نشد.

Abd-El-Malek و همکاران *آئروموناس هیدروفیلا* را در ۲۲ نمونه از ۳۵ نمونه ماهی خام شناسایی کرده‌اند (۲۴). Hussien و همکارش شیوع *آئروموناس هیدروفیلا* را در نمونه‌های تازه ماهی ۹ درصد (۲۵) و Elshahid و همکاران ۱۶ درصد در ماهی‌های آب شیرین (۲۶) گزارش کردند. به‌طور مشابه، بسیاری از محققین اشاره کردند که *آئروموناس هیدروفیلا* رایج‌ترین ایزوله در غذاهای با منشأ

آن ماهی با ۶۷/۸ درصد بوده است. در میان این باکتری‌ها بیشترین میزان مقاومت دارویی به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین، نالیدیکسیک اسید، سفازیدیم و تتراسایکلین بوده و کمترین میزان مقاومت به ترتیب در داروهای کلورامفنیکل، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و آمیکاسین مشاهده شد (۳۲). در مطالعه‌ای دیگر Türe و همکاران نشان دادند که *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از آبریان نسبت به فلورفنیکل، تریمتوپریم + سولفامتوکسازول، اکسی‌تتراسایکلین و انروفلوکساسین حساس و نسبت به لینکومایسین، پنی‌سیلین جی، آموکسی‌سیلین مقاوم هستند (۳۳). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که هر سه سویه نسبت به آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول مقاوم هستند. همچنین نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت چندگانه باکتریایی داشتند. مطالعات زیادی در خصوص بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از حیوانات انجام شده است (۳۴). اما باید به این نکته توجه داشت که تفاوت نمایی آنتی‌بیوگرام در مناطق مختلف جغرافیایی بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی منطقه‌ای تأثیر دارد که در درمان تجربی و اختصاصی باید به این مسئله توجه ویژه گردد.

علی‌شاهی و همکاران گزارش کردند که عصاره آویشن، پوست انار با میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برابر ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را روی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* دارد، همچنین عصاره سیاه‌دانه، اسکوتلاریا و زیتون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کمتر از ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در برابر این باکتری را داشته‌اند (۳۵). عادل و همکاران نشان دادند که باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیه*، *یرسینیا راکری*، *ویبریو انگویلاروم*، *آئروموناس هیدروفیلا* و *سودوموناس آئروجینوزا* و چهار قارچ بیماری‌زای *سایپروگلنیا*، *فوزاریوم سولانی*، *کاندیدا آلبیکنز* و *آسپرژیلوس فلاوس* نسبت به اسانس بومادران

حساسیت بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کنترل دارند. علاوه بر این، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس مورد مطالعه در محدوده ۱۲۵ تا ۸۰۰ میکروگرم بر لیتر تعیین شد که قادر به مهار رشد باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای مذکور بود (۳۶). Deepika و همکاران گزارش کردند که هر چند فلاونوئید روتین به تنهایی هیچ اثر ضد باکتریایی علیه *آئروموناس هیدروفیلا* ندارد اما اثرات مهاری فلورفنیکل را تا چهار برابر افزایش داده است. همچنین تجویز فلورفنیکل به همراه روتین در بیماران مبتلا به *آئروموناس* باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی و فعالیت‌های ضد پروتئاز و ضد لیزوزیم و استرس اکسیداتیو شده است (۳۷). Bandeira Junior مشخص نمود که کاراکرول و تیمول بیشترین اثرات آنتی‌باکتریال را دارند و ترکیب‌های لینالول + فلورفنیکل یا اکسی‌تتراسایکلین علیه *آئروموناس* و سیترات + اکسی‌تتراسایکلین علیه *سیتروباکتر فرونتی الگوی* هم‌افزایی نشان داده‌اند (۳۸). در مطالعه Kot و همکاران تمامی سویه‌های *آئروموناس سالمونیسیدا* به دنبال مصرف سینامالدهید کاهش یافته است به طوری که اثر مهاری آن با اکسی‌تتراسایکلین قابل مقایسه بوده است. به علاوه ترکیب‌های سینامالدهید به اضافه عصاره آویشن و سینامالدهید به اضافه عصاره میخک در مهار باکتری‌های مورد بررسی اثرات هم‌افزایی نشان داده‌اند. بیشترین خاصیت باکتری‌کشی در ترکیب سینامالدهید و عصاره آویشن مشاهده گردید (۳۹). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که گیاه بومادران اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر نسبت به دو گیاه دیگر با کمترین غلظت مهاری و کمترین اثر کشندگی باکتریایی دارد. در پژوهش‌های متعدد دیگری خواص آنتی‌باکتریال عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های بیماری‌زا مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص گردیده است که عفونت‌هایی که به دلیل مواد غذایی آلوده به عوامل پاتوژن ایجاد می‌شوند، تاثیر به‌سزایی در بهداشت و سلامت عمومی دارند. به منظور کاهش ضررهای اقتصادی و مرگ و میر ناشی از این عوامل، بکارگیری ترکیبات طبیعی به‌عنوان ترکیبات

ضد میکروبی یک رویکرد تأثیرگذار جهت کنترل عوامل بیماری‌زا و بالا بردن طول دوره نگهداری غذاهای فراوری شده است (۳۴، ۳۸، ۳۹). در این بین عصاره‌های به‌دست آمده از برخی گیاهان، یک منبع غنی از ترکیبات ضد میکروبی هستند که واجد اثرات ضد باکتریایی می‌باشند.

ظهور و گسترش چشمگیر مقاومت ضد میکروبی در باکتری‌های پاتوژن، بهداشت و سلامت عمومی را با چالش مواجه نموده است. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های مشابه نشان می‌دهد که انتخاب نادرست و نابجا از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی می‌تواند مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را در باکتری‌های مختلف گسترش دهد. بکارگیری ترکیبات آنتی‌بیوتیک جهت درمان عفونت‌ها در آبزبان به علت مواجهه‌ی مستقیم دارو با محیط زیست و تهدیدی که برای سلامت جوامع دارد توجهات زیادی را به خود جلب نموده است و سبب بروز نگرانی در صنعت پرورش آبزبان گردیده است. امروزه به علل نامشخصی استفاده از داروها و ترکیبات سنتزی بدون تجویز و خارج از سیستم درست تشخیص بدون توجه به بقایای دارویی بجا مانده و اثرات مخرب آنها بر محیط زیست و عوارض منفی که این بقایا بر سلامت انسان‌ها دارند، مانند واکنش‌های ازدیاد حساسیت، آثار سمی، ایجاد عفونت‌های ثانویه و بروز اختلال در متابولیسم با حضور مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و انتقال این مقاومت به عوامل بیماری‌زای انسانی سلامت و بهداشت عموم با تهدیدی جدی مواجه می‌گردد و به دنبال آن ممکن است خسارات غیر قابل جبرانی رخ بدهد. مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش آبزبان نیز منجر به مختل شدن درمان و تحمیل خسارت‌های اقتصادی زیادی بر پرورش دهندگان می‌گردد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به خودی خود آثار سمی برجای نگذارد، اما استفاده طولانی مدت و بیش از حد نیاز این ترکیبات در

آبزبان سبب افزایش جمعیت سویه‌های مقاوم در آبزبان، سخت پوستان و میکروفلور آب می‌گردد. مصرف بی‌رویه ترکیبات ضد میکروبی به‌ویژه آنهایی که در انسان نیز کاربرد درمانی دارند زمینه بروز مقاومت‌های باکتریایی را فراهم می‌نماید و امنیت غذایی و سلامت و بهداشت عموم را با چالش مواجه می‌کند. بنابراین، نظارت بر مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در گونه‌های *آئروموناس* جدا شده از آبزبان به عنوان منبعی از مواد غذایی، جهت محافظت از سلامت عموم مهم است. در نقاط مختلف جهان موارد بی‌شماری از مقاومت باکتریایی به‌وسیله برنامه‌های نظارتی گزارش گردیده است. با این وجود این پژوهش‌ها عمدتاً به عوامل بیماری‌زای انسانی منحصر شده است و موارد بسیار محدودی در زمینه بروز مقاومت در مواد غذایی و محیط‌های فراوری مواد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ آبزبان وجود دارد.

#### نتیجه‌گیری

بررسی اثر آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی سه عصاره اسطوخودوس، بومادران و آویشن بر روی *آئروموناس* هیدروفیلای جدا شده نشان داد که گیاه بومادران اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر نسبت به دو گیاه دیگر دارد و همچنین گیاه اسطوخودوس به‌طور معنی‌داری کمترین خواص آنتی‌باکتریال را نسبت به دو گیاه دیگر داشت. به‌طور کلی ردیابی میزان شیوع این عوامل بیماری‌زا در آبزبان در کنار بررسی میزان شیوع مقاومت دارویی و بکارگیری درمان‌های جایگزین مانند استفاده از گیاهان دارویی با خواص ضد میکروبی که بتواند بر این مقاومت‌های دارویی غلبه نماید و از شیوع بیشتر این عوامل در صنعت پرورش آبزبان جلوگیری نماید ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین پژوهش‌های جامع‌تر پیرو رویکردهای درمانی کارآمد جهت طرح ریزی سیاست‌های درمانی و پیشگیرانه ضروری است.

## References

- 1- **Jamshidian M.** Veterinary Clinic Bacteriology and Mycology Guide. edition F, editor. Ahvaz: Ahvaz Shahid Chamran University Press. 1993. [In Persian]
- 2- **Wray C, Wray C, Wray A.** Salmonella in Domestic Animals: CABI Pub. 2000.
- 3- **Habibi TR, Mohammad Mahdi.** General Zoology of Vertebrates. Edition F, editor. Tehran 2012. 75-8 p. [In Persian]
- 4- **Habibian RI, Khoshdel R.** Medicinal Plants Research University of Shahrekord Medical Science. 2005: 63-99. [In Persian]
- 5- **Satari M.** Aquatic health and diseases. . Edition F, editor. *Rasht Haqshana Publications.* 1998. [In Persian]
- 6- **Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A.** Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in Salmonella enterica isolates from animals in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004; 48(3): 903-8.
- 7- **Asperilla MO, Smego RA, Scott LK.** Quinolone antibiotics in the treatment of Salmonella infections. *Reviews of Infectious Diseases.* 1990; 12(5): 873-89.
- 8- **Kashhedikar M, Chhabra D.** Multiple drug resistance in Aeromonas hydrophila isolates of fish. *Food Microbiol.* 2010; 28: 157-68.
- 9- **Paighan RM.** Fishery Basics. edition F, editor. Hamedan: Sepehr Danesh publishing house; 2004. 429. [In Persian]
- 10- **Zhao WH, Hu ZQ.** Beta-lactamases identified in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Crit Rev Microbiol.* 2010; 36(3): 245-58.
- 11- **Coenye T, Vandamme P.** Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters.* 2003; 228(1): 45-9.
- 12- **Paulsen E.** Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis.* 2002; 47(4): 189-98.
- 13- **Javidnia K, Miri R, Sadeghpour H.** Composition of the volatile oil of Achillea wilhelmsii C. Koch from Iran. 2004. [In Persian]
- 14- **Prusinowska R, Śmigielski KB.** Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (Lavandula angustifolia L). A review. *Herba Polonica.* 2014; 60(2): 56-66.
- 15- **Da Porto C, Decorti D, Kikic I.** Flavour compounds of Lavandula angustifolia L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chem.* 2009; 112(4): 1072-8.
- 16- **Cavanagh HM, Wilkinson JM.** Lavender essential oil: a review. *Am J Infect Control* 2005; 10(1): 35-7.
- 17- **Raut JS, Karuppayil SM.** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products.* 2014; 62: 250-64.
- 18- **Yuan C, Li D, Chen W, Sun F, Wu G, Gong Y, et al.** Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (Cyprinus carpio). *Fish Physiology and Biochemistry.* 2007; 33(2): 93-101.
- 19- **Gori A, Boucherle B, Rey A, Rome M, Fuzzati N, Peuchmaur M.** Development of an innovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products. *Fitoterapia.* 2021; 148: 104798.
- 20- **Ferraro MJ.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: NCCLS. 2000.
- 21- **Ultee A, Bennik M, Moezelaar R.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002; 68(4): 1561-8.
- 22- **Raa J.** The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science.* 1996; 4(3): 229-88.
- 23- **Association APH.** Standard methods for the examination of water and wastewater: *American Public Health Association.* 1926.
- 24- **Abd-El-Malek AM.** Incidence and virulence characteristics of Aeromonas spp. in fish. *Veterinary World.* 2017; 10(1): 34.
- 25- **Hussien A, Adil M.** Aerobic bacterial contamination and shelf life of bagrus bayad fish stored in crushed ice in Khartoum state-Sudan. *Journal of Applied and Industrial Sciences.* 2014; 2(4): 158-65.
- 26- **Elshahid Y, Ibrahim H, Samaha I.** Some enteropathogenic bacteria isolated from freshwater fish at Alexandria Province. Proceedings of the 2nd Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Cairo International Convention Center, 24-26 October 2009: *Massive Conferences and Trade Fairs.*
- 27- **Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI.** Emerging Aeromonas species

infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*. 2012.

28- **Fadaeifard F.** Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* in the aquarium gold fish and cultured rainbow trout in Chaharmahal va Bakhtiary province. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*. 2014; 8(1): 401-9. [In Persian]

29- **Tolouei Gilani J, Goudarزتalejerdi A, Yavari M, Nouri Kalourazi M.** Isolation and Identification of *Aeromonas hydrophila* from Cyprinidae Suspected with Hemorrhagic Septicemia in Pools of Warm Water Fishes in Gilan Province. *International Journal of Nutrition Sciences*. 2021; 6(1): 52-8. [In Persian]

30- **Fazeli-Nasab B, Saeidi S, Fazeli F, Bidarnamani F, Beigomi Z.** Investigation of antimicrobial and antioxidant activity of 4 medicinal plants on 10 standard strains. *New Findings in Veterinary Microbiology*. 2023;5(2):19-30. [In Persian]

31- **Alcaide E, Blasco MD, Esteve C.** Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*. 2010; 161(1): 40-5.

32- **Roges EM, Gonçalves VD, Cardoso MD, Festivo ML, Siciliano S, Berto LH, et al.** Virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates from animal, food, and human sources in Brazil. *BioMed Research International*. 2020.

33- **Türe M, Alp H.** Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *Journal of Veterinary Research*. 2016; 60(2): 141-

6.

34- **Moori Bakhtiari N, Peyghan R, Monzavi F.** Determination of isolated *Aeromonas hydrophila* antibiotic resistance profile from farmed common carp (*Cyprinus carpio*) in khuzestan province. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 2017; 25(5): 41-50. [In Persian]

35- **Alishahi M, Masoud Q, Hossein N.** Antibacterial effects of plant extracts against *Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Iranian Veterinary Journal*. 2010; 2: 21-30. [In Persian]

36- **Adel M, Amiri A.** Chemical compounds and antimicrobial activity of yarrow essential oil against common pathogenic bacteria and fungi in fish. *Journal of Medicinal Plants*. 2015; 6: 65-71. [In Persian]

37- **Deepika MS, Thangam R, Vijayakumar TS, Sasirekha R, Vimala RTV, Sivasubramanian S, et al.** Antibacterial synergy between rutin and florfenicol enhances therapeutic spectrum against drug resistant *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog*. 2019; 135: 103612.

38- **Bandeira Junior G, Sutili F, Gressler L, Ely V, Silveira B, Tasca C, et al.** Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2018; 125(3): 655-65.

39- **Kot B, Kwiatek K, Janiuk J, Witeska M, Pękala-Safińska A.** Antibacterial activity of commercial phytochemicals against *aeromonas* species isolated from fish. *Pathogens*. 2019; 8(3): 142.

## Comparison of antibacterial and synergistic effects of some medicinal plants against the zoonotic bacterium (*Aeromonas hydrophila*)

Sanaz Hekmatinia<sup>1</sup>, Seyedeh Ommolbanin Ghasemian<sup>2\*</sup>, Hamid Mahmoodipour<sup>3</sup>

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

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

3 - Department of Nursing and Midwifery, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.

Receive: November 14, 2022; Revise: January 18, 2023; Accept: April 16, 2023

### Summary

*Aeromonas hydrophila* bacteria is an opportunistic bacterium that can reduce the use of chemical and synthetic drugs by using medicinal plants to inhibit its growth in food. Considering the antibacterial properties of three plants, Yarrow, Lavender and Thyme, this study was conducted with the aim of investigating the antibacterial and synergistic effects of these three plants against *Aeromonas hydrophila* bacteria. In this study, *Aeromonas hydrophila* bacteria was first prepared from fish samples and confirmed by biochemical and PCR methods. Then extraction was done by maceration method and the sensitivity of isolated bacteria was checked by disk diffusion method in Mueller Hinton culture medium. Also, the minimum inhibitory concentration of medicinal plants was investigated. According to the results, the prevalence of *Aeromonas hydrophila* bacteria was 5%. The isolated bacteria were resistant to all the investigated antibiotics. The lowest inhibitory concentration and the lowest lethal concentration were related to the yarrow plant, which shows its stronger antibacterial effects than the other two plants. The highest lethality concentration was reported for lavender plant, and this difference was statistically significant compared to other two plants ( $p < 0.05$ ). In general, tracking the prevalence of these pathogens in aquatic animals, along with investigating the prevalence of drug resistance and using alternative treatments such as the use of medicinal plants with antimicrobial properties that can overcome drug resistance and prevent the further spread of these factors in the aquaculture industry It seems necessary.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila* Lavender, *Achillea Millefolium*, Hydroalcoholic extract, *Zataria multiflora* Boiss

## تشخیص باکتری لپتوسپیروز در ادرار جوندگان با حسگر تشدید پلاسمون سطحی با استفاده از ساختارهای جاذب فرامواد

مهدی راشکی<sup>۱</sup>، محمدرضا رخشانی<sup>۲\*</sup>

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

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

دریافت مقاله: ۲۲ آذر ۱۴۰۱، بازنگری: ۱۰ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱۰ دی ۱۴۰۱

### چکیده

لپتوسپیروز بیماری مشترک بین انسان و دام است که می‌تواند در استخر، رودخانه، آب‌های سطحی، خاک‌های مرطوب لجن‌زارها و در هوای گرم زنده بماند. لپتوسپیروز می‌تواند مستقیماً توسط تماس با ادرار اغلب جوندگان (موش صحرائی، روباه، راکون و غیره) از طریق خراش یا آسیب‌های جزئی و یا غیر مستقیم توسط آب و خاک آلوده به انسان منتقل شود. با توجه به اینکه کشت و رشد این باکتری وقت‌گیر است استفاده از حسگرهای تشدید پلاسمون سطحی با استفاده از ساختار فراماده روش مناسبی برای تشخیص سریع این بیماری است. از آنجا که باکتری لپتوسپیرا از طریق ادرار قابل شناسایی است، در این مطالعه از پنج نمونه ادرار حیوان جونده به‌عنوان ماده مورد حسگری در ساختار طراحی شده استفاده شده است. در ساختار پیشنهادی، فلز طلا به دلیل واکنش‌پذیری خیلی کم و عدم اکسید شدن به‌عنوان فلز پلاسمونی انتخاب شده است. منحنی‌های جذب برای بررسی حساسیت این افزاره به‌دست آمده و نتایج از نظر حساسیت، دقت تشخیص و ضریب کیفیت بررسی و تحلیل شده است. نتایج نشان می‌دهد این حسگر با حساسیت  $1315 \text{ nm/RIU}$  و معیار شایستگی  $63 \text{ RIU}^{-1}$  قابلیت تشخیص باکتری لپتوسپیرا را دارد.

**واژگان کلیدی:** شناسایی لپتوسپیروز، باکتری، حسگر زیستی، فراماده، حساسیت حسگر زیستی

## مقدمه

بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان یکی از مشکلات عمده پزشکی در جوامع انسانی هستند. از آنجا که تماس بین انسان‌ها با دام اجتناب‌ناپذیر است به ناچار کنترل این عفونت‌ها تنها با جستجو و تشخیص به‌موقع عفونت‌های علامت‌دار و بدون علامت راه را برای کنترل و جلوگیری از ابتلا انسان‌ها هموار می‌سازد.

لپتوسپیروز یکی از بیماری‌های مسری مشترک بین انسان و حیوان است (۱، ۲) که توسط سرووراهای لپتوسپیرا ایجاد می‌شود و اولین بار توسط ادولف ویل به‌عنوان یک بیماری همراه با زردی و تب توصیف شد (۳، ۴).

همه‌گیری‌های گزارش شده لپتوسپیروز معمولاً در اثر تماس انسان با خاک یا آب آلوده به ادرار میزبان‌های نگهدارنده یا بیمار ایجاد می‌شود. عامل لپتوسپیروز متعلق به جنس لپتوسپیرا است که از طریق پوست نرم و مرطوب به‌خصوص سطوح مخاطی افراد در معرض خطر ابتلا مثل کارکنان کشتارگاه‌ها و جراحان دامپزشک، دامداران و کارگران شالیزار وارد می‌شود. شیوع فراوان لپتوسپیروز در گاو، گوسفند و خوک منجر به زیان‌های اقتصادی فراوانی در سراسر جهان می‌شود. سازمان بهداشت جهانی (WHO) لپتوسپیروز را یک بیماری مهم و قابل توجه معرفی کرده است (۵). این بیماری می‌تواند مستقیماً توسط تماس با ادرار اغلب جوندگان (موش صحرائی، روباه، راکون و غیره) از طریق خراش یا آسیب‌های جزئی و یا غیر مستقیم و توسط آب و خاک آلوده به انسان منتقل شود (۶، ۷). گزارشات مختلف نشان می‌دهد که بیشترین شیوع لپتوسپیروز در بین کشاورزان، دامداران، کارگران معادن، کارگران پرورش ماهی، کارگران کشتارگاه‌ها و کارگران کانال‌های آب و فاضلاب مشاهده شده است (۸، ۹). معمولاً این بیماری با علائمی چون آنفلوآنزای خفیف، تب و لرز و سردرد شدید نمایان می‌شود. در موارد شدید علائمی چون نارسایی کبدی و خونریزی و عفونت ریوی ظاهر می‌گردد که می‌تواند باعث

مرگ شود (۱۰). دوره کمون این بیماری اغلب ۳ تا ۷ روز است و در این دوره بدون آن که علائمی از بیماری ظاهر شود این باکتری در بدن رشد و تکثیر می‌یابد (۱۱). مطالعات نشان داده است که ظرف ۲۴ ساعت تعداد این باکتری در خون ۱۰ برابر می‌شود. این بیماری در آب و هوای گرم بیشتر شایع است، زیرا این باکتری در محیط‌های گرم و مرطوب بیشتر زنده می‌ماند به همین دلیل در فصل‌های سرد سال کمتر دیده می‌شود (۱۲).

در مورد تعداد افراد مبتلا به لپتوسپیروز آمار جهانی وجود ندارد و یا قابل اعتماد نیست زیرا بسیاری از موارد این بیماری در مناطقی اتفاق می‌افتد که تشخیص و گزارش‌دهی به صورت ناقص صورت می‌گیرد. اما سالانه هزاران مورد از این بیماری گزارش می‌شود که نشان می‌دهد کشورهای در حال توسعه بیشتر تحت تأثیر این بیماری قرار دارند. کاستا و همکاران در مقاله‌ای در سال ۲۰۱۵ گزارش داده‌اند که تقریباً ۱/۰۳ میلیون مورد از این بیماری در جهان وجود داشته که از این تعداد حدود ۵۸۹۰۰ مورد مرگ به ثبت رسیده است (۱۳).

تاکنون تشخیص‌های آزمایشگاهی سنتی مختلفی برای باکتری لپتوسپیروز در زیر دسته‌های: میکروسکوپ، سرولوژی (آنتی‌بادی و آنتی‌ژن) و مولکولی گزارش شده است. این روش‌های سنتی، آهسته، غیر قابل تکرار، نیاز به نمونه بزرگ، پیچیده و دارای حساسیت کم هستند (۱۴). در مقابل، حسگر تشدید پلاسمون سطحی (SPR) یک تکنیک تشخیص بدون برچسب است. حسگر SPR توانایی تشخیص حضور تک مولکول زیستی با حساسیت بالا را دارد. علاوه بر این، این تکنیک سریع و قابل تکرار است. این حسگرها کاربردهای مختلفی در صنایع، معادن، ایمنی مواد غذایی، تحقیقات دارویی، سنتز مواد و غیره دارند (۱۵، ۱۶). علاوه بر این، حسگرهای مبتنی بر SPR برای مطالعه برهمکنش بین گونه‌های مختلف زیستی، به‌عنوان مثال، اسید نوکلئیک، آنتی‌بادی‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز استفاده می‌شوند. پراستفاده‌ترین فلزات پلاسمونی برای تولید پلاسمون‌های سطحی، طلا، نقره، مس، آلومینیوم،

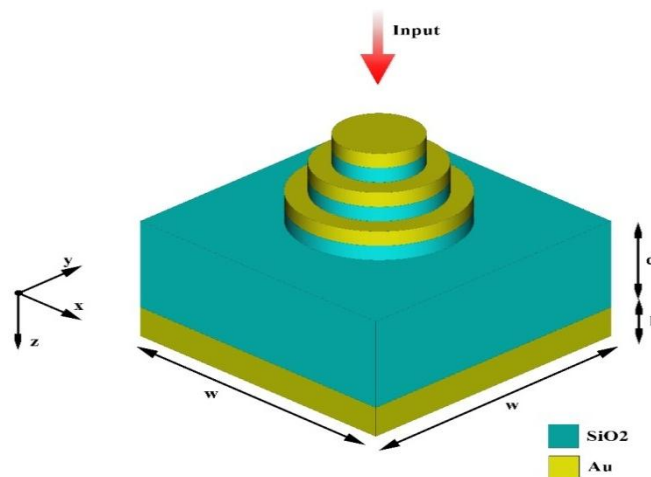
۱ نشان داده شده‌اند. در ساختار این حسگر از دو ماده  $\text{SiO}_2$  (دی‌اکسید سیلیکون) و طلا استفاده شده است. در این ساختار طلا به‌عنوان فلز پلاسمونی استفاده و بکارگیری شده است. دیسک‌های آبی‌رنگ در شکل ۱ هر کدام از ماده  $\text{SiO}_2$  و دیسک‌های طلایی رنگ نیز از ماده طلا ساخته شده‌اند. شبیه‌سازی با استفاده از ماژول FDTD نرم‌افزار لومریکال و به‌صورت سه بعدی انجام شده است. با فرض این که در محیط بالایی این حسگر آب قرار گرفته است، ضریب شکست فضای بالای این حسگر برابر ضریب شکست آب ( $1/33$ ) در نظر گرفته شده است. شرایط مرزی در محیط شبیه‌سازی در راستای  $x$  و  $y$  به‌صورت متناوب و در راستای  $z$  از لایه‌های کاملاً جاذب (PML) انتخاب شده است. شبیه‌سازی در مدت زمان  $30000$  فمتو ثانیه و در دمای  $300$  درجه کلون انجام می‌شود. برای پرتودهی از موج الکترومغناطیسی تخت در راستای  $z$  استفاده شده که از بالای ساختار تابیده می‌شود.

سدیم و ایندیم هستند (۱۷). ایندیم بسیار گران است، سدیم واکنش‌پذیر است و نقره، مس و آلومینیوم بسیار قابل اکسید شدن هستند. در مقابل، طلا به‌عنوان بهترین فلز پلاسمونی انتخاب شده است.

در این مقاله، ضرایب شکست مختلف مربوط به غلظت‌های مختلف باکتری لپتوسپیروز در ادرار آلوده جوندگان بررسی شده است. پارامترهای طراحی و پارامترهای عملکرد در بخش مواد و روش‌ها تعریف شده‌اند. سپس نتایج مورد بحث قرار گرفته و در انتها مقاله با نتیجه‌گیری به پایان می‌رسد.

### مواد و روش‌ها

در این مقاله برای تشخیص باکتری لپتوسپیروز از حسگر زیستی مبتنی بر ساختار جاذب فراماده که دارای ساختار سه بعدی دیسکی شکل می‌باشد، استفاده شده است. در شکل ۱ طرح‌واره سه بعدی سلول واحد این ساختار نشان داده شده که برای انجام شبیه‌سازی استفاده می‌شود. مقادیر پارامترهای فیزیکی این ساختار در جدول



شکل ۱- ساختار حسگر زیستی مبتنی بر جاذب فراماده دیسکی شکل

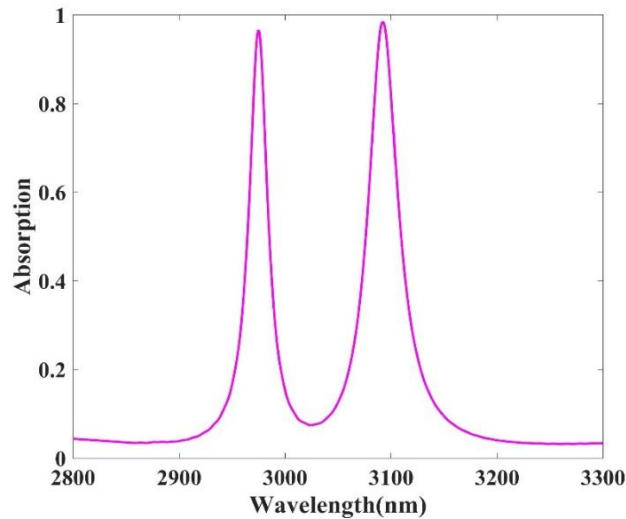
جدول ۱- مقادیر پارامترهای فیزیکی ساختار ارایه شده در شکل (۱)

مقدار	واحد	پارامتر
۲۱۵۰	nm	w
۹۰۰	nm	d
۱۰۰	nm	h

**نتایج**

همان‌طور که در این شکل ملاحظه می‌شود بیشینه جذب در دو طول موج ۲۹۷۵nm و ۳۰۹۲/۵nm رخ می‌دهد که مقدار جذب به ترتیب برابر ۹۷ و ۹۹ درصد است.

شکل ۲ نمودار طیف جذب را برای ساختار حسگر معرفی شده در بازه ۲۸۰۰nm تا ۳۴۰۰nm نشان می‌دهد.



شکل ۲- طیف جذب ساختار حسگر ارائه شده مبتنی بر جاذب فراماده دیسکی شکل

نوع پلی‌اوری است که ضریب شکست آنها مطابق با جدول ۲ به‌دست آمده است (۱۸).

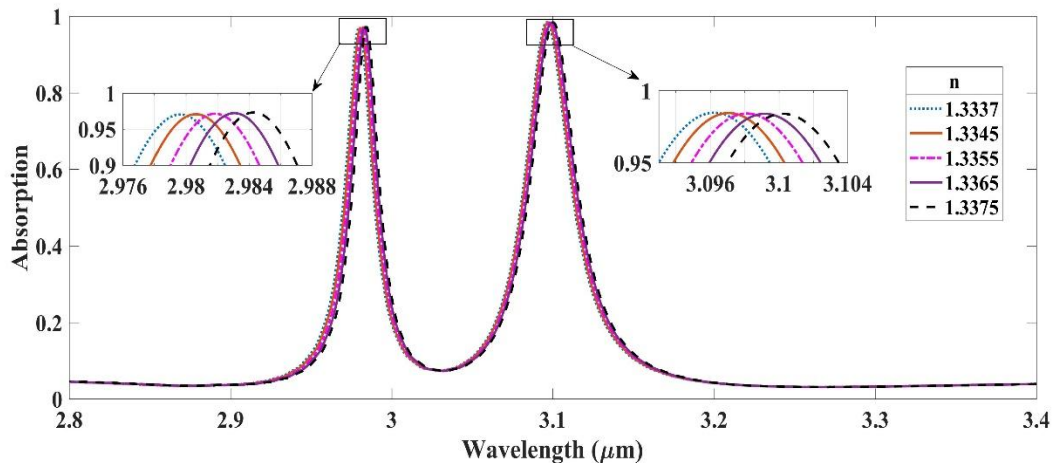
برای نشان دادن حسگری باکتری، در این ساختار از نمونه ادرار پنج موش صحرایی که در ادرار آنها باکتری لپتوسپیروز وجود دارد استفاده شده است. این نمونه‌ها از

**جدول ۲- ضریب شکست ادرار موش‌های صحرایی مختلف از دسته پلی‌اوری**

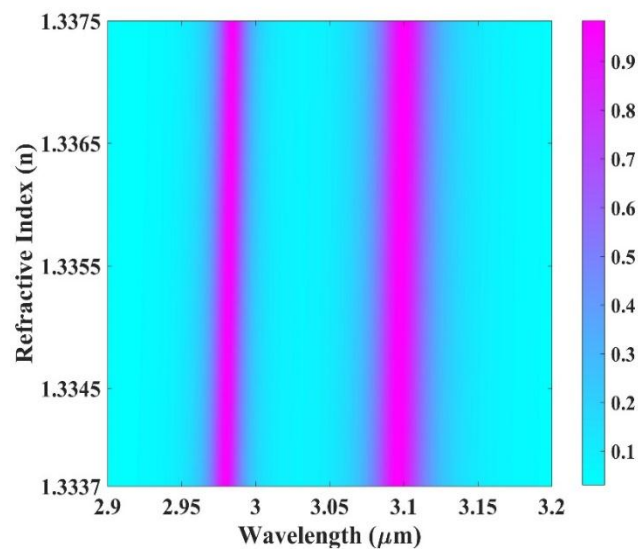
شماره موش صحرایی	مقدار آب (ml)	مقدار ادرار (ml)	ضریب شکست (RI)
۱	۱۶۴	۱۳۶	۱/۳۳۳۷
۲	۸۸	۶۳	۱/۳۳۴۵
۳	۴۸	۳۲	۱/۳۳۵۵
۴	۴۰	۱۹	۱/۳۳۶۵
۵	۴۰	۲۱	۱/۳۳۷۵

تشدید دوم از ۳۰۹۶nm به ۳۱۰۰nm تغییر پیدا کرده است که تغییرات قابل توجهی است. شکل ۴ نمودار جاروب توان و طول موج تشدید را بر حسب ضریب شکست و طول موج نشان می‌دهد.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، با تغییر ضریب شکست از مقدار ۱/۳۳۳۷ (معادل نمونه شماره ۱ با ۱۶۴ml آب و ۱۳۶ml ادرار) به مقدار ۱/۳۳۷۵ (معادل نمونه شماره ۱ با ۴۰ml آب و ۲۱ml ادرار)، طول موج تشدید اول از ۲۹۷۹nm به ۲۹۸۴nm و طول موج



شکل ۳- طیف جذب ساختار حسگر ارائه شده وقتی در معرض پنج نمونه ادرار موش صحرایی قرار می‌گیرد



شکل ۴- نمودار توان باز تاب شده بر حسب ضریب شکست و طول موج

FWHM عرض کامل در نصف مقدار بیشینه طیف خروجی است. در این ساختار SPR با نور با قطبش TM تحریک می‌شود. نتایج برای دو طول موج تشدید در جدول ۳ نشان داده شده است. مطابق با نتایج به دست آمده، طول موج تشدید اول دارای حساسیت و ضریب شایستگی بهتر  $1315 \text{ nm/RIU}$  و  $63 \text{ RIU}^{-1}$  است.

برای بررسی عملکرد ساختار، پارامترهای حساسیت و

ضریب شایستگی از روابط زیر تعریف می‌شوند:

$$S = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n} \quad (1)$$

$$FOM = \frac{S}{FWHM} \quad (2)$$

که در آن  $\Delta\lambda$  جابجایی طول موج تشدید پلاسمون سطحی،  $\Delta n$  تغییرات ضریب شکست در محیط حسگری و

جدول ۳- نتایج شبیه‌سازی مطابق با شکل (۳)

اطلاعات تشدید اول	اطلاعات تشدید دوم	طول موج تشدید بیشینه اول (nm)	طول موج تشدید بیشینه دوم (nm)
S=۱۰۵۲ (nm/RIU)	S=۱۳۱۵ (nm/RIU)	۳۰۹۶	۲۹۷۹
FWHM=۳۳nm	FWHM=۲۱nm	۳۰۹۷	۲۹۸۰
FOM=۳۲RIU <sup>-1</sup>	FOM=۶۳RIU <sup>-1</sup>	۳۰۹۸	۲۹۸۲
		۳۰۹۹	۲۹۸۳
		۳۱۰۰	۲۹۸۴

وجود باکتری لپتوسپیروز را به خوبی تشخیص دهد. نتایج این شبیه‌سازی نشان می‌دهد که حسگر زیستی پیشنهادی می‌تواند برای تشخیص زودهنگام بیماری‌های مرتبط با باکتری لپتوسپیروز با حساسیت و دقت بالا مورد استفاده قرار گیرد.

#### سپاسگزاری

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

#### References

1- Izurieta R, Galwanker S, Clem A. Leptospirosis: themysterious mimic. *J emerg trauma shock*. 2008; 1(1): 21-33.

2- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospirosis: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7: 736-47.

3- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol*. 2001; 14: 296-326.

4- Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and infection*. 2000; 2(10): 1265-76.

5- Terpstra, WJ. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance & Control. *WHO, International Leptospirosis Society*. 2003.

6- Packchianian A. Susceptibility and resistance of certain species of American deer mice, genus *Peromyscus*, and other rodents to *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. *Public Health Reports* (1896-1970). 1940: 1389-402.

7- Babamahmoodi F, Motamed N, Mahdavi M, Nikkhhah F, Ghavi Bonye K. Epidemiology of leptospirosis in rural area of Ghaemshahr, Ma-

#### نتیجه‌گیری

در این مقاله حسگر زیستی SPR مبتنی بر جاذب فراماده به شکل دیسک‌های عمود بر هم پیشنهاد و جهت شناسایی و تشخیص باکتری لپتوسپیروز موجود در ادرار جوندگان شبیه‌سازی نوری و مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نمونه ادرار پنج موش صحرائی با درصد‌های متفاوت آب بررسی شد. در تحلیل نمودارهای طیف جذب ناشی از تغییر ضریب شکست بر حسب طول موج پرتو ورودی مشخص شد که این حسگر با حساسیت ۱۳۱۵nm/RIU و معیار شایستگی ۶۳RIU<sup>-1</sup> می‌تواند

zandaran, during September-October 2004. *J Mazandaran Uni Med Sci*. 2006; 16(53): 51-6. [In Persian]

8- Rafiei A, Hedayati Zadeh-Omran A, Babamahmoodi F, Alizadeh Navaei R, Valadan R. Review of Leptospirosis in Iran *J Mazand Univ Med Sci*. 2012; 22(94): 113-24. [In Persian]

9- Babamahmoodi F, Salmani Mojaveri M, Babamahmoodi A. Seroepidemiology of leptospirosis in workers of high risk occupation in Mazandaran province – Iran 2007-2008. *J Mazand Univ Med Sci*. 2009; 19(73): 11-5. [In Persian]

10- S. Faine, B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat, *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.

11- Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Leptospirosis in: Harrison's principles of internal medicine (18th edition). *McGraw-Hill Medical Pub Division*. 2011.

12- Victoriano AFB, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjarat K, et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect Dis*. 2009; 9: 1-9.

13- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M,

**Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al.** Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015; 9(9): e0003898.

**14- Ahmed SN, Shah S, Ahmad FMH.** Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*. 2005; 51(3): 195.

**15- Rakhshani MR.** Narrowband plasmonic absorber using gold nanoparticle arrays for refractive index sensing. *IEEE Sensors Journal*. 2022; 22(5): 4043-50. [In Persian]

**16- Rakhshani MR, Rashki M.** Metamaterial perfect absorber using elliptical nanoparticles in a

multilayer metasurface structure with polarization independence. *Optics Express*. 2022; 30(7): 10387-99. [In Persian]

**17- Maurya JB, Prajapati YK.** A comparative study of different metal and prism in the surface plasmon resonance biosensor having MoS<sub>2</sub>-graphene. *Optical and Quantum Electronics*. 2016; 48(5): 1-12.

**18- Kitagawa YF, Takahashi T, Hayashi H.** Relationship between the refractive index and specific gravity of the rat urine. *Experimental Animals*. 1981; 30(3): 307-11.

# Detection of Leptospirosis Bacteria in Rodent Urine Using Metamaterial Absorber Based Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor

Mahdi Rashki<sup>1</sup>, Mohammad Reza Rakhshani<sup>\*2</sup>

1- Assistant Professor, Department of Physics, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran.

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

Receive: December 13, 2022; Revise: December 31, 2022; Accept: December 31, 2022

## Summary

---

Leptospirosis is a common disease between humans and animals that can survive in swimming pools, rivers, surface waters, moist soils, swamps, and hot weather. Leptospirosis can be transmitted to humans directly through contact with the urine of most rodents (rats, foxes, raccoons, etc.) by scratches or minor injuries, or indirectly through contaminated water and soil. Considering that the cultivation and growth of this bacterium is time-consuming, the use of surface plasmon resonance sensors using metamaterial structure is a suitable method for rapid diagnosis of this disease. Ordinary, leptospirosis bacteria can be detected by urine. In this article, we apply five rodent urine samples as the sensing material in the designed biosensor. In the proposed structure, gold metal has been chosen as a plasmonic metal due to its resistant against air oxidation. To check the sensitivity of this device and the results, we find absorption curves and analyze them in terms of sensitivity, detection accuracy, and quality factor. The results show that this sensor can detect leptospirosis bacteria with a sensitivity of 1315nm/RIU and a figure of merit (FOM) of 63RIU<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Detection of Leptospirosis, Bacteria, Biosensors, Metamaterial, Biosensor Sensitivity*

## شناسایی مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس در موارد ورم پستان تحت بالینی در مزارع گاو شیری شهرستان نیشابور

علی اکبر طوسی<sup>۱</sup>، محسن نجیمی<sup>۲\*</sup>، محمد جواد بهزادی شهر بابک<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته دکترای عمومی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

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

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

دریافت مقاله: ۱۳ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۱۸ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱۸ دی ۱۴۰۱

### چکیده

ورم پستان تحت بالینی یکی از معضلات شایع مزارع گاو شیری است که منجر به افت تولید و تحمیل خسارت اقتصادی به دامدار می‌شود. شناسایی پاتوژن‌های عامل ورم پستان تحت بالینی در هر منطقه برای پیشگیری و کنترل این معضل ضرورت دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان شیوع مولکولی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری شهرستان نیشابور بود. تعداد ۵۰۰ رأس گاو شیری از ۱۳ مزرعه واقع در نقاط مختلف شهرستان نیشابور وارد مطالعه شدند. نمونه شیر از تمام کارتیه‌ها گرفته شد و از نظر ابتلا به ورم پستان تحت بالینی با استفاده از آزمون ورم پستان کالیفرنایی بررسی شدند. از کارتیه‌هایی که در آزمون ورم پستان کالیفرنایی مثبت بودند مجدداً نمونه شیر اخذ شد و از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شدند. از مجموع ۵۰۰ رأس گاو شیری مورد مطالعه (۲۰۰۰ کارتیه)، ۹۴ (۱۸/۸ درصد) رأس مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بودند که آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در ۸ رأس شناسایی گردید. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی و همچنین شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در بین موارد ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری شهرستان نیشابور پایین است.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، آزمون ورم پستان کالیفرنایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

## مقدمه

بیماری اورام پستان خسارت اقتصادی قابل توجهی را از راه افت تولید، کاهش کیفیت شیر و تهدید سلامت گاو به صنعت گاو شیری تحمیل می‌کند (۱). ورم پستان از نظر بروز علائم بالینی به دو نوع بالینی و تحت بالینی دسته‌بندی می‌شود. در ورم پستان بالینی تغییرات در شیر (رنگ و قوام شیر، وجود لخته)، تورم کارتیه و علائم عمومی ظاهر می‌شود (۲) در حالی که ورم پستان تحت بالینی هیچ‌یک از این علائم را ندارد اما تولید شیر را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد و در تمام گله‌های شیری ۲۰-۵۰ درصد گاوها را درگیر می‌کند (۳). استفیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین عوامل ورم پستان در گاو شیری است و به سختی به درمان پاسخ می‌دهد و گاهی کارتیه درگیر تا پایان عمر عفونی باقی می‌ماند (۴). ورم پستانی که توسط این میکروارگانیسم ایجاد می‌شود به شدت واگیر است و به‌طور ویژه در زمان شیردوشی به کارتیه‌های سالم انتقال می‌یابد (۵). استفیلوکوکوس اورئوس دارای فاکتورهای حدت شامل مولکول‌های چسبنده سطحی، همولیزین، آنزیم‌های کواگولاز و پروتئاز و سموم است که در بیماری‌زایی این پاتوژن نقش بسزایی دارند (۶). علاوه بر این استفیلوکوکوس اورئوس می‌تواند از عوامل ایمنی ذاتی و اکتسابی میزبان خود را در امان نگه دارد (۷). بررسی شیوع ورم پستان تحت بالینی در مزارع گاو شیری و همچنین شناسایی پاتوژن‌های عامل ورم پستان در هر منطقه برای تعیین استراتژی‌های پیشگیری و مدیریت بهداشتی گله‌های شیری ضرورت دارد. اخیراً تمایل زیادی به استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تشخیص و شناسایی پاتوژن‌ها در شیر ورم پستانی وجود دارد (۸، ۹). هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری در شهرستان نیشابور و همچنین تعیین سهم باکتری استفیلوکوکوس اورئوس در ایجاد ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری این منطقه به روش PCR است.

## مواد و روش‌ها

**بررسی شیوع ورم پستان تحت بالینی:** تعداد ۱۳ مزرعه در سطح شهرستان نیشابور به طور تصادفی انتخاب شد و بسته به جمعیت آن از تعدادی از گاوهای هر گله نمونه‌برداری شد. برای ارزیابی از نظر ورم پستان تحت بالینی توسط آزمایش ورم پستان کالیفرنایی (CMT) در مجموع از ۵۰۰ رأس گاو شیری (۲۰۰۰ کارتیه) نمونه شیر گرفته شد. نمونه‌گیری در وعده شیردوشی ظهر و پس از آماده‌سازی کارتیه‌ها شامل شستشو، خشک کردن و رگ‌زنی و قبل از اتصال دستگاه شیردوشی انجام می‌شد. پس از دور ریختن دو دوشش اول، دوشش سوم هر کارتیه درون گوده‌های ظرف مخصوص CMT ریخته می‌شد. سپس به اندازه حجم نمونه معرف CMT (KERBL California Mastitis Testing Liquid، شرکت کرل، آلمان) به شیر افزوده و هم زده می‌شد. پس از ۳۰ ثانیه نتیجه آزمایش بر اساس تغییرات مخلوط قرائت می‌شد. طبق مطالعه Kandeel و همکاران (۱۰) بر حسب تشکیل یا عدم تشکیل توده‌ی ژله‌ای و شکل و قوام آن نتیجه آزمایش منفی (-)، ناچیز (Trace)، یک مثبت (+)، دو مثبت (++) و سه مثبت (+++) ارزیابی می‌شد. عدم هرگونه غلیظ شدگی و تشکیل ژل در مخلوط نشانه منفی، غلیظ شدگی بسیار مختصر نشانه ناچیز و تشکیل توده کمی غلیظ، توده غلیظ، و توده‌ای که ژلاتینی است و با تکان دادن ظرف حرکت داده نمی‌شود به ترتیب نشانه +، ++ و +++ بود. هر سه حالت +، ++ و +++ نشانه ابتلای کارتیه به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد. در سطح گاو، گاوی که در آزمایش CMT حداقل یک کارتیه آن واکنش مثبت داشت مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد.

**بررسی شیوع استفیلوکوکوس اورئوس در موارد ورم پستان تحت بالینی:** از کارتیه‌هایی که در آزمایش CMT مثبت ارزیابی شدند پس از ضد عفونی نوک سرپستانک به وسیله پنبه الکل، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر

برای انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی سنتز شده توسط شرکت پیشگام که در جدول ۱ توالی آن آمده استفاده شد. مخلوط PCR از ۲ میکرولیتر محلول DNA استخراج شده به علاوه ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۸ میکرولیتر master mix و ۴ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. محتویات mastermix به صورت استاندارد شامل بافر، dNTPS، Taqpolymerase و  $MgCl_2$  می باشد که در نهایت پرایمرها و DNA الگو و آب مقطر استریل برای رساندن به حجم نهایی اضافه شد. مخلوط نهایی طبق مراحل ذکر شده در جدول ۲ درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. پس از انجام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۱ میکرولیتر رنگ safe stain به مدت ۸۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد.

درون لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری استریل جمع آوری شد. نمونه های اخذ شده تا زمان انجام آزمایش درون فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد (۱۱) به این صورت که حجم ۱ میلی لیتر از نمونه با رعایت شرایط استریل به میکروتیوب منتقل و با دور ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شد، پس از دور ریختن مایع رویی ۱ میلی لیتر بافر TRIS EDTA به آن اضافه و ورتکس شد و مجدداً مورد سانترفیوژ قرار گرفت. مایع رویی دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه و ورتکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در ادامه محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانترفیوژ شد و مایع رویی که حاوی DNA مورد نظر بود با رعایت شرایط استریل به میکروتیوب جدید منتقل شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های شیر

Target	Oligonucleotide(F*)	Sequence (5'-3') (R*)	product size (bp)
S. aureus	STAA-AUI	TCTTCAGAAGATGCGGAATA	۴۲۰
	STAA-AUII	TAAGTCAAACGTTAACATACG	

F: forward

R: reverse

جدول ۲- مراحل انجام PCR

۹۴°C	۲۴۰sec	واسرشنگی اولیه
۹۴°C	۳۰sec	واسرشنگی
۵۴°C	۳۰sec	اتصال پرایمر به DNA
۷۲°C	۳۰sec	طویل شدن رشته الگو
۷۲°C	۳۰۰sec	طویل شدن نهایی

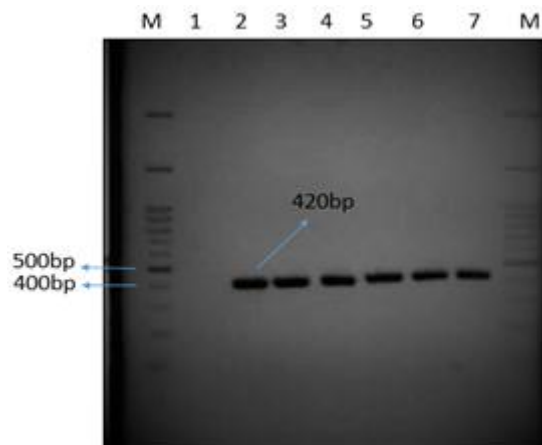
استافیلوکوکوس اورئوس به روش PCR شناسایی شد. در جدول ۳ میزان ابتلا به ورم پستان تحت بالینی و همچنین میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در هریک از گله های مورد مطالعه نشان داده شده است.

## نتایج

بر اساس نتایج آزمایش CMT از ۵۰۰ رأس گاو بررسی شده (۲۰۰۰ کارتیبه) تعداد ۹۴ رأس (۱۲۴ کارتیبه) مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بودند. در ۸ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی باکتری

جدول ۳- میزان ابتلا به ورم پستان تحت بالینی و میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در هریک از گله‌های مورد مطالعه

شماره گله	تعداد گاوهای مولد گله	تعداد گاوهای بررسی شده	تعداد گاوهای CMT مثبت	تعداد گاوهای با عفونت پستانی <i>S. aureus</i>
۱	۴۰۰	۴۰	۱۲	-
۲	۲۰۰	۳۵	۶	۱
۳	۱۵۰	۳۰	۴	-
۴	۲۵۰	۴۰	۵	-
۵	۳۰۰	۴۰	۱۲	-
۶	۱۵۰	۳۵	۸	۲
۷	۱۲۰	۳۰	۶	-
۸	۲۰۰	۴۰	۹	۱
۹	۴۵۰	۴۰	۱۴	۲
۱۰	۳۵۰	۴۰	۱۲	۱
۱۱	۲۰۰	۳۵	۸	-
۱۲	۳۰۰	۴۰	۱۲	۱
۱۳	۱۱۰۰	۵۵	۱۶	-
مجموع	۴۱۷۰	۵۰۰	۹۴	۸



شکل ۱- ستون M مارکر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز می‌باشد. ستون شماره ۱ کنترل منفی و ستون شماره ۲ کنترل مثبت، وزن باند ۴۲۰ bp

### بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج آزمایش CMT در مطالعه حاضر میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری شهرستان نیشابور ۱۸/۸ درصد و در سطح کارتیه‌ها ۶/۲ درصد بود. این میزان وقوع در مقایسه با نتایج برخی مطالعات مشابه در ایران نسبتاً پایین است. سجادی و همکاران (۱۲) در ارزیابی میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در گاوداری‌های اطراف مشهد میزان کارتیه‌های CMT مثبت

را ۷۴/۵۲ درصد گزارش کردند. همچنین هاشمی و همکاران (۱۳) میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی را در گاوداری‌های استان فارس در سطح گاو ۴۲/۵ درصد و در سطح کارتیه‌های مورد بررسی ۲۱/۶ درصد گزارش کردند. اما مطالعاتی نیز میزان وقوع پایین ورم پستان تحت بالینی را در مزارع ایران گزارش کرده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر نزدیک هستند. نقشینه و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۱۴) طی یک ارزیابی سه ساله از ۸۶۹ گاو شیری

بوده است. در مزارع شیری استان فارس از ۶۹۴ کارتیه CMT مثبت بیشترین ارگانیزمی که در کشت جدا شد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی (۱۹/۶ درصد) بودند (۱۳). همچنین به دنبال کشت ۵۶۱ نمونه شیر متعلق به کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری از ۵۱ درصد نمونه‌ها استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی جدا شد (۲۲). قربان پور و همکاران (۲۳) در ۲۵ درصد از نمونه‌های مربوط به کارتیه‌های CMT مثبت استافیلوکوکوس اورئوس را به روش مولکولی شناسایی کردند. مطالعات متعددی در سایر کشورها میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس را در ورم پستان تحت بالینی بررسی کرده‌اند که عمدتاً شیوع بالاتری نسبت به مطالعه حاضر گزارش نموده‌اند از جمله ۴۴/۵ درصد موارد در اتیوپی (۲۴)، ۴۱/۸ درصد در مصر (۲۵)، ۲۰/۶ درصد در رواندا (۱۷)، اما در مواردی از قبیل مطالعه Zaatout و همکاران (۲۶) (۵/۳ درصد در الجزایر) و Ikiz و همکاران (۲۷) (۳/۳ درصد در ترکیه) میزان شیوع پایین‌تر نیز یافت شده است.

