

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

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهرکرد

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد

افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی زاهدان

مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده

دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد جهانتیغ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه زابل

سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهید باهنر کرمان



کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

وبسایت: [nfvm.uoz.ac.ir](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 میکروبی‌شناسی دامپزشکی

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

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

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

### شیوه نگارش مقاله:

متن مقاله در صفحه A4 با ۱۵/۱ بین خطوط و ۵/۲ سانتی‌متر از حاشیه و با نرم‌افزار Word 2003 یا بالاتر و از طریق ثبت نام در سایت مجله به آدرس [nfvm.uoz.ac.ir](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 بخش های زیر باشد:

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

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

\* بحث

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

مقاله مروری (Review)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### تعهد نامه

سر دبیر محترم مجله تازه ها در میکروبی شناسی دامپزشکی

با سلام؛

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

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

امضاء و تاریخ

عنوان مقاله: -----

مشخصات کلیه نویسندگان مقاله به ترتیب مندرج در مقاله

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

آدرس پستی و الکترونیک نویسنده مسئول:

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

## فرم تعارض منافع

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

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

.....

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

.....

عنوان مقاله:

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

امضاء و تاریخ



## تعیین میزان حدت و تغییرات هیستوپاتولوژی بسنوتیا بسنویتتی در تخم مرغ

### جنین دار

شادزی متکلمی<sup>۱</sup>، مرضیه کفایت<sup>۲\*</sup>، سیدرضا حسینی<sup>۳</sup>، میلاد حمزه علی طهرانی<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

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

۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۴- دانش آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۳ خرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۹ تیر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۸ شهریور ۱۴۰۲



10.22034/NFVM.2023.400320.1188



20.1001.1.26454491.1402.6.2.1.9

### چکیده

بسنتیازیس یک بیماری مزمن تا شدید و به طور معمول غیر کشنده در گاو است که توسط تک یاخته بسنوتیا بسنویتتی ایجاد و سبب تظاهرات جلدی و سیستمیک شدید می شود. ایزوله Bb-Ger1 از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد و ابتدا در محیط کشت با رده سلولی (MARC 145) تکثیر و سپس با استفاده از لام نئوبار شمارش شد، هفت گروه ده تایی از تخم مرغ های جنین دار استاندارد نژاد Ross 308 از مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران تهیه و در روز نهم هچینگ تخم مرغ ها به گروه های اول تا ششم به ترتیب رقت های (ده، صد، هزار، ده هزار، صد هزار، یک میلیون) از تاکی زوئیت های انگل به میزان ۲۰۰ میکرولیتر و گروه هفتم به عنوان گروه شاهد فقط با PBS استریل تلقیح شدند. تخم مرغ ها روزانه بررسی و نمونه های بافتی از مغز، قلب، کبد، و پوست در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری و جهت بررسی هیستوپاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. مرگ و میر جنین ها در گروه های دریافت کننده انگل تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشت ( $P < 0.05$ ) و تلفات جنین ها و شدت ضایعات بافتی در گروه های مختلف وابسته به دوز انگل نبوده و تفاوت معنی داری با هم نداشتند ( $P > 0.05$ ). ضایعات هیستوپاتولوژی در بافت های مختلف شامل پرخونی، خونریزی، سلول های آماسی و نکروز مشاهده شد. مطالعه حاضر نشان داد که تخم مرغ جنین دار نمی تواند محیط مناسبی برای رشد و تکثیر انگل بسنوتیا بسنویتتی باشد.

**واژگان کلیدی:** بسنوتیا بسنویتتی، تخم مرغ جنین دار، حیوان مدل آزمایشگاهی

## مقدمه

تک‌یاخته بسنوتیا از خانواده سارکوسیستیده است و انگل لوله گوارش گربه بوده و اووسیست آن دفع شده و اگر چنانچه توسط گاو بلع شود یک دوره نزله‌ای (تبدار) را طی می‌کند و بعد از این دوره در زیر جلد مستقر شده و کیست‌های بسنوتیا را ایجاد می‌کند که ابتدا موجب ریزش مو و سپس شاخی و سفت شدن پوست (اسکلرودرما) شده که تحت عنوان بیماری پوست فیلی نیز شناخته می‌شود. مگس‌های خونخوار در دوران کوتاه گزش خود موجب انتقال انگل از یک حیوان آلوده (دوره پارازیتمی) به حیوان دیگر می‌شوند و به‌طور کلی روند بیماری با دو مرحله شروع می‌شود: ابتدا مرحله تبدار انگل که در آن ترشحات اشک، ریزش بینی و گاهی ممکن است ترس از نور و اغزوفتالمی و تورم غده‌های لنفاوی پشت چشم را نشان دهد و در نهایت یک آدنوپاتی منتشر (تورم سایر غدد لنفاوی بدن) رخ دهد. در مرحله بعد تمامی علائم از بین رفته و ریزش مو و ایجاد سیورئیک مشاهده می‌شود، همچنین کیست‌های انگل در صلبیه چشم قابل مشاهده هستند (۵). در حال حاضر دارو یا واکسن مؤثری علیه بیماری در دنیا وجود ندارد ولیکن راه‌های تشخیصی همچون سرولوژی شامل الایزا و وسترن بلات و روش‌های تشخیص مولکولی (PCR) با استفاده از توالی‌های ITS-1 و 18srDNA برای این بیماری شناخته شده است (۳، ۴، ۸، ۹). تخم‌مرغ‌های جنین‌دار چندین دهه در انگل‌شناسی به‌عنوان مدلی برای ایزوله کردن تک‌یاخته و تکثیر آنها استفاده شده است، استفاده از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار به دلیل مقرون به صرفه و استریل بودن بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند و کشت تک‌یاخته توکسوپلازما گوندی در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار گزارش شده است (۱۶). بر این اساس جهت انجام مطالعه حاضر از تخم‌مرغ جنین‌دار به‌عنوان محیط کشت جهت رشد و تکثیر انگل استفاده شد تا میزان حدت انگل در دوزهای مختلف و آسیب‌های وارده به بافت‌های مختلف جنین تخم‌مرغ‌ها در اثر انگل مشخص گردد.

## مواد و روش‌ها

**کشت سلولی:** از ایزوله Bb-Ger1 بسنوتیا بسنوتیتی تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی جهت آلوده‌سازی و تکثیر تک‌یاخته مورد نیاز تحقیق حاضر استفاده شد و ایزوله مذکور ابتدا در محیط کشت با رده سلولی (MARC 145) (سلول کلیه میمون سبز آفریقایی) در محیط کشت DMEM به همراه ۲ درصد سرم جنین گوساله و پنی‌سیلین - استرپتومایسین به میزان (1µl/ml) کشت داده شد. فلاسک‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شد و روزانه به‌منظور مشاهده تخریب سلولی با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفت، پس از سه روز تخریب ۸۰ تا ۹۰ درصدی در سلول‌ها مشاهده شد، سپس محتویات مایع رویی فلاسک جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 1800g سانتریفیوژ شد، رسوب باقیمانده که حاوی بسنوتیا بسنوتیتی بود با رنگ تریپان بلو (Sigma Aldrich- Germany) رنگ‌آمیزی شد و با لام نئوبار مورد شمارش قرار گرفت. کشت و پاساژ دادن تاکی‌زوئیت‌های بسنوتیا بسنوتیتی در رده‌های سلولی ذکرشده به طور اصولی با خصوصیات بیولوژیکی مناسب تأیید شد. عدم آلودگی مایکوپلاسمایی روی محیط کشت PPLO آگار تأیید شد و جهت اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی از محیط کشت سلولی و سرم، کشت تاکی‌زوئیت‌ها در محیط آگارخون‌دار انجام و عدم رشد باکتری در این محیط‌ها نیز تأیید شد.

**تلقیح به تخم‌مرغ جنین‌دار:** جهت مقایسه‌ی میزان حدت تاکی‌زوئیت‌های بسنوتیا بسنوتیتی، هفت گروه ده تایی از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار استاندارد نژاد Ross 308 از مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۷۰ درصد و ۶ تا ۸ بار چرخش در ساعت داخل دستگاه هچر به‌صورت استریل نگهداری شد، تخم‌مرغ‌ها به‌طور روزانه به روش کندل مورد بررسی قرار گرفت و جنین‌ها از لحاظ وجود علائم حیاتی (حرکت و تشکیل رگه‌ها) بررسی شدند و در روز

شد، بعد از ۲۴ ساعت فرمالین تعویض شد و مراحل آماده‌سازی بافت شامل آگیری با استفاده از الکل‌هایی با درجه صعودی انجام شد و پس از آن مرحله شفاف‌سازی با استفاده از گزیلول و خارج کردن الکل انجام شد (دستگاه اتوتکنیکون) و نهایتاً مرحله آغستگی و قالب‌گیری با استفاده از پارافین مذاب صورت گرفت و پس از تهیه برش‌های ۴ تا ۵ میکرونی از بلوک‌های بافتی، به مدت سی دقیقه در آون ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از خشک شدن در محیط آزمایشگاه، رنگ‌آمیزی متداول هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و به‌وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (تصویر ۱).

**آنالیز آماری:** برای تجزیه و تحلیل نمونه‌ها و تعیین رابطه بین متغیرهای کیفی مورد مطالعه حاضر به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و با کمک تست آزمون مربع کای استفاده شد.

### نتایج

در جوجه‌های هچ شده با گروه‌های دریافت کننده تاکی‌زوئیت‌های بسنوتیا بسنوتی علائم بالینی شامل عدم جذب کامل کیسه زرده، ضعف، عدم تعادل، ناتوانی در ایستادن و ژولیدگی پرها و مرگ در رقت‌های چهارم و ششم مشاهده شد و همچنین جوجه‌های هچ شده گروه شاهد از نظر بالینی کاملاً طبیعی بودند (جدول شماره ۱).

نهم هچینگ تخم‌مرغ‌ها، محل غشاء کوریوآلانتوئیک با استفاده از کندلینگ مشخص و محدوده آن در هر تخم‌مرغ علامت‌گذاری شد، سپس سوراخی در حد فاصل کیسه هوایی و غشاء کوریو آلانتوئیک جهت محل تزریق انگل ایجاد، سپس به گروه‌های اول تا ششم به ترتیب رقت‌های (ده، صد، هزار، ده هزار، صد هزار، یک میلیون) از تاکی‌زوئیت‌های انگل به میزان ۲۰۰ میکرولیتر تلقیح شد و گروه هفتم به‌عنوان گروه شاهد فقط با سرم PBS استریل تلقیح شدند. تخم‌مرغ‌ها به مدت ۱۸ روز در دمای مناسب و شرایط کنترل شده حرارت و رطوبت در دستگاه جوجه‌کشی نگهداری شدند و به‌صورت روزانه دو بار جهت بررسی تلفات احتمالی کندل شدند و میزان مرگ و میر در هر گروه ثبت و از بافت‌های مغز، قلب و کبد، پوست و عضله آنها نمونه‌برداری انجام شد و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری و جهت بررسی هیستوپاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت.

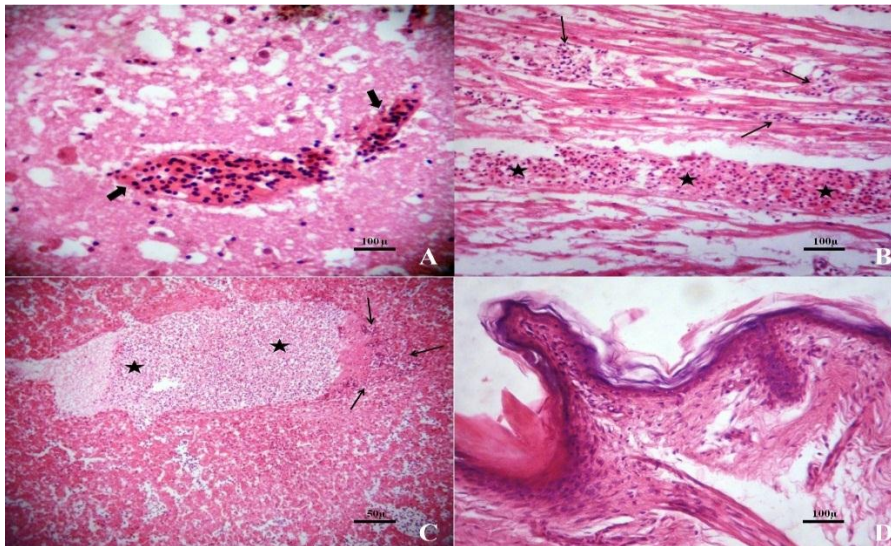
**هیستوپاتولوژی:** از جنین‌های تلف شده در گروه‌های مختلف تلقیح، ابتدا بازرسی دقیق خارجی به عمل آمده و سپس جهت مطالعات هیستوپاتولوژی بافت‌های مغز، قلب، کبد و پوست آنها نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های بافتی در فرمالین ۱۰ درصد به میزان حداقل ۱۰ برابر حجم نمونه برای مغز، قلب، کبد و پوست و همچنین به میزان حداقل ۲۰ برابر برای مغز استفاده

جدول ۱- نتایج تلفات جنین‌ها ۱۵ روز پس از تلقیح

گروه	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم (شاهد)
رقت تاکی‌زوئیت	۱۰	۱۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰	۰
میزان کشندگی	٪۵۰	٪۵۰	٪۷۵	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	۰

(لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و هتروفیل‌ها) در بین سلول‌های عضلانی، در بافت کبد: پرخونی، خون‌ریزی، نفوذ سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای (لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و هتروفیل‌ها) در اطراف سیاهرگ مرکز لوبولی و همچنین در بافت پوست: افزایش بافت همبند، ضخیم و چروکیده شدن پوست مشهود می‌باشد (تصویر ۱).

در بررسی ماکروسکوپی جنین‌های مرده در گروه‌های مختلف در بافت‌های مختلف مغز، قلب، کبد و پوست هیچ‌گونه ضایعه‌ای مشاهده نشد و لیکن در بررسی هیستوپاتولوژی میکروسکوپی در بافت مغز: خونریزی، پرخونی، سلول‌های آماسی، در بافت قلب: نکروز سلول‌های عضلانی، پرخونی، ارتشاء سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای



تصویر ۱- مقاطع هیستوپاتولوژی، بافت مغز (A)، بافت قلب (B)، بافت کبد (C)، بافت پوست (D)

### بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ایزوله‌ی تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (Bb-Ger1) با موفقیت در محیط کشت با رده سلولی (MARC 145) (سلول کلیه میمون سبز آفریقایی) تکثیر و جهت آلوده‌سازی تخم‌مرغ‌ها استفاده شد (۶، ۱۰، ۱۲). در سال‌های اخیر از تخم‌مرغ جنین‌دار به‌عنوان مدلی برای جداسازی، انتشار و انجام مطالعات بر روی بیولوژی انگل‌ها استفاده شده است که در دسترس بودن و قیمت مناسب، آن را به مدل خوبی برای انجام مطالعات تبدیل کرده است. تاکنون از تخم‌مرغ جنین‌دار به‌عنوان محیط کشت برای تک‌یاخته‌هایی همچون تریپانوزوم کروزو استفاده شده است (۱۳).

کیست بافتی *بسنوتیا بسنوتی* تاکنون در هیچ حیوان آزمایشگاهی تولید نشده است و R.D. Biglake در سال ۱۹۶۲ نشان داد که تاکی‌زوئیت‌های *بسنوتیا بسنوتی* مشتق شده از محیط کشت برای ژربیل‌ها و رت‌های خاکی کشته شده است و خرگوش‌ها علائم بالینی شامل تب، کونژکتیویت و ارکیت را نشان دادند اما زنده مانده‌اند. موش‌ها، رت‌ها، خوکچه هندی، همستر و میکروتوس‌ها نشانه بالینی بیماری را بروز ندادند اما تیترا پادتن اختصاصی ضد *بسنوتیا بسنوتی* در آنها افزایش یافته

است (۱). در مطالعه نمازی و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز مرگ و میر در تخم‌مرغ‌های جنین‌داری که دوزهای مختلف *بسنوتیا کاپره* را دریافت نموده بودند از ۶ الی ۷ روز پس از تلقیح انگل آغاز شده بود و تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل دیده شده است (۱۵). همچنین نتایج مرگ و میر تخم‌مرغ‌های جنین‌دار دریافت‌کننده دوزهای مختلف انگل در مقایسه گروه کنترل مشابه مطالعه فورتا و همکاران در سال ۲۰۰۷، منصوریان و همکاران در سال ۲۰۱۵، و بابایی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بود. مقایسه گروه‌های دریافت‌کننده تاکی‌زوئیت‌های *بسنوتیا بسنوتی* نشان داد که افزایش دوز تاکی‌زوئیت تلقیح شده تأثیری در میزان مرگ و میر جنین‌ها نداشته است و این بدین معناست که تلفات جنین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه به دوز انگل تلقیح شده وابسته نبوده است (۲، ۱۱، ۱۴).

نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه فورتا و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد که در آن تک‌یاخته *نئوسپورا کنینوم* را به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار نژاد تخم‌گذار تلقیح نمودند و مشخص شد که میزان مرگ و میر جنین‌ها در اثر تک‌یاخته *نئوسپورا کنینوم* به دوز تلقیح شده وابسته نیست (۱۱). هر چند که نمازی و همکاران در سال ۲۰۱۰ توانستند تک‌یاخته *بسنوتیا کاپره* را به‌طور موفقیت‌آمیزی در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار کشت و تکثیر

مطالعه حاضر که برای اولین بار بر روی جنین جوجه‌های گوشتی انجام شده است نشان داد که تخم مرغ جنین دار نمی‌تواند محیط مناسبی برای رشد و تکثیر انگل بسنوتیا بسنوتی باشد.

#### تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

نمایند. علاوه بر این که در مطالعه حاضر از تخم مرغ جنین دار نژاد گوشتی Ross 308 استفاده شد اما نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه ذکر شده مغایرت دارد (۱۵). همچنین در بررسی هیستوپاتولوژی در بافت‌های مختلف جنین‌های تلف شده ضایعاتی از قبیل نکرروز و درجاتی از سلول‌های آماسی، خونریزی و پرخونی مشاهده شد که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۲).

#### References

- 1- Bigalke R.D. Preliminary communication on the cultivation of *Besnoitia besnoiti* (Morotel, 1912) in tissue culture and embryonated eggs. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1962; 33(4).
- 2- Babaei Gourchinloo Z, Kefayat M, Namavari M. Comparison of virulence and histopathological changes of NC-1 and NC-SweB1 isolates of *Neospora caninum* in chicken embryonated eggs. *Veterinary Research & Biological Products*. 2017; 30(4): 92-99. [In Persian]
- 3- Cortes H.C, Nunes S, Reis Y, Staubli D, Vidal R, Sager H, et al. Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Vet Parasitol*. 2006; 141(3-4): 216-225.
- 4- Cortes H.C, Reis Y, Gottstein B, Hemphill A, Leitao A, Muller N. Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet Parasitol*. 2007; 146(3-4):352-356.
- 5- Cortes H.C, Reis Y, Waap H, Vidal R, Soares H, Marques I, et al. Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Vet Parasitol*. 2006; 141(3-4): 226-233.
- 6- Dubey J.P, Sreekumar C, Rosenthal B.M, Vianna M.C.B, Nylund M, Nikander S, et al. Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (*Rangifer tarandus*). *International Journal of Parasitology*. 2004; 34: 1273-1287.
- 7- Ellis J.T, Holmdahl J.M, Ryce C, Njenga M.J, Harper P.A.W, Morrison D.A. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest, and goats. *Protist*. 2000;151: 329-336.
- 8- Ellis J.T, Holmdahl J.M, Ryce C, Njenga M.J, Harper P.A.W, Morrison D.A. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest, and goats. *Protist*. 2000; 151: 329-336.
- 9- Fernandez-García A, Alvarez-García G, Risco-Castillo V, Aguado-Martínez A, Marcen J.M, Rojo-Montejo S, et al. Development and use of an indirect ELISA in the outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Vet Rec*. 2010; 166(26): 818-822.
- 10- Fernandez-García, A, Risco-Castillo, V, Pedraza-Diaz, S, Aguado-Martínez, A, Alvarez-García, G, Gomez-Bautista, M, et al. First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain. *J. Parasitol*. 2009; 95(2): 474-476.
- 11- Furuta P.I, Mineo T.W.P, Carrasco A.O.T, Godoy G.S, Pinto A.A, Machado R.Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology*. 2007; 134: 1931-1939.
- 12- G Schares, Basso W, Majzoub M, Cortes H.C, Rostaher A, Semair J, et al. First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Vet. Parasitol*. 2009; 163(4): 31-322.
- 13- Mello M.N, Deane M.P. Patterns of development of *Trypanosoma cruzi* in the embryonated chicken egg. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1976; 70: 380-388.
- 14- Mansourian M, Namavari M, Khodakaram-Tafti A, Rahimian A. Experimental *Neospora caninum* infection in domestic bird's embryonated eggs. *J Parasit Dis*. 2015; 39(2): 241-

244. [In Persian]

**15- Namazi F, Oryan A, Namavari M.M, Rahimian A.** Experimental infection of embryonated eggs of chicken. *Tropical Biomedicine*. 2010; 27(3): 417. [In Persian]

**16- Que X, Wunderlich A, Joiner K.A, Reed S.L.** Toxopain-1 is critical for infection in a novel chicken embryo model of congenital toxoplasmosis. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 2915-2921.



## Determining the intensity and histopathological changes of *Besnoitia besnoiti* in embryonated eggs

Shadzi Motakalemi, Marzieh Kefayat<sup>\*1</sup>, Seyed Reza Hosseini<sup>2</sup>, Milad Hamzehali Tehrani<sup>3</sup>

1- Graduate, faculty of veterinary, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.


2- Associate Professor, Department of Pathobiology, faculty of veterinary, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, faculty of veterinary, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

4- Graduate, Department of Pathobiology, faculty of veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Receive: June 03, 2023; Revise: July 10, 2023; Accept: September 9, 2023

 10.22034/NFVM.2023.400320.1188

 20.1001.1.26454491.1402.6.2.1.9

### Summary

Besnoitiosis is a chronic to severe and usually non-fatal disease in cattle, which is caused by the protozoan *Besnoitia besnoiti* and causes severe skin and systemic manifestations. The Bb-Ger1 isolate was obtained from the Razi Vaccine and Serum Research Institute and was first propagated in the culture medium with the cell line (MARC 145) and then counted using Neubauer chamber, seven groups of ten from Ross 308 standard embryonated eggs from Iran Animal Science Research Institute and on the ninth day of hatching, the eggs were divided into the first to sixth groups, respectively (ten, one hundred, one thousand, ten thousand, one hundred thousand, one million) dilutions of parasite tachyzoites in the amount of 200 microliter and the seventh group were inoculated only with sterile PBS as a control group. Eggs were examined daily and tissue samples from brain, heart, liver, and skin were fixed in 10% formalin and evaluated for histopathology. The mortality of fetuses in the groups receiving the parasite was significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ) and the death of the fetuses and the severity of tissue lesions in different groups were not dependent on the parasite dose and had no significant difference ( $P > 0.05$ ). Histopathological lesions were observed in various tissues, including hyperemia, hemorrhage, edematous cells, and necrosis. The present study showed that the embryonated egg cannot be a suitable environment for the growth and reproduction of *Besnoitia besnoiti* parasite.

**Keywords:** *Besnoitia besnoiti*, embryonated egg, laboratory model animal



## تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال (*Fleckvieh*) و ارتباط آن با زنده‌مانی و تحرک اسپرم و غلظت تستوسترون سرم خون و پلاسمای منی

امیر خاکی<sup>۱</sup>، حجت‌الله شکری<sup>۲\*</sup>

۱- استادیار، گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۴ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۷ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۰۲ بهمن ۱۴۰۱



10.22034/nfvm.2023.379656.1169



20.1001.1.26454491.1402.6.2.2.0

### چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین میزان آلودگی قارچی بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال با زنده‌مانی و تحرک اسپرم و همچنین غلظت تستوسترون در سرم خون و پلاسمای منی است. نمونه‌گیری از پوست خارجی غلاف قضیب، پوست داخلی غلاف قضیب، آلت تناسلی قبل از انزال، مایع پیش انزالی، مایع انزالی (منی)، آلت تناسلی پس از انزال و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی از گاوهای نر انجام شد. برای آزمایش قارچ‌شناسی، همه نمونه‌ها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (۰/۰۰۵ درصد) کشت داده شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۰ روز نگهداری شدند. تحرک اسپرم‌ها با استفاده از نرم‌افزار CASA و درصد اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی با کمک رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین انجام شد. همچنین، سطوح تستوسترون نمونه‌های سرم خون و پلاسمای منی با روش کمی لومینسانس سنجش شدند. شایع‌ترین قارچ‌های جدا شده شامل گونه‌های *کاندیدا* (۳۵/۶ درصد)، *پنی‌سیلیوم* (۱۸/۶ درصد) و *آسپرژیلوس* (۱۴/۲ درصد) بودند. بیشترین و کمترین تعداد میانگین قارچ‌ها به ترتیب مربوط به پوست داخل قضیب ( $16/43 \pm 21/08$ ) و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی ( $2/45 \pm 2/00$ ) بودند. اگرچه بین میزان کل آلودگی قارچی در دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال و پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود نداشت، اما ارتباط مثبت معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد و غلظت تستوسترون پلاسمای منی مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). یافته‌ها نشان دادند که همبستگی معناداری بین میزان جمعیت قارچی و تعداد اسپرم‌های زنده و سطح تستوسترون مایع منی وجود دارد.

**واژگان کلیدی:** آسپرژیلوس، اندام جنسی نر، فلور میکروبی، کاندیدا، کروزئی، هورمون جنسی

## مقدمه

در شرایط آب و هوایی مرطوب، ممکن است عوامل قارچی و مخمری در خوراک دام و علوفه‌های استفاده شده در بستر دام کلونیزه شده و تولید توکسین‌های مختلفی کنند. این عوامل قارچی می‌توانند از طریق گوارش و تنفس وارد بدن دام‌ها شده و منجر به مسمومیت قارچی و عفونت اندام‌های مختلف بدن در دام‌ها شوند (۱). مهم‌ترین اثرات مستقیم یا غیر مستقیم قارچ‌ها بر دام‌ها شامل سقط جنین، کاهش باروری و کاهش تولید شیر می‌باشد (۲). مطالعات مختلف آلودگی قارچی را در دستگاه تناسلی حیوانات تأیید کرده‌اند. اغلب گونه‌های قارچی گزارش شده شامل *فوزاریوم*، *آسپرژیلوس*، *استاکی بوتریس* و *پنی‌سیلیوم* می‌باشند (۳-۵).