از آنجا که استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن واگیر است شیوع آن بستگی به رعایت بهداشت شیردوشی دارد. شیوع پایین این پاتوژن در موارد ورم پستان تحت بالینی مزارع نیشابور می‌تواند به دلیل رعایت بهداشت شیردوشی باشد. Sommerhäuser و همکاران شیوع استافیلوکوکوس اورئوس را در مزارع شیری آلمان قبل و بعد از بکارگیری نکات بهداشتی و کنترلی بررسی کرده‌اند و تأثیر قابل توجه رعایت نکات بهداشتی در شیردوشی در کنترل و محدود نمودن شیوع استافیلوکوکوس اورئوس را گزارش نموده‌اند (۲۸).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری شهرستان نیشابور ۱۸/۸ درصد است که ۶/۴ درصد این موارد بر اساس بررسی مولکولی نمونه‌های CMT مثبت ناشی از پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس است. میزان وقوع پایین ورم پستان تحت بالینی و نیز شیوع پایین استافیلوکوکوس

مربوط به یک مزرعه صنعتی در آذربایجان شرقی میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی را در سطح گاو ۲۰/۸۳ درصد و در سطح کارتیه ۲۳/۷۱ درصد گزارش نمودند. همچنین پسرکلو و همکاران در سال ۱۴۰۱ (۱۵) میزان ۲۶/۶ درصد وقوع ورم پستان تحت بالینی را در گاوهای شیری استان گرگان گزارش دادند. برخی از مطالعاتی که به بررسی میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در سایر کشورها پرداخته‌اند میزان ۱۹ درصد در فنلاند (۱۶)، ۵۰/۴ درصد در رواندا (۱۷)، ۸۶/۲ درصد در اوگاندا (۱۸)، ۲۸/۳۴ درصد در اتیوپی (۱۹)، ۷۴/۸۳ درصد در پاراگوئه (۲۰)، ۲۹ درصد در بنگلادش (۲۱) را گزارش نموده‌اند. ورم پستان بیماری پیچیده‌ای است که تحت تأثیر پارامترهای مختلف محیطی، مدیریتی، عوامل مربوط به حیوان و همین‌طور عوامل مربوط به ارگانیزم است. از آنجا که اثرات این عوامل بر تعداد سلول‌های سوماتیک شیر (SCC) در بین گله‌ها، مراحل شیردهی و نژادهای گاو متفاوت است، انتظار می‌رود شیوع ورم پستان در مکان‌های مختلف متفاوت باشد (۱۴). میزان پایین وقوع ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری مورد مطالعه می‌تواند به دلیل رعایت بهداشت شیردوشی و مدیریت مناسب بستر و جایگاه در سطح مزارع شیری شهرستان نیشابور باشد. با توجه به رونق صنعت گاو شیری در این شهرستان و اینکه گله‌های مورد مطالعه نسبتاً گله‌های بزرگی (بیش از ۱۲۰ رأس مولد) بوده‌اند، آموزش و تجربه‌ی خوب پرسنل و مدیران مزارع می‌تواند در وضعیت نسبتاً مناسب پستان در مطالعه حاضر نقش داشته باشد.

بر اساس نتایج آزمایش PCR، ۶/۴ درصد کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مزارع مورد مطالعه از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مثبت ارزیابی شدند. با توجه به اهمیت این پاتوژن تاکنون مطالعات زیادی به بررسی نقش آن در ایجاد ورم پستان تحت بالینی به روش‌های باکتری‌شناسی و مولکولی پرداخته‌اند. میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه حاضر در مقایسه با بسیاری از مطالعات مشابه پایین‌تر

محیطی پیشگیری نمود.

**سیاسگزاری:** این پژوهش در قالب پایان نامه نویسنده اول انجام شده است. از پرسنل محترم شبکه دامپزشکی شهرستان نیشابور که زمینه ارتباط با مزارع گاو شیری را برای انجام این تحقیق فراهم کردند سپاسگزاری می شود.

## References

- 1- Hoque M, Das Z, Rahman A, Haider M, Islam M. Molecular characterization of Staphylococcus aureus strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018; 6(1): 53-60.
- 2- Khasanah H, Setyawan HB, Yulianto R, Widianingrum DC. Subclinical mastitis: Prevalence and risk factors in dairy cows in East Java, Indonesia. *Vet. World.* 2021; 14(8): 2102.
- 3- Forsbäck L, Lindmark-Månsson H, Andrén A, Åkerstedt M, Svennersten-Sjaunja K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. *Animal.* 2009; 3(5): 710-7.
- 4- Hosseinzadeh S, Saei HD. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2014; 2(1): 27-34. [In Persian]
- 5- Ster C, Allard M, Boulanger S, Boulet ML, Mulhbach J, Lafontaine D, et al. Experimental treatment of Staphylococcus aureus bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci.* 2013; 96(2): 1000-8.
- 6- Kot B, Szweda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K. Virulence gene profiles in Staphylococcus aureus isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *J. Dairy Res.* 2016; 83(2): 228-35.
- 7- Tuscherr L, Löffler B, Buzzola FR, Sordelli DO. Staphylococcus aureus adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiol.* 2010; 5(12): 1823-32.
- 8- Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen M, Pyörälä S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.* 2009; 92(6): 2610-7.
- 9- Elsayed MS, Dawoud MA. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of Staphylococcus aureus isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. *Vet. World.* 2015; 8(9): 1051.
- 10- Kandeel S, Morin D, Calloway C, Constable P. Association of California mastitis test scores with intramammary infection status in lactating dairy cows admitted to a veterinary teaching hospital. *J. Vet. Intern. Med.* 2018; 32(1): 497-505.
- 11- Ahmed OB, Dablood A. Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in gram negative bacteria. *Int. J. Bioassays.* 2017; 6(4): 5347-9.
- 12- Sajadi SS-R, Khoramian B, Azizzadeh M, Farzaneh N. Evaluating the Accuracy of the Diagnosis of Subclinical Mastitis Using Lactate Dehydrogenase-Based Dipsticks. *J. Vet. Res.* 2021; 76(2): 260-7. [In Persian]
- 13- Hashemi M, Kafi M, Safdarian M. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *Iran. J. Vet. Res.* 2011; 12(3): 236-241. [In Persian]
- 14- Naghshineh S, Rafat S, Shoja J, Moghaddam G, Ebrahimi M. Prevalence and Risk Factors of Subclinical Mastitis in Iranian Holstein Cows. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 2015; 5(3): 569-574. [In Persian]
- 15- Pesarakloo M, Ahani Azari A, Danesh A. Prevalence and Antibiotics Resistance Patterns of Common Bacterial Causes of Bovine Subclinical mastitis in Selected Dairy Farms of Gorgan, North-east of Iran. *Vet. Res. & Biol Prod.* 2022; 35(1): 101-6. [In Persian]

**16- Hiitiö H, Vakkamäki J, Simojoki H, Autio T, Junnila J, Pelkonen S, et al.** Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Vet. Scand.* 2017; 59(1): 1-14.

**17- Mpatswenumugabo J, Bebora L, Gitao G, Mobegi V, Iraguha B, Kamana O, et al.** Prevalence of subclinical mastitis and distribution of pathogens in dairy farms of Rubavu and Nyabihu districts, Rwanda. *J. Vet. Med.* 2017; 2017; 1-8.

**18- Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima BM, Båge R.** Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* 2014; 46(1): 99-105.

**19- Tezera M, Aman Ali E.** Prevalence and associated risk factors of Bovine mastitis in dairy cows in and around Assosa town, Benishangul-Gumuz Regional State, Western Ethiopia. *Vet. Med. Sci.* 2021; 7(4): 1280-6.

**20- Rodríguez Jara LM.** Prevalence of Subclinical Mastitis in Dairy Farm in Paraguay. *Rev. Med. Vet.* 2020; (40): 61-8.

**21- Islam M, Islam M, Rahman M, Islam M.** Prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. *BJAS.* 2011; 9(1): 73-8.

**22- Mahzounieh M, Zadfar G, Maqami S, Shams N.** Bacteriological and epidemiological aspects of mastitis in arak area dairy herds (IRAN). *Acta Vet. Scand.* 2003; 44(1): 1-15. [In Persian]

**23- Ghorbanpour M, Seyfiabad Sm, Motamedi H, Jamshidian M, Gouraninezhad S.** Comparison of PCR and bacterial culture methods

for diagnosis of dairy cattle's subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J.Vet.Res.* 2007; 62(4): 87-91. [In Persian]

**24- Abera M, Demie B, Aragaw K, Regassa F, Regassa A.** Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. *J. Vet. Med. Anim. Health.* 2010; 2(3): 29-34.

**25- Elhaig MM, Selim A.** Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt. *Trop. Anim. Health Prod.* 2015; 47(2): 271-6.

**26- Zaatout N, Ayachi A, Kecha M, Kadlec K.** Identification of staphylococci causing mastitis in dairy cattle from Algeria and characterization of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 2019; 127(5): 1305-14.

**27- Ikiz S, BAŞARAN B, BİNGÖL EB, Cetin Ö, KAŞIKÇI G, ÖZGÜR NY, et al.** Presence and antibiotic susceptibility patterns of contagious mastitis agents (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) isolated from milks of dairy cows with subclinical mastitis. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2013; 37(5): 569-74.

**28- Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K.** The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol.* 2003; 96(1): 91-102.

## Molecular identification of *Staphylococcus aureus* in cases of subclinical mastitis in dairy cattle farms of Neyshabur city

Ali Akbar Toosi<sup>1</sup>, Mohsen Najimi<sup>\*2</sup>, Mohammad Javad Behzadi-Shahrbabak<sup>3</sup>

1- Graduated in doctor veterinary medicine, Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Iran.

2- Associate professor, Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Assistant professor, Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: January 3, 2023; Revise: January 8, 2023; Accept: January 8, 2023

### Summary

Subclinical mastitis is one of the common problems of dairy farms, which leads to a decrease in production and economic damage to the farmers. Identification of the pathogens causing subclinical mastitis in each region is necessary to prevent and control this problem. The aim of this study was to investigate the molecular prevalence of *Staphylococcus aureus* bacteria in subclinical mastitis cows in dairy farms of Neyshabur city. A total of 500 milking cows from 13 dairy farms located in different parts of Neyshabur city were included in the study. Milk samples were taken from all quarters and checked for subclinical mastitis using the California mastitis test. Milk samples were taken from the quarters that were positive in the California mastitis test, and evaluated for contamination with *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. Out of 500 dairy cows studied (2000 quarters), 94 (18.8%) had subclinical mastitis, and *Staphylococcus aureus* infection was detected in 8 cows (8 quarter). Based on the results of this study, the occurrence rate of subclinical mastitis as well as the prevalence of *Staphylococcus aureus* among subclinical mastitis cows in dairy farms of Neyshabur city is low.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, California mastitis test, Polymerase chain reaction

## انگشت‌نگاری ژنتیکی جدایه‌های باکتری *اشریشیاکلی* جمع‌آوری شده از حیوانات باغ وحش کرمان با روش ERIC-PCR

لاله سعادت<sup>۱</sup>، مازیار جاجرمی<sup>۲</sup>، ندا اسکندرزاده<sup>۳\*</sup>، رضا قنبرپور<sup>۴</sup>

- ۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
- ۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
- ۳- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
- ۴- استاد، گروه میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

دریافت مقاله: ۲۳ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۰۹ اسفند ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۰۹ اردیبهشت ۱۴۰۲

### چکیده

انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* در یک زیستگاه می‌تواند کمک شایانی به درک ما از تنوع ژنتیکی و چرخش آنها در میزبان‌های مختلف کند. در این مطالعه، تعداد ۴۸ نمونه مدفوع از ۲۴ نوع گونه حیوان سالم در باغ وحش کرمان توسط سوآپ استریل جمع‌آوری شد. پس از جداسازی *اشریشیاکلی*، سویه‌ها با روش ERIC-PCR، انگشت‌نگاری ژنتیکی شده و الگوی باندهای به‌دست آمده از الکتروفورز با نرم‌افزار Gel Quest کالیبره و تجزیه و تحلیل شد. در گام بعد شباهت انواع ERIC با ترسیم درخت فیلوژنتیک توسط نرم‌افزار Cluster Viz با استفاده از الگوریتم UPGMA نشان داده شد. در این روش با قطع تشابه  $\leq 90\%$  درصد، ۲۲ کلون مورد شناسایی قرار گرفت؛ الگوی ERIC جدایه‌های کبوتر با یک جدایه از طاووس، همچنین جدایه‌های شترمرغ با یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی داشت. جدایه‌های مرغ شاخدار، کاسکو و یک جدایه از شاه‌بوف با شباهت ۱۰۰ درصدی از نظر الگوی ERIC در کنار هم قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های شتر و یک جدایه از شاه‌بوف شباهت ۱۰۰ درصدی را در الگوی ERIC از خود نشان دادند. با توجه به اینکه چندین سویه جدا شده از میزبان‌های مختلف با گونه‌های متفاوت دارای شباهت ۱۰۰ درصد در الگوی ERIC بودند، می‌توان نتیجه گرفت به علت نزدیکی بودن این گونه‌های مختلف حیوانی در یک زیستگاه مانند باغ وحش، باعث شده است که این سویه‌ها در بین حیوانات مختلف در گردش باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی*، ERIC-PCR، باغ وحش

## مقدمه

باکتری /شریشیالکی یکی از گونه‌های باکتری با تنوع ژنتیکی بسیار بالاست که منجر به سازگاری سویه‌های /شریشیالکی با زیستگاه‌ها و شرایط متفاوت شده است (۱)، (۲). باکتری /شریشیالکی در قسمت‌های انتهایی دستگاه گوارش انسان و حیوانات سالم به صورت همزیست و غیر بیماری‌زا یافت می‌شود، ولی برخی از سویه‌های آن می‌توانند به صورت پاتوژنی فرصت‌طلب موجب مسمومیت‌های غذایی و اسهال شوند (۳-۵). این باکتری علاوه بر این‌که عضوی از میکروفلور دستگاه گوارش حیوانات اهلی به‌ویژه نشخوارکنندگانی مانند گاو و گوسفند است، ساکن دستگاه گوارش حیوانات وحشی نیز می‌باشد. همچنین سویه‌های پاتوژن /شریشیالکی در طیف گسترده‌ای از پستانداران، پرندگان، ماهی‌ها و چندین حشره شناسایی شده است (۶-۸).

در باغ وحش جمعیت کوچکی متشکل از میزبان‌های مختلف در کنار یکدیگر زندگی می‌کنند و همه روزه در تماس مستقیم با انسان‌ها در رده‌های سنی مختلف به‌ویژه کودکان هستند که امکان انتقال پاتوتیپ‌های بیماری‌زا را فراهم می‌کنند. در گزارش بندر و شولمن، شیوع بیماری مشترک انسان و دام در انسان با سویه O157، با تماس با حیوانات باغ وحش‌ها، مزارع و پارک‌های جانورشناسی مرتبط است (۹). جدا از انتقال به انسان، باغ وحش‌ها ممکن است انتقال باکتری‌های مقاوم یا ژن‌های مقاومت را به سایر حیوانات در محیط زیست تسهیل کنند زیرا حیوانات اغلب در طول برنامه‌های اصلاح نژاد مبادله می‌شوند و یا حیوانات باغ وحش و فرزندان آنها در طبیعت رها می‌شوند (۱۰). بررسی تنوع ژنتیکی در میان سویه‌های باکتری /شریشیالکی در یک محیط مخصوصاً مکان‌هایی که حیوانات و انسان در تماس با یکدیگر هستند مانند دامداری‌ها، پارک‌های جنگلی و باغ وحش‌ها می‌تواند اطلاعات اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی با ارزشی را در مورد رفتار میکروارگانیسم در میزبان‌های مختلف ارائه دهد (۱۱، ۱۲).

بررسی تنوع ژنتیکی در /شریشیالکی به کمک روش‌های مولکولی انگشت‌نگاری ژنوم امکان‌پذیر است. بنابراین هدف از انگشت‌نگاری ژنوم یا تایپینگ، تشخیص تفاوت اثر انگشت DNA داخل گونه‌ای و ارتباط کلونال در بین سویه‌های باکتریایی است. به‌منظور انگشت‌نگاری ژنتیکی روش‌های متعددی مانند AFLP PCR، RAPD، PFGE و غیره وجود دارد که از بین آنها ERIC-PCR به دلیل پروتکل ساده و قدرت افتراق، بیشترین کاربرد را دارد (۱۳-۱۵). روش ERIC-PCR بر اساس حضور توالی‌های تکراری غیر کدکننده ۱۷ الی ۳۱۷ جفت بازی که توالی محافظت شده میان ژنی بین باکتریایی ERIC نام دارند، بنا شده است. تنوع قابل توجهی از نظر تعداد کپی و طول در توالی‌های ERIC در میان سویه‌های مختلف /شریشیالکی وجود دارد. این تنوع فرایندهای تکامل را در میان سویه‌های باکتریایی در یک گونه خاص مانند /شریشیالکی تداعی می‌کند، بنابراین امکان طراحی پرایمر برای PCR به‌عنوان بیومارکر تنوع ژنتیکی سویه‌ها و یا بررسی ارتباط تکاملی باکتری را فراهم آورده است. انتظار می‌رود که تفاوت در تعداد و محل توالی‌های ERIC بین سویه‌های باکتریایی منجر به مشاهده‌ی تفاوت بین سویه‌ها از نظر تعداد و اندازه محصولات PCR شود که در نهایت منجر به تفاوت در الگوهای باند در الکتروفورز می‌شود. الگوهای ظاهر شده که به آنها اریک تایپ می‌گویند، برای ارزیابی نزدیکی فیلوژنتیک با کمک انواع نرم‌افزارهای مختلف بکار می‌رود (۱۶، ۱۷، ۱۴). استفاده از اطلاعات تایپینگ مولکولی مانند ERIC تایپ نیازی به تعیین توالی ندارد و در مقایسه با روش‌های سنتی میکروبیولوژیک مانند آزمایشات بیوشیمیایی، تایپ باکتریوفاژ و سروتیپ، پیشرفته‌تر بوده و قابلیت تکرارپذیری و قدرت تمایز بالا را پوشش می‌دهد (۱۳).

مطالعات در زمینه اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی در زمینه چرخش میکروارگانیسم‌ها در بین حیوانات باغ وحش بسیار نادر است (۱۸-۲۰). بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی شباهت ژنتیکی سویه‌های باکتری

دانشکده دامپزشکی ارسال گردید. لازم به ذکر است که مطالعه به تائید کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان رسید.

**جداسازی و تائید بیوشیمیایی باکتری:** در آزمایشگاه از کشت هر نمونه در محیط مک‌کانکی، یک کلنی تک صورتی رنگ (لاکتوز مثبت) به‌عنوان یک جدایه‌ی مشکوک به اشریشیاکلی انتخاب شده و توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل تست‌های IMViC (citrate, indole, methyl red, Voges-Proskauer) مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

**استخراج DNA** برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد. به‌منظور ایجاد حرارت از دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۰ تا ۱۵ دقیقه استفاده شد. در نهایت مایع رویی میکروتیوب‌ها پس از سانتریفیوژ شدن به‌عنوان منبع DNA برای مراحل بعدی ذخیره شدند (۸، ۲۱).

**انگشت‌نگاری از طریق ERIC-PCR:** برای درک بهتر رابطه کلونال بین سویه‌های اشریشیاکلی، همه ۴۸ سویه اشریشیاکلی برای انگشت‌نگاری از طریق ERIC-PCR انتخاب شدند. این روش با استفاده از یک جفت پرایمر به نام ERIC1 و ERIC2 که در جدول شماره ۱ آورده شده است، انجام شد (۲۲).

اشریشیاکلی در بین میزبان‌های مختلف در حیوانات باغ وحش کرمان از طریق بررسی توزیع توالی محافظت شده میان ژنی بین باکتریایی یا توالی‌های ERIC می‌باشد. از آنجایی‌که تاکنون پژوهش مشابهی در منطقه‌ی مورد مطالعه انجام نشده است، این مطالعه فرضیه حضور شباهت‌های ژنتیکی میان سویه‌های جدا شده از حیوانات یک باغ وحش را مورد مطالعه قرار می‌دهد.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌گیری:** جامعه‌ی مورد مطالعه، سویه‌های اشریشیاکلی جمع‌آوری شده در سال ۱۳۹۸ از نمونه‌های مدفوع حیوانات سالم باغ وحش واقع در حاشیه شرقی شهر کرمان می‌باشد. در زمان نمونه‌گیری، در این باغ وحش ۳۱ گونه حیوان مختلف نگهداری می‌شده است. در این مطالعه تعداد ۴۸ نمونه مدفوع از ۲۴ نوع گونه حیوان سالم باغ وحش (از هر گونه ۲ نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از حیوانات عقاب، الاغ، خروس محلی، خر مینیاتوری، گرگ، خرس، سیخور، شتر، خوکچه هندی، شیر، طوطی سبز، پونی، شاهین، میمون رزوس، بز کوهی، کبوتر، طاووس، شترمرغ، یاکریم، قرقی، شاه بوف، مرغ شاخدار، آهو و کاسکو توسط سوآپ استریل جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها در محیط انتقالی آیمیس (اوکسوید، انگلستان) در مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در روش ERIC-PCR

PCR	Gene	Primers	Sequences (5'→3')	Fragment size (bp)
ERIC	Enterobacterial repetitive sequences	ERIC1	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	Random
		ERIC2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	

با آب مقطر استریل حجم آن به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترموسایکلر (بیوراد، ایالات متحده) گذاشته شدند و از برنامه‌ی دمایی مطابق جدول ۱ برای انجام PCR استفاده شد (جدول شماره ۲).

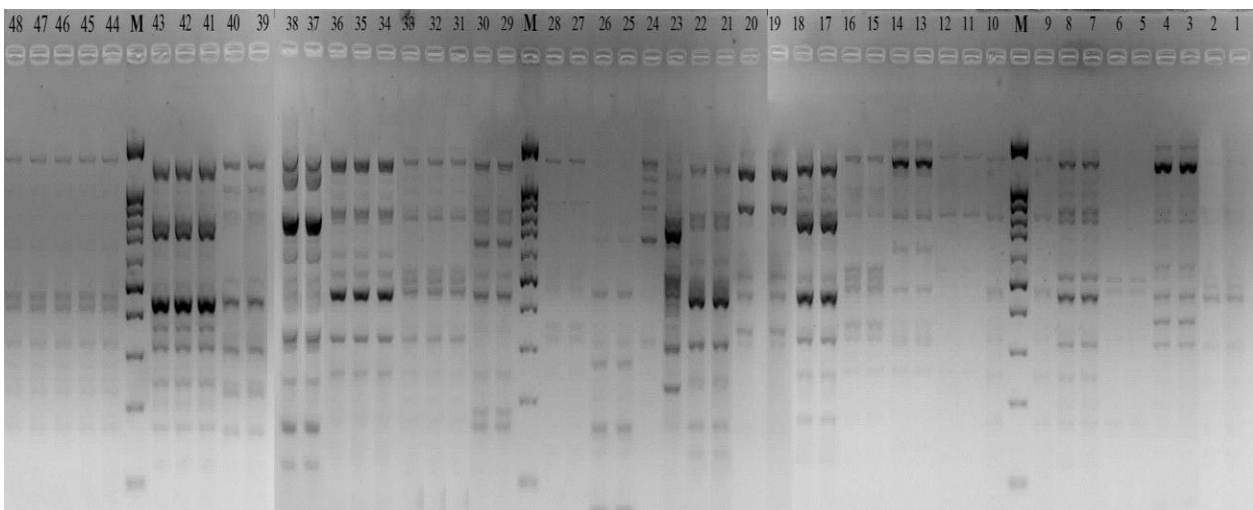
واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای تهیه مخلوط PCR، به ازای هر نمونه، مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس آماده‌ی شرکت پارس توس (ایران)، مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۶ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج و درون میکروتیوب ریخته شد و

جدول ۲: برنامه‌ی دمایی جهت انجام ERIC-PCR

واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال پرایمرها	طولیل شدن	طولیل شدن انتهایی
۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۷ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه	۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۸۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه
۱ بار	۳۰ بار تکرار			۱ بار

حضور یا عدم حضور هر باند به یک کد باینری تبدیل شد (صفر: عدم حضور یک باند و یک: حضور باند). بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، شباهت انواع ERIC با ترسیم درخت فیلوژنتیک توسط نرم‌افزار Cluster Viz با استفاده از گروه جفتی بدون وزن با خوشه‌بندی میانگین ریاضی (UPGMA) نشان داده شد.

به دست آوردن الگوی ERIC و ترسیم درخت فیلوژنی: برای شناسایی سویه‌هایی که از نظر ژن‌ها و توالی‌های مورد نظر مثبت بودند، تمامی محصولات ERIC-PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد، الکتروفورز گردید. تصاویر باندها توسط سیستم تصویربرداری ژل داک ۱۰۰۰ (ویلیر لورمات، فرانسه) ثبت شد و از آن عکس‌برداری شد. الگوی باندهای تصاویر با استفاده از نرم‌افزار Gel Quest کالیبره و تجزیه و تحلیل شد و داده‌های اثر انگشت ERIC، بسته به

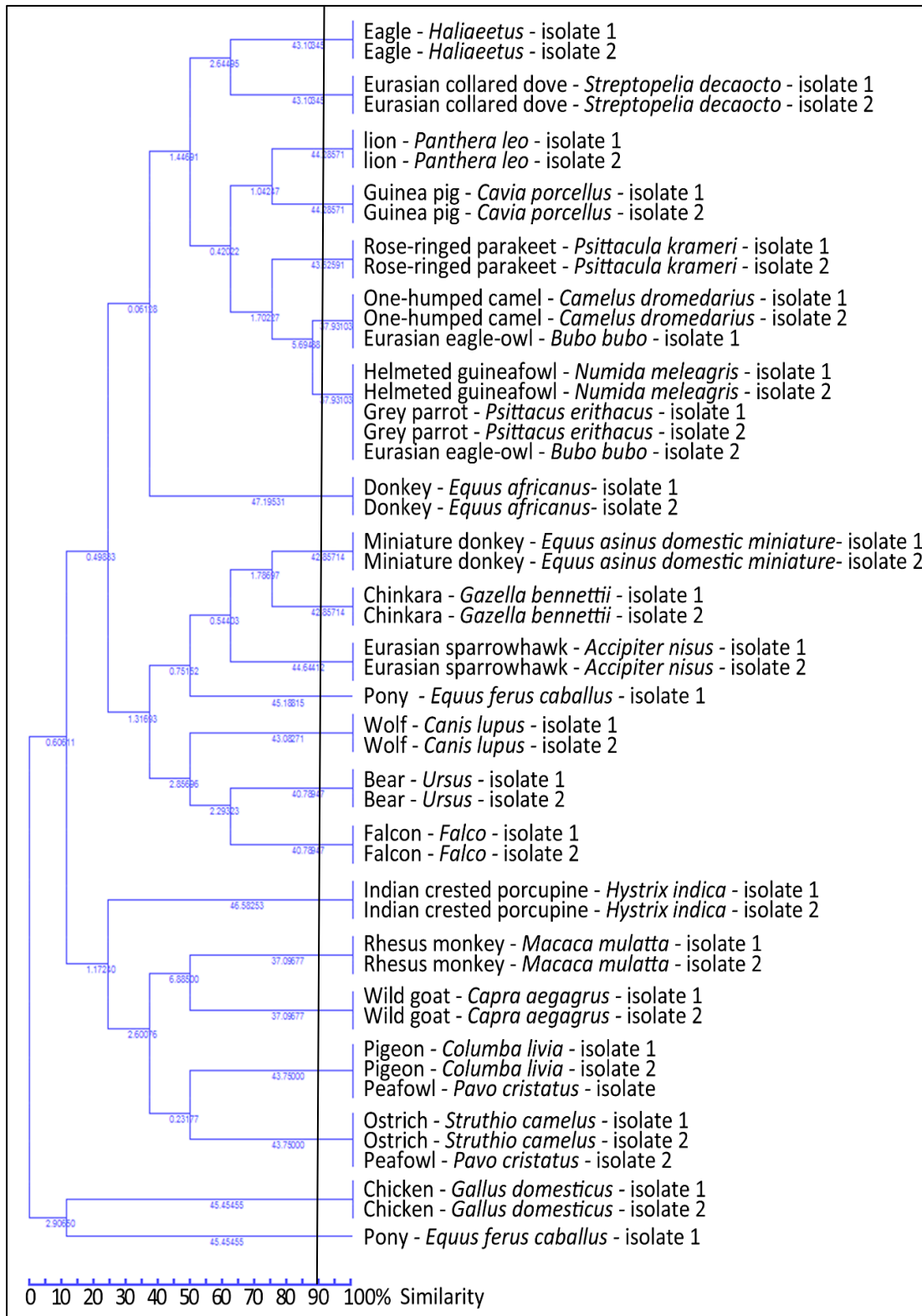


شکل ۱- باندهای الکتروفورز به دست آمده در ERIC-PCR ۲۴ گونه مختلف حیوانی از باغ وحش شهر کرمان. باندهای M، مارکر DNA می‌باشند.

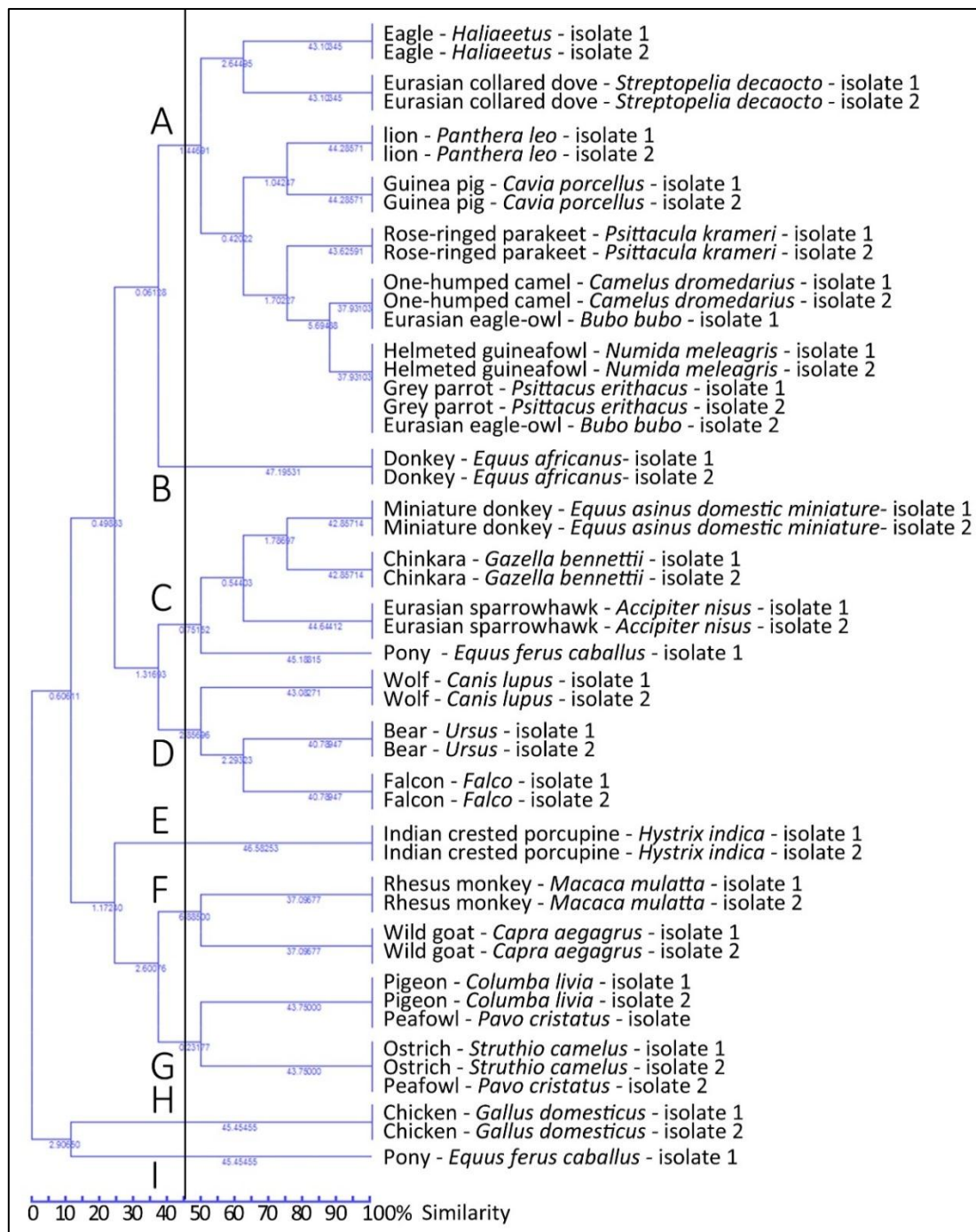
فیلوژنی، کلنی‌های موجود در قطع تشابه بیش از ۹۰ درصد به‌عنوان کلنی‌های مرتبط از لحاظ ژنتیکی (۱۳) و کلنی‌های موجود در قطع تشابه ۴۵ درصد به‌عنوان معیار خوشه‌بندی کلون‌ها در نظر گرفته شد (۲۳). همچنین کلنی‌های موجود در قطع تشابه ۱۰۰ درصد به‌عنوان کلنی‌های یکسان در نظر گرفته شد.

## نتایج

الگوهای به دست آمده از الکتروفورز در **Error!** **Reference source not found.** و درخت فیلوژنتیکی یا دندروگرام الگوهای ERIC با قطع تشابه بیش از ۹۰ درصد و همچنین ۴۵ درصد به ترتیب در **Error! Reference source not found.** و ۳ نشان داده شده است. در درخت



شکل ۲- درخت فیلوژنی الگوهای ERIC-PCR از ۲۴ گونه مختلف حیوانی جمع‌آوری شده از باغ وحش شهر کرمان بر پایه‌ی الگوریتم UPGMA. بر اساس قطع تشابه  $\leq 90\%$ ، ۲۲ کلون شناسایی شد. مقیاس در پائین دندروگرام شباهت ژنتیکی (%) را نشان می‌دهد.



شکل ۳- درخت فیلوژنی الگوهای ERIC-PCR بر پایه‌ی الگوریتم UPGMA از ۲۴ گونه مختلف حیوانی جمع‌آوری شده از باغ وحش شهر کرمان با قطع تشابه ۴۵٪. در این روش ۸ خوشه (A, B, C, D, E, F, G, H) و ۱ کلون منفرد (I) شناسایی شد که بزرگترین خوشه (A) دارای ۱۸ سویه‌ی *اشریشیاکلی* متعلق به میزبانان مختلفی چون عقاب، کبوتر، شیر، خوکچه هندی، طوطی سبز، شتر، شاه‌بوف، کاسکو و مرغ شاخدار بود. مقیاس در پائین دندروگرام شباهت ژنتیکی (%) را نشان می‌دهد.

جدایه‌های کبوتر با یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی داشت، همچنین الگوی ERIC جدایه‌های شترمرغ با یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی داشت. جدایه‌های مرغ شاخدار، کاسکو و یک جدایه از

#### ارتباط کلونال جدایه‌های *اشریشیاکلی* با قطع

تشابه بیش از ۹۰ درصد: همان‌طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است، با قطع تشابه بیش از ۹۰ درصد، بیست و دو کلون مورد شناسایی قرار گرفت؛ الگوی ERIC

یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی نشان دادند. همچنین قرابت ژنتیکی ۱۰۰ درصدی بین جدایه‌های شتر و یک جدایه از شاه‌بوف مشاهده شد. از طرف دیگر با دومین سطح خوشه‌بندی در شباهت ۴۵ درصد، ۸ خوشه (A, B, C, D, E, F, G و H) و ۱ کلون منفرد (I) شناسایی شد که بزرگترین خوشه (A) دارای ۱۸ سویه‌ی اشریشیاکلی (۷۵ درصد کل سویه‌ها) متعلق به میزبانان مختلفی چون عقاب، کبوتر، شیر، خوکچه هندی، طوطی سبز، شتر، شاه‌بوف، کاسکو و مرغ شاخدار بود. زیرشاخه‌های دیگری برگرفته از شاخه‌های اصلی در قطع تشابه‌های بالاتر از ۴۵ درصدی وجود داشت که در دندروگرام شکل ۳ قابل تشخیص می‌باشد. همپوشانی یکسان سویه‌ها نشان داد که کلون مشترک اشریشیاکلی بین پرندگان و پستانداران وجود دارد. بنابراین به نظر می‌رسد دریافت غذای یکسان و نگهداری حیوانات در نزدیکی به یکدیگر باعث چرخش این باکتری نه تنها در بین پرندگان مختلف، بلکه بین پستانداران و پرندگان شده است. دلیل این اتفاق می‌تواند اشتراک نگهبان باغ وحش نیز باشد که در این حالت باید توجه خاصی به رعایت بهداشت توسط افراد مراقب حیوانات شود.

همان‌طور که در دندروگرام ترسیمی نشان داده شده است (شکل شماره ۲)، تنوع بین جدایه‌های یک گونه حیوان نیز وجود داشت، به‌عنوان مثال با قطع تشابه ۱۰۰ درصد، دو جدایه از پونی به‌صورت دو کلون مجزا و کاملاً به‌صورت دور از هم در دندروگرام واقع شده‌اند. همین مسئله در مورد جدایه‌های شاه‌بوف و طاووس نیز صدق می‌کند. در دندروگرام ترسیمی (شکل شماره ۳)، یک جدایه از پونی (کلون I) به‌صورت خارج خوشه‌ای و منفرد قرار دارد در صورتی که جدایه دیگر از پونی در خوشه C به همراه جدایه‌های آهو و قرقی قرار گرفته است. با در نظر گرفتن این مسئله که در روش ژنوتایپینگ به روش ERIC-PCR، سویه‌هایی با میزان تشابه زیر ۸۵ درصد از نظر ژنتیکی نامرتب در نظر گرفته می‌شوند (۲۴)، جدا بودن دو جدایه از پونی در قطع تشابه ۴۵ درصد،

شاه‌بوف با شباهت ۱۰۰ درصدی از نظر الگوی ERIC در کنار هم قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های شتر و یک جدایه از شاه‌بوف شباهت ۱۰۰ درصدی را در الگوی ERIC از خود نشان دادند.

### ارتباط کلونال جدایه‌های اشریشیاکلی با قطع

**تشابه ۴۵ درصد:** در دندروگرام حاصل از نتایج ERIC با قطع تشابه ۴۵ درصد، ۹ اریک تایپ مورد شناسایی قرار گرفت که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. در این میزان از تشابه همه جدایه‌ها در یک خوشه قرار نگرفتند به‌طوری که ۸ خوشه (A, B, C, D, E, F, G و H) و ۱ کلون منفرد (I) شناسایی شد که بزرگترین خوشه (خوشه A) دارای ۱۸ سویه‌ی اشریشیاکلی متعلق به میزبانان مختلفی چون عقاب، کبوتر، شیر، خوکچه هندی، طوطی سبز، شتر، شاه‌بوف، کاسکو و مرغ شاخدار بود.

### بحث و نتیجه‌گیری

بررسی الگوهای رفتاری و شباهت‌های فیلوژنتیکی سویه‌های باکتری اشریشیاکلی در محیط باغ وحش که میزبان‌های متعدد حیوانی در تماس با انسان‌ها قرار دارند اهمیت بالایی دارد. در این مطالعه، از مدفوع ۲۴ گونه حیوان سالم شامل عقاب، الاغ، خروس محلی، خر مینیاتوری، گرگ، خرس، سیخور، شتر، خوکچه هندی، شیر، طوطی سبز، پونی، شاهین، میمون رزوس، بز کوهی، کبوتر، طاووس، شترمرغ، یاکریم، قرقی، شاه‌بوف، مرغ شاخدار، آهو و کاسکو در باغ وحش کرمان باکتری اشریشیاکلی جداسازی و با روش ERIC-PCR، انگشت‌نگاری ژنتیکی شدند. آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل با استفاده از روش UPGMA نشان داد که با قطع تشابه ۱۰۰ درصد، الگوی باندهای به‌دست آمده از الکتروفورز ۲۴ گونه حیوان در ۲۲ کلون قرار گرفتند که این خود نشان‌دهنده‌ی قرار گرفتن برخی جدایه‌ها از حیوانات مختلف در یک کلون می‌باشد. جدایه‌های مرغ شاخدار، کاسکو و یک جدایه از شاه‌بوف با شباهت ۱۰۰ درصدی از نظر الگوی ERIC در کنار هم قرار گرفتند. الگوی ERIC جدایه‌های کبوتر و جدایه‌های شترمرغ با

نشان‌دهنده تنوع بالای باکتری /شیریشیالکی در این گونه حیوان است (شکل شماره ۳). همین مسئله در مورد جدایه‌های شاه‌بوف و طاووس نیز صدق می‌کند (شکل شماره ۲). هر دو جدایه مربوط به خروس محلی و هر دو جدایه مربوط به سیخور تشکیل خوشه‌های مجزای با نام‌های به ترتیب H و E داده‌اند. مسئله با اهمیت دیگر که در دندروگرام (شکل ۲ و ۳) مشخص است این است که هر دو جدایه از خروس محلی و یک جدایه از پونی به صورت کاملاً مجزا با سایر جدایه‌ها قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی قابل توجه باکتری /شیریشیالکی (تقریباً ۹۰ درصد) در این حیوانات با سایر حیوانات این مطالعه می‌باشد. همچنین بیشترین تفاوت ژنتیکی بین پونی و عقاب وجود داشت.

انتخاب کات‌آف قطع تشابه بر اساس تکرارپذیری طولانی مدت اثر انگشت به دست آمده با یک سویه مشخص /شیریشیالکی با استفاده از یک تکنیک ژنوتایپینگ خاص به دست می‌آید. به عنوان مثال کاسارز و همکاران با مقایسه ۴ روش ژنوتایپینگ نشان دادند که در روش ژنوتایپینگ به روش ERIC-PCR، سویه‌هایی با میزان تشابه زیر ۸۵ درصد از نظر ژنتیکی نامرتب در نظر گرفته می‌شود (۲۴). در برخی مطالعات دیگر حداقل قرابت ژنتیکی ۹۰ درصد به عنوان کات‌آف برای سویه‌های مرتبط و کات‌آف ۵۰ درصد برای به دست آوردن خوشه‌های اصلی در نظر گرفته شده است (۱۳، ۱۴) که در مطالعه حاضر به منظور یافتن شباهت ژنتیکی از قطع تشابه بالاتر از ۹۰ درصد و برای خوشه‌بندی قطع تشابه ۴۵ درصد استفاده شد. در تصویر دندروگرام با کمتر شدن قطع تشابه، بزرگنمایی قرابت ژنتیکی کمتر شده و تعداد اریک تایپ‌ها کمتر می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌ها با روش ERIC-PCR می‌تواند به عنوان روشی مفید جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. در طول دو دهه گذشته، چندین محقق از ERIC-PCR به عنوان یک

روش تایپ مولکولی سریع برای تعیین روابط ژنتیکی بین چندین گونه باکتری جدا شده از مواد غذایی، نمونه‌های محیطی، نمونه‌های انسانی و غیره بهره برده‌اند (۷، ۸، ۲۵). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۷ توسط رنجبر و همکاران انجام شد نمونه مدفوع حیوانات سالم مانند مرغ، گاو و گوسفند طی یک سال (مهر ۱۳۹۱ تا مهر ۱۳۹۲) از دامداری‌های اطراف استان‌های تهران و البرز برای تعیین توزیع ERIC در سویه‌های /شیریشیالکی جدا شده تهیه شد (۱۴). این محققان بیشترین فراوانی و تنوع در بین سویه‌های /شیریشیالکی جدا شده از نمونه‌های مدفوع مرغ و گوسفند مشاهده کردند و ابراز داشتند که پروفایل‌های DNA به وضوح از طریق الگوهای اثر انگشت خاص قابل تشخیص بودند. آنها بیان کردند روش ERIC-PCR رویکرد مناسبی برای تایپینگ مولکولی سویه‌های /شیریشیالکی جدا شده از منابع مختلف حیوانی است (۱۴). السلطان و الهادی در سال ۲۰۲۲ از توالی‌های ERIC برای تعیین تنوع ژنتیکی در میان /شیریشیالکی جدا شده از انسان و گوشت منجمد وارداتی میگو و گاو استفاده کردند. در این مطالعه حداقل قرابت ژنتیکی ۹۰ درصد به عنوان کات‌آف برای سویه‌های مرتبط در نظر گرفته شد. نتایج آنها همپوشانی یکسان دو سویه /شیریشیالکی جدا شده از انسان‌های مبتلا به گاستروانتریت و سویه‌های جدا شده از گوشت گاو و میگو منجمد وارداتی را نشان داد که اهمیت این منابع را برای باکتری /شیریشیالکی بیماری‌زا در روده انسان برجسته کرد (۱۳). این محققین همچنین اثبات کردند که بکار بردن همزمان پرایمرهای ERIC1 و ERIC2 بهترین توانایی تمایز و تایپینگ برای بررسی اپیدمیولوژیک و تجزیه و تحلیل ژنتیکی در میان جمعیت سویه‌های /شیریشیالکی را دارد و استفاده از یک پرایمر ERIC منفرد نمی‌تواند برای تمایز بین سویه‌های /شیریشیالکی جدا شده از منابع مختلف بکار رود (۱۳). در مطالعه حاضر از دو پرایمر ERIC همزمان استفاده شد. یکی از محدودیت‌های تحقیق حاضر عدم بررسی جدایه‌ها از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عدم انجام

سطوح و یا جابجایی وسایل موجود در کنار حیوانات توسط نگهبانان و یا رفت و آمد کارکنان، باعث انتشار آلودگی و انتقال به مواد غذایی سایر حیوانات شده و در نتیجه گونه‌های مختلف حیوانی این سویه‌های اشریشیاکلی را دریافت و کلونیزه می‌کنند. بنابراین برای به حداقل رساندن انتشار اشریشیاکلی، می‌توان توصیه کرد که اقدامات بهداشتی اضافی در باغ وحش‌ها، مانند محدودیت‌های بهداشتی در خوردن و آشامیدن و تأمین امکانات ضد عفونی به‌ویژه در نواحی نوازش برای بازدیدکنندگان باغ وحش و همچنین ضد عفونی مکرر سطوح و حذف مدفوع حیوانات اعمال شود.

#### سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است که بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را ابراز می‌نمایند.

#### References

1- Bagheri M, Jajarmi M, Ghanbarpour R. Identification of colicinogenic *Escherichia coli* isolates from broiler car-casses and their inhibitory effect on *E. coli* pathotypes. *New Find Vet Microbiol.* 2023; 5(2): 31–40. [In Persian]

2- O'Boyle N, Douce GR, Farrell G, Rattray NJW, Schembri MA, Roe AJ, et al. Distinct ecological fitness factors coordinated by a conserved *Escherichia coli* regulator during systemic bloodstream infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2023; 120(1): e2212175120.

3- Lorrayne de Souza AM, Motta RG, Martinez AC, Orsi H, Hernandez RT, Rall VLM, et al. Virulence-encoding genes related to extraintestinal pathogenic *E. coli* and multidrug resistant pattern of strains isolated from neonatal calves with different severity scores of umbilical infections. *Microb Pathog.* 2023; 174: 105861.

4- Burgaya J, Marin J, Royer G, Condamine B, Gachet B, Clermont O, et al. The bacterial genetic determinants of *Escherichia coli* capacity to cause bloodstream infections in humans. *bioRxiv.* 2023; 2012–22.

سروتایپینگ بود. همچنین به‌منظور تجزیه و تحلیل بهتر داده‌ها می‌توان از روش‌های دیگر انگشت‌نگاری مانند AFLP به‌عنوان روش مکمل به‌منظور افزایش قدرت تفکیک استفاده کرد. اهمیت این اطلاعات در مدیریت شیوع و اقدامات پیشگیرانه، ارائه‌ی راهکارهای درمانی مناسب به‌ویژه در شیوع سویه‌های پاتوژن اشریشیاکلی ضروری است. با توجه به اینکه در این مطالعه چندین سویه جداسازی شده از میزبان‌های مختلف با جنس‌های متفاوت دارای شباهت ۱۰۰ درصدی در الگوی ERIC بودند، می‌توان نتیجه گرفت به علت نزدیکی بودن این جنس‌های مختلف حیوانی در یک زیستگاه، باعث شده است که این سویه‌ها در بین حیوانات مختلف در گردش باشد. بنابراین اگر این سویه‌ها حاوی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و یا سویه‌های پاتوژن باشند، از طریق مدفوع و فضولات حیوانات در محیط قرار می‌گیرند و توسط ذرات گرد و غبار برخاسته در هوا انتشار می‌یابند. همچنین تماس با

5- Abdlla YA, Al-Sanjary RA. The molecular identification of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) isolated from meat and meat products. *Iraqi J Vet Sci.* 2023; 37(1): 9–15.

6- Askari A, Ghanbarpour R, Akhtardanesh B, Aflatoonian MR, Sharifi H, Jajarmi M, et al. Detection of zoonotic diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli* in healthy household dogs. *Iran J Microbiol.* 2020; 12(6): 522. [In Persian]

7- Jajarmi M, Fooladi AAI, Badouei MA, Ahmadi A. Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. *Microb Pathog.* 2017; 109: 274–9. [In Persian]

8- Jajarmi M, Askari Badouei M, Imani Fooladi AA, Ghanbarpour R, Ahmadi A. Pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of caprine origin: virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. *BMC Vet Res.* 2018; 14(1): 1–8. [In Persian]

9- Bender JB, Shulman SA. Reports of

zoonotic disease outbreaks associated with animal exhibits and availability of recommendations for preventing zoonotic disease transmission from animals to people in such settings. *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 224(7): 1105–9.

**10- Sherwen SL, Hemsworth PH, Butler KL, Fanson K V, Magrath MJL.** Impacts of visitor number on Kangaroos housed in free-range exhibits. *Zoo Biol.* 2015; 34(4): 287–95.

**11- Vale AP, Cousins C, Tzora A, McCarron M, Green A, Molloy S, et al.** Molecular characterization of fecal escherichia coli isolated from zoo animals. *J Zoo Wildl Med.* 2020; 50(4): 813.

**12- Schlager S, Lepuschitz S, Ruppitsch W, Ableitner O, Pietzka A, Neubauer S, et al.** Petting zoos as sources of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) infections. *Int J Med Microbiol.* 2018; 308(7): 927–32.

**13- Alsultan A, Elhadi N.** Evaluation of ERIC-PCR method for determining genetic diversity among Escherichia coli isolated from human and retail imported frozen shrimp and beef. *Int J Food Contam.* 2022; 9(1): 12.

**14- Ranjbar R, Tabatabaee A, Behzadi P, Kheiri R.** Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of Escherichia coli strains isolated from different animal stool specimens. *Iran J Pathol.* 2017; 12(1): 25. [In Persian]

**15- Shnaiderman-Torban A, Steinman A, Meidan G, Paitan Y, Abu Ahmad W, Navon-Venezia S.** Petting zoo animals as an emerging reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and ampC-producing Enterobacteriaceae. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2488.

**16- Ramazanzadeh R, Zamani S, Zamani S.** Genetic diversity in clinical isolates of Escherichia coli by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iran J Microbiol.* 2013; 5(2): 126–31. [In Persian]

**17- De Gregorio E, Silvestro G, Petrillo M, Carlomagno MS, Di Nocera PP.** Enterobacterial

repetitive intergenic consensus sequence repeats in yersiniae: Genomic organization and functional properties. *J Bacteriol.* 2005; 187(23): 7945–54.

**18- Ishihara K, Hosokawa Y, Makita K, Noda J, Ueno H, Muramatsu Y, et al.** Factors associated with antimicrobial-resistant Escherichia coli in zoo animals. *Res Vet Sci.* 2012; 93(2): 574–80.

**19- De Witte C, Vereecke N, Theuns S, De Ruyck C, Vercammen F, Bouts T, et al.** Presence of broad-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Zoo Mammals. *Microorganisms.* 2021; 9(4): 834.

**20- Wang Y, He T, Han J, Wang J, Foley SL, Yang G, et al.** Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal Escherichia coli isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet Microbiol.* 2012; 159(1–2): 53–9.

**21- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D.** Clinical Veterinary Microbiology E-Book. *Elsevier Health Sciences.* 2013.

**22- Versalovic J, Koeth T, Lupski R.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(24): 6823–31.

**23- Ibrahim DR, Dodd CER, Stekel DJ, Ramsden SJ, Hobman JL.** Multidrug resistant, extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolated from a dairy farm. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016; 92(4).

**24- Casarez EA, Pillai SD, Mott JB, Vargas M, Dean KE, Di Giovanni GD.** Direct comparison of four bacterial source tracking methods and use of composite data sets. *J Appl Microbiol.* 2007; 103(2): 350–64.

**25- Fuentes Castillo D, Navas Suárez PE, Gondim MF, Esposito F, Sacristán C, Fontana H, et al.** Genomic characterization of multidrug-resistant ESBL-producing Escherichia coli ST58 causing fatal colibacillosis in critically endangered Brazilian merganser (*Mergus octosetaceus*). *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(2): 258–66.

## Genetic fingerprinting of *Escherichia coli* bacterial isolated from Kerman zoo animals using ERIC-PCR

Laleh Saadat<sup>1</sup>, Maziar Jajarmi<sup>2</sup>, Neda Eskandarzade<sup>3\*</sup>, Reza Ghanbarpour<sup>4</sup>

1- DVM, Faculty of Veterinary Medicine, 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- Assistant professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

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

Receive: January 13, 2023; Revise: February 28, 2023; Accept: April 29, 2023

### Summary

---

Genetic fingerprinting of *Escherichia coli* strains in one habitat can significantly help our understanding of genetic diversity and circulation in different hosts. In this study, 48 stool samples were collected from 24 healthy zoo animal species in Kerman zoo by sterile swab. After the isolation of *Escherichia coli*, the strains were genetically fingerprinted by the ERIC-PCR method, and the bond patterns obtained from electrophoresis were calibrated and analyzed with Gel Quest software. In the next step, the similarity of ERIC templates was determined by drawing a phylogenetic tree by Cluster Viz software using the UPGMA algorithm. In this method, 22 clones were identified with a  $\geq 95\%$  similarity cutoff; The ERIC pattern of pigeon isolates had 100% similarity with a peacock isolate, and the ERIC pattern of ostrich isolates had 100% similarity with one peacock isolate. The isolates of horned chicken, casco, and one isolate of the tawny owl were grouped together with 100% similarity in terms of ERIC pattern. Also, camel isolates and one isolate from a tawny owl showed 100% similarity in the ERIC pattern. Considering that several strains isolated from different hosts with different species had 100% similarity in the ERIC pattern, it can be concluded that due to the proximity of different animal species in the same habitat such as a zoo, these strains circulated among different animals.

**Key words:** *Escherichia coli*, ERIC-PCR, Zoo

## خواص ضد باکتریایی اسانس ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت تنش شوری

سارا نجفی قافلستانی<sup>۱\*</sup>، محمدعلی نجفی<sup>۲</sup>

۱- دانش‌آموخته دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۱ آذر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳ دی ۱۴۰۱

### چکیده

نگهدارنده‌های شیمیایی اثرات زیان‌باری بر سلامت انسان دارند، به همین دلیل امروزه سعی شده تا ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌ها به‌عنوان جایگزین مورد توجه قرار گیرند. تنش شوری از جمله تنش‌های مهم محیطی است که بر اجزاء اسانس و خواص آن تأثیرگذار است. هدف از این تحقیق ارزیابی اثر ضد باکتریایی اسانس ریحان به‌دست آمده تحت تأثیر تنش شوری است. در این پژوهش تنش شوری در ۵ سطح شامل کنترل (۰/۳ dc/m)، ۱/۵، ۳، ۵ و ۸ ds/m در شرایط گلخانه‌ای بر گیاه ریحان اعمال و اثر آن بر عملکرد وزن تر برگ و اسانس و نیز اجزاء اسانس بررسی گردید. همچنین خواص ضد باکتریایی اسانس به دو روش چاهک و میکروداپلوشن در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *شریشیاکلی*، *پسودوموناس آئروژنزا* و *سالمونلا انتریکا* ارزیابی شد. افزایش تنش شوری تا سطح ۸ ds/m باعث کاهش عملکرد وزن تر برگ در هر بوته (تا ۱۴۲/۲ درصد) و افزایش مقدار اسانس ریحان (تا ۵۴/۱ درصد) گردید ( $p < 0.05$ ). همچنین با افزایش تنش شوری برخی ترکیبات مانند لینالول (۴/۸ درصد) و جرماکرن (۴۴/۲ درصد) افزایش و اجزاء اوجنول (۴۰/۸ درصد) و آلفا-کادینول (۳۴/۷ درصد) کاهش یافتند. نمونه‌های اسانس ریحان در تمام سطوح شوری در برابر باکتری‌های هدف اثر ضد میکروبی نشان داد. این خصوصیت تحت تأثیر نوع باکتری و سطح شوری قرار داشت. *باسیلوس سرئوس* مقاوم‌ترین و *سالمونلا انتریکا* حساس‌ترین باکتری در برابر اثرات ضد میکروبی اسانس ریحان بودند. افزایش قدرت ضد باکتریایی اسانس ریحان در سطوح شوری  $\leq 3/0$  dc/m مشاهده گردید، که می‌تواند برای کاربرد مؤثرتر در برابر باکتری‌های بیماری‌زا لحاظ شود.

**واژگان کلیدی:** اجزاء اسانس، رشد باکتری، عملکرد، میکروداپلوشن

فساد میکروبی مواد غذایی یک مسأله اصلی در صنایع غذایی است که با کاهش ماندگاری، بروز انواع بیماری‌ها و ضرر اقتصادی همراه است. راهکار رایج در ممانعت از فساد میکروبی استفاده از ترکیبات نگهدارنده شیمیایی است که به دلیل اثرات سمی آن بر سلامت انسان با محدودیت‌هایی مواجه شده است. امروزه علاقه شدیدی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به‌عنوان یک جایگزین مناسب پدید آمده است (۳). اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که در اندام‌های گل، برگ، ساقه و ریشه، با فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع از جمله ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ساخته می‌شوند. این ترکیبات به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، کارایی قوی و سمیت پایین برای پستانداران، از قابلیت گسترده‌ای به‌عنوان طعم‌دهنده، ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان در مواد غذایی برخوردار هستند (۱۳). خواص اسانس تابع نوع و مقدار اجزاء آن است که خود تحت تأثیر منطقه جغرافیایی، وارسته، تنش‌های محیطی و روش استخراج قرار دارد (۱، ۳، ۲۰). تنش شوری یک خطر جدی است. پیش‌بینی می‌شود تا اواسط قرن ۲۱ بیش از ۵۰ درصد زمین‌های کشاورزی شور خواهند شد که این موضوع برای کشور ایران با توجه به شرایط اقلیمی خاص خود، بسیار جدی‌تر است (۷، ۲۶). در فرآیند تنش شوری، غلظت نمک‌های مختلف مانند کلرید سدیم، سولفات کلسیم، سولفات منیزیم و بی‌کربنات‌ها در آب و خاک موجب اعمال استرس‌های اسمتیک به گیاه شده و در نتیجه با تغییر فعالیت‌های آنزیمی مسیرهای متابولیک سنتز، کمیت و کیفیت اسانس را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۹). از سویی دیگر عملکرد برگ و اسانس نیز تحت تأثیر شوری قرار دارد و معمولاً در سطوح شوری بالاتر از ۶ ds/m کاهش می‌یابد (۷، ۲۵). یکی از مهم‌ترین برنامه‌های پژوهشی در کشت گیاهان دارویی، به‌دست آوردن بهترین شرایط کشت برای تولید گیاهی با بیشترین درصد متابولیت‌های ثانویه است (۹). (۱۵)

از مشهورترین تیره‌های گیاهان دارویی، لامیاسه (Lamiaceae) است که دربرگیرنده ۲۳۶ سر رده و حدود ۶۰۰۰ جنس می‌باشد. جنس *Ocimum* از مهم‌ترین اعضاء این خانواده بوده و دربرگیرنده ۱۵۰ گونه متفاوت است (۱). ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از گیاهان مهم خانواده نعناع است که برای سالیان طولانی به‌عنوان گیاه دارویی با هدف پیشگیری یا درمان اختلالات قلبی-عروقی، دیابت، گرفتگی قاعدگی، اختلالات گوارشی و عصبی، ضد اسپاسم، ضد التهاب و درد و همچنین تب‌بر کاربرد دارد. همچنین کاربرد وسیعی به‌عنوان ادویه و سبزی تازه‌خوری دارد (۲۱). گزارشات متعددی در خصوص اثر ضد میکروبی اسانس برگ ریحان در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی در دسترس است (۱، ۱۴، ۱۹). گزارش شده که فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس برگ ریحان عمدتاً ناشی از فعالیت گروه‌های مونوترپن، تری‌ترپن و فلاونوئیدی است (۱۳).

در این پژوهش سعی شده تا برای نخستین بار تأثیر تنش شوری بر اجزاء تشکیل‌دهنده و نیز خواص ضد میکروبی اسانس ریحان گونه *Ocimum basilicum* L. در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گیرد. تا بهترین و مؤثرترین سطح شوری آبیاری با هدف کاربرد اسانس به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی معرفی گردد.

### مواد و روش‌ها

بذر رقم ریحان (*Ocimum basilicum* L.) پاکان بذر، اصفهان، ایران) در شرایط گلخانه‌ای به تاریخ ۱۰ آبان ماه ۱۴۰۰، درون گلدان‌هایی (دهانه ۴۰ cm، ارتفاع ۳۷ cm) حاوی مخلوط پیت ماس: شن: خاک مزرعه (۵۰:۲۵:۲۵) کشت شد. در هر گلدان تعداد ۱۰ بذر در عمق ۱ cm کشت و در مجموع هر تیمار در ۱۵ گلدان اجرا شد (۱۰). آبیاری بلافاصله پس از کشت تا مرحله شش برگی گیاه با تیمار کنترل (۰/۳ dc/m) انجام گردید. در طی رشد گیاه طی چند مرحله بوته‌ها تنک و در نهایت داخل هر گلدان تعداد سه بوته قرار گرفت. تیمارهای شوری در ۵ سطح شامل کنترل (۰/۳ dc/m)، ۱/۵، ۳، ۵ و ۸ ds/m اعمال

## خواص ضد باکتریایی اسانس ریحان (*Ocimum basilicum L.*) تحت تنش شوری

**آزمون‌های میکروبی:** اثر ضد میکروبی اسانس ریحان بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1337، لیستریا منوسیوتونز (ATCC 19118)، باسیلوس سرئوس PTCC 1857، اشریشیاکلی PTCC 1763، پseudomonas آئروژنا PTCC 1074 و سالمونلا انتریکا PTCC 1709 مورد بررسی قرار گرفت. تمامی باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه زابل تهیه و برای فعال‌سازی، به محیط کشت نوترینت برات (سیگما آلدریج، انگلستان) تلقیح و تحت دمای °C ۳۷ برای مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری (پارس آزما، ایران) شدند. جهت تهیه کلنی‌های خالص بر روی محیط کشت نوترینت جامد (سیگما آلدریج، انگلستان) کشت خطی انجام و پس از گرمخانه‌گذاری مجدد، کلنی‌های خالص جهت تکثیر به محیط کشت نوترینت برات (سیگما آلدریج، انگلستان) منتقل و در شرایط مشابه به گرمخانه منتقل گردیدند. از کشت تازه ۲۴ h سوسپانسیون نیم مک‌فارلند ( $\times 10^6$  CFU/ml ۱/۵ - ۱) تهیه و بلافاصله جهت آزمون‌های بعدی استفاده شد (۵).

**آزمون ضد میکروبی به روش چاهک:** در این روش ۱ ml از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به پلیت ۹ cm منتقل و ۱۵ ml از محیط کشت نوترینت آگار ذوب شده به آن اضافه گردید. سپس در هر پلیت چاهک‌هایی به قطر ۵ mm ایجاد و هرکدام با ۵۰  $\mu$ l از اسانس گیاه با غلظت ۲۰ درصد پر شد. Tween 80 (۰/۵ v/v درصد) به‌عنوان کنترل منفی و اریترومیسین (E15، سیگما آلدریج- انگلستان) به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. سپس پلیت‌ها گرمخانه‌گذاری (دمای °C ۳۷، ۴۸ h) گردیدند. اثر ضد میکروبی بر حسب میلی‌متر (mm) ناحیه بازداری گزارش شد (۱). تمامی آزمون‌ها در ۵ تکرار انجام گرفت.

**تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس ریحان:** حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی

شدند. محلول‌های نمکی با افزودن مقادیر کافی NaCl به محلول کنترل، به گونه‌ای آماده شدند تا رسانایی الکتریکی مورد نظر حاصل شود. بوته‌ها پس از شش برگی شدن، تیمارهای شوری را هر ۵ روز به مقدار ۵۰۰ ml دریافت نمودند. تنش شوری حدود ۲۹ روز (زمانی که ۵۰ درصد بوته‌ها وارد مرحله‌ی گلدهی شدند) اعمال گردید. یک هفته پس از آخرین آبیاری، برگ‌ها جهت آزمون‌های بعدی برداشت شدند (۸).

**عملکرد وزن تر برگ:** بدین منظور تمامی برگ‌های هر تیمار جداگانه توزین و برحسب وزن تر برگ به ازای هر بوته (گرم) گزارش گردید (۸).

**استخراج و عملکرد اسانس:** برگ‌های برداشت شده بدون ذرات خارجی، پس از شستشو با آب، در دمای اتاق خشک و سپس توسط دستگاه آسیاب (Feller، چین) پودر شدند. مقدار ۳۰ گرم پودر همراه آب به نسبت (پودر: آب) ۱:۱۰ به درون بالن دستگاه کلونجر (شیمی آزماگستر، ایران) منتقل و برای مدت ۳ ساعت فرآیند استخراج ادامه یافت. اسانس به‌دست آمده به کمک قیف جداکننده از فاز آبی جدا و در ادامه پس از فیلتراسیون با کاغذ واتمن ۱ به کمک انیدرو سولفات سدیم (مرک، آلمان) خشک شدند. عملکرد اسانس برحسب مقدار اسانس استخراج شده (درصد) بر پایه وزن تر برگ گزارش گردید (۱۶).

**شناسایی اجزاء اسانس:** شناسایی ترکیبات اسانس ریحان با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent 7890A (آمریکا) متصل به طیف‌سنج جرمی Agilent 5975C و ستون DB-5 (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر، ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) انجام شد. گاز هلیوم با سرعت ۱/۱ ml/min به ستون با دمای متغیر ۳۰ تا °C ۲۵۰ (روند افزایشی ۲/۵°C/min) تزریق گردید. انرژی یونیزاسیون طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت بود. ترکیبات اسانس با بررسی طیف نرمال آلکان‌های C7 - C22 و مقایسه آنها با طیف جرمی ترکیبات استاندارد و بهره‌گیری از فرهنگ ترکیبات طبیعی شناسایی شد (۱۶).

افزایش سطح شوری موجب افزایش معنی‌دار مقدار اسانس برگ گردید ( $p < 0.05$ ). بیشترین مقدار (۰/۰۹۳ درصد) در سطح شوری ۸ ds/m و کمترین (۰/۰۶۱ درصد) تحت شوری ۰/۳ ds/m ثبت شد.

**ترکیبات شیمیایی اسانس:** همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد ۳۵ ترکیب شیمیایی مختلف در نمونه‌های اسانس ریحان شناسایی شدند. در بین تمامی تیمارها به ترتیب ترکیبات لینالول (۵۶/۹۳-۵۴/۳۲ درصد) و اوجنول (۷/۹۱-۴/۶۸ درصد) بالاترین سهم را به خود اختصاص دادند. سایر ترکیباتی که به‌طور متوسط مقادیری بالاتر از ۳ درصد را ثبت نمودند به ترتیب ۵-ان-۴-آلفا-اول- مورل (۴/۸۲-۳/۹۵ درصد)، جرماکرن (۴/۱۸-۲/۹۶ درصد)، الف-کادینول (۴/۲۷-۲/۷۹ درصد) و ۸- سینول (۳/۴۶-۲/۸۲ درصد) بودند.

**اثر ضد میکروبی اسانس ریحان:** اثر ضد میکروبی نمونه‌های اسانس ریحان در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اریترومیسین در جدول ۲ آورده شده است. تمامی نمونه‌های اسانس ریحان در برابر باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا منوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) و گرم منفی (سالمونلا انتریکا، اشریشیا کلی، پseudوموناس آئروژنزا) اثر بازدارندگی داشتند. آنتی‌بیوتیک اریترومیسین در مقایسه با اسانس ریحان در برابر تمامی باکتری‌ها بجز سالمونلا انتریکا ( $6/7 \pm 0/7$  mm) اثر ضد میکروبی قوی‌تری نشان داد. بالاترین اثر ضد میکروبی اسانس ریحان در برابر سالمونلا انتریکا (۶/۱۶-۱۵/۷) و کمترین در برابر باسیلوس سرئوس ( $8/8$  -  $8/2$  mm) ثبت شد. افزایش شوری تنها در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۱۶/۶-۱۲/۳) باعث تقویت اثر ضد میکروبی گردید حال آنکه بر سایر باکتری‌ها تأثیر نیرومندی نداشت.

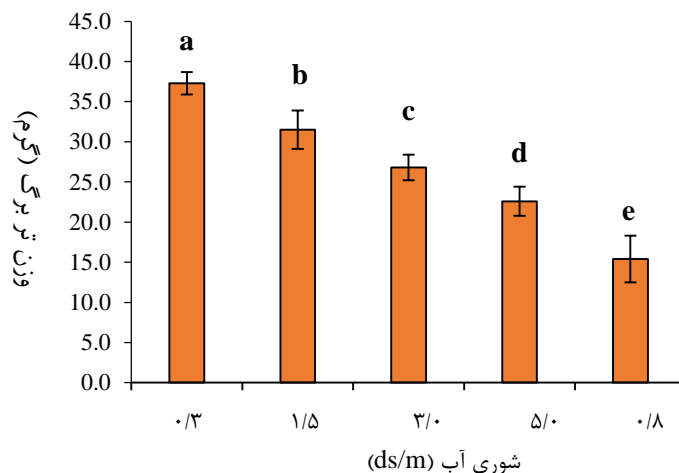
(MBC) اسانس ریحان به روش میکرودايلوشن و با استفاده از محیط کشت براث مغذی و پلیت ۹۶ خانه انجام شد. به هر چاهک مقدار ۱۰۰  $\mu$ l سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. سپس به چاهک نخست مقدار ۱۰۰ اسانس اضافه و رقیق‌سازی سریالی تا خانه نهم ادامه یافت. محیط کشت حاوی میکروب هدف به‌عنوان کنترل مثبت و محیط کشت فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پلیت برای مدت ۴۸ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری و به لحاظ کدورت سنجی در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (سسیل، انگلستان) بررسی گردید. کمترین غلظت اسانس که در آن باکتری رشد نکرد به‌عنوان MIC ثبت شد. همچنین از خانه‌هایی که فاقد رشد میکروبی بودند، ۵۰ میکرولیتر به محیط کشت نوترینت آگار تلقیح و برای ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری ( $37^{\circ}\text{C}$ ) گردیدند، کمترین غلظتی که قادر به مرگ ۹۹/۹ باکتری هدف بود به‌عنوان MBC ثبت شد (۲۳).

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** در این تحقیق تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

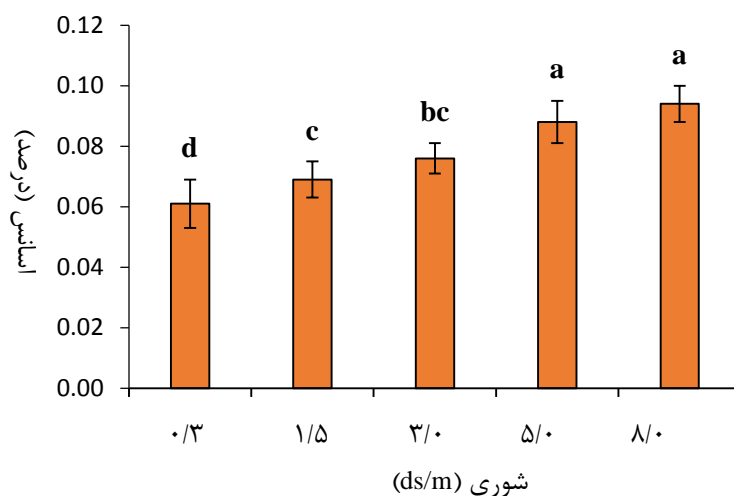
## نتایج

**عملکرد وزن تر برگ:** آبیاری با آب شور بر صفت وزن تر برگ (شکل ۱) در سطح اطمینان ۹۵ درصد اثر معنی‌دار داشت. به‌طوری که افزایش سطح شوری موجب کاهش وزن تر برگ گردید. مقادیر وزن تر برگ بوته‌ها از ۱۵/۴ تا ۳۷/۳ گرم متغیر بود که به ترتیب توسط تیمارهای شوری ۸/۰ ds/m و کنترل (۰/۳ ds/m) به‌دست آمد.

**عملکرد اسانس:** همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد



شکل ۱- تأثیر سطح شوری بر عملکرد وزن تر برگ (گرم) گیاه ریحان. حروف کوچک بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. داده‌ها: میانگین  $\pm$  انحراف معیار



شکل ۲- تأثیر سطح شوری مقدار اسانس (درصد) گیاه ریحان. حروف کوچک بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. داده‌ها: میانگین  $\pm$  انحراف معیار

سرئوس و کمترین مقادیر در غلظت اسانس  $6/25 \mu\text{g/ml}$  برای *سالمونلا انتریکا* به دست آمد. با توجه به مقادیر MIC نمونه‌های اسانس، سطح شوری  $5 \text{ ds/m}$  بر روی لیستریا مونوسیژنوز و سطوح شوری  $3$  و  $5 \text{ ds/m}$  بر روی *سالمونلا انتریکا* بیشترین تأثیرگذاری را داشتند.

#### حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کشندگی

(MBC): نتایج حاصل از ارزیابی حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کشندگی (MBC) نمونه‌های اسانس ریحان در برابر باکتری‌های هدف (جدول ۳) بیانگر اثرات متفاوت است. بالاترین مقادیر MIC ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) و  $6/25 \mu\text{g/ml}$  در تمامی تیمارهای شوری در برابر *باسیلوس*

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف شوری (ds/m) بر ترکیبات اساسی ریحان (*Ocimum basilicum*. L) بر حسب درصد

ردیف	ترکیب شیمیایی	RI	شوری (ds/m)				
			۰	۱	۲	۳	۴
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>							
۱	$\alpha$ - pinene	۹۳۲	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۱۹	۰/۱۳	۰/۰۹
۲	Camphen	۹۴۹	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۶
۳	Sabinene	۹۷۳	۰/۱۸	۰/۱۲	۰/۰۵	-	-
۴	$\beta$ - pinene	۹۷۹	۰/۹۸	۰/۷۶	۰/۳۳	۰/۱۸	۰/۰۸
۵	Myrecen	۹۹۲	۰/۸۶	۰/۶۲	۰/۵۶	۰/۴۵	۰/۴۲
۶	$\alpha$ -phellandrene	۱۰۰۹	۰/۵۸	۰/۳۲	-	-	-
۷	limonen	۱۰۱۷	۰/۲۲	۰/۱۲	۰/۰۴	-	-
۸	1,8-Cineol	۱۰۳۰	۲/۸۲	۲/۹۶	۳/۱۵	۳/۲۸	۳/۴۶
۹	cis- $\beta$ - ocimene	۱۰۴۳	۰/۵۹	۰/۳۹	۰/۲۱	۰/۱۶	۰/۱۲
۱۰	$\gamma$ -Terpinene	۱۰۵۶	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۰	۰/۰۸	۰/۱۱
۱۱	$\alpha$ -Terpinene	۱۰۶۱	۱/۴۸	۱/۵۹	۱/۸۳	۲/۰۶	۲/۲۱
۱۲	Fenchone	۱۰۷۶	۰/۷۳	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۵۱	۰/۴۸
<b>Oxygenated Monoterpenes</b>							
۱۳	Linalool	۱۰۸۳	۵۴/۳۲	۵۴/۴۹	۵۶/۵۷	۵۶/۷۱	۵۶/۹۳
۱۴	Camphor	۱۱۴۳	۰/۸۹	۰/۹۵	۱/۱۸	۱/۲۴	۱/۳۱
۱۵	Borneol	۱۱۶۶	۰/۴۵	۰/۳۹	۰/۳۱	۰/۲۸	۰/۲۳
۱۶	Terpinene-4-ol	۱۱۷۵	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۲۱
۱۷	Bornyl acetate	۱۲۷۳	۰/۶۶	۰/۷۳	۰/۷۹	۰/۸۰	۰/۸۷
۱۹	Eugenol	۱۳۵۸	۷/۹۱	۷/۳۴	۶/۲۹	۵/۵۷	۴/۶۸
۲۰	$\beta$ - Caryophyllene	۱۴۵۴	۰/۱۶	۰/۱۹	۰/۲۴	۰/۲۹	۰/۳۱
۲۱	Germacrene D	۱۴۸۰	۲/۹۶	۳/۲۲	۳/۳۵	۴/۱۸	۴/۲۱
<b>Sesquiterpene Hydrocarbons</b>							
۲۲	$\alpha$ -Copaene	۱۳۶۶	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۲۰	۰/۲۷
۲۳	$\beta$ -Cubebene	۱۳۷۹	۰/۴۶	۰/۳۵	۰/۱۹	۰/۰۶	۰/۰۱
۲۴	$\beta$ - Elemene	۱۳۸۴	۱/۶۳	۱/۵۲	۱/۳۶	۱/۲۸	۱/۲۱
۲۵	$\alpha$ - Z- Ergamotene	۱۴۴۱	۲/۳۷	۲/۱۱	۱/۷۵	۱/۴۳	۱/۱۷
۲۶	$\beta$ - Farenesen	۱۴۶۱	۲/۱۵	۲/۲۶	۲/۴۵	۲/۶۷	۲/۸۷
۲۷	$\alpha$ - Amorphene	۱۴۹۳	۱/۲۱	۱/۱۹	۱/۰۸	۰/۸۵	۰/۳۶
۲۸	$\alpha$ - Selinene	۱۴۹۹	۰/۳۲	۰/۹۳	۱/۵۳	۱/۷۶	۲/۴۹
۲۹	$\delta$ - Cadinene	۱۵۱۲	۰/۸۳	۰/۹۵	۱/۸۲	۲/۰۵	۲/۲۵
۳۰	$\Delta$ - Cadinene	۱۵۲۸	۰/۱۲	۰/۱۹	۰/۲۳	۰/۴۱	۰/۵۷
۳۱	Bicyclogermacrene	۱۵۰۱	۰/۹۵	۰/۴۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۸
<b>Oxygenated Sesquiterpenes</b>							
۳۲	Spathulenol	۱۵۷۶	۱/۲۵	۱/۰۳	۰/۸۲	۰/۷۵	۰/۶۲
۳۳	Caryophyllene oxide	۱۵۸۱	۰/۷۳	۰/۵۸	۰/۴۳	۰/۲۸	۰/۱۶
۳۴	Muurool-5-en-4- $\alpha$ -ol	۱۶۳۷	۳/۹۵	۴/۱۲	۴/۲۵	۴/۴۹	۴/۸۲
۳۵	$\alpha$ - Cadinol	۱۶۵۱	۴/۲۷	۴/۰۵	۳/۵۸	۳/۴۱	۲/۷۹
	کل		۹۶/۷۲	۹۵/۲۵	۹۵/۸۵	۹۵/۹۱	۹۵/۳۳

RI: زمان بازداری

جدول ۲- اثر ضد میکروبی اسانس ریحان (mm) بر روی باکتری‌های هدف به روش چاهک

Tween 80	اریترومایسین	سطح شوری (ds/m)					میکروارگانیسم	
		۸/۰	۵/۰	۳/۰	۱/۵	۰/۳		
NE	۲۱/۶±۰/۵	۱۲/۲±۰/۴	۱۲/۳±۰/۷	۱۲/۲±۰/۷	۱۱/۶±۰/۵	۱۱/۸±۰/۳	<i>L. monocytogenes</i>	گرم مثبت
NE	۱۶/۵±۰/۷	۱۴/۶±۰/۵	۱۴/۸±۰/۴	۱۲/۹±۰/۷	۱۲/۷±۰/۴	۱۲/۳±۰/۴	<i>S. aureus</i>	
NE	۱۹/۵±۰/۸	۸/۵±۰/۶	۸/۸±۰/۴	۸/۲±۰/۵	۸/۷±۰/۸	۸/۴±۰/۳	<i>B. cereus</i>	
NE	۶/۷±۰/۷	۱۶/۳±۰/۴	۱۵/۷±۰/۳	۱۶/۱±۰/۵	۱۶/۴±۰/۶	۱۶/۶±۰/۹	<i>S. enterica</i>	گرم منفی
NE	۱۴/۸±۰/۱	۱۳/۳±۰/۵	۱۳/۶±۰/۶	۱۳/۴±۰/۳	۱۲/۸±۰/۳	۱۳/۱±۰/۴	<i>P. aeruginosa</i>	
NE	۱۲/۳±۰/۶	۱۴/۴±۰/۷	۱۴/۶±۰/۴	۱۴/۹±۰/۵	۱۴/۷±۰/۸	۱۴/۹±۰/۴	<i>E. coli</i>	

NE: ناحیه بازدارندگی شناسایی نشد. داده‌ها: میانگین ± انحراف معیار

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) باکتریایی اسانس ریحان (µg/ml)، تحت تنش شوری به روش چاهک

سطح شوری (ds/m)					فعالیت ضد میکروبی	میکروارگانیسم	
۸/۰	۵/۰	۳/۰	۱/۵	۰/۳			
۲۵/۰	۱۲/۵	۲۵/۰	۲۵/۰	۲۵/۰	MIC	<i>L. monocytogenes</i>	گرم مثبت
۲۵/۰	۲۵/۰	۲۵/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	MBC		
۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	MIC	<i>S. aureus</i>	گرم مثبت
۱۲/۵	۱۲/۵	۲۵/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	MBC		
۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	MIC	<i>B. cereus</i>	گرم مثبت
۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	MBC		
۱۲/۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	MIC	<i>S. enterica</i>	گرم منفی
۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	MBC		
۵۰/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	MIC	<i>P. aeruginosa</i>	گرم منفی
۱۰۰/۰	۵۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	MBC		
۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	MIC	<i>E. coli</i>	گرم منفی
۲۵/۰	۱۲/۵	۱۲/۵	۲۵/۰	۲۵/۰	MBC		

### بحث و نتیجه‌گیری

گیاه ریحان به‌خصوص برگ‌ها، در برابر غلظت شوری آب عکس‌العمل نشان داده و از نظر سطح و تعداد کاهش می‌یابند. این پدیده مربوط به کاهش تقسیم سلولی است. کوچک‌تر شدن سطح برگ به همراه کاهش پتانسیل اسمتیک، مقدار جذب ترکیبات محلول خاک را کاهش می‌دهد که نتیجه آن پایین آمدن مقدار وزن ماده خشک و سطح برگ گیاه است (۲۲). املاح و ترکیبات مغذی به‌طور مستقیم بر فتوسنتز متابولیت‌های اولیه (قند، آمینو

نتایج نشان داد تیمار شوری بر مقدار MIC باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *پسودوموناس آئروژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* بی‌تأثیر بود. افزایش غلظت شوری باعث کاهش مقدار MBC اسانس ریحان در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* (۸-۳ ds/m)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸-۳ ds/m)، *سالمونلا انتریکا* (۳ ds/m)، *پسودومونوس آئروژنز* (۵ ds/m) و *اشریشیاکلی* (۳ ds/m) و ۳ ds/m و ۵ ds/m در مقایسه با تیمار کنترل (۰/۳ ds/m) گردید.

اسید و اسیدهای آلی) تأثیرگذار بوده و کاهش جذب، موجب کاهش وزن تر و از سویی افزایش تجمع برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند اسانس می‌شود (۲۰). اثر تنش شوری بر اجزاء عملکرد از جمله ریحان (۲۰، ۸) و بادرنجوبیه بررسی و نتایج مشابهی گزارش گردیده است (۲۵).

گزارشات متفاوتی از نوع و درصد اجزاء شیمیایی اسانس ریحان در دسترس است. امور و همکاران (۲۰۲۱) بیشترین اجزاء اسانس ریحان را لینالول (۴۱/۳ درصد) و او ۸- سینول (۹/۶ درصد) اعلام (۲) کردند در حالی که قاسمی و همکاران (۲۰۱۷) دو ترکیب متیل چاویکول (۴۹/۷) و لینالول (۱۰/۷) گزارش نمودند (۲۱). تفاوت نتایج مربوطه احتمالاً به اثر وارسته، شرایط اقلیمی، عوامل مؤثر بر مرحله داشت (شامل میزان کوددهی، دور آبیاری)، زمان برداشت و روش استخراج اسانس بر فرایند سنتز ترکیبات اسانس ناشی شده است (۱۸). در این پژوهش تنش شوری تأثیرات متفاوتی بر کمیت اجزاء اسانس نشان داد. افزایش سطح استرس شوری موجب افزایش مقدار ترکیبات لینالول (۴/۸ درصد)، او ۸- سینول (۲۲/۷ درصد)، جرماکرن (۴۲/۲ درصد) و ۵-ان-۴-آلفا-اول-مورل (۲۲/۲ درصد)، و کاهش اوجنول (۴۰/۸ درصد) و آلفا-کادینول (۳۴/۷ درصد) شد. سنتز متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر استرس‌های محیطی به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی گیاه در برابر عوامل تنش‌زای محیطی (نمک، دما، کم‌آبی) عمل می‌کند. اجزای اصلی اسانس ریحان عمدتاً از دو مسیر بیوشیمیایی شیکیمیک اسید برای ترکیبات متیل چاویکول، اوژنول، متیل اوژنول و متیل سینامات، و دیگری مسیر اسید موالونیک برای اجزاء ترپنوئیدی مانند لینالول و ژرانپول ساخته می‌شوند (۲۶). این مسیرها با مسیرهای سنتز متابولیت اولیه در ارتباط بوده و تأثیر می‌پذیرند (۲۳). شوری همچنین با تأثیرگذاری بر فعالیت‌های آنزیماتیک متابولیسم‌های بیوسنتز منجر به تغییر محتویات اسانس و اجزاء آن می‌شود (۹). بسیاری از نویسندگان تغییر ترکیبات اسانس گیاهان در شرایط شور

را گزارش نموده‌اند. عزیز و همکاران (۲۰۱۳) ترکیبات اسانس بادرنجوبیه، را تحت تنش شوری (۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۵۰۰ ppm NaCl) ارزیابی و گزارش نمود. مقادیر ژرانپول (۷۵/۲ - ۱۹/۶ درصد)، ژرانپیل استات (۹/۱۴-۱۳/۰۶ درصد)، نرال (۵۱/۱ - ۲۱/۲ درصد) و پس از آن ژرانپول (۳۱/۰-۹۹/۱ درصد) تغییر یافت (۴). در پژوهشی دیگر اثر شوری در غلظت‌های ۰ - ۹ ds/m بر اجزاء اسانس زیره سیاه بررسی و مشخص گردید افزایش سطح شوری تا مقدار ۶ ds/m، باعث افزایش آلفا-پینن (حدود ۵۹ درصد) و کاهش پی-سیمن (۳۹ درصد) شده است (۹).

فاکتور تعیین کننده بر اثرات ضد میکروبی اسانس، اجزاء شیمیایی، وجود گروه‌های عملگر و اثرات متقابل سینترژیستی آنان است. به‌طور کلی اسانس‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت خاصیت مهارکنندگی بیشتری در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارند. دلیل مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی احتمالاً ناشی از ساختار سخت و غنی غشاء خارج سلولی از ترکیبات لیپولی ساکاریدی می‌باشد که موجب مقاومت بیشتر غشاء در برابر نفوذ ترکیبات آب‌گریز می‌گردد. با این حال ترکیبات آب‌دوست کوچک مولکول قادر به عبور از کانال‌های پروتئینی پورین می‌باشند اما همچنان مانعی برای درشت مولکول‌ها و ترکیبات آب‌گریز هستند (۲۱). اما غشاء خارجی باکتری‌های گرم‌مثبت توسط لایه‌ای از ترکیبات پپتیدوگلیکان پوشیده شده که در بسیاری موارد فاقد تراکم لازم به جهت ممانعت از نفوذ ترکیبات ضد میکروب کوچک مولکول می‌باشد (۷). در برخی از گزارشات اثر ضد میکروبی اسانس‌ها را ناشی از ماهیت چربی‌دوستی آنها دانسته‌اند که با تأثیرگذاری بر دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی باعث برهم‌زدن نظم مولکولی ترکیبات پلی‌ساکاریدی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدی شده و در نهایت موجب نفوذپذیری بیشتر می‌شوند. در باکتری‌ها، نفوذپذیری غشاها با از دست دادن یون‌ها و کاهش پتانسیل غشاء و نیز تخلیه ATP همراه است. آسیب به دیواره سلولی و غشاء می‌تواند منجر به

## خواص ضد باکتریایی اسانس ریحان (*Ocimum basilicum L.*) تحت تنش شوری

شوری بر خاصیت ضد میکروبی واریته‌های مختلف اسانس ریحان را در برابر باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا انتریکا* و *انتروباکتر کلاسه* بررسی نموده و ضمن اشاره به تأثیرگذاری سطح شوری بر خصوصیت ضد میکروبی نمونه‌های اسانس، بیان داشتند واریته‌های مختلف اثرات ضد میکروبی متفاوتی دارند (۸).

نتایج ما نشان داد افزایش سطح تنش شوری در گیاه ریحان موجب کاهش عملکرد وزن برگ تر و افزایش راندمان تولید اسانس می‌شود. تنش شوری موجب تغییراتی در غلظت ترکیبات سازنده اسانس ریحان گردید. همچنین موجب تغییرات مؤثری بر کنترل رشد باکتری‌های گرم‌منفی و مثبت در مقایسه با تیمار کنترل (۰/۳ ds/m) شد. این ویژگی تحت تأثیر سطح شوری و نوع میکروارگانیسم قرار داشت. بنابراین اعمال تنش شوری می‌تواند روش مناسب نوینی برای تولید اسانس‌های ریحان با کاربردهای خاص در صنایع غذایی و دارویی مطرح باشد. با این حال این ادعا نیاز به مطالعات دقیق‌تر اقتصادی، بالینی و در محیط واقعی غذایی دارد.

### سپاسگزاری

این پژوهش با بهره‌گیری از گرنت شماره UOZ-GR-9955 اجرا گردیده است. نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه زابل اعلام می‌دارند.

نشت ماکرومولکول‌ها و تجزیه شدن آنها شود. روغن‌های ضروری همچنین می‌توانند به ساختمان لیپیدها و پروتئین‌ها آسیب بزنند. به نظر می‌رسد سمیت سلولی شامل چنین آسیب‌های غشایی باشد (۷، ۱۲، ۲۱). با این وجود نمی‌توان این موضوع را با قطعیت بیان داشت که تمامی باکتری‌های گرم‌منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم‌مثبت در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس ریحان مقاوم‌تر هستند (۲۶). ترکیب اسانس یک پارامتر بسیار مهم برای ارزیابی کیفیت ریحان و کاربرد آن به‌عنوان ماده اولیه برای استفاده در شاخه‌های مختلف صنایع دارویی، غذایی و شیمیایی است. ترپنوئیدها مانند لینالول، اوسمین،  $\alpha$ -ترپینول،  $\alpha$ -۸و۱-سینئول، کامفور،  $\alpha$ -پینن، جرماسین و همچنین سسکوئی‌ترین‌ها اهمیت اکولوژیکی و بیولوژیکی زیادی دارند. سسکوئی‌ترین‌ها متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی بسیار قوی هستند که در میان آنها جرماسرین برجسته است. مونوترپن‌های  $\alpha$ -۸و۱-سین‌ال، کامفور، لینالول،  $\alpha$ -ترپین‌ال و غیره اثر ضد باکتریایی قابل توجهی دارند (۱۱). لازم به ذکر است اطلاعات کمی در مورد اثر تقابل بین اجزای تشکیل‌دهنده بر فعالیت ضد میکروبی وجود دارد که می‌تواند به‌صورت اثرات افزایشی و یا کاهش‌ی بروز نماید. این خصوصیت احتمالاً ناشی از مهار متوالی یک مسیر بیوشیمیایی مشترک، مهار آنزیم‌ها (سنتز پروتئین، سنتز اسید نوکلئیک) و نیز متلاشی شدن غشای خارجی است (۲۶). کروز و همکاران (۲۰۲۰) اثر

## References

1- Ababutain IM. Antimicrobial Activity and Gas Chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) analysis of Saudi Arabian *Ocimum basilicum* leaves extracts. *J Pure Appl Microbiol.* 2019; 13: 823-833.

2- Amor G, Sabbah M, Caputo L, Idbella M, De Feo V, Raffaele P, et al. Basil essential oil: Composition, antimicrobial properties, and micro-encapsulation to produce active chitosan films for food packaging. *Foods.* 2021; 10: 1- 16.

3- Alhathloul HA, Soliman MH, Ameta KL, El-Esawi MA, Elkelish A. Changes in ecophysiology, osmolytes, and secondary metabolites of the medicinal plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* subjected to drought and heat stress. *Biomolecules.* 2020; 10: 43-64.

4- Aziz EE, Hussein MS, Wahba HE, Razin AM. Essential oil constituents of *Dracocephalum moldavica L.* grown under salt Stress and different sources of soil amendment. *Middle East J Sci Res.*

2013; 16: 706-713.

**5- Barzegar H, Alizadeh behbahani B, Mehrnia MA.** Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Journal of food science and technology (Iran)*. 2019; 16: 113-125. [In Persian]

**6- Caliskan O, Kurt D, Temizel Kadir E, Odabas MS.** Effect of Salt Stress and Irrigation Water on Growth and Development of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Open Agric*. 2017; 2: 589-594.

**7- Chouhan S, Sharma K, Guleria S.** Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines*. 2017; 4: 1-27.

**8- Cruz LRO, Polyzos N, Fernandes A, Petropoulos SA, Gioia FD, Dias MI, et al.** Effect of saline conditions on chemical profile and the bioactive properties of three red-colored basil cultivars. *J Agron*. 2020; 10: 1-17.

**9- Davazdahemami S, Allahdadi M.** Essential oil yield and composition of four annual plants (ajowan, dill, moldavian balm and black cumin) under saline irrigation. *Food Therapy and Health Care*. 2022; 4: 1-9.

**10- Ebrahimi M, Rezaerdinejad V, Besharat S, Abdi M.** A study of evapotranspiration as well as crop coefficient in *Ocimum Basilicum* L. growth process in greenhouse. *Journal of Water and Irrigation Management*. 2018; 8: 1-13. [In Persian]

**11- Gadisa E, Weldearegay G, Desta K, Tsegaye G, Hailu S, Jote K, Takele A.** Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2019; 19: 1-9.

**12- Ghasemi Pirbalouti A, Malekpoor, Salimi A.** Chemical composition and yield of essential oil from two Iranian species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*). *Trends Phytochem Res*. 2017; 1: 3-8.

**13- Hamida NB, Martínez-Díaz RA, Hela M, Msaada K, Ouerghi Z, Andres MF, et al.** Effect of salinity on the antiparasitic activity of hyssop essential oil. *J Essent. Oil Res*. 2020; 32: 74-83.

**14- Ilic ZS, Milenkovic L, Sunic L, Tmusic N, Mastilovic J, Kevresan Z, et al.** Efficiency of Basil essential oil antimicrobial agents under different shading treatments and harvest times. *J Agron*.

2021; 11: 1-12.

**15- Isayenkov SV, Maathuis FJ.** Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Front Plant Sci*. 2019; 10: 1-11.

**16- Kalkhorani NM, Dadgar M, Rezaee MB, Mahboubi A, HeroAbadi F.** Essential oils composition of *Ocimum basilicum* var. purpurascens from different ecological zone in Iran and antimicrobial activity against different bacterial species. *J medicinal plants by-products*. 2017; 2: 117-123.

**17- Li ZH, Cai M, Liu YS, Sun PL, Luo SL.** Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules*. 2019; 24: 1-10.

**18- Milenkovic L, Stanojevic J, Cvetkovic D, Stanojevic L, Lalevic D, Sunic L, Fallik E, Ilic ZS.** New technology in basil production with high essential oil yield and quality. *Ind. Crops Prod*. 2019; 140: 111718.

**19- Nabrdalik M, Grata K.** Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil against Gram-negative bacteria. *Post Fitoter*. 2016; 17: 80-86.

**20- Najafi Ghaghelestani S, Khammari E, Ghanbari A, Dahmardeh M.** Effect of additive intercropping series of Sunflower with Basil, under saline and fresh water irrigation regimes on their yield and advantage indices. *J Crop Improv*. 2022; 24: 311-323. [In Persian]

**21- Purushothaman B, Prasanna Srinivasan R, Suganthi P, Ranganathan B, Gimbun J, Shanmugam KA.** Comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *J Nat Med*. 2018; 18: 71-83.

**22- Sandra SS, da -Silva CPR, Oliveira FA, da Silva OM, Silva AC, Candido WS.** Responses of basil cultivars to irrigation water salinity. *Rev. Bras. de Eng. Agricola e Ambient*. 2017; 21: 44-49.

**23- Saravani Pak E, Najafi MA, Tavakoli M, Soltani Tehrani N.** Evaluation antimicrobial effects of new edible film from Persian gum incorporated with Saffron extract and nisin, on chicken fillets under chilled conditions. *New Findings in Veterinary Microbiology*. 2021; 4: 23-36.

**24- Sarri E, Termentzi A, Abraham EM, Papadopoulos GK, Baira E, Machera K, et al.** Salinity stress alters the secondary metabolic profile of *M. sativa*, *M. arborea* and their hybrid (*Alborea*). *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 1-19.

**25- Shabankareh GH, Fakheri B, Mohamadpoor VR.** Effects of different levels of salinity and drought stress on growth parameters and essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Iran*

*J Field Crop Sci.* 2016; 46: 673-686. [In Persian]

26- Stanojevic LP, Marjanovic-Balaban ZR, Kalaba VD, Stanojevic JS, Cvetkovic DJ, Cakic MD. Chemical composition, antioxidant and anti-

microbial activity of Basil (*Ocimum basilicum L.*) essential oil. *Essent Oil Bear Pl.* 2017; 20: 1557-156.

## Antibacterial properties of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress

Sara Najafi Ghaqlestani<sup>\*1</sup>, Mohammad Ali Najafi<sup>2</sup>

1- Graduated PhD in Agriculture, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Science and Industry, Zabol University, Zabol, Iran.

Receive: December 2, 2022; Revise: December 23, 2022; Accept: December 24, 2022

### Summary

---

Chemical preservatives have harmful effects on human health, for this reason, natural compounds such as essential oils (EOs) are being considered as alternatives. Salinity stress (SS) is one of the important environmental stress that affects EOs components and its properties. The purpose of this research is to evaluate the antibacterial effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) EO obtained under SS. salinity at 5 levels including control (0.3 dc/m), 1.5, 3, 5 and 8 ds/m was applied to basil plant in greenhouse conditions. Leaf weight and EO yield, also the EO components were evaluated. Also, antibacterial properties of EO by agar-well diffusion and microdilution method were evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenes* and *Salmonella enterica*. Increasing the salinity stress up to 0.8 ds/m level, decreased the yield of leaf weight per plant (up to 142.2%) and increased the amount of EO content (up to 54.1%). Also, with the increase in SS level, some compounds such as linalool (4.8%) and germacrene (44.2%) increased, and eugenol (40.8%) and  $\alpha$ -cadinol (34.7%) components decreased. Basil EOs showed antimicrobial effect against the target bacteria at all salinity levels. This characteristic was influenced by the type of bacteria and salinity level. *Bacillus cereus* was the most resistant and *Salmonella enterica* the most sensitive bacteria against the antimicrobial effects of basil EO. An increase in the antibacterial power of EOs was observed at salinity levels  $\geq 0.3$  dc/m, which can be considered for more effective use against pathogenic bacteria.

**Key words:** Essential oil components, Bacterial growth, Yield, Microdilution

## واکسن‌های DNA استراتژی قدرتمندی برای کنترل بروسلوز

سعید عابدی<sup>۱\*</sup>، غزال پورمحمدحسینی<sup>۲</sup>، گلنوش رضائی زاده<sup>۳</sup>

- ۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، ایران.
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، ایران.
- ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۷ اسفند ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱۶ اردیبهشت ۱۴۰۲

### چکیده

بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام با توزیع جهانی و با روند صعودی می‌باشد. کنترل بروسلوز در انسان به کنترل بیماری حیوانی بستگی دارد. با وجود این که تاکنون واکسن تأیید شده‌ای برای بروسلوز در انسان وجود ندارد، تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن‌هایی با کارایی بالا و عوارض جانبی پائین برای حیوانات صورت گرفته است. واکسن‌های زنده ضعیف شده ارزان‌تر و مؤثرتر از سایر واکسن‌ها هستند اما می‌توانند موجب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تداخل با آزمایش‌های تشخیصی سرولوژیکی و افزایش حدت در حیوان شوند. واکسیناسیون حیوانات با واکسن‌های موجود در بازار ممکن است باعث بیماری شود و در برخی شرایط اثربخشی پایینی دارند. واکسن‌های حاوی پروتئین نوترکیب یا DNA کدکننده آنها می‌توانند جایگزین مناسبی برای واکسن‌های مرسوم باشند، زیرا می‌توانند موجب کاهش عوارض ناخواسته شوند. انتخاب آنتی‌ژن مناسب که سیستم ایمنی را به خوبی تحریک کند در تهیه این واکسن‌ها اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه مروری با بررسی واکسن‌های نوترکیبی که بر مبنای پروتئین‌های نوترکیب و DNA ساخته شده‌اند، تلاش شده است تا نقاط قوت و ضعف آنها و چشم‌انداز جدید واکسیناسیون بر علیه بیماری بروسلوز روشن‌تر شود. مطالعه حاضر با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed، Google scholar و SID تا سال ۲۰۲۱ میلادی به تحقیقات جدید در مورد پروتئین نوترکیب و واکسن‌های DNA علیه بروسلوز پرداخته است. با توجه مزیت‌ها و معایب واکسن‌های معمول و جدید بروسلوز، واکسن‌های نوترکیب و DNA، پس از گذراندن مراحل تحقیقات در حیوانات بزرگ، می‌توانند راهکار مناسبی برای جلوگیری از پیشرفت بروسلوز باشند.

**واژگان کلیدی:** بروسلوز، واکسن، پروتئین نوترکیب، واکسن‌های DNA

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: said\_abedi83@yahoo.com

## مقدمه

بروسلوز (*Brucellosis*) یا تب مالت یک عفونت مشترک بین حیوانات اهلی و وحشی است. باکتری بروسلای (*Brucella*) به عنوان انگل درون سلولی اختیاری عمل می‌کند و باعث ایجاد بیماری مزمن می‌شود که ممکن است تا آخر عمر ادامه داشته باشد. انسان توسط چهار گونه بروسلای/بورتوس (*B. abortus*)، بروسلای کنیس (*B. canis*)، بروسلای ملی‌تنسیس (*B. melitensis*) و بروسلای سوئیس (*B. suis*) آلوده می‌شود (۱). علائم بیماری شامل تب‌های موج، تعریق، درد مفاصل و درد عضلانی است. علاوه بر آن کاهش گلبول‌های سفید و قرمز خون، افزایش آنزیم‌های کبدی مانند آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در بیماران دیده می‌شود. در ۷۰ درصد موارد، علائم گوارشی مانند تهوع، استفراغ، کاهش اشتها، کاهش وزن ناخواسته، ناراحتی معده، یبوست، اسهال، التهاب کبد، بزرگ شدن کبد و بزرگ شدن طحال رخ می‌دهد (۲) بروسلوز انسانی عمدتاً با مصرف شیر غیر پاستوریزه و پنیرهای نرم حاصل از شیر حیوانات آلوده به‌خصوص بزها به بروسلای ملی‌تنسیس ایجاد می‌شود. سایر فراورده‌های حیوان آلوده مثل جگر و گوشت که به‌صورت خام یا نیمه‌پخته مصرف شوند هم می‌توانند باعث ایجاد بیماری شوند (۳). تب مالت در تمام نقاط ایران پراکنده است ولی وفور آن در مناطق مختلف یکسان نیست. با نگاهی به برخی بررسی‌ها و گزارش‌ها مشخص شده است که از سال ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۹، میزان ابتلا به بروسلوز در کشور کاهش یافته است، اما از سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۲ روند صعودی داشته است. از نظر بروز تب مالت در سال ۱۳۹۹، استان‌های کردستان، لرستان، ایلام، زنجان و کرمانشاه، جزو مناطق با شیوع بال گزارش شده‌اند (۴).

با توجه به این که واکسن مؤثری برای پیشگیری بروسلوز در انسان وجود ندارد، باید راه‌های ابتلای دام به این بیماری را کنترل کرد. در حال حاضر، از سه سویه بروسلای در ساخت واکسن علیه بروسلوز استفاده می‌شود که شامل سویه‌های S19 و RB51 برای گاو و سویه

Rev1 برای نشخوارکنندگان کوچک است. اگرچه سویه‌های S19 بروسلای/بورتوس و Rev1 بروسلای ملی‌تنسیس می‌توانند سطوح مؤثری از محافظت را در گاو، بز و گوسفند ایجاد کنند، اما محدودیت‌های خاصی از جمله خطر سقط جنین در گاوهای بالغ آبستن را دارند (۵). همچنین بر اساس مطالعات انجام شده، واکسن‌های S19 و Rev1 محافظت کاملی در برابر عفونت با برخی سویه‌های خطرناک ایجاد نمی‌کنند (۶). بروسلای یک پاتوژن داخل سلولی است که در نوتروفیل‌ها بدون فعال‌سازی قابل توجه دستگاه ایمنی، زنده می‌ماند. همچنین این باکتری به شدت به عملکرد باکتری‌کشی پپتیدهای ضد میکروبی و سرم مقاوم است. بنابراین، توسعه موفقیت‌آمیز واکسن‌های بروسلوز یک چالش بزرگ است (۲-۷).

بروسلای از چندین روش برای سرکوب سیستم ایمنی استفاده می‌کند که توجه به این روش‌ها برای ساخت واکسن بسیار ضروری است. توانایی بروسلای در فرار یا مسدود کردن عناصر پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی میزبان برای بیماری‌زایی آنها ضروری است. این ارگانسیم از طریق کاهش، تغییر یا پنهان کردن شاخص‌های مولکولی مرتبط با پاتوژنیسته مانند لیپوپلی‌ساکارید (*Lipopolysaccharide, LPS*) و تاژک، استراتژی‌هایی برای فریب دادن سیستم ایمنی ذاتی میزبان ابداع کرده است. با استفاده از این تکنیک، باکتری‌ها می‌توانند بدون ایجاد پاسخ ایمنی تطبیقی وارد واکوئل شوند. آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه LPS باعث محافظت ناقص در برابر عفونت می‌شوند، حتی باکتری‌های اپسونیزه شده به‌طور مؤثری توسط ماکروفاژها کشته نمی‌شوند. آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه پروتئین‌های سطحی بروسلای نیز در حذف عفونت کارایی کمتری دارند. پاک‌سازی بروسلای وابسته به پاسخ‌های لنفوسیت نوع Th1 با تولید اینترفرون گاما ( $\gamma$ -IFN) و تولید سایتوکاین‌های مهمی مانند اینترلوکین (IL-1) و اینترلوکین ۱۲ (IL-12) و فاکتور نکروزدهنده تومور  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) همراه است (۸).

## واکسن‌های DNA استراتژی قدرتمندی برای کنترل بروسلوز

سویه Rev۱ هم وجود دارد که هنوز به‌عنوان موثرترین واکسن علیه بیماری در گوسفند و بز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶).