نژاد سیمنتال دو منظوره شیری-گوشتی (فلکفیه) نژادی قدرتمند، کم‌هزینه و مقاوم در برابر تنش‌های گرمایی و متابولیک بوده که تولید بالای شیر و عضلانی بودن به‌عنوان دو عامل موفقیت این نژاد ارزشمند در نظر گرفته می‌شود. بهبود ژنتیک در حیوانات اهلی با روش پذیرفته شده جهانی تلقیح مصنوعی در حال انجام است. این امر با استفاده از اسپرم‌های منجمد دام‌های نر انجام می‌شود. جدا از این که این روش خصوصیات ژنتیکی مطلوب را به ارمغان می‌آورد، اسپرم منجمد می‌تواند به‌عنوان ابزاری برای انتشار وسیع عوامل میکروبی بیماری‌زا باشد (۶). ماکروفاژها و گرانولوسیت‌ها اولین خط دفاعی بدن در برابر میکروارگانیسم‌ها بوده که با تولید رادیکال‌های آزاد موجب کشتار آنها می‌شوند. با این وجود رادیکال‌های آزاد ممکن است به خارج از سلول‌ها نیز رها شده و با مولکول‌ها و سلول‌هایی نظیر اسپرماتوزوئیدهای مجاورشان واکنش نشان دهند (۷). آنتی‌اکسیدان‌های سلولی هم اغلب در سیتوپلاسم قرار دارند و در اسپرم به جهت اینکه سیتوپلاسم اندکی وجود دارد در نتیجه جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد ناکافی هستند (۸). اسپرم منجمد شده حیوانات ممکن است قبل (آلودگی اولیه) و یا بعد (آلودگی ثانویه) از انجماد با قارچ‌ها آلوده شود. Tao و

همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند که اسپرم انسان می‌تواند به صورت اولیه آلوده به قارچ شود و انجماد اسپرم قادر به کاهش غلظت عوامل قارچی می‌گردد (۹). عدم وجود آلودگی در اسپرم‌های منجمد تهیه شده در مراکز تولید اسپرم گاو از نظر کیفیت اسپرم‌های تولیدی و میزان باروری اسپرم‌های تلقیح شده به گاوهای ماده حائز اهمیت می‌باشد. مشخص شده است که وجود باکتری، ویروس و قارچ در منی تأثیرات مخربی بر کیفیت اسپرم تولیدی دارد و همچنین ممکن است این پاتوژن‌ها به نسل‌های بعدی نیز انتقال یابند. با وجود بکارگیری تدابیر بهداشتی قابل قبول، میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب به علت انتشار گسترده‌شان قادرند در طول استحصال، پردازش و نگهداری اسپرم، به داخل مایع منی راه یابند (۱۰). منابع این عفونت‌ها می‌تواند متعدد باشد مثل آلودگی‌های محیطی مرتبط با جمع‌آوری و فرآیندهای انجمادی گامت‌ها (۱۱). انجماد منی و رویان این مزیت را دارد که از ذخیره طولانی مدت گامت‌ها اطمینان حاصل می‌شود، اما همزمان، اگر به خوبی کنترل نشوند، خطر انتشار برخی پاتوژن‌ها به واسطه انتقال رویان و تلقیح مصنوعی ممکن است افزایش یابد (۱۲-۱۴). در حقیقت، مشخص شده است که منی منجمد شده گاو یک منبع بالقوه برای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مختلف می‌باشد که می‌توانند به‌طور مخربی بر تحرک اسپرم و رشد رویان تأثیرگذار باشند (۱۵-۱۷). بنابراین مهم است که جمعیت میکروارگانیسم‌ها به‌طور مؤثری در طول تمامی مراحل فناوری‌های تولید مثلی کنترل شده تا از ورود عوامل بیماری‌زا به حیوانات، گله‌ها، مناطق و یا کشورهایی که قبلاً این عوامل وجود نداشتند، جلوگیری شود (۱۸).

تاکنون اطلاعات و گزارشات مستندی در مورد میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال در دسترس نمی‌باشد. بنابراین هدف این مطالعه، تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال و بررسی ارتباط آن با زنده‌مانی و تحرک اسپرم و همچنین غلظت تستوسترون در سرم خون و پلاسمای

## تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سمینتال ...

قوام، رنگدانه و سرعت رشد روی محیط ثبت گردید. تعداد کلونی‌های قارچی در هر پلیت آگار مثبت شمارش گردید. شناسایی قارچ‌ها بر اساس مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنها انجام شد. آزمایش مستقیم میکروسکوپی بر روی کلونی‌های قارچی شفاف شده با لاکتوفنل کاتن‌بلو صورت پذیرفت. مخمرها با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی و کشت بر روی محیط کشت اختصاصی کروم آگار ( CHROMagar Co., Paris, France) تعیین هویت شدند (۱۹).

**انجماد اسپرم:** نمونه‌های منی با استفاده از رقیق کننده Andromed (Minitube, Germany) منجمد شدند. بدین منظور، پس از اخذ نمونه‌های منی، ابتدا حجم انزال و سپس غلظت منی و در نهایت درصد تحرک پیشرونده اسپرم‌ها بررسی شدند. پس از ارزیابی اسپرم و تأیید کیفیت قابل انجماد بودن آن، محلول Pre - extender تهیه شد. جهت تهیه محلول Pre - extender به نسبت ۱ به ۱ رقیق‌کننده به مایع انزالی اضافه شد. محلول تهیه شده در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری به مدت ۱۰ دقیقه باقی ماند. مراحل پرکردن و بستن نمونه‌ها توسط دستگاه automatic filling & sealing of straws - MPP Uno (Minitube, Germany) در دمای اتاق انجام شد. سپس نمونه‌ها بسته‌بندی شده و در سینی‌های پایت‌های اسپرم قرار داده شده و به مدت ۴ - ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال به تعادل رسیدند. سپس اسپرم‌های بسته‌بندی شده به دستگاه MT Freezer (Minitube, Germany) جهت انجماد منتقل شدند. سه نمونه از هر پایت منجمد شده پس از یخ‌گشایی در بن‌ماری ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مورد بررسی پارامترهای کیفی منی قرار گرفتند.

**بررسی تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد:** تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد با استفاده از نرم‌افزار CASA (HFT CASA, Hooshmand Fanaver, Iran) بررسی شد. بدین منظور، یک پایت از هر انزال در بن‌ماری تنظیم شده

منی بوده است. نتایج این مطالعه می‌تواند جهت اقدامات پیشگیرانه و امنیت زیستی در مراکز پرورش، پروراندی و به‌ویژه مراکز تولید اسپرم منجمد کمک بسیار شایانی نماید، چرا که شرایط عاری از آلودگی از اصول اساسی و لازم‌الاجرای تمامی مراکز اصلاح نژاد در دنیا می‌باشد و یکی از معضلات اصلی هر واحد صنعتی تولید اسپرم، مبارزه با عوامل قارچی است، چرا که در صورت وجود آلودگی مرکز، احتمال تعلیق فعالیت آنها وجود خواهد داشت.

### مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه:** برای این مطالعه، تعداد ۱۲ راس گاو نر سمینتال دومنظوره آلمانی (فلکفیه) در مرکز اصلاح نژاد گاو سمینتال کشور واقع در شهرستان آمل در سال ۱۳۹۸ انتخاب شدند. همه حیوانات یک برنامه پیشگیرانه شامل درمان‌های ضد انگلی و واکسیناسیون‌های معمول را دریافت نمودند. این حیوانات فاقد هرگونه نارسایی‌های تناسلی بوده و درمان‌های ضد قارچی در طی ۶ ماه گذشته نداشتند. نمونه‌ها توسط سواب استریل از پوست خارجی غلاف قضیب، پوست داخلی غلاف قضیب، آلت تناسلی قبل از انزال، مایع پیش انزالی، مایع انزالی (منی)، آلت تناسلی پس از انزال و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها سریعاً جهت آزمایش قارچ‌شناسی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی و برای آزمایشات تناسلی به آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل منتقل شدند. در این مطالعه، تمام آزمایشات انجام شده بر روی گاوها مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاقی رای تحقیق روی حیوانات دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل بودند.

**کشت نمونه‌ها و جداسازی قارچ‌ها:** همه نمونه‌ها بر روی سطح محیط سابورو دکستروز آگار (Merck Co., Darmstadt, Germany) حاوی کلرامفنیکل (۰/۰۵ درصد) کشت داده شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۰ روز نگهداری گردیدند. ارزیابی‌های چشمی از کلونی‌های قارچی انجام شد و مشخصات آنها شامل

در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شد و پس از خشک کردن پایت، مایع حاوی اسپرم در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری که در رک‌های شناور در بن‌ماری قرار داشتند، ریخته شدند. برای تمامی مراحل ۵ میکرولیتر از نمونه جهت بررسی بر روی لام مخصوص دستگاه CASA قرار گرفت. پارامترهای تحرک اسپرم‌ها شامل موارد ذیل بودند: درصد تحرک پیشرونده اسپرم‌ها بعد از انجماد (PMFT)، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده بعد از انجماد (VCLFT)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها بعد از انجماد (VSLFT)، سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها بعد از انجماد (VAPFT)، متوسط زاویه چرخشی اسپرم‌ها بعد از انجماد (MADFT)، حداکثر دامنه حرکت جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (ALH.FT)، فرکانس حرکات جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (BCFFT)، خطی بودن حرکت اسپرم‌ها بعد از انجماد (LINFT).

**بررسی اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی:** به‌منظور بررسی درصد اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی هر انزال، از رنگ‌آمیزی اتوزین نیگروزین (Eosin G, 15405/0025 - Germany) (Nigrosin, 15405/0029, Minitube - Germany) استفاده شد. در این روش، پس از این که اسپرم‌ها در رقیق‌کننده نهایی قرار گرفتند، یک قطره از آن با یک قطره اتوزین ۲ درصد و دو قطره نیگروزین ۴ درصد به آرامی با سمپلر ترکیب شده و بر روی لام شیشه‌ای قرار گرفته و از آن گسترش تهیه شد. گسترش‌های تهیه شده بر روی یک صفحه گرم، خشک شده و سپس حداقل ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ بررسی شدند. اسپرم‌های مرده به علت نفوذپذیری بالای غشای سلولی خود، رنگ اتوزین را به خود گرفته و قرمز رنگ شده و از اسپرم‌های زنده که این رنگ را به خود نمی‌گیرند کاملاً متمایز شدند و به این ترتیب درصد اسپرم‌های مرده به دست می‌آمد. جهت بررسی اسپرم‌های منجمد نیز پس از یخ‌گشایی و ریخته شدن در میکروتیوب‌های شناور در بن‌ماری عیناً به مانند اسپرم‌های تازه عمل شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم از هر لام

مورد بررسی و شکل‌شناسی اسپرم‌ها از لحاظ موارد غیر طبیعی در قسمت‌های سر، بدنه و دم مورد توجه قرار گرفت.

### اندازه‌گیری میزان تستوسترون خون و پلاسمای منی:

به‌منظور اندازه‌گیری مقدار تستوسترون سرم خون، خونگیری از ورید دمی تمامی گاوهای تحت مطالعه انجام شد. نمونه‌های خون پس از لخته شدن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شده و سرم آنها جدا و تا اندازه‌گیری میزان تستوسترون در دمای منفی ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک میلی‌لیتر منی از هر انزال جهت تعیین میزان تستوسترون پلاسمای منی جدا شده و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روی نمونه‌ها بعد از سانتریفیوژ با سمپلر برداشته شده و در نمونه‌هایی که پلاسمای منی آنها شفاف نبود، یک قطره از پلاسمای از نظر وجود اسپرم در زیر میکروسکوپ بازرسی و در صورت وجود اسپرم دوباره سانتریفیوژ شد. سپس نمونه‌های پلاسمای منی به‌دست آمده توسط سمپلر برداشته و به میکروتیوب با ظرفیت ۱/۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد و تا زمان آزمایش در دمای منفی ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری مقادیر تستوسترون نمونه‌های سرم و پلاسمای منی به روش کمی لومینسانس و با دستگاه Siemens advia XPT (Siemens Co., Munich, Germany) انجام شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحت ویندوز نسخه ۲۴ (SPSS Sciences, Chicago, IL, USA) انجام شد. برای بررسی رابطه همبستگی بین پارامترهای کیفی اسپرم و میزان تستوسترون سرم و منی با میزان آلودگی قارچی در نمونه‌های مختلف دستگاه تناسلی دام‌های نر و همچنین انواع مختلف قارچ‌های رشته‌ای و مخمری از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. داده‌هایی که دارای توزیع نرمال بودند و همگنی واریانس بین دو عامل رعایت شده بود از همبستگی پیرسون استفاده شد. فرض تصادفی

## تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سمینتال ...

جدایه‌های قارچی متعلق به ۱۵ جنس مختلف شامل گونه‌های *کاندیدا* (۳۵/۶ درصد)، *پنی‌سیلیوم* (۱۸/۶ درصد)، *آسپرژیلوس* (۱۴/۲ درصد)، *کلادوسپوریوم* (۱۰/۵ درصد)، *ترایکوسپورون* (۷/۳ درصد)، *موکور* (۳/۲ درصد)، *آلترناریا* (۲/۷ درصد)، *فوزاریوم* (۲/۱ درصد)، *رودوتورولا* (۱/۵ درصد)، *ژئوتریکوم* و *قارچ رنگی* (۱/۳ درصد)، *اولوکلادیوم* (۰/۷ درصد)، *اوستیلاگو* (۰/۵ درصد)، *کورولاریا* (۰/۲ درصد) و *رایزوپوس* (۰/۱ درصد) بودند. تفاوت معناداری بین میزان شیوع گونه‌های *کاندیدا* با سایر جنس‌های قارچی مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ) (جدول ۱). از بین گونه‌های مختلف *کاندیدا*، *کروزئی* (مورد ۱۵۲)، *آلبیکنس* (۱۱۷ مورد)، *تروپیکالیس* (۴۲ مورد) و سایر گونه‌های *کاندیدا* (۲۲ مورد) از اصلی‌ترین مخمرهای جدا شده از دستگاه تناسلی گاوهای نر سمینتال شناخته شده‌اند.

بودن نمونه‌ها یک اصل اساسی است. در مورد پارامترهایی که به صورت کمی و رتبه‌ای مورد آزمایش قرار گرفتند از Spearman's Rank-Order Correlation استفاده گردید. معنادار بودن جواب‌ها در حیطه  $P < 0/05$  به دست آمد.

### نتایج

عوامل قارچی از ۹۰/۴ درصد (۷۶ از کل ۸۴ نمونه) نمونه‌های تحت آزمایش جداسازی شدند. ارگانسیم‌های جدا شده و فراوانی هر جنس قارچی در جدول ۱ ارائه شده است. یک مجموعه‌ای از ۹۴۰ جدایه قارچی از نمونه‌های تناسلی به دست آمد. بعد از بررسی قارچ‌شناسی، ۵۱۰ قارچ رشته‌ای (۵۴/۳ درصد) و ۴۳۰ مخمر (۴۵/۷ درصد) تشخیص داده شدند. ۳ قارچ مختلف در ۱ گاو، ۴ تا قارچ مختلف در ۱ گاو، ۶ قارچ مختلف در ۳ گاو، ۷ قارچ مختلف در ۳ گاو، ۸ قارچ مختلف در ۲ گاو و ۹ قارچ مختلف در ۲ گاو یافت شدند.

جدول ۱- فراوانی قارچ‌های جدا شده از بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر (تعداد، درصد)

قارچ	ناحیه	پوست خارجی غلاف قضیب	پوست داخلی غلاف قضیب	آلت تناسلی قبل از انزال	مایع پیش انزالی	مایع انزالی (منی)	آلت تناسلی پس از انزال	مایع انزالی پس از یخ‌گشایی	مجموع
قارچ‌های رشته‌ای	<i>آسپرژیلوس</i>	۱۷ (۱/۸)	۳۳ (۳/۵)	۲۳ (۲/۴)	۲۵ (۲/۷)	۹ (۰/۹)	۲۷ (۲/۹)	۰	۱۳۴ (۱۴/۲)
	<i>پنی‌سیلیوم</i>	۳۸ (۴)	۴۳ (۴/۶)	۱۳ (۱/۴)	۱۸ (۱/۹)	۱۲ (۱/۳)	۳۳ (۳/۵)	۱۸ (۱/۹)	۱۷۵ (۱۸/۶)
	<i>موکور</i>	۱۲ (۱/۳)	۶ (۰/۶)	۴ (۰/۴)	۱ (۰/۱)	۲ (۰/۲)	۵ (۰/۵)	۰	۳۰ (۳/۲)
	<i>رایزوپوس</i>	۰	۰	۱ (۰/۱)	۰	۰	۰	۰	۱ (۰/۱)
	<i>فوزاریوم</i>	۳ (۰/۳)	۲ (۰/۲)	۲ (۰/۲)	۲ (۰/۲)	۱ (۰/۱)	۱۰ (۱)	۰	۲۰ (۲/۱)
	<i>آلترناریا</i>	۱۴ (۱/۵)	۵ (۰/۵)	۱ (۰/۱)	۴ (۰/۴)	۰	۱ (۰/۱)	۰	۲۵ (۲/۷)
	<i>کورولاریا</i>	۲ (۰/۲)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲ (۰/۲)
	<i>کلادوسپوریوم</i>	۱۱ (۱/۲)	۱۵ (۱/۶)	۲۰ (۲/۱)	۱۵ (۱/۶)	۱۷ (۱/۸)	۲۱ (۲/۲)	۰	۹۹ (۱۰/۵)
	<i>اولوکلادیوم</i>	۰	۰	۰	۷ (۰/۷)	۰	۰	۰	۷ (۰/۷)
	<i>اوستیلاگو</i>	۰	۰	۵ (۰/۵)	۰	۰	۰	۰	۵ (۰/۵)
مخمرها	<i>قارچ رنگی</i>	۱۲ (۱/۳)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲ (۱/۳)
	<i>ترایکوسپورون</i>	۰	۲۲ (۲/۳)	۲۱ (۲/۲)	۴ (۰/۴)	۱ (۰/۱)	۲۱ (۲/۲)	۰	۶۹ (۷/۳)
	<i>ژئوتریکوم</i>	۰	۳ (۰/۳)	۰	۹ (۰/۹)	۰	۰	۰	۱۲ (۱/۳)
	<i>رودوتورولا</i>	۵ (۰/۵)	۱ (۰/۱)	۴ (۰/۴)	۲ (۰/۲)	۰	۲ (۰/۲)	۰	۱۴ (۱/۵)
	<i>کاندیدا</i>	۳۹ (۴/۱)	۱۱۹ (۱۲/۷)	۶۸ (۷/۲)	۴۵ (۴/۸)	۵ (۰/۵)	۵۳ (۵/۶)	۶ (۰/۶)	۳۳۵ (۳۵/۶)
مجموع		۱۵۳ (۱۶/۳)	۲۴۹ (۲۶/۵)	۱۵۹ (۱۶/۹)	۱۳۵ (۱۴/۴)	۴۷ (۵)	۱۷۳ (۱۸/۴)	۲۴ (۲/۵)	۹۴۰ (۱۰۰)

بودند (جدول ۲). تعداد کل قارچ‌های شناسایی شده در پوست داخل قزیب به‌طور معناداری بیشتر از سایر بخش‌ها بود ( $p < 0/05$ ).

بیشترین و کمترین تعداد میانگین عوامل قارچی جدا شده به‌ترتیب مربوط به پوست داخل قزیب ( $16/43 \pm$ ) و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی ( $2/00 \pm 2/45$ )

جدول ۲- مقادیر میانگین عوامل قارچی مختلف براساس نمونه‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر

متغیر	میانگین	انحراف استاندارد
پوست خارجی غلاف قزیب	۱۳/۵۸	۷/۳۴
پوست داخلی غلاف قزیب	۲۱/۰۸	۱۶/۴۳
آلت تناسلی قبل از انزال	۱۳/۵۰	۷/۷۸
مایع پیش‌انزالی	۱۱/۰۰	۱۰/۶۸
مایع انزالی (منی)	۴/۰۰	۲/۸۳
آلت تناسلی پس از انزال	۱۴/۵۸	۱۱/۳۶
مایع انزالی پس از یخ‌گشایی	۲/۰۰	۲/۴۵

همبستگی معنادار مثبت با LINFT (خطی بودن حرکت اسپرم‌ها) بعد از انجماد مشاهده شد ( $p < 0/05$ ) (جدول ۳ و ۴). همچنین در این مطالعه مشخص شد که بین میزان کل آلودگی‌های قارچی و مخمیری در مجموع بخش‌های تناسلی گاوهای نر سیمنتال با پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود ندارد (به استثنای همبستگی مثبت معنادار با متوسط زاویه چرخشی اسپرم‌ها پس از انجماد).

نتایج یافته‌های این پژوهش نشان داد که آلودگی قارچی پوست خارجی غلاف قزیب با هیچ‌کدام از پارامترهای تحرک اسپرم در قبل و بعد از انجماد همبستگی معناداری نداشت. در مقابل، میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قزیب با میل جنسی و تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها قبل از انجماد و تمامی پارامترهای تحرک اسپرم پس از انجماد (به غیر از LINFT) همبستگی مثبت معناداری داشتند. همچنین تمایل به

جدول ۳- میانگین پارامترهای کیفی اسپرم‌های گاوهای نر بر اساس میزان آلودگی قارچی

متغیر	میانگین	انحراف استاندارد
Lib	۳/۲۵	۰/۶۲
Vol	۹/۸۵	۶/۹۳
Con	۱۲۴۹/۰۰	۴۱۶/۲۷
PM	۶۸/۵۰	۵/۹۳
VCLFT	۴۶/۲۱	۵/۲۱
VSLFT	۲۸/۰۳	۴/۳۴
VAPFT	۳۲/۷۹	۳/۹۸
MADFT	۲۱/۸۸	۴/۵۵
ALHFT	۲/۱۲	۰/۱۹
BCFFT	۰/۷۰	۰/۱۵
LINFT	۳۷/۲۸	۴/۱۱

درجه میل جنسی گاو نر (Lib)، حجم مایع انزالی (Vol)، غلظت مایع انزالی (Con)، درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها قبل از انجماد (PM)، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده بعد از انجماد (VCLFT)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها بعد از انجماد (VSLFT)، سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها بعد از انجماد (VAPFT)، متوسط زاویه چرخشی اسپرم‌ها بعد از انجماد (MADFT)، حداکثر دامنه حرکت جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (ALHFT)، فرکانس حرکات جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (BCFFT) و خطی بودن حرکت اسپرم‌ها بعد از انجماد (LINFT).

## تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سمینتال ...

جدول ۴- همبستگی بین آلودگی های قارچی بر اساس نمونه های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر

پوست خارجی غلاف قضیب	پوست داخلی غلاف قضیب	آلت تناسلی قبل از انزال	مایع پیش انزالی مایع انجماد	مایع انزالی قبل از انجماد	آلت تناسلی پس از انزال	مایع انزالی پس از یخ گشایی	
۰/۰۶	۰/۵۹*	۰/۰۵	۰/۱۸	-۰/۳۱	۰/۳۵	۰/۱۲	Lib
۰/۱۶	-۰/۰۳	۰/۳۹	-۰/۳۴	-۰/۴۲	۰/۱۶	-۰/۳۲	Vol
-۰/۱۱	-۰/۲۷	-۰/۶۷*	۰/۴۰	-۰/۲۱	-۰/۲۳	-۰/۱۱	Con
۰/۳۹	۰/۵۹*	۰/۲۴	-۰/۲۴	۰/۳۵	۰/۲۰	۰/۴۴	PM
۰/۱۶	۰/۳۷	۰/۲۰	-۰/۳۳	-۰/۲۰	-۰/۰۸	۰/۵۰	PMFT
۰/۰۵	۰/۵۵*	۰/۱۸	-۰/۱۳	-۰/۰۸	۰/۲۹	۰/۱۹	VCLFT
-۰/۰۶	۰/۵۴*	۰/۲۷	-۰/۱۲	۰/۰۹	۰/۰۸	۰/۵۰ <sup>P</sup>	VSLFT
۰/۰۴	۰/۶۲*	۰/۳۱	-۰/۱۳	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۵۸*	VAPFT
۰/۳۳	۰/۶۸*	۰/۲۶	-۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۳۲	۰/۳۸	MADFT
۰/۲۹	۰/۶۱*	۰/۲۲	-۰/۲۷	-۰/۰۵	۰/۴۷	۰/۲۴	ALHFT
۰/۰۴	۰/۷۲*	۰/۲۰	-۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۲۴	BCFFT
-۰/۲۴	۰/۵۲ <sup>P</sup>	-۰/۱۲	۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۳۲	۰/۰۶	LIN.FT

\*:significantly correlation ( $p < 0.05$ ), P: tend to significantly ( $p < 0.10$ )

نتایج آماری این مطالعه نشان دادند که میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قضیب با درصد زندهمانی اسپرمها قبل از انجماد همبستگی مثبت معناداری داشت. همچنین با درصد اسپرمهای غیر طبیعی قبل و پس از

انجماد، همبستگی منفی معناداری نشان داد. میزان آلودگی قارچی آلت تناسلی قبل از انزال با میزان تستوسترون خون و پلاسمای منی همبستگی مثبت معنادار نشان داد (جدول ۵).

جدول ۵- میانگین پارامترهای کیفی اسپرم گاوهای نر در هنگام نمونه گیری جهت تعیین آلودگی قارچی

متغیر	میانگین	انحراف استاندارد
Viab	۸۴/۲۹	۷/۶۷
Morph	۱۶/۴۷	۱۲/۰۸
Head	۶/۷۵	۸/۷۰
MidP	۱/۱۴	۰/۶۵
Tail	۷/۸۶	۹/۲۶
CyD	۰/۷۲	۰/۵۹
HOST	۶۹/۳۹	۱۱/۴۳
ViabFT	۵۱/۵۱	۸/۵۲
HOSTFT	۳۸/۷۴	۶/۹۳
MorphFT	۲۱/۶۳	۱۳/۴۶
HeadFT	۹/۴۰	۱۳/۶۶
MidPFT	۲/۱۱	۰/۷۳
TailFT	۹/۳۴	۸/۶۳
CyDFT	۰/۷۸	۰/۴۹
BT	۸/۱۷	۲/۷۹
SPT	۷/۲۴	۵/۵۷

درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده قبل از انجماد (Viab)، درصد کل اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی قبل از انجماد (Morph)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در سر اسپرم قبل از انجماد (Head)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در قطعه میانی اسپرم قبل از انجماد (MidP)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در دم اسپرم قبل از انجماد (Tail)، درصد قطره سیتوپلاسمی قبل از انجماد (CyD)، درصد تورم هایپواسموتیک اسپرمها قبل از انجماد (HOST)، درصد اسپرمهای زنده بعد از

انجماد (ViabFT)، درصد تورم هایپواسموتیک اسپرم‌ها بعد از انجماد (HOSTFT)، درصد کل اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی بعد از انجماد (MorphFT)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در سر اسپرم بعد از انجماد (Head FT)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در قطعه میانی اسپرم بعد از انجماد (MidPFT)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در دم اسپرم بعد از انجماد (Tail FT)، درصد قطره سیتوپلاسمی بعد از انجماد (CyDFT)، میزان تستوسترون در سرم خون (BT) و میزان تستوسترون در پلاسمای منی (SPT).

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه جدایه‌های قارچی از بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاو نر شامل پوست خارجی غلاف قضیب، پوست داخلی غلاف قضیب، آلت تناسلی قبل از انزال، مایع پیش انزالی، مایع انزالی (منی)، آلت تناسلی پس از انزال و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی به دست آمدند. شایع‌ترین عوامل قارچی جدا شده شامل گونه‌های *کاندیدا* با فراوانی ۳۵/۶ درصد، *پنی‌سیلیوم* با فراوانی ۱۸/۶ درصد و *آسپرژیلوس* با فراوانی ۱۴/۲ درصد بودند. همچنین بیشترین و کمترین تعداد میانگین عوامل قارچی جدا شده به ترتیب مربوط به پوست داخل قضیب ( $16/43 \pm$ ) و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی ( $2/08 \pm 2/45$ ) بودند. تا به امروز گزارشی از حضور و انتشار قارچ‌ها در دستگاه تناسلی گاوهای نر صورت نگرفته است و فقط مطالعات اندکی در زمینه آلودگی قارچی مایع منی تازه و یخ‌گشایی شده گاوها انجام شده است که با مطالعه ما همخوانی نزدیکی دارند. Seyedmousavi و همکاران در سال ۲۰۱۸ قارچ‌های *آسپرژیلوس* و *کاندیدا* را از دستگاه تناسلی حیوانات نر از جمله گاوها گزارش کردند (۲۰). در مطالعه Bielanski و همکاران در سال ۲۰۰۳، قارچ *آسپرژیلوس* از مایع منی یخ‌گشایی شده گاو جداسازی شد (۱۵). مخمرهای بیماری‌زای *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* هم از نمونه‌های منی تازه و رقیق شده و غلاف قضیب گاوها و گاو میش‌های به ظاهر سالم و همچنین از مایع منی منجمد یخ‌گشایی شده گاوهای نر بومی و غیر بومی جدا گردید (۲۱). در مطالعه انجام شده توسط Zampieri و همکاران در سال ۲۰۱۳، قارچ *کاندیدا* از یک نمونه از ۱۱ نمونه اسپرم گاوی منجمد یخ‌گشایی شده یافت شد (۲۲). Mitra و همکاران در سال ۲۰۱۶ طی بررسی بر روی ۸۶۰ اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده گاو، ۵ نمونه

آلوده به *آسپرژیلوس نایجر* تشخیص دادند (۲۳).

در دنیا نیز مطالعات بسیار کمی در مورد فلور قارچی دستگاه تناسلی نر حیوانات دیگر انجام شده است. در مطالعه Rota و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی دستگاه تناسلی اسب‌های نر سالم، قارچ‌های رشته‌ای مثل گونه‌های *پنی‌سیلیوم* (۸/۵ درصد)، *موکوراسه* (۶/۱ درصد)، *آسپرژیلوس* و *اسکوپولاریوپسیس* (۵/۴ درصد) و مخمرهایی مانند گونه‌های *ترایکوسپورون* (۳ درصد) و *کاندیدا* (۰/۶ درصد) به‌عنوان مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل قارچی جدا شده از بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی بودند (۵). در مطالعه فوق، هیچ عوامل قارچی از مایع منی جداسازی نشده بود و این یافته با نتایج سایر محققین بر روی منی تازه (۱ تا ۵ درصد نمونه مثبت) (۲۴) و منی منجمد شده نریان (۶ تا ۳۳ درصد نمونه مثبت) (۲۵) و همچنین مطالعه ما بر روی گاوهای نر (۵ درصد) متفاوت است. علت جداسازی عوامل قارچی از منی تازه یا پس از یخ‌گشایی می‌تواند مربوط به آلودگی حین اسپرم‌گیری یا دستگاه‌های فرآوری‌کننده منی باشد. اگرچه این قارچ‌ها اغلب ساپروفیت هستند، اما تحت شرایط خاصی می‌توانند بیماری‌زا شده و با انتقال به حیوانات ماده منجر به آندومتريت، سقط جنین یا مرگ نوزاد گردند (۲۶). منبع عوامل قارچی در مادیان ممکن است منی یا بخش‌های آناتومیکی دام نر و یا تجهیزات آلوده اسپرم‌گیری باشد. Xiaoping و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای را در خصوص جداسازی و شناسایی قارچ‌های موجود در اندام تناسلی پاندهای نر انجام دادند که طی آن ۲۴ گونه قارچی از پوشش خارجی دستگاه تناسلی و ۵ گونه قارچی از نمونه‌های منی پاندهای نر جداسازی شدند. بیشترین گونه‌های قارچی شناسایی شده شامل *آسپرژیلوس*، *ترایکوسپورون*، *پنی‌سیلیوم*، *کاندیدا* و *کلادوسپوریوم*

## تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سمینتال ...

همچنین در این مطالعه مشخص شد که بین میزان کل آلودگی‌های قارچی و مخمری در مجموع بخش‌های تناسلی گاوهای نر سمینتال با پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود ندارد (به استثنای همبستگی مثبت معنادار با متوسط زاویه چرخشی اسپرم‌ها پس از انجماد).

نتایج آماری این مطالعه نشان داد که میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قضیب با درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها قبل از انجماد همبستگی مثبت معناداری داشت. همچنین با درصد اسپرم‌های غیر طبیعی قبل و پس از انجماد، همبستگی منفی معناداری نشان داد. میزان آلودگی قارچی آلت تناسلی قبل از انزال با میزان تستوسترون خون و پلاسمای منی همبستگی مثبت معنادار نشان داد. میزان آلودگی قارچی مایع پیش‌انزالی با درصد دم‌های غیر طبیعی اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی مثبت معناداری نشان داد. میزان آلودگی قارچی مایع انزالی و آلت تناسلی پس از انزال با هیچ یک از پارامترهای کیفی اسپرم همبستگی نشان نداد. این پژوهش مشخص نمود که بین کل آلودگی‌های قارچی‌های رشته‌ای و مخمری در مجموع بخش‌های تناسلی گاوهای نر سمینتال با پارامترهای کیفی اسپرم همبستگی وجود ندارد، اما ارتباط مثبت معناداری با میزان کل آلودگی قارچی‌های رشته‌ای با درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده پس از انجماد و میزان تستوسترون پلاسمای منی و همچنین تمایل به ارتباط معنادار مثبت با یکپارچگی غشای اسپرم‌ها و درصد قطره سیتوپلاسمی اسپرم‌ها بعد از انجماد داشتند. میزان آلودگی قارچی‌های رشته‌ای تمایلی به ارتباط معنادار منفی با درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در قسمت میانی اسپرم‌ها قبل از انجماد داشت. بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط نویسندگان، تاکنون در زمینه همبستگی بین میزان آلودگی قارچی بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر با پارامترهای کیفی اسپرم و همچنین میزان تستوسترون مایع منی مطالعات کمی انجام شده است، ولی تاکنون گزارشی از ارتباط بین

بودند (۲۷). نتایج مطالعه آنها نشان داد که قارچ‌های رشته‌ای (۶۴ مورد از کل ۷۶ مورد) به‌طور چشمگیری بیشتر از مخمرها (۱۲ مورد از ۷۶ مورد) در پوشش خارجی دستگاه تناسلی و منی پانداها بودند. با این حال، هیچ مخمری در منی پانداها یافت نشد که مشابه نتیجه به دست آمده توسط Rota و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی نریان سالم می‌باشد (۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود انواع مختلفی از قارچ‌ها از منی تازه و رقیق شده و همچنین مایع شستشوی غلاف قضیب جداسازی شدند که این قارچ‌ها می‌توانند در ایجاد نارسایی‌های تولید مثلی تحت شرایط خاصی نقش داشته باشند.

در این مطالعه انواع متغیرهای کیفی اسپرم شامل درجه میل جنسی گاو نر (Lib)، حجم مایع انزالی (Vol)، غلظت مایع انزالی (Con)، درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها قبل از انجماد (PM)، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده بعد از انجماد (VCLFT)، سرعت در مستقیم‌الخط اسپرم‌ها بعد از انجماد (VSLFT)، سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها بعد از انجماد (VAPFT)، متوسط زاویه چرخشی اسپرم‌ها بعد از انجماد (MADFT)، حداکثر دامنه حرکت جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (ALHFT)، فرکانس حرکات جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (BCFFT) و خطی بودن حرکت اسپرم‌ها بعد از انجماد (LINFT) برحسب میزان آلودگی قارچی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج یافته‌های این پژوهش نشان داد که همبستگی مثبت معناداری بین میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قضیب با میل جنسی و حرکت اسپرم‌ها قبل و پس از انجماد وجود دارد. میزان آلودگی قارچی آلت تناسلی قبل از انزال با غلظت منی همبستگی منفی معنادار داشت. میزان آلودگی قارچی مایع انزالی و آلت تناسلی پس از انزال با هیچ یک از پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی نشان ندادند. میزان آلودگی قارچی اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده با سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها پس از انجماد همبستگی مثبت معناداری داشت.

تناسلی گاوهای نر سیمنتال با پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود ندارد، اما ارتباط مثبت معناداری با درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد و میزان تستوسترون پلاسمای منی مشاهده شد. با توجه به اینکه این مطالعه بر روی تعداد محدودی از گاوهای نر سیمنتال انجام شده است پیشنهاد می‌شود که در آینده مطالعات گسترده‌تری بر روی نژادهای مختلف و تعداد بیشتری از گاوهای نر انجام پذیرد.

#### سپاسگزاری

از مدیریت شرکت آمارد دام طب‌رستان (مهندس حشمت‌الله جمالی و مهندس علی‌اکبر واحدی) بابت اجازه انجام این پژوهش و کارشناسان مرکز اصلاح نژادی و تولید اسپرم گاو سیمنتال ایران (مهندس مسعود بابایی، مهندس مرتضی فانی، مهندس آرمین خاکی، مهندس عابد ضرغامی و مهندس عادل علی‌نژاد) بابت همکاری در نمونه‌برداری جهت آزمایشات قارچ‌شناسی و تهیه اسپرم منجمد کمال قدردانی و تشکر را داریم.

#### تعارض منافع

این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافی برای نویسندگان ندارد.

میزان سطح خونی تستوسترون و فراوانی قارچ‌های مستقر در دستگاه تناسلی حیوانات نر مشاهده نشده است. Tian و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که کاندیدا/آلبیکنس و فیلتره آن دارای یک اثر مهارکنندگی روی حرکت اسپرم، زنده‌مانی اسپرم و ناهنجاری‌های ساختاری اسپرم در مایع منی هستند (۲۸). برخی مطالعات آزمایشگاهی نیز افزایش شکستگی DNA اسپرم، تغییر میتوکندریال غشایی و آگلوتیناسیون اسپرم‌ها توسط گونه‌های قارچی را نشان دادند که منجر به کاهش کیفیت اسپرم و باروری موجودات نر و در نهایت اختلال در فرآیند باروری و تشکیل جنین می‌گردد (۲۹).

در مجموع یک شیوع متفاوتی از عوامل قارچی بین نمونه‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال مشاهده شد. قارچ‌های رشته‌ای و مخمری به‌طور شایع در پوست داخل قضیب یافت شدند، در حالی که مایع انزالی پس از یخ‌گشایی کمترین میزان آلودگی را نشان داد. گونه‌های کاندیدا و پنی‌سیلیوم به‌ترتیب شایع‌ترین مخمر و قارچ رشته‌ای جدا شده از دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال بودند. این مطالعه نشان داد که بین میزان کل آلودگی‌های قارچی و مخمری در مجموع بخش‌های

## References

- 1- Abramson D, Mills J.T, Marquardt R.R, Frohlich A.A. Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1997; 61(1): 49-52.
- 2- Cafarchia C, Figueredo L.A, Otranto D. Fungal diseases of horses. *Veterinary Microbiology*. 2013; 167(1-2): 215-234.
- 3- Moraes I.A, Stussi J.S, Lilenbaum W, Pissinatti A, Luz F.P, Ferreira A.M.R. Isolation and identification of fungi from vaginal flora in three species of captive Leontopithecus. *American Journal of Primatology*. 2004; 64(3): 337-343.
- 4- Shokri H, Khosravi A, Sharifzadeh A, Tootian Z. Isolation and identification of yeast flora from genital tract in healthy female camels (*Camelus Dromedarius*). *Veterinary Microbiology*. 2010; 144(1-2): 183-186. [In Persian]
- 5- Rota A, Calicchio E, Nardoni S, Fratini F, Ebani V.V, Sgorbini M, et al. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology*. 2011; 76(3): 464-470.
- 6- Vinodh R, Raj G.D, Govindarajan R, Thiagarajan V. Detection of *Leptospira* and *Brucella*. *Tropical Animal Health and Production*. 2008; 40(5): 323-329.
- 7- Ochsendrof F.R. Infection and reactive oxygen species. *Andrology*. 1998; 30(1): 81-86.
- 8- Drevius L.O. Bull spermatozoa as osmometers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1970; 28(1): 29-39.

- 9- Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille M.C. Human sperm vitrification: the state of the art. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020; 18(17): 1-10.
- 10- Sannat C, Nair A, Sahu S.B, Sahasrabudhe S.A, Kumar A, Gupta A.K, et al. Effect of species, breed, and age on bacterial load in bovine and bubaline semen. *Veterinary World*. 2015; 8(4): 461-466.
- 11- Guerin B, Nibart M, Marquant-Le Guienne B, Humblot P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*. 1997; 47: 33-42.
- 12- Bailey J.L, Ois Bilodeau J.F, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomena. *Journal of Andrology*. 2000; 21(1): 1-7.
- 13- Karrow A.M, Critser J.K. Reproductive tissue banking: scientific principles. San Diego, CA: *Academic Press*. 1997.
- 14- Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reproductive BioMedical Online*. 2004; 9(2): 134-151.
- 15- Bielanski A, Bergeronb H, Laub P.C.K, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2003; 46(2): 146-152.
- 16- D'Angelo M, Pavão D.L, Melo G.M, Rojas N, Souza R.J, Athayde C, et al. Acceptable microorganisms concentration in a semen sample for *in vitro* embryo production. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; 37(4): 571-572.
- 17- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*. 2009; 24(10): 2457-2467.
- 18- Eanglesome M.D, Garcia M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Revue Scientifique et Technique*. 1997; 16(1): 215-225.
- 19- Shokri H, Yadollahi M. Isolation and identification of fungal microbiota from genital tract of ewes. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2017; 168(4-6): 81-86. [In Persian]
- 20- Seyedmousavi S, Bosco S.M.G, Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes R.R. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medical Mycology*. 2018; 56(1): S165-S187.
- 21- Corona A, Cherchi R. Microbial quality of equine frozen semen. *Animal Reproduction Sciences*. 2009; 115(1-4): 103-109.
- 22- Zampieri D, Santos V.G, Braga P.A, Ferreira C.R, Ballottin D, Tasic L, et al. Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Theriogenology*. 2013; 80(4): 337-345.
- 23- Mitra J, Chowdhury S.D, Panda S.K, Chakraborty M, Singha A. Microbiological evaluation of bovine frozen semen samples in west Bengal, India. *Exploratory Animal and Medical Research*. 2016; 6(2): 185-191.
- 24- Malmgren L, Olsson Engvall E, Engvall A, Albihn A. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility in under field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1998; 39(2): 173-182.
- 25- Pugh D.G, Martin M.T, Shull J.W, Bowen J.M. Endometrial candidiasis in five mares. *Journal of Equine Veterinary Sciences*. 1986; 6(1): 40-43.
- 26- Samanta I. *Veterinary Mycology*. 1<sup>st</sup> edn. Springer, 2015.
- 27- Xiaoping M, Changcheng L, Jiafa H, Yu G. Isolation and identification of culturable fungi from the genitals and semen of healthy giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *BMC Veterinary Research*. 2017; 13(1): 344.
- 28- Tian Y.H, Xiong J.W, Hu L, Huang D.H, Xiong C.L. *Candida albicans* and filtrates interfere with human spermatozoal motility and alter the ultrastructure of spermatozoa: an *in vitro* study. *International Journal of Andrology*. 2007; 30(5): 421-429.
- 29- Burrello N, Calogero A.E, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans*: a case report. *Reproduction Biomedicine Online*. 2004; 8(5): 569-573.



## Evaluation of fungal contamination rate of simental male cows (*Fleckvieh*) genital system and its correlation with viability and sperm motility and testosterone concentration of blood serum and semen plasma

Amir Khaki<sup>1</sup>, Hojjatollah Shokri<sup>\*2</sup>

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Receive: January 4, 2023; Revise: January 17, 2023; Accept: January 22, 2023



10.22034/nfvm.2023.379656.1169



20.1001.1.26454491.1402.6.2.2.0

### Summary

The aim of this study was to evaluate the correlation between the fungal contamination rate of various parts of simental male cows genital system with viability and sperm motility and also testosterone concentration in blood serum and semen plasma. Sampling was performed from external skin of penis, internal skin of penis, penis before ejaculation, fluid pre ejaculation, ejaculation fluid (semen), penis after ejaculation, and ejaculation fluid after defreezing from male cows. For mycological examination, all samples were cultured onto sabouraud dextrose agar medium containing chloramphenicol (0.005%) and kept at 30°C for 7-10 days. Sperms motility using CASA software and the percentage of abnormal and viable sperms using Eosin nigrosin were performed. Also, testosterone levels of blood serum and semen plasma samples were assessed by quantitative chemiluminescence method. The most frequently isolated fungi were *Candida* spp. (35.6%), *Penicillium* spp. (18.6%) and *Aspergillus* (14.2%). The highest and lowest mean rates of fungi were associated with internal skin of penis ( $21.08 \pm 16.43$ ) and ejaculation fluid after defreezing ( $2.00 \pm 2.45$ ), respectively. Although there was no correlation between the total amount of the fungal contamination and sperm motility parameters before and after freezing, a positive significant relationship was observed between viable sperms percent after freezing and testosterone concentration of semen plasma ( $P < 0.05$ ). The findings showed that there is a significant correlation between fungal community rate and viable sperms and testosterone level of semen fluid.

**Keywords:** *Aspergillus*, *Candida krusei*, Male sexual organ, Microbial flora, Sex hormone



## شناسایی مولکولی باکتری بروسلا در نمونه‌های کلینیکی منطقه سیستان با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه

معصومه نورا<sup>۱</sup>، حسین کمال‌الدینی<sup>۲\*</sup>، فاطمه حدادی<sup>۲</sup>، محسن نجیمی<sup>۳</sup>

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

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

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

دریافت مقاله: ۲۹ آذر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۸ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۰۲ بهمن ۱۴۰۱



10.22034/nfvm.2023.377326.1166



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

بروسلوز یا تب مالت (تب مدیترانه‌ای) به واسطه رشد و تکثیر باکتری کوکوباسیل گرم منفی بروسلا در سلول‌های پستانداران رخ می‌دهد و این بیماری به‌عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام حائز اهمیت می‌باشد. تست‌های سرولوژی متعددی جهت شناسایی این باکتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند، با این حال این روش‌ها محدودیت‌هایی در شناسایی دقیق باکتری دارند. پژوهش حاضر، با هدف بررسی و شناسایی مولکولی باکتری بروسلا در نمونه‌های جمع‌آوری شده از گوسفندان آلوده در منطقه سیستان با استفاده از تکنیک PCR چندگانه انجام شد. در ابتدا نمونه‌های خون و شیر از گوسفندان جمع‌آوری گردید. تایید آلودگی به باکتری در ابتدا با استفاده از نمونه‌های خون و روش سرولوژی رزبنگال صورت گرفت. در ادامه DNA از شیرهای جمع‌آوری شده استخراج شد و بررسی مولکولی با استفاده از PCR چندگانه و تکثیر دو ژن *Omp31* و *BLS* به‌منظور تکثیر قطعات با سایزهای ۳۴۷ bp و ۲۵۶ bp انجام پذیرفت. از ۴۰ نمونه کلینیکی مورد مطالعه همگی تست رزبنگال مثبت را نشان دادند اما بررسی مولکولی با استفاده از PCR چندگانه ۵ نمونه مثبت کاذب تایید شده با تست رزبنگال را نشان داد. استفاده از روش‌های شناسایی مولکولی به جهت حساسیت و دقت بالاتر و صرف زمان کمتر می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسب برای شناسایی پاتوژن‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** باکتری بروسلا، تب مالت، ژن *BLS*، ژن *Omp31*، PCR چندگانه

بروسلاها باکتری‌های گرم منفی و جز انگل‌های درون سلولی و عامل بیماری تب مالت یا بروسلوز می‌باشند. به‌طور معمول، بروسلوز در حیوانات اهلی به‌عنوان یک بیماری عفونی مزمن در نظر گرفته می‌شود که معمولاً تا پایان عمر حیوان ادامه می‌یابد. شیوع جهانی بروسلوز در طی سال‌های اخیر افزایش یافته که علت آن ناتوانی در ریشه‌کن کردن کامل آن در میان گوسفندان ذکر شده است (۱). بیماری بروسلوز در کشورهای خاورمیانه، مدیترانه و حاشیه خلیج فارس از جمله ایران به وفور یافت می‌شود و علت انتشار این بیماری در ایران زندگی روستایی و عشایری است. در این مناطق، بین محل زندگی خانواده‌ها و محل نگهداری گوسفندان فاصله چندانی وجود ندارد و نوازش نوزاد تازه به دنیا آمده دام توسط کودکان و مصرف محصولات لبنی و تازه تهیه‌شده دامی و همچنین ذبح غیر استاندارد دام‌ها از اهمیت بالایی در بیماری‌زایی برخوردار است (۲). تست‌های آزمایشگاهی متعددی برای شناسایی این باکتری به‌کار رفته که از آن جمله می‌توان به آنتی‌بادی اختصاصی ضد بروسلا، روش‌های تشخیصی مولکولی مانند PCR و جداسازی و کشت بروسلائی گرفته‌شده از نمونه، اشاره نمود. به‌طور سنتی باکتری‌ها را می‌توان با روش‌های فنوتیپیک، شیمیایی و خصوصیات سرولوژیکی مانند مشاهده میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم) و بررسی فنوتیپی خصوصیات باکتری روی محیط کشت شناسایی کرد، اما این روش‌ها از دقت و قدرت تشخیصی کافی برای جداسازی میکروارگانیزم‌ها برخوردار نیستند و از طرفی برخی از این روش‌ها زمان‌بر می‌باشند. روش‌های تشخیصی مبتنی بر کشت نیازمند رشد باکتری در محیط کشت می‌باشد، اما از آنجائی که ممکن است بسیاری از باکتری‌ها در حین نمونه‌گیری و یا به دلیل مصرف آنتی‌بیوتیک از بین بروند، این روش‌های تشخیصی با محدودیت روبرو می‌باشند. کشت بروسلا با توجه به سخت رشد بودن باکتری همیشه موفقیت‌آمیز نمی‌باشد، لذا این

موضوع می‌تواند دلیلی برای جایگزین شدن سایر روش‌ها برای تشخیص سریع در آزمایشگاه‌ها باشد.

پیشرفت‌های اخیر در ارائه روش‌های مولکولی برای شناسایی عوامل بیماری‌زا در موجودات زنده از جمله باکتری‌ها امکان شناسایی سریع و دقیق با استفاده از ژنوم موجودات را فراهم نموده است و حتی امکان تمایز بین گونه‌ها و سویه‌ها نیز فراهم گردیده است. با توجه به اینکه باکتری‌ها دارای توالی‌های منحصر به فرد و خاص در ژنوم خود هستند، واکنش زنجیره پلی‌مرز در تکثیر توالی خاصی از اسید نوکلئیک باکتری استفاده می‌شود. توالی‌های ژنی *Omp31* و *BLS*، اختصاصی باکتری بروسلا می‌باشند. *Omp31* یک پروتئین و آنتی‌ژن غشای خارجی اصلی ایمنی‌زا است (۳). این فرضیه وجود دارد که *Omp31* از *Bruella melitensis* با مهار آپوپتوز از طریق سیگنال‌دهی  $TNF-\alpha$  به دنبال عفونت بروسلا، برای بقا و تکثیر در ماکروفاژها مفید است (۴). *Lumazine Synthase (BLS)* بروسلا یک پروتئین با خاصیت ایمنی‌زایی بسیار زیاد است که می‌تواند پروتئین‌های خارجی را در انتهای N-terminal خود بپذیرد. این پروتئین دارای ویژگی‌های آنتی‌ژنیک بوده و نقش مهمی در ایجاد بیماری بروسلوز دارد. *BLS* همچنین می‌تواند در زمان استفاده به‌صورت کانژوگه شده با آنتی‌ژن‌های دیگر دارای نقش ادجوانتی یا کمک‌کننده باشد (۵).