واکسن‌های زنده ضعیف شده به‌طور گسترده در برابر بروسلوز استفاده شده‌اند، مانند سویه S۱۹ بروسلا/بورتوس و سویه‌های Rev۱ و M۵ بروسلا ملی‌تنسیس و سویه S۲ بروسلا سوئیس که نوع آخر به‌عنوان یک فنوتیپ ضعیف شده توسط پاساژ مکرر سویه ۲۳۰۸ در شرایط آزمایشگاهی به‌دست آمده است. تحقیقات متعددی در مورد اثربخشی این واکسن‌ها در حیوانات آزمایشی انجام شده است و ثابت شده است که حیوانات واکسینه شده به‌طور مؤثر در برابر باکتری‌های نوع وحشی محافظت می‌شوند (۸، ۱۱، ۱۲). اشکال اصلی سویه‌های واکسن و Rev۱ این است که آگلوتینین‌های القا شده توسط این واکسن‌ها برای مدت طولانی در حیوانات ایمن شده باقی می‌مانند و با تست‌های تشخیصی سرولوژی استاندارد تداخل ایجاد می‌کنند، زیرا آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط این دو واکسن با دوام هستند. بنابراین، تشخیص بین حیوانات آلوده و واکسینه شده با سویه واکسن S۱۹ یا Rev۱ دشوار است. اگرچه میزان بروز سقط جنین پایین است، اما برای غلبه بر این نقایص، نیاز به یک واکسن ایمن و کارآمد احساس می‌شود (۱۴). یکی دیگر از واکسن‌های این دسته واکسن زنده ضعیف شده است که حاوی بروسلا سوئیس سویه S۲ می‌باشد. واکسیناسیون با این واکسن یکی از برنامه‌های کنترل بروسلوز در چین است. مطالعات نشان می‌دهد که این واکسن پاسخ ایمنی هومورال و سلولی خوبی ارائه می‌دهد و در برابر گونه‌های دیگر بروسلا نیز محافظت ایجاد می‌کند (۳)، البته این واکسن دامنه میزبانی محدودی دارد (۱۱).

### واکسن‌های بروسلوز مبتنی بر پروتئین‌های

**نوترکیب:** واکسن‌های پروتئین نوترکیب به‌عنوان جایگزین واکسن‌های مرسوم بسیار نویدبخش هستند، زیرا می‌توانند در بازدهی زیاد، خلوص بالا و با قابلیت اصلاح به‌منظور افزایش فعالیت‌های دلخواه و کاهش فعالیت‌های

لیپید A در LPS بروسلا در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم‌منفی، می‌تواند باعث تأخیر و کاهش پاسخ التهابی در میزبان آلوده شود. آنتی‌ژن O که بیرونی‌ترین جزء LPS در باکتری بروسلا است، می‌تواند از طریق واکنش با گیرنده‌های اختصاصی سطح سلول میزبان و با کاهش فعالیت ماکروفاژها به بقا و مقاومت باکتری در بدن میزبان کمک نماید (۹). آنتی‌ژن O می‌تواند با مولکول‌های MHC کلاس II واکنش داشته باشد و کمپلکس‌هایی را تشکیل دهد که ماکروفاژهای آلوده به بروسلا با عرضه آن آنتی‌ژن‌های پروتئینی در سطح خود باعث کاهش فعالیت‌های سلول‌های T شوند (۱۰).

### واکسن‌های کلاسیک علیه بروسلوز: در مراحل

اولیه ساخت واکسن بروسلا، اجزای سلولی از جمله پروتئین غشای خارجی، عصاره‌های محلول و نامحلول پوشش سلولی، سلول‌های مرده کامل، پروتئین‌های پری‌پلاسمیک و پروتئین‌های قابل استخراج استفاده شدند (۱۱).

واکسن‌های زنده ضعیف شده مؤثرترین واکسن‌هایی هستند که برای کنترل بروسلوز حیوانی استفاده می‌شوند (۸). به دلیل کارایی کمتر واکسن‌های بروسلوز غیر فعال و زیرواحد پروتئینی در تحریک سیستم ایمنی، دوزهای متعدد باید تجویز شود، در حالی که واکسن‌های تضعیف شده ارزان‌تر و مؤثرتر هستند و از طریق پاسخ‌های هومورال و سلولی باعث ایجاد ایمنی می‌شوند (۱۲). با این حال، برخی از اشکالات در تجویز واکسن‌های بروسلوز زنده ضعیف شده گزارش شده است که از جمله آنها مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تداخل با آزمایش‌های تشخیصی سرولوژیکی و حدت باقیمانده در حیوانات می‌باشند (۸). واکسن بروسلا/بورتوس S۱۹، که همچنان به‌عنوان واکسن استاندارد است که سایر واکسن‌ها در برابر آن ارزیابی می‌شوند، گسترده‌ترین واکسن مورد استفاده برای پیشگیری از بروسلوز در گاو است (۱۳). از واکسن‌هایی که برای کنترل بروسلوز از سالیان گذشته مورد استفاده قرار گرفته واکسن تخفیف حدت یافته بروسلا ملی‌تنسیس

آلومینیوم (تنها ادجوانت مجاز برای استفاده در واکنش‌های انسانی) پاسخ‌های ایمنی نوع Th<sub>2</sub> را ایجاد می‌کنند، در حالی که لیپید مونوفسفوریل A پاسخ‌های نوع Th<sub>1</sub> را القا می‌کند. برای غربالگری و ارزیابی آنتی‌ژن‌های محافظ، ترکیبی از یک آنتی‌ژن مناسب، ادجوانت، تقویت‌کننده و وکتور تحویل دهنده برای ایجاد یک پاسخ ایمنی محافظتی قوی، مانند پاسخ ایمنی Th<sub>1</sub> به‌عنوان ایمنی غالب در برابر بروسوز مورد نیاز است (۱۹). برای ایجاد یک واکنش مؤثر علیه پاتوژن داخل سلولی که توسط بروسلا ارائه می‌شود، تولید سایتوکاین‌های مشتق از (IL-۱۲)، Th<sub>1</sub>، TNF $\alpha$ ، IFN $\gamma$  و همچنین فعال‌سازی ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های T CD $4^+$  و CD $8^+$  از عوامل کلیدی برای پاکسازی عفونت هستند، در حالی که پاسخ‌های ایمنی Th<sub>2</sub>، که توسط سیستم ایمنی هومورال القا می‌شوند، نقش جزئی در پاکسازی عفونت دارند. سیتوکین‌ها نقش اصلی را در رشد، بلوغ، تمایز و فعال‌سازی سلول‌های ایمنی ایفا می‌کنند. به‌عنوان مثال، IL-۴ (سیتوکین Th<sub>2</sub>) با تمایز سلول‌های T CD $4^+$  ساده به سلول‌های ۲ Th باعث تولید آنتی‌بادی IgG<sub>1</sub> می‌شود، در حالی که IFN $\gamma$  (سیتوکین Th<sub>1</sub>) با تمایز سلول‌های T CD $4^+$  ساده، تشکیل آنتی‌بادی IgG<sub>2</sub> را القا می‌کند (۲۰). IL-۱۰ یک سیتوکین تنظیم‌کننده ایمنی است که تعادل پاسخ‌های ایمنی Th<sub>1</sub> یا Th<sub>2</sub> را برای جلوگیری از فعالیت بیش از حد سیستم ایمنی و محدود کردن آسیب بیشتر بافت ایجاد می‌کند (۲۱).

سطوح سلولی و اجزای درون سلولی متعددی از بروسلا مانند پروتئین‌های غشای خارجی و ریبوزومی Omp<sub>2B</sub>، Omp<sub>16</sub>، Omp<sub>19</sub>، Omp<sub>31</sub> و L<sub>12</sub>/L<sub>Y</sub> در *E. coli* بیان شده است و به‌عنوان آنتی‌ژن‌های محافظ در مدل‌های موش مورد استفاده قرار گرفته است (۲۲). با این حال، هیچ‌یک از آنها نتیجه موفقیت‌آمیزی نشان نداده‌اند و نیاز به بررسی بیشتری دارند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پروتئین‌هایی که طیف وسیعی از ایمنی‌زایی را

ناخواسته ساخته شوند. فرمولاسیون این واکنش‌ها استفاده از یک پروتئین نوترکیب بسیار حفاظت شده است که می‌تواند بر گونه‌های متعدد بروسلا تأثیر بگذارد. در این طرح، انتخاب یک آنتی‌ژن (متفاوت از آنتی‌ژن مورد استفاده در تست‌های تشخیصی) برای واکنش‌های، امکان تمایز بین حیواناتی که واکنش‌دهنده‌اند و حیواناتی که عفونت بروسلا دارند را فراهم می‌کند. همچنین، این واکنش‌ها بیماری را گسترش نمی‌دهند و نمی‌توانند به سویه‌های خطرناک تبدیل شوند و این باعث می‌شود که استفاده از آنها ایمن‌تر از سایر واکنش‌ها باشد (۱۵). در یک واکنش بروسلا با نام X4072b1، از یک سویه ضعیف شده *سالمونلا* تیپ‌موریوم حامل پلاسمید نوترکیب *asd*-pBL، به‌عنوان یک ناقل برای انتقال پروتئین‌های الحاقی AL7/L12 و BLS بروسلا به مناطق مهم ایمنی استفاده شد. هنگامی که این واکنش به‌صورت خوراکی روی موش‌های BALB/c تجویز شد، سویه ناقل ضعیف شده قادر به ایجاد ایمنی مخاطی و سیستمیک و محافظت موش‌ها در برابر عفونت بروسلا/بورتوس سویه ۵۴۴ شد (۱۶).

واکنش‌های زیرواحدی، به دلیل قابلیت دستکاری برای به حداکثر رساندن فعالیت‌های مطلوب، واکنش‌های امیدوارکننده‌ای هستند. با این حال، آنها نمی‌توانند عفونت طبیعی بروسلا (تروپیسیم بافتی و سلولی) را تکثیر و تقلید کنند و بنابراین در مقایسه با واکنش‌های زنده ضعیف شده، کارایی محافظتی کمتری دارند (۱۷). فعالیت آنتی‌ژنی ضعیف، ناپایداری و نیمه عمر کوتاه آنتی‌ژن‌های نوترکیب مانع اصلی در طراحی یک واکنش زیرواحدی مؤثر علیه بروسوز شده است (۱۸). در این زمینه، استفاده از ادجوانت‌ها، تعدیل‌کننده‌های ایمنی و سیستم‌های تحویل آنتی‌ژن برای تقویت پاسخ‌های ایمنی علیه این آنتی‌ژن‌ها ضروری است. نوع پاسخ ایمنی القایی به نوع آنتی‌ژن و ادجوانت مورد استفاده در واکنش‌های حاوی پروتئین نوترکیب بروسلا بستگی دارد. ادجوانت فروند (متداول‌ترین ادجوانت)، ادجوانت آلوم و هیدروکسید

## واکسن‌های DNA استراتژی قدرتمندی برای کنترل بروسلوز

پروتئین اتصال پری پلاسمیک (P39) جزء غشای سیتوپلاسمی محیطی بروسلا است و ثابت شده است که یک آنتی‌ژن محافظت کننده است. گروهی از دانشمندان در سال ۲۰۱۰ دریافتند که واکسیناسیون موش‌ها با پروتئین P39 بروسلا و ایجاد عفونت متعاقب آن با باکتری‌های سویه M ۱۶، تعداد این باکتری را در طحال در هفته‌های ۴ و ۸ پس از واکسیناسیون کاهش داده است. (۲۷).

پروتئین بسیار ایمنی‌زای بروسلا لومازین سنتاز (BLS) دارای ویژگی‌های یک آدجوانت خوب است و همین موضوع باعث شده که به‌عنوان یک حامل پروتئین مفید برای واکسن شناخته شود. این پروتئین اصولاً باعث تحریک سیستم ایمنی می‌شود (۲۵). محققان ایرانی، کلونینگ، بیان و خالص‌سازی پروتئین بروسلا لومازین سنتاز را در باکتری *اشریشیاکلی* سویه BL2۱ انجام دادند. روش مورد استفاده در این مطالعه را می‌توان برای تولید یک BLS نسبتاً خالص در صنعت واکسیناسیون به کار برد. (۲۸).

اگرچه واکسن‌های زیرواحدی از مزیت ایمنی برخوردار هستند، اما به تقویت‌کننده‌های متعدد و ترکیبی از چندین آنتی‌ژن، آدجوانت و وکتور برای ایجاد ایمنی مؤثر و محافظت در برابر بروسلوز در گاو نیاز دارند که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست (۲۹). لازم به ذکر است که از کپسولاسیون‌هایی مانند اسکریوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها و همچنین تقویت با سایتوکاین‌های IL-۱۸ می‌توان برای تقویت واکسیناسیون زیرواحدی استفاده کرد. برای تعیین اینکه آیا این واکسن‌های بالقوه، در حیوانات مؤثر هستند یا نه، تحقیقات بیشتری مورد نیاز است (۲۰).

**واکسن‌های DNA علیه بروسلوز:** واکسن‌های نسل سوم عبارتند از تزریق مستقیم پلاسمید (DNA) نو ترکیب خاصی که قدرت القای ژن مورد نظر را درون سلول‌های بدن دارد. بنابراین اساس کار واکسن‌های ژنی بر فرآیند طبیعی عمل ترجمه ژن‌ها به پروتئین در سلول‌های بدن انسان و تمام موجودات زنده است و پروتئین نو ترکیبی که

ایجاد می‌کنند، می‌توانند پاسخ‌های ایمنی قوی‌تر و محافظت بهتری در برابر بروسلا نسبت به هم‌تایان تک ظرفیتی خود ایجاد کنند (۲۳). در عین حال، سایر مطالعات چنین یافته‌هایی را مشاهده نکرده‌اند (۲۴). طیف وسیعی از عوامل مؤثر بر پاسخ‌های ایمنی و محافظت ناشی از واکسیناسیون در مدل موش وجود دارد، از جمله عوامل ذاتی میزبان (جنس، سن و نوع موش)، عوامل واکسن (مانند نوع واکسن، نوع آدجوانت، تعداد و دوز واکسیناسیون)، عوامل تجویز (برنامه، محل، مسیر، زمان واکسیناسیون)، و عوامل چالش (سویه پاتوژن چالش برانگیز و فاصله زمانی بین واکسیناسیون و ارزیابی شدت عفونت باکتریایی طحال) (۲۳). در زیر به چند پروتئین بروسلا که در طراحی واکسن‌های زیرواحدی مورد استفاده قرار گرفته‌اند اشاره می‌شود.

L۱۲ / L۷ (پروتئین ریوزومی) یکی از اولین پروتئین‌های نو ترکیب خالص شده است که علیه بروسلا آزمایش شده است. یافته‌ها نشان می‌دهد که تجویز L۷ / L۱۲ با کمک آدجوانت، منجر به محافظت قابل توجهی در برابر عفونت بروسلا *آبورتوس* می‌شود. (۱۷). در سال ۲۰۰۷، مطالعه گروهی از پژوهشگران نشان داد که آرایه سیتوزولی پروتئین نو ترکیب L۷ / L۱۲ با استفاده از لیپید لیپوزومی *اشریشیاکلی* (اشریوزوم) می‌تواند پاسخ‌های ایمنی قوی را در موش‌های BALB/c ایجاد کند (۲۱).

پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلو دالتون (Omp3۱) یک پروتئین غشایی بروسلا است و نقش مهمی در محافظت بروسلا ملی‌تنسیس دارد. در واقع Omp3۱ یک عامل حدت قابل توجه برای گونه‌های بروسلا است و پتانسیل بالایی به‌عنوان آنتی‌ژن واکسن دارد. (۲۵). در یک بررسی در سال ۲۰۰۵ تزریق پروتئین غشای خارجی نو ترکیب ۳۱ کیلو دالتونی بروسلا ملی‌تنسیس (rOmp3۱) همراه با آدجوانت فروند به موش‌ها، موجب تحریک پاسخ شدید ایمونوگلوبولین IgG و تولید بالای IL-۲ و IFN- $\gamma$  شد (۲۶).

تجویز واکسن DNA، هیچ پاسخ محافظتی در مقابل بروسلا مشاهده نشده است یا پاسخ ایمنی القا شده خفیف است (۳۵). این امر ممکن است به دلیل ناتوانی واکسن در بیان آنتی‌ژن‌های خاصی مانند آنتی‌ژن GroEL-Hsp توسط واکسن‌های پلاسمیدی باشد (۳۶). به دلیل خاموش شدن سریع ژن‌ها و از دست دادن پاسخ محافظتی در طولانی مدت، تجویز این واکسن‌ها نیاز به دوزهای مکرر تقویت‌کننده دارد. در این راستا یافته‌های مطالعه‌ای نشان داده است به دنبال واکسیناسیون مکرر با ۳ PcDNA حاوی ژن BLS، پاسخ محافظتی و تولید IgG2a در موش‌ها القا می‌شود (۳۷). بنابراین، علی‌رغم این که واکسن‌های مبتنی بر DNA بیان آنتی‌ژن‌های محافظ را موجب می‌شوند ولی ممکن است این بیان آنتی‌ژن به دلیل خاموش شدن زود هنگام ژن کدکننده، بالا نباشند. امروزه تلاش‌هایی برای به تأخیر انداختن خاموشی ژن برای مدت طولانی‌تری با استفاده از عواملی مانند ادجوانت انجام می‌شود (۳۰).

#### مزایای واکسن‌های DNA : واکسن‌های DNA

به‌عنوان یک استراتژی ایده‌آل درمانی با توجه به مزایای متعدد بر روی پلتفرم‌های رقابتی پیشنهاد شده است. به‌عنوان مثال، واکسن‌های DNA غیر زنده و بدون تکثیر هستند و در نتیجه بر خلاف واکسن‌های زنده قادر به تبدیل شدن به نوع بیماری‌زا نیستند. علاوه بر این، واکسن‌های DNA بسیار قابل تنظیم هستند و از این‌رو، آنتی‌ژن‌های چندگانه را می‌توان در یک پلاسمید DNA منفرد رمزگذاری کرد. این امر اجازه می‌دهد تا در پاسخ ایمنی میزبان، وسعت بسیار بیشتر و حفاظت بهتر صورت گیرد، زیرا اپی‌توپ‌های مختلف در یک پاتوژن انواع مختلفی از پاسخ‌های ایمنی را به ارمغان می‌آورد. علاوه بر این، بهینه‌سازی وکتورهای واکسن و آنتی‌ژن‌های کد شده بیان و واکنش متقابل سلولی/هومورال را افزایش داده است. در نهایت، واکسن‌های DNA ساده و ارزان هستند و به راحتی می‌توانند در مقادیر زیادی تولید شوند، این واکسن‌ها پایدارتر از واکسن‌های معمولی هستند (در دمای

برای تحریک سیستم ایمنی لازم است به جای آن که در خارج از بدن تولید و به بدن تزریق شود، در داخل بدن تولید و مستقیماً در اختیار سیستم ایمنی قرار می‌گیرد. واکسن‌های بروسلا مبتنی بر DNA پاسخ‌های ایمنی را به دنبال دوزهای متعدد تحریک می‌کنند (۲۵). این واکسن‌ها به دلیل تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی قوی، بیان چندین آنتی‌ژن و شرایط نگهداری ساده، واکسن‌های ایمن و کارآمد علیه بروسلا هستند (۱۱). واکسن‌های مبتنی بر DNA حاوی توالی‌های ژنی از پاتوژن‌ها هستند که برای بقای درون سلولی گونه‌های بروسلا ضروری هستند. ایمنی‌زایی و کارایی ژن‌های حدت مورد استفاده در واکسن‌های DNA در مطالعات حیوانی از جمله سیستم دو جزئی BvrR/BvrS نشان داده شده است (۳۰). مثال‌های پروتئین‌های کدشده توسط این واکسن‌ها شامل سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) (۳۱)، L12/LY ریبوزومی، بروسلا لومازین سنتاز (BLS) (۳۲)، (Omp31 و Omp25) (۳۰) ژن پروتئین سطحی آنتی‌ژنی (BCSP31) (۳۳)، (SP41) (۳۴) و پروتئین ریبوزومی L9 (rL) می‌باشند (۲۷). با توجه به مطالعات انجام شده، واکسن‌های DNA ممکن است برخی معایب سایر انواع واکسن‌های بروسلا را نداشته باشند (۳۵). در اکثر مطالعات، حیواناتی که با انواع مختلف واکسن‌های DNA واکسینه شده‌اند، محافظت کامل در برابر سویه‌های بدخیم (مانند بروسلا ابورتوس S19، بروسلا ابورتوس ۲۳۰۸، بروسلا ملی‌تنسیس M16 و بروسلا ملی‌تنسیس Rev1) نشان داده‌اند (۳۱). ترکیبی از چندین آنتی‌ژن مناسب، مانند L12/LY، BCSP31، SOD، P39 و Omp16، می‌تواند برای ساخت واکسن DNA آنتی‌ژنی دو ظرفیتی یا چند ظرفیتی استفاده شود. این واکسن‌ها به دلیل دارا بودن اجزای آنتی‌ژنی بیشتر، موجب القای طیف وسیعی از پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی شده‌اند و شبیه‌ترین وضعیت به عفونت بروسلا را ایجاد کرده‌اند (۲۵).

با این حال برخی مطالعات نشان داده‌اند که پس از

## واکسن‌های DNA استراتژی قدرتمندی برای کنترل بروسلوز

موش‌های BALB/c با pCI OMP<sub>31</sub> محافظت خوبی در برابر عفونت‌های بروسلا ایجاد کرد. سلول‌های طحال موش‌های واکسینه شده با OMP<sub>31</sub> فعالیت سیتوتوکسیک خاص لنفوسیت T ایجاد کردند که باعث شد ماکروفاژهای آلوده به بروسلا در شرایط آزمایشگاهی لیز شوند (۳۹).

در سال ۲۰۰۲، زیست‌شناسان در مطالعه‌ای دریافتند که تزریق پلاسمید حامل ژن BLS (pcDNA-BLS) به موش‌های BALB/c می‌تواند پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را در آنها ایجاد کند. همچنین سلول‌های طحال حیوانات واکسینه شده اینترلوکین ۲ و گاما اینترفرون تولید کردند. این یافته‌ها نشان دادند که pcDNA-BLS یک ایمونوژن خوب برای تولید پاسخ‌های هومورال و سلولی است (۳۷).

در یک مطالعه، کلون‌سازی مولکولی و تجزیه و تحلیل بیان ژن OMP<sub>25</sub> در طراحی یک واکسن زیرواحد علیه بروسلا با استفاده از وکتور pET<sub>32</sub>(a) مورد آزمایش قرار گرفت. دانشمندان این ژن را به‌عنوان یک کاندید برای تحریک سیستم ایمنی با واسطه سلولی و هومورال در مطالعات آینده مفید یافتند (۴۱).

در سال ۲۰۱۷ محققان ایمنی‌زایی واکسن DNA چند اپی‌توپی کدکننده سوپراکسید دیسموتاز مس- روی را علیه بروسلا / بورتوس در موش مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان‌دهنده یک پاسخ ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی در موش BALB/c به واسطه پاسخ CD<sub>4</sub>+ T، تولید ایمونوگلوبولین G<sub>2a</sub> و IFN- $\gamma$  بود (۳۲).

در یک مطالعه، محققان قابلیت واکسن DNA کدکننده پروتئین Omp<sub>31</sub> ۱۶ را برای تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال در موش بررسی کردند. این واکسن با استفاده از ناقل بیان یوکاریوتی ۳۱ pTargeTomp طراحی و ساخته شد. پاسخ آنتی‌بادی مثبت و طولانی مدتی ایجاد کرد و علاوه بر پاسخ تکثیر سلول T، میزان IFN- $\gamma$  را نیز افزایش داد (۴۲).

اتاق به راحتی قابل نگهداری هستند) و می‌توانند به راحتی ذخیره و حمل شوند (۲۵).

## برخی واکسن‌های DNA طراحی شده علیه

**بروسلوز:** در سال ۲۰۰۱، گروهی از محققان، ناقل بیانی یوکاریوتی به نام‌های pCIBFR و pCIP<sub>39</sub> ساختند که آنتی‌ژن‌های BFR یا P39 را کد می‌کردند. آنها دریافتند که هر دو ناقل یک پاسخ گاما اینترفرون قابل توجه ایجاد کرده و باعث تکثیر بیشتر سلول T در موش‌ها شدند (۳۸).

محققان ایرانی در پژوهشی، واکسن DNA کدکننده پروتئین OMP<sub>31</sub> بروسلا ملی‌تنسیس (pcDNA<sub>3/1</sub>-OMP<sub>31</sub>) را طراحی کردند. آنها دریافتند که تزریق داخل عضلانی این واکسن DNA به موش‌های BALB/c به‌طور قابل توجهی پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را بر می‌انگیزد. علاوه بر این، واکسن DNA، پاسخ تکثیری به سلول T و همچنین تولید اینترفرون گاما را القا کرد (۳۹).

در سال ۲۰۱۵، گروهی از محققین ایرانی از ژن‌های stx<sub>2</sub> و P<sub>39</sub> برای ساخت واکسن DNA استفاده کردند. آنها موفق شدند وکتور نوترکیب pcDNA<sub>3/1</sub>+stx<sub>2</sub>-P<sub>39</sub> را به‌طور مؤثری ایجاد کنند و پیشنهاد کردند که در تحقیقات آینده ممکن است ساختار P<sub>39</sub>-pcDNA<sub>3/1</sub>+stx<sub>2</sub> ایجاد شده بتواند به‌عنوان کاندیدای واکسن DNA در برابر سویه‌های بدخیم بروسلا ملی‌تنسیس و اشریشیاکلای که سموم شیگا را در مدل‌های حیوانی تولید می‌کنند، بکار گرفته شود (۳۹).

در سال ۲۰۱۵، دانشمندان ژن OMP<sub>31</sub> و ژن bls را با هم در یک سلول کلون کردند و پروتئین نوترکیب را بیان کردند. یافته‌ها نشان داد که OMP<sub>31</sub> یک کاندید اصلی برای واکسیناسیون است و مولکول Bls یک حامل مناسب برای انتقال پروتئین‌های آنتی‌ژنی در بدن می‌باشد (۴۰).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ برای ارزیابی ایمنی‌زایی و اثر حفاظتی OMP<sub>31</sub> بروسلا ملی‌تنسیس کلون شده در پلاسمید pCI (با نام pCI OMP<sub>31</sub>) انجام شد. ایمن‌سازی

در سال ۲۰۰۷، محققان پنج ژن کاندید را در ژنوم بروسلا ملی‌تنسیس ۱۶M انتخاب کردند و در مدل موشی (BALB/c) عفونت تب مالت، اثربخشی و خواص محافظتی هر واکسن را مورد ارزیابی قرار دادند. محققان توانستند اثر محافظتی قابل توجهی را با استفاده از آنتی‌ژن Omp25 مشاهده نمایند (۲۳).

پژوهشگران برای نخستین بار واکسن نو ترکیب BCG یا (rBCG) بیان کننده پروتئین P39-LV/12 بروسلا ملی‌تنسیس را علیه عفونت بروسلا ساختند و پس از بررسی‌ها دریافتند که واکسن rBCG در داخل بدن ایمنی هومورال و ایمنی سلولی با واسطه سلول T را تقویت می‌کند. علاوه بر این، سطح حفاظت القا شده توسط واکسن rBCG به‌طور قابل توجهی بالاتر از سطح حفاظتی القا شده توسط BCG بود. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که واکسن rBCG می‌تواند به‌عنوان یک واکسن مناسب و یک استراتژی جدید در برابر بروسلاز انسانی عمل کند (۲۳).

در سال ۲۰۲۰ میلادی گروهی از محققان آنتی‌ژن L12/LV بروسلا /بورتوس را به‌صورت سازه پلاسمید pJHL 65 : L12/LV به سویه ضعیف شده سالمونلا تیفی‌موریوم، منتقل کردند و سپس این واکسن DNA تولید شده را به موش تزریق کردند. آنها دریافتند که پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی با برانگیختن موفقیت‌آمیز پاسخ‌های ایمنی Th1 و Th2 ایجاد شد (۴۴).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ میلادی پژوهشگران موش‌های BALB/c را با pcDNA-omp31 و pVAX-31 Omp31 ایمن‌سازی کردند و برای یادآور از Omp31 نو ترکیب استفاده کردند. در موش‌های تلقیح شده، هر دو نامزد واکسن DNA، پاسخ‌های قوی از نوع Th1 با سطوح بیشتری از سایتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها را القا کردند (۴۵).

محققان در سال ۲۰۲۱، ژن Omp25 را تکثیر و در وکتور بیانی Pet102/D-TOPO کلون کردند. آنها دریافتند

گروهی از پژوهشگران واکسن DNA مبتنی بر ژن کدکننده پروتئین سطحی آنتی‌ژنی BCSP31 را با استفاده از وکتور pTZ5YR/T طراحی و بر روی خرگوش آزمایش کردند. نتایج نشان داد که پاسخ‌های اختصاصی IgG در گروه‌های واکسینه شده در مقایسه با گروه شاهد بسته به دوز تزریقی واکسن به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. (۳۴).

گروهی از پژوهشگران چینی در سال ۲۰۱۹ میلادی به‌منظور ارزیابی ایمنی‌زایی و اثر حفاظتی واکسن DNA کدکننده بروسلا BvrR، پلاسمید نو ترکیب pCDNA-BvrR را با قرار دادن قطعه ژن BvrR در یک وکتور بیانی ساختند و پس از تزریق این واکسن به موش‌ها و بررسی کلیرانس باکتریایی سیستمیک و سطح IgG دریافتند که واکسن pCDNA-BvrR سطح قابل توجهی از محافظت را در موش‌های BALB/c ایجاد کرده است. این نتایج نشان داد که BvrR ممکن است کاندید خوبی برای واکسن DNA علیه بروسلاز باشد (۳۱).

محققان واکسن DNA فیوژن دو ظرفیتی pcDNA3.1-L7/L12-Omp16 را در سال ۲۰۰۶ برای آزمایش ایمنی‌زایی و اثر محافظتی پروتئین‌های بروسلا /بورتوس L7/L12 (پروتئین ریپوزومی) و Omp16 ابداع و به‌صورت عضلانی به موش BALB/c تزریق کردند. یافته‌ها نشان داد هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی به شدت القا شدند. در یک سری از آنتی‌بادی‌های تولید شده، ایمونوگلوبولین G2a (IgG2a) بر ایمونوگلوبولین G1 غالب بود (۲۵).

در سال ۱۹۹۴، محققان سه پپتید از ساختار اصلی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز روی-مس (Cu-Zn SOD) بروسلا /بورتوس را تولید و از آن برای ایجاد واکسن بروسلاز استفاده کردند. تحقیقات آنها نشان داد که تنها پپتید سوم (GGAPGEKDKGKIVPAG) دارای فعالیت بیولوژیکی پیشگیرانه است که معلوم شد می‌تواند باعث جلوگیری از بزرگی طحال و کاهش شدت عفونت طحال شود (۴۳).

## واکسن‌های DNA استراتژی قدرتمندی برای کنترل بروسلوز

واکسن‌های DNA نیز معایب واکسن‌های حاوی زیرواحدهای پروتئینی را دارند اما با رمزگذاری آنتی‌ژن‌های چندگانه در یک پلاسمید منفرد می‌توان موجب شد پاسخ ایمنی میزبان با وسعت بسیار بیشتر و حفاظت بهتر صورت گیرد، زیرا اپی‌توپ‌های مختلف در یک پاتوژن انواع مختلفی از پاسخ‌های ایمنی را به تحریک می‌کنند. از جمله ژن‌های بروسلائی مورد استفاده در این واکسن‌ها می‌توان به ژن‌های کدکننده پروتئین‌های *Omp31*، *BFR*، *P39*، *BLS*، *Omp25*، سوپراکسید دیسموتاز مس- روی، *Momp31*، *BCSP31*، *BvrR* و *P39-LV/12* اشاره کرد که در تحقیقات مختلف طراحی DNA واکسن علیه بروسلا بکار رفته‌اند. با در نظر گرفتن مزیت‌ها و معایب انواع واکسن‌های بروسلوز، واکسن‌های DNA می‌توانند استراتژی خوبی برای درمان بروسلوز باشند. با این حال، برای افزودن نامزدهای بیشتری برای تولید این واکسن‌ها به عنوان واکسن‌های برتر، ایمن و مؤثر در برابر این بیماری، باید از تحقیقات در حیوانات بزرگ در زمینه واکسن DNA بروسلا حمایت شود.

که دوزهای ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و کمتر این واکسن به‌طور قابل توجهی التهاب را از طریق افزایش سطوح اکسید نیتریک (NO) افزایش می‌دهد و مطالعات روی بقاء سلولی *Th1* و انتشار سیتوکین مربوطه، امید ساخت واکسن بر مبنای پروتئین *Omp25* را بسیار افزایش داده است (۴۶).

### نتیجه‌گیری

وجود اشکالاتی مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تداخل با آزمایش‌های تشخیصی سرولوژیکی و احتمال برگشت به حالت بیماری‌زا در واکسن‌های بروسلوز زنده ضعیف شده، موجب شده است دانشمندان در صدد طراحی واکسن‌هایی با تکنولوژی‌های نوین‌تر باشند. واکسن‌های حاوی زیرواحدهای پروتئینی و DNA واکسن‌ها در این زمینه مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. با این وجود، فعالیت آنتی‌ژنی ضعیف، ناپایداری و نیمه عمر کوتاه واکسن‌های حاوی زیرواحدهای پروتئینی که از طریق تکنولوژی DNA نو ترکیب به دست آمده‌اند، مانع اصلی در استفاده از آنها به‌عنوان یک واکسن مؤثر علیه بروسلوز است. استفاده از ادجوانت‌ها یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل است.

## References

- 1- Madkour MM. Brucellosis. Elsevier; 2014.
- 2- Vishnu US, Sankarasubramanian J, Gunasekaran P, Rajendhran J. Identification of potential antigens from non-classically secreted proteins and designing novel multipeptide vaccine candidate against *Brucella melitensis* through reverse vaccinology and immunoinformatics approach. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 55: 151-8.
- 3- Zhu L, Feng Y, Zhang G, Jiang H, Zhang Z, Wang N, et al. *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella spp.* infections. *Vaccine*. 2016; 34(3): 395-400.
- 4- Shirzadi MR, Mohammadi P, Moradi G, Goodarzi E, Khazaei S, Moayed L, et al. The Incidence and Geographical Distribution of Brucellosis in Iran Using Geographic Information System and Prediction of its Incidence in 2021. *Journal of preventive medicine and hygiene*. 2021;62(3): E635.
- 5- Djangwani J, Ooko Abong' G, Gicuku Njue L, Kaindi DW. Brucellosis: Prevalence with reference to East African community countries—A rapid review. *Veterinary Medicine and Science*. 2021;7(3): 851-67.
- 6- Dadar M, Tiwari R, Sharun K, Dhama K. Importance of brucellosis control programs of live-stock on the improvement of one health. *Veterinary Quarterly*. 2021; 41(1): 137-51.
- 7- Moreno E, Barquero-Calvo E. The role of neutrophils in brucellosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2020; 84(4): e00048-20.
- 8- Li ZQ, Shi JX, Fu WD, Zhang Y, Zhang J, Wang Z, et al. A *Brucella melitensis* M5-90 wboA deletion strain is attenuated and enhances vaccine efficacy. *Molecular Immunology*. 2015;66(2): 276-

83.

9- Pei J, Turse JE, Ficht TA. Evidence of *Brucella abortus* OPS dictating uptake and restricting NF- $\kappa$ B activation in murine macrophages. *Microbes and infection*. 2018; 10(6): 582-90.

10- Barrionuevo P, Cassataro J, Delpino MV, Zwerdling A, Pasquevich KA, Samartino CG, *et al.* *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infection and immunity*. 2018; 76(1): 250-62.

11- Gheibi A, Khanahmad H, Kashfi K, Sarmadi M, Khorramizadeh MR. Development of new generation of vaccines for *Brucella abortus*. *Heliyon*. 2018; 4(12): e01079.

12- Mansoori N, Pourmand MR. Vaccines and vaccine candidates against brucellosis. *Infection Epidemiology and Microbiology*. 2016; 2(4): 32-6.

13- Mohammed FA, Salman AM. Risk Assessment of *Brucellosis* in Dairy Cows in Bahri North Locality, Sudan.

14- Truong QL, Cho Y, Park S, Park BK, Hahn TW. *Brucella abortus* mutants lacking ATP-binding cassette transporter proteins are highly attenuated in virulence and confer protective immunity against virulent *B. abortus* challenge in BALB/c mice. *Microbial pathogenesis*. 2016; 95: 175-85.

15- Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology*. 2019; 30(1): 23-32.

16- Zhao Z, Li M, Luo D, Xing L, Wu S, Duan Y, *et al.* Protection of mice from *Brucella* infection by immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing A L7/L12 and BLS fusion antigen of *Brucella*. *Vaccine*. 2009; 27(38): 5214-9.

17- Buggybayeva D, Kydyrbayev Z, Zinina N, Assanzhanova N, Yespembetov B, Kozhamkulov Y, *et al.* A new candidate vaccine for human brucellosis based on influenza viral vectors: development of immunization schedule in guinea pig model. 2021; 25(10): 112-55.

18- Tabynov K. Influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine: a novel vaccine candidate for veterinary practice. *Expert Review of Vaccines*. 2016; 15(10): 1237-9.

19- Li ZQ, Zhang JL, Xi L, Yang GL, Wang SL, Zhang XG, *et al.* Deletion of the transcription-

al regulator GntR down regulated the expression of genes related to virulence and conferred protection against wild-type *Brucella* challenge in BALB/c mice. *Molecular Immunology*. 2017; 92: 99-105.

20- Hop HT, Reyes AW, Simborio HL, Arayan LT, Min WG, Lee HJ, *et al.* Immunization of mice with recombinant *Brucella abortus* organic hydroperoxide resistance (Ohr) protein protects against a virulent *Brucella abortus* 544 Infection. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016; 26(1): 190-6.

21- Hewawaduge C, Senevirathne A, Lee JH. Enhancement of host infectivity, immunity, and protective efficacy by addition of sodium bicarbonate antacid to oral vaccine formulation of live attenuated *Salmonella* secreting *Brucella* antigens. *Microbial pathogenesis*. 2020; 138: 103-857.

22- Ghasemi A, Jeddi-Tehrani M, Mautner J, Salari MH, Zarnani AH. Immunization of mice with a novel recombinant molecular chaperon confers protection against *Brucella melitensis* infection. *Vaccine*. 2014; 32(49): 6659-66.

23- Zhou Y, Zheng Y, Chen Y, Li Y, Sun X, Huo Y, *et al.* Evaluation of a recombinant *bacillus calmette-guérin* vaccine expressing P39-L7/L12 of *Brucella melitensis*: An immunization strategy against brucellosis in BALB/c mice. *Materials Express*. 2020; 10(3): 350-62.

24- Tadepalli G, Konduru B, Murali HS, Batra HV. Intraperitoneal administration of a novel chimeric immunogen (rOP) elicits IFN- $\gamma$  and IL-12p70 protective immune response in BALB/c mice against virulent *Brucella*. *Immunology Letters*. 2017; 192: 79-87.

25- Zhang F, Li Z, Jia B, Zhu Y, Pang P, Zhang C, *et al.* The immunogenicity of OMP31 peptides and its protection against *Brucella melitensis* infection in mice. *Scientific Reports*. 2019;9(1): 1-7.

26- Abdollahi A, Mansouri S, Amani J, Fasihi-Ramandi M, Ranjbar R, Ghasemi A, *et al.* A Recombinant Chimera Protein as a Novel *Brucella* Subunit Vaccine: Protective Efficacy and Induced Immune Response in BALB/c Mice. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2018;11(1).

27- Al-Mariri A, Abbady AQ. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy in mice of a DNA vaccine encoding SP41 from *Brucella melitensis*. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013; 7(04): 329-37.

28- Majidi B, Najafi MF, Saeedian S. Cloning, expression and purification of *Brucella*

lumazine synthase protein in *E. coli* BL21. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2019; 9(S2).

**29- Zimmermann P, Curtis N.** Factors that influence the immune response to vaccination. *Clinical microbiology reviews*. 2019; 32(2): e00084-18.

**30- Hu XD, Yu DH, Chen ST, Li SX, Cai H.** A combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. *DNA and Cell Biology*. 2009; 28(4): 191-9.

**31- Chen B, Liu B, Zhao Z, Wang G.** Evaluation of a DNA vaccine encoding *Brucella* BvrR in BALB/c mice. *Molecular Medicine Reports*. 2019; 19(2): 1302-8.

**32- Escalona E, Sáez D, Oñate A.** Immunogenicity of a multi-epitope dna vaccine encoding epitopes from Cu-Zn superoxide dismutase and open reading Frames of *Brucella abortus* in mice. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 125.

**33- Shojaei M, Tahmoorespur M, Soltani M, Sekhavati MH.** Immunogenicity evaluation of plasmids encoding *Brucella melitensis* Omp25 and Omp31 antigens in BALB/c mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2018; 21(9): 957.

**34- Imtiaz W, Khan A, Gul ST, Saqib M, Saleemi MK, Shahzad A, et al.** Evaluation of DNA vaccine encoding BCSP31 surface protein of *Brucella abortus* for protective immunity. *Microbial pathogenesis*. 2018; 125: 514-20.

**35- Jain S, Afley P, Dohre SK, Saxena N, Kumar S.** Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*. 2014; 32(35): 4537-42.

**36- Da Sol Choi SI, Shin WG, Park CH.** Risk for colorectal neoplasia in patients with *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2020; 11(2): 1401-553.

**37- Kwon AJ, Moon JY, Kim WK, Kim S, Hur J.** Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (GI24) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2016: 16-0036.

**38- Du ZQ, Wang JY.** A novel lumazine synthase molecule from *Brucella* significantly promotes the immune-stimulation effects of antigenic protein. *Genet Mol Res*. 2015; 14(4): 13084-95.

**39- Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Kargar M, Sharifi A.** Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin 2 (stx2) genes. *Genetika*. 2015; 47(2): 499-507.

**40- Ke Y, Wang Y, Li W, Chen Z.** Type IV secretion system of *Brucella spp.* and its effectors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2015; 5: 72.

**41- Yousefi S, Tahmoorespur M, Sekhavati MH.** Cloning, expression and molecular analysis of Iranian *Brucella melitensis* Omp25 gene for designing a subunit vaccine. *Research in pharmaceutical sciences*. 2016; 11(5): 412.

**42- Gupta VK, Rout PK, Vihan VS.** Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Research in veterinary science*. 2017; 82(3): 305-13.

**43- Deng Y, Liu X, Duan K, Peng Q.** Research progress on brucellosis. *Current Medicinal Chemistry*. 2019; 26(30): 5598-608.

**44- Senevirathne A, Hewawaduge C, Lee JH.** Live vaccine consisting of attenuated *Salmonella* secreting and delivering *Brucella* ribosomal protein L7/L12 induces humoral and cellular immune responses and protects mice against virulent *Brucella abortus* 544 challenge. *Veterinary research*. 2020; 51(1): 1-0.

**45- Harzandi N, Aghababa H, Khoramabadi N, Tabaraie T.** Efficient Immunization of BALB/c Mice against Pathogenic *Brucella melitensis* and *B. ovis*: Comparing Cell-Mediated and Protective Immune Responses Elicited by pCDNA3. 1 and pVAX1 DNA Vaccines Coding for Omp31 of *Brucella melitensis*. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2021; 19(1): e2618.

**46- Atabey T, Acar T, Derman S, Ordu E, Erdemir A, Taşlı PN, et al.** In Vitro Evaluation of Immunogenicity of Recombinant OMP25 Protein Obtained from Endemic *Brucella abortus* Biovar 3 as Vaccine Candidate Molecule Against Animal Brucellosis. *Protein and Peptide Letters*. 2021;28(10): 1138-47.

## DNA vaccines: a powerful strategy for brucellosis control

Saeid Abedi<sup>1\*</sup>, Ghazal Pourmohammad Hosseini<sup>2</sup>, Golnoosh Rezaeizadeh<sup>3</sup>

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biology Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran.

2- Masters student, Department of Microbiology, Faculty of Biology Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran.

3- Masters, Department of Microbiology, Faculty of Biology Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran

Receive: January 11, 2023; Revise: February 26, 2023; Accept: May 6, 2023

### Summary

---

Brucellosis is a common disease between humans and animals with global distribution and an increasing trend. The control of brucellosis in humans depends on the control of the animal disease. Although there is no approved vaccine for brucellosis in humans, many efforts have been made to develop vaccines with high efficiency and low side effects for animals. Live attenuated vaccines are cheaper and more effective than other vaccines, but they can increase antibiotic resistance, interfere with serological diagnostic tests, and increase virulence in animals. Vaccination of animals with commercially available vaccines may cause disease and, in some cases, have low efficacy. Vaccines containing recombinant protein or their coding DNA can be suitable alternatives to the conventional vaccines, because they can reduce unwanted side effects. Choosing the suitable antigen that stimulates the immune system is very important in the preparation of these vaccines. In the present study, by observing the new recombinant vaccines that are made based on recombinant proteins and DNA, it has been tried to clarify their strengths and weaknesses and the new perspective of vaccination against brucellosis. There is currently no approved vaccine for brucellosis in humans. In addition, the control of brucellosis in humans depends on the control of the animal disease. This review article searches Google scholar, PubMed, and SID databases for new research on recombinant protein and DNA vaccines against brucellosis until 2021. Considering the advantages and disadvantages of common and new brucellosis vaccines, recombinant and DNA vaccines, after conducting the research stages in large animals, can be a suitable approach to prevent the progress of brucellosis.

**Key words:** *Brucellosis, vaccine, recombinant protein, DNA vaccines*

## اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه بر باکتری‌های اصلی ورم پستان گاو

رضا راه‌چمنی<sup>\*</sup>، سمیرا نوری<sup>۱</sup>، جواد بیات کوهسار<sup>۱</sup>

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.  
۲- دانش‌آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ بهمن ۱۴۰۱، بازنگری: ۰۶ اردیبهشت ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۶ خرداد ۱۴۰۲

### چکیده

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عوارض جانبی از مشکلات درمان بیماری‌های باکتریایی توسط آنتی‌بیوتیک‌ها است و با توجه به داشتن اثر ضد باکتریایی، اسانس گیاهان دارویی جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس* و *استرپتوکوک آگلالتیه* هر کدام باعث بیماری‌هایی در انسان و دام می‌شوند ولی هر سه باکتری از عوامل اصلی بیماری ورم پستان گاو نیز هستند. لذا این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های نعنا و پونه علیه این باکتری‌ها و مقایسه آنها با آنتی‌بیوتیک‌های لینکوسایکلین، جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات انجام شد. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها به روش GC/MS انجام شد. حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس‌ها به روش رقیق‌سازی لوله‌ای و حساسیت باکتری به اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از دیسک دیفیوژن تعیین گردید و تأثیر اسانس‌ها بر منحنی رشد باکتری‌ها در ساعت‌های ۰، ۶، ۱۰ و ۲۴ مطالعه شد. مهم‌ترین ترکیبات نعنا کارون (۶۳/۰۲ درصد)، لیمونن (۲۴/۴۸ درصد) و پونه پولگون (۴۸/۱۶ درصد)، اکالیپتول (۱۴/۵۷ درصد) بودند. از نظر MIC و MBC اثر نعنا بر هر سه باکتری مشابه یا قوی‌تر از لینکوسایکلین و اثر پونه بر *استرپتوکوک آگلالتیه* قوی‌تر از لینکوسایکلین بود ولی در دیسک دیفیوژن اثر ضد باکتریایی نعنا و پونه بر *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت اما علیه دو باکتری دیگر اثر ضد باکتریایی کمتری از جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات داشتند. در منحنی رشد، غلظت Sub-MIC اسانس‌ها در ساعت ۲۴ باعث کاهش معنی‌دار تعداد *اشریشیاکلی* شد. به‌طور کلی هر دو اسانس اثر ضد باکتریایی قابل قبولی داشتند ولی اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا قوی‌تر از پونه بود.

**واژگان کلیدی:** بیماری‌های باکتریایی، گیاهان دارویی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوک آگالاکتیه و اشریشیاکلی بیماری‌های مختلفی ایجاد می‌کنند ولی هر سه باکتری از مهم‌ترین عوامل ورم پستان گاو نیز هستند (۷). ورم پستان یک بیماری جهانی است که به‌وسیله عوامل مختلفی ایجاد شده و بر کیفیت و کمیت شیر تأثیر می‌گذارد و عامل بیشترین خسارت‌های اقتصادی در صنعت گاو شیری در بسیاری از کشورهاست (۱). مهم‌ترین درمان ورم پستان در دامداری‌های متداول تزریق داخل پستانی آنتی‌بیوتیک‌هاست که عوارضی مانند ایجاد سویه‌های مقاوم و باقی ماندن دارو در شیر دارد (۲). با توجه به مسائل یاد شده و ممنوع بودن استفاده از آنتی‌بیوتیک در گاوداری‌های ارگانیک نیاز به سایر روش‌های درمانی احساس می‌شود.

اسانس‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهی و دارای اثرات ضد باکتریایی هستند و بعد از استفاده طولانی‌مدت، سویه‌های مقاوم در باکتری‌ها و عوارض جانبی در انسان مشاهده نشده است بنابراین به‌عنوان یک سلاح قوی در مبارزه با بیماری‌های باکتریایی مطرح هستند (۳).

گونه‌های نعنایان از جمله نعنا با نام علمی *Mentha piperita* (peppermint) و پونه با نام علمی *Mentha pulegium* (pennyroyal) معمول‌ترین گیاهان دارویی هستند (۴) در مطالعات مختلف اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مثل استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس، سالمونلا انتریدیس، اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی‌موریوم نشان داده شده و در مورد پونه این اثرات به نئومنول، پولگون و منتون نسبت داده شده است (۹-۵).

با توجه به این که اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه بر باکتری استرپتوکوک آگالاکتیه هنوز مطالعه نشده است با توجه به اهمیت بیماری ورم پستان گاو باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی نیز انتخاب شدند تا ضمن بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها علیه این سه باکتری (مهم‌ترین عوامل ورم پستان) و مقایسه با

آنتی‌بیوتیک‌های معمول بتوان از نتایج این مطالعه در پژوهش‌های بالینی درمان آن و همچنین سایر بیماری‌ها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

**شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها:**  
اسانس‌های نعنا (*Mentha piperita*) و پونه (*Mentha pulegium*) از شرکت درین گلاب کاشان تهیه شدند. جهت حصول اطمینان از عدم آلودگی اسانس‌ها به میکرو ارگانسیم‌های قارچی و باکتریایی، اسانس‌ها را از فیلترهای  $0.2 \mu\text{m}$  عبور داده و با انتقال به محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Tryptic soy agar) (Biolife, Milano, Italy) هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید. برای آنالیز اسانس‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی کوپل با طیف‌سنج (GC/MS) (Model 5977A, Agilent Technologies, USA) استفاده شد. مشخصات ستون آن شامل: 60DB-1، mmX0.25 mm fused silica capillary column ضخامت فیلمی  $0.25 \mu\text{m}$  و برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با میزان چهار درجه در دقیقه و دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد انژکتور و گاز حامل هلیوم می‌باشد. پس از تزریق اسانس به GC/MS و مشاهده طیف کروماتوگرام با استفاده از زمان بازداری (RT)، اندیس کوانس (KI)، طیف جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد موجود در کتابخانه اطلاعات کامپیوتری، شناسایی ترکیبات اسانس و تعیین درصد کمی در آنها انجام گردید.

**باکتری‌ها:** کشت لیوفلیزه سویه‌های استاندارد باکتری‌های استرپتوکوک آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae* PTCC 1768)، استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC 1113) و اشریشیاکلی (*Escherichia coli* PTCC 1399) از مرکز تحقیقات و پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. این باکتری‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت تریپتیک سوی براث (Tryptic soy Broth) (TSA) کشت داده شدند، سپس کشت مجدد از کشت

## اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه بر باکتری‌های اصلی ورم پستان گاو

**غلظت کشندگی (MBC):** این غلظت‌ها به روش ماکرودیالوژن و با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان امولسیفایر انجام شد. بعد از تهیه محیط کشت تریپتیک سوی براث حاوی ۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید غلظت‌های دو برابری اسانس‌های نعنا و پونه در ۱۰ لوله شامل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۱۹ درصد در محیط کشت تهیه شد. سپس به هر لوله ۱۰۰ μl از رقت ۱:۲۵۰ سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج ۶۰۰ nm و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) تلقیح شد و بعد از آن همه لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. برای آزمایش رقت‌های مختلف هر اسانس ۱۰ لوله و برای کنترل منفی (حاوی اسانس و محیط کشت)، کنترل مثبت (حاوی باکتری و محیط کشت) و کنترل محیط کشت خالی هر کدام یک لوله قرار داده شد. برای هر کدام از اسانس‌ها آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به‌عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت در محیط TSA کشت داده شد. پس از گذشت مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آخرین غلظتی از اسانس‌ها که قادر به مرگ ۹۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (۱). جهت مقایسه اثر اسانس‌ها با یک آنتی‌بیوتیک تجاری معمول از آنتی‌بیوتیک لینکوسایکتینومایسین (لینکومایسین ۵٪ + اسپکتینومایسین ۱۰ درصد) (لینکوجکت، رویان دارو، سمنان، ایران) به‌عنوان یک کنترل مثبت استفاده شد.

### اثر ضد باکتری اسانس‌ها به روش انتشار از

**دیسک:** طبق روش انتشار در آگار به‌صورت دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به شیوه کربی بائر (Kirby Bauer) ابتدا سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج ۶۰۰nm و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) در سطح محیط تریپتیک سوی آگار کشت داده

اول داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۱۰۰ μl در میکروتیوب‌های استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس از این کشت‌ها برای کشت استوک با دو بار کشت در تریپتیک سوی براث و سپس کشت خطی در محیط کشت شیب‌دار تریپتیک سوی آگار استفاده شد. این کشت‌ها در دمای ۴ درجه نگهداری شده و هر ماه یک‌بار تجدید کشت شد (۱۰).