روش‌های مولکولی ساده، نسبتاً کم‌هزینه و دارای حساسیت کافی بوده و برای تشخیص و شناسایی باکتری‌هایی که به سختی رشد می‌کنند یا غیر قابل کشت هستند، مناسب می‌باشند (۶). همچنین نیاز به حجم و مقادیر بسیار کم نمونه منجر به استفاده گسترده از روش‌های شناسایی مولکولی مانند PCR-RFLP، Multiplex PCR و Real-PCR برای تشخیص مستقیم باکتری‌ها گردیده است. با توجه به مشکلات روش‌های سرولوژیکی و نتایج مثبت و منفی کاذب احتمالی در استفاده از این تکنیک‌ها، در مطالعه حاضر از PCR چندگانه برای شناسایی باکتری بروسلا در نمونه‌های

کلینیکی منطقه سیستان به منظور ارائه یک تکنیک دقیق و سریع استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه نمونه‌های مورد مطالعه: برای انجام مطالعه ۴۰

نمونه خون و شیر جمع‌آوری شده از گوسفندان روستاهای شهرستان زابل توسط اداره دامپزشکی استفاده شد. بهینه‌سازی تکنیک PCR چندگانه با هدف شناسایی مولکولی نمونه‌های کلینیکی، با DNA باکتری بروسلا تهیه شده از آرشیو دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل صورت گرفت.

### تست رزبنگال: تست رزبنگال بر روی نمونه‌های

خون جمع‌آوری شده از گوسفندان مشکوک به بیماری تب مالت جهت تأیید آلودگی به باکتری بروسلا انجام شد. در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم خون و ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن رزبنگال به خوبی یکنواخت و بر روی پلیت ریخته شد و بعد از گذشت مدت زمان ۴ دقیقه از شروع آزمایش آگلوتیناسیون نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

### واکنش PCR چندگانه: استخراج DNA از ۴۰ نمونه

شیر آلوده جمع‌آوری شده به روش جوشاندن انجام شد. ابتدا ۱/۵ سی‌سی شیر در میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری ریخته و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ

(Eppendorf, Germany) با دور ۳۵۰۰ rpm قرار گرفت و سپس مایع رویی دور ریخته شد. برای شستشوی رسوب باقیمانده، مقدار ۱ سی‌سی آب مقطر استریل اضافه و پس از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. مرحله شستشو سه بار تکرار شد. در ادامه مایع رویی را خارج و به رسوب باقی‌مانده ۰/۱ سی‌سی آب مقطر افزوده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۸-۱۰۰ درجه سلسیوس گذاشته شد. در نهایت میکروتیوب در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و مایع رویی که حاوی DNA می‌باشد به تیوب دیگر منتقل و در دمای فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری گردید. بررسی کمی و کیفی DNA ها با استفاده از الکتروفورز ( Labnet, Taiwan) ژل آگارز ۱ درصد و نانودراپ (Nabi, South Korea) انجام شد.

واکنش PCR چندگانه با استفاده از دو ژن اختصاصی باکتری بروسلا *BLS* و *Omp31* انجام شد. توالی‌های ژن‌های *BLS* با شماره دسترسی KJ401344.1 و *Omp31* با شماره دسترسی GQ184729.1 از پایگاه داده NCBI برای طراحی پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (جدول شماره ۱).

جدول ۱- جدول اطلاعات مربوطه به پرایمرها

Gene Name	Sequence (5'-3')	Tm (°c)	GC%	Mer	PCR Product (bp)
<i>BLS</i>	F: CAAAGCTGTCCGAACAAGAC	59.74	52.4	20	256
	R: ATGACGATAGATGCCGCGG	60.08	57.89	20	
<i>Omp31</i>	F: TTGACACCTTCTCGTGACC	59.61	55	21	347
	R: AACCATGAGGCGTTTCGGTAG	60.11	55	19	

DNA باکتری بروسلا و مستر میکس (Amplicon, Denmark) استفاده شد. جهت تأیید و بهینه‌سازی دمای

برای انجام واکنش PCR چندگانه از مخلوط پرایمرهای فوروارد و ریورس ژن‌های *BLS* و *Omp31*,

کلینیکی مورد مطالعه با تکنیک PCR چندگانه انجام شد. محصولات PCR چندگانه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و در بافر TBE 1X آنالیز و با استفاده از safe stain (Cambridge, France) رنگ‌آمیزی و در دستگاه ژل داگ (Cambridge, France) بررسی شدند.

اتصال پرایمرها در واکنش PCR چندگانه، گرادیانت PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) طبق برنامه جدول ۲ انجام شد. پس از بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها با استفاده از DNA باکتری بروسلا تهیه شده از آرشیو دانشکده دامپزشکی، بررسی مولکولی ۴۰ نمونه

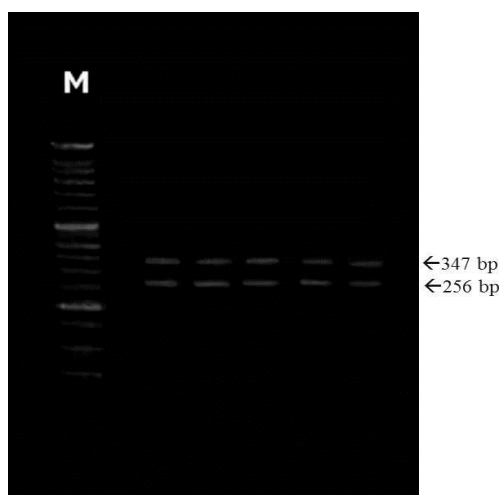
جدول ۲- برنامه Multiplex PCR

مرحله	دما (°C)	زمان	تکرار
Pre-denaturation	94	5 دقیقه	1
Denaturation	94	30 ثانیه	
Annealing	56.4 – 62.3	45 ثانیه	35 سیکل
Extension	72	35 ثانیه	
Final extension	72	5 دقیقه	1

بهرتر به‌عنوان دمای بهینه PCR چندگانه تعیین گردید. نتایج PCR چندگانه نشان‌دهنده مثبت بودن ۳۵ نمونه مورد مطالعه بود. قطعات با سایزهای ۲۵۶ و ۳۴۷ باز برای دو ژن *Omp31* و *BLS* در تمام نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۱). با استفاده از PCR چندگانه در ۵ نمونه مورد مطالعه قطعات ژنی مورد نظر تکثیر نشدند و این نتیجه تأییدکننده وجود نتایج مثبت کاذب با استفاده از تست سرولوژی رزبنگال بود. دقت روش رزبنگال در شناسایی باکتری بروسلا ۸۷/۵ درصد و در روش PCR چندگانه ۱۰۰ درصد به دست آمد.

## نتایج

نتایج بررسی تست رزبنگال مثبت بودن ۴۰ نمونه خونی جمع‌آوری شده از گوسفندان برای آلودگی به باکتری بروسلا را تأیید نمود. وقوع آگلوتیناسیون ضعیف تا قوی به‌عنوان وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی و در نتیجه مثبت بودن تست رزبنگال و عدم وقوع آگلوتیناسیون برای منفی بودن تست رزبنگال در نظر گرفته شد. در ادامه هر ۴۰ نمونه برای تأیید آلودگی به باکتری با روش مولکولی بررسی شدند. با توجه به نتایج گرادیانت PCR دمای ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد با داشتن باند با کیفیت و وضوح



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR چندگانه در دمای ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد، در تمام نمونه‌ها قطعات ژنی *Omp31* و *BLS* تکثیر شده است. M- مارکر ژنی ۵۰ bp

## بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز انسانی در بسیاری از کشورها از جمله ایران به‌عنوان یک مشکل اساسی بهداشت جامعه مطرح می‌باشد (۷) و مهم‌ترین راه‌های انتقال باکتری بروسلا می‌باشد (۷) و مهم‌ترین راه‌های انتقال باکتری بروسلا ایجادکننده این بیماری از طریق تماس با خون حیوان آلوده به بروسلا و نیز مصرف شیر خام آلوده و فرآورده‌های لبنی غیر پاستوریزه آن بوده و در مناطق روستایی که مصرف شیر تولید شده توسط خانوار صورت می‌گیرد بیشتر شایع می‌باشد. تشخیص بروسلوز در اغلب موارد به دلیل شباهت بالینی این بیماری با بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیر عفونی و همچنین استفاده از روش‌های تشخیصی که در اغلب موارد موفق به جداسازی میکروارگانیسم نمی‌گردند دشوار می‌باشد (۸). به دلیل زمان تقسیم طولانی این باکتری، گونه‌های بروسلا معمولاً به آهستگی در محیط‌های کشت اولیه و کشت متوالی (Subculture) رشد می‌نمایند. مشکل اصلی در خصوص کشت بروسلا وقت‌گیر بودن آن می‌باشد که با استفاده از روش‌های مرسوم گاه تا بیش از ۳۰ روز زمان نیاز دارد (۹). از تست‌های سرولوژیک مختلفی مثل رایت، کومبس رایت و الیزا می‌توان برای تشخیص بروسلوز استفاده کرد. حساسیت تست‌های سرولوژیک بین ۶۵ تا ۹۵ درصد متغیر می‌باشد اما حساسیت شناسایی این تست‌ها به ویژه در مناطق اندمیک، به دلیل شیوع بالای آنتی‌بادی در جمعیت سالم، کم می‌باشد (۱۰).

علاوه بر این، بیشتر تست‌های سرولوژیک دارای واکنش متقاطع با سایر باکتری‌ها می‌باشند. در طی دهه گذشته، پیشرفت‌های شگرفی در تمامی جنبه‌های تشخیص مولکولی بروسلوز انسانی صورت گرفته است. آزمایشات مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سریع‌تر و بسیار حساس‌تر از روش‌های معمول شناسایی باکتری‌ها می‌باشند. علیرغم اهمیت روش‌های شناسایی مبتنی بر PCR، در حال حاضر استاندارد برای آماده‌سازی نمونه یا انتخاب ژن‌های هدف و یا روش‌های ردیابی محصولات PCR برای باکتری بروسلا وجود ندارد. اعضای جنس

بروسلا پاتوژن‌های داخل سلولی اختیاری هستند و به‌طور طبیعی مقدار باکتری که در بیماران یافت می‌شود، بسیار کم است (۱۱) و این موضوع بر اهمیت استفاده از تکنیک‌های مولکولی که قادر به شناسایی مقادیر جزئی از DNA می‌باشند می‌افزاید. در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده از PCR به دلیل هزینه و گاهی اوقات در دسترس بودن حجم نمونه آزمایشی کافی محدود می‌شود. برای غلبه بر این کاستی‌ها و همچنین افزایش ظرفیت تشخیصی PCR، گونه‌ای به نام PCR چندگانه طراحی شده است. در PCR چندگانه بیش از یک توالی هدف را می‌توان با گنجاندن بیش از یک جفت پرایمر در واکنش تقویت کرد. این تکنیک دارای پتانسیل صرفه‌جویی قابل توجهی در زمان نسبت به PCR است. همچنین احتمال مشاهده نتایج کاذب در PCR چندگانه نسبت به PCR بسیار کمتر می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش شناسایی باکتری بروسلا با روش PCR چندگانه در نمونه‌های کلینیکی منطقه سیستان انجام شد. برای انجام PCR، استخراج DNA از نمونه شیر آلوده برای بررسی باکتری مورد استفاده قرار گرفت. هر چند که استفاده از نمونه خون محیطی این مزیت را دارد که امکان دسترسی به حداکثر باکتری‌های موجود در جریان خون را فراهم می‌آورد، اما به دلیل حضور مهارکننده‌های بالقوه PCR در خون از قبیل هموگلوبین انجام PCR بر روی نمونه‌های خون از نظر تکنیکی تا حدودی دشوار می‌باشد (۱۲).

در مطالعه حاضر ژن‌های اختصاصی *Omp31* و *BLS* برای شناسایی مولکولی باکتری بروسلا مورد استفاده قرار گرفتند. ژن *BLS* همولوژی بالایی در گونه‌های مختلف بروسلا دارد و *Omp31* در همه گونه‌های بروسلا، به استثنای *Brucella abortus* وجود دارد. مطالعه و بررسی ۴۰ نمونه کلینیکی تأیید شده با تست رزبنگال با استفاده از تکنیک PCR چندگانه مثبت بودن ۳۵ نمونه را تأیید نمود، بنابراین استفاده از این دو توالی ژنی امکان شناسایی باکتری بروسلا با دقت ۱۰۰ درصد را با تکنیک PCR چندگانه در نمونه‌های کلینیکی فراهم نمود. همچنین

پلات، تست آگلوتیناسیون لوله و تست ۲ مرکاپتواتانول آزمایش شدند. اسید نوکلئیک نمونه‌ها استخراج و PCR با توالی ژن *pb26* که در اکثر گونه‌های بروسلا شایع است مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که آزمایش‌های سرولوژیکی دارای آلودگی مزمن حیوانات بودند (۱۵).

در مطالعات شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا استفاده از نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از دام نسبت به خون کم خطرتر می‌باشد. از آنجایی که شیر از غدد اپی‌تلیال ترشح می‌شود بنابراین باکتری‌های آلوده کننده ابتدا بایستی در این سلول‌ها وارد شوند و در ادامه در شیر ترشح شوند و همین موضوع می‌تواند منجر به کاهش تعداد باکتری در شیر باشد. از طرف دیگر شیر واجد باکتری‌های مفیدی مانند لاکتوکوکوس بوده که با باکتری‌های بیماری‌زا مقابله می‌کنند و منجر به کاهش آلودگی تا ۱۰۰ برابر می‌شوند و از این‌رو میزان خطرات تهدیدکننده نمونه شیر نسبت به خون برای کاربر بسیار کمتر می‌باشد. تکنیک PCR قادر به شناسایی نمونه حتی با تعداد بسیار کم می‌باشد و از این‌رو استفاده از این روش حساس می‌تواند به عدم نیاز به استفاده از خون دام منجر گردد.

ضرورت استفاده از روش‌های مولکولی به‌عنوان یک روش تأییدی جهت تشخیص بروسلا در کنار روش‌های متداول غربالگری امری ضروری می‌باشد. تکنیک PCR چندگانه با داشتن مزایایی از جمله دقت بالا، کاهش مصرف مواد آزمایشگاهی، صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌ها و نتایج قابل اعتماد به‌طور گسترده برای شناسایی مولکولی مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه کنونی دو ژن *Omp31* و *BLS* جهت شناسایی و تشخیص باکتری بروسلا با به‌کارگیری روش PCR چندگانه استفاده شد و نتایج نشان داد که این روش جهت شناسایی باکتری بروسلا دقت و کارایی بالایی دارد.

میزان دقت تکنیک سرولوژی رزبنگال ۸۷/۵ درصد به‌دست آمد که در مقایسه با روش PCR چندگانه امکان شناسایی بدون خطا را فراهم نمی‌آورد و مشاهده ۵ نتیجه مثبت کاذب با روش سرولوژیکی حاکی از حساسیت و دقت پایین این تست‌ها و اهمیت استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی باکتری‌ها می‌باشد. مطالعات متعددی برای شناسایی باکتری بروسلا در نمونه‌های مختلف انجام شده اما تا کنون مطالعه‌ای برای شناسایی با ژن‌های *Omp31* و *BLS* صورت نگرفته است. Satei و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی مولکولی گونه‌های باکتری بروسلا در شیر خام جمع‌آوری شده از مراکز خرید در شهر زنجان را با استفاده از ژن‌های *IS711* و *BCSP31* و روش PCR انجام دادند و نتایج نشان داد که از ۷۳ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده، ۳۸ مورد (۵۲ درصد) از نظر جنس بروسلا مثبت، ۳ مورد (۷/۸ درصد) متعلق به *Bruella abortus* و ۲ مورد (۵/۲ درصد) متعلق به *Brucella melitensis* بودند. هیچ مورد مثبتی برای بروسلا اویس و بروسلا سوئیس وجود نداشت. نتایج مطالعه‌ی آنها نشان داد که شیوع بروسلا در شیر خام همچنان تهدیدی برای سلامت عمومی است که باید نگاه عمیق‌تری به راهکارها و روش‌های کنترلی پیشگیری از تب مالت در دام داشت (۱۳).

Tantillo و همکاران به بررسی و شناسایی باکتری بروسلا در شیر و پنیر با روش PCR و ژن‌های *BCSP31* و *Omp25* پرداختند. نتایج نشان داد که این روش مولکولی می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک سریع و قابل اعتماد برای شناسایی باکتری بروسلا مورد استفاده قرار گیرد (۱۴). در مطالعه دیگری بررسی سرولوژیکی و مولکولی بروسلوز شتر در نجف‌آباد صورت گرفت. در این مطالعه، ۱۵۰ نمونه خون شتر از کشتارگاه نجف‌آباد جمع‌آوری شد. نمونه‌ها ابتدا با روش‌های سرولوژیکی تست رزبنگال

## References

- 1- Maleknejad P, Peeri-DoGaheh H, Amir-Zargar A, Jafari S, Fatollahzadeh B. Diagnosis of brucellosis by use of BACTEC blood culture and confirmation by PCR. *J Vet Res*. 2007; 62(4): 83-6. [In Persian]
- 2- Adams L.G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Veterinary microbiology*. 2002; 90(1-4): 553-561.
- 3- Ghasemi A, et al. Immune reactivity of *Brucella* melitensis-vaccinated rabbit serum with recombinant *Omp31* and DnaK proteins. *Iranian Journal of Microbiology*. 2013; 5: 19-23. [In Persian]
- 4- Zhang K, Wang H, Guo F, Yuan L, Zhang W, Wang Y, et al. *OMP31* of *Brucella* melitensis 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF- $\alpha$ . *Experimental and therapeutic medicine*. 2016; 12(4): 2783-2789.
- 5- Sha T, Li Z, Zhang C, Zhao X, Chen Z, Zhang F, et al. Bioinformatics analysis of candidate proteins *Omp2b*, *P39* and *BLS* for *Brucella* multivalent epitope vaccines. *Microbial Pathogenesis*. 2020; 147: 104318.
- 6- Talebzadeh S, Zaker Bostanabad S, Nazari R. Study and Comparison of Diagnostic Methods (Culture-Molecular) for *Brucella* in the Samples Isolated from Patients Suspected to Brucellosis in Different Regions of Tehran. *NCMBJ*. 2016; 6 (23): 105-110. [In Persian]
- 7- Zhang H, Fan Q, et al. *CD14* gene silencing alters the microRNA expression profile of RAW264.7 cells stimulated by *Brucella* melitensis infection. *Innate Immun*. 2017; 23(5): 424-431.
- 8- Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Veterinary microbiology*. 2002; 90(1-4): 81-110.
- 9- Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 1999; 37(11): 3437-42.
- 10- Elfaki M.G, Uz-Zaman, T, Al-Hokail, A.A, Nakeeb, S.M. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005; 53(1): 1-7
- 11- Gamazo C, Vitas A, Lopez-Goni I, Diaz R, Moriyon I. Factors affecting detection of *Brucella* melitensis by BACTEC NR730, a nonradio-metric system for hemocultures. *Journal of clinical microbiology*. 1993; 31(12): 3200-3.
- 12- Queipo-Ortuno M, Garcia-Ordonez M, Colmenero J, Morata P. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *Biotechniques*. 1999; 27(2): 248-52.
- 13- Satei E, Mirshahabi H, Zeighami H, Gholoobi A, Sadeghi H. Molecular survey of *BCSP31* and *IS711* using PCR assays in detection of *Brucella* spp. in raw milk. *Meta Gene*. 2020; 24: 1006-1018. [In Persian]
- 14- Tantillo G, Di Pinto A, Vergara A, Buonavoglia C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *Journal of food protection*. 2001; 64(2): 164-167.
- 15- Mahzounieh M, Salimi M. "Short article" Serological and molecular survey on camel brucellosis in Najaf Abad. *Biological Journal of Microorganism*. 2015; 4(14): 167-174. [In Persian]



## Molecular identification of *Brucella* bacteria in clinical samples of Sistan region by multiplex polymerase chain reaction

Masoumeh Noura<sup>1</sup>, Hossein Kamaladdini<sup>\*2</sup>, Fatemeh Haddadi<sup>2</sup>, Mohsen Najimi<sup>3</sup>

1- MS.c graduate of genetic, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Associated professor, Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: December 20, 2022; Revise: January 18, 2023; Accept: January 22, 2023



10.22034/nfvm.2023.377326.1166



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

Brucellosis or malt fever (Mediterranean fever) occurs due to the growth and multiplication of the gram-negative coccobacillus *Brucella* in mammalian cells, and this disease is important as a common disease between humans and animals. Several serological tests have been investigated to identify this bacterium, however, these methods have limitations in the accurate identification of the bacterium. The present study was conducted with the aim of investigating and molecular identification of *Brucella* bacteria in samples collected from infected sheep in Sistan region using multiplex PCR technique. At first, blood and milk samples were collected from infected sheep. Confirmation of bacterial infection was initially done using blood samples and Rose Bengal serology method. Next, DNA was extracted from the collected milk and molecular analysis was performed using multiplex PCR and amplification of *Omp31* and *BLS* genes, in order to amplify fragments with sizes of 347 bp and 256 bp respectively. Out of the 40 clinical samples, all of them showed a positive Rose Bengal test, but molecular analysis using multiplex PCR showed 5 false positive samples confirmed with the Rose Bengal test. Due to the higher sensitivity and accuracy and short time of identification the molecular methods can be used as a suitable option for identifying pathogens.

**Keywords:** *Brucella*, Malta fever, *BLS* and *Omp31* genes, multiplex PCR



## شیوع و شدت انگل‌های خونی در آگامای قفقازی *Paralaudakia caucasia* در شمال شرق ایران

زهرا رحیمی<sup>۱</sup> و حسین جوان بخت<sup>۲\*</sup>

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

دریافت مقاله: ۱۸ خرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۳ شهریور ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۲ شهریور ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2023.401322.1189



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

خزندگان میزبان طیف وسیعی از انگل‌های درون و برون سلولی هستند که از تک سلولی‌های انگلی تا نماتدهای میکروفیلاریایی را در بر می‌گیرد. هموگری‌گاری‌ها در تعداد زیادی از مهره‌دارن یافت می‌شوند که پرشیوع‌ترین انگل‌های آبی کمپلکسایی در خزندگان محسوب می‌شوند. در این مطالعه، شیوع و شدت انگل‌های خونی در مارمولک آگامای قفقازی *Paralaudakia caucasia* مورد بررسی قرار گرفت. اسمیرهای خونی تهیه شده توسط گیمسا رنگ‌آمیزی شد و حضور انگل‌های خونی مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از میکروسکوپ نوری دو دسته از انگل‌ها مورد شناسایی قرار گرفت: *Hepatozoon sp* و *Lankesterella sp* به‌عنوان انگل‌های خونی آبی کمپلکس و میکروفیلاریاها به‌عنوان نماتد یافت شدند. شیوع مارمولک‌های آلوده به ترتیب ۵۰، ۱۷ و ۱۰ درصد برای انگل‌های *Hepatozoon sp* و *Lankesterella sp* بود. همچنین ۱۰ درصد از مارمولک‌ها توسط کرم‌های نماتد آلوده شده بودند. این گزارش اولین بررسی از انگل‌های خونی در مارمولک‌های این ناحیه می‌باشد. تنوع بالایی از انگل‌های خونی در مارمولک نشان داده شد که اهمیت بررسی این انگل‌ها را بر روی میزبان‌ها نشان می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** هموگری‌گاری، *Hepatozoon*، *Lankesterella*، مارمولک، میکروفیلاریا

خزندگان در معرض آلودگی به طیف وسیعی از انگل‌های خونی داخل و خارج سلولی شامل ویروس‌ها، ریکتزیاها، گونه‌هایی از چندین جنس پروتوزوا مانند تریپانوزوم و آپی کمپلکسا و میکروفیلاریاها، قرار دارند (۱). انگل‌های خونی بر میزبان خزنده به شیوه‌های مختلف تأثیر می‌گذارند از جمله تشکیل کیست بخش‌های مختلف بدن مثل کبد، طحال، کلیه و مغز، تغییر در هموگلوبین، تضعیف سیستم ایمنی و کم‌خونی است (۲). در جانوران جوان‌تر حضور انگل خونی می‌تواند با ایجاد شرایط استرس‌زا منجر به مرگ جانور شود (۲). هر چند سیکل زندگی تعداد زیادی از انگل‌های خونی هنوز مشخص نشده است، با این وجود آنها معمولاً به چند میزبان (معمولاً هر دو میزبان مهره‌دار و بی‌مهره) برای کامل کردن سیکل زندگی خود نیاز دارند. طیفی از میزبان‌هایی که این ارگانیسم‌ها استفاده می‌کنند به میزان زیادی متغیر است. کنه، هیره، زالو و پشه‌ها به‌عنوان انتقال دهنده این انگل‌ها به میزبان‌های متنوع مهره‌دارشان می‌باشند (۱).

آپی کمپلکسا انگل‌های خونی معمول در خزندگان هستند که تنوع بالایی دارند، با این وجود تعداد کمی از گونه‌های بالقوه آنها توصیف شده‌اند. پژوهش‌های جدید تنوع بالایی از این انگل‌ها را در خزندگان نشان می‌دهد (۳). انگل‌های خونی که مارمولک‌ها را آلوده می‌کنند عموماً در دو دسته قرار می‌گیرند، معمول‌ترین آنها هموگری‌گاری‌ها هستند که تنوع، شیوع و شدت بالقوه آنها در حال شناخته شدن است (۴). این انگل‌ها به‌وسیله مایت‌های جنس *Ophionyssus* منتقل می‌شوند (۵). در بین این انگل‌ها *Hepatozoon* از خانواده *Hepatozoidae* معمول‌ترین انگل خونی خزندگان است که گلبول‌های قرمز را آلوده می‌کند (۶). گروه دوم انگل‌های خونی که عمومیت کمتری در مارمولک‌ها دارند و اختصاصی‌تر هستند متعلق به هموکوکسیدیای جنس‌های *Schellackia spp* و *Lankesterella spp* از راسته ایمیریا

هستند که توسط بندپایانی مانند کنه یا دوبالان منتقل می‌شوند (۷).

خزندگان به‌دلیل تنوع مورفولوژیکی و تنوع بالای انگل‌های خونی، نسبت به پرندگان و پستانداران کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است که می‌تواند مرتبط به اندازه بزرگ گلبول‌های قرمز خون و ساختار هسته در داخل آنها و همچنین تنوع بالاتر تعداد جنس و گونه انگل‌های خونی، در خزندگان باشد (۱). علاوه بر پیشرفت‌های زیادی که در جهان در بررسی انگل‌های خونی و میزبانان آنان در محیط‌های طبیعی صورت گرفته است مطالعات کمی روی انگل‌های خونی حیات وحش ایران به‌ویژه مارمولک‌ها صورت گرفته است. بنابراین در مطالعه حاضر تنوع، شیوع و شدت انگل‌های خونی در مارمولک‌ها *Paralaudakia caucasia* در شمال شرق کشور مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه در بهار و تابستان سال ۱۴۰۱ در استان خراسان شمالی، در مناطق شمال شهر بجنورد صورت گرفته است (33°N 57', 37°N 50'). مارمولک‌ها توسط دست و تور گرفته شدند. نمونه‌ها طبق کلید شناسایی مارمولک‌های ایران شناسایی شدند (۸). سپس خونگیری از سیاهرگ دمی توسط سرنگ انسولین صورت گرفت و بلافاصله اسمیرهای خونی تهیه شد. مارمولک‌ها بعد از خونگیری در محیط آزاد شدند. اسمیرهای خونی در هوای آزاد خشک شدند و سپس در متانول ۱۰۰ درصد فیکس شدند. بعد از خشک شدن به مدت ۱۵ دقیقه در محلول گیمسای ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شد و توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. شدت آلودگی برای هر نمونه در ۱۰۰۰۰ گلبول قرمز برآورد شد (۹). تصویربرداری توسط دوربین دیجیتال (UCMOS10000KPA; China) انجام گرفت. شناسایی مورفولوژی انگل‌ها طبق Telford (۱) انجام گرفت.

### نتایج

بررسی اسمیرهای خونی، حضور انگل‌های خونی آپی کمپلکسا و میکروفیلاریا را در خون مارمولک‌ها نشان داد.

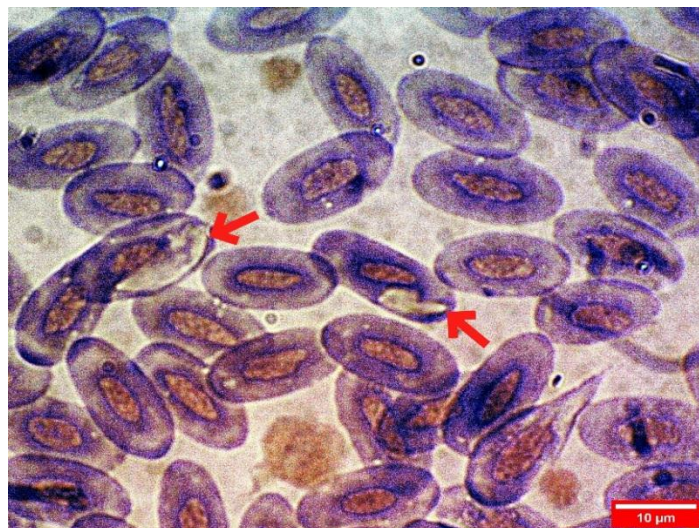
## شیوع و شدت انگل‌های خونی در آگامای قفقازی ...

۰/۲۴ درصد برای *Hepatozoon* sp و حداقل ۰/۰۶ و حداکثر ۰/۳ درصد برای نمونه‌های آلوده به *Lankesterella* sp در نوسان بود. انگل‌های خارج سلولی میکروفیلاریا نیز مارمولک‌ها را آلوده می‌کردند (شکل ۳). درصد شیوع این انگل در مارمولک‌ها برابر ۱۰ درصد بود (n=40).

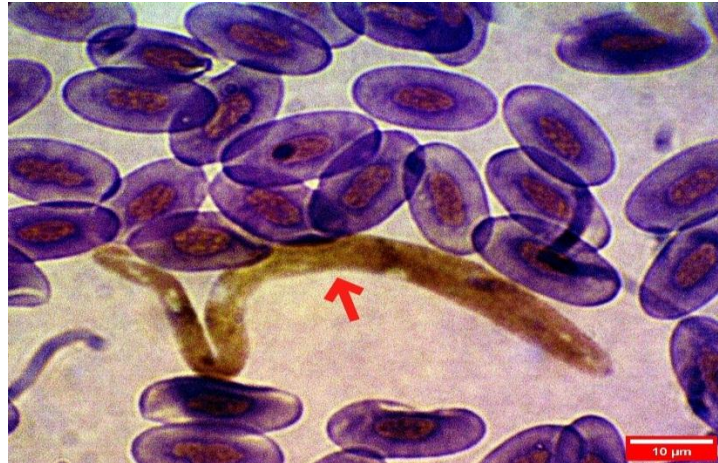
انگل‌های آپی کمپلکس با عنوان *Hepatozoon* sp و *Lankesterella* sp مورد شناسایی قرار گرفت که در داخل گلبول‌های قرمز مارمولک‌ها مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). شیوع آلودگی به انگل *Hepatozoon* sp و *Lankesterella* sp در مارمولک‌ها به ترتیب ۵۰، ۱۷ و ۱۰ درصد بود (n=40). شدت انگلی شدن بین حداقل ۰/۰۶ و حداکثر



شکل ۱- گلبول‌های قرمز مارمولک آگامای قفقازی آلوده به تروفوزوئیت انگل *Hepatozoon* sp



شکل ۲- گلبول‌های قرمز مارمولک آگامای قفقازی آلوده به اسپوروزوئیت انگل *Lankesterella* sp



شکل ۳- انگل خونی میکروفیلاریا در خون مارمولک آگامای قفقازی

### بحث و نتیجه‌گیری

مارمولک‌ها به تناوب توسط مایت‌ها آلوده می‌شوند و این مایت‌ها می‌توانند آلودگی به انگل‌های هموگری‌گاری یا هموکسیدیایی را به مارمولک‌ها انتقال دهند که در زمان آفتاب‌گیری یا در پناهگاه به سایر مارمولک‌ها منتقل می‌شوند. از طرف دیگر تنوع محیطی بر نوع و ترکیب انگل‌های خونی بر روی میزبانان اثرگذار است، زیرا گونه‌های مختلف ناقل شامل پشه‌ها، کنه‌ها و مایت‌ها در شب‌های مختلف محیطی وجود دارند (۱۰).

مطالعات جهانی در مورد شیوع و شدت انگل‌های خونی در مارمولک بسته به گونه و منطقه متفاوت است. در مطالعه‌ای که بر روی گونه مارمولک *Teira dugesii* در پرتغال صورت گرفت نشان داد که شیوع انگل‌های *Hepatozoon sp* در دو جزیره مختلف به میزان ۳/۳ درصد و ۲۶/۷ درصد متغییر بود (۱۱). حضور انگل‌های گونه‌های مختلف *Hepatozoon* در خانواده‌های مختلف مارمولک متفاوت بوده و بالاترین شیوع در خانواده Lacertidae دیده می‌شود (۱۱). با این وجود در مطالعه ما درصد شیوع انگل *Hepatozoon* ۱۷/۵ درصد بود که در مقایسه با شیوع در مارمولک‌های *Podocaris hispanica* در شبه جزیره ایبریا که بین ۹۰ تا ۱۰۰ درصد آلوده گزارش شده‌اند و همچنین شیوع ۷۰ درصد در گونه *Podarcis lilfordi* در جزایر بالئاریک به مراتب کمتر می‌باشد (۱۲). مطالعه انگل‌های خانواده لانکستره لیدا

جنس *Schellackia* در اسپانیا نشان داد که ۴۵/۹ درصد مارمولک‌های *Lacerta schreiberi* و ۱۴/۲۸ درصد مارمولک‌های *Podarcis hispanica* آلوده به انگل بودند (۴). همچنین مطالعه بر روی انگل‌های خونی سه گونه مارمولک (*Ophisops elegans*، *Eremias monticola* و *Trapelus lessonae*) در استان مرکزی نشان داد که ۵۰-۳۷ درصد مارمولک‌ها آلوده به انگل‌های خانواده لانکستره لیدا بودند (۹). در مطالعه حاضر ۱۰ درصد از نمونه‌های مارمولک *Paralaudakia caucasia* آلوده به انگل میکروفیلاریا بودند که مرحله لاروی کرم‌های نماتد از خانواده Filarioidea هستند. این انگل‌ها که توسط میزبان واسط انتقال می‌یابند در خون محیطی میزبان‌های مهره‌دار وجود دارند. بسیاری از گونه‌های این انگل‌ها در مارمولک‌ها از خانواده Onchocercidae می‌باشند (۱۳). در حالی که اطلاعات کمی در مورد مورفولوژی مرحله لاروی این نماتدها وجود دارد و شناسایی این گروه از انگل‌ها به طور دقیق ممکن نشد.

مطالعه حاضر از محدود مطالعاتی است که برای شناسایی انگل‌های خونی خزندگان وحشی در ایران انجام شد، در حالی که در دنیا چالش‌های زیادی در درک برهمکنش بین انگل‌ها و میزبانان وجود دارد. یافته‌های ما می‌تواند در آینده در مطالعات خصوصیات تاکسونومیک، اکولوژی و تکاملی سودمند باشد.

## References

- 1- Telford S R. Hemoparasites of Reptilia, Color Atlas and Text. CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, Florida, USA. 2009.
- 2- Zamudio N, Mramírez. Presencia de Hepatozoon spp. en serpientes del Centro de Atención y Valoración de Fauna silvestre (CAV) del Área Metropolitana del Valle de Aburrá, Barbosa – Antioquia, CES Medicine. 2007; 2: 34.
- 3- Tomé B, Rato C, Perera A, Harris D J. High diversity of *Hepatozoon* spp. In geckos of the genus *Tarentola*. *Journal of Parasitology*. 2019; 102: 476–480.
- 4- Megía-Palma R, Martínez J, Merino S. Phylogenetic analysis based on 18s rRNA gene sequences of *Schellackia* parasites (Apicomplexa: Lankesterellidae) reveals their close relationship to the genus *Eimeria*. *Zootaxa*. 2014; 140(9): 1149–57.
- 5- Haklová-Kočíková B, Hižňanová A, Majláth I, Račka K, Harris D J, Földvári G, et al. Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* – a neglected but common parasite infecting some European lizards. *Parasites & Vectors*. 2014; 7: 1–12.
- 6- Medrano-Tupiza E, Morales-Arciniega S, Santander-Parra S, Núñez-Naranjo L, Puga-Torres B. Absence of Hemoparasites in Wildlife Snakes, Located in the Ecological Reserves Cota 70, Cotacachi-Cayapas and Sumaco-Napo-Galeras in Ecuador. *Research in Zoology*. 2017; 7(1): 7–10.
- 7- Megía-Palma R, Martínez J, Paranjpe D, D'Amico V, Aguilar R, Palacios M G, et al. Phylogenetic analyses reveal that *Schellackia* parasites (Apicomplexa) detected in American lizards are closely related to the genus *Lankesterella*: is the range of *Schellackia* restricted to the Old World? *Parasites & Vectors*. 2017; 10: 470.
- 8- Mozafari A, Kamali K, Fahimi H. Iranian reptiles. *Department of Environment*. 2017. Pp: 362. [In Persian]
- 9- Hajjyan R, Javanbakht H. Prevalence and intensity of coccidian blood parasites in three species of lizards from Markazi Province, Iran. *Nova Biologica Reperta*. 2021; 8: 39–45. [In Persian]
- 10- Picelli A M, Ramires A C, Masseli G S, Pessoa F A C, Viana A L, Kaefer I L. Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from Central Amazonia revealed by microscop. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2020; 92(2).
- 11- Rund D, Neves V, Quillfeld P. Molecular survey of *Hepatozoon* infection of *Teira dugesii* in the Azores. *Animal Biodiversity and Conservation*. 2019; 42:1.
- 12- Harris D J, Maia J P, Perera A. Molecular survey of Apicomplexa in Podarcis wall lizards detects *Hepatozoon*, *Sarcocystis*, and *Eimeria* species. *Journal of Parasitology*. 2012; 98(3): 592–597.
- 13- Macedo Silva T, Sakai Okamoto A, Firmino da Silva L A, Domeneghetti Smaniotto B, José da Silva R, Lucio Andreatti Filho R. New record of *Pelecitus* sp (Nematoda, Onchocercidae) as a parasite of *Athene cunicularia* (Strigiformes, Strigidae) in southeastern Brazil. *Brazilian journal of veterinary parasitology*. 2014; 23(2): 274–275.



## Prevalence and intensity of haemoparasites in Caucasian agamids *Paralaudakia caucasia* from north east of Iran

Zahra Rahimi<sup>1</sup>, Hossein Javanbakht<sup>2\*</sup>

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

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

Receive: June 8, 2023; Revise: September 4, 2023; Accept: September 13, 2023



10.22034/nfvm.2023.401322.1189



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

Reptiles are hosts for a wide variety of intra- or extracellular blood parasites that range from protozoan parasites to microflarid nematodes. Hemogregarines are found in many vertebrates, being the most prevalent apicomplexan parasites in reptiles. In this study, the prevalence and intensity of hemoparasites in Caucasian Agamid lizards, *Paralaudakia caucasia* was investigated. Blood smears were prepared, stained by gimsa, and were examined for the presence of haemoparasites. The light microscopic diagnosis detected parasites in two groups: *Hepatozoon* sp and *Lankestrella* sp were found as apicomplexan blood parasites and microflarial worms as nematods. The prevalence of infected lizards was 17.50 and 10 percent for *Hepatozoon* sp and *Lankestrella* sp, respectively. As well as 10 percent of lizards were infected by nematod worms. This report is the first survey of haemoparasites in these lizards. It revealed a high diversity of haemoparasites in lizards of the study region and highlighted the need to understand their impacts on hosts.

**Keywords:** *Haemogregarine, Hepatozoon, Lankesterella, Lizard, Microfilaria*



## واکسن یا آنتی بیوتیک: کدام یک در پرورش ماهی باید استفاده شود؟

احمد عرفان منش<sup>۱</sup>، بابک بیک زاده<sup>۲\*</sup>، مجید خانزاده<sup>۱</sup>

۱- گروه پژوهشی فرآورده‌های بیولوژیک دامی، سازمان جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ مرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۰۲ مهر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۳ مهر ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2023.412650.1199



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

همزمان با توسعه آبی‌پروری در دنیا، بیماری‌ها در این صنعت افزایش یافته است. استفاده از واکسن‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها روش پذیرفته شده‌ای در سراسر جهان برای مقابله با بیماری‌ها است. اما مسیر مبارزه با بیماری‌ها در ایران به سمت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها رفته است. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها فشار تکاملی بر باکتری‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا وارد می‌کند که نتیجه آن ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و بازگشت بیماری با شدت بیشتر است. از طرفی دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها بر عملکرد سیستم ایمنی و واکسن‌ها هم تأثیر می‌گذارند. مجموع این رخدادها، جنبه اقتصادی پرورش ماهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها از جنبه تأثیر در محیط زیست و بهداشت عمومی، سیستم ایمنی، واکسن و اقتصاد آبی‌پروری مورد اهمیت است. در این مقاله مروری سعی گردیده با مطالعه و بررسی تحقیقات پیشین در خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها، تحلیل اقتصادی مصرف واکسن و همچنین اثرات بهداشتی آن، با پاسخ به سوال "واکسن یا آنتی‌بیوتیک: کدام یک در پرورش ماهی باید استفاده شود؟" اهمیت استفاده از واکسن‌ها به جای آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شود.

**واژگان کلیدی:** واکسن، آنتی‌بیوتیک، آبی‌پروری، سیستم ایمنی، بهداشت عمومی

همزمان با توسعه آبی‌پروری بیماری‌های عفونی گسترش یافته است. از بین بیماری‌های مختلف که در مزرعه آبی‌پروری خسارات فراوانی را موجب می‌شوند می‌توان به بیماری‌های باکتریایی نظیر استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس اشاره کرد (۱). این دو بیماری برخلاف بیماری‌های ویروسی و انگلی که در وزن بالای ۵۰۰ گرم نمی‌توانند مشکل جدی برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایجاد کنند، در همه سنین مشکل‌ساز هستند. به‌عنوان مثال بیماری استرپتوکوکوزیس با سن و وزن رابطه مستقیمی دارد و افزایش وزن با شدت بیشتری در گله بروز می‌کند (۲، ۳). متأسفانه این بیماری‌ها اغلب در کشور ما با مصرف آنتی‌بیوتیک کنترل می‌شوند. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها از چهار جنبه دارای اهمیت است: ۱- مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر آن در محیط زیست و بهداشت عمومی ۲- مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر آن بر سیستم ایمنی ۳- اثر متقابل مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن بر همدیگر ۴- مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر آن بر اقتصاد آبی‌پروری. این مقاله در خصوص اهمیت این چهار موضوع با رویکرد مقایسه‌ای بهداشتی و اقتصادی استفاده از آنتی‌بیوتیک و واکسن بحث می‌کند.

### مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر آنها بر محیط زیست

**و بهداشت عمومی:** پس از کشف پنی‌سیلین توسط فلمینگ در سال ۱۹۲۸، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها همانند یک داروی جادویی برای مقابله با باکتری‌ها گسترش یافت (۴). طبق مطالعات صورت گرفته در ۳۰ تا ۵۰ درصد موارد بیماری‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک انتخاب درمانی اولویت ندارد و بعضاً انتخابی اشتباه است که می‌تواند فرد یا حیوان بیمار را با مخاطرات سلامتی بیشتری مواجه کند (۵). از طرفی دیگر استفاده از دوزهای اشتباه و استفاده مکرر آنها نه تنها برای بیمار اثرات منفی به همراه دارد، بلکه بهداشت عمومی جمعیت‌های انسانی و حیوانی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۶). آنتی‌بیوتیک‌ها

در جوامع انسانی توسعه نیافته و یا در حال توسعه بیشتر به صورت خوددرمانی برای کودکان و بالغین استفاده می‌شود (۷). در حالی که برای حیوانات در همین کشورها به‌ویژه دام‌ها و آبزیان، انتخاب اول درمانی است. روند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در این کشورها به گونه‌ای است که از آنها به‌عنوان محرک رشد و پیشگیری کننده از عفونت‌ها استفاده می‌شود (۸، ۹). این الگوی رو به رشد مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، در نهایت ظهور باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم و حذف باکتری‌های مفید از محیط زیست و بدن حیوانات (میکروبیوتای روده) را منجر می‌شود و به دنبال آن باعث از بین رفتن تعادل میکروبیوم محیطی و جانداران شده که می‌تواند مخاطرات جدی برای سلامت انسان به همراه آورد. این مخاطرات به سه شکل کلی تقسیم‌بندی می‌شود: ۱- ایجاد بیماری توسط باکتری‌های مقاوم منشاء گرفته از حیوانات که به واسطه تماس با آنها و یا خوردن گوشت آنها به انسان منتقل می‌شود ولی بین انسان‌ها انتقال نمی‌یابد. ۲- ایجاد بیماری در انسان به واسطه باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم که از انسانی دیگر منتقل شده‌اند و یا باکتری‌های فلور نرمال که توانایی ایجاد بیماری به صورت فرصت‌طلب را دارند. ۳- انتقال ژن‌های مقاومت از باکتری‌های محیطی به باکتری‌های بیماری‌زا در فرایند انتقال افقی که نتیجه نهایی آن مقاوم شدن باکتری‌های بیماری‌زا است (۱۰، ۱۱).

انسان‌ها و حیوانات می‌توانند به سادگی از راه گوارشی، باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم و کومنسال را به‌دست آورند. مصرف نابجا و بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها در حیواناتی که منبع غذایی انسان می‌باشند، می‌تواند یک تهدید برای سلامت انسان‌ها باشد. از طرفی دیگر در جوامعی که آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک روش درمانی ارزان جایگزین تحقیق و توسعه واکسن‌ها شده است، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های انسانی غیر تجزیه‌پذیر برای حیوانات به‌ویژه آبزیان مرسوم می‌باشد. این رویکرد باعث یک فشار طولانی‌مدت بر باکتری‌های بیماری‌زا و

## واکسن یا آنتی‌بیوتیک: کدام‌یک در پرورش ماهی باید استفاده شود؟

باکتری *یرسینیا راکری* به‌عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای ماهیان پرورشی به‌ویژه ماهی قزل‌آلا باعث خسارت‌های اقتصادی زیادی در مزارع پرورش ماهی می‌شود (۱۷، ۱۸). از این رو مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با بیماری‌زایی این باکتری از انتخاب‌های اول درمانی است. گزارشات از شناسایی سویه‌های مختلف مقاوم به آنتی‌بیوتیک این باکتری در سراسر جهان خبر می‌دهد. اکسی‌تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، ائروفلوکسازین، نالیدیکسیک اسید و فلوروکوئینولون از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که سویه‌های مقاوم به آن در جهان ردیابی شده است (۱۲، ۱۹).

*استرپتوکوکوزیس* نیز مثالی دیگر از بیماری‌های مهم مزارع پرورش ماهی است که توسط باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس پارابریس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* ایجاد می‌شود. این بیماری غالباً با تجویز اریترومايسين و تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و تریمتوپریم کنترل و درمان می‌شود اما یافته‌ها نشان‌دهنده وجود ژن‌های مقاومت *tet (M) tet (S) tet (O)* برای تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین، *ermB* مقاومت به اریترومايسين، *dhfr I* و *dhfr II* مقاومت به تریمتوپریم در برخی از سویه‌های این باکتری‌ها است (۱۲، ۲۰، ۲۱). بنابراین ادامه روند مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها نه تنها باعث افزایش مقاومت ضد آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زای ماهی می‌شود بلکه باعث افزایش خطر انتقال این مقاومت به باکتری‌های دیگر در انسان و حیوانات می‌گردد.

### مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر آنها بر سیستم

**ایمنی:** سیستم ایمنی مجموعه‌ای از سلول‌ها و ترکیبات هومورال است که مؤلفه‌هایی برای دفاع از بدن در برابر عوامل خارجی مانند میکروارگانیزم‌ها، سموم یا سلول‌های بدخیم است. سیستم ایمنی ماهیان نیز همانند دیگر حیوانات به دو بخش ذاتی و تطبیقی تقسیم‌بندی می‌شود که هر دو بخش نیز شامل اجزای سلولی و هومورال است (۲۲، ۲۳). با این وجود سیستم ایمنی در بسیاری از موارد

همسفره\* می‌گردد که در نهایت منجر به حضور سویه‌های مقاوم می‌شود. در حالی که پژوهش‌ها نشان می‌دهد، اگر در زمان شیوع بیماری سلامت آب تامین شود، گسترش باکتری‌ها در آب از آبیان درگیر بیماری کمتر شده و در نتیجه کنترل بیماری ساده‌تر و حتی دوره بیماری کوتاه‌تر خواهد شد (۱۲).

در مزارع پرورش ماهی، مشاهدات و مطالعات نشان می‌دهد در پی تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها به همراه غذا، اغلب ماهیان بزرگ‌تر و سالم‌تر سهم بیشتری از غذا و آنتی‌بیوتیک را دریافت می‌کنند که معمولاً یک نتیجه مثبت در رشد و زنده‌مانی آنها به همراه دارد. در حالی که ماهیان کوچک‌تر و بیمار که نیاز به دریافت آنتی‌بیوتیک بیشتری دارند، به دلیل بیماری‌شان غذا و بالطبع آنتی‌بیوتیک کمتری دریافت می‌کنند که در نهایت منجر به مرگ آنها می‌شود (۱۳، ۱۴). پس‌آب‌های حاصل از این مزارع پرورش ماهی، هنگامی که وارد محیط زیست می‌شوند حامل آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های مقاوم و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که در محیط زیست دوره جدیدی از حیات خودشان را با آلوده کردن انسان و حیوانات آغاز می‌کنند (۱۵). این رخدادها همانند یک چرخه ادامه می‌یابد تا در نهایت باعث ظهور موتانت‌ها و باکتری‌های نوظهوری در انسان و حیوانات می‌شود که نتیجه آن افزایش هزینه‌های درمانی و تولیدی است.

در پژوهشی که Aoki و همکارانش بر روی پلاسمیدهای R (پلاسمید حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها) باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان انجام دادند، مشخص گردید که سه سویه از باکتری *Aeromonas salmonicida* دارای این پلاسمیدها هستند. از سال ۱۹۵۹ که یک سویه از *A. salmonicida* به‌عنوان سویه استاندارد جهانی معرفی گردید، پلاسمید R برای آنتی‌بیوتیک‌های سولفاتیزول، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و دی‌هیدرو استرپتومايسين شناسایی شد (۱۲، ۱۶).

\* Commensal

برای مواجهه با عوامل بیماری‌زا نیاز به صرف زمان و انرژی دارد که این خود باعث عقب افتادن آن از تکثیر و پیشرفت بیماری می‌شود. بنابراین ترکیباتی همانند آنتی‌بیوتیک‌ها که می‌توانند در روند مبارزه و دفاع، سیستم ایمنی را یاری کنند مورد توجه فعالین حوزه سلامت و بهداشت بوده است اما اثربخشی و کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها و سیستم ایمنی در مقابل باکتری‌ها تحت تأثیر یک رابطه دو طرفه بین آنها است. بر اساس تحقیقات گذشته، اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها در افرادی که نقص سیستم ایمنی دارند بیشتر است (۲۴). در حالی که اخیراً تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایطی که سیستم ایمنی سالم باشد عملکرد بهتری دارند (۲۵). بدین صورت که آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ضعیف شدن باکتری‌ها و غیر فعال‌سازی آنها می‌شوند و سیستم ایمنی پاک‌سازی نهایی بدن را انجام می‌دهد. همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها بر عملکرد سیستم ایمنی نیز تأثیر می‌گذارند. برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها واکنش‌های التهابی را تشدید می‌کنند و باعث آسیب‌های بافتی در عفونت‌های شدید می‌شوند در حالی که برخی دیگر واکنش‌های التهابی را کاهش می‌دهند. این خواص تشدیدکننده التهاب و کاهش دهنده التهاب در زمان انتخاب آنتی‌بیوتیک برای درمان بیماری‌ها بسیار اهمیت دارد، عدم انتخاب صحیح و یا استفاده جایگزین در مواردی که برای یک بیماری در یک حیوان و یا انسان آنتی‌بیوتیک مورد نیاز وجود ندارد، موجب پیش‌آگهی ضعیف در بیماران می‌شود (۲۵).