### تهیه میزان تلقیح باکتری: ابتدا از کشت استوک به

داخل محیط تریپتیک سوی براث برده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کشت مجدد داده شده از کشت اول نیز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. مقادیر مختلفی از کشت دوم به لوله کووت حاوی ۳ ml محیط کشت براث استریل، تا مادامی انتقال داده شد که میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جرمی (Spectrophotometry) (Libra S12, Biochrom Ltd., Cambridge, London) در طول موج ۶۰۰ nm، به ۰/۱ برسد. بعد از تهیه رقت‌های متوالی با استفاده از آب پپتونه ۰/۰۱ درصد و انتقال ۱۰۰ μl از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط کشت آگاردار و گرمخانه‌گذاری این پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد باکتری‌ها شمارش شدند. کل آزمایش ۲ مرتبه تکرار شد و میانگین تعداد باکتری در کووت با جذب نوری ۰/۱ برای باکتری *اشریشیاکلی* معادل  $10^{11}$  cfu/ml  $\times$  ۲/۴، *استافیلوکوک اورئوس* معادل  $10^{10}$  cfu/ml  $\times$  ۳/۴ و برای *استرپتوکوک آگالاکتیه* معادل  $10^{11}$  cfu/ml  $\times$  ۱/۶۴ محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه تهیه نمود (۸).

### تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل

نظر اضافه شد به طوری که مقدار اسانس و محیط کشت برای هر ساعت ۱ ml بود. سپس ۱۰۰ μl از سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج ۶۰۰ nm و جذب ۰/۱) به هر لوله اضافه شد. بعد از انکوباسیون لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ساعت‌های صفر، ۶، ۱۰ و ۲۴ با انتقال یک میلی‌لیتر از ترکیب فوق به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل رقت‌های متوالی تا  $10^{-9}$  تهیه شد. با شمارش تعداد کلونی، تعداد باکتری‌ها محاسبه و این آزمایشات ۲ بار تکرار شد. نمودار رشد بر اساس  $\log_{10}^{cfu/ml}$  در واحد زمان (ساعت) رسم شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 for windows و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA با سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد اختلاف میانگین‌ها نیز توسط آزمون توکی مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

**ترکیبات شیمیایی اسانس نعنا:** نتایج آنالیز اسانس نعنا در این مطالعه (جدول ۱) نشان می‌دهد از بین ترکیبات شناسایی شده به ترتیب کارون (۶۳/۰۲ درصد)، لیمونین (۲۴/۴۸ درصد) و کاریوفیلین (۳/۱۹ درصد) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس را تشکیل می‌دهند.

شد. مقدار ۲۰ μl از محلول رقیق نشده اسانس و رقیق شده با نسبت ۱:۱ با DMSO روی دیسک‌های کاغذی استریل بلانک ساخت شرکت پادتن طب (تهران- ایران) ریخته و بعد از ۲۰ تا ۴۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه دیسک‌ها مقداری خشک شدند. سپس دیسک‌ها با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت، روی محیط کشت قرار داده شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین/ کلارولونات با غلظت ۲۰/۱۰ μg/Disk، شماره ۲۰۱۰۳ و جنتامایسین با غلظت ۱۰ μg/Disk، شماره ۲۰۳۰۹ (شرکت پادتن طب، تهران، ایران) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بعد از انکوباسیون محیط کشت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف صفحه‌ها اندازه‌گیری شد (۱۱) و نتایج با جداول CLSI مقایسه گردید (۱۲). جهت حصول اطمینان، این آزمایش‌ها برای هر باکتری و هر یک از غلظت‌های مختلف اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها، دو بار تکرار شد.

**اثر اسانس‌ها بر نمودار رشد باکتری:** اثر غلظت Sub-MIC (یک رقت کمتر از حداقل غلظت مهاره‌ی رشد) اسانس‌ها روی باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. به محیط کشت استریل حاوی پنج درصد DMSO غلظت اسانس مورد

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس نعنا

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	درصد
۱	(-)-β-Pinene	۴/۹۳۱	۰/۹۱
۲	D-Limonene	۶/۰۰۷	۲۴/۴۸
۳	P-menth-8-en-2-1,transe	۱۰/۱۷۷	۲/۸۸
۴	(±)-pulegone	۱۱/۲۳	۲/۱۳
۵	(-)-Carvone	۱۱/۴۳۸	۶۳/۰۲
۶	Carvyl acetate E	۱۴/۳۵۷	۱/۰۸
۷	(-)-β-Bourbonene	۱۵/۰۳۹	۰/۸۸
۸	Caryophyllene	۱۵/۹۳۹	۳/۱۹

درصد)، اکالیپتول (۱۴/۵۷ درصد) و پیرپیتون (۱۰/۰۹ درصد) بیشترین ترکیبات موجود در اسانس پونه را

**ترکیبات شیمیایی اسانس پونه:** با توجه به نتایج آنالیز از بین ترکیبات شناسایی شده پولگون (۴۸/۱۶

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس پونه

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
۱	3-Carene	۴/۱۰	۱/۵۸
۲	Sabinen	۴/۸۱	۱/۴۳
۳	$\beta$ -Pinene	۴/۹۳	۲/۱۲
۴	$\beta$ -Myrcene	۵/۱۰	۰/۷۶
۵	Cymene	۵/۸۹	۰/۸
۶	D-Limonene	۶/۰۰	۲/۳۷
۷	Eucalyptol	۶/۰۸	۱۴/۵۷
۸	1-Cyclohexene-1-methanol, $\alpha,\alpha,4$ -trimethyl-	۸/۹۳	۲/۶۱
۹	Menthone	۹/۰۹	۰/۷۹
۱۰	p-Menthan-3-one	۹/۳۲	۰/۷۸
۱۱	endo-Borneol	۹/۵۱	۰/۹۶
۱۲	Isopulegon	۹/۵۹	۰/۹۲
۱۳	L-.alpha.-Terpineol	۱۰/۱۱	۰/۹۵
۱۴	Pulegone	۱۱/۲۸	۴۸/۱۶
۱۵	Carvone	۱۱/۳۸	۱/۵۵
۱۶	Piperitone	۱۱/۶۴	۱/۴۵
۱۷	Thymol	۱۲/۶۰	۱/۰۲
۱۸	Piperitenone	۱۳/۸۳	۱۰/۰۹
۱۹	Terpinyl acetate	۱۴/۰۵	۱/۰۱
۲۰	3-Methoxy-5-propylphenol	۱۴/۳۹	۴/۱۷
۲۱	Caryophyllene	۱۵/۹۴	۱/۴۲

اشریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس قوی‌تر و علیه استرپتوکوک آگالاکتیه ضعیف‌تر بود. اثر نعنا بر تمام باکتری‌ها مشابه یا قوی‌تر از لینکواسپکتین و اثر پونه بر استرپتوکوک آگالاکتیه قوی‌تر از لینکواسپکتین بود.

**MIC و MBC اسانس‌های نعنا و پونه: حداقل** غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های نعنا و پونه علیه باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر ضد باکتریایی نعنا نسبت به پونه علیه

جدول ۳- حداقل غلظت مهاری و کشندگی اسانس نعنا و پونه بر باکتری‌های مورد آزمایش

باکتری	حداقل غلظت مهاری (%)	حداقل غلظت کشندگی (%)
نعنا	استافیلوکوک اورئوس	۰/۰۳
	اشریشیاکلی	۰/۰۷
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۳۱
پونه	استافیلوکوک اورئوس	۰/۱۵
	اشریشیاکلی	۰/۳۱
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۰۱
لینکواسپکتین	استافیلوکوک اورئوس	۰/۰۷
	اشریشیاکلی	۰/۱۵
	استرپتوکوک آگالاکتیه	۰/۳۱

معنی‌داری نداشت اما از آموکسی‌سیلین/ کلاولونات کمتر بود اثر اسانس‌های رقیق نشده و رقیق شده (۱:۱) هر دو گیاه علیه *اشریشیاکلی* و *استرپتوکوک آگالاکتیه* نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر بود. هر چند اثر نعنا نسبت به پونه از نظر عددی بیشتر بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود.

**انتشار از دیسک:** اثر اسانس‌های نعنا، پونه و دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/ کلاولونات علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۴ نشان داده شده است. طبق جداول CLSI هر سه باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند. اثر ضد باکتریایی نعنا و پونه بر *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به جنتامایسین تفاوت

جدول ۴- مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری‌ها تحت تاثیر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها

میانگین استاندارد	سطح معنی‌داری	تیمار				باکتری		
		آموکسی‌سیلین/ کلاولونات	جنتامایسین	پونه (۱:۱)	پونه	نعنا (۱:۱)	نعنا	
۱/۵۵	۰/۰۰	۲۴/۰۹ <sup>a</sup>	۱۸/۸۷ <sup>ab</sup>	۹/۷۹ <sup>cd</sup>	۱۴/۷۰ <sup>bc</sup>	۱۰/۲۲ <sup>cd</sup>	۱۵/۲۴ <sup>bc</sup>	<i>استافیلوکوک اورئوس</i>
۱/۵۶	۰/۰۰	۲۲/۶۰ <sup>a</sup>	۱۷/۶۰ <sup>a</sup>	۹/۳۲ <sup>b</sup>	۱۰/۷۱ <sup>b</sup>	۸/۳۴ <sup>b</sup>	۱۰/۹۸ <sup>b</sup>	<i>اشریشیاکلی</i>
۱/۶۸	۰/۰۰	۲۵/۴۴ <sup>a</sup>	۱۹/۷۶ <sup>a</sup>	۱۰/۷۶ <sup>b</sup>	۱۲/۵۳ <sup>b</sup>	۱۰/۶۴ <sup>b</sup>	۱۲/۷۸ <sup>b</sup>	<i>استرپتوکوک آگالاکتیه</i>

<sup>abcde</sup>حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

(۱:۱): اسانس رقیق شده با دی‌متیل سولفوکساید به نسبت ۱:۱

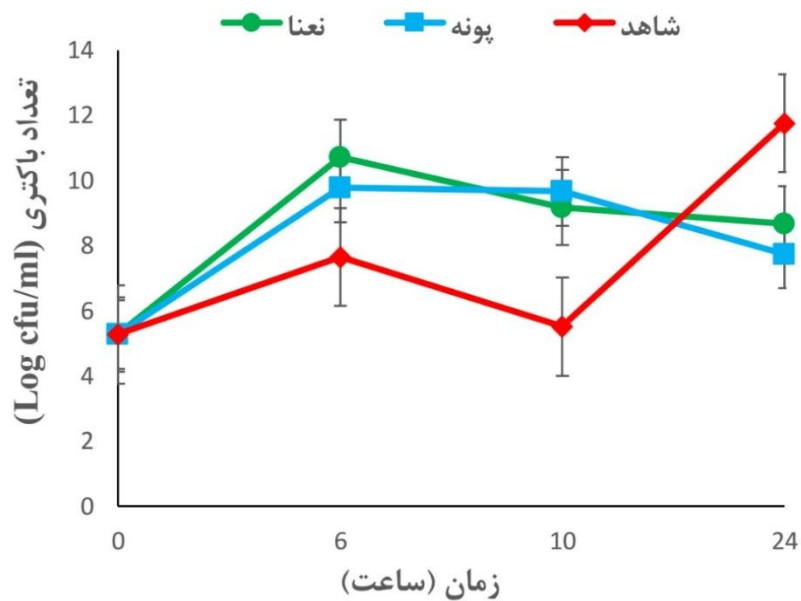
در مواد غذایی از جمله شیر باعث گسترش تحقیقات برای جستجوی ترکیبات ضد میکروبی جدید و همچنین جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. با توجه به سابقه تاریخی استفاده از گیاهان دارویی و اسانس آنها در درمان بیماری‌ها، اسانس‌های گیاهی به علت داشتن اثر ضد میکروبی وسیع‌الطیف علیه میکروارگانیسم‌ها و عوارض جانبی کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، جایگزین‌های مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. در گاوداری‌های ارگانیک به علت ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ورم پستان یک مشکل جدی محسوب می‌شود. و تقاضای زیادی برای داروهای ضد میکروب طبیعی مثل اسانس‌های گیاهی وجود دارد (۱۳). بنابراین در این مطالعه اثر اسانس گیاهان نعنا و پونه بر باکتری‌های مهم عامل ورم پستان گاو مطالعه شد.

### اثر اسانس نعنا و پونه بر نمودار رشد باکتری‌ها:

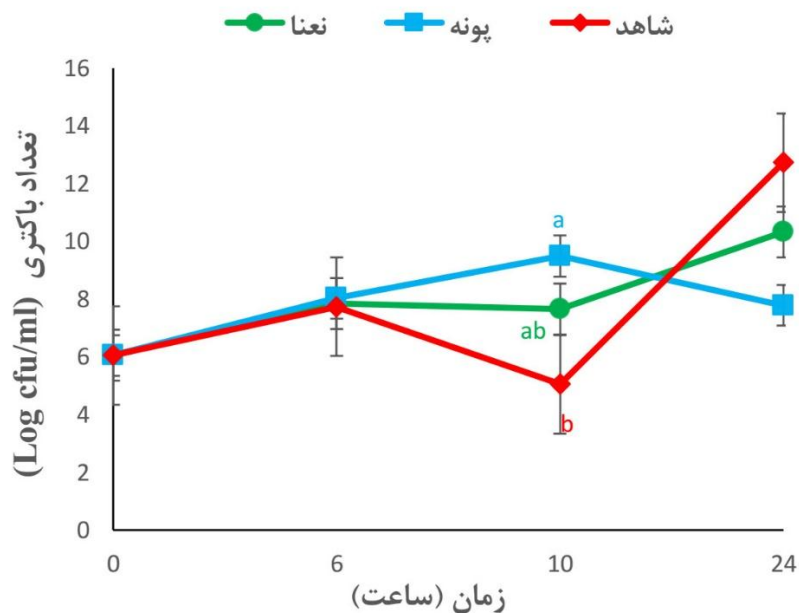
در شکل‌های شماره ۱، ۲ و ۳ اثر اسانس نعنا و پونه بر تعداد باکتری *استافیلوکوک اورئوس*، *استرپتوکوک آگالاکتیه* و *اشریشیاکلی* طی زمان‌های صفر، ۶، ۱۰ و ۲۴ ساعت مشاهده می‌شود. در ساعت شش بین تیمار شاهد و اسانس‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت در ساعت ۱۰ هم تنها تفاوت معنی‌دار، کاهش معنی‌دار تعداد باکتری‌های *استرپتوکوک آگالاکتیه* در گروه شاهد بود. در ساعت ۲۴ اسانس نعنا و پونه تعداد هر سه باکتری را کاهش داد هر چند فقط کاهش *اشریشیاکلی* معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ).

### بحث

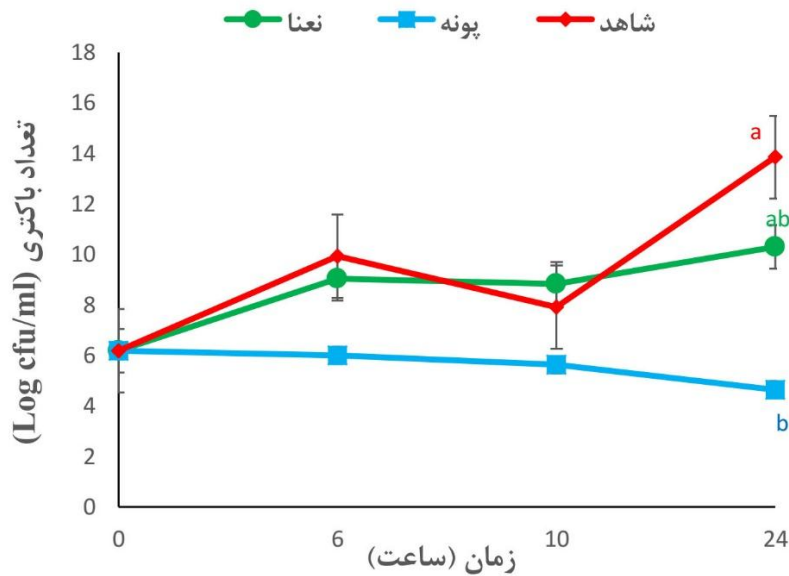
افزایش روزافزون تعداد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و نگرانی‌ها در مورد باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها



شکل ۱- اثر غلظت‌های صفر (شاهد، قرمز) و Sub-MIC اسانس نعنا (سبز) و پونه (آبی) بر منحنی رشد استافیلوکوک اورئوس. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در هر زمان می‌باشد.



شکل ۲- اثر غلظت‌های صفر (شاهد، قرمز) و Sub-MIC اسانس نعنا (سبز) و پونه (آبی) بر منحنی رشد استرپتوکوک آگالاکتیه. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در هر زمان می‌باشد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های صفر (شاهد، قرمز ♦) و Sub-MIC اسانس نعنا (سبز ●) و پونه (آبی ■) بر منحنی رشد باکتری اشریشیاکلی. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در هر زمان می‌باشد.

درصد) (۱۸) بود. ترکیبات عمده مطالعه حاضر (کارون و لیمون) بسیار شبیه یکی از مطالعات ایران (۱۸) ولی تا حدی متفاوت از سایر مطالعات ایران (۱۷-۱۵) بود و منتون و منتول که در اکثر مطالعات سایر کشورها گزارش شده (۱۳، ۵) در مطالعه حاضر یافت نشد.

در مطالعه حاضر پولگون (۴۸/۱۶ درصد)، اکالیپتول (۱۴/۵۷ درصد) و پیپریتون (۱۰/۰۹ درصد) بیشترین ترکیبات موجود در اسانس پونه را تشکیل می‌دهند. این نتایج شبیه مطالعه دیگری از ایران (۱۹) با ترکیبات عمده سیس-پولگون-اکسید (۴۵/۶۷ درصد)، ۳،۳-دی‌منتول (۱۸/۸۵ درصد) و پی-منا-۲-ان-۱-ال (۱۲/۱۵ درصد) و مطالعه دیگری از پرتغال (۲۰) با ترکیبات عمده پولگون (۸۶/۶۴ درصد)، ایزومنتون (۴/۶ درصد) و پیپریتون (۲/۵۸ درصد) است. در پژوهش دیگری از پرتغال ترکیبات عمده اسانس پونه منتون (۳۵/۹ درصد)، پولگون (۲۳/۲ درصد) و نئو-منتون (۹/۲ درصد) گزارش شد (۷). اختلاف در ترکیبات عمده اسانس در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از شرایط آب و هوایی، مکان جغرافیایی، نور آفتاب، مرحله رشد، روش استخراج اسانس و قسمت مورد استفاده گیاه باشد (۲۱).

در پژوهش حاضر ۹ ترکیب در نعنا شناسایی شد که بین ترکیبات شناسایی شده به ترتیب کارون (۶۳/۰۲ درصد)، لیمون (۲۴/۴۸ درصد) و کاریوفیلین (۳/۱۹ درصد) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس را تشکیل می‌دهند. در یک مطالعه از هلند ترکیبات عمده اسانس نعنا منتیل استات (۱۹/۲ درصد)، منتون (۲۲/۷ درصد) و منتول (۲۹ درصد) (۱۳) و در مطالعه دیگری از عربستان فراوان‌ترین ترکیبات اسانس نعنا منتوفوران (۶/۸۸ درصد)، منتیل استات (۸/۹۵ درصد)، منتون (۲۴/۵۶ درصد) و منتول (۳۶/۰۲ درصد) بود (۵). ترکیبات عمده اسانس نعنا از برزیل شامل ترپین-۴-ال (۸ درصد)، ۳-کتانول (۱۰/۱ درصد)، کارون (۲۳/۴۲ درصد) و لینانول (۵۱ درصد) گزارش شد (۱۴). در چندین مطالعه از ایران ترکیبات عمده اسانس نعنا منتون (۳۰/۶۲ درصد)، منتول (۲۵/۱۶ درصد)، منتوفوران (۶/۴۹ درصد)، منتیل استات (۴/۶۱ درصد) و اکالیپتول (۲/۱۵ درصد) (۱۵)، منتول (۵۳/۲۸ درصد)، منتیل استات (۱۵/۱ درصد)، منتوفوران (۱۱/۱۸ درصد) و آلفا-ترپینن (۱۹/۷ درصد)، پیپریتون اکسید (۱۹/۳ درصد) و ترانس-کارون (۱۴/۵ درصد) (۱۷)، کارون (۵۱/۰۳ درصد) و لیمون (۲۱/۱۲

## اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه بر باکتری‌های اصلی ورم پستان گاو

ضد باکتریایی قوی‌تر اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم‌مثبت (استافیلوکوک اورئوس و استرپتوکوک آگالاکتیه) نسبت به باکتری گرم‌منفی/شریشیالکی بود که مورد انتظار ما بود و در سایر مطالعات نیز تایید شده است و علت آن ممانعت از نفوذ اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول توسط غشای خارجی در باکتری‌های گرم‌منفی است و علاوه بر آن آنزیم‌های ناحیه پری‌پلاسم گرم‌منفی‌ها ممکن است مواد ضد باکتریایی اسانس‌ها را غیر فعال کند (۲۳).

در مورد منحنی رشد با این که اسانس نعنا و پونه بعد از ۲۴ ساعت فقط تعداد باکتری/شریشیالکی را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند و روی دو باکتری دیگر اثر معنی‌دار نداشتند ولی این اثرات مربوط به غلظت تحت حداقل غلظت مهاری رشد است و اگر غلظت مهاری و یا حتی غلظت‌های چند برابر مهاری استفاده می‌شد به احتمال زیاد اثرات ضد باکتریایی خیلی قوی‌تر می‌بود.

ترکیبات اسانس و سویه‌های متفاوت باکتری در مطالعات مختلف عامل تفاوت‌ها در فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌ها است. نظرات مختلفی در مورد این که کدام ترکیب یا ترکیبات عامل اثرات ضد باکتریایی هستند بیان شده است در بعضی پژوهش‌ها بیان شده است که اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها حاصل فقط ترکیبات اصلی نبوده و به مجموع اثرات تمام ترکیبات ارتباط دارد. و وجود ترکیبات با مقدار کم هم برای اثرات ضد باکتریایی ضروری بوده و اثر سینرژیست دارند و اثر کل اسانس بیشتر از اثر انفرادی ترکیبات اصلی است (۲۳، ۲۴).

به علت وجود چندین گروه شیمیایی در ترکیب اسانس، اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها با چند مکانیسم انجام می‌شود اسانس‌ها به کمک خصوصیت آب‌گریزی اسانس یا اجزای آن با اثر بر غشای سلولی باکتری‌ها که حاوی لیپید است باعث افزایش نفوذپذیری غشاء، نشت محتویات و در نهایت مرگ باکتری می‌شوند (۴).

### نتیجه‌گیری

اثر ضد باکتریایی نعنا بر هر سه باکتری مشابه یا قوی‌تر از آنتی‌بیوتیک لینکوسپکتین و اثر پونه بر استرپتوکوک

در مطالعات مختلف مقادیر متفاوتی برای MIC و MBC اسانس نعنا و پونه علیه باکتری‌ها گزارش شده است. در یک مطالعه محدوده MIC، ۳/۱۲ mg/ml - ۰/۳۹ و محدوده MBC، ۱۲/۴۸ mg/ml - ۰/۷۸ برای اسانس نعنا علیه/استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند دارو گزارش شد (۱۳). در مطالعات دیگر MIC نعنا علیه سویه‌های استاندارد/استافیلوکوک اورئوس ۰/۵ mg/ml (۸)، ۰/۰۳ ± ۰/۷۵ (۵)، ۰/۱ درصد (۹) و علیه/شریشیالکی ۰/۰۹ ± ۰/۲ (۵) و ۰/۲۵ درصد (۹) گزارش شد. MIC پونه علیه/شریشیالکی در یک پژوهش ۲/۳ mg/ml بود (۷). مقادیر متفاوت گزارش شده برای MIC و MBC در مطالعات مختلف می‌تواند به علت سویه‌های مختلف باکتریایی و ترکیبات مختلف اسانس باشد. برای ارزیابی قدرت ضد باکتریایی اسانس‌ها از نسبت MBC/MIC استفاده می‌شود اگر این نسبت بزرگتر از ۴ باشد اسانس باکترواستاتیک و اگر کمتر یا مساوی ۴ باشد باکتریسید در نظر گرفته می‌شود (۲۱). طبق این تقسیم‌بندی اسانس‌های مطالعه حاضر اثر باکتریسیدی نشان دادند.

در مطالعه حاضر، با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، اثر ضد باکتریایی نعنا و پونه بر استافیلوکوک اورئوس نسبت به جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت اما علیه دو باکتری دیگر نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر بود. اثر اسانس رقیق نشده قوی‌تر از رقیق شده (۱:۱) بود بنابراین در مقادیر بالاتر از ۲۰ μL می‌تواند اثرات قوی‌تری داشته و به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گیرد. نتایج مطالعه حاضر مشابه نتایج بعضی مطالعات در مورد ارزیابی اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا و پونه علیه میکروارگانیزم‌های متعدد است (۲۰، ۲۲، ۱۹، ۸، ۵). اختلاف هاله عدم رشد در مطالعات مختلف می‌تواند به علت سویه‌های مختلف باکتری، اختلاف مقدار و غلظت اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها در هر دیسک و همچنین اختلاف در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها باشد. نکته قابل توجه دیگر در مطالعه حاضر، اثر

اسانس نعنا قوی‌تر از پونه بود.

سپاسگزاری: این تحقیق برگرفته از طرح پژوهشی با کد ۶/۱۸۲ و با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه گنبد کاووس انجام شده است که نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

آگلایکتیه قوی‌تر از لینکواسپکتین بود و فعالیت ضد باکتریایی نعنا و پونه بر *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت و هر دو اسانس بعد از ساعت ۲۴ باعث کاهش معنی‌دار تعداد *شریشیایکلی* شدند. هر دو اسانس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها اثر ضد باکتریایی قابل قبولی داشتند ولی اثر ضد باکتریایی

## References

- 1- Contreras GA, Rodríguez JM. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16(4): 339–56.
- 2- Montironi ID, Cariddi LN, Reinoso EB. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Rev Argent Microbiol*. 2016; 48(3): 210–6.
- 3- Aleksh MO, Ismail ZB, Awawdeh MS, Shatnawi S. Effects of intramammary infusion of sage (*Salvia officinalis*) essential oil on milk somatic cell count, milk composition parameters and selected hematology and serum biochemical parameters in Awassi sheep with subclinical mastitis. *Vet World*. 2017; 10(8): 895–900.
- 4- Ananda Baskaran S, Kazmer GW, Hinckley L, Andrew SM, Venkitanarayanan K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogen's in vitro. *J Dairy Sci*. 2009; 92(4): 1423–1429.
- 5- Desam NR, Al-Rajab AJ, Sharma M, Mylabathula MM, Gowkanapalli RR, Albratty M. Chemical constituents, *in vitro* antibacterial and antifungal activity of *Mentha × Piperita L.* (peppermint) essential oils. *J King Saud Univ - Sci*. 2019; 31(4): 528–33.
- 6- Parham S, Kharazi AZ, Bakhsheshi-Rad HR, Nur H, Ismail AF, Sharif S, et al. Antioxidant, antimicrobial and antiviral properties of herbal materials. *Antioxidants*. 2020; 9(12): 1–36. [In Persian]
- 7- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, et al. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind Crops Prod*. 2012; 36(1): 81–7.
- 8- Kang J, Jin W, Wang J, Sun Y, Wu X, Liu L. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *Lwt- Food Sci Technol*. 2019; 101: 639–45.
- 9- Catherine AA, Deepika H, Negi PS. Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *J Essent Oil Res*. 2012; 24(5): 481–6.
- 10- Akhondzadeh 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 Sci Technol*. 2007; 40(6): 973–81. [In Persian]
- 11- Fu YJ, Zu YG, Chen LY, Shi XG, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phyther Res*. 2007; 21(10): 989–94.
- 12- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. *CLSI document M100-S25, Wayne. Ninth Ed.* 2015. p:18.
- 13- Kot B, Wierzchowska K, Piechota M, Czerniewicz P, Chrzanowski G. Antimicrobial activity of five essential oils from lamiaceae against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Res*. 2019; 33(24): 3587–91.
- 14- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2004; 35(4): 275–80.
- 15- Moghaddam M, Pourbaige M, Tabar HK, Farhadi N, Hosseini SMA. Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil from Iran. *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2013; 16(4): 506–12. [In Persian]
- 16- Saharkhiz MJ, Motamedi M,

**Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K.** Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita L.* *ISRN Pharm.* 2012; 1–6. [In Persian]

**17- Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I.** Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita L.* and *Myrtus communis L.* essential oils. *Phytochemistry.* 2006; 67(12): 1249–55. [In Persian]

**18- Azizi Tabrizad N, Seyedin Ardebili SM, Hojjati, M.** Identification of chemical compounds of pennyroyal, mint and thyme essential oils and investigate their antimicrobial activities. *J Food Sci Tech.* 2019; 16(87): 395-404. [In Persian]

**19- Dehghani N, Afsharmanesh M, Salarmoini M, Ebrahimnejad H.** Characterization of pennyroyal (*Mentha pulegium*) essential oil as an herbal, antibacterial, and antioxidant substance. *Comp Clin Path.* 2018; 27(6): 1575–81. [In Persian]

**20- Luís Â, Domingues F.** Screening of the potential bioactivities of pennyroyal (*Mentha pulegium L.*) essential oil. *Antibiotics.* 2021; 10(10): 1266.

**21- Hajlaoui H, Mighri H, Aouni M, Gharsallah N, Kadri A.** Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana L.* essential oil. *Microb Patho.* 2016; 95: 86-94.

**22- Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S, Mantzourani I, Theodoridou I, Stavropoulou E, et al.** Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus.* *Anaerobe.* 2011; 17(6): 399–402.

**23- Bouyahya A, Et-Touys A, Abrini J, Talbaoui A, Fellah H, Bakri Y, et al.** *Lavandula stoecha* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2017;12: 179-184.

**24- Moosavi-Nasab M, Saharkhiz MJ, Ziaee E, Moayedi F, Koshani R, Azizi R.** Chemical compositions and antibacterial activities of five selected aromatic plants essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria. *Essen Oil Res.* 2016; 83(3): 607-613. [In Persian]

## Antibacterial effect of essential oils of peppermint and pennyroyal on major bovine mastitis bacteria

Reza Rahchamani<sup>1\*</sup>, Samira Noori<sup>2</sup>, Javad Bayat Kouhsar<sup>1</sup>

1- Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.

2- M.Sc. graduate of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.

Receive: February 14, 2023; Revise: April 26, 2023; Accept: May 27, 2023

### Summary

---

Antibiotic therapy of bacterial diseases has some side effects including antibiotic resistance. There is need to investigate new and natural antibacterial agents because of various side effects of antibiotics. According to antibacterial effects, essential oils (EOs) are suitable alternatives. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* cause various diseases in human and animals. Also, these three bacteria are major bovine mastitis-causing bacteria. So, this study investigated antibacterial activity of *Mentha piperita* (peppermint) and *Mentha pulegium* (pennyroyal) essential oils in comparison with lincospectin, gentamicin and amoxicillin/clavulanate antibiotics on these bacteria. Gas chromatography/mass spectrometry was used for the analysis of EOs. Antibacterial effects of the EOs on bacteria were evaluated with minimum bactericidal concentration (MBC), minimum inhibitory concentration (MIC), disk diffusion method, and time-kill assay in tryptic soy broth (TSB). Major components of peppermint EO were carvone (63.02%) and limonene (24.48%), and those of pennyroyal EO were pulegone (48.16%), eucalyptol (14.57%). According to MIC and MBC results, the antibacterial activity of peppermint was the same or higher than lincospectin and pennyroyal effect on *Streptococcus agalactiae* was higher than lincospectin. The inhibition zone of peppermint and pennyroyal had no significant difference with gentamycin but the effects of two EOs against the other two bacteria were lower than gentamycin and amoxicillin/clavulanate. Sub-MIC concentrations of oils decreased *Escherichia coli* count at 24 h. Generally, the essential oil of peppermint and pennyroyal had a significant antibacterial effect and the effect of peppermint was higher than pennyroyal.

**Key words:** Antibiotic resistance, Bacterial disease, Medicinal plant

## بررسی مقاومت به کولیستین و آمینوگلیکوزیدها در اشریشیاکلی‌های جداشده از طیور گوشتی استان گیلان

زهره پورحسین، لیلا اسدپور\*، هادی حبیب‌الهی، سیده‌طوبی شفیقی

گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

دریافت مقاله: ۲۳ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۰۹ اردیبهشت ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۳ خرداد ۱۴۰۲

### چکیده

گوشت مرغ، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی در جهان، میزان بالایی از آلودگی به اشریشیاکلی را نشان می‌دهد، که می‌تواند به‌طور گسترده‌ای مقاومت آنتی‌بیوتیکی را انتشار دهد. هدف از این مطالعه بررسی مقاومت به کولیستین و آمینوگلیکوزیدها در اشریشیاکلی‌های جداشده از طیور گوشتی است. در این بررسی ۱۲۲ جدایه اشریشیاکلی از قلب و کبد مرغ‌های ۲۰ تا ۴۵ روزه با علائم بالینی کلی‌باسیلوس در سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری گردید. سویه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید و کولیستین به ترتیب توسط روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC شناسایی شدند. سپس حضور ژن‌های  $1-mcr-2$  -  $3-mcr$  و  $ant(3'')-Ia$  و  $aac(3)-IIa$   $aph(3')-IIa$   $mcr$  در جدایه‌ها به روش PCR بررسی گردید. از ۱۲۲ جدایه مورد بررسی، ۳۵ جدایه (۲۸/۶۸ درصد) به نئوماپسین سولفات، ۱ جدایه (۰/۸۲ درصد) به جنتامایسین مقاوم بود. همه جدایه‌ها به آمیکاسین، توبرامایسین و استرپتوماپسین حساسیت نشان دادند و ۵ جدایه (۴/۱۰ درصد) مقاوم به کولیستین بودند. در ردیابی ژن‌های  $mcr$  توسط روش PCR، هیچ‌یک از ژن‌های مورد بررسی شناسایی نشد اما ژن‌های  $ant(3'')-Ia$  و  $aac(3)-IIa$   $aph(3')-IIa$  به ترتیب در ۲۵/۴۱، ۲۳/۷۷ و ۳۶/۸۸ درصد جدایه‌ها شناسایی شدند. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر کاهش حساسیت اشریشیاکلی‌های جداشده از جوجه‌های گوشتی به آمینوگلیکوزید و کولیستین می‌باشد. گسترش این مقاومت‌ها هشدار جدی در زمینه کاهش گزینه‌های درمانی، در درمان کلی‌باسیلوس و خطر انتقال ژن‌های مقاومت به فلور میکروبی انسان می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** مقاومت آنتی‌بیوتیک، گوشت مرغ، اشریشیاکلی، طیورگوشتی

کولیستین، یک آنتی‌بیوتیک پلی‌پپتیدی از خانواده پلی‌میکسین، با وزن مولکولی ۱۷۵۰ دالتون، متشکل از یک هیتاپتید حلقوی با زنجیره جانبی تری‌پپتیدی است که در انتهای N دارای دم اسید چرب است. آگریز بودن بخش N ترمینال قطعه اسید چرب مسئول ماهیت سمی آن است و تأثیر زیادی بر فعالیت ضد میکروبی کولیستین دارد (۱). این آنتی‌بیوتیک کاتیونی، به لیپید A لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی متصل می‌گردد و با جابجایی کاتیون‌هایی مانند  $Mg^{2+}$  و  $Ca^{2+}$  در غشای خارجی، یکپارچگی غشاء را مختل می‌کند و منجر به لیز سلولی می‌شود (۲). اگرچه چندین مکانیسم مولکولی در مقاومت به کولیستین مؤثر است، تغییراتی در پورین‌های غشای خارجی و کاهش بار منفی LPS، بیان بیش از حد سیستم‌های پمپ افلاکس، تولید بیش از حد پلی‌ساکارید کپسولی از جمله‌ی آنهاست. مقاومت کولیستین با واسطه پلاسمید نیز شناخته شده است که توسط ترانسفرازهای فسفو اتانول آمین به نام‌های  $mcr-1$ ،  $mcr-2$ ،  $mcr-3$  و  $mcr-4$  ایجاد می‌شود (۳، ۴).

در اواخر سال ۲۰۱۵، ژن  $mcr-1$  پلاسمیدی که یک فسفو اتانول آمین ترانسفراز را تحریک می‌کند و باعث ایجاد مقاومت در برابر پلی‌میکسین می‌شود، برای اولین بار در سویه‌های باکتریایی با منشأ حیوانی، شناسایی شد (۵). در بسیاری از کشورها کولیستین در دامپروری برای کنترل عفونت استفاده می‌شود، اما در انسان به دلیل سمیت کلیوی قابل توجهی که دارد به‌طور محدود مورد مصرف قرار می‌گیرد (۶). از آنجا که این آنتی‌بیوتیک به‌عنوان آخرین گزینه درمانی عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم‌منفی مقاوم به چند دارو استفاده می‌شود، ظهور جدایه‌های مقاوم در برابر این آنتی‌بیوتیک مهم‌ترین نگرانی بهداشت عمومی در سال‌های اخیر است (۷). ارتباط بین اشیریشیاکلی پاتوژن طیور (APEC) با اشیریشیاکلی‌های یوروپاتوژن انسان سبب بروز نگرانی در خصوص انتقال ژن‌های  $mcr$  جدایه‌های APEC مقاوم در

برابر کولیستین به سویه‌های بالینی انسان گردید. بنابراین ارزیابی مقاومت مرتبط با حضور ژن  $mcr$  در APEC برای تعیین منابع بالقوه مهم در زنجیره غذایی انسان ضروری است (۸، ۹). آمینوگلیکوزیدها از نظر ساختاری، قند آمینی پلی‌کاتیونیک هستند که گروه‌های آمین در محیط‌های بیولوژیکی پروتون‌دار می‌شوند. مکانیسم فعالیت آمینوگلیکوزیدها شامل باند شدن به جایگاه A در 16SrRNA و مهار سنتز پروتئین‌هاست (۱۰). مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها از طریق مکانیسم‌های مختلفی چون اصلاح آنزیمی، نفوذناپذیری، فعالیت پمپ‌های افلاکس، تشکیل بیوفیلم و فعالیت متیلازهای 16SrRNA رخ می‌دهد. در میان این مکانیسم‌ها، غیر فعال کردن داروها توسط آنزیم‌های اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزید (AMEs) رایج‌ترین است. AME ها مجموعه متنوعی از سه خانواده: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (aac)، آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز (ant) و آمینوگلیکوزید فسفوریل ترانسفراز (aph) است (۱۱، ۱۲). ژن  $Ila - aph(3')$  مقاومت در برابر کانامایسین و نئومایسین،  $Ila - aac(3)$  مقاومت به جنتامایسین، توبرامایسین و نتلمایسین را ایجاد می‌کند،  $ant(3'')$  مقاومت در برابر کانامایسین، استرپتومایسین و  $aac(6')$  مقاومت در برابر کانامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین و نتیلمایسین را رمزدهی می‌کند (۱۳).

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه‌ها:** این مطالعه در سال ۱۴۰۰، بر روی جوجه‌های گوشتی ۲۰ تا ۴۵ روزه با علائم بالینی کلی‌باسیلوز در استان گیلان انجام پذیرفت. نمونه‌ها از قلب و کبد جوجه‌های گوشتی بیمار جمع‌آوری شد.

## جداسازی و شناسایی باکتری اشیریشیاکلی:

نمونه‌های جمع‌آوری شده بر روی محیط‌های کشت آگار مکانکی و آگار EMB کشت داده شدند. سپس کلونی‌های لاکتوز مثبت رشد کرده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شامل بررسی تولید اندول، واکنش متیل رد، واکنش وژ پروسکوئر، تولید اوره‌آز، مصرف سیترات، تخمیر



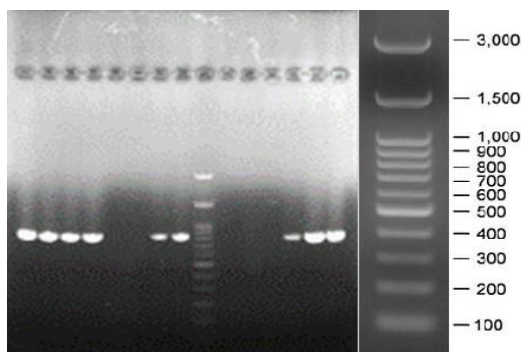
نئومایسین سولفات، ۳۵ جدایه (۲۸/۶۸ درصد) و پس از آن به کولیستین، ۵ جدایه (۴/۱۰ درصد) بود. نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی-بیوتیکی جدایه‌ها مطابق با جدول ۲ می‌باشد.

جدول ۲- تعداد و درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

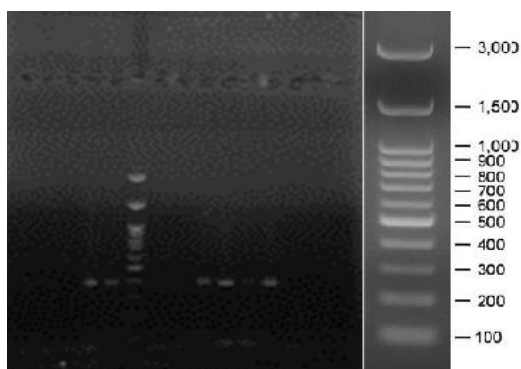
آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد (درصد)	حد واسط تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
آمیکاسین	0(0%)	22 (18.03%)	100 (82%)
جنتامایسین	1(0.82%)	3 (2.46%)	118 (96.72%)
نئومایسین سولفات	35 (28.68%)	50 (40.98%)	37 (30.33%)
توبرامایسین	0(0%)	2(1.64%)	120 (98.36)
استرپتومایسین	0(0%)	4(3.28)	118 (96.72%)
کولیستین	5(4.10)	1(0.82%)	116 (95.1)

۲۹ *aac(3)-IIa* (۲۵/۴۱ درصد)، ۳۱ *aph(3')-IIa* (۲۳/۷۷ درصد) و ۴۵ *ant(3'')-Ia* (۳۶/۸۸ درصد) بود (شکل‌های ۱-۳).

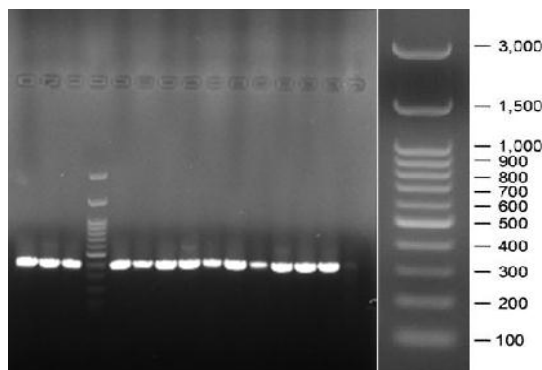
در ردیابی ژن‌های *mcr-1*، *mcr-2*، *mcr-3* توسط روش PCR هیچ‌یک از ژن‌های مورد بررسی شناسایی نشد. میزان فراوانی ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *aph(3')-IIa* (طول محصول ۱۱۶bp)



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن *aac(3)-IIa* (طول محصول ۳۸۴bp)



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن *ant(3)-a* (طول محصول ۳۸۸bp)

### بحث

مقاومت باواسطه پلاسمید به کولیستین، به دلیل توانایی انتقال ژن‌های مقاومت به سویه‌های دیگر و احتمال گسترش آنها از حیوانات به جمعیت‌های انسانی نگران‌کننده است. این امر اهمیت پایش این مقاومت‌ها در باکتری‌های جداسده از منابع غذایی انسان را مشخص می‌سازد. تاکنون گزارشی از مقاومت باواسطه پلاسمید به کولیستین در ایران گزارش نشده است. علیرغم استفاده از کولیستین در حیطه دامپزشکی و شناسایی جدایه‌های مقاوم به کولیستین در بررسی فنوتیپی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد ژن *mcr* در جدایه‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه در گیلان وجود ندارد. در ایران، در مطالعات مختلفی مقاومت به کولیستین در جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی در انسان مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که در شمال غرب ایران توسط آقاپور و همکاران (۲۰۱۹) بر روی جدایه‌های اشریشیاکلی در بیمارستان‌های تبریز انجام شد، از ۹۰۰ جدایه بالینی، ۳۳۳ جدایه، به‌عنوان جدایه‌های با مقاومت حد وسط به کولیستین و ۲۶/۶ درصد از آنها بسیار مقاوم بودند. ژن‌های *mcr-1*، *mcr-2* و *mcr-3* در هیچ‌کدام از جدایه‌های مقاوم شناسایی نشد (۷). در مطالعه دیگری در شمال غربی ایران سطح بالایی (۱۴ درصد) از مقاومت در برابر کولیستین گزارش شده است (۱۵). همچنین میزان مقاومت به کولیستین در مطالعه‌ای از مرکز ایران حدود ۱۱/۶ درصد گزارش شده است (۱۷). در سایر کشورها، در

مطالعات مختلف حضور ژن پلاسمیدی کدکننده مقاومت به کولیستین در اشریشیاکلی‌های جداسده از طیور گزارش شده است. به‌ویژه در مناطقی که کولیستین به‌طور معمول در دامپزشکی استفاده می‌شود، طیور ممکن است مخزنی از اشریشیاکلی‌هایی باشند که *mcr-1* را حمل می‌کند (۱۸). در مطالعه‌ای در برزیل، فراوانی ژن *mcr-1* در اشریشیاکلی‌های مدفوعی و بیماری‌زای طیور ۵۷/۹ درصد گزارش شد و بین مصرف گوشت مرغ خریداری شده از بازار حیوانات زنده و جداسازی اشریشیاکلی حامل *mcr-1* ارتباط وجود داشت (۱۹). در مطالعه‌ای در آمریکا، *mcr-1* در ۱۲ جدایه از مجموعه ۹۸۰ جدایه اشریشیاکلی بیماری‌زای مرغی شناسایی شد (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای در آلمان (۲۰۱۶)، حضور ژن *mcr-1* در اشریشیاکلی بیماری‌زای طیور گزارش گردید (۲۱). در پایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در اشریشیاکلی‌های جداسده از دام و طیور در کشور چین نیز افزایش چشمگیر در مقاومت به کولیستین باواسطه پلاسمید، در سال‌های اخیر گزارش گردید (۲۲). همچنین در مطالعه حاضر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی در اشریشیاکلی‌های جداسده از جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های مورد مطالعه، بیشترین میزان مقاومت را به آنتی‌بیوتیک نئوماپسین سولفات (۲۸/۶۸ درصد) نشان دادند. در بررسی فنوتیپی میزان مقاومت به آمیکاسین و جنتامایسین در باکتری‌های مورد آزمایش از درصد بالایی

پروتئینی در جهان است، ظهور و گسترش ژن‌های مقاومت پلاسمیدی در اشریشیاکلی‌های جدا شده از طیور می‌تواند کنترل بیماری‌های ناشی از این باکتری در انسان را دشوار نماید (۲۰). در این راستا چوی و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی در کره دریافتند که در نتیجه مصرف آپرامایسین در حیوانات، انسان در معرض خطر عفونت ناشی از سویه‌های مقاوم به جنتامایسین قرار می‌گیرد. این محققین با بررسی ۱۹۲۱ اشریشیاکلی جدا شده از دام و طیور، ژن مقاومت آمینوگلیکوزیدی *IV- (3) aac* را در تمام جدایه‌های مقاوم به آپرامایسین شناسایی کردند (۲۵).

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر ظهور سویه‌های مقاوم به کولیستین در اشریشیاکلی‌های جدا شده از جوجه‌های گوشتی در گیلان می‌باشد. مصرف بی‌رویه و نادرست کولیستین خطری جدی برای صنعت طیور کشور و بهداشت عمومی محسوب می‌شود. کاهش حساسیت جدایه‌های مطالعه حاضر به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و حضور ژن‌های کدکننده این مقاومت‌ها نیز هشدار جدی در زمینه کاهش گزینه‌های درمانی، در درمان کلی‌باسیلوس در صنعت پرورش طیور و خطر انتقال ژن‌های مقاومت به فلور میکروبی انسان می‌باشد.

برخوردار نبود، اما به نظر می‌رسد حساسیت به آمیکاسین در جدایه‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه رو به کاهش است. در میان آمینوگلیکوزیدها، نئومایسین معمولاً در درمان بیماری‌های جوجه‌های گوشتی در شمال ایران استفاده می‌شود. این امر شیوع بالاتر مقاومت به نئومایسین را در جدایه‌های مورد آزمایش توضیح می‌دهد. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها، غیر فعال‌سازی آنزیمی آنتی‌بیوتیک است که عمدتاً از طریق آنزیم‌های اصلاح‌کننده ساختار آنتی‌بیوتیک (AMEs) که منشأ پلاسمیدی یا کروموزومی دارند، رخ می‌دهد (۲۳). در مطالعه حاضر، آنزیم اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزید *Ia- (3'') ant* فراوان‌ترین (۳۶/۸۸) ژن AMEs شناسایی شده بود و پس از آن *Iia- (3') aph* و *Iia- (3) aac* به ترتیب در ۲۵/۴۱ و ۲۳/۷۷ درصد جدایه‌ها شناسایی شدند. در نتایج مشابهی ژانگ و همکاران (۲۰۱۴)، *Ia- (3') ant* را به عنوان متداول‌ترین ژن‌های اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزید در اشریشیاکلی جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به سپتی‌سمی در چین گزارش کردند (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط لی و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، *Ia- (3) ant* یکی از شایع‌ترین ژن‌های مقاومت مشاهده شده در جدایه‌های اشریشیاکلی مقاوم به آمینوگلیکوزیدها بود (۲۴). از آنجایی که گوشت طیور یکی از مهم‌ترین و ارزان‌ترین منابع

### References

1- Brink AJ, Richards GA, Colombo G, Bortolotti F, Colombo P, Jehl F. Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics. *International journal of antimicrobial agents*. 2014; 43(1): 1-6.

2- Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015; 59(1): 536-43.

3- Kim Y, Bae IK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014; 79(3): 362-6.

4- Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Jour-*

*nal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017; 72(12): 3317-24.

5- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, *et al*. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016; 16(2): 161-8.

6- Caniaux I, Van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017; 36(3): 415-20.

7- Aghapour Z, Hasani A, Aghazadeh M, Rezaei MA, Ganbarov K, Poulak T, *et al*. Genes involved in colistin resistance of gram-negative isolates in the northwest of Iran. *Gene Reports*. 2019; 14: 81-6. [In persian]

8- Singer RS. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. *Frontiers in microbiology*. 2015; 6: 28-36.

9- Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, *et al*. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nature microbiology*. 2017; 2(4): 1-7.

10- Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clinical microbiology reviews*. 2014; 27(1): 21-47.

11- Vaziri F, Peerayeh SN, Nejad QB, Farhadian A. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac (6')-I*, *aac (6')-II*, *ant (2'')-I*, *aph (3')-VI*) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics*. 2011; 66(9): 1519-22. [In persian]

12- Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, *et al*. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(8): 4443-51.

13- Zhou WR, Wang HN, Zhang AY, Wu Q, Huang Y, Liu P, *et al*. Detection of sulfonamide-resistant genes in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from pigs and wild animals. *Vet. Sci. China*. 2007; 37: 287-90.

14- Xie R, Huo S, Li Y, Chen L, Zhang F, Wu X. Molecular epidemiological survey on quinolone 424 resistance genotype and phenotype of *Escherichia coli* in septicemic broilers in Hebei. *China. 425 Poultry science*. 2014; 93(2): 335-9.

15- Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S,

Aghazadeh M, Iversen A, Edquist P, *et al*. A multiresistant clone of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran. *Apms*. 2013; 121(2): 146-52. [In persian]

16- Zhang FY, Huo SY, Li YR, Xie R, Wu XJ, Chen LG, *et al*. A survey of the frequency of aminoglycoside antibiotic-resistant genotypes and phenotypes in *Escherichia coli* in broilers with septicemia in Hebei, China. *British poultry science*. 2014; 55(3): 305-10.

17- Vakili B, Fazeli H, Shoaee P, Yaran M, Ataei B, Khorvash F, *et al*. Detection of colistin sensitivity in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(1): S67. [In persian]

18- Monte DF, Fernandes MR, Cerdeira L, de Souza TA, Franco BD, Landgraf M, *et al*. Draft genome sequences of colistin-resistant MCR-1-producing *Escherichia coli* ST1850 and ST74 strains isolated from commercial chicken meat. *Genome Announcements*. 2017; 5(20): e00329-17.

19- Vasquez AM. Investigation of *Escherichia coli* harboring the *mcr-1* resistance gene—Connecticut, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 2016; 65.

20. Lima Barbieri N, Nielsen DW, Wan-nemuehler Y, Cavender T, Hussein A, Yan SG, *et al*. *mcr-1* identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS One*. 2017; 12(3): e0172997.

21- Ewers C, Göttig S, Bülte M, Fiedler S, Tietgen M, Leidner U, *et al*. Genome sequence of avian *Escherichia coli* strain IHIT25637, an extraintestinal pathogenic *E. coli* strain of ST131 encoding colistin resistance determinant MCR-1. *Genome Announc*. 2016; 4(5): e00863-16.

22- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, *et al*. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016; 16(2): 161-8.

23. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Update*. 2010; 13 (6), 151–171.

24. Li Y, Chen L, Wu X, Huo S. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Science*. 2015; 94(4), 601–611.

25-Choi MJ, Lim SK, Nam HM, Kim AR,

**Jung SC, Kim MN.** Apramycin and gentamicin resistances in indicator and clinical *Escherichia*

*coli* isolates from farm animals in Korea. *Food borne pathogens and disease*. 2011; 8(1): 119-23.