مکانیسم تحریک و افزایش پاسخ‌های التهابی آنتی‌بیوتیک‌ها مربوط به آن گروهی است که هدفشان دیواره سلولی باکتری‌ها است و باعث تخریب دیواره سلولی باکتری و آزاد شدن ترکیبات تحریک‌کننده التهابی از باکتری می‌شوند و به دنبال آن سیستم ایمنی یک واکنش التهابی را کلید می‌زند (۲۶، ۲۷). در حالی که آنتی‌بیوتیک‌های ممانعت‌کننده از پاسخ‌های التهابی بیشتر بر مهار سنتز پروتئین‌های باکتری تمرکز دارند مثل

گروه ماکرولیدها که سنتز پروتئین در گرم مثبت و منفی‌ها را مهار کرده و تولید فاکتورهای حدتی مثل بایوفیلیم و توکسین‌ها را متوقف می‌کنند. همچنین گروه دیگری از آنتی‌بیوتیک‌ها مثل فلوروکوئینولون‌ها، ایمیدازول و تتراسایکلین که مستقیماً بر سلول‌های ایمنی تأثیر می‌گذارند و باعث جلوگیری از تولید واسطه‌های التهابی می‌شوند (۲۵). مطالعات صورت گرفته بر باکتری‌های فلور دستگاه گوارش در طی دوره مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها حاکی از تغییرات عمده در جمعیت آنها دارد که این خود باعث افزایش حساسیت میزبان به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و بیماری‌زایی آنها می‌شود (۲۸). برخی دیگر از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند سیپروفلوکساسین علاوه بر تأثیر بر باکتری‌ها، باعث تغییر متابولیسم سلول‌های طبیعی بدن به ویژه سلول‌های ایمنی می‌شوند. تحقیقات نشان می‌دهد مصرف این آنتی‌بیوتیک منجر به متوقف شدن انفجار تنفسی در ماکروفاژها و کاهش فاگوسیتوز در آنها می‌شود (۲۹). مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌ها علیرغم کمک به سیستم ایمنی بدن جانداران در حذف باکتری‌ها، می‌توانند همانند یک شمشیر دو لبه باعث تعدیل سیستم ایمنی و پیشرفت بیماری‌ها شوند.

**اثر متقابل مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن بر همدیگر:** علاوه بر مطالب عنوان شده آنتی‌بیوتیک‌ها بر عملکرد واکسن‌ها هم تأثیر می‌گذارند. طبیعت کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها به نوعی خلاف یکدیگر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌ها وسیع‌الطیف هستند و بی‌هدف می‌کشند، در حالی که واکسن‌ها بسیار هدفمند و اختصاصی هستند. واکسن‌ها از ایجاد عفونت‌ها جلوگیری می‌کنند در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌ها استفاده می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌ها سدهای دفاعی باکتری‌ها را می‌شکنند تا فعالیت باکتری‌ها را مختل کنند، آنها با سیستم ایمنی بدن ما سازگار نیستند. اما واکسن‌ها به سادگی از سیستم ایمنی بدن استفاده می‌کنند تا قبل از ورود باکتری‌ها مانع فعالیت آنها شوند، بنابراین بسیار

## واکسن یا آنتی‌بیوتیک: کدام یک در پرورش ماهی باید استفاده شود؟

۱۳۹۰.

۳- واکسن استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس تولید سازمان جهاد دانشگاهی تهران ۱۳۹۱.

**چه زمانی واکسیناسیون انجام شود؟** اگرچه ماهی از بدو تولید سیستم ایمنی فعالی دارد لیکن سیستم ایمنی ماهی از وزن ۵-۳ گرم توانمندتر است و در این زمان قادر خواهد بود پاسخ مناسبی را به واکسیناسیون داشته باشد (۱۴). بنابراین بهترین زمان انجام اولین نوبت واکسیناسیون وزن ۵-۳ گرم می‌باشد.

واکسن‌ها در آبزیان اغلب به روش غوطه‌وری استفاده می‌شوند. در روش غوطه‌وری معمولاً واکسن را به نسبت ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۱۰۰ رقیق کرده و ماهی را به مدت ۶۰ الی ۱۲۰ ثانیه در آن غوطه‌ور می‌کنند (۳۱). در ماهی قزل‌آلا در حین عمل واکسیناسیون هوادهی محلول واکسن با استفاده از اکسیژن انجام می‌گردد تا در طی عملیات واکسیناسیون، ماهی دچار کمبود اکسیژن نگردد. استفاده از واکسن یادآور معمولاً ۴۵-۴۰ روز پس از واکسیناسیون مرحله اول توصیه شده است. اگر ماهی در وزن ۵ گرم اولین نوبت واکسن خود را دریافت کند معمولاً ۴۵-۴۰ روز بعد که نوبت بعدی واکسیناسیون است قزل‌آلا بین ۱۰ تا ۱۵ گرم وزن خواهد داشت. واکسیناسیون با روش غوطه‌وری تا ۵۰ گرم توصیه می‌شود و پس از آن به دلیل هزینه زیاد آن عموماً روش تزریقی توصیه می‌گردد. بر اساس توصیه سازندگان واکسن در روش غوطه‌وری به ازای هر ۱۰۰ کیلو وزن زنده ماهی ۱ لیتر واکسن استفاده می‌شود به این ترتیب اگر در نوبت اول ماهی ۵ گرم باشد ۴۵-۴۰ روز بعد نیز ۱۵-۱۰ گرم وزن خواهد داشت و هر دو نوبت واکسیناسیون غوطه‌وری خواهد بود.

بنابراین برای ۱۰,۰۰۰ ماهی در نوبت اول و وزن ۵ گرم حدود ۰/۵ لیتر و نوبت دوم با وزن ۱۵ گرم ۱/۵ لیتر واکسن نیاز خواهد بود. با فرض ۵ میلیون ریال به ازای هر لیتر واکسن هزینه واکسن دو نوبت یک قطعه ماهی ۱۰۰۰ ریال خواهد بود. برای ماهی بیش از ۵۰ گرم واکسیناسیون به روش تزریقی توصیه شده است. برای

کمتر تهاجمی هستند (۳۰). همان‌طور که گفته شد استفاده نابجا و یا بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به آنها و وارد شدن ما به چرخه متناوب ظهور سویه‌های جدید و ساخت آنتی‌بیوتیک‌های بیشتر می‌شود. واکسن‌ها با توجه به ویژگی‌هایی که دارند می‌توانند این چرخه را قطع کنند و از ظهور بیماری‌های نوپدید جلوگیری کنند (۳۱). از منظری دیگر مطالعه‌ای بر روی سلول‌های حافظه‌ای T اثبات کرده است که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند جمعیت این سلول‌ها را کاهش دهد و در نتیجه عفونت‌های مجدد در اثر فقدان این سلول‌ها رخ دهد (۱۴). این یافته می‌تواند به شکست واکسن در برخی از بیماری‌ها تعمیم داده شود که البته نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

## مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر آنها بر اقتصاد آبزی پروری

**سابقه استفاده از واکسن آبزیان در ایران:** اگرچه اولین واکسن در سال ۱۹۳۸ یعنی حدود ۸۰ سال پیش در حوزه آبزیان بر علیه آئروموناس (*A. punctate*) در ماهی کپور استفاده شد، لیکن اولین واکسن تجاری در حوزه آبزیان مربوط به سال ۱۹۷۶ می‌باشد که واکسن کشته شده علیه بیماری یرسینیوزیس بوده و موفق به دریافت مجوز \* FDA گردید (۲۳، ۳۱). از آن زمان تاکنون بیش از ۲۸ نوع واکسن مختلف در حوزه آبزیان به صورت تجاری وجود دارد که بیشترین آنها مربوط به ماهیان سردآبی است. در کشور ما نیز واکسیناسیون در آبزیان از ۱۳۸۴ آغاز گردید.

تا سال ۱۳۹۸ سه واکسن در حوزه آبزیان در کشور ایران به صورت تجاری در دسترس قرار گرفته است که هر سه مربوط به بیماری استرپتوکوکوزیس قزل‌آلا می‌باشد.

۱- واکسن مربوط به کمپانی Scherring Ploug انگلیس ۱۳۸۴.

۲- واکسن لاکتوکوکوزیس مربوط به مؤسسه رازی

\* Food and Drug Administration

تزریق معمولاً ۰/۵-۰/۱ سی‌سی از واکسن را داخل صفاق، داخل عضلات و یا زیر پوست ماهی تزریق می‌کنند. مرسوم‌ترین نقطه برای تزریق داخل صفاق است تا کمترین آسیب را داشته و به دلیل وجود ماکروفاژهای صفافی بیشترین نتیجه را داشته باشد. در روش واکسیناسیون تزریقی هر لیتر واکسن برای ۸-۷ هزار ماهی پاسخگو است به این ترتیب به شرط قیمت ۱۸ میلیون ریالی برای هر لیتر واکسن هزینه برای هر قطعه ماهی ۲۲۵۰ ریال خواهد بود.

**محاسبات اقتصادی در واکسیناسیون:** در تجربیات متعدد انجام شده مقایسه رشد دو گروه واکسینه و غیر واکسینه نشان داد که تفاوت وزن‌گیری بین دو گروه در شرایط مساوی بین ۵ تا ۹ درصد به نفع گروه واکسینه در ماه اول خواهد بود. این افزایش وزن بچه‌ماهی که وزن اولیه پائین است قادر به جبران هزینه واکسیناسیون نخواهد بود لیکن در اوزان بالاتر این تفاوت قابل توجه خواهد بود. مثال در اینجا می‌تواند به روشن شدن موضوع کمک کند به طور مثال ۱۰/۰۰۰ قطعه ماهی ۵ گرم داریم و این گروه را طی دو نوبت در وزن ۵ و ۱۵ گرم واکسینه می‌کنیم.

$$10,000 \times 5 = 50,000 \text{ Kg}$$

$$10,000 \times 0.5 = 5,000 \text{ Kg}$$

۰/۵ لیتر در نوبت اول و ۱/۵ لیتر در نوبت دوم واکسن مورد نیاز خواهد بود که با فرض قیمت ۱۸ میلیون ریال برای هر لیتر واکسن، هزینه واکسیناسیون هر قطعه ماهی در دو نوبت ۱۰۰ تومان خواهد شد و در جمع ده میلیون ریال هزینه واکسیناسیون گله خواهد شد.

حال اگر این بچه‌ماهی در ماه ۱۰۰ درصد اضافه وزن داشته باشد، ۱۵۰ کیلو اضافه وزن معمول آن خواهد بود که در گروه واکسینه  $150 \times 0.5 = 75 \text{ kg}$  بیشتر خواهد بود. ۷/۵ کیلو بچه‌ماهی اضافه با فرض هر کیلو ۶۰,۰۰۰ تومان جمعاً ۴۵۰ هزار تومان خواهد شد که با هزینه یک میلیون تومان این عدد نشان‌دهنده زیان می‌باشد. لیکن وقتی ماهی به وزن ۵۰۰ گرم رسید ۱۰/۰۰۰ قطعه ماهی

حدود ۵ تن وزن خواهند داشت. تفاوت افزایش وزن گروه واکسینه و غیر واکسینه در این مرحله به شرط افزایش وزن ۶۰ درصدی تفاوت اضافه وزن  $60 = 3/000 \text{ Kg}$  ۵۰۰٪ و  $5 = 150 \text{ Kg}$  ۳۰۰٪ که با فرض هر کیلو ماهی ۲۰ هزار تومان رقم ۳ میلیون تومان به دست خواهد آمد که در مقایسه با هزینه واکسیناسیون یک میلیون تومانی رقم ۲ میلیون تومان به نفع مزرعه‌دار خواهد بود. و این علاوه بر هزینه‌های دارویی و تلفاتی که صرفه‌جویی می‌شود می‌باشد و البته این اعداد برای یک ماه محاسبه گردیده‌اند که این ارقام در ۳-۴ ماه باقیمانده دوره پرورش ضرب کنیم اعداد به مراتب بیشتر خواهد شد.

### بحث و نتیجه‌گیری

ماهی‌ها به‌ویژه ماهی‌های پرورشی به دلیل تراکم بالای جمعیت، به‌طور مداوم در معرض عوامل بیماری‌زا هستند. بنابراین، استفاده از داروهای شیمیایی و واکسن‌ها برای مبارزه عفونت‌های میکروبی منجر به کاهش مرگ و میر ماهی‌ها و افزایش تولید می‌شود (۳۲).

آنتی‌بیوتیک‌ها به هر شکلی که باشند، فشار تکاملی بر طیف وسیعی از باکتری‌ها ایجاد می‌کنند، حیوانات و انسان به‌طور طبیعی میزبان تعداد زیادی از باکتری‌ها هستند و حضور آنها به‌عنوان میکروبیوتا ضروری می‌باشد. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، میکروبیوتای روده را به هم می‌زند و تعداد زیادی از میکروب‌های مفید روده حذف می‌شوند که می‌تواند خطرات جدی برای بدن جانداران به همراه داشته باشد. همچنین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث اختلالات ایمنی و آسیب به بافت‌های مختلف از جمله روده می‌شود که یکی از جایگاه‌های اصلی سکونت باکتری‌های مفید است و به دنبال آن جاندار مستعد بیماری خواهد شد (۳۳، ۳۴). علاوه بر این، هنگامی که از آنتی‌بیوتیک استفاده می‌کنیم، تمام این باکتری‌ها را در معرض انتخاب زنده ماندن و یا حذف شدن قرار می‌دهیم. امروزه آنتی‌بیوتیک‌ها در منابع آبی به راحتی یافت می‌شوند، از آنجایی که این مواد اغلب دست نخورده باقی می‌مانند، این منابع آبی، محیطی ایده‌آل برای ظهور

## واکسن یا آنتی‌بیوتیک: کدام یک در پرورش ماهی باید استفاده شود؟

به‌طور قابل توجهی بالا برده است. با این حال کمبود اطلاعات در خصوص اثر برهمکنش متقابل واکسن‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها بر همدیگر همچنان وجود دارد و نیاز به انجام تحقیقات بیشتر است. در خصوص بهره‌مندی از مزایای واکسیناسیون در کشور دو راهکار زیر توصیه می‌گردد.

۱- توسعه واکسیناسیون تزریقی تا پرورش دهندگان در مزرعه خود اقدام به واکسیناسیون نمایند.

در این روش هر قطعه ماهی با هزینه‌های جاری، ۲۵۰ - ۲۰۰ تومان هزینه واکسیناسیون خواهد داشت که با فرض ۱۰,۰۰۰ قطعه رقمی حدود ۲-۲/۵ میلیون تومان هزینه واکسیناسیون خواهد شد که در ماه اول پس از واکسیناسیون اضافه وزن ماهی جبران هزینه واکسن را در بر خواهد داشت. لیکن دو مشکل اساسی در این راه وجود دارد: الف- مزارع پرورش اکثراً آلودگی دارند و شناسایی وضعیت مناسب برای واکسیناسیون در این مزارع کار سختی است ب- تزریق واکسن در کشور، به لحاظ تأمین واکسن و تیم واکسیناسیون هنوز مشکل فراوانی دارد.

۲- اجباری کردن واکسیناسیون در مزارع بچه‌ماهی و انتقال هزینه از مراکز تکثیر به مزارع پرورش از طریق افزایش قیمت بچه‌ماهی و یا اینکه دولت در مقطعی با واکسیناسیون بچه‌ماهی از سلامت جامعه و اقتصاد این صنعت حمایت کند، این روش به دلیل پاک بودن مزارع تکثیر، حرفه‌ای بودن پرسنل مراکز تکثیر و قابلیت اجرایی بهتر، توصیه می‌شود.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

- 1- Pridgeon J W, Klesius P H. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CABI Reviews*. 2012: 1-16.
- 2- Guijarro J A, García-Torrico A I, Cascales D, Méndez J. The infection process of *Yersinia ruckeri*: reviewing the pieces of the jigsaw puzzle. *Frontiers in cellular and infection*

باکتری‌های مقاوم هستند (۳۲). اما این تنها اثر آنتی‌بیوتیک‌ها نیست، این مواد باعث تغییرات عمده ژنتیکی (genetic drift) به دلیل از بین رفتن حجم وسیعی از باکتری‌ها و متعاقب آن گنجینه ژنی آنها و باقی ماندن تنوع کمی از باکتری‌ها که مجبور به تغییرات ژنی عمده می‌شوند می‌گردد. این تغییرات عمده باعث تکامل باکتری‌ها در جهات جدید و غیر قابل پیش‌بینی از جمله افزایش بیماری‌زایی می‌شود (۳۵، ۳۶).

بر عکس آن واکسن‌ها فقط بر روی باکتری خاصی که برای آن ساخته شده‌اند فشار انتخابی ایجاد می‌کنند و به‌واسطه ایمنی جمعی، حتی در مواردی که برخی از حیوانات و یا انسان‌ها به هر دلیلی واکسن را دریافت نکنند، به خاطر حضور اکثریت افراد واکسینه در برابر بیماری ایمن هستند. از آنجایی که واکسن‌ها مانع تکثیر عامل بیماری‌زا در میزبان می‌شوند، هیچ‌گونه تنگنای تکاملی ایجاد نمی‌شود و از آسیب رساندن به میزبان جلوگیری می‌شود.

این که چرا مراکز تفریح ماهی نسبت به واکسیناسیون اقدام نمی‌کنند در محاسبات مالی کاملاً مشخص است. ضمن آن که قطع غذا بودن ماهی، خطرات دستکاری ماهی و زحمت واکسیناسیون را باید به آن اضافه کرد. همچنین در ماهیان بزرگ‌تر واکسیناسیون به روش غوطه‌وری به صرفه نیست چون هزینه‌ها بسیار زیاد خواهد شد.

امروزه مطالعات در زمینه واکسن‌های آبی‌زیان و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی درک ما را از عواملی که باعث به خطر افتادن بهداشت عمومی، ضعف سیستم ایمنی و بر هم خوردن تعادل میکروبیوتای روده ماهیان می‌شوند، را

*microbiology*. 2018; 8: 218.

- 3- Sepahdari A, Saeedi A, Kakoulaki S, Habibi Kotanaee F, Babaalian A. Incidence of streptococcosis in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) farms in Haraz River in Mazandaran Province, Iran. *ISFJ*. 2014; 22(4): 41-50.

- 4- Gaynes R. The discovery of penicillin-new

insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging infectious diseases*. 2017; 23(5): 849.

5- Saleem M, Deters B, de la Bastide A, Korzen M. Antibiotics overuse and bacterial resistance. *Annals of Microbiology and Research*. 2019; 3(1): 93.

6- Malo S, José Rabanaque M, Feja C, Jesús Lallana M, Aguilar I, Bjerrum L. High antibiotic consumption: a characterization of heavy users in Spain. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2014; 115(3): 231-6.

7- Elong Ekambi G A, Okalla Ebongue C, Penda I C, Nnanga Nga E, Mpondo Mpondo E, Eboumbou Moukoko C E. Knowledge, practices and attitudes on antibiotics use in Cameroon: Self-medication and prescription survey among children, adolescents and adults in private pharmacies. *PLoS one*. 2019; 14(2): e0212875.

8- Gaskins H, Collier C, Anderson D. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal biotechnology*. 2002; 13(1): 29-42.

9- Angelakis E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microbial Pathogenesis*. 2017; 106: 162-70.

10- Lipsitch M, Singer R S, Levin B R. Antibiotics in agriculture: when is it time to close the barn door? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99(9): 5752-4.

11- Duan H, Yu L, Tian F, Zhai Q, Fan L, Chen W. Antibiotic-induced gut dysbiosis and barrier disruption and the potential protective strategies. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2022; 62(6): 1427-52.

12- Miller R, Harbottle H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Microbiol Spectr*. 2018.

13- Coyne R, Bergh Ø, Samuelson O, Andersen K, Lunestad B T, Nilsen H, et al. Attempt to validate breakpoint MIC values estimated from pharmacokinetic data obtained during oxolinic acid therapy of winter ulcer disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 2004; 238(1-4): 51-66.

14- Ellis A. Development of the immune response in relation to bacterial disease in the growing fish. *Biology of Growing Animals*. 2005; 2: 314-27.

15- Petersen A, Andersen J S, Kaewmak T, Somsiri T, Dalsgaard A. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. *Applied and environmental microbiology*. 2002; 68(12): 6036-42.

16- Aoki T, Egusa S, Kimura T, Watanabe T. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. *Applied microbiology*. 1971; 22(4): 716-7.

17- Erfanmanesh A, Beikzadeh B, Khanzadeh M. Efficacy of polyvalent vaccine on immune response and disease resistance against streptococcosis/lactococcosis and yersiniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research Communications*. 2023: 1-9.

18- Huang Y, Michael GB, Becker R, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S, et al. Pheno- and genotypic analysis of antimicrobial resistance properties of *Yersinia ruckeri* from fish. *Veterinary Microbiology*. 2014; 171(3-4): 406-12.

19- Safika S, Nilasari Z, Pasaribu F H. Detection of antibiotic resistance coding gene in *Klebsiella pneumoniae* bacteria isolated from broiler chickens in West Java, Indonesia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2022; 12(7): 190-8.

20- Biller-Takahashi J D, Urbinati E C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2014; 86: 1484-506.

21- Miller T E, North D K. Clinical infections, antibiotics and immunosuppression: a puzzling relationship. *The American Journal of Medicine*. 1981; 71(3): 334-6.

22- Anderson R, Tintinger G, Cockeran R, Potjo M, Feldman C. Beneficial and harmful interactions of antibiotics with microbial pathogens and the host innate immune system. *Pharmaceuticals*. 2010; 3(5): 1694-710.

23- Makesh M, Rajendran K. Fish immune system and vaccines: *Springer*; 2022.

24- Kohanski M A, Dwyer D J, Collins J J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8(6): 423-35.

25- Martínez J L. Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. *F1000Research*. 2017: 6.

26- Ubeda C, Pamer E G. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in immunology*. 2012; 33(9): 459-66.

27- Yang J H, Bhargava P, McCloskey D, Mao N, Palsson B O, Collins J J. Antibiotic-induced changes to the host metabolic environment inhibit drug efficacy and alter immune function. *Cell host & microbe*. 2017; 22(6): 757-65. e3.

**28- Lipsitch M, Siber G R.** How can vaccines contribute to solving the antimicrobial resistance problem? *MBio*. 2016; 7(3):10.

**29- Bloom D E, Black S, Salisbury D, Rappuoli R.** Antimicrobial resistance and the role of vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018; 115(51): 12868-71.

**30- How do antibiotics and vaccines affect nature?** . Forbes. 2018.

**31- Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø.** Fish vaccination: *Wiley Online Library*. 2014.

**32- Sanganyado E, Gwenzi W.** Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. *Science of the Total Environment*. 2019; 669: 785-97.

**33- Willing B P, Russell S L, Finlay B B.**

Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology*. 2011; 9(4): 233-43.

**34- Sun L, Zhang X, Zhang Y, Zheng K, Xiang Q, Chen N, et al.** Antibiotic-induced disruption of gut microbiota alters local metabolomes and immune responses. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2019; 9:99.

**35- Baquero F, Negri M C, Morosini M I, Blázquez J.** Antibiotic-selective environments. *Clinical infectious diseases*. 1998; 27(1): S5-S11.

**36- Durão P, Balbontín R, Gordo I.** Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*. 2018; 26(8): 677-91.



## Vaccine or Antibiotic: which one should be used in fish farming?

Ahmad Erfanmanesh<sup>1</sup>, Babak Beikzadeh<sup>2\*</sup>, Majid Khanzadeh<sup>1</sup>

1- Research Group of Animal Biologic Products, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran Organization, Tehran, Iran.

2- Department of Cellular and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Receive: August 21, 2023; Revise: September 24, 2023; Accept: September 25, 2023

 10.22034/nfvm.2023.412650.1199  20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

Along with the global expansion of aquaculture, diseases have increased in this industry. Vaccines and antibiotics are used as accepted methods throughout the world to fight disease. However, in Iran, the path of fighting diseases has gone into the use of antibiotics. Antibiotic overuse puts evolutionary pressure on pathogenic and non-pathogenic bacteria, resulting in the emergence of antibiotic-resistant strains and a more severe recurrence of the disease. On the other hand, antibiotics also affect the function of vaccines. Together, these events affect the economic aspects of fish farming. So, antibiotic use is important in terms of environmental impact and public health, the immune system, vaccines, and aquaculture economics. In this review paper, an attempt had been made to study previous research on antibiotics and vaccines, economic analysis of vaccine uses and its health effects, by answering the question "Vaccine or antibiotics: which one should be used in fish farming?" Shows the importance of using vaccines instead of antibiotics.