## Evaluation of resistance to colistin and aminoglycosides in *Escherichia coli* isolated from broilers in Guilan province

Zohreh Pourhossein, Leila Asadpour\*, Hadi Habibollahi, Seyedeh Tooba Shafighi

Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Receive: January 13, 2023; Revise: April 29, 2023; Accept: June 3, 2023

### Summary

---

Chicken meat, as one of the most important sources of protein in the world, shows a high rate of contamination with *Escherichia coli*, which can widely spread antibiotic resistance. The aim of this study was to investigate the resistance to colistin and aminoglycosides in *E. coli* isolated from broilers. In this study, during 2021, a total of 122 *E. coli* isolates were collected from the heart and liver of 20- to 45-day-old chickens with clinical signs of colibacillosis. Aminoglycosides and colistin resistant strains were identified by disk diffusion and MIC determination, respectively. Subsequently, the presence of *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *aph (3')-IIa*, *aac (3) -IIa* and *ant (3'')-Ia* genes in the isolates was analyzed by PCR. Out of 122 isolates, 35 isolates (28.68%) were resistant to neomycin sulfate and 1 isolate (0.82%) was resistant to gentamicin. All isolates were sensitive to amikacin, tobramycin and streptomycin and 5 isolates (4.10%) were resistant to the colistin. In the detection of *mcr* genes by PCR method, none of the studied genes were identified, but *aph (3') -IIa*, *aac (3) -IIa* and *ant (3'')-Ia* genes were detected in 25.41%, 23.77% and 36.88% of isolates respectively. The results of this study indicate a decrease in the sensitivity of poultry isolated *E. coli* to aminoglycosides and colistin. The spread of such resistant isolates is a serious warning about the reduction in treatment choices of colibacillosis and indicates the risk of transmission of resistance genes to the human microbial flora.

**Key words:** Antibiotic resistance, Chicken meat, *Escherichia coli*, aminoglycoside, colistin

## تأثیر پرتوتابی گاما بر بار باکتریایی و ازت کل فرار در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت شرایط یخچالی

مسعود مددی<sup>۱</sup>، زهره مشاک\*<sup>۲</sup>، غلامرضا شاه‌حسینی<sup>۳</sup>

- ۱- دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
- ۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۸ اسفند ۱۴۰۱، بازنگری: ۰۳ خرداد ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۹ خرداد ۱۴۰۲

### چکیده

آبزیان از جمله ماهی‌ها همواره جز فسادپذیرترین منابع پروتئینی بوده‌اند. برای افزایش مدت زمان نگهداری این منابع راه‌های زیادی از جمله پرتوتابی وجود دارد. در این مطالعه اثر پرتوتابی با پرتو گاما روی بار میکروبی و میزان کل ازت فرار گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا گوشت این گونه ماهی با دزهای ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ کیلوگری پرتوی گاما پرتوتابی شده و متعاقباً به یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس منتقل گردید. طی روزهای اول، هفتم و چهاردهم پس از پرتوتابی (پس از انتقال به یخچال) میزان کل باکتری و میزان ازت کل فرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با استفاده از دزهای مختلف پرتوتابی گاما میزان بار میکروبی و میزان ازت کل فرار تا حد زیادی کاهش می‌یابد. در بین دزهای پرتوتابی شده دز ۳/۵ کیلوگری بیشترین کاهش این شاخص‌ها را نشان داد، اما با توجه به این که بین گروه ۲/۵ و ۳/۵ کیلوگری اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت، دز ۲/۵ کیلوگری به‌عنوان دز مناسب برای پرتوتابی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و نگهداری متعاقب آن در شرایط یخچالی پیشنهاد شد.

**واژگان کلیدی:** ازت کل فرار، پرتوتابی گاما، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، میزان کل باکتری‌ها

## مقدمه

با توجه به عمل سریع آنزیم‌های اتولیتیک در گوشت ماهی و امکان بروز فعالیت‌های میکروبی و در نتیجه تغییرات در ماتریکس ترکیبات بیولوژیکی، این گونه از مواد غذایی به‌عنوان یکی از فاسدشدنی‌ترین مواد غذایی مطرح می‌باشند (۴-۱). میکروارگانسیم‌هایی مانند سودوموناس‌ها، و انتروباکتریاسه‌ها عامل اصلی فساد ماهی در یخچال می‌باشند و در تولید چند متابولیت، که منجر به از دست دادن کیفیت و کاهش زمان ماندگاری این محصول می‌شوند نقش پررنگی را ایفا می‌کنند (۲، ۵، ۶). به‌منظور کنترل فعالیت میکروبی و افزایش ماندگاری مواد غذایی فسادپذیر فناوری‌های مختلفی نظیر بسته‌بندی اتمسفری اصلاح شده\* (MAP)، پرتوتابی از جمله تابش فرابنفش (UV-C) و گاما مورد استفاده قرار گرفته است (۴، ۷، ۸). به‌طور کلی مطالعات نشان می‌دهد که اگر دز مناسب برای پرتوتابی با استفاده از پرتو گاما استفاده شود، تابش آن روی گوشت، بافت و ظاهر انواع ماهیان و سخت‌پوستان تاثیر نمی‌گذارد (۹-۱۱). پرتوهای یونیزان از جمله پرتو گاما و اشعه ایکس (X) برای افزایش زمان نگهداری، کاهش و غیر فعال کردن میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و بهبود سلامت محصولات فسادپذیر از جمله ماهی تازه و منجمد موثر می‌باشد (۱۴-۱۲).

ازت کل فرار<sup>†</sup> (TVN) یا کل نیتروژن فرار پایه<sup>‡</sup> (TVBN) بر اساس پایه نیتروژنی بیان می‌شود و برای ارزیابی تازگی ماهی است، اندازه‌گیری آن معمولاً برای ارزیابی فساد گوشت ماهی استفاده می‌شود و در اکثر ماهیان افزایش مقادیر TVN به صورت خطی یا منحنی است و با تعداد کلنی‌های باکتریایی رابطه معنی‌داری دارد و به‌طور معمول به‌صورت میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه می‌باشد (mg-N/100g) (۱۵).

ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با نام علمی *Oncorhynchus mykiss* (مهم‌ترین گونه پرورشی ماهیان سردابی می‌باشد (۱۶). این ماهی بومی حوزه اقیانوس آرام و آمریکای شمالی است که در سال ۱۸۸۰ میلادی به اروپا آورده شده و به تدریج به نقاط مستعد در سراسر دنیا معرفی شد (۱۷). این ماهی به مراتب آسان‌تر از گونه‌های دیگر ماهیان سردابی نسبت به محیط سازگاری حاصل می‌نماید (۱۰). هدف از انجام این مقاله بررسی تأثیر پرتودهی گاما بر روی میزان کل باکتری و مقدار کل ازت فرار گوشت ماهی قزل‌آلا، با بکار بردن پرتودهی در راستای افزایش کیفیت و بالا بردن مدت نگهداری آن در شرایط یخچالی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

تعداد صد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (Rainbow trout) تهیه شده از استخر پرورش ماهی در اطراف استان تهران خریداری و سپس به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج منتقل گردید. پس از تقسیم‌بندی، گوشت ماهی جهت پرتودهی به پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای منتقل شد. برای این منظور از دزهای مختلف (صفر، ۱/۵ و ۲/۵ و ۳/۵ کیلوگری) پرتوگاما با استفاده از دستگاه پرتودهی گاماسل (Gammacell PX-30) ساخت کشور روسیه با دز ۰/۵۵ گری در ثانیه و چشمه کبالت ۶۰ استفاده شد.

پس از پرتودهی مجدداً نمونه‌ها تحت زنجیره انتقال سرد و در شرایط استریل به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج منتقل شد تا در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شده و در زمان‌های ۱، ۷ و ۱۴ روز بعد از پرتوتابی آزمایشات شمارش کلی باکتریایی و مواد ازت کل فرار (TVN) برای بررسی تأثیر پرتوتابی روی کیفیت میکروبی و شیمیایی گوشت ماهی قزل‌آلا در دمای یخچالی مورد ارزیابی قرار گیرد.

شمارش کلی باکتری: ابتدا ۲۵ گرم نمونه مخلوط گوشت از چند ناحیه در یک دستگاه مخلوط‌کن استریل

\* Modified Atmosphere Packaging

† Total volatile nitrogen

‡ Total Volatile Basic Nitrogen

گردید. سپس از طریق رابطه زیر میزان کل ازت فرار بر حسب میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه محاسبه گردید. برای ۴۰ آزمون یک نمونه شاهد که حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ گرم اکسید منیزیم بود استفاده گردید (۱۵).

$100 \times \text{مقدار مصرفی اسیدکلریدریک} / 1 \times \text{نرمال} \times \text{نرمالیت}$

$\text{اسیدکلریدریک} = \text{مقدار T.V.N بر حسب میلی‌گرم درصد}$

وزن نمونه

**آنالیز آماری:** نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام آنالیزها با Arc sin تبدیل شدند. تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 23 انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

### نتایج

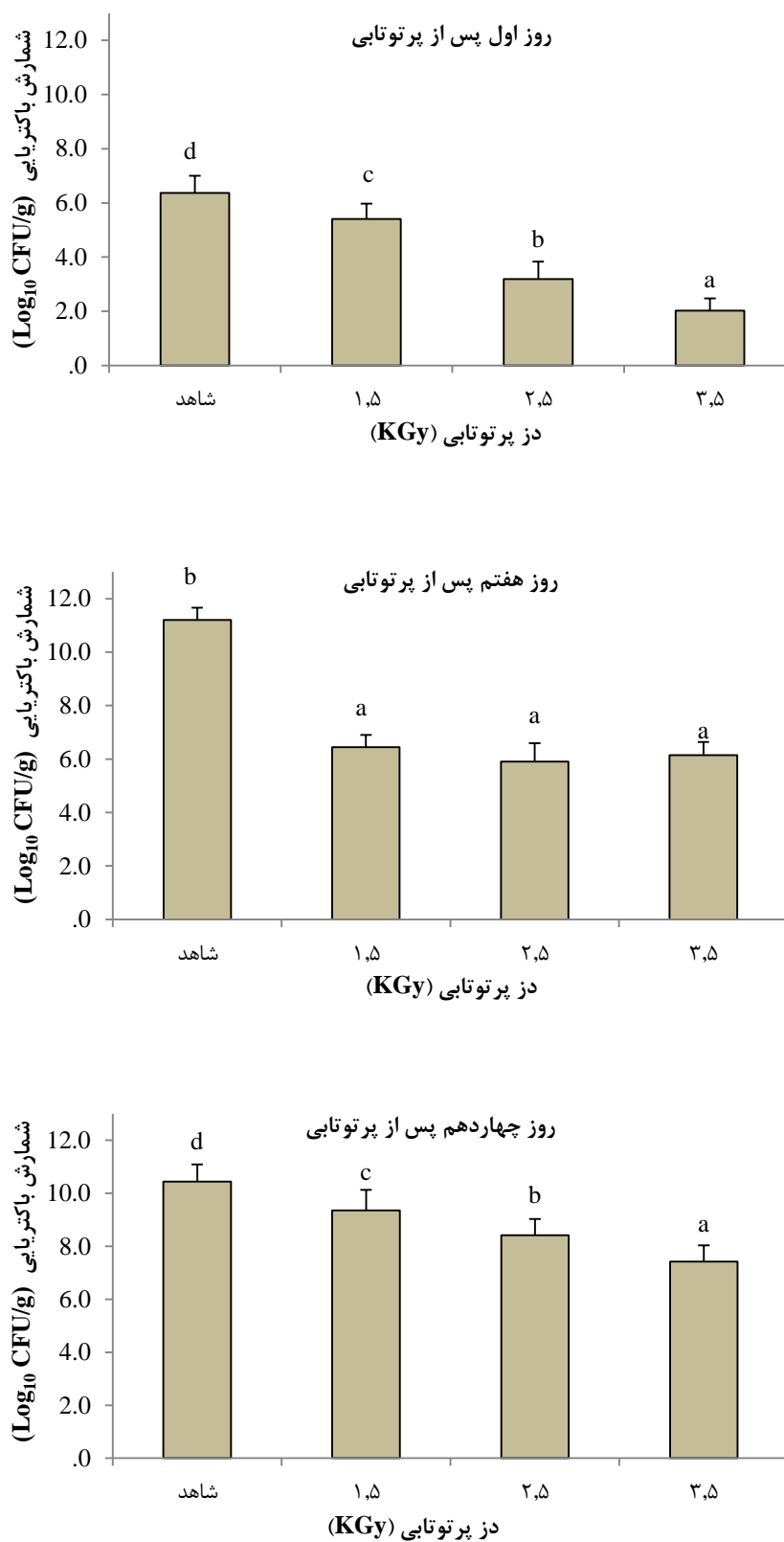
**شمارش کل باکتری:** نتایج بررسی به عمل آمده نشان داد که، با پرتودهی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان میزان بار میکروبی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش در طی مدت زمان نگهداری (روزهای ۱، ۷ و ۱۴) در گروه‌های پرتوتابی شده (دز ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ کیلوگری) با گروه پرتوندیده (صفر کیلوگری) تفاوت معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). (شکل ۱).

در روز اول نگهداری نمونه‌های ماهی با افزایش دز پرتودهی لگاریتم رشد باکتری‌ها کاهش یافت (صفر < ۱/۵ < ۲/۵ < ۳/۵ کیلوگری). ضمناً بین نمونه‌های پرتودهی شده با دز ۳/۵ Kgy و نمونه‌های پرتوندیده اختلاف میزان باکتری‌ها  $\text{Log}_{10} \text{CFU/g}$  ۴/۲۵ بود ( $p < 0.05$ ). (شکل ۱). در روز هفتم نگهداری نیز اختلاف میزان باکتری‌ها بین نمونه‌های پرتوندیده و پرتوندیده قابل توجه بود و بین میانگین لگاریتم میزان باکتری‌ها در نمونه‌های پرتوندیده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. (شکل ۱). این در حالی بود که در روز ۱۴ بعد از پرتوتابی میزان باکتری در بین کلیه گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

به همراه ۲۲۵ میلی‌لیتر رقیق‌کننده استریل (آب پیتونه) همگن گردید. از این نمونه همگن رقت‌های سریالی ده برابر، تهیه و از آنها روی محیط کشت نوترینت آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از تهیه‌ی گسترش از سوسپانسیون مربوطه بر روی محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس بر اساس ضریب تعداد کلنی شمارش شده و عکس رقت مورد بررسی و عکس حجم برداشتی، تعداد باکتری در گرم نمونه تعیین و بر حسب تعداد باکتری در هر گرم نمونه ( $\text{Log}_{10} \text{CFU/gr}$ ) ارائه گردید (۸، ۱۸).

**ازت کل فرار (TVN):** اندازه‌گیری مواد ازته فرار در نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از روش کلدال صورت گرفت. جهت تعیین TVN ۱۰ گرم از نمونه گوشت به همراه ۲ گرم اکسید منیزیم، ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر، چند عدد سنگ جوش و ۲ قطره ضد کف اکتانول به بالن تقطیر کلدال اضافه شد. سپس در داخل یک ارلن مایر با حجم ۵۰۰ سانتی‌متر مکعب که به‌عنوان ظرف گیرنده در زیر قسمت سردکننده دستگاه تقطیر قرار گرفته بود، ۵۰ میلی‌لیتر اسید بوریک ۲ درصد به همراه چند قطره معرف توشیرو (مخلوط متیل رد در برموکروزول گرین که در محیط اسیدی قرمز و در محیط قلیایی آبی می‌باشد) ریخته شد. سپس دستگاه تقطیر وصل شده و محتویات بالن تقطیر حرارت داده شد، به‌طوری که در مدت ۱۰ دقیقه به جوش آمد و بعد از آن، حرارت به مدت ۲۵ دقیقه ادامه داده شد. قسمت مبرد به‌وسیله یک لوله با قیف به داخل محلول موجود در ظرف گیرنده مربوط بود. لذا اسید ضعیف و رقیق موجود در آن، گاز آمونیاک حاصل از مرحله تقطیر را جذب نموده و رنگ آن در زمانی که محلول موجود در بشر گیرنده به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسید به آبی سبز متمایل شد. در این مرحله به‌طور همزمان، بشر از قیف گیرنده خارج شد و نیز حرارت‌دهی متوقف شد. محلول حاصل در بشر با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تیتتر شده و حجم مصرفی یادداشت

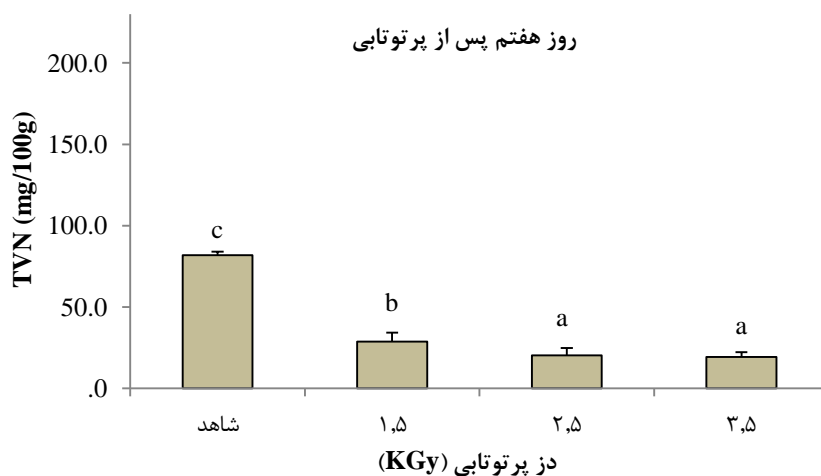
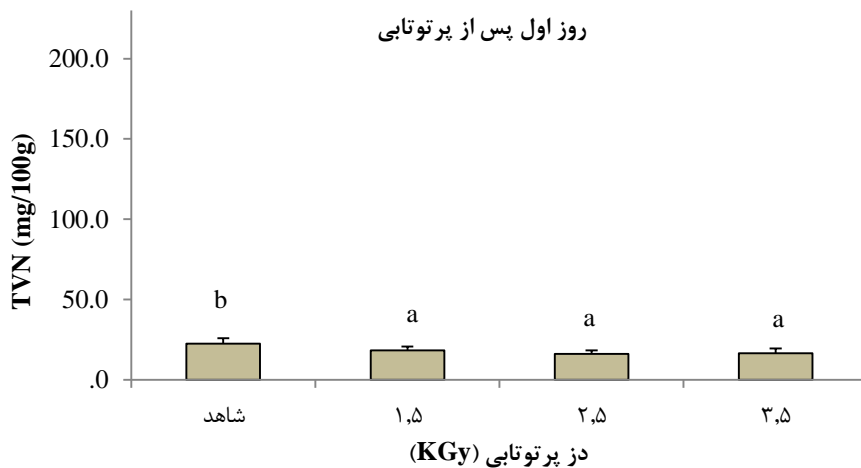
بیشترین این اختلاف بین گروه ۳/۵ کیلوگری و گروه شاهد ملاحظه شد (شکل ۱).

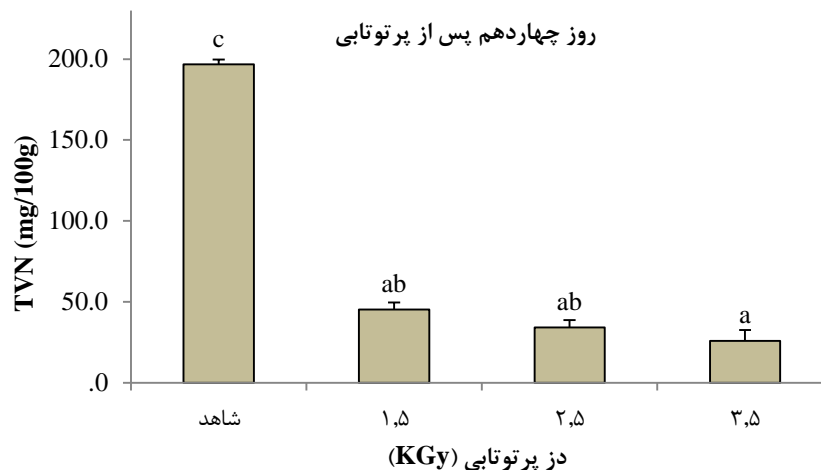


شکل ۱- میانگین تغییرات لگاریتمی شمارش کلی باکتری‌ها ( $Log_{10} CFU/g$ ) تحت تأثیر مقادیر مختلف اشعه گاما (صفر، ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ KGy) در مدت زمان نگهداری (روزهای ۱، ۷ و ۱۴) تحت شرایط یخچالی

پرتوندیده ملاحظه شد. لذا اختلاف بین میانگین مقادیر TVN در نمونه‌های پرتوندیده در مقایسه با پرتودیده از نظر آماری قابل توجه بود ( $p < 0.05$ ). در این میان بین دز ۲/۵ و ۳/۵ اختلاف آماری مشهود نبود (شکل ۲). در روز چهاردهم کمینه‌ی TVN مربوط به گروه ۳/۵ کیلوگری و حدود  $25/74 \text{ mg}/100\text{g}$  بود در حالی که بیشینه‌ی TVN متعلق به نمونه‌های پرتوندیده  $196/75 \text{ mg}/100\text{g}$  بود که این امر نشان‌دهنده اختلاف زیاد بین گروه‌های پرتودیده و پرتوندیده است. در این روز بین کلیه گروه‌های پرتودیده و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). (شکل ۲).

**ازت کل فرار (TVN):** در روز اول کمینه‌ی TVN در نمونه‌های پرتودیده (با دز  $2/5 \text{ KGy}$ )  $16/09 \text{ mg}/100\text{g}$  مشاهده گردید. در حالی که بیشینه‌ی TVN در همین روز در نمونه‌های پرتوندیده حدود  $20 \text{ mg}/100\text{g}$  بود. همچنین این نتایج نشان می‌دهد که در روز اول میزان TVN بین دزهای ۲/۵ و ۳/۵ اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. این در حالی است که بین این گروه‌ها و گروه شاهد و ۱/۵ کیلوگری اختلاف آماری معنی‌دار بود (شکل ۲). کمینه‌ی TVN در روز هفتم بعد از پرتوتابی حدود  $19/28 \text{ mg}/100\text{g}$  مربوط به گروه ۳/۵ کیلوگری و بیشینه‌ی آن با میزان  $71/83 \text{ mg}/100\text{g}$  در گروه





شکل ۲- میانگین تغییرات ازت کل فرار (TVN mg/100g) تحت تأثیر مقادیر مختلف پرتو گاما (صفر، ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ KGy) در مدت زمان نگهداری (روزهای ۰، ۷ و ۱۴) تحت شرایط یخچالی

## بحث

همواره نگهداری طولانی مدت محصولات با منشأ آبزیان با روش‌های گوناگون اهمیت زیادی داشته است. مطالعات این تحقیق نشان داد که پرتوتابی با استفاده از پرتو گاما با دزهای مختلف ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ کیلوگری به صورت مطلوبی روی کاهش میزان بار باکتری‌های مزوفیل گوشت ماهی و همچنین میزان ازت کل فرار تأثیر معنی‌داری دارد که این امر با هدف تحقیق همراستا می‌باشد. باکتری‌های پاتوژن موجود در ماهی منجمد و فرآورده‌های آن نسبت به پرتودهی از مقاومت بیشتری برخوردار هستند. اکثر مطالعات انجام شده به وسیله‌ی کمیته‌ی علمی غذا دلالت بر کاهش پاتوژن‌های بدون اسپور به میزان ۲ تا ۵ Log در ماهی و انواع فرآورده‌های ماهی تحت تأثیر کاربرد پرتودهی تا دز ۳ کیلوگری می‌باشد. پرتودهی یا پاستوریزاسیون سرد به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب کاهش مقدار پاتوژن‌های خطرناک، ضمن تغییر کم در خواص حسی و تغذیه‌ای غذا می‌شود (۱۹، ۲۰).

طی تحقیقات متعدد نشان داده شده که پرتودهی با دز ۱، ۲ و ۳ کیلوگری به ترتیب سبب کاهش ۲، ۳ و ۴ Log باکتری مزوفیل هوازی در گوشت گاو شده است. کمیته علمی غذا پیشنهاد نمود که ماهی و آبزیان تا دز ۳

کیلوگری می‌تواند پرتو داده شود (۱۱، ۲۳-۲۱). پرتودهی این مواد غذایی سبب افزایش ماندگاری، کاهش پاتوژن‌ها و غیر فعال شدن انگل‌ها و جلوگیری از فساد در انواع ماهیان خشک و دودی می‌گردد (۲۴). هدف اولیه از پرتودهی گوشت کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های پاتوژن بوده که به میزان دز و سطح آلودگی بستگی دارد. وینا (۱۹۹۳) گزارش نمود که دز بین ۳ الی ۵ کیلوگری سبب غیر فعال‌سازی باکتری‌های غیر اسپوردار در گوشت قرمز و طیور و ماهی می‌گردد (۲۵).

با توجه به این که فرایند نگهداری طولانی مدت گوشت ماهی در دمای انجماد (زیر صفر درجه سلسیوس) انجام می‌گیرد اغلب مطالعات انجام شده برای بررسی روند تغییر بار میکروبی و خصوصیات شیمیایی آن تحت تأثیر پرتوتابی در این دما انجام شده است. جوکی و خزایی (۲۰۰۹) اثر پرتو گاما (دزهای صفر، ۱ و ۲ کیلوگری) را بر بار میکروبی گوشت ماهی قزل‌آلا در طی دوره نگهداری در دمای ۱۸- درجه سلسیوس بررسی نموده و عنوان کردند که ترکیب پرتودهی در دز ۰/۵ کیلوگری و بالاتر همراه با نگهداری در دمای زیر صفر نسبت به حالت نگهداری در دمای زیر صفر و بدون کاربرد پرتودهی، در افزایش زمان نگهداری ماهی قزل‌آلا به‌طور معنی‌داری مؤثر می‌باشد. ضمن این که هیچ‌یک از دزهای بکار برده شده اثر غیر

که موجب افزایش ماندگاری این محصول در یخچال به مدت ۷ روز گردید (۲۹).

ژائو و همکاران (۲۰۱۷) در جستجوی فرایند جایگزین پاستوریزاسیون برای گوشت گاو طعم‌دار شده، نمونه‌های مورد نظر را تحت پرتودهی گاما با دوزهای صفر، ۰/۵، ۱/۵، ۳، ۴، ۶ و ۸ کیلوگری قرار دادند و خصوصیات نمونه‌ها از نظر بار میکروبی، طعم، بو و تغییرات بافتی مورد بررسی قرار گرفت که شمارش میکروبی نشان داد دوز ۴ کیلوگری برای پاستوریزه کردن نمونه‌های گوشت طعم‌دار مناسب است؛ ضمن این که طی پرتودهی با دوزهای بالاتر کیفیت طعمی و بافتی نمونه‌ها تحت تاثیر قرار گرفت (۳۰).

شاه حسینی و همکاران (۲۰۲۰) اثر پرتودهی گاما و نگهداری در شرایط انجماد را به عنوان یک روش ترکیبی برای بهبود مدت زمان ماندگاری گوشت مرغ مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که پرتودهی و کاربرد نگهداری در دمای انجماد موجب کاهش باکتری‌های مزوفیل، کلیفرم، سالمونلا و اشریشیا کولی می‌شود، اما در میزان ازت تام فرار تفاوت معناداری مشاهده نشد (۳۱).

در مطالعه حاضر برای اولین بار ویژگی‌های میکروبی و میزات TVN تحت تاثیر پرتودهی گاما و دمای نگهداری یخچالی در نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفته است. در پرتوتابی محصولات غذایی به ویژه آبزیان استفاده از دز مناسب که با کاهش شاخص‌های فساد روی کیفیت، طعم و رنگ محصول تأثیر معنی‌داری نداشته باشد، اهمیت زیادی دارد. اثرات پرتوتابی گاما توسط کوارانتا و همکاران (۱۹۸۴) روی ماهی تن، ابوتارپوش و همکاران (۱۹۹۶) روی تیلاپیا، الکهتانی و همکاران (۱۹۹۶) روی ماهی ماکرل؛ چولپارا و همکاران (۲۰۰۴) روی سیم دریا، توپپلا و همکاران (۲۰۱۱) روی صدف و هاک‌اوغلو و همکاران (۲۰۱۲) روی میگو مورد مطالعه قرار گرفته است (۹، ۳۶-۳۲). همگی این مطالعات نشان دهنده آن است که دز ۱/۵ تا ۳/۵ کیلوگری مناسب‌ترین دز برای پرتوتابی گونه‌های مختلف

قابل قبولی بر کیفیت شیمیایی و حسی گوشت ماهی نداشت (۲۶).

در مطالعه اورایی و همکاران (۲۰۱۱) اثر تابش گاما (۱، ۳ و ۵ کیلوگری) بر کیفیت میکروبی فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط انجماد (۲۰- درجه سلسیوس) طی ۵ ماه بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده تابش گاما تأثیر معنی‌داری بر کاهش جمعیت میکروارگانیسیم‌ها داشت. اما تابش با دز ۳ کیلوگری نسبت به تابش با دز ۵ کیلوگری اثر بهتری در کاهش تعداد میکروارگانیسیم‌ها داشت. به طوری که در نمونه‌های پرتوتابی شده با دوز ۱ و ۵ کیلوگری افزایش تعداد کپک و مخمر در ماه چهارم و پنجم مشاهده شد، اما در نمونه‌های پرتوتابی شده با دوز ۳ کیلوگری کپک و مخمرها در طول دوره نگهداری رشد قابل توجهی نداشتند (۲۷).

با توجه به این که انجماد ماهی در دمای زیر صفر می‌تواند موجب تغییر در خواص تغذیه‌ای گوشت ماهی شود، در مطالعه حاضر روند تغییرات میکروبی و شیمیایی گوشت ماهی قزل‌آلا تحت تاثیر پرتوی گاما و در دمای نگهداری یخچالی (۲ الی ۸ درجه سلسیوس) بررسی شده است. پیش از این در مطالعات مشاک و همکاران (۲۰۱۴) که بر روی نگهداری گوشت شترمرغ در شرایط یخچالی طی سی روز نگهداری صورت پذیرفت، نشان داده شد که پرتوی گاما با دز ۲ کیلوگری در کنترل پاتوزن‌های غذازاد نظیر سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس، کلی‌فرم و اشریشیا کولای موثر بوده و همچنین دز ۴ کیلوگری جهت کاهش رشد باکتری‌های مزوفیل هوازی، در شرایط نگهداری گوشت شترمرغ در یخچال طی ۳۰ روز توصیه شد (۲۸).

شاه حسینی و مشاک (۲۰۱۷) تغییرات بار میکروبی و کل ازت فرار را در نمونه‌های ماهی کپور علفخوار پرتودهی شده، طی نگهداری تحت شرایط یخچالی مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که میزان TVN و باکتری‌های مزوفیل هوازی در نمونه‌های پرتودیده در مقایسه با نمونه‌های پرتوندیده به طور معناداری کمتر بود

آزبان می‌باشد.

باید توجه داشت که انتخاب مقادیر کم دز پرتوتابی موجب کاهش اثر میکروبوکشی آن شده و از سوی دیگر در صورت زیاد بودن دز پرتو خطر ایجاد تغییرات شیمیایی ناخواسته در فرآورده غذایی وجود دارد. جوان و مطلبی (۲۰۱۵) اثر دوزهای مختلف پرتوی گاما (صفر، ۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵، ۳/۰، ۳/۷۵ و ۴/۵ کیلوگری) را بر ترکیبات اسید چرب فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی نمودند که با افزایش دز پرتوتابی غلظت کل اسیدهای چرب اشباع در نمونه‌های مورد بررسی افزایش یافت. بنابراین نشان داده شد که تابش گاما با دز بالای ۳/۷۵

کیلوگری موجب افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و تغییر ترکیب اسیدهای چرب در فیله ماهی خواهد شد (۳۷).

در مطالعه حاضر با توجه به این که در طول دوره پرتوتابی دز ۲/۵ کیلوگری اختلاف چندانی در میزان باکتری کل و همچنین کل ازت فرار در مقایسه با گروه ۳/۵ کیلوگری نشان نداد، بنابراین دز ۲/۵ کیلوگری به عنوان مناسب‌ترین دز برای پرتوتابی گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جهت نگهداری در دمای یخچالی پیشنهاد می‌شود که ضمن حفظ ویژگی‌های حسی این نوع از ماهی می‌تواند موجب افزایش ماندگاری آن گردد.

## References

- 1- Ashie IN, Smith JP, Simpson BK, Haard NF. Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shellfish. *Crit Rev Food Sci & Nut.* 1996; 36(1-2): 87-121.
- 2- Gram L, Huss HH. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Mic.* 1996; 33(1): 121-137.
- 3- Monteiro ML, Marsico ET, Mano SB, Teixeira CE, Canto AC, de Carvalho Vital H, et al. Influence of good manufacturing practices on the shelf life of refrigerated fillets of tilapia (*Oreochromis niloticus*) packed in modified atmosphere and gamma irradiated. *Food Sci & Nut.* 2013; 1(4): 298-306.
- 4- Rodriguez-Lazaro D, Gonzalez-García P, Gattuso A, Gianfranceschi MV, Hernandez M. Reducing time in the analysis of *Listeria monocytogenes* in meat, dairy and vegetable products. *Int J Food Mic.* 2014; 184: 98-105.
- 5- Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Cur Ppinion in Biotech.* 2002; 13(3): 262-266.
- 6- Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev.* 2013; 42(15): 6290-6307.
- 7- Monteiro CA, Moubarac JC, Cannon G, Ng SW, Popkin B. Ultra processed products are becoming dominant in the global food system. *Obesity Rev.* 2013; 14: 21-8.
- 8- Powell SM, Ratkowsky DA, Tamplin ML. Predictive model for the growth of spoilage bacteria on modified atmosphere packaged Atlantic salmon produced in Australia. *Food Mic.* 2015; 47: 111-115.
- 9- Al Kahtani HA, Abu Tarboush HM, Bajaber AS, Atia M, Abou Arab AA, El Mojaddidi MA. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in tilapia and Spanish mackerel. *J Food Sci.* 1996; 61(4): 729-33.
- 10- Aziz NH, Souzan RM, Azza AS. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the occurrence of pathogenic microorganisms and nutritive value of four principal cereal grains. *App Radiation & Isotopes.* 2006; 64(12): 1555-1562.
- 11- Brewer S. Irradiation effects on meat color—a review. *Meat Sci.* 2004; 68(1): 1-7.
- 12- Collins MV, Flick GJ, Smith SA, Fayer R, Rubendall E, Lindsay DS. The effects of E beam irradiation and microwave energy on eastern oysters (*Crassostrea virginica*) experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryotic Mic.* 2005; 52(6): 484-488.
- 13- Farkas J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. *Int J Food Mic.* 1998; 44(3): 189-204.
- 14- Loaharanu P. Irradiation as a cold pasteurization process of food. *Vet Parasit.* 1997; 1(71): 65.
- 15- Castro P, Padrón JC, Cansino MJ, Velázquez ES, De Larriva RM. Total volatile

base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food control*. 2006; 17(4): 245-248.

16- **Barbosa MJ, Morais R, Choubert G.** Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 1999; 176(3-4): 331-341.

17- **Amar EC, Kiron V, Satoh S, Watanabe T.** Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Res*. 2001; 32: 162-73.

18- **Olsen RA, Bakken LR.** Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Mic Eco*. 1987; 13:59-74.

19- **Woods RJ.** Food irradiation. *Endeavour*. 1994; 18(3): 104-108.

20- **Mashak Z, Radmehr B, Shahhoseini G, Sajadi S.** Investigating the effect of irradiation on the microbial load of ostrich meat during storage in the refrigerator. *Iran J Vet Sci*. 2009; 6(26):783-788. [In Persian]

21- **Diehl JF.** Food irradiation—past, present and future. *Radiation Phys & Chem*. 2002; 63(3-6): 211-215.

22- **Elias PS, Cohen AJ.** Recent advances in food irradiation. Sole distributor for the USA and Canada, *Elsevier Sci*. 1983.

23- **Hanis T, Jelen P, Klir P, Mnukova J, Perez B, Pesek M.** Poultry meat irradiation-effect of temperature on chemical changes and inactivation of microorganisms. *J Food Protect*. 1989; 52(1): 26-29.

24- **Radomyski T, Murano EA, Olson DG, Murano PS.** Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: A review. *J Food Protect*. 1994; 57(1): 73-86.

25- **Viena CM.** Estudo bacteriológico de extracto de pescaode refrigerado submetido a daioaco gama Niteroi. 1993;. 49.

26- **Jouki M, Khazaei N.** Effects of gamma irradiation and frozen storage on microbial load, physico-chemical qualities of salmon. *Food Sci & Thech*. 2009; 2(1): 59-70. [In Persian]

27- **Oraei M, Motalebi AA, Hoseini E, Javan S.** Effect of Gamma irradiation and frozen storage on microbial quality of Rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Iran J Fish Sci*. 2011; 10(1): 75-84.

28- **Mashak Z, Sodagari HR, Khanjari A, Shahhoseini G, Motaghifar A, DavoodabadiFarahani M.** Effect of gamma irradiation on *Cysticercus bovis* infested cattle carcasses. *Food Hygiene*. 2014; 4(15): 1-8. [In Persian]

29- **Shahhoseini R, Mashak Z.** The effect of gamma rays on shelf life of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillet in the refrigerator condition. *J Food Mic*. 2017; 3(4): 51-60. [In Persian]

30- **Zhao L, Zhang Y, Guo S, Xiong W, Xia H, Liu W, et al.** Effect of irradiation on quality of vacuum-packed spicy beef chops. *Journal of Food Quality*. 2017; 2017: 1-8.

31- **Shahhoseini G, Javanmard M, Rokni N.** Combined application of gamma irradiation and frozen technique to increase the shelf life of a chicken. *J Food Mic*. 2020; 7(3): 1-2.

32- **Abu-Tarboush HM, Al-Kahtani HA, Atia M, Abou-Arab AA, Bajaber AS, El-Mojaddidi MA.** Irradiation and postirradiation storage at 2±2 C of Tilapia (*Tilapia nilotica* × *T. aurea*) and Spanish Mackerel (*Scomberomorus commerson*): Sensory and microbial assessment. *J Food Protect*. 1996; 59(10): 1041-1048.

33- **Chouliara I, Savvaidis IN, Panagiotakis N, Kontominas MG.** Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Mic*. 2004; 21(3): 351-359.

34- **Hocaoglu A, Demirci AS, Gümüs T, Demirci M.** Effects of gamma irradiation on chemical, microbial quality and shelf life of shrimp. *Radiation Phys & Chem*. 2012; 81(12): 1923-1929.

35- **Quaranta HO, Piccini J, Perez SS.** Irradiation delayed oxidative rancidity in tuna loins. *Food Chem*. 1984; 14(2): 135-139.

36- **Thupila N, Ratana-Arporn P, Wilaipun P.** Radiation resistances and decontamination of common pathogenic bacteria contaminated in white scar oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Radiation Phys & Chem*. 2011; 80(7): 828-832.

37- **Javan S, Motalebi AA.** Changes of fatty acid profile during gamma irradiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Int J Meat Sci*. 2015; 5(1): 1-7.

## Effect of gamma irradiation on total bacterial load and total volatile nitrogen in fish rainbow trout meat during refrigerator condition

Masoud madadi<sup>1</sup>, Zohreh Mashak\*<sup>2</sup>, Gholamreza Shahhoseini<sup>3</sup>

1- Graduated of veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urimia Branch, Islamic Azad University, Urimia, Iran.

2- Associate Professor, Department of food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

3- Assistant Professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran.

Accept: March 19, 2023, Receive: May 24, 2023, Revise: June 9, 2023

### Summary

---

Aquatics, including fish, have always been one of the most perishable protein sources. For increasing storage time of the resource there are several ways including radiation. The effect of gamma irradiation was investigated on the microbial load and total volatile nitrogen of fish meat rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). At the beginning of these experiment, the fish meat is irradiated by 1.5, 2.5 and 3.5 KGry radiation doses and subsequently transferred to the refrigerator at 4°C. During the first, seventh and fourteenth days after irradiation (after transfer to the refrigerator) the total amount of bacteria and total volatile nitrogen was investigated. The results indicated a greatly reduction of amount of bacterial load and total volatile nitrogen by the use of various doses of gamma irradiation. Among the irradiated doses, 3.5 KGry showed the greatest decrease in these parameters, but considering that there was not huge difference between 2.5 and 3.5 KGry in the reduction, thus 2.5 KGry gamma irradiation is selected as a suitable dose for rainbow trout irradiation and subsequent storage in the refrigerator.

**Key words:** Rainbow trout, Gamma irradiation, Total bacterial count, Total volatile nitrogen

## تأثیر تجویز اسانس اوجی (*Pulegium Mentha*) بر درمان ورم پستان تحت بالینی گاو هلشتاین

کامل عموزاده آرائی<sup>۱</sup>، هما محمدی فرد<sup>۲</sup>، محمد اسدی<sup>۳\*</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دامپزشک عمومی، دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل، بابل، ایران.

۳- دکتری تغذیه دام، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

دریافت مقاله: ۲۲ اسفند ۱۴۰۱، بازنگری: ۱۲ خرداد ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۷ خرداد ۱۴۰۲

### چکیده

ورم پستان که از التهاب غده پستانی ناشی می‌شود، شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری می‌باشد که گاوهای شیری در سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. درمان ورم پستان در دوران شیردهی دام به دلیل مخاطرات آلودگی شیر به آنتی‌بیوتیک در گاوهای شیرده توصیه نمی‌شود. در این پژوهش از گیاه اوجی (*Pulegium Mentha*) برای درمان ورم پستان تحت بالینی گاو هلشتاین استفاده شد. بدین منظور ۵۰ رأس گاو هلشتاین مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با میانگین سنی ۴/۵ سال و در اواسط مرحله شیرواری با میانگین تولید  $20 \pm 2/7$  انتخاب شدند. پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار و بیست و پنج تکرار انجام شد که تیمارها به صورت: ۱- شاهد (بدون تزریق اسانس اوجی به کارتیه پستان) ۲- تزریق ۵ میلی‌لیتر اسانس اوجی در هر کارتیه پستان. همچنین تغییرات در میزان تولید شیر، ترکیبات شیر و شمارش سلول‌های سوماتیک و نتایج کشت باکتریایی پیش از آغاز درمان و تا ۱۸ روز بعد از خاتمه‌ی درمان، مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، تزریق اسانس اوجی به کارتیه پستان سبب بهبود میانگین میزان تولید شیر، کاهش سلول‌های سوماتیک، افزایش درصد پروتئین، چربی و لاکتوز شیر گاوها شد ( $P < 0/05$ )، هرچند از نظر حذف کلی عفونت‌های داخل پستانی بین تیمار اوجی و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. به‌طور کلی نتایج بررسی حاضر نشان داد که می‌توان از اسانس اوجی در درمان ورم پستان تحت بالینی گاوها استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** اسانس اوجی، تولید شیر، گاو هلشتاین، ورم پستان

## مقدمه

ورم پستان که از التهاب غده پستانی ناشی می‌شود، شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری می‌باشد که گاوهای شیری در سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۷). التهاب غدد پستانی با عفونت باکتریایی همراه است و تحت تأثیر عوامل متعدد مربوط به مدیریت، جایگاه و دوشش قرار می‌گیرد. این بیماری باعث کاهش تولید و کیفیت شیر می‌شود و به دلیل بیماری‌های مشترک بین انسان و دام که در آن شیر به‌عنوان حاملی برای برخی از عوامل عفونی عمل می‌کند، برای سلامت عمومی اهمیت بسیار حیاتی دارد (۲). بسته به شدت التهاب، ورم پستان را می‌توان به اشکال تحت بالینی، بالینی و مزمن طبقه‌بندی کرد و درجه آن به سن، نژاد، سیستم ایمنی و وضعیت شیردهی حیوان بستگی دارد (۱۱). بر خلاف شکل بالینی، ورم پستان تحت بالینی هیچ تغییر قابل مشاهده‌ای در کیفیت شیر یا وضعیت پستان نشان نمی‌دهد، اما تولید شیر را کاهش داده و باکتری‌ها در ترشحات ظاهر می‌شوند (۴۹). زیان‌های مالی ناشی از ورم پستان در هر دو مرحله تحت بالینی و بالینی بیماری رخ می‌دهد و شامل هزینه‌های درمان، کاهش تولید شیر و حذف زودرس دام از گله می‌شود (۵۳). شایع‌ترین پاتوژن‌های ورم پستان توسط طیف وسیعی از باکتری‌ها ایجاد می‌شوند که می‌توانند به‌عنوان محیطی (شریشیاکلی، استرپتوکوکوس دیسگالاکتیه، استرپتوکوکوس اوبریس، انتروکوکوس فکالیس و استفیلوکوکوس) طبقه‌بندی شوند (۲۱). عوامل بیماری‌زی ورم پستان معمولاً از طریق تماس پستانک‌ها با خاک، بستر، آب آلوده با مواد مدفوع و گاو به گاو منتقل می‌شوند (۴۴). عفونت از طریق فومایت‌های (ناقل غیر فعال) آلوده به شیر در هنگام شیردوشی، توسط دستان شیردوش یا دستگاه شیردوشی منتقل می‌شود (۸، ۳۰). رایج‌ترین درمان ورم پستان با تجویز آنتی‌بیوتیک داخل پستانی در قسمت‌های آلوده پستان و تزریق عضلانی است (۶). استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان ورم

پستان برای مدت طولانی ممکن است باعث ایجاد مقاومت دارویی شود که به افزایش دز آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز دارد، این عمل منجر به تجمع مقادیر زیادی آنتی‌بیوتیک در شیر و فرآورده‌های آن و انتقال آن به انسان می‌شود. ظهور سویه‌های مقاوم به دارو و همچنین وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های غذایی خطرات بهداشتی مهمی برای انسان دارد (۵۱). از طرف دیگر، بسیاری از گونه‌های باکتریایی به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در درمان ورم پستان گاو مقاوم هستند (۱۸). رشد روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی به میکروارگانیسم‌ها، توسعه و جستجوی عوامل ضد میکروبی جدید را برای مبارزه با این مشکل ضروری می‌کند. از سوی دیگر، با توجه به افزایش بالقوه مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها، محققان به دنبال مواد ضد میکروبی جدید با منشأ گیاهی به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های ناکارآمد هستند (۱۹، ۳۰). گیاهان دارویی سرشار از طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه مانند تانن‌ها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها هستند که مشخص شده در شرایط آزمایشگاهی دارای خواص ضد میکروبی هستند (۲۶، ۳۱). گزارش‌های متعددی در مورد فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گیاهی وجود دارد (۱۹). بسیاری از گیاهان برای درمان اختلالات گوارشی، بیماری‌های تنفسی و عفونت‌های پوستی یافت شده‌اند (۴۳). اوجی یا پونه کوهی با نام علمی *Pulegium Mentha* و از خانواده Labiatae می‌باشد. این خانواده شامل ۲۰ گونه است که در سراسر دنیا پراکنده بوده و در ایران در مناطق شمالی ایران در مازندران و گیلان به‌طور خودرو رشد می‌کند. ماده مؤثره مهم پونه کوهی پولگون و ماده ضد عفونی‌کننده آن منتول می‌باشد (۳). همچنین پونه کوهی حاوی فنول، تیمول، کارواکرول، هیدروکربن‌های مونوترپن، پی‌سیمن و آلفاترپین است که جزو مواد با اثر ضد میکروبی و باکتری طبیعی بی‌خطر طبقه‌بندی می‌شوند (۵۴، ۲۸، ۴). گزارش شده است که کارواکرول، یکی از اجزای اصلی ضد باکتری اسانس پونه کوهی،

### مواد و روش‌ها

(۴۵). در این پژوهش تأثیر اسانس اوجی به صورت تزریق داخل پستانی بر ورم پستان تحت بالینی گاوهای هلشتاین مورد ارزیابی قرار گرفت.

مطالعه حاضر در یک دامداری صنعتی شیری در اطراف کرج با ظرفیت ۵۰۰ رأس گاو دوشا صورت گرفت. در طی مطالعه ۵۰ رأس از گاوهایی که میانگین چهار رکوردگیری سلول‌های سوماتیک (SCC) شیر آنها بیشتر از ۳۰۰,۰۰۰ در هر میلی‌لیتر بود انتخاب شدند (۴۵). میانگین سنی گاوهای مورد مطالعه ۴/۵ سال با سه شکم زایش و همگی در اواسط مرحله شیردهی قرار داشتند. گاوهای مورد مطالعه به شکل بالینی در سلامتی کامل بودند و هیچ‌گونه علائمی از بیماری‌های دیگر را نشان نمی‌دادند و به لحاظ وضعیت فیزیولوژیکی در شرایط مطلوبی به سر می‌بردند. یافتن موارد تحت بالینی با کمک آزمون تشخیص سریع، آزمون ورم پستان کالیفرنایی (CMT) صورت گرفت. بر این اساس گاوهایی با ورم پستان تحت بالینی به شکل تصادفی در دو گروه شاهد و گروه درمان با اوجی با ۲۵ تکرار تقسیم شدند. تیمارها شامل: ۱- کنترل (بدون تزریق اسانس اوجی به کارتیه پستان) ۲- تزریق ۵ میلی‌لیتر اسانس اوجی در هر کارتیه پستان. (جدول ۱) نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس اوجی مورد استفاده در این پژوهش را با دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی نشان می‌دهد.

زیست لایه را در مرحله رشد اولیه مهار می‌کند و از تشکیل زیست لایه‌های بالغ جلوگیری می‌کند. همچنین ترکیبات فنلی موجود در اسانس پونه کوهی با تغییر سطح سلولی باکتری، از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند، که ممکن است از چسبندگی باکتری به سلول‌های اپیتلیال پستان جلوگیری کند (۳۷). از اهمیت استفاده از گیاهان دارویی می‌توان به عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا نسبت به آنها، نداشتن اثرات سوء بر حیوان و محیط زیست (۴۶) و نیز باقی‌نماندن بقایای مضر آن در فرآورده‌های تولیدی و مقرون به صرفه بودن اشاره کرد (۳). بسیاری از این گیاهان دارویی نیز برای درمان گاو، گوسفند، طیور، اسب و خوک استفاده می‌شوند (۴). علاوه بر این، هیچ گزارشی مبنی بر مقاومت ضد میکروبی در برابر این فایتوبیوتیک‌ها ثبت نشده است که احتمالاً به دلیل مکانیسم‌های متعدد عمل آنهاست که به‌طور بالقوه از انتخاب سویه‌های مقاوم باکتری جلوگیری می‌کند (۴۸). تعداد زیادی از مطالعات منتشر شده در زمینه درمان ضد میکروبی با استفاده از محصولات طبیعی (۳۸، ۱۰)، از جمله مطالعات در مورد اثر ضد میکروبی محصولات گیاهی بر پاتوژن‌های جدانشده از ورم پستان وجود دارد (۱۴، ۱۵). گزارش شده که اسانس آویشن شیرازی سبب کاهش رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت شد (۹). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، تجویز اسانس آویشن شیرازی بر ورم پستان تحت بالینی منجر به حذف باکتری‌های مولد ورم پستان شد

جدول ۱- ترکیب شیمیایی اسانس اوجی در آنالیز GC/MS

نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	درصد ترکیب
پولگون	۲۰/۱۱	۳۷/۹۶
منتول	۱۷/۸۸	۱۸/۶۶
کارواکرول	۱۵/۳۶	۱۳/۷۰
تیمول	۱۴/۶۶	۱۱/۸۰
ترپینن	۱۳/۳۱	۱۰/۸۰
آلفا ترپینن	۱۳/۰۹	۲/۹۰
آلفا پینن	۱۰/۱۴	۰/۷۶
بی‌سیمن	۹/۸۸	۰/۴۸

از کارتیته‌هایی که با درجه‌ی بالایی از (CMT) قابل تشخیص بودند، پس از ضد عفونی کردن سر پستانک‌ها و دور ریختن پیش دوشش‌ها، نمونه‌ی شیر اخذ گردید. نمونه‌ها در کنار یخ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و ظرف مدت کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. از هر کارتیته سه نمونه شیر تهیه شد که از دو نمونه برای کشت باکتریایی و از یک نمونه برای آزمایش ترکیبات شیر و شمارش سلول‌های سوماتیک استفاده شد. یکی از دو نمونه‌ی تهیه شده برای آزمون باکتریایی جهت پشتیبانی از نتایج آزمایشگاه به صورت منجمد شده نگهداری شد. همزمان با نمونه‌گیری، میزان تولید شیر هر گاو به طور جداگانه ثبت می‌شد. تغییرات در میزان تولید شیر، ترکیبات شیر و شمارش سلول‌های سوماتیک و نتایج کشت باکتریایی پیش از آغاز درمان و تا ۱۸ روز بعد از خاتمه‌ی درمان، مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

به منظور تعیین ترکیبات شیر گاوها، به میزان ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر شیر تهیه و به آزمایشگاه ارسال شد. غلظت‌های چربی، پروتئین و لاکتوز توسط دستگاه میکرواسکن اندازه‌گیری شدند. آنالیز شمارش سلول‌های سوماتیک با روش دستی صورت گرفت (۴۵). بدین منظور بعد از تهیه‌ی گسترش نمونه‌های شیر بر روی لام شیشه‌ای، شمارش سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. سلول‌های سوماتیک شامل، نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، پلاسماسل و اپیتلیال سل هستند. پیش از درمان انتهای سر پستان توسط سوآپ پنبه‌ای با الکل ۹۵ درجه تمیز شد. بعد از گذشت ۱۸ روز از آغاز درمان تغییرات شیر، شمارش سلول‌های سوماتیک، میزان تولید و کشت باکتریایی بررسی شدند. پس از انتقال نمونه‌های گرفته شده به آزمایشگاه سانتی‌یوژن ۳۰۰۰ دور برای ۳ دقیقه بر گرم صورت گرفت و توسط سوآپ استریل از نمونه‌ها بر روی محیط‌های متداول و به صورت استاندارد کشت شد. در این مطالعه از ماده دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان ماده امولوسی‌فایر برای رقیق نمودن

اسانس استفاده شد و بر اساس آزمایش از رقتی از این ماده استفاده شد که خاصیت ضد میکروبی نداشته باشد. پس از تهیه لوله کشت *E. coli* با رقت ۱:۲۵۰ از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها و ترکیب رقیق شده اسانس با استفاده از حلال دی‌متیل سولفوکسید در ۹ لوله در پیچ‌دار استریل (به جز لوله شماره ۱) به میزان ۱ سی‌سی ترکیب رقیق شده اسانس را پس از تکان دادن به لوله شماره ۱ و ۲ افزوده و پس از تکان دادن لوله شماره ۲ به میزان ۱ سی‌سی از محلول این لوله را به لوله شماره ۳ انتقال داده و این روند تا لوله شماره ۹ ادامه یافت و در نهایت ۱ سی‌سی از محلول شماره ۹ دور ریخته شد. پس از این مرحله به میزان ۱ سی‌سی سوسپانسیون میکروبی با رقت ۱:۲۵۰ مقایسه شده با استاندارد نیم مک فارلند، به لوله‌های ۲ تا آخر افزوده شد و درب لوله‌ها محکم بسته شد و داخل گرمخانه ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. برای قرائت نتایج از سمت لوله شاهد، لوله‌ها را نگاه کرده و آخرین لوله شفاف به عنوان MIC انتخاب شد که دلیل بر عدم رشد باکتری در آن لوله‌ها می‌باشد. برای تأیید این نتیجه علاوه بر لوله MIC، از یک لوله قبل و یک لوله بعد از آن نیز بر روی محیط ژلوز خوندار آگار کشت داده شد و پس از آن ۲۴ ساعت غلظت لوله‌ای که یک کلونی یا حداکثر سه در محیط ایجاد کرده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۴۵). لازم به ذکر است که در این آزمایش لوله شماره ۱ شاهد منفی (از نظر رشد) است، که حاوی ۱ سی‌سی سوسپانسیون میکروبی با رقت ۱:۲۵۰ و یک سی‌سی ترکیب رقیق شده اسانس اوجی می‌باشد، که با وجود دارا بودن باکتری، به دلیل حضور اسانس اوجی و نبود محیط کشت شفاف می‌باشد. لازم به ذکر است جهت اطمینان از نتایج حاصل، آزمایش MIC برای هر نمونه دوبار انجام شد و در هر بار نتایج تقریباً مشابهی به دست آمد.