**Keywords:** *Vaccine, Antibiotic, Aquaculture, Immune System, Public Health*



## اثر استفاده‌ی کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و جمعیت میکروبی ایلئوم در بلدرچین ژاپنی

مهدی راشکی<sup>۱</sup>، قاسم جلیوند\*<sup>۲</sup>، فرزاد باقرزاده کاسمانی<sup>۳</sup>، محمود قزاقی<sup>۴</sup>، آیدا داوری<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲ و ۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۵- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۶ اردیبهشت ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۱ اردیبهشت ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۱ اردیبهشت ۱۴۰۲

10.22034/nfvm.2023.396116.1186

20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

آزمایشی به منظور بررسی اثرات استفاده‌ی کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و جمعیت میکروبی ایلئوم در بلدرچین با تعداد ۶۷۵ قطعه بلدرچین ژاپنی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار، ۵ تکرار و هر تکرار با ۱۵ قطعه بلدرچین انجام شد. تیمارها شامل شاهد: جیره پایه ذرت و کنجاله سویا، کنجاله کلزا جایگزین ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد با کنجاله سویا و همان تیمارها با افزودن پروبیوتیک پروتکسین (۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در جیره غذایی بودند که در سن ۷ تا ۳۵ روزگی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد تیمارها بر اسیدیته گوشت بلدرچین و افت خون‌آبه آن تأثیری نداشتند و کنجاله کلزای بدون پروبیوتیک تأثیری بر کیفیت گوشت بلدرچین نداشت ( $P>0/05$ ). تیمار ۲۵ درصد کنجاله کلزا با پروبیوتیک در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین ظرفیت نگهداری آب، کمترین مقدار افت پخت، و بیشترین میزان شمارش لاکتوباسیل را داشت ( $P<0/05$ ). همچنین تیمارهای شاهد و ۲۵ درصد کلزا با پروبیوتیک کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید و تیمارهای ۲۵ و ۵۰ درصد کلزا با پروبیوتیک کمترین میزان شمارش باکتری اشریشیاکلی را داشتند ( $P<0/05$ ). همچنین تیمار ۲۵ درصد کنجاله کلزا همراه با پروبیوتیک بیشترین طول پرز روده و کمترین میزان عمق کریپت را در مقایسه با سایر تیمارها داشت ( $P<0/05$ ). نتایج در این مطالعه نشان داد که با توجه به اثرات مثبت جایگزینی ۲۵ درصد کنجاله کلزا با کنجاله سویا و استفاده از پروبیوتیک پروتکسین بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و جمعیت میکروبی ایلئوم بلدرچین ژاپنی می‌توان از این منبع پروتئینی قابل دسترس در جیره بلدرچین ژاپنی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** بلدرچین ژاپنی، پروبیوتیک پروتکسین، کنجاله سویا، کنجاله کلزا

## مقدمه

یکی از نگرانی‌های عمده مصرف فرآورده‌های طیور استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد است که می‌تواند منجر به ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود و به دلیل ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، علاقه به یافتن جایگزین‌هایی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک دام افزایش یافته است. برای تسهیل استفاده از خوراک‌ها در پرندگان، استفاده از مواد افزودنی خوراکی مانند آنزیم، پروبیوتیک و فرآیند تخمیر پیشنهاد شده است (۱). پروبیوتیک‌ها به دلیل پتانسیل آنها در کاهش بیماری روده‌ای در طیور، جایگزین مناسبی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۲). تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک در روده، مزیت رقابتی این ارگانیسم‌ها را نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها برای استفاده به‌عنوان پروبیوتیک فراهم کرده است (۳، ۴). علاوه بر این، وجود مقداری لاکتوباسیلوس در دستگاه گوارش مرغ برای تنظیم ترکیب میکروفلور روده، توسعه ایمنی روده و ارتقای سلامت جوجه‌ها اهمیت زیادی دارد (۵). پروبیوتیک‌ها می‌توانند علاوه بر بهبود شاخص‌های مهم مرتبط با رشد مانند وزن، افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی، شاخص‌های خونی مانند گلبول‌های قرمز و سفید، شمارش افتراقی گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت را که با وضعیت فیزیولوژیکی اندام‌های بدن مرتبط هستند را بهبود دهند (۶). با توجه به محدودیت شدید و ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد و عوامل درمانی در صنعت طیور، پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد شده‌اند. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی میکروبی زنده تعریف شده‌اند که با بهبود تعادل میکروبی روده حیوان میزبان، تأثیر مفیدی بر روی حیوان میزبان دارند. پروبیوتیک‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت هستند و میکروارگانیسم‌های زنده هستند که حاوی مولکول‌های شیمیایی نیستند. پروبیوتیک‌ها باقیمانده ندارند و مقاومت میکروبی ایجاد نمی‌کنند (۷).

این ارگانیسم‌ها محیط دستگاه روده را بهبود می‌بخشند و ممکن است به‌عنوان میکروارگانیسم زنده‌ای تعریف شود که به حیوانات داده می‌شود و به ایجاد جمعیت روده‌ای کمک می‌کند که برای حیوان مفید است و با میکروبیوم مضر مخالف است (۸). با تولید اسیدها (مانند اسید استیک و اسید لاکتیک) و سایر ترکیباتی که مانع از کاهش اسید و سایر باکتری‌های مضر می‌شوند، اثر پروبیوتیکی نشان داده شده است (۹). مطالعات انجام شده با جوجه‌های گوشتی نشان دهنده پاسخ مثبت به مکمل‌های غذایی پروبیوتیک است (۱۰، ۱۱). یو و کیم در سال ۱۹۹۷ بهبودهای علمی قابل توجهی را در افزایش روزانه و مصرف خوراک برای جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پروبیوتیک گزارش کردند (۱۲). پروبیوتیک‌ها تولید اجزای سمی توسط باکتری‌ها را کاهش می‌دهند و فرصتی در مورفولوژی دیواره روده ایجاد می‌کنند و کلونیزاسیون پاتوژن‌ها را بر روی دیواره روده کاهش می‌دهند و در نتیجه از آسیب به سلول‌های اپیتلیال جلوگیری می‌کنند (۱۳). پروبیوتیک پروتکسین دارای مجموعه‌هایی از سویه‌های گوناگون باکتری‌های سودمند از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک، قارچ و مخمر است. باکتری‌های اسید لاکتیک رایج‌ترین پروبیوتیک‌های استفاده شده در تغذیه حیوانات هستند و از اثرات سودمند این باکتری‌ها می‌توان به افزایش رشد، افزایش کارایی غذا، جلوگیری از اختلالات روده‌ای و انجام پیش هضم شاخص‌های ضد تغذیه‌ای موجود در اجزای غذا اشاره کرد (۱۴). پروبیوتیک کشت یک سویه باکتری یا ترکیبی از سویه‌های مختلف است و می‌تواند برای دستکاری میکروفلور روده و افزایش سرعت رشد به‌طور داده شود. پروبیوتیک‌ها می‌توانند با مهار رشد باکتری‌های مضر و افزایش جمعیت باکتری‌های غیر بیماری‌زا مخاط روده را تحت تأثیر قرار دهند (۱۵). با توجه به افزایش میکروفلور مفید در روده و بهبود عملکرد در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های مکمل پروبیوتیک (پروبیوتیک پروتکسین)، این افزودنی به‌عنوان یک جایگزین

## اثر استفاده‌ی کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و ...

آنتی‌بیوتیکی تأیید شده است (۱۶).

با توجه به گرانی و کمبود کنجاله سویا در کشور و همچنین کاهش واردات آن در تغذیه طیور و همچنین اثرات مختلف و متنوع پروبیوتیک‌ها در بهبود سلامت طیور این پژوهش به منظور ارزیابی تأثیر استفاده کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا همراه پروبیوتیک (پروبیوتیک پروتکسین) بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و جمعیت میکروبی روده در بلدرچین ژاپنی انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش با تعداد ۶۷۵ قطعه بلدرچین ژاپنی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار، ۵ تکرار و هر تکرار با ۱۵ قطعه بلدرچین انجام شد. جوجه‌ها در سن ۷ تا ۳۵ روزگی و در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱ گروه

شاهد جیره پایه ذرت و کنجاله سویا (بدون افزودنی)، تیمارهای کنجاله کلزا جایگزین در چهار سطح: ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ با کنجاله سویا (به ترتیب تیمارهای ۲، ۳، ۴ و ۵) و تیمارهای کنجاله کلزا جایگزین در چهار سطح: ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ با کنجاله سویا + پروبیوتیک پروتکسین (۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) (به ترتیب تیمارهای ۶، ۷، ۸ و ۹) در جیره غذایی بودند. جیره‌های آزمایشی در سن ۷ تا ۳۵ روزگی مورد استفاده قرار گرفت. در طول دوره پرورش، جوجه‌ها به صورت آزاد به خوراک و آب آشامیدنی دسترسی داشتند. جیره‌ها برای دوره هفت تا ۳۵ روزگی با توجه به احتیاجات مواد مغذی توصیه شده توسط انجمن ملی تحقیقات آمریکا (۱۷) تنظیم شدند (جدول ۱).

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیب مواد مغذی جیره‌ها

تیمار ۹	تیمار ۸	تیمار ۷	تیمار ۶	تیمار ۵	تیمار ۴	تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱ (شاهد)	مواد خوراکی
۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	۵۶/۹۶	ذرت (%)
۰/۰۰	۸/۷۵	۱۷/۵۰	۲۶/۲۵	۰/۰۰	۸/۷۵	۱۷/۵۰	۲۶/۲۵	۳۵/۰۰	کنجاله سویا (۴۴٪)
۳۵/۰۰	۲۶/۲۵	۱۷/۵۰	۸/۷۵	۳۵/۰۰	۲۶/۲۵	۱۷/۵۰	۸/۷۵	۰/۰۰	کنجاله کلزا (%)
۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	گلوتن ذرت (%)
۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	روغن گیاهی (%)
۱/۴۳	۱/۴۳	۱/۴۳	۱/۴۳	۱/۴۳	۱/۴۳	۱/۴۳	۱/۴۳	۱/۴۳	کربنات کلسیم (%)
۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱	بی‌کربنات سدیم (%)
۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۱	ال-لیزین هیدروکلراید (%)
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل ویتامینی <sup>۱</sup> (%)
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل معدنی <sup>۱</sup> (%)
۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	دی‌ال-متیونین (%)
۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	دی‌کلسیم فسفات (%)
۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	ال-ترئونین (%)
۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	نمک (%)
۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	پروبیوتیک پروتکسین (میلی‌گرم در کیلوگرم)
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	جمع
									ترکیب مواد مغذی (محاسبه شده)
۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری در کیلوگرم)
۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	۲۴/۵۲	پروتئین خام (درصد)
۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵	لیزین (درصد)
۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۱	متیونین (درصد)
۱/۰۸	۱/۰۸	۱/۰۸	۱/۰۸	۱/۰۸	۱/۰۸	۱/۰۸	۱/۰۸	۱/۰۸	متیونین + سیستین (درصد)
۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	ترئونین (درصد)
۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	تریپتوفان (درصد)
۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	کلسیم (درصد)
۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰	فسفر قابل دسترس (درصد)
۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	سدیم (درصد)
۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	کلر (درصد)
۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	تعادل کاتیون - آنیون (میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم)

<sup>۱</sup> مکمل ویتامینی مقادیر زیر را در هر کیلوگرم جیره تأمین می‌نمود: ویتامین A (از vitamin A acetate)، ۱۱۵۰۰ IU؛ کوله کلسیفرول، ۲۱۰۰ IU؛ ویتامین E (از DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate)، ۲۲ IU؛ ویتامین B<sub>12</sub>، ۰/۶۰ mg؛ ریوفلاوین، ۴/۴ mg؛ نیکوتین‌آمید، ۴۰ mg؛ کلسیم پانتوتنات، ۳۵ mg؛ منادیون (منادیون دی‌متیل پیریمیدینول)، ۱/۵۰ mg؛ فولیک اسید، ۰/۸۰ mg؛ تیامین، ۳ mg؛ پیریدوکسین، ۱۰ mg؛ بیوتین، ۱ mg؛ کولین کلراید، ۵۶۰ mg؛ اتوکسی کوئین، ۱۲۵ mg.  
<sup>۲</sup> مکمل معدنی مقادیر زیر را در هر کیلوگرم جیره تأمین می‌نمود: منگنز (از MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O)، ۶۵ mg؛ روی (از ZnO)، ۵۵ mg؛ آهن (از FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)، ۵۰ mg؛ مس (از CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)، ۸ mg؛ پد (از Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O)، ۱/۸ mg؛ سلنیم، ۰/۳۰ mg؛ کبالت (Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)، ۰/۲۰ mg؛ و مولیبدن، ۰/۱۶ mg.

مخصوص قرار داده شدند و در دمای ۲۴- درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. سپس، یک گرم نمونه گوشت آسیاب و چهار میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرو استیک پنج درصد به آن اضافه شد. پس از آن ۲/۵ میلی‌لیتر بوتیلات هیدروکسی تولوئن ۰/۸ درصد به آن اضافه گردید. سپس به مدت سه دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و لایه رویی آن حذف و باقیمانده‌ی آن با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد. بعد از آن سه میلی‌لیتر محلول ۲- اسید تیوباربیتوریک ۰/۸ درصد به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن بلافاصله سرد گردید. میزان جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد و غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد (۱۸). در پایان آزمایش، دو قطعه بلدرچین از هر تکرار انتخاب و با برش گردن از بین مهره اول و دوم گردنی ذبح شدند.

**ارزیابی جمعیت میکروبی:** برای ارزیابی جمعیت میکروبی، محتویات ایلئومی از هر دو قطعه بلدرچین ذبح شده جمع‌آوری شد. یک گرم محتویات ایلئوم هر تکرار در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و پس از تصفیه این محتوی رقیق شده، آن را کاملاً هم زده تا همگن شد. دو رقت (۱-۱۰ و ۲-۱۰) پس از این محلول همگن تهیه و هر رقت بر روی محیط کشت مخصوص خود کشت شد. با استفاده از این نمونه‌های رقیق شده شمارش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک، به ترتیب بر روی محیط کشت MRS (Man-Rogosa-Sharpe) پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت و در شرایط هوازی به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت مک‌کانکی (Mac Conkey) MC انجام

### ارزیابی کیفیت گوشت: برای اندازه‌گیری ظرفیت

نگهداری آب، ابتدا یک گرم گوشت، وزن و سپس به مدت پنج دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پس از آن نمونه به آرامی با پارچه کتان خشک و دوباره وزن‌کشی شد (۱۸). ظرفیت نگهداری آب با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (رابطه ۱).

$$100 \times (\text{وزن بعد سانتریفیوژ} / \text{وزن قبل سانتریفیوژ}) = \text{ظرفیت نگهداری آب}$$

برای اندازه‌گیری pH گوشت، ۵ گرم از نمونه توزین و با ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر به‌طور کامل مخلوط شد. سپس pH هر نمونه در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. برای محاسبه افت خونابه بعد از کشتار، مقدار ۲۰ گرم از هر یک از نمونه‌های گوشت وزن شد. نمونه‌ها در پلاستیک زیپ‌دار به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری و بعد از ۲۴ ساعت رطوبت سطحی گوشت سینه با استفاده از کاغذ جاذب رطوبت، جذب و سپس نمونه‌ها مجدداً وزن شدند. مقدار افت خونابه با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد. بعد از اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب گوشت، نمونه‌های گوشت درون پلاستیک زیپ‌دار و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم (بن ماری) قرار گرفتند و بعد از آن نمونه‌ها با آب، سرد شدند. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. مقدار افت حاصل از پخت با استفاده از رابطه ۳، اندازه‌گیری شد (۱۸).

$$(2) \times 100 = \text{افت خونابه} / (\text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه})$$

$$(3) \times 100 = \text{افت حاصل از پخت} / (\text{وزن اولیه قبل از پخت} - \text{وزن نهایی پس از پخت})$$

برای اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید گوشت، نمونه‌های گوشت مربوط به هر پرنده در پاکت‌های

## اثر استفاده‌ی کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و ...

شد (۱۹). آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰) (نسخه ۹/۱) تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و در سطح آماری ۵ درصد استفاده شدند. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر است:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

در این رابطه  $Y_{ijk}$  مقدار مشاهده واحد آزمایش  $i$  در تکرار  $j$  ام،  $\mu$  میانگین جامعه،  $T_i$  اثر تیمار،  $\varepsilon_{ij}$  اثر خطای آزمایشی بود.

### نتایج

نتایج مربوط به کیفیت گوشت جوجه‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در جدول ۲ آورده شده است. در این مطالعه نشان داده شد که کیفیت گوشت تحت تأثیر

تیمارهای مختلف قرار گرفت. در این آزمایش تیمارهای کنجاله کلزا بدون پروبیوتیک تأثیری بر کیفیت گوشت نداشت و pH گوشت و افت خونابه آن تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت ( $P > 0.05$ ). تیمار شاهد و تیمار ۲۵ درصد کنجاله کلزا با پروبیوتیک بیشترین ظرفیت نگهداری آب را داشت که در مقایسه با تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ درصد کنجاله کلزا بدون پروبیوتیک دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $P < 0.05$ ). همچنین تیمار جایگزینی ۲۵ درصد کنجاله کلزا با پروبیوتیک و تیمار شاهد کمترین میزان مالون دی‌آلدئید را داشتند ( $P < 0.05$ ). نتایج این جدول نشان می‌دهد که جایگزینی کنجاله کلزا با کنجاله سویای بدون پروبیوتیک تأثیری بر کیفیت گوشت بلدرچین نداشت.

جدول ۲- اثر مکمل کردن تیمارهای مختلف بر کیفیت گوشت بلدرچین ژاپنی

تیمارها	افت خون‌آبه (درصد)	افت پخت (درصد)	ظرفیت نگهداری آب (درصد)	pH	مالون دی‌آلدئید (mg/kg)
جیره بر پایه ذرت - سویا (شاهد)	۱۳/۹۵	۱۹/۳۲ <sup>ab</sup>	۸۵/۴۱ <sup>a</sup>	۶/۳۲	۰/۱۱ <sup>d</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۲۵٪ سویا	۱۲/۷۰	۱۹/۰۷ <sup>ab</sup>	۸۳/۱۲ <sup>ab</sup>	۶/۳۰	۰/۷۸ <sup>bcd</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۵۰٪ سویا	۱۴/۵۱	۱۶/۹۴ <sup>ab</sup>	۷۹/۶۹ <sup>ab</sup>	۶/۳۰	۰/۶۳ <sup>bcd</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۷۵٪ سویا	۱۳/۸۸	۲۰/۵۸ <sup>a</sup>	۷۶/۱۱ <sup>bc</sup>	۶/۳۷	۱/۰۸ <sup>cb</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۱۰۰٪ سویا	۱۲/۴۱	۲۰/۹۲ <sup>a</sup>	۶۶/۳۷ <sup>d</sup>	۶/۲۵	۲/۲۸ <sup>a</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۲۵٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (۲۰۰ mg/kg)	۱۳/۴۷	۱۵/۴۱ <sup>b</sup>	۸۵/۲۵ <sup>a</sup>	۶/۳۱	۰/۱۲ <sup>d</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۵۰٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (۲۰۰ mg/kg)	۱۴/۲۵	۱۵/۵ <sup>b</sup>	۸۳/۰۵ <sup>ab</sup>	۶/۴۲	۰/۲۵ <sup>dc</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۷۵٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (۲۰۰ mg/kg)	۱۳/۷۴	۱۸/۳۴ <sup>ab</sup>	۷۹/۳۲ <sup>ab</sup>	۶/۲۹	۰/۸۵ <sup>bcd</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۱۰۰٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (۲۰۰ mg/kg)	۱۳/۹۱	۱۹/۰۱ <sup>ab</sup>	۶۹/۲۱ <sup>dc</sup>	۶/۳۸	۱/۲۸ <sup>b</sup>
SEM	۰/۷۷	۱/۰۳	۱/۸۹	۰/۰۴۹	۰/۱۵
P-value	۰/۶۶۴	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۱	۰/۴۰۰	۰/۰۰۰۱

a-b-c حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

SEM: انحراف معیار میانگین

کمترین عمق کریپت هستند و اختلاف معنی‌داری با تیمارهای حاوی ۱۰۰ و ۷۵ درصد کنجاله کلزا بدون پروبیوتیک دارند.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر ارتفاع پرز و عمق کریپت وجود دارد ( $P < 0.05$ ). تیمارهای حاوی ۲۵ و ۵۰ درصد کنجاله کلزا همراه با آنزیم دارای بیشترین ارتفاع و

جدول ۳- اثر تیمارهای مختلف بر مورفولوژی ایلئوم روده کوچک در بلدرچین‌های ژاپنی

تیمارها	طول روده (سانتی‌متر)	ارتفاع پرز (میکرومتر)	عمق کریپت (میکرومتر)
جیره بر پایه ذرت- سویا (شاهد)	۳۵/۴۵	۲۵۹/۲۸ <sup>ab</sup>	۱۱/۸۹ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۲۵٪ سویا	۳۶/۸۷	۲۷۱/۵۴ <sup>ab</sup>	۱۱/۵۷ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۵۰٪ سویا	۳۴/۵۷	۲۶۸/۸۴ <sup>ab</sup>	۱۲ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۷۵٪ سویا	۳۵/۰۵	۲۴۳/۵۸ <sup>b</sup>	۱۲/۹۸ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۱۰۰٪ سویا	۳۶/۸۶	۲۴۲/۸۴ <sup>b</sup>	۱۳/۵۱ <sup>a</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۲۵٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۳۶/۵۰	۲۷۸/۵۰ <sup>a</sup>	۱۰/۶۵ <sup>b</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۵۰٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۳۵/۷۵	۲۸۰/۴۱ <sup>a</sup>	۱۰/۵۶ <sup>b</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۷۵٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۳۲/۸۶	۲۵۵/۸۷ <sup>ab</sup>	۱۱/۱۲ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۱۰۰٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۳۷/۲۱	۲۶۲/۹۱ <sup>ab</sup>	۱۱/۲۸ <sup>ab</sup>
SEM	۰/۵۱	۳/۲۱	۰/۲۷۳
P-value	۰/۲۸۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۸

a-b-c: حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: انحراف معیار میانگین

درصد کنجاله کلزا بدون پروبیوتیک کمترین جمعیت لاکتوباسیلوس را داشتند (P<۰/۰۵)، همچنین تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای دریافت‌کننده ۷۵ و ۱۰۰ درصد کنجاله کلزا بدون پروبیوتیک و ۲۵ و ۵۰ درصد کلزا همراه با پروبیوتیک وجود داشت (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به جمعیت میکروبی ایلئوم در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود افزودن پروبیوتیک باعث افزایش لاکتوباسیلوس و کاهش اشریشیاکلی در جوجه‌های مصرف‌کننده می‌شود، تیمارهای حاوی ۲۵ درصد کنجاله کلزا همراه پروبیوتیک بیشترین جمعیت لاکتوباسیلوس و تیمارهای ۵۰ و ۷۵

جدول ۴- اثر تیمارهای مختلف بر جمعیت میکروبی ایلئوم در بلدرچین ژاپنی (log10 CFU/g)

تیمارها	لاکتوباسیلوس	اشریشیاکلی
جیره بر پایه ذرت- سویا (شاهد)	۷/۲۱ <sup>ab</sup>	۲/۶۸ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۲۵٪ سویا	۶/۹۲ <sup>ab</sup>	۲/۷۵ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۵۰٪ سویا	۶/۳۱ <sup>b</sup>	۳/۱۵ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۷۵٪ سویا	۶/۱۰ <sup>b</sup>	۳/۳۹ <sup>a</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۱۰۰٪ سویا	۷/۰۱ <sup>ab</sup>	۳/۴۴ <sup>a</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۲۵٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۸/۶۹ <sup>a</sup>	۱/۸۱ <sup>b</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۵۰٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۷/۹۵ <sup>ab</sup>	۱/۹۶ <sup>b</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۷۵٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۷/۲۱ <sup>ab</sup>	۳/۰۱ <sup>ab</sup>
کنجاله کلزا جایگزین ۱۰۰٪ سویا + پروبیوتیک پروتکسین (mg/kg۲۰۰)	۶/۸۸ <sup>ab</sup>	۲/۸۵ <sup>ab</sup>
SEM	۰/۳۲	۰/۴۱
P-value	۰/۰۵۱	۰/۰۴۱

a-b-c: حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: انحراف معیار میانگین

### بحث و نتیجه‌گیری

نتیجه ظرفیت نگهداری آب و رنگ گوشت را تحت تأثیر قرار دهد. ثابت شده است که انقباض فیبرهای انقباضی ایجاد شده توسط اسیدپتیه پایین‌تر توانایی پیوند آب را کاهش داده و به دنبال آن ظرفیت نگهداری آب کم

کاهش pH پس از کشتار در بافت گوشت منجر به کاهش ظرفیت نگهداری آب و روشن‌تر شدن رنگ گوشت می‌شود همچنین pH می‌تواند ساختار میوفیبریل‌ها و در

## اثر استفاده‌ی کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و ...

گوشت در گروه‌های تغذیه شده با ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم همراه بود. در تحقیق دیگری گزارش شد که رژیم غذایی هیچ تأثیری بر pH گوشت جوجه‌ها نداشت و میزان اسیدیته گوشت در محدوده طبیعی بود (۲۵). این نتیجه نشان می‌دهد که گنجاندن کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا در رژیم غذایی خروس‌ها بر سطح گلیکوژن و در نتیجه pH گوشت تأثیر ندارد.

یکی از مهم‌ترین عواملی که برای ارزیابی تعیین ظرفیت حمل و سلامت روده مورد نیاز است، مطالعه ارتفاع پرز، عمق کریپت و حفظ یکپارچگی مخاط روده است (۲۶). بنابراین ارتفاع پرز و عمق کریپت‌ها در بافت روده در میزان کارایی جذب مؤثر است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کنجاله کلزا همراه با پروبیوتیک دارای اثرات مفید بر مورفولوژی روده در بلدرچین‌های گوشتی است، به این معنی که ارتفاع پرز به‌طور قابل توجهی افزایش یافت.

در آزمایشی، محققان افزایش در ایمنی و فعالیت سلول‌های مخاط روده را هنگام افزودن مولتی آنزیم به جیره‌های حاوی عناصر خوراکی نامتعارف گزارش کردند (۲۷). این ممکن است به دلیل قابلیت هضم بهتر عناصر تشکیل دهنده و افزایش در تجزیه ضد مغذی‌ها باشد، بنابراین تعداد مواد مغذی موجود برای رشد افزایش می‌یابد (۲۸).

به‌منظور تحریک رشد، تقویت سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری‌ها مواد افزودنی متعددی از جمله آنزیم‌ها، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها، اسیدهای آلی و گیاهان دارویی به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها به خوراک طیور افزوده می‌شوند (۲۹). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که به‌صورت انتخابی سبب تحریک فعالیت و متابولیسم باکتری‌های مفید موجود در انتهای دستگاه گوارش شده و از این طریق باعث تعادل جمعیت میکروبی در میزبان می‌شوند (۳۰). در پژوهشی دیگر گزارش شد که استفاده از پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس باعث افزایش طول پرز روده نسبت

می‌شود به‌طور کلی تیماری بهتر است که سبب افزایش ظرفیت نگهداری آب شود و وجود مکمل پروبیوتیک می‌تواند باعث بهبود کیفیت گوشت از طریق افزایش ظرفیت نگهداری آب و کاهش میزان مالون دی‌آلدئید گردد (۲۱).

اکسید شدن لیپیدها یکی از مکانیسم‌های اصلی است که بر کیفیت گوشت تأثیر گذاشته و سبب بدتر شدن رنگ، بافت و ارزش غذایی می‌شود. گوشت طیور سرشار از اسیدهای چرب غیر اشباع است که حساسیت گوشت را به اکسیداسیون بالا می‌برد. نتایج آزمایشات مختلف نشان می‌دهد که گوشتی که توانایی نگهداری آب را نداشته باشد برای فرایند کردن و پروسه‌های بعدی و استفاده به صورت تازه نامطلوب است (۲۲). مالون دی‌آلدئید (MDA) محصول نهایی اصلی از پراکسیداسیون لیپید می‌باشد و معمولاً برای تخمین میزان تخریب اکسیداتیو، استفاده می‌شود. اکسید شدن لیپیدها یکی از مکانیسم‌های اصلی است که بر کیفیت گوشت تأثیر گذاشته و سبب بدتر شدن رنگ بافت و ارزش غذایی می‌شود. مشخص شده است که pH شاخص مهمی برای کیفیت گوشت می‌باشد، چون که کاهش pH پس از کشتار ممکن است به دلیل داناتوره شدن پروتئین‌ها باشد که در نهایت منجر به کاهش ظرفیت نگهداری آب (whc)، روشن‌تر شدن رنگ گوشت می‌شود. کاهش توانایی بافت در نگهداری و ذخیره آب سبب می‌شود ارزش تغذیه‌ای گوشت از بین برود که این به میزان داناتوره شدن پروتئین‌ها در بافت‌ها بستگی دارد (۲۳).

برخی از محققان به این نتیجه رسیدند که جیره‌های حاوی ۲۰۰ گرم بر کیلوگرم کنجاله کلزا با گلوکوزینولات کم، هیچ اثر نامطلوبی بر کیفیت گوشت در جوجه‌های گوشتی ندارد (۲۴). در آزمایشی که توسط Mikulski و همکاران در سال ۲۰۱۲، بر روی بوقلمون انجام شد، نشان داده شد که افزایش محتوی کنجاله کلزا با گلوکوزینولات کم جیره‌ها با تغییرات نامطلوبی در ویژگی‌های عملکردی انتخابی گوشت از جمله افزایش قابل توجه در آب خروجی

به تیمار شاهد شد (۳۱). در تطابق با نتایج این پژوهش گزارش‌های بسیاری مبنی بر تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر بهبود عملکرد فراسنجه‌های مورفولوژیکی روده در بلدرچین و جوجه‌های گوشتی وجود دارد (۲۵، ۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵). نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاضر با نتایج بیان شده توسط Gunal و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت، در تحقیق مذکور استفاده از پروبیوتیک پروتکسین در جیره جوجه‌های گوشتی رأس سبب افزایش ارتفاع پرز در قسمت ایلئوم و ژژنوم در گروه مصرف‌کننده فلورومیسین شد. ملایی‌کندولوسی و همکاران در سال ۱۳۹۱ گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک ساکارومیسیس سرویسه در جیره جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸ سبب افزایش ارتفاع پرزها در ایلئوم و ژژنوم شد، اما با نتایج صابونی و همکاران (۱۳۹۰) منطبق نبود، آنها با استفاده از پروبیوتیک پریمالاک در جیره جوجه‌های گوشتی راس سویه ۳۰۸ تأثیری بر افزایش ارتفاع پرزهای قسمت ایلئوم مشاهده نکردند که احتمالاً به علت اختلاف پروبیوتیک‌های مورد استفاده می‌باشد.

استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی طیور باعث افزایش سنتر میزان اسیدهای چرب غیر اشباع در روده شده که تکثیر و توسعه سلول‌های روده را تحریک و باعث افزایش ارتفاع پرز می‌شود (۳۶). پروبیوتیک با تأثیر بر عمق کریپتو باعث بهبود آن و مهاجرت انتروسیت‌ها در طول پرز و افزایش طول پرزها می‌شوند که در نتیجه باعث بهبود ظرفیت هضمی در روده کوچک می‌شوند (۳۷). بیشترین ظرفیت هضم و حداکثر جذب به‌وسیله سطح لامینال وسیع و با پرزهای طویل و انتروسیت‌های بالغ حاصل می‌شود، که در جریان مهاجرت سلول‌های انتروسیت به سوی راس پرز، این سلول‌ها در زمان استفاده از پروبیوتیک در جیره طیور، در قسمت ژژنوم عمق کریپت نسبت به ایلئوم افزایش یافته ولی ارتفاع پرزها در قسمت ایلئوم بیشتر از ژژنوم می‌شود (۳۸).

استفاده از پروبیوتیک، نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در بخش دوازدهه و ایلئوم را به‌طور قابل

ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد (۲۵). تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها در افزایش ارتفاع پرزهای روده و فعال شدن عملکرد ویلی‌ها در جوجه‌های دریافت‌کننده جیره‌های مکمل شده با پروبیوتیک، گزارش شده است (۳۹).

مکمل‌سازی جیره‌ی جوجه گوشتی با پروبیوتیک‌ها سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در ارتفاع پرزهای قسمت ژژنوم روده‌ی باریک در ۴۲ روزگی دارد (۳۹، ۴۰). پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس بر افزایش ارتفاع ویلی‌های ژژنوم اثر نداشت ولی ارتفاع آنها را در دوازدهه و ایلئوم به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد (۴۱) بنابراین، ارتفاع زیاده‌تر پرزها شاخصی از عملکرد فعال ویلی‌های روده‌ای است (۴۲) و با افزایش ارتفاع ویلی عملکرد هضم و جذب مواد مغذی نیز به دلیل افزایش مساحت سطح جذب، بیان آنزیم‌های در سطوح پرزها و بهبود سیستم‌های حمل و نقل مواد مغذی، افزایش می‌یابد (۴۳) کوتاه شدن پرزها ممکن است منجر به جذب ضعیف مواد مغذی، افزایش ترشحات دستگاه گوارش و کاهش عملکرد شود (۴۴). در مقابل، افزایش ارتفاع و نسبت ارتفاع آنها به عمق کریپت به‌طور مستقیم با افزایش بازچرخ سلول‌های اپی‌تلیال بافت روده رابطه مستقیم دارد (۴۵).

اهمیت مطالعه میکروب‌های روده و مخاط، به دلیل نقش آنها در مکانیسم‌های دفاعی ایمنی میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، افزایش استفاده از تغذیه و مورفولوژی روده، که به‌طور مثبت بر عملکرد کلی پرندگان تأثیر می‌گذارد، می‌باشد (۲۸). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن پروبیوتیک اثر مفیدی بر میکروفلور ایلئوم و افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس (باکتری مفید) و کاهش جمعیت اشیریشیاکلی داشت.

محققان دیگر نیز گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک حاوی باکتری‌های زنده لاکتوباسیل در جیره جوجه‌های گوشتی، جمعیت لاکتوباسیل‌ها را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد در حالی که تأثیر معنی‌داری بر جمعیت کلی‌فرم‌ها در سکوم جوجه‌های گوشتی ندارد (۴۶). همچنین Kabir و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر

## اثر استفاده‌ی کنجاله کلزا به جای کنجاله سویا بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و ...

این طریق سبب کاهش در رشد پاتوژن‌ها و افزایش در شمار باکتری‌های مفید تولیدکننده لاکتات می‌شوند (۴۹).

افزودن باکتری‌های مفید همراه با الیگو ساکاریدهای غیر قابل هضم، pH دستگاه گوارش را کاهش داده و محیط را برای فعالیت باکتری‌های نامطلوب مانند سالمونلا و کلی‌باسیل‌ها که pH مطلوب برای فعالیت آنها حدود ۷ است، نامناسب می‌کنند و در نتیجه موجب کاهش وقوع اسهال شده و بهبود ضریب تبدیل غذایی و سرعت رشد در جوجه‌های گوشتی می‌شوند (۳۶).

در آزمایشی توسط Elbaz و همکاران در سال ۲۰۲۳ گزارش شد که جیره تخمیر شده تأثیر قابل توجهی بر جمعیت میکروبی دارد و تعداد کل لاکتوباسیل‌ها در سکوم جوجه‌های تغذیه شده با کنجاله کلزا تخمیر شده و کنجاله کلزا همراه پروبیوتیک به‌طور قابل توجهی بالاتر بود و در همین حال تعداد اشریشیاکلی کمتر از گروه‌هایی بود که با جیره پایه و یا کنجاله کلزا تغذیه شده بودند (۲۸).

در مجموع با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که با توجه به اثرات مثبت جایگزینی ۲۵ درصد کنجاله کلزا با کنجاله سویا و استفاده از پروبیوتیک پروتکسین بر کیفیت گوشت، مورفولوژی و جمعیت میکروبی ایلنوم بلدرچین ژاپنی می‌توان از این منبع پروتئینی قابل دسترس در جیره بلدرچین ژاپنی استفاده کرد.

باکتری‌های پروبیوتیکی را بر حذف باکتری‌های بیماری‌زا و تنظیم میکروفلور روده توسط اندازه‌گیری شمار کل باکتری‌های زنده و کل شمار لاکتوباسیلوس‌ها در نمونه‌هایی از چینه‌دان و سکوم مورد بررسی قرار دادند که نتایج آنها پدیده حذف رقابتی را نشان داد که در این حالت باکتری‌های پروبیوتیکی دارای اثر مهارکننده و محدودیت بر برخی از باکتری‌های غیر مفید بیماری‌زا در روده از طریق اتصال به فضای مفید درون روده می‌باشند. آنها همچنین نشان دادند جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پروبیوتیک‌ها دارای اثر ویژه‌ای در بافت‌های روده‌ای از جمله افزایش فعالیت میتوزی و افزایش اندازه هسته سلول‌های روده نسبت به گروه شاهد بودند (۴۷). نتایج تحقیقات دیگری نشان داد که استفاده از باسیلوس سوبتلیس به‌عنوان یک پروبیوتیک در جیره جوجه‌های گوشتی منجر به افزایش کلنی‌های لاکتوباسیل در ایلئوم، سکوم و مدفوع در مقایسه با گروه شاهد گردید، همچنین یک روند کاهشی نیز در کلنی‌های کلستریدیوم پرفریجنس در روده بزرگ و مدفوع مشاهده شد (۴۸).

پروبیوتیک‌ها به دلیل ویژگی ساختمانی به‌وسیله آنزیم‌های هضمی دستگاه گوارش هیدرولیز نمی‌شوند و در روده‌های کور تحت تأثیر آنزیم‌های باکتریایی تجزیه و تخمیر می‌شوند و در نهایت اسیدهای چرب فرار تولید می‌کنند که این اسیدهای چرب سبب کاهش pH شده و با تبدیل به فرم یونیزه در داخل سلول‌های باکتری‌های بیماری‌زا اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند و از

## References

- 1- Costa C.C, Goulart D.F, Figueiredo C.F, Oliveira S, Silva J.H.V. Economic and environmental impact of using exogenous enzymes on poultry feeding. *International Journal of Poultry Science*. 2008; 7: 311-314.
- 2- Patterson J.A, Burkholder K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*. 2003; 82: 627-631.
- 3- Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, Rambaud J.C. Fate and effects of some transiting mi-

croorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 1993; 74: 1-21.

4- Salminen S, Deighton M.A, Benno Y, Gorbach S.L. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Ed. by S. Salminen and A. von Wright). 1998; pp. 211-253.

5- Muir W.I, Bryden W.L, Husband A.J. Immunity, vaccination and the avian intestinal

tract. *Developmental and Comparative Immunology*. 2000; 24: 325-342.

**6- Pur M.M, Alishahi M, Ghotbeddin N.** Effects of dietary probiotic, *Lactobacillus casei* on some hematological and immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *International Journal of Biosciences*. 2015; 6(7): 29-33.

**7- Fuller, R.** probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 1989; 66: 365-378.

**8- Green A.A, Sainsbury D.W.B.** The role of probiotic in producing quality products. XV European symposium on the quality of poultry meat 9-12 September. 2001; kusadasi/Turkey, pp: 245-251.

**9- Honma N, Ohtani K, Kikuchi H.** On effect of lactic acid bacteria. part.II. clinical effect. *New. Med. Clin.* 1987; 36: 75.

**10- Middilli M, Tuncer S.D.** The effect of enzyme and probiotic supplementation to diets on broiler performance. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*. 2001; 895-903.

**11- Mohan B, Kadirvel R, Natarajan A, Bhaskaran M.** Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broiler. *British Poultry Science*. 1996; 37: 395-401.

**12- Yeo J, kim K.I.** Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Journal of Poultry Science*. 1997;76: 381-385.

**13- Langout P.** New additives for broiler chickens. *Feed Mix*. 2000; pp: 24-27.

**14- Renuka K.P, Venkateswarlu M, Ramachandra Naik A.T.** Effect of probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) on hematological parameters of *Catla catla*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014; 3(8): 326-335.

**15- Hashemipour H, Khaksar V, Kermanshahi H.** Application of probiotic on egg production and egg quality of chukar partridge. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10: 19244-19248. [In Persian]

**16- Khosravi A, Boldaji F, Dastar B, Hassani S.** The use of some feed additives as growth promoters in broilers nutrition. *International Journal of Poultry Science*. 2008; 7:1095-1099. [In Persian]

**17- National Research Council.** Nutrient Requirements of Poultry. 9th Revised Edition, National Academy Press. 1994; Washington, D C.

**18- Mehri M, Sabaghi V, Bagherzadeh-**

**Kasmani F.** *Mentha piperita* (peppermint) in growing Japanese quails diet: Serum biochemistry, meat quality, humoral immunity. *Animal Feed Science and Technology*. 2015; 206: 57-66.

**19- Guban J, Korver D.R, Allison G.E, Tannock G.W.** Relationship of dietary antimicrobial drug administration with broiler performance, decreased population levels of *Lactobacillus salivarius*, and reduced bile salt deconjugation in the ileum of broiler chickens. *Poultry Science*. 2006; 85: 2186-2194.

**20- SAS.** SAS User's Guide: Statistics. 9.1 Edition. 2004, SAS Institute Inc. Cary, NC.

**21- Mohammed A.A, Zaki R.S, Negm E.A, Mahmoud M.A, Cheng H.W.** Effects of dietary supplementation of a probiotic (*Bacillus subtilis*) on bone mass and meat quality of broiler chickens. *Poultry science*. 2021; 100(3): 1-11.

**22- Saenmahayak B, Singh M, Bilgili S.F, Hess J.B.** Influence of dietary supplementation with complexed zinc on meat quality and shelf life of broilers. *International journal of poultry science*. 2012; 11(1): 28-32.

**23- Briskey E.J, Wismer-Pedersn J.** Biochemistry of pork muscle structure. Rate of anaerobic glycolysis and temperature change versus the apparent structure of muscle tissue. *Journal of Food Science* .1962; 26: 297-395.

**24- Mushtaq T, Sarwar M, Ahmad G, Mirza M.A, Nawaz H, Mushtaq M.M, et al.** Influence of canola meal-based diets supplemented with exogenous enzyme and digestible lysine on performance, digestibility, carcass, and immune responses of broiler chickens. *Poultry Science*. 2007; 86: 2144-2151. [In Persian]

**25- Awad W.A, Ghareeb K, Abdel-Raheem S, Böhm J.** Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*. 2009; 88: 49-55.

**26- Chiang G, Lu W.Q, Piao X.S, Hu J.K, Gong L.M, Thacker P.A.** Effects of feeding solid-state fermented rapeseed meal on performance, nutrient digestibility, intestinal ecology and intestinal morphology of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2009; 23(2): 263-271.

**27- Montanhini Neto R, Ceccantini M.L, Fernandes J.I.M.** Immune response of broilers fed conventional and alternative diets containing multi-enzyme complex. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2013; 15: 223-231.

- 28- Elbaz A.M, El-Sheikh S.E, Abdel-Maksoud A. Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant state, ileal histomorphometry, and cecal ecology of broilers fed on fermented canola meal with and without exogenous enzymes. *Tropical Animal Health and Production*. 2023; 55(1): 46-57.
- 29- Windisch W, Schedle K, Plitzner Kroismayr A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Animal Science*. 2008; 86: 140-148.
- 30- Zhang A.W, Lee B.D, Lee S.K, Lee K.W, An G.H, Song K.B, et al. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science*. 2005; 84: 1015-1021.
- 31- Baurhoo B, Letellier A, Zhao X, Ruiz-Feria C.A. Cecal populations of Lactobacilli and Bifidobacteria and Escherichia coli after in vivo Escherichia coli challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligo-saccharides. *Poultry Science*. 2007; 86: 2509-2516.
- 32- Awad, W.A, Bohm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K, Ze-ntek J. Effect of addition of a probiotic micro organism to broiler diets contaminated with deoxyniva-lenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poultry Science*. 2006; 85: 974-979.
- 33- Samli H.E, Senkoylu N, Koc F, Kanter M, Agma A. Effects of Enterococcus faecium and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and microbiota. *Archives of Animal Nutrition*. 2007; 61: 42-49.
- 34- Houshmand M, Azhar K, Zulkifli I, Bejo M.H, Meiman-dipour A, Kamyab A. Effects of non-antibiotic feed additives on performance, tibial dyschondroplasia incidence and tibia characteristics of broilers fed low calcium diets. *Poultry Science*. 2012; 91: 393-401.
- 35- KhodambashiEmami N, Samie A, Rahmani H.R, Ruiz-Feria C.A. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 2012; 175: 57-64.
- 36- Jin L.Z, Abdullah Y, Jalaludin S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing lactobacillus cultures. *Poultry Science*. 1998; 7: 1259-1265.
- 37- Pelicano E.R.L, Souza P.A, Souza, H.B.A. Intestinal mucosa development in broiler chicken fed natural growth promoters. *Rev. Brasil. Cie.Avic*. 2005; 7: 287-94.
- 38- Samanya M, Yamauchi K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried bacillus subtilis var. natto. *Comp. Biochem. Physiol.* 2002; Part A. 133: 95-104.
- 39- Chichlowski M.W.J, Croom F.W, Edens R, MacBride C, Qiu L.R, Chiang R, et al. Micro-architecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, Primalac and salinomycin. *Poultry Science*. 2007; 86: 1121-1132.
- 40- Gunal M, Yayli G, Kara O, Karahan N, Sulak O. The effect of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science*. 2006; 5: 149-155.
- 41- Taheri H.R, Moravej H, Malakzadegan A, Tabandeh F, Zaghari M, Shivazad M, et al. Efficacy of Pedicoccus acid lactici-based probiotic on intestinal Coliforms and villus height, serum cholesterol level and performance of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9: 7564-7567. [In Persian]
- 42- Shamoto K, Yamauchi K. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different feeding procedures. *Poultry Science*. 2000; 79: 718-723.
- 43- Pluske J.R, Tompson M.J, Atwood C.S, Bird P.H, Williams I.H, Hartmann P.E. Maintenance of villus height and crypt depth and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. *British Journal Nutrition*. 1996; 76: 409-422.
- 44- Taherpour K, Moravej H, Shivazad M, Adibmoradi M, Yakhchali B. Effect of dietary probiotic, prebiotic and butyric acid glycerides on performance and serum composition in broiler chickens. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8: 2329-2334. [In Persian]
- 45- Fan Y, Croom J, Christensen V, Black B, Bird A, Daniel L, et al. Jejunal glucose uptake and oxygen consumption in turkey poult selected for rapid growth. *Poultry Science*. 1997; 76: 1738-1745.
- 46- Fajardo P, Pastrana L, Mendes I, Fucifios C, Guerra N.P. Effect of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid

bacteria on the performance and cecal microflora of broiler chickens. *The Scientific World Journal*. 2012; 1-9.

47- **Kabir S.M.L, Rahman M.M, Rahman M.B, Hossain M.Z, Akand M.S.I.** Viability of probiotics in balancing intestinal flora and effecting histological changes of crop and cecal tissues of broilers. *Biotechnology*. 2005; 4: 325330.

48- **Jeong J.S, Kim I.H.** Effect of *Bacillus sub-*

*tilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poultry Science*. 2014; 93: 3097–3103.

49- **Chichlowski M, Croom J, McBride B.D, Havenstein G.B, Koci M.D.** Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry (review). *International Journal of Poultry Science*. 2007; 6: 694-704.



## Effect of rapeseed meal instead of soybean meal on meat quality, morphology and ileum microbial population in Japanese quail

Mehdi Rashki<sup>1</sup>, Ghasem Jalilvand<sup>\* 2</sup>, Farzad Bagherzadeh kasmani<sup>3</sup>, Mahmoud Ghazaghi<sup>4</sup>, Aida Davari<sup>5</sup>

1- Ph.D. students, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

2,3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

4- Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

5- Assistant professor, Faculty of Veterinary, Zabol University, Zabol, Iran.

Receive: May 6, 2023; Revise: May 11, 2023; Accept: May 11, 2023

 10.22034/nfvm.2023.396116.1186  20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

This study investigated the effects of using rapeseed meal instead of soybean meal on meat quality, morphology, and ileum microbial population in Japanese quail using 675 Japanese quail in a completely randomized design with 9 treatments, 5 repetitions, and 15 quail per repetition. The treatments consisted of a control group fed with a corn and soybean meal-based diet without additives, as well as rapeseed meal replacing soybean meal at 25, 50, 75, and 100 percent both with and without protoxin probiotic (200 mg/kg) supplementation diets from 7 to 35 days of ages. Treatments without probiotics had no effect on quail meat pH and percentage of loss due to cooking and the rapeseed meal without probiotic had no effect on meat quality of quail ( $P>0.05$ ). The treatment fed with the control treatment and the 25% rapeseed meal treatment with probiotics had the highest percentage of water retention capacity, lower loss due to cooking and higher amount of lactobacillus counted ( $P<0.05$ ). The control treatments and 25% rapeseed meal had lower amount of malondialdehyde and 25, 50 % rapeseed meal treatments with probiotic had lower Escherichia coli count ( $P<0.05$ ). Also 25% rapeseed meal with probiotic treatment increase villi height and decrease crypt depth compare with other treatments ( $P<0.05$ ). In conclusion, this study suggests that inclusion of 25 % rapeseed meal instead of soybean meal with probiotic supplementation can positively affect meat quality, morphology, and microbial population in the ileum of Japanese quail we can use this available protein meal in the Japanese quail ration.

**Keywords:** Japanese quail, Protoxin probiotic, Soybean meal, Rapeseed meal



## ارزیابی میزان شیوع، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های *fljB* و *rfljB* سالمونلا تیپ‌موریوم در لبنیات صنعتی و سنتی

ابراهیم رحیمی<sup>۱\*</sup>، محمدامین حیدرزادی<sup>۲</sup>، نجمه واحد دهکردی<sup>۳</sup>

۱- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۳ تیر ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۶ مهر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۰ آبان ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.405215.1194



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

سالمونلا از پاتوژن‌های گرم‌منفی است که حضور آن در مواد غذایی سبب کاهش کیفیت تولید و رخداد گاستروانتریت در انسان می‌شود. شیوع سالمونلا در فراورده‌های لبنی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری از بحران‌های کنونی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع سالمونلا تیپ‌موریوم در لبنیات سنتی و صنعتی عرضه شده در شهرستان شهرکرد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها است. در این مطالعه تعداد ۱۴۰ نمونه از لبنیات سنتی و صنعتی مختلف جداسازی و در شرایط سترون به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی انتقال و نمونه‌ها جهت جداسازی باکتری توسط روش‌های استاندارد، مورد ارزیابی قرار گرفتند و مقاومت جدایه‌ها به روش Disk diffution انجام گرفت. نتایج نشان داد که از مجموع ۶۰ نمونه لبنیات صنعتی ۲ نمونه (۳/۳۳ درصد) و از ۸۰ نمونه لبنیات سنتی ۳۸ نمونه (۴۷/۵ درصد) به سالمونلا آلوده بودند که بیشترین آلودگی مربوط به کشک صنعتی (۶/۴۲ درصد) و سپس کره و پنیر سنتی (۵/۷۱ درصد) بود، همچنین بیشترین میزان مقاومت مربوط به سولفامتاکسازول (۷۱ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آموکسی‌کلاو (۵۰ درصد) بود. نتایج این مطالعه نشان داد که ردیابی باکتری به روش PCR نسبت به سایر روش‌های سنتی ارجحیت داشته و با توجه به رخداد بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی جهت درمان گاستروانتریت ناشی از سالمونلا، استفاده از آنتی‌بیوتیک جهت درمان باید به حداقل برسد.

**واژگان کلیدی:** لبنیات، سالمونلا، گاستروانتریت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شهرکرد

## مقدمه

شیر و فراورده‌های لبنی حاصل از آن، در میان غذاهای متعدد با منشأ حیوانی حائز اهمیت می‌باشند، بنابراین تضمین کیفیت بهداشت و ایجاد ایمنی غذایی برای این فرآورده‌ها امری ضروری بوده که فراهم‌کننده بهداشت و سلامت جامعه می‌باشد (۱).

مسمومیت‌ها و عفونت‌های باکتریایی ناشی از مواد غذایی منبع نگرانی برای کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. در اروپا، *سالمونلا* و کمپیلوباکتر مهم‌ترین علل بیماری‌های ناشی از غذا هستند. تعداد زیادی از محصولات غذایی مورد استفاده مردم از جمله گوشت، سبزیجات و محصولات لبنی هر روز در سراسر جهان مصرف می‌شوند که آلودگی آنها به پاتوژن‌ها، شایع است و اغلب باعث عفونت، مسمومیت، اسهال، استفراغ و مرگ و میر قابل توجهی می‌شود. *سالمونلا* یکی از این میکروارگانیسم‌های پاتوژن است. *سالمونلا* از باکتری‌های بیماری‌زا مشترک بین انسان و دام بوده که سبب بیماری سالمونلوز می‌شود و شایع‌ترین بیماری منتقله از طریق غذا گزارش شده است و آن را به یک مشکل جدی در حوزه بهداشت عمومی و مواد غذایی در سراسر جهان تبدیل کرده است (۲، ۳).

گونه‌های *سالمونلا* باسیل‌های گرم‌منفی، دارای تاژک هستند که دمای بهینه رشد آنها بین ۲۵ تا ۴۰ درجه بوده و از میکروارگانیسم‌های روده‌ای می‌باشند و متوسط Aw در آن ۰/۹۸ تا ۰/۹۵ است. این میکروارگانیسم به خشکی ضعیف بوده و برای رشد خود به آهن نیاز دارد. به همین دلیل در غذاهای دارای آهن رشد بیشتری داشته و سالانه ۹۳/۸ میلیون مورد گاستروانتریت را سبب می‌شود. در حال حاضر بیش از ۲۶۰۰ سرووار *سالمونلا* وجود دارد که *S. Enteritidis* و *S. Typhimurium* شایع‌ترین پاتوژن‌های غذایی هستند. شدت عفونت سالمونلایی به نوع سویه و وضعیت سلامت میزبان بستگی دارد. کودکان زیر ۵ سال، سالمندان و بزرگسالان دارای نقص ایمنی، بیشتر مستعد ابتلا به سالمونلوز هستند. علائم بیماری شامل اسهال،

استفراغ، گرفتگی عضلات شکم و به ندرت اسهال خونی است (۴، ۵).

به‌طور کلی، داده‌های اپیدمیولوژیک در مورد FBDs به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، به‌صورت دقیق در دست نیست. اما با این حال، سیستم نظارت بر شیوع بیماری‌های منتقله از غذا در ایالات متحده گزارش داده