**واکاوی داده‌ها:** پژوهش حاضر، با دو تیمار و بیست و پنج تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) انجام شد. رویه GLM برای تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از

میزان تولید شیر در هر وعده پیش از درمان، یک هفته پس از درمان و ۱۸ روز بعد از درمان مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، میانگین میزان تولید شیر در گروه شاهد از ۱۹/۸۹ کیلوگرم قبل از درمان به ۱۸/۵۹ کیلوگرم در یک هفته بعد از درمان و ۱۷/۷۸ کیلوگرم بعد از گذشت ۱۸ روز بعد از درمان رسید. در گروه درمان میانگین میزان تولید شیر در زمان قبل از درمان ۲۰/۶۷ کیلوگرم بود که بعد از گذشت یک هفته به ۱۹/۵۳ کیلوگرم کاهش پیدا کرد، ولی بعد از گذشت ۱۸ روز به ۲۱/۸۸ کیلوگرم افزایش یافت (جدول ۲). از طرفی دیگر، اختلاف معنی‌داری در ۱۸ روز پس از تجویز اوجی از نظر میزان شیر تولیدی وجود داشت ( $P < 0/05$ ).

نرم‌افزار SAS (2003) و برای تعیین تفاوت‌های معنی‌دار از آزمون‌های چندگانه دانکن استفاده شد.

$$Y_{ij} = u + T_i + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  = هر مشاهده از متغیر مورد اندازه‌گیری

$\mu$  = میانگین کل

$T_i$  = اثر تیمار  $i$

$e_{ij}$  = اثر خطای آزمایشی مربوط به تیمار  $i$  ام در تکرار

زام

### نتایج

ترکیب شیمیایی اسانس اوجی در جدول ۱ آمده است. نتایج آنالیز اوجی نشان می‌دهد که بیشترین ماده موثره موجود در اوجی به ترتیب پولگون، منتول، کارواکرول، تیمول، ترپینن بود.

جدول ۲- تأثیر اسانس اوجی بر روی میزان تولید شیر (کیلوگرم) قبل و بعد از درمان

نوع درمان	قبل از درمان	۷ روز پس از درمان	۱۸ روز پس از درمان	درصد تغییر
شاهد	۱۹/۱±۸۹/۹۲	۱۸/۰±۵۹/۹۹	۱۷/۱±۷۸/۵۵ <sup>b</sup>	-۱۰/۶۱
حاوی اوجی	۲۰/۱±۶۷/۷۱	۱۹/۱±۵۳/۱۷	۲۱/۲±۸۸/۰۱ <sup>a</sup>	+۵/۸۵
P-Value	۰/۶۷۸	۰/۵۱۱	۰/۰۱۱	

جدول ۳- تأثیر اسانس اوجی بر روی ترکیبات شیر قبل و بعد از درمان

نوع درمان	قبل از درمان	۷ روز پس از درمان	۱۸ روز پس از درمان
سلول‌های سوماتیک			
شاهد	۶۴۱۸۸۸	۳۱۱±۵۶/۴۳۳ <sup>a</sup>	۲۵۶±۵۱۹۷۶۳ <sup>a</sup>
حاوی اوجی	۶۳۹۲۲۷	۲۸۸±۵۱۰۳۷۶ <sup>b</sup>	۲۸۷±۴۸۴۱۱۶ <sup>b</sup>
P-Value	۰/۴۱۸	۰/۰۲۸	۰/۰۰۱
درصد پروتئین			
شاهد	۲/۰±۸۸/۲۱	۲/۰±۷۴/۱۷ <sup>b</sup>	۲/۰±۷۱/۲۱ <sup>b</sup>
حاوی اوجی	۲/۰±۸۴/۱۹	۳/۰±۱۷/۲۴ <sup>a</sup>	۳/۰±۱۹/۱۱ <sup>a</sup>
P-Value	۰/۷۱۸	۰/۰۴۶	۰/۰۲۹
درصد چربی			
شاهد	۲/۰±۸۰/۲۱	۲/۰±۷۸/۱۸ <sup>b</sup>	۲/۰±۷۶/۲۱ <sup>b</sup>
حاوی اوجی	۲/۰±۸۸/۱۹	۳/۰±۰۶/۱۳ <sup>a</sup>	۳/۰±۱۳/۰۹ <sup>a</sup>
P-Value	۰/۸۹۶	۰/۰۴۱	۰/۰۴۴
درصد لاکتوز			
شاهد	۴/۰±۶۷/۲۷	۴/۰±۶۵/۳۱	۴/۰±۵۰/۲۷ <sup>b</sup>
حاوی اوجی	۴/۰±۷۱/۱۷	۴/۰±۸۸/۱۳	۵/۰±۰۱/۲۸ <sup>a</sup>
P-Value	۰/۶۸۷	۰/۵۴۶	۰/۰۰۱

نتایج نشان دادند که ۷ و ۱۸ روز پس از درمان گاوهای مبتلا به ورم پستان، تعداد سلول‌های سوماتیک کاهش،

اطلاعات حاصل از تأثیر اسانس اوجی بر روی ترکیبات شیر قبل و بعد از درمان گاوها در جدول ۳ آمده است.

۶۸ درصد (۱۷ نمونه از ۲۵) بود و نسبت به گروه شاهد تعداد عفونت بیشتری حذف شده است. در گروه درمانی اوجی حذف موارد آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به ترتیب ۶۸/۴۲ و ۷۰ درصد بود و با افزایش زمان پس از درمان نیز تعداد این باکتری‌ها کاهش یافت. در گروه شاهد این نتایج در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به ترتیب ۲۷/۷۷ و ۳۷/۵۰ درصد بود.

درصد پروتئین و چربی شیر نیز افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). علاوه بر این درصد لاکتوز شیر در زمان ۱۸ روز پس از درمان نیز بهبود یافت ( $P < 0/05$ ).

نتایج مربوط به تأثیر اسانس اوجی در حذف کلی عفونت‌های داخل پستانی در جدول ۴ و ۵ آمده است. بعد از تجویز داخل پستانی اوجی و درمان به مدت ۳ روز، میزان عفونت داخل پستان کاهش یافت. به طوری که درصد حذف عفونت داخل پستانی برای گروه حاوی اوجی،

جدول ۴- تأثیر اسانس اوجی در حذف کلی عفونت‌های داخل پستانی

نوع درمان	تعداد عفونت	حذف عفونت	درصد حذف عفونت
شاهد	۲۵	۹	$36 \pm 0/87^b$
حاوی اوجی	۲۵	۱۷	$68 \pm 1/14^a$
P-Value			۰/۰۰۱

جدول ۵- تأثیر اسانس اوجی در حذف کلی عفونت‌های داخل پستانی

نوع درمان	قبل از درمان	۷ روز پس از درمان	۱۸ روز پس از درمان	درصد حذف
<b>استرپتوکوک</b>				
شاهد	۸	۶	۵	$37/50 \pm 1/70^b$
حاوی اوجی	۱۰	۶	۳	$70 \pm 0/97^a$
P-Value				۰/۰۰۱
<b>استافیلوکوک</b>				
شاهد	۱۸	۱۶	۱۳	$27/77 \pm 0/47^b$
حاوی اوجی	۱۹	۱۵	۶	$68/42 \pm 2/11^a$
P-Value				۰/۰۰۱
<b>استرپتوکوک + استافیلوکوک</b>				
شاهد	۲۶	۲۲	۱۸	$30/76 \pm 0/81^b$
حاوی اوجی	۲۹	۲۱	۹	$68/96 \pm 2/61^a$
P-Value				۰/۰۰۱

آنها به دلیل حذف شیر از حیوانات تحت درمان است (۴۱). اطلاعات در رابطه با اثر تجویز اسانس اوجی بر میزان تولید شیر بسیار اندک است. با این حال، مطالعه تاجیک و همکاران (۲۰۱۲) نشان می‌دهد که تجویز اسانس آویشن شیرازی به کارتیبه پستان موجب افزایش میانگین تولید شیر گاوها می‌شود (۴۵). تاکنون پژوهشی مبنی بر اثر اسانس اوجی بر افزایش شیر در گاو وجود ندارد. در بررسی حاضر گروه دریافت‌کننده اوجی ۱۸ روز پس از درمان نسب به گروه شاهد شیر بیشتری تولید

## بحث

ورم پستان به‌عنوان مهم‌ترین و پرهزینه‌ترین نوع بیماری در گاوهای شیری در نظر گرفته شده است، که تلفات آن نیمی از کل هزینه‌های بهداشتی در کل دامداری را تشکیل می‌دهد (۲۳). در تحقیقی که توسط Sewalem و همکاران (۲۰۰۶) صورت گرفت، گزارش شده است که وجود ورم پستان به گروه‌هایی از گاوهای با تولید شیر بالا مرتبط است که نشان‌دهنده زیان‌های مالی زیادی برای تولیدکنندگان گاوهای شیری است که ضرر

نمودند. جهت تعیین علت دقیق این عمل به پژوهش‌های بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

Larson و همکاران (۱۹۸۰) نشان دادند که ورم پستان سبب تغییرات در ترکیب شیر می‌شود. این تغییرات اولاً ناشی از کاهش فعالیت سنتز اجزای اصلی شیر (مانند چربی، لاکتوز و کازئین) و ثانیاً افزایش حضور عناصر خونی به دلیل واکنش التهابی (مانند پروتئین‌ها، آلبومین سرم و ایمونوگلوبولین‌ها، کلرید و سدیم) است (۲۴). با این حال، سیستم‌های قیمت‌گذاری فعلی شیر بیشتر بر بازده کل چربی و پروتئین کل (یا درصد) و شاخص لیپولیز شیر تحویلی تکیه دارند. بنابراین تنها تغییرات در این پارامترها ممکن است پیامدهای اقتصادی در مزرعه داشته باشد (۱۷). Arief و Nurdin در سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ دریافتند که درمان با گیاهان دارویی احتمالاً با تغییر تعادل میکروب در شکمبه نسبت داده می‌شود. گیاهان دارویی حاوی ساپونین هستند که می‌توانند به تعادل میکروب در شکمبه با تعداد کم میکروب‌های با پتانسیل بیماری‌زایی کمک کنند. این وضعیت باعث pH مطلوب مایع شکمبه می‌شود. این شرایط اکولوژی شکمبه بهتری را تشکیل می‌دهد و نتایج آزمایش آزمایشگاهی برای باکتری‌های شکمبه، غلظت آمونیاک و اسید چرب فرار در این تیمارها بهترین نتایج را به دست می‌دهد، علاوه بر این، شرایط اکولوژی شکمبه بر کیفیت و کمیت تولید گاوهای شیری تأثیر می‌گذارد (۳۳). تغذیه مناسب نشخوارکنندگان به دو عامل بستگی دارد: اسید چرب فرار و جمعیت میکروارگانیسم بزرگ در شکمبه. در مطالعه‌ی Kalscheur و همکاران و Wang و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشخص گردید که جمعیت زیادی از میکروارگانیسم‌ها مسئول افزایش تولید اسید چرب فرار (اسید استیک و اسید پروپیونیک) هستند. اسید استیک عامل پیش‌ساز چربی شیر و اسید پروپیونیک عامل سنتز گلوکز است (۲۰، ۵۰).

در مطالعه‌ی Nurdin (۲۰۱۰) مشخص شد که گیاهان دارویی به دلیل ترکیب آنتی‌اکسیدانی و پتانسیل ضد

التهابی که دارند می‌توانند نفوذپذیری سلول‌های آلوتولی را افزایش داده و به تعادل اکولوژیکی شکمبه کمک کنند (۳۴). نتایج این پژوهش نشان داد که مکمل‌های گیاهی به طور معنی‌داری بر وضعیت ورم پستان تأثیر می‌گذارند که همسو با نتایج مطالعه‌ی Nurdin و همکاران (۲۰۱۱) بود. آنها گزارش کردند استفاده از مکمل‌های گیاهی با بازگرداندن ترکیبات شیر به حالت طبیعی همراه بود و گیاهان می‌توانند موارد ورم پستان را کاهش دهند. این اثر مثبت می‌تواند ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی (آلکالوئید، ساپونین، فلاوانوئید و تری‌پنوئید) باشد که می‌تواند نفوذپذیری سلول‌های آلوتول را افزایش داده و استقامت بدن را افزایش دهد. در راستای پژوهش حاضر، تاجیک و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که میانگین شمارش سلول‌های سوماتیک از ۶۳۱۸۱۸ عدد سلول در یک میلی‌لیتر شیر پیش از تجویز آویشن شیرازی به ۵۲۰۴۵۴ عدد سلول در یک میلی‌لیتر شیر در هفت روز بعد از درمان کاهش یافت. همین‌طور در گروه درمانی حاوی اسانس آویشن، میانگین شمارش از ۶۲۶۴۷۰ عدد سلول قبل از درمان به ۴۹۴۱۱۷ عدد سلول یک هفته بعد از درمان کاهش یافت. در مطالعه حاضر اسانس اوجی به طور نسبی باعث کاهش التهاب بافت پستان و کاهش تعداد سلول‌های سوماتیک شد. آنها گزارش کردند ۱۸ روز پس از تجویز اسانس آویشن به کارتیبه گاوهای مبتلا به ورم پستان تعداد سلول‌های سوماتیک شیر در گروه درمان به نصف میزان آن در قبل از درمان کاهش یافت. همچنین در گروه شاهد نیز کاهش محسوس تعداد سلول‌های سوماتیک در روزهای ۷ و ۱۸ پس از درمان مشاهده گردید (۴۵).

در مطالعه‌ی توغدیری و همکاران (۲۰۲۲) مشخص گردید که سلول‌های سوماتیک عمدتاً سلول‌های اپیتلیال ترشح‌کننده شیر هستند که از پوشش غده و گلبول‌های سفید خون (لکوسیت‌ها) که در پاسخ به آسیب یا عفونت وارد غده پستانی شده‌اند تشکیل شده‌اند (۴۶). سلول‌های سوماتیک شیر شامل ۷۵ درصد لکوسیت‌ها، یعنی

این، کنترل شیری که حاوی باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی است، بسیار دشوار بوده است (۷، ۳۶). در تحقیق دیگری Lee و همکاران (۲۰۰۷) و Martin و همکاران (۲۰۰۱) نتیجه گرفتند که جایگزین دیگر برای افزایش دفاع بدن، مکمل‌های گیاهان دارویی بود که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی دارند. این گیاهان برای مدت طولانی توسط بسیاری از افراد برای غلبه بر التهابی که در انسان رخ می‌دهد استفاده می‌شود (۲۵، ۲۹).

با این حال، همسو با نتایج حاضر آخوندزاده و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که، غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی تأثیر مهارکنندگی بر میزان رشد باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت داشت (۹). همچنین در مطالعه‌ی تاجیک و همکاران (۲۰۱۲) گزارش گردید که تجویز اسانس آویشن شیرازی توانسته است در ۶۸ درصد از موارد ورم پستان تحت بالینی منجر به حذف عوامل عفونی باکتریایی موجود در شیر گردد. در این بین بیشترین تأثیر این اسانس بر روی باکتری *استرپتوکوکوس آگلانتیه* (۴۲/۷۱ درصد) و در درجه بعدی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۶۶/۶۶ درصد) بوده است (۴۵). در پژوهشی دیگر که توسط زهرایی صالحی و همکاران (۲۰۰۵) بر روی اثرات آنتی‌باکتریال آویشن شیرازی بر عوامل اصلی ایجادکننده ورم پستان گاو (محیطی و مسری) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی این ترکیب در مورد سویه‌های مولد ورم پستان بسیار بیشتر از سویه‌های استاندارد بود (۵۲). در مطالعات محبوبی و حقی (۲۰۰۸) و عزیزخانی و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت ضد باکتریایی خانواده نعنایان علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان گزارش شده است (۲۸، ۵). همچنین در آزمایشی که توسط Okoh و همکاران (۲۰۱۰) بر روی اثرات ضد باکتریایی رزماری انجام شد، نشان داده شد که اسانس گیاه رزماری در محدوده غلظتی معین دارای اثر آنتی‌باکتریایی است. با افزایش غلظت

نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، گلبول‌های قرمز و ۲۵ درصد سلول‌های اپیتلیال هستند که با مطالعه Sharma (۲۰۱۱) همخوانی دارد (۴۲). در تحقیق دیگری که توسط Cho و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت مشخص شد که سلول‌های اپیتلیال به‌طور معمول ترشح می‌شوند، اما در طول عفونت، تعداد آنها افزایش می‌یابد. گلبول‌های سفید به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی برای مبارزه با عفونت و کمک به ترمیم بافت آسیب‌دیده عمل می‌کنند. در طول التهاب (ورم پستان) افزایش عمده تعداد سلول‌های سوماتیک به دلیل هجوم نوتروفیل‌ها به شیر برای مبارزه با عفونت است و بیش از ۹۰ درصد تخمین زده شده است (۱۲).

Kim و همکاران (۲۰۰۹) دریافتند که *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یک پاتوژن اصلی عامل ورم پستان تحت بالینی در گاو شناخته شده است که در اثر کلونیزاسیون و درونی شدن آن در سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال غدد پستانی ایجاد می‌شود (۲۲).

اثر ممانعت‌کنندگی رشد میکروبی گیاهان دارویی برای مدت‌های طولانی است که شناخته شده و اخیراً مورد توجه بسیاری از پژوهشگران بوده است. در مطالعه‌ی محبوبی و حقی در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که کارواکرول و تیمول موجود در اسانس اوجی بیشترین اثرات ضد میکروبی را در میان این ترکیبات دارند (۲۸). از طرفی دیگر Gravert (۱۹۸۷) در تحقیقی نتیجه گرفت که بهبود بافت پارانشیمی غدد پستانی در ورم پستان حیوانات را می‌توان با آنتی‌بیوتیک‌ها انجام داد، در واقع بر شرایط ورم پستان با پاسخ ایمنی بدن غلبه می‌شود (۱۶). معمولاً درمان دارویی ورم پستان، تزریق آنتی‌بیوتیک از داخل پستانی است. اما کنترل شیر حاوی باقیمانده آنتی‌بیوتیک بسیار مشکل می‌باشد. این تلاش این فرصت را افزایش داد که بقایای آنتی‌بیوتیک در محصولات دامی وجود داشته باشد و ماده متابولیکی در بدن تولید کند، سلامت عمومی را به خطر می‌اندازد. اغلب، آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق با قوانین قابل اجرا استفاده نشده است. علاوه بر

گرفت که کارواکروول عملکرد غشاء سلولی را از طریق تغییر در نفوذ پذیری کانال‌های غشایی مختل کرده و با تغییر در شیب غلظت یونی منجر به توقف و اختلال در عملکرد سلول‌های باکتری و مرگ آنها می‌شود (۱۳).

#### نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تزریق اسانس اوجی به میزان ۵ میلی‌لیتر کارتیه پستان سبب بهبود میانگین میزان تولید شیر، کاهش سلول‌های سوماتیک، افزایش درصد پروتئین، چربی و لاکتوز شیر گاوها شده است. همچنین تجویز اسانس اوجی به کارتیه پستان سبب کاهش عفونت‌های داخل پستانی و کاهش باکتری‌های مولد ورم پستان شد. به‌طور کلی نتایج بررسی حاصل نشان داد که می‌توان از اسانس اوجی در درمان ورم پستان تحت بالینی گاوها استفاده نمود.

اسانس اثر آنتی‌باکتریایی هم افزایش یافته است. این عمل می‌تواند به دلیل افزایش میزان غلظت مواد مؤثره باشد که با افزایش غلظت اسانس میزان آنها افزایش می‌یابد (۳۵). در مطالعه‌ای که توسط Safi thria و همکاران (۲۰۱۱) به‌منظور بررسی اثرات آنتی‌باکتریایی سیر با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد بر روی باکتری‌های مولد ورم پستان در گاو انجام شد، مشخص شد که در غلظت‌های بالاتر اسانس سیر، اثرات مهاری بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* بیشتر است (۳۹). از دلایل کاهش باکتری در این پژوهش می‌توان به حضور ترکیبات فنلی و ضد میکروبی مثل تیمول، کارواکروول پی‌سیمن و ترپینن اشاره کرد که با مطالعه‌ی زهرایی صالحی و همکاران (۲۰۰۵) همخوانی دارد. De.Sousa (۲۰۱۶) در تحقیق خود نتیجه

#### References

- 1- Ahmad I, Aqil F. In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESβL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiol. Res.* 2007; 162: 264-275.
- 2- Ahmady M, Kazemi S. Detection of the enterotoxigenic genes (sei, sej) in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran. *Comp. Clin Pathol.* 2013; 22(4): 649-654.
- 3- Amozadeh Araee K, Ghoorchi T, Toghory A, Asadi M, Mehrani K. The effect of different levels of *Mentha Pulegium* on performance, nutrient digestibility, rumination behavior, blood and rumen parameters of dalagh ewes. *J. Anim. Pro.* 2023; 25(1): 71-81. [In Persian]
- 4- Ananda Baskaran S, Kazmer, GW, Hinckley L, Andrew SM, Venkitanarayanan K. Antibacterial Effect of Plant-Derived Antimicrobials on Major Bacterial Mastitis Pathogens in Vitro. *J. Dairy Sci.* 2009; 92(4):1423-29.
- 5- Azizkhani M, Misaghi A, AkhondZadeh Basti A, Gandomi H, Hosseini H. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Int. J. Food Microbiol.* 2013; 163(2-3): 159-165.
- 6- Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis *J. Dairy Sci.* 2006; 89: 1877-1895.
- 7- Barton MD, Hart WS. Public Health Risks: Antibiotic Resistance. Review. *Asian- Aust. J. Anim. Sci.* 2001; 14(3): 414-442.
- 8- Barua M, Prodhana MAM, Islam K, Chowdhury S, Hasanuzzaman M, Imtiaz MA, et al. Seasonal effects on milk yield, erythrocytic and leukocytic indices of Kankrej cattle (*Bos indicus*). *Vet. World.* 2014; 7: 483-488.
- 9- Basti AA, Misaghi A, Khaschabi D. Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimorium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Science and Technol.* 2007; 40: 973 - 81.
- 10- Boldootar D, El-Seedi HR, Findakly M, Jabri S, Javzan B, Choidash B, et al. Antigenotoxic and antioxidant effects of the Mongolian medicinal plant *Leptopyrum fumarioides* (L): An in vitro study. *J. Ethn-*

*nopharmacol.* 2014; 155: 559–606.

- 11- **Bradley AJ.** Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.* 2002; 164: 116–128.
- 12- **Cho BW, Cha CN, Lee SM, Kim MJ, Park JY, Yoo CY, et al.** Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J Vet Res.* 2015; 55(4): 253-257.
- 13- **De Sousa R.** Plant-based pesticides: Potential of apiaceae essential oils. PhD Thesis. *Universidade do Minho (Portugal).* 2016; 1: 110.
- 14- **Dorman HJD, Deans SG.** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 88: 308–316.
- 15- **Gopinath SM, Suneetha TB, Mruganka VD.** Chemical prophylaxis and antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of some medicinal plants against bovine mastitis. *Int. J. Adv. Biol. Res.* 2011; 1: 93–95.
- 16- **Gravert HO.** Dairy Cattle Production. Institute for Milk Production. Federal Dairy Research Centre Kiel FRG. *Elsevier Sci. Publ. B.V. New York.* 1987.
- 17- **Hortet P, Seegers H.** Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Pre. Vet. Med.* 1988; 37(1-4): 1-20.
- 18- **Islam B, Khan SN, Haque I, Alam M, Mushfiq M., Khan AU.** Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 62: 751-757.
- 19- **Islam MA, Islam MZ, Islam MA, Rahman MS, Islam MT.** Prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. *Bangladesh J. Vet. Med.* 2011; 9: 73-78.
- 20- **Kalscheur KF, Baldwin RL, Glenn BP, Kohn RA.** Milk production of dairy cows differing concentration of rumendegraded protein. *J. Dairy Sci.* 2006; 89: 249–259.
- 21- **Keane OM, Budd KE, Flynn J, McCoy, F.** Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex aetiology. *Vet. Rec.* 2013; 173: 17.
- 22- **Kim DH, Lim JJ, Lee JJ, Kim DG, Chang HH, Lee SJ, et al.** Dehydrating and bacterial elimination effects of fecal dehydrating system for reducing bovine mastitis derived from environmental contamination. *Korean J Vet Res.* 2009; 49: 257-263.
- 23- **Lam TJGM, Ruegg PL, McDougall S.** Good veterinary practices on udder health: what to do, what not to do and opportunities. *Entorno Ganadero.* 2015; 71: 24-31.
- 24- **Larson BL, Heary HL, Devery JR, Devery JE.** Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1980; 63: 665±671.
- 25- **Lee SB, Cha KH, Kim SN, Altantsetseg S, Shatar S, Sarangerel O.** The antimicrobial activity of essential oil from *Dracocephalum foetidum* against pathogenic microorganisms. *J. Microbiol.* 2007; 45: 53-57.
- 26- **Lewis K, Ausubel FM.** Prospects of plant derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24: 1504-1507.
- 27- **Li R, Jiang Z.T.** Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. *Flavour and Fragrance J.* 2004; 19(4):311-313.
- 28- **Mahboubi M, Haghi G.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. Essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 119: 325- 327.
- 29- **Martin M, McCorkle CM, Mathias E.** Ethnoveterinary Medicine: An Annotated Bibliography of Community Animal Healthcare. *Intermediate Technology Development Group Publishing, London.* 2001.
- 30- **Mir AQ, Bansal BK, Gupta DK.** Subclinical mastitis in machine milked dairy farms in Punjab: prevalence, distribution of bacteria and current antibiogram. *Vet. World.* 2014; 7: 291-294.
- 31- **Mubarack HM, Doss A, Vijayasanthi M, Venkataswamy R.** Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Coimbatore, Tamilnadu, South India. *Vet. World.* 2012; 5: 352-355.
- 32- **Nurdin E, Amelia T, Makin M.** The effects of herbs on milk yield and milk quality of mastitis dairy cow. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 2011; 36(2): 104-108.
- 33- **Nurdin E, Arief A.** The Effectivity of Cumin as natural-antioxidant to improve rumen ecology of mastitis dairy cow's. *J. Produksi Ternak (University of Jenderal Soedirman).* 2009; 11(3): 114-119.
- 34- **Nurdin E.** Pemanfaatan kunyit manga (*Curcuma mangga*) terhadap ekologi rumen sapi perah Holstein. *J. Penelitian Unja.* 2010; 12(3): 86-89.

35- Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem.* 2010; 120:308-12.

36- Owens WE, Nickerson SC, Boddie RL, Tomita GM, Ray CH. Prevalence of mastitis in dairy heifers and effectiveness of antibiotic therapy. *J. Dairy Sci.* 2001; 84: 814- 817.

37- Paşca C, Mărghitaş L, Dezmirean D, Bobiş O, Bonta V, Chirilă F, et al. Medicinal plants based products tested on pathogens isolated from mastitis milk. *Molecules.* 2017; 22(9): 1473.

38- Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100: 80–84.

39- Safi thria M, Bintanga M, Poeloenganb M. Antibacterial Activity of Garlic Extract Against some Pathogenic Animal Bacteria. *Med. Peternakan.* 2011; 155-158.

40- SAS Institute. User's Guide. Version 9.1: Statistics. *SAS Institute, Cary, NC.* 2003.

41- Sewalem A, Miglior F, Kistemaker GJ, Van Doormaal BJ. Analisis of the relationship between somatic cell score and functional longevity in Canadian dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 3609-3614.

42- Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2011; 24: 429-438.

43- Somchit MN, Reezal I, Nur IE, Mutalib AR. In vitro antibacterial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 84: 1-4.

44- Sudhakar PA, Narendra VK., Vikas MS, Mangesh SM. Prevalence and current antibiogram trend of mastitic agents in Udgir and its vicinity, Maharashtra State, India. *Int. J. Dairy Sci.* 2009; 4: 117-122.

45- Tajik P, Darabi MR, Lotfollah-zadeh S, Mohammad-Sadegh M. Effects of *Zataria multiflora* Boiss (ZMB) Essential Oil on Treatment of Sub - Clinical Mastitis in Dairy Cow. *J. Med. Plants.* 2012; 10(39): 81-87. [In Persian]

46- Toghory A, Ghoorchi T, Asadi M, Bokharaeian M, Najafi M, Ghassemi Nejad J. Effects of Environmental Temperature and Humidity on Milk Composition, Microbial Load, and Somatic Cells in Milk of Holstein Dairy Cows in the Northeast Regions of Iran. *Animals.* 2022; 12(18): 2484.

47- Unakal CG, Kaliwal BB. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet. World.* 2010; 3: 65-67.

48- Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. *BioMed Res. Int.* 2014.

49- Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R. Mastitis detection: Current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 2009; 27: 486–493.

50- Wang C, Liu JX, Yuan ZP, Mu YM, Zhai SW, Ye HW. Effect of level of metabolizable protein on milk production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2006; 90: 2960-2965.

51- White DG, McDermott PF. Emergence and transfer of antibiotic resistance. *J. Dairy Sci.* 2001; 84: E151–E155.

52- Zahraei-Salehi T, Vojgani M, Bayat M, Torshizi H, Akhondzadeh A. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of extract of *Zataria multiflora* against *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. *J. V. R.* 2005; 60: 107 - 10.

53- Zeedan GS, Abdalhedem AM, Abdeen E, Ottai ME, Abdel-Shafy S. Evaluation of antibacterial effect of some Sinai medicinal plant extracts on bacteria isolated from bovine mastitis. *Vet. World.* 2014; 7(11).

54- Zhou F, Baoping J, Hong Z, Hui J, Zhiwei Y, Jingjing L, Jihai L, Yali R, Wenjie Y. Synergistic Effect of Thymol and Carvacrol Combined with Chelators and Organic Acids against *Salmonella Typhimurium*. *J. Food. Protection.* 2007; 70(7): 1704–9.

## The effect of administering *Mentha Pulegium* essential oil on the treatment of subclinical mastitis in Holstein cows

Kamel Amozadeh Araee<sup>1</sup>, Homa Mohammadi Fard<sup>2</sup>, Mohammad Asadi<sup>3\*</sup>

1- Master's student, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- General veterinarian, graduate of Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran.

3- PhD in Animal Nutrition, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Receive: March 14, 2023; Revise: June 2, 2023; Accept: June 7, 2023

### Summary

Mastitis, which is caused by inflammation of the mammary gland, is the most common and costly disease that affects dairy cows around the world. Treatment of mastitis during lactation is not recommended due to the risks of milk contamination with antibiotics in lactating cows. In this research, (*Pulegium Mentha*) plant was used to treat subclinical mastitis in Holstein cows. For this purpose, 50 Holstein cows with subclinical mastitis with an average age of 4.5 years and in the middle of the lactation stage with an average production of  $20\pm 2.7$  were selected. The research was conducted in the form of a completely randomized design with two treatments and twenty-five repetitions, which treatments were: 1- control (no injection of Oji essential oil into the breast area) 2- injection of Oji essential oil into the breast area. The results of the present study showed that the injection of Oji essential oil into the mammary gland improved the average amount of milk production, reduced somatic cells, and increased the percentage of protein, fat and lactose in cows' milk ( $P<0.05$ ). However, there was no significant difference between the Oji treatment and the control in terms of total elimination of intramammary infections. In general, the results of the study showed that Oji essential oil can be used in the treatment of subclinical mastitis in cows.

**Key words:** *Holstein Cow, Mentha Pulegium, Milk Production, Mastitis*

## بررسی شیوع سرمی طاعون نشخوارکنندگان کوچک در گوسفندان و بزهای استان گیلان در سال ۱۴۰۱

سامان مهدوی<sup>۱\*</sup>، محمد مرادی<sup>۲</sup>

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.  
۲- دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۰۵ تیر ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۹ تیر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۰ تیر ۱۴۰۲

### چکیده

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) یک بیماری ویروسی بسیار مسری با میزان بروز و مرگ و میر بالا است که در خاورمیانه، آسیای جنوب غربی و آفریقا بومی است. این بیماری باعث خسارات اقتصادی در گله‌های گوسفند و بز در این مناطق شده است. هدف از این تحقیق، بررسی شیوع سرمی طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) در گوسفندان و بزهای استان گیلان در سال ۱۴۰۱ بود. در این مطالعه مقطعی، نمونه خون ۳۶۸ رأس گوسفند و بز از مناطق مختلف روستایی استان گیلان با استفاده از آزمون الایزا رقابتی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. عوامل خطر شامل جنس، سن، گونه و موقعیت جغرافیایی در نظر گرفته شد. از مجموع ۳۶۸ نمونه سرمی که برای وجود آنتی‌بادی علیه ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک آنالیز شدند، ۸۵/۳۲ درصد (۳۱۴ مورد) نمونه برای آنتی‌بادی ویروس PPR مثبت و ۱۴/۶۸ درصد (۵۴ مورد) منفی بودند. بجز منطقه جغرافیایی، تفاوت آماری معنی‌داری بین عوامل خطر و شیوع سرمی آنتی‌بادی ویروس PPR وجود نداشت ( $p > 0.05$ ). با توجه به نتایج، طاعون نشخوارکنندگان کوچک یک بیماری بومی در شمال ایران است و عوامل خطر محیطی نسبت به عوامل خطر میزبانی، تأثیر بیشتری بر شیوع سرمی بیماری دارند. بنابراین برای کنترل بیماری در مناطق اندمیک باید به فاکتورهای خطر محیطی توجه بیشتری شود و با انجام واکسیناسیون در بازه‌های زمانی و مناطق حساس قبل تغییرات محیطی پرخطر، احتمال بروز موارد همه‌گیری را به حداقل رساند.

**واژگان کلیدی:** الایزای رقابتی، شیوع سرمی، طاعون نشخوارکنندگان کوچک

## مقدمه

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) Peste des petits ruminants، یک بیماری ویروسی بسیار مسری، حاد و تبار در گوسفند و بز است. علائم بالینی این بیماری شامل تب، بی‌اشتهایی، افسردگی، ترشحات بینی و چشمی، سقط جنین، ضایعات تخریشی مخاطات دهان و بینی، سرفه، اسهال و پنومونی است که در بیشتر موارد، منجر به مرگ مبتلایان می‌شود (۱، ۲). گوسفند و بز، میزبانان اصلی عامل این بیماری هستند. اگرچه مطالعات اندکی در خصوص شیوع فرم تحت بالینی و بالینی بیماری در شتر، گاو، گاومیش و خوک وجود دارد اما این دام‌ها نقش بسزایی در گسترش اپیدمیولوژیکی بیماری ندارند (۲، ۳، ۴). سازمان بهداشت جهانی دام، طاعون نشخوارکنندگان کوچک را به‌عنوان یک بیماری عفونی هشدار دادنی بسیار مهم از نظر تبعات اقتصادی در گوسفند و بز عنوان کرده که با همه‌گیری و مرگ و میر بالایی همراه است (۵). این بیماری یک خطر جدی برای تجارت جهانی چهارپایان و فرآورده‌های دامی، امنیت غذایی و ثبات معیشتی دامپروران روستایی در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌رود (۶). در چین و هندوستان تخمین زده شده که سالانه حدوداً ۳۹ میلیون دلار خسارت‌های اقتصادی متعاقب بروز فرم بالینی PPR و آلودگی سرمی به صنعت دامپروری وارد می‌شود (۷). PPR یک بیماری مسری است که برنامه‌های فراوانی به جهت ریشه‌کنی آن تا سال ۲۰۳۰ میلادی در سطح جهان در دست اجرا است (۸، ۹). تاکنون مطالعات نشان داده است که مواردی از قبیل گونه دامی (۱۰)، جنسیت (۱۱)، سن (۱۲)، پارامترهای اکولوژیک (۱۳) و موقعیت جغرافیایی (۱۴) به‌عنوان فاکتورهای خطر میزبانی و محیطی می‌توانند بر پراکندگی طاعون نشخوارکنندگان کوچک در مناطق مختلف جهان اثرگذار باشند. بنابراین اطلاع دقیق از پراکنش جغرافیایی آلودگی در نقاط مختلف جهان، علی‌الخصوص نواحی آندمیک در میزبانان اصلی بیماری، جهت به ثمر رساندن برنامه‌های ریشه‌کنی،

حائز اهمیت بالایی است. نظر به اینکه اطلاعات و مطالعه ثبت شده‌ای در خصوص وجود آلودگی سرمی با PPR در نشخوارکنندگان کوچک استان گیلان وجود ندارد، لذا مطالعه حاضر به‌منظور بررسی شیوع سرمی طاعون نشخوارکنندگان کوچک در گوسفندان و بزهای استان گیلان در سال ۱۴۰۱ انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه‌ها:** این مطالعه مقطعی از بهمن ماه سال ۱۴۰۰ الی تیر ماه سال ۱۴۰۱ در مناطق روستایی استان گیلان (شامل شهرهای رشت، تالش، رضوان‌شهر و بندر انزلی) انجام شد. از ورید وداجی ۳۶۸ رأس گوسفند و بز به ظاهر سالم خونگیری به عمل آمد و از هر نمونه ۲ میلی‌لیتر خون اخذ شد. لازم به ذکر است که هیچ کدام از گله‌های مورد مطالعه، سوابقی از واکسیناسیون علیه بیماری PPR را نداشتند. نمونه‌های خون با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و نمونه‌های سرمی پس از جداسازی به میکروتیوب منتقل شده و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند. اطلاعات هر نمونه شامل گونه دامی، سن، جنس و موقعیت جغرافیایی ثبت شد.

**آزمون الایزای رقابتی (Competitive ELISA)**

**برای تشخیص آنتی‌بادی ضد ویروس PPR جهت ارزیابی وجود پادتن (IgG)،** علیه ویروس PPR در نمونه‌های سرمی، از کیت الایزای تجاری شرکت ID vet (کشور فرانسه) به روش الایزای رقابتی استفاده شد. این روش بر اساس ردیابی رقابت بین پادتن ضد پروتئین H پادتن مونوکلونال ویروس PPR و نمونه سرمی جهت اتصال به پادگن PPR در کف چاهک‌های پلیت است. حضور پادتن PPR در نمونه سرم باعث واکنش انسدادی پادتن مونوکلونال موجود در کیت و در نتیجه کاهش ایجاد رنگ پس از افزودن آنزیم کونژوگه و محلول کروموزن می‌شود. برای هر نمونه، نسبت OD (Optimal Density) نمونه (Sample) بر شاهد منفی (Negative)

(Benferroni supplementary test) تعیین شد.

### نتایج

از ۳۶۸ نمونه سرم مورد آزمایش، ۸۵/۳۲ درصد (۳۱۴) نمونه) از نظر حضور آنتی‌بادی ضد ویروس PPR مثبت بودند و ۱۴/۶۸ درصد (۵۴ نمونه) از نظر حضور آنتی‌بادی ضد ویروس PPR منفی بودند (جدول ۱). در این تحقیق، عوامل خطر مثل گونه دامی، سن، جنس و منطقه جغرافیایی نیز مورد بررسی قرار گرفت که بجز منطقه جغرافیایی، بقیه عوامل خطر ذکر شده در بین نمونه‌های مورد آزمایش، اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ ).

(control) به‌صورت درصد (S/N %) محاسبه شد. در صورتی که این درصد، برابر یا کمتر از ۵۰ باشد به‌عنوان نمونه مثبت، در صورتی که بین ۶۰-۵۰ باشد به‌عنوان نمونه مشکوک و در صورتی که بالاتر از ۶۰ باشد به‌عنوان نمونه منفی تلقی می‌شود.

**روش آماری:** داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری IBM SPSS (SPSS25 Chicago, USA) و با روش‌های آزمون کای مربع و فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، تفاوت بین گروه‌ها با آزمون تکمیلی بن‌فرونی

جدول ۱- عوامل خطر برای ویروس PPR در نمونه‌های گوسفند و بز مورد آزمایش

P value	تعداد کل		تعداد (%)		عوامل خطر
	منفی (%)	مثبت (%)	منفی (n=۵۴)	مثبت (n=۳۱۴)	
۰/۶۶	۱۲	۶۶/۳	۴۴(۱۵/۳)	۲۴۴(۸۴/۷)	جنس ماده
	۲/۷	۱۹	۱۰(۱۲/۵)	۷۰(۸۷/۵)	نر
۰/۲۵۵	۱۲/۵	۶۴/۱	۴۶(۱۶/۳)	۲۳۶(۸۳/۷)	گونه دامی گوسفند
	۲/۲	۲۱/۲	۸(۹/۳)	۷۸(۹۰/۷)	بز
۰/۸۱۹	۴/۴	۲۰/۷	۱۶(۱۷/۴)	۷۶(۸۲/۶)	سن (سال) ≤۲
	۴/۴	۲۸/۸	۱۶(۱۳/۱)	۱۰۶(۸۶/۹)	۲-۴
	۶	۳۵/۷	۲۲(۱۴/۳)	۱۳۲(۸۵/۷)	>۴
۰/۰۱	۴/۹	۲۲/۳	۱۸(۱۸)	۸۲(۸۲) <sup>a</sup>	منطقه جغرافیایی رضوان‌شهر
	۳/۳	۱۹/۵	۱۲(۱۴/۳)	۷۲(۸۵/۷) <sup>ab</sup>	تالش
	۰/۶	۲۶/۶	۲(۲)	۹۸(۹۸) <sup>b</sup>	بندرانزلی
	۶	۱۶/۸	۲۲(۲۶/۲)	۶۲(۷۳/۸) <sup>a</sup>	رشت

a-b: حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

بود. علت شیوع بالاتر در گوسفند می‌تواند به دلیل پاسخ پادتنی بالاتر در این گونه دامی باشد (۱۲)، چون طول دوره بیماری در گوسفند طولانی‌تر از بز است. اما چون شانس بقاء پس از ابتلاء به بیماری PPR در گوسفند بالاتر از بز است (۱۰)، در نتیجه تعداد بیشتری گوسفند آلوده در سطح گله زنده مانده و این مسئله باعث ایجاد پاسخ پادتنی و افزایش شیوع سرمی در گوسفندان یک گله می‌شود (۱۵). اگرچه برخی مطالعات نیز علت این پدیده را مربوط به مقاومت ذاتی گوسفندان نسبت به بروز علائم بالینی و در نتیجه بقای آنها در سطح گله می‌دانند (۱۳). علاوه بر آن با توجه به اینکه نرخ زاد و ولد در بزها بالاتر از

### بحث

در مطالعه‌ی حاضر، از کیت آزمون رقابتی الیزا برای تشخیص آنتی‌بادی ضد ویروس PPR استفاده شد که ۸۵/۳۲ درصد (۳۱۴ نمونه) از کل نمونه‌های مورد آزمایش از نظر حضور آنتی‌بادی ضد ویروس PPR مثبت و ۱۴/۶۸ درصد (۵۴ نمونه) منفی بودند. در بین عوامل خطر مورد آزمایش (شامل گونه دامی، سن، جنس و موقعیت جغرافیایی)، فقط منطقه جغرافیایی اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان موارد مثبت سرمی نشان داد ( $p < 0.05$ ). فراوانی سرمی آنتی‌بادی ضد ویروس PPR در گوسفندان و بزهای مورد مطالعه به ترتیب ۶۴/۱ درصد و ۲۱/۲ درصد

گوسفندان است پس از بروز تلفات به دنبال PPR سریعاً بزغاله‌ها در گله جایگزین شده و مجدداً جمعیت دامی به تعادل می‌رسد اما پاسخ پادتنی در این جمعیت جدید وجود نداشته و یا اندک است که همین مسئله نه تنها باعث افزایش حساسیت این گونه دامی می‌شود بلکه منجر به تشکیل یک جمعیت بدون واکنش سرمی در ارزیابی‌های سرولوژیکی می‌گردد (۱۶). ایلدرآبادی و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که شیوع موارد مثبت سرمی آنتی‌بادی ضد ویروس PPR در گوسفندان و بزهای شهرستان گرمسار به ترتیب ۳۲/۱۷ و ۱۸/۷۸ درصد بود (۱۷). آنها همچنین نشان دادند، به جز منطقه جغرافیایی، هیچ رابطه معنی‌داری بین گونه‌های دامی، جنسیت و سن با شیوع سرمی PPR وجود ندارد. Bari و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که شیوع بیماری PPR در جنس نر ۳۰ درصد و در جنس ماده ۳۲/۵۶ درصد می‌باشد، اما بین جنسیت و میزان بروز بیماری، تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت و احتمال ابتلاء به بیماری در جنس ماده ۱/۳۲ برابر بیشتر از جنس نر بود (۱۰). در این رابطه، برخی از مطالعات به نتیجه خلاف مطالعه فوق رسیدند و مشخص شد که میزان آلودگی سرمی در حیوانات نر بیشتر از ماده‌ها است (۱۸ و ۱۹). در مجموع به نظر می‌رسد که جنس نر بیشتر مستعد ابتلا به این بیماری هستند و این موضوع می‌تواند ناشی از عوامل ژنتیکی وابسته به جنسیت باشد (۱۷). در مطالعه اخیر، درصد موارد مثبت سرمی در ماده‌ها بیشتر از نرها بود و یکی از دلایل نتایج این مطالعه می‌تواند به دلیل تعداد کم حیوانات نر مورد بررسی و عدم تناسب بین جمعیت نر و ماده در این تحقیق باشد. به‌طور کلی جمعیت دام‌های اهلی نر کمتر از ماده است و دلیل آن در عدم صرفه اقتصادی در نگهداری و پرورش دام‌های نر به استثنای فصول تولید مثلی است که این مسئله باعث ایجاد محدودیت مطالعه پیش رو در مقایسه جنس نر و ماده بود. در مطالعه حاضر، درصد موارد سرم مثبت در حیوانات

بالغ بیشتر از حیوانات جوان بود و با افزایش سن، این درصد افزایش یافت که با نتایج برخی مطالعات مطابقت دارد (۱۷، ۱۸). برخی مطالعات نشان داده‌اند که این بیماری در بزهای کمتر از یک سال شایع‌تر است (۱۲، ۲۰). البته Sarker و Islam (۲۰۱۱) علت این آلودگی و حساسیت بیشتر در بزهای جوان را مربوط به اختلالات قبیل سوء تغذیه، ضعف سیستم ایمنی و اشکالات مدیریتی می‌دانند (۱۹). اما در نقطه مقابل آن در اکثر بیماری‌های عفونی مسری به دنبال افزایش سن، شانس برخورد دام در محیط زندگی با عامل عفونی و بیماران در یک جمعیت دامی افزایش یافته و لذا شانس ردیابی غلظت پادتن سرمی بالاتر در دام‌های مسن در مقایسه با دام‌های جوان انتظار می‌رود (۱۷). لازم به ذکر است که نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مبنی بر شیوع سرمی بالاتر در حیوانات مسن‌تر مؤید این نکته است که اگرچه فرم بالینی بیماری PPR در بازه زمانی انجام مطالعه حاضر دیده نشد اما در جمعیت دامی استان گیلان بومی است. نتایج مطالعات در مناطق مختلف جهان به‌طور کلی علت نوسان در شیوع بیماری را در برخی مناطق، مربوط به اختلاف موقعیت جغرافیایی، زمان بررسی مطالعه، حجم نمونه، جابجایی دام‌ها، کمبودهای تغذیه‌ای، اختلالات مدیریتی، ضعف در سیستم ایمنی، سابقه برخورد پیشین با بیماری PPR، نادیده گرفتن مسائل بهداشتی، عدم رعایت قرنطینه، وجود گله‌های مهاجر در یک منطقه، خرید دام جدید از گله‌های آلوده و مجاورت با میادین خرید و فروش دام می‌داند (۱۴، ۲۱).

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نیز در راستای سایر مطالعات ثابت کرد فاکتورهای خطر محیطی و میزبانی می‌تواند در نوسان شیوع آلودگی مؤثر بوده و در توجیه درصدی از تغییرات کمک‌کننده باشد تا با بهره از آنها بتوان یک دستورالعمل قابل اجرا جهت ریشه‌کنی بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک را تا سال ۲۰۳۰ میلادی در کشور تدوین کرد.

## References

- 1- Tariq A, Aqil K, Akabaar Z, Mahboob K, Sarfraz A, Rafique R, *et al.* Peste des petits ruminant (PPR) in small ruminants- a clinical hemato-serological and pathological aspects. *Int J Vet Sci.* 2014; 3(4): 206-209.
- 2- Zakian A, Nouri M, Faramarzian K, Sharif MT, Rezaie A, Mokhber-Dezfouli MR. Comprehensive review on peste des petits ruminants [PPR] disease in ruminants and camels: with emphasis on clinical signs and histopathological finding. *J Vet Sci Med Diagn.* 2016. [In Persian]
- 3- Khalafalla AI, Saeed IK, Ali YH, Abdurrahman MB, Kwiatek O, Libeau G, *et al.* An outbreak of peste des petits ruminants (PPR) in camels in the Sudan. *Acta Tropica.* 2010; (116): 161-165.
- 4- Sen A, Saravanan P, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Sarkar J, *et al.* Detection of subclinical peste des petits ruminants virus infection in experimental cattle. *Virus Dis.* 2014; (25): 408-411.
- 5- Karim A, Bhattacharjee U, Puro K, Shakuntala I, Sanjukta R, Das S, *et al.* Detection of Peste des petits ruminants virus and goatpox virus from an outbreak in goats with high mortality in Meghalaya state, India. *Vet World.* 2016; (9): 1025-1027.
- 6- Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, Muthuchelvan D, Buczkowski H, Banyard AC. Peste des petits ruminants. *Vet Microbiol.* 2015; (181): 90-106.
- 7- Singh RP. Control strategies for peste des petits ruminants in small ruminants of India. *Rev Sci Tech OIE.* 2011; (30): 879- 87.
- 8- Albina E, Kwiatek O, Minet C, Lancelot R, Servan R, Libeau G. Peste des Petits ruminants, the next eradicated animal disease. *Vet Microbiol.* 2013; (165): 38-44.
- 9- Taylor W. The global eradication of peste des petits ruminants (PPR) within 15 years-is this a pipe dream? *Trop Anim Health Pro.* 2016; (48): 559-567.
- 10- Bari S, Ahmed Rana E, Ahaduzzman MD, Al-Masud A, Das T, Hasan T. Hemato-biochemical parameters of pesti-des petitis ruminants (PPR) affected goats in Chittagong, Bangladesh. *J Adv Vet Anim Res.* 2018; (5): 211-217.
- 11- Rezazadeh F, Madadgar O, Poureini F. Study of peste des petitis ruminants (PPR) in some border areas of Iran by Nested-PCR. *Iran J Rum Health Res.* 2016; (1): 61-72. [In Persian]
- 12- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grunberg W. *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horse, sheep, pigs and goats.* 11<sup>th</sup> ed. Missouri: *Saunders Elsevier.* 2017; P: 125-130.
- 13- Mokhtari A, Azizi Z, Rabiacee Fradonbeh S. Epidemiological study and spatial modeling of peste des petitis ruminants (PPR) in central area of Iran. *Revista MVZ Cordoba.* 2017; (22): 5899-5909. [In Persian]
- 14- Rasooli A, Nouri M, Seifi Abad-Shapouri MR, Khalafi E, Daghari M. Seroprevalence of peste des petitis ruminants (PPR) virus infection in sheep and cattle in Ahvaz. *J Vet Res.* 2018; (73): 465-473. [In Persian]
- 15- Bhaskar SR, Deshmukh VV, Chopade NA, Rautmare SS. Sero-prevalence of peste des petits ruminants in Maharashtra. *Indian J Anim Res.* 2009; (43): 285-287.
- 16- Hussain M, Muneer M, Jahangir M, Awan AH, Khokhar MA, Zahur AB. Chromatographic strip technology: A pen-side test for the rapid diagnosis of pests des petits ruminants in sheep and goats. *Online J Biol Sci.* 2003; (3): 1-7.
- 17- Iidarabadi H, Yourdkhani S, Zakian A. Seroprevalence of peste des petits (PPR) virus in small ruminants of Garmsar city: Impact of environmental and host risk factors. *J Vet Res.* 2021; 76(1): 62-74. [In Persian]
- 18- Li XH, Li K, Zhang H, Gan P, Luo HQ, Han ZQ, *et al.* Epidemiological investigation and risk factors of peste des petitis ruminants (PPR) in yaks (*Bos grunniens*) and cattle in five regions of China. *Trop Biomed.* 2018; (35): 736-743.
- 19- Sarker S, Islam MH. Prevalence and risk factor assessment of peste des petits ruminants in goats in Rajshahi, Bangladesh. *Vet World J.* 2011; (4): 546-549.
- 20- Singh RP, Saravanan P, Sreenivasa BP, Singh RK, Singh B. Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants in India. *Rev Sci Tech OIE.* 2004; (23): 807-819.
- 21- Zakian A, Nouri M, Kahroba H, Mohammadian B, Mokhber-Dezfouli MR. The first report of peste des petits ruminants (PPR) in camels (*Camelus dromedarius*) in Iran. *Trop Anim Health Pro.* 2016; (48): 1215-1219. [In Persian]

## Study of seroprevalence of peste des petits ruminants in sheep and goats in Guilan province in 2022

Saman Mahdavi <sup>\*1</sup>, Mohammad Moradi <sup>2</sup>

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

2- PhD Student in Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Receive: June 26, 2023; Revise: July 10, 2023; Accept: July 11, 2023

### Summary

---

Peste des petitis (PPR) is a highly contagious viral disease with high incidence and mortality rate, which is endemic in the Middle East, Southwest Asia, and Africa. This disease has been causing economic losses in sheep and goat flocks in these areas. The aim of current research was to study of seroprevalence of peste des petits ruminants (PPR) in sheep and goats in Guilan province in 2022. In this cross-sectional study, blood samples from 368 sheep and goats from different rural areas of Guilan province were analyzed using competitive ELISA test. Risk factors including sex, age, species and the geographic location were taken into consideration. From a total of 368 serum samples that analyzed for the presence of antibody against PPR virus, 85.32% (n=314) samples were positive for PPR virus antibody, and 14.68% (n=54) were negative. Except for the geographical area, there was no statistically significant difference between risk factors and PPR virus antibody seroprevalence ( $p>0.05$ ). According to the results, PPR was proven to be an endemic disease in north of Iran and the environmental risk factors have a greater impact on the seroprevalence of disease than host risk factors. Therefore, in order to control the disease in endemic areas, further attention should be paid to environmental risk factors and minimizing the risk of epidemics through vaccination at sensitive timescales and areas before high-risk environment changes.

**Keywords:** *Competitive ELISA, Seroprevalence, PPR*

## بررسی الگوی اپیدمیولوژیک و نقشه پراکنش جغرافیایی بیماری تب برفکی در استان کرمانشاه: یک مطالعه مقطعی

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

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

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

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

دریافت مقاله: ۲۶ فروردین ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۳ خرداد ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۸ شهریور ۱۴۰۲

### چکیده

بیماری تب برفکی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی و ویروسی دام است. بعضی از مناطق جغرافیایی ایران اندمیک و یکی از مشکلات مهم بهداشتی اقتصادی می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی الگوی اپیدمیولوژیک و پراکنش جغرافیایی بیماری تب برفکی در استان کرمانشاه با استفاده از سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) طی یک دوره ۱۲ ساله بود. گزارش بیماری تب برفکی از سطح استان کرمانشاه طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS 10.6 لایه‌های تقسیمات استان مشخص و اطلاعات مربوط به پارامترهای مختلف شامل تعداد کل دام‌ها به تفکیک معاینه شده، مبتلا، تلفات و کانون‌های پرخطر بیماری به صورت جدول توصیفی به پایگاه داده سیستم مختصات جغرافیایی (GCS) متصل به نقشه‌ی استان اضافه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس تفاوت بین نقاط درگیر بیماری و میزان درگیری انجام شد. بین مناطق مختلف استان در غرب، مرکز و شرق در جمعیت نشخوارکنندگان اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در گاوان بیشترین شیوع در شرق استان با ۹/۱۷ درصد و کمترین در مرکز با ۶/۱ درصد بود. در نشخوارکنندگان کوچک بالاترین شیوع در شرق استان با ۱۹/۱ درصد و کمترین در مرکز با ۳/۸ درصد بود. رخداد تب برفکی در کل جمعیت نشخوارکنندگان بزرگ و کوچک اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیشترین شیوع در سال ۱۳۹۴ و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ گزارش شده بود. نتایج این مطالعه در کمک به سیاست‌گذاران بهداشتی حوزه دام و اتخاذ روش‌های کنترلی مفید می‌باشد، لذا دقت در ثبت دقیق کدهای اپیدمیولوژیک سیستم GIS و توجه بیشتر به پایش ضروری است.

**واژگان کلیدی:** الگوی اپیدمیولوژیک، نقشه پراکنش جغرافیایی، تب برفکی، کرمانشاه

## مقدمه

بیماری تب برفکی (FMD) یک بیماری ویروسی بسیار مسری حیوانات نشخوارکننده اهلی و وحشی است و با ایجاد وزیکول‌ها، عمدتاً در دهان و روی پاها همراه با تب ظاهر می‌شود. تب برفکی به لحاظ شدت خسارات اقتصادی یکی از موانع اصلی تأمین بهداشت دام و تولید فرآورده‌های دامی (کاهش تولید شیر، گوشت، سقط جنین، ناباروری، عفونت‌های ثانویه، تلفات دام‌های جوان و شیرخوار) است. بعلاوه، هزینه‌های کلان درمان دام‌های مبتلا و در مواقعی غیر اقتصادی شدن دام مبتلا در اثر شدت ضایعات موجب شده تا دفتر بین‌الملل بهداشت بیماری‌های واگیر دام (OIE) این بیماری را جزء مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی دام و در رده بیماری‌های گروه A طبقه‌بندی کند (۱). عامل ایجاد آن ویروس RNA از خانواده پیکور نایوریده (کوچک‌ترین ویروس‌های شناخته شده از نظر اندازه)، جنس آفتوویروس و دارای ۷ سروتایپ کاملاً متمایز آنتی‌ژنتیکی و ایمونوژنتیکی از یکدیگر می‌باشد. کپسید ویروسی شامل پروتئین‌های ساختمانی Vp1 - Vp2 - Vp3 - Vp4 جزء ایمونوژنیک ویرون FMDV بوده که در بین آنها VP1 نقش مهم‌تری دارد. در مناطق آندمیک اغلب یک سوش بر سوش‌های دیگر غالب شده گرچه احتمال عفونت همزمان ۲ سوش از سویه‌های هفتگانه نیز ممکن است. همچنین برخی از سویه‌های ویروس به گونه خاصی از دام تمایل داشته و سایر گونه‌ها را به سختی مبتلا می‌کند (۲).

انتقال ویروس تب برفکی با قابلیت تعداد اندک ویروس، تکثیر سریع و سطح گسترده انتشار، اغلب به‌وسیله قطرات آئروسول طی تماس مستقیم و غیرمستقیم با محصولات حیوانی، ابزار و یا از طریق باد در حیوانات زوج سم اهلی و وحشی (گاو، گوسفند، بز، خوک، آهو، گوزن و...) اتفاق می‌افتد. به همین دلیل کنترل و ریشه‌کنی بیماری سخت می‌شود. ویروس تب برفکی به بافت اپیتلیال تمایل زیادی دارد، پس از ورود به بدن در مخاطات دهان و لوزه‌ها تکثیر اولیه نموده و از طریق

خون، بافت‌های پوششی مختلف را مورد حمله قرار داده و سبب بروز تاول‌های بسیار شدید در بافت‌های موکوسی و پوششی از جمله دهان، دستگاه تناسلی، پستان، دست‌ها و پاها همراه با از دست دادن اشتها و ترشح بیش از حد بزاق می‌شود. گرچه این ویروس دام‌ها را در تمام سنین تحت تأثیر قرار می‌دهد در حالی‌که موجب بازده کمتر حیوانات مسن‌تر شده، اما احتمال مرگ و میر جوان‌ترها به‌ویژه به‌دلیل میوکاردیت بیشتر است. به همین دلیل پیشگیری از FMD مؤثرترین راه کنترل بیماری است (۳). اگرچه میزان کشندگی این بیماری کمتر از ۵ درصد است، با این وجود ممکن است به دلیل تشخیص دیرهنگام، مرگ و میر دام‌های جوان، کاهش تولیدات، اختلال در بازار فروش داخلی و منع تجارت جهانی محصولات دامی و دام‌های زنده برای صادرات، تأثیر منفی زیادی بر اقتصاد بگذارد (۴). شیوع FMD در آسیا و مواردی که هر ساله در بخش‌هایی از ایران به‌خصوص در استان‌های مرزی ثبت می‌شود، چالش‌هایی را در اجرای اقدامات کنترلی، مانند واکسیناسیون ایجاد می‌کند. بنابراین دولت و سازمان دامپزشکی کشور، دامپروان و بازرگانان همچنان سالانه هزینه‌های مستقیم و غیرمستقیم مرتبط با این بیماری را متحمل می‌شوند. به همین دلیل هزینه‌های درمانی زیاد و غیر اقتصادی شدن دام‌های مبتلا در اثر ماهیت بیماری تب برفکی و خسارات هنگفت اقتصادی سبب شده تا این بیماری دشمن دام و سرمایه دامی ( Enemy of Livestock and Livestock kipper) لقب بگیرد (۵). علاوه بر این، دولت‌های آسیب‌دیده ممکن است کمپین‌های قرنطینه و واکسیناسیون را اعمال کنند که پرهزینه و ممکن است خیلی مؤثر نباشد.

دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی برای بیماری تب برفکی شامل اقدامات قرنطینه‌ای و بهداشتی، انجام واکسیناسیون جمعی دام‌ها حداقل هر ۴ ماه یک بار، مراقبت بالینی، سرولوژی به‌منظور شناخت تغییرات بیماری و ماهیت سویه‌های در گردش است. بر اساس

### تحلیل جغرافیایی استان و جمع‌آوری داده‌های

شیوع بیماری تب برفکی طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰:

استان کرمانشاه از شمال با استان کردستان، از شرق با استان همدان، از غرب با کشور عراق و از جنوب با استان‌های لرستان و ایلام هم‌جوار است. این استان دارای تعداد تقریبی ۵۱۹۴۳۶۳ رأس دام سبک (گوسفند و بز) و سنگین (گاو و گوساله) می‌باشد. با توجه به وضعیت خاص اقلیمی (آب و هوایی چهار فصل، پوشش‌های گیاهی و ارتفاعات رشته کوه‌های زاگرس)، اکثر قریب به اتفاق دام‌ها به‌صورت آزاد و رها از چراگاه‌های اطراف روستاها و مزارع تغذیه می‌کردند. بر اساس وسعت شهرستان‌های استان و نیز جمعیت دام‌های مورد بررسی، استان به سه منطقه مرکزی (شهر کرمانشاه)، غربی (شهرستان‌های اسلام آباد، دالاهو، روانسر، جوانرود، پاوه، ثلاث، سرپل ذهاب، گیلان غرب و قصر شیرین) و شرقی (هرسین، صحنه، سنقر و کنگاور) تقسیم گردید. با توجه به تقسیم‌بندی استاندارد سازمان دامپزشکی کشور، واحدهای مزرعه در روستاها، مجتمع‌های دامداری و دامپروری با حداقل ظرفیت یک دام در نظر گرفته شد. بر این اساس اطلاعات مراقبت اپیدمیولوژیکی مستمر ثبت و گردآوری سیستماتیک و آنالیز داده‌ها برای ارزیابی جمعیت دامی، گزارش موارد وقوع بیماری تب برفکی ثبت شده در سامانه سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) اداره کل دامپزشکی استان جمع‌آوری شد. همچنین با ساخت یک پایگاه داده در محیط نرم‌افزار ArcGIS 10.6 تقسیمات استان کرمانشاه به لایه‌های نقشه‌ی ایران اضافه شد. سپس اطلاعات مربوط به پارامترهای عددی شامل تعداد کل دام، دام‌های معاینه شده، دام‌های مبتلا به بیماری، تلفات دام‌ها و کانون‌های پرخطر بیماری و واکسیناسیون به‌صورت جدول توصیفی به پایگاه داده اضافه و با استفاده از سیستم مختصات جغرافیایی (GCS) به نقشه‌ی استان متصل شد.

**آنالیز داده‌ها:** بررسی اختلاف شیوع بیماری در نقاط

مختلف استان و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از

اسناد OIE شیوع ویروس تب برفکی، جهان به ۷ حوزه تقسیم می‌شود. حوزه ۳ شامل آسیای مرکزی و خاورمیانه است. بر اساس نقشه راه OIE در منطقه ۳ نیز باید تا سال 2025 میلادی برنامه کنترل و پیشگیری عملیاتی شده و موارد بروز و ظهور نشانه‌های بالینی بیماری تب برفکی دام‌ها کاهش پیدا کند (۶، ۷). کشورهای موجود در منطقه ۳، در ۵ جایگاه طبقه‌بندی می‌شوند. ایران نیز در جایگاه ۲ قرار گرفته است (۸).

در سال‌های اخیر، توجه فزاینده‌ای به درک اپیدمیولوژی تب برفکی در ایران و جهان شده است. همچنین شتاب تحقیقاتی در نتیجه معرفی مسیر کنترل پیشرونده بیماری تب برفکی، یک چارچوب گام به گام توسعه‌یافته توسط فائو و سازمان جهانی بهداشت حیوانات ارائه می‌کند. بنابراین، جهت کمک به کشورها و مناطق آندمیک تب برفکی در کاهش تأثیر این بیماری، مستلزم درک اطلاعات اپیدمیولوژیک بیماری و طراحی کنترل‌های استراتژیک است. بر این اساس باید به‌صورت معمول در هر منطقه بررسی عوامل تعیین‌کننده مؤثر در بروز بیماری انجام گیرد تا به کمک آن برنامه‌های کنترل و پیشگیری هدفدار دنبال شود. مطالعه‌ی اسناد سازمان جهانی بهداشت حیوانات، داده‌های موجود در سازمان دامپزشکی کشور و استفاده از سیستم پایش اطلاعات جغرافیایی (GIS) ابزاری کارآمد در مدیریت آسان‌تر پیشگیری و کنترل شیوع بیماری‌های عفونی از محل مزارع حیوانات است. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی الگوی اپیدمیولوژیک و نقشه پراکنش جغرافیایی بیماری تب برفکی در استان کرمانشاه واقع در منطقه غربی و مرزی ایران با عراق و شرایط جغرافیایی مناسب دامپروری با استفاده از طراحی سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) طی یک دوره ۱۲ ساله (۱۴۰۱-۱۳۹۰) بود، تا بر اساس دستورالعمل‌های OIE، با ایجاد شناختی مناسب در کنترل و رسیدن به هدف کنترل و ریشه‌کنی بیماری کمک نماید.

**مواد و روش کار**

نرم‌افزار *SSPS 18* و آزمون‌های *chi-square* و *Fisher* انجام شد.

### نتایج

بر اساس بررسی گزارش سامانه ثبت GIS اداره کل دامپزشکی استان مبنی بر اطلاعات بیماری تب برفکی (در گاوان و گوسفندان با منشأ سروتایپی به ترتیب A, asia1, و O) و واکسیناسیون، طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰، از مجموع کل ۵۱۹۴۳۶۳ دام استان، تعداد ۱۳۸۸۲۳۹ (۷۲/۲۶ درصد) تحت واکسیناسون و پایش بیماری قرار گرفته‌اند. اطلاعات اخذ شده نشان داد جمعیت گاوان و گوسفندان استان به ترتیب سالانه ۴ و ۱ مرتبه علیه بیماری تب برفکی واکسیناسیون می‌شوند. کانون‌های درگیری و میزان ابتلا به بیماری تب برفکی کل نشخوارکنندگان به تفکیک شهرستان‌های استان کرمانشاه دیده می‌شود (جدول ۱، نقشه ۱).

در میزان موارد گزارش شده رخداد تب برفکی در گاوان پایش شده در مقایسه‌ی سه منطقه در استان کرمانشاه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P<0.05$ ).

بالاترین شیوع در شرق استان با ۱۷/۹ درصد و کمترین در مرکز با ۱/۶ درصد بود. بین غرب، مرکز و شرق استان اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۲).

در میزان موارد گزارش شده رخداد تب برفکی در گوسفندان و بزهای (نشخوارکنندگان کوچک) پایش شده در مقایسه سه منطقه در استان کرمانشاه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P<0.05$ ). بالاترین شیوع در شرق استان با ۱۹/۱ درصد و کمترین در مرکز با ۳/۸ درصد بود. بین غرب، مرکز و شرق استان اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۳).

در میزان موارد گزارش شده رخداد تب برفکی در نشخوارکنندگان پایش شده در مقایسه سه منطقه در استان کرمانشاه در کل جمعیت گاو و گوسفند بدون تفکیک گونه، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P<0.05$ ). بالاترین شیوع در شرق استان با ۱۸/۹ درصد و کمترین در مرکز با ۲/۹ درصد بود. بین غرب، مرکز و شرق استان اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۴، نقشه ۲).

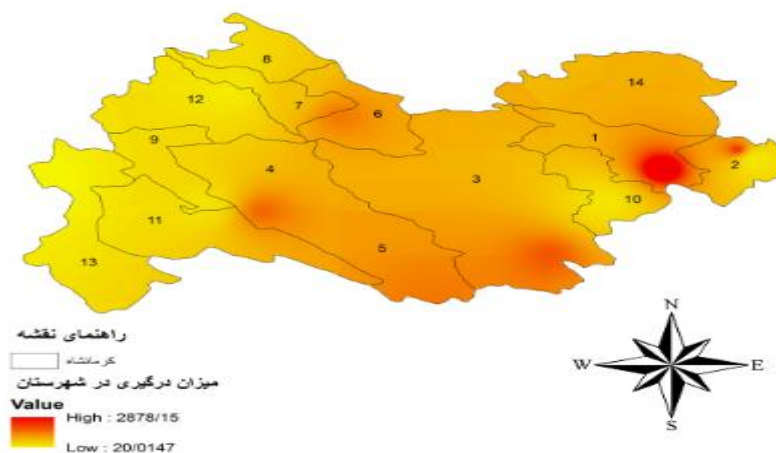
جدول ۱- وضعیت رخداد تب برفکی در جمعیت نشخوارکنندگان استان کرمانشاه به تفکیک شهرستان طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰ بر اساس پایش اداره کل دامپزشکی استان مربوط به نقشه ۱ (جمع کل گله‌های پایش شده ۸۹۹۸۰ از تعداد ۵۱۹۴۳۶۳ رأس گله)

ردیف	شهر	تعداد گاوان مبتلا	تعداد گوسفندان مبتلا	نشخوارکنندگان مبتلا (کل)
۱	صحنه	۳۴۷	۲۵۳۶	۲۸۸۳
۲	کنگاور	۲۹۲	۸۸۸	۱۱۸۰
۳	کرمانشاه	۲۲۱	۷۴۹	۹۷۰
۴	دالاهو	۹۹	۷۶۱	۸۶۰
۵	اسلام آباد	۶۲	۷۰۱	۷۶۳
۶	روانسر	۱۳۷	۶۰۹	۷۴۶
۷	جوانرود	۱۰۲	۲۱۸	۳۲۰
۸	پاوه	۱۵۵	۱۱	۱۶۶
۹	سرپل ذهاب	۰	۱۳۵	۱۳۵
۱۰	هرسین	۳۷	۹۳	۱۳۰
۱۱	گیلانغرب	۴۴	۶۷	۱۱۱
۱۲	ثلاث باباجانی	۵۴	۳۵	۸۹
۱۳	قصر شیرین	۰	۲۰	۲۰
۱۴	سنقر	۰	۰	۰
	جمع کل	۱۵۵۰	۶۸۲۳	۸۳۷۳

علامت \*: عدم وجود ثبت آمار GIS و پایش

سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۴۰۱ به لحاظ شیوع رخداد تب برفکی در گاو در کل استان به‌طور معنی‌داری متفاوت بودند ( $P < 0.05$ ). بیشترین رخداد بیماری در گاو مربوط به سال ۱۳۹۴ با ۲۱/۴ درصد و کمترین آن در سال ۱۳۹۶ با ۲/۳ درصد گزارش شده بود. در سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۴۰۱ نیز به لحاظ شیوع رخداد تب برفکی در نشخوارکنندگان کوچک در کل استان به‌طور معنی‌داری متفاوت بودند ( $P < 0.05$ ). بیشترین رخداد بیماری در گوسفندان و بزها مربوط به سال ۱۳۹۲ با ۳۱/۲ درصد و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ با ۳۱/۲ درصد گزارش شده بود. در ۵/۷ درصد جمعیت گاو و ۱۰/۹ درصد جمعیت گوسفندان و بزها بیماری مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده). رخداد تب برفکی در کل جمعیت نشخوارکنندگان بزرگ و کوچک طی دوره پژوهش اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیشترین رخداد مربوط به سال ۱۳۹۴ و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ گزارش شده بود (جدول ۵).

سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۴۰۱ به لحاظ شیوع رخداد تب برفکی در گاو در کل استان به‌طور معنی‌داری متفاوت بودند ( $P < 0.05$ ). بیشترین رخداد بیماری در گاو مربوط به سال ۱۳۹۴ با ۲۱/۴ درصد و کمترین آن در سال ۱۳۹۶ با ۲/۳ درصد گزارش شده بود. در سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۴۰۱ نیز به لحاظ شیوع رخداد تب برفکی در نشخوارکنندگان کوچک در کل استان به‌طور معنی‌داری متفاوت بودند ( $P < 0.05$ ). بیشترین رخداد بیماری در گوسفندان و بزها مربوط به سال ۱۳۹۲ با ۳۱/۲ درصد و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ با ۳۱/۲ درصد گزارش شده بود. در ۵/۷ درصد جمعیت گاو و ۱۰/۹ درصد جمعیت گوسفندان و بزها بیماری مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده). رخداد تب برفکی در کل جمعیت نشخوارکنندگان بزرگ و کوچک طی دوره پژوهش اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیشترین رخداد مربوط به سال ۱۳۹۴ و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ گزارش شده بود (جدول ۵).



نقشه ۱- وضعیت رخداد تب برفکی نشخوارکنندگان شهرستان‌های استان کرمانشاه طی سال ۱۴۰۱-۱۳۹۰

جدول ۲- وضعیت رخداد تب برفکی در جمعیت گاو (نشخوارکنندگان بزرگ) در مناطق مختلف استان کرمانشاه طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰

تب برفکی گاو			
منطقه	مثبت	منفی	کل
مرکزی	تعداد	۲۲۱	۱۴۱۰۸
	درصد منطقه نسبت به سایر مناطق	۱/۶°	۹۸/۴
شرقی	تعداد	۶۷۶	۳۷۶۹
	درصد منطقه نسبت به سایر مناطق	۱۷/۹°	۸۲/۱
غربی	تعداد	۶۵۳	۹۴۰۰
	درصد منطقه نسبت به سایر مناطق	۶/۹	۹۳/۱
کل	تعداد	۱۵۵۰	۲۷۲۷۷
	درصد موارد درگیری در منطقه	۵/۷	۹۴/۳

در میزان موارد گزارش شده رخداد تب برفکی بالاترین شیوع در شرق با ۱۷/۹ درصد و کمترین در مرکز با ۱/۶ درصد بود. در مقایسه بین سه منطقه استان تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳- وضعیت رخداد بیماری تب برفکی در جمعیت نشخوارکنندگان کوچک در مناطق مختلف استان کرمانشاه طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰

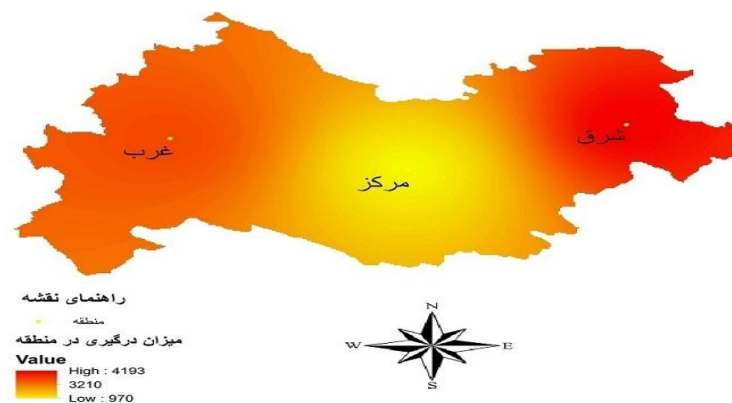
تب برفکی گوسفندان			
منطقه	مثبت	منفی	کل
	۷۴۹	۱۹۰۳۲	۱۹۷۸۱
مرکزی	۳/۸°	۹۶/۲	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۱۱/۰	۳۴/۱	۳۱/۵
تعداد	۳۵۱۷	۱۴۹۳۶	۱۸۴۵۳
شرقی	۱۹/۱°	۸۰/۹	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۵۱/۵	۲۶/۷	۲۹/۴
تعداد	۲۵۵۷	۲۱۹۱۲	۲۴۴۶۹
غربی	۱۰/۴	۸۹/۶	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۳۷/۵	۳۹/۲	۳۹/۰
تعداد	۶۸۲۳	۵۵۸۸۰	۶۲۷۰۳
کل	۱۰/۹	۸۹/۱	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

در میزان موارد گزارش شده رخداد تب برفکی بالاترین شیوع در شرق با ۱۹/۱ درصد و کمترین در مرکز با ۳/۸ درصد بود. در مقایسه بین سه منطقه استان تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴- وضعیت رخداد تب برفکی در کل جمعیت نشخوارکنندگان در مناطق مختلف استان کرمانشاه طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰

تب برفکی کل نشخوارکنندگان			
منطقه	مثبت	منفی	کل
	۹۷۰	۳۲۹۱۹	۳۳۸۹
مرکزی	۲/۹	۹۷/۱	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۱۱/۶	۴۰/۳	۳۷/۷
تعداد	۴۱۹۳	۱۸۰۲۹	۲۲۲۲۲
شرقی	۱۸/۹	۸۱/۱	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۵۰/۱	۲۲/۱	۲۴/۷
تعداد	۳۲۱۰	۳۰۶۵۹	۳۳۸۶۹
غربی	۹/۵	۹۰/۵	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۳۸/۳	۳۷/۶	۳۷/۶
تعداد	۸۳۷۳	۸۱۶۰۷	۸۹۹۸۰
کل	۹/۳	۹۰/۷	۱۰۰
درصد منطقه نسبت به سایر مناطق			
درصد موارد درگیری در منطقه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

در میزان موارد گزارش شده رخداد تب برفکی بالاترین شیوع در شرق ۱۸/۹ درصد و کمترین در مرکز ۲/۹ درصد بود. در مقایسه بین سه منطقه استان تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).



نقشه ۲- وضعیت رخداد تب برفکی در نشخوارکنندگان پایش شده در مقایسه سه منطقه در استان کرمانشاه طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰ در کل جمعیت نشخوارکنندگان بدون تفکیک گونه بالاترین شیوع در شرق استان و کمترین در مرکز. بین غرب، مرکز و شرق استان اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

جدول ۵- وضعیت رخداد تب برفکی کل نشخوارکنندگان استان کرمانشاه به تفکیک سال بر اساس اطلاعات GIS طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰

تاریخ	گاوه‌های معاینه شده	گاوه‌های مبتلا	گوسفندان معاینه شده	گوسفندان مبتلا	کل معاینه شده‌ها	مبتلایان کل	تلفات کل
۱۳۹۰	۲۱۳۷	۱۴۴	۱۲۰۰	۱۳۳	۷۱۲۲	۲۷۷	۳۳
۱۳۹۱	۳۶۵۰	۸۵	۲۰۱۱	۱۳۱	۵۶۶۱	۲۱۶	۳۹
۱۳۹۲	۴۲	۱۹۹	۴۹۸۵	۵۰۷*	۴۹۸۵	۵۱۶	۲۹۴
۱۳۹۳	۷۱۶	۶۹	۳۵۰	۷۰*	۱۰۶۶	۱۳۹**	۱۳
۱۳۹۴	۱۰۱۲۹	۵۴۸*	۲۰۷۰۵	۴۳۲	۴۱۴۱۰	۹۸۰**	۲۲۲
۱۳۹۵	۸۱۲۲	۴۹۳	۲۷۶۶۱	۳۵۶	۳۵۷۳۳	۸۴۹	۴۶۹
۱۳۹۶	۸۹۰	۲۲*	۹۰۴	۲۸۲	۹۰۴	۳۰۴	۸
۱۳۹۷	۱۵۹۱	۱۸۰	۴۸۸۷	۴۶۳	۶۴۷۸	۶۴۳	۱۳۳
۱۳۹۸	۱۵۸۴	۱۷۸	۴۹۹۱	۳۶۷	۶۵۷۵	۵۴۵	۲۲
۱۳۹۹	۱۵۹۸	۱۹۲	۳۷۹۸	۳۴۱	۵۳۹۶	۵۳۳	۴۱
۱۴۰۰	۱۴۲۷	۱۸۱	۴۵۶۱	۳۲۹	۵۹۸۸	۵۱۰	۲۴
۱۴۰۱	۱۴۰۱	۱۶۸	۴۲۰۱	۲۰۸	۵۶۰۲	۳۷۶	۱۱
جمع کل	۳۳۲۸۷	۲۲۷۸	۴۰۲۵۳	۷۱۷۹	۱۲۵۸۲۰	۸۵۰۷	۱۳۱۹

بیشترین رخداد بیماری گاوان مربوط به سال ۱۳۹۴ و کمترین آن در سال ۱۳۹۶ و بیشترین رخداد بیماری گوسفندان و بزها مربوط به سال ۱۳۹۲ و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ گزارش شده بود.

\* رخداد تب برفکی در کل جمعیت نشخوارکنندگان در استان اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

\*\* بیشترین رخداد مربوط به سال ۱۳۹۴ و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ گزارش شده بود.

## بحث

گردآوری مداوم و سیستماتیک، آنالیز و تفسیر داده‌های بیماری‌های عفونی از جمله بیماری تب برفکی در جمعیت دامی هر منطقه در طراحی وضع قوانین و مقررات مراقبت اپیدمیولوژیکی نقش عمده و اساسی دارد (۹). سیستم‌های مراقبت متناسب با ویژگی‌ها و شرایط موجود در هر کشور و منطقه طراحی می‌شود. برای بررسی نقشه پراکنش جغرافیایی وقایع بیماری می‌توان از مدل GIS استفاده کرد تا منجر به درک تعامل مجموعه داده‌ها در جمعیت‌های بررسی شده منطقه با گسترش بیماری شود. موارد بسیاری از همه‌گیری بیماری تب برفکی در تمام یا قسمت‌های بزرگی از ایران با انواع سروتیپ اندمیک اتفاق می‌افتد. در همه‌گیری‌های سال‌های ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵ در ایران، سروتیپ‌های O و A نقش عمده داشتند (۱۰، ۱۱). بیماری تب برفکی در همسایگان ایران با مرز مشترک طولانی عراق (۱۲)، افغانستان (۱۳) و پاکستان (۱۴) نیز بومی است. در افغانستان ۴۱۷۱ مورد شیوع تب برفکی (۱۹۹۵ تا ۲۰۰۸) و موارد مثبت در تست‌های سرولوژی با ۴۶/۴ تا ۷۶/۲

درصد و ۵۷۴ مورد بالینی (۲۰۰۹ تا ۲۰۱۶) گزارش شده است (۱۳، ۱۵). بر اساس یافته‌های این مطالعه نیز تمام نقاط به‌ویژه بخش شرقی استان با درصد قابل ملاحظه‌ای درگیر است. در ۵/۷ درصد جمعیت گاوان و ۱۰/۹ درصد جمعیت گوسفندان و بزها بیماری مشاهده شد. بین مناطق مختلف استان در غرب، مرکز و شرق استان در جمعیت نشخوارکنندگان اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). در گاوها بیشترین شیوع در شرق استان با ۱۷/۹ درصد و کمترین در مرکز با ۱/۶ درصد بود. در نشخوارکنندگان کوچک بالاترین شیوع در شرق استان با ۱۹/۱ درصد و کمترین در مرکز با ۳/۸ درصد بود. رخداد تب برفکی در کل جمعیت نشخوارکنندگان بزرگ و کوچک اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیشترین رخداد مربوط به سال ۱۳۹۴ و کمترین آن در سال ۱۳۹۳ گزارش شده بود. بیماری تب برفکی در عراق در مرز مشترک غربی ایران با استان کرمانشاه نیز موجب خسارات زیادی می‌گردد و مطالعات زیادی به‌منظور بررسی شیوع بیماری در استان‌های مختلف آن گاهی تا شیوع سرولوژیک ۱۰۰ درصد نیز گزارش شده است (۱۶).

در ایران کنترل تب برفکی عمدتاً بر واکسیناسیون تمام نشخوارکنندگان حساس با واکسن‌های چندگانه شناسایی و تست حیوانات بر اجرای برنامه‌های حفاظت و مراقبتی ناحیه‌ای و اجرای قرنطینه و امنیت زیستی استوار است. با این حال موارد بسیاری از همه‌گیری در تمام یا قسمت‌های بزرگی از ایران به‌طور همیشگی اتفاق می‌افتد (۱۷، ۱۸). در استان شرقی ایران (خراسان رضوی) نیز ۱۱۹ مورد (۲۰۱۲)، ۱۲۳ مورد (۲۰۱۳) و ۱۲۳ مورد ابتلا (۲۰۱۴) گزارش شده است (۱۹).

اپیدمیولوژی بیماری تب برفکی بسیار پیچیده است و توجیه علت تفاوت رخداد بیماری در مناطق مختلف دشوار است. با این حال عوامل مرتبط با همه‌گیرشناسی بیماری تب برفکی در اینجا مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد. تفاوت شیوع بیماری بین مناطق علاوه بر خصوصیات ذاتی سروتیپ‌های مختلف ویروس، عمدتاً به الگوی تجارت گوشت و جابجایی دام‌ها بستگی دارد (۲۰)، بر اساس گزارشات کارشناسان سازمان دامپزشکی عوامل مختلفی در رخداد بیماری تب برفکی مؤثرند. لذا با توجه به بافت عشایری استان، ورود دام جدید و عبور دام‌های عشایر از نزدیکی دامداری‌ها مهم‌ترین عوامل خطر برای بروز بیماری تب برفکی در منطقه است. در مناطق بررسی شده بخش عمده‌ای از نشخوارکنندگان کوچک کوچ رو با علائم بالینی نامشخصی حامل بیماری می‌باشند. همچنین نقش دلانان و چوبدارها (بدون داشتن پروانه اشتغال) به‌عنوان واسطه‌گرهای جابجایی دام از یک مکان به مکان دیگر، نامحدوده‌ی جغرافیایی در ثبت تردد دام‌ها بدون امکان ردیابی منشأ عفونت و طغیان بروز بیماری تب برفکی به‌عنوان یک فاکتور خطر معرفی شده است. همچنین واکسیناسیون و همکاری با واکسیناتورها فاکتور حفاظتی مهمی است. به‌طور کلی پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی یک بیماری در هر جمعیتی نیازمند شناخت فراوانی و توزیع جغرافیایی و زمانی آن است. بدون شناخت سه موضوع اساسی پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی، اصول تصمیم‌گیری و اتخاذ روش‌های کنترل

بیماری‌ها مخدوش می‌شود. از طرفی سرعت در شناخت وضعیت بیماری در ارتباط مستقیم با خطر گسترش بیماری است، بدین معنی که فاصله زمانی طولانی بین وقوع و لحظه شناخت آن بالطبع در اکثر موارد گسترش بیماری را به دنبال خواهد داشت. بنابراین بررسی سیستم پایش و مانیتورینگ بیماری‌های دامی با هدف اطلاع‌رسانی سریع بیماری‌های دامی و اطلاع‌رسانی به مقامات استانی و مرکزی است. تداوم این سیستم همراه با شناخت به‌موقع بیماری‌های دامی، ارائه ماهیت آن در مناطق و زمان‌های مختلف، با بکارگیری راهکارهای ضروری از اهداف سامانه GIS است. این موضوع در پیشگیری، کنترل، ریشه‌کنی و اولویت‌بندی بیماری‌های اختار کردنی مهمی مانند تب برفکی شامل: (۱- سرعت انتشار و سرایت بیماری ۲- خسارات اقتصادی ۳- تأثیر در بهداشت عمومی ۴- وجود برنامه مبارزه‌ای ملی، منطقه‌ای و جهانی ۵- اطلاعات کمکی و جنبی درخصوص همه‌گیری، آزمایشگاهی و درمانگاهی ۶- بازرسی حضوری از منطقه آلوده و در معرض خطر ۷- اهمیت در تجارت بین‌المللی) دارای اهمیت زیستی است (۲۲، ۲۳). از سامانه GIS در مقالات مختلفی برای کمک به تحقیقات اپیدمیولوژیک بیماری‌ها استفاده شده است. بوسینی سمان و همکاران در کوچینگ و ساراواک مالزی (۲۴)، گزو و همکاران در چین (۲۵) و ویسنگرات و همکاران در تایلند (۲۶) از پلت‌فرم سنجش سامانه GIS برای بررسی اپیدمیولوژی تب برفکی استفاده نمودند. همچنین اوزدنورال و همکاران (۲۰۱۵) از سنجش نقشه سامانه GIS برای مدل‌سازی پیشرفته‌ای در تعیین فاکتورهای خطر رخداد ابتلا به بیماری‌های عفونی استفاده نمودند (۲۷). در مطالعه قبلی ما (۱۳۹۷-۱۳۹۰) پراکنش جغرافیایی بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک بر اساس مدل سامانه GIS بررسی شد (۲۸).

بر اساس گزارش مرکز GIS اداره کل دامپزشکی استان کرمانشاه، طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۰ از مجموع کل ۵۱۹۴۳۶۳ دام استان، تعداد ۱۳۸۸۲۳۹ (۷۲/۲۶)

وحشی و ناتوانی واکسن‌های موجود در پیشگیری و احتمالاً به علت از بین رفتن ایمنی در گله‌های ایمن شده و سپس شروع مجدد بیماری از کانون‌های کوچکی که در آنها دام‌ها مجدداً حساس شده‌اند صورت می‌گیرد. در مطالعه حاضر شیوع تب برفکی در گوسفند در بین مناطق مختلف استان به‌طور معنی‌داری متفاوت بود و بیشترین شیوع مربوط به منطقه شرقی و کمترین مربوط به منطقه مرکزی بود. شیوع تب برفکی در گاو نیز در بین مناطق مختلف استان به‌طور معنی‌داری متفاوت بود و بیشترین شیوع مربوط به منطقه شرقی و کمترین مربوط به منطقه مرکزی بود. در بررسی اپیدمیولوژیک حاضر و اطلاعات ثبت شده نیز چرای مشترک و آزاد منطقه از سوی دامداران یک مشکل اساسی بود. همچنین تأثیر خرید دام با تاریخچه معین بر کاهش انتقال بیماری اهمیت دارد. دامدارانی که به‌طور معمول دام‌های مورد نیاز خود را از مناطق پیرامون دامداری تهیه می‌کنند، با خطر کمتری در ابتلا به بیماری گله برخوردارند. یک دلیل می‌تواند به‌واسطه شناخت و اطلاع از سابقه دامداری‌های مبدأ باشد. در این رابطه نیز عدم توجه دامداران در بررسی‌های کارشناسی سامانه ثبت GIS مشهود است. از سوی دیگر عدم وجود دقت در ثبت و پیگیری کامل کدهای اپیدمیولوژیک (حمل و نقل دام‌ها، شناسنامه‌دار نبودن دام‌های منطقه، عدم ثبت تحرکات دامی و کنترل ورود و خروج دام‌های قاچاق، عدم ایمن‌سازی کامل و عدم سامان‌دهی دلان) می‌تواند دلایل مهمی از عدم کنترل کامل بیماری در منطقه باشد. رطوبت، سرعت و جهت باد نیز عوامل مهمی در تعیین نرخ انتشار بیماری می‌باشند. در شرایط مناسب محیطی تخمین زده می‌شود که ویروس می‌تواند تا ۲۵۰ کیلومتر جابجا شود (۳۳).

حیوانات حیات وحش می‌توانند به‌عنوان مخزن بیماری مطرح باشند. شواهدی هست که ویروس می‌تواند توسط پرنده‌ها از ورای کوه‌ها و دریاها منتقل شود. همچنین برخی حیوانات پس از ابتلا به بیماری ممکن است تا مدت‌ها به‌عنوان حامل محسوب شوند که این

درصد) تحت واکسیناسیون قرار گرفته‌اند. همچنین از آنجایی که ایمنی متقاطع بین سروتیپ‌های ویروس تب برفکی وجود ندارد، ایمنی در برابر یک سروتیپ به معنای ایمنی در برابر سایر سروتیپ‌ها نیست و این می‌تواند مشکلاتی را در واکسیناسیون ایجاد کند. با این حال واکسیناسیون یکی از مؤثرترین راه‌های پیشگیری در برابر ویروس تب برفکی به‌خصوص در گوسفندانی است که به‌صورت سنتی در مجاورت گاوها نگهداری می‌شوند. از سوی دیگر دانش، نگرش و آگاهی دامداران در برابر بیماری‌های دامی، موجب کاهش رخداد بیماری‌های دامی و در نتیجه بهره‌وری بیشتر می‌شود. بنابراین نگرش مثبت دامدار در مورد تأثیر واکسن بیماری تب برفکی بسیار اهمیت دارد. نوع دامپروری و ترکیب سنی جمعیت دامی هر واحد نیز می‌تواند موجب افزایش استعداد گله برای ابتلا به بیماری باشد. مطالعات دیگری نشان داده‌اند که بزرگی گله می‌تواند بر افزایش شانس ابتلا به بیماری بیفزاید (۲۹، ۳۰). مطالعات نشان داده‌اند، چرا در مراتع مشترک بز، با عبور حیوانات از مرزهای روستا و چرای گاوها در مناطق به‌عنوان فاکتورهای خطر رخداد تب برفکی هستند. نشان داده شده است که در نواحی بومی احتمالاً مهم‌ترین روش انتشار بیماری تماس مستقیم بین حیواناتی است که بین استان‌های مختلف یا کشورهای مختلف یا سیستم عشایری جابجا می‌شود (۱۵، ۳۱، ۳۲). بر اساس آنالیز سامانه ثبت GIS، گرچه حمل و نقل دام بر اساس دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور با صدور گواهی حمل بهداشتی صورت می‌گیرد، با این حال به دلیل رواج طریقه دامداری عشایری در استان کرمانشاه، خود می‌تواند به‌عنوان عامل مهمی در انتشار بیماری در منطقه باشد. در این بررسی مشخص شد در نواحی دامپروری سنتی مانند استان کرمانشاه موارد رخداد دوره‌ای بیماری و سپس فروکش کردن آن رخ می‌دهد. به‌طور مثال بر اساس اطلاعات سامانه ثبت GIS، حدوداً هر ۵ سال با یک موج شیوع بالای تب برفکی در استان مواجه بوده‌ایم که احتمالاً به خاطر موتاسیون در ویروس

در آن استان‌ها و نیز نوع ارتباطات و جابجایی دام‌ها بین این مناطق می‌باشد. اگرچه آگاهی، نگرش و همکاری دامداران در کنترل موفق بیماری و نقش دام‌های عشایر در انتقال بیماری پررنگ است. اما بالاتر بودن گزارشات رخداد بیماری در برخی سال‌ها می‌تواند زمینه‌ساز بستری برای مطالعات بیشتر و تلاش در جهت مرتبط کردن این یافته با عواملی نظیر نرخ واکسیناسیون و وضعیت بیماری در کشورهای همسایه و غیره باشد. بنابراین به دلیل اندمیک بودن بیماری در ایران، نتایج این مطالعه برای کمک به سیاست گزاران بهداشتی در حوزه دام و بیماری‌های دامی در اتخاذ روش‌های کنترلی جامع، مفید بوده و موجب شناخت بهتر در مورد نقشه اپیدمیولوژی بیماری می‌شود.

#### تشکر و قدردانی

بخشی از یافته‌های این مطالعه مربوط به پایان نامه دکترای عمومی دامپزشکی، به شماره ایرانداک ۱۴۸۲۳۲۲ به تاریخ ۹۷/۱۲/۱۸ مصوب دانشگاه رازی می‌باشد. نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند و از حمایت اداره کل دامپزشکی استان کرمانشاه به جهت استفاده از داده‌های سامانه ثبت GIS صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

نقش مهمی در همه‌گیرشناسی بیماری دارد. حتی حیوانات واکسینه در معرض ویروس ممکن است تا ۵۰ درصد به‌صورت حامل درآیند (۳۴). در استان کرمانشاه برخی حیوانات سم‌دار وحشی (کل، بز و گراز) وجود دارند که ممکن است به‌عنوان مخزن بالقوه بیماری مطرح باشند، هرچند تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه صورت نگرفته است. همچنین به دلیل عدم مطالعات مشابه علمی گزارش شده در منابع معتبر، این اولین مطالعه بررسی شیوع با استفاده از داده‌های GIS در منطقه می‌باشد. بنابراین به دلیل اندمیک بودن تب برفکی در ایران و منطقه، به‌واسطه تحمیل افزایش هزینه‌های بیماری، کاهش تولید و تأثیر منفی بر تجارت دامپروری؛ شناخت وضعیت گذشته و حال حاضر بیماری بر اساس یک سیستم کامل GIS، در هدایت هر چه بهتر منابع برای کنترل بهینه و پیشگیری از بروز بیماری در آینده ضروری است.

#### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر بالاترین موارد گزارش شده تب برفکی در شرق استان بوده است. این یافته می‌تواند به علت وضعیت بیماری در استان‌های واقع در شرق استان کرمانشاه باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتر

#### References

- 1- Rodríguez-Habibe I, Celis-Giraldo C, et al. A comprehensive review of the immunological response against foot-and-mouth disease virus infection and its evasion mechanisms. *Journal of Vaccines*. 2020; 8(4): 764.
- 2- Li K, Wang C, et al. Virus-host interactions in foot-and-mouth disease virus infection. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 571509.
- 3- Mahy BW. Overview of foot-and-mouth disease and its impact as a re-emergent viral infection. *Foot and Mouth Disease: Book of Foot and Mouth Disease, CRC Press*. 2019. p: 437-46.
- 4- Sei JJ, Waters RA, et al. Effect of foot-and-mouth disease virus infection on the frequency, phenotype and function of circulating dendritic

cells in cattle. *Journal of PLoS One*. 2016; 11(3): e0152192.

- 5- Knight Jones TJ, McLaws M, Rushton J. Foot and mouth disease impact on smallholders what do we know, what don't we know and how can we find out more? *Journal of Transboundary and Emerging Diseases*. 2017; 64(4): 1079-94.

- 6- Nampanya S, Khounsy S, et al. Financial impacts of foot and mouth disease at village and national levels in Lao PDR. *Journal of Transboundary and Emerging Diseases*. 2016; 63(5): e403-e11.

- 7- Nikiforov V, Shcherbakov A, et al. Insights into the Molecular Epidemiology of Foot-and-Mouth Disease Virus in Russia, Kazakhstan, and

Mongolia in Terms of O/ME-SA/Ind-2001e Sublineage Expansion. *Journal of Viruses*. 2023; 15(3): 598.

**8- Brito B, Rodriguez L, Hammond J, et al.** Review of the global distribution of foot and mouth disease virus from 2007 to 2014. *Journal of Transboundary and emerging diseases*. 2017; 64(2): 316-32.

**9- Wubshet AK, Dai J, Li Q, et al.** Review on outbreak dynamics, the endemic serotypes, and diversified topotypic profiles of foot and mouth disease virus isolates in Ethiopia from 2008 to 2018. *Journal of Viruses*. 2019; 11(11): 1076.

**10- Azimi S, Mahravani H, Lotfi M.** Genetic and Antigenic Evaluation of Foot-and-mouth Disease Virus Type A in the Endemic Area of Iran within 2014-2015. *Archives of Razi Institute*. 2020; 75(3): 349. [In Persian]

**11- Hemmatzadeh F, Boardman W, et al.** Molecular and serological survey of selected viruses in free-ranging wild ruminants in Iran. *Journal of PLoS One*. 2016; 11(12): e0168756.

**12- Al-Salihi KA.** The epidemiology of foot-and-mouth disease outbreaks and its history in Iraq. *Journal of Veterinary world*. 2019; 12(5): 706.

**13- Osmani A, Robertson ID, et al.** History and epidemiology of foot-and-mouth disease in Afghanistan: a retrospective study. *Journal of BMC veterinary research*. 2019; 12-1: (1)15

**14- Ali I, Rehman A, Mushtaq MH, et al.** Outbreak investigation and identification of risk factors associated with the occurrence of foot and mouth disease in Punjab, Pakistan. *Journal of Preventive Veterinary Medicine*. 2022; 202(2): 105-123.

**15- Wajid A, Chaudhry M, et al.** Outbreak investigation of foot and mouth disease in Nangarhar province of war-torn Afghanistan, 2014. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 13800.

**16- Salim S, Talb O, et al.** Prevalence and risk factors of foot and mouth disease virus in nineveh province, iraq. *Journal of Adv Anim Vet Sci*. 2020; 8(1): 1-10.

**17- Najafi H, FallahMehrabadi MH, et al.** The first full genome characterization of an Iranian foot and mouth disease virus. *Journal of Virus research*. 2020; 279: 197888.

**18- Mahravani H, Keyvanfar H, et al.** Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus in ruminant during 2005-2006 in Iran. *Journal of Veterinary Research*. 2010; 65(2): 123-69.

**19- Rashtibaf M, K Sharifi, et al.** A survey on frequency of foot and mouth disease virus carriers in slaughtered cattle at Khorasan Razavi province abattoir using of Real-time PCR. *Journal of Transboundary and emerging diseases*. 2012; 59(6): 482-489

**20- Menezes TCd, Luna I, Miranda SHd.** Network analysis of cattle movement in Mato Grosso do Sul (Brazil) and implications for foot-and-mouth disease. *Journal of Frontiers in veterinary science*. 2020; 7: 219.

**21- Colenutt C, Brown E, et al.** Quantifying the transmission of foot-and-mouth disease virus in cattle via a contaminated environment. *Journal of MBio*. 2020; 11(4): e00381-20.

**22- Andel Van M, Tildesley MJ, Gates MC.** Challenges and opportunities for using national animal datasets to support foot and mouth disease control. *Journal of Transboundary and Emerging Diseases*. 2021; 68(4): 1800-13.

**23- Wu P, Rodríguez YY, et al.** Validation of a binary ethylenimine (BEI) inactivation procedure for biosafety treatment of foot-and-mouth disease viruses (FMDV), vesicular stomatitis viruses (VSV), and swine vesicular disease virus (SVDV). *Journal of Veterinary Microbiology*. 2021; 252: 108928.

**24- Seman BB, Masron T.** Hotspot Analysis of Hand Foot and Mouth Disease (HFMD) Using GIS in Kuching, Sarawak, Malaysia. *Journal of Humanities & Social Sciences Reviews*. 2019; 7(2): 36-44.

**25- Xu X, Tang Z, et al.** Detection of hand-foot-mouth disease and its spatial-temporal Epidemiological characteristics with GIS platform. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2018; (2)2: 337-371.

**26- Sangrat W, Thanapongtharm W, Poolkhet C.** Identification of risk areas for foot and mouth disease in Thailand using a geographic information system-based multi-criteria decision analysis. *Journal of Preventive veterinary medicine*. 2020; 185: 105183.

**27- Ozdenerol E.** GIS and remote sensing use in the exploration of Lyme disease epidemiology. *International journal of environmental research and public health*. 2015; 12(12): 15182-203.

**28- Kurdistani H, Pooyanmehr M, Afshari Safavi E.** Epidemiology of Peste des petits ruminants based on GIS; a case study in Kermanshah province, 2011-2019. *Journal of New Findings in Veterinary Microbiology*. 2022; 5(1):

24-34. [In Persian]

**29- Ilbeigi K, Bokaie S, et al.** Risk factors for recurrence of FMD outbreaks in Iran: a case-control study in a highly endemic area. *Journal of BMC veterinary research*. 2018; 14(1): 1-7.

**30- Sansamur C, Arjkumpa O, et al.** Determination of risk factors associated with foot and mouth disease outbreaks in dairy farms in Chiang Mai Province, Northern Thailand. *Journal of Animal Science*. 2020; 10(3): 512.

**31- Firestone SM, Hayama Y, et al.** Transmission network reconstruction for foot-and-mouth disease outbreaks incorporating farm-level covariates. *Journal of PLoS One*. 2020; 15(7): e0235660.

**32- Iriarte MV, Gonzáles JL, et al.** Main

factors associated with foot-and-mouth disease virus infection during the 2001 FMD epidemic in Uruguay. *Journal of Frontiers in Veterinary Science*. 2023; 10.

**33- Kerfua SD, Shirima G, et al.** Spatial and temporal distribution of foot-and-mouth disease in four districts situated along the Uganda-Tanzania border: Implications for cross-border efforts in disease control. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2018; 85(1): 1-8.

**34- Chowdhury MSR, Ahsan MI, et al.** Data on prevalence, distribution and risk factors for Foot and Mouth Disease in grazing cattle in haor areas of Bangladesh. *Journal of Data in brief*. 2020; 28: 104843.

# Investigating the Epidemiological Pattern and Geographical Distribution Map of Foot and Mouth Disease in Kermanshah Province: A Cross-sectional Study

۱۲۵

Hamoon Kurdestani<sup>1</sup>, Mehrdad Pouyanmehr<sup>2\*</sup>, Ehsanullah Afshari Safavi<sup>3</sup>

1- Graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

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

3- Assistant professor of large animal internal medicine, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.

Receive: April 15, 2023; Revise: June 3, 2023; Accept: September 9, 2023

## Summary

---

Foot and mouth disease is one of the most important viral infectious diseases of livestock. It is an endemic in some geographical regions of Iran and is one of the important health and economic problems. The aim of this study was to investigate the epidemiological pattern and geographic distribution of foot and mouth disease in Kermanshah province using geographic information system (GIS) over a 12-year period. Report of foot and mouth disease had been collected during 2011-2022. Then, using ArcGIS 10.6 software, the layers of specific province's divisions and information related to various parameters, including the total number of livestock's, examined, diseased, casualties and high-risk foci of the disease in the form of a descriptive table, coordinate system database Geographic (GCS) have connected to the map of the added province. Data analysis has been done based on the difference between the points involved in the disease and the degree of involvement. A significant difference has been observed in the population of ruminants between different regions of the province in the west, center and east ( $P < 0.05$ ). In the cows, the highest prevalence was in the east with 17.9% and the lowest was in the center with 1.6%. In small ruminants, the highest prevalence was in the east with 19.1% and the lowest in the center with 3.8%. The occurrence of foot and mouth disease in the whole population of large and small ruminants showed a significant difference ( $P < 0.05$ ). The highest was reported in 2014 and the lowest in 2013. The results of this study are useful in helping livestock health policy makers and adopting control methods, so it is necessary to be careful in recording the epidemiological codes of the GIS system and pay more attention to monitoring.

**Key words:** *Epidemiological pattern, Geographic distribution map, FMD, Kermanshah*

# New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 6, No. 2, Autumn & Winter 2024

**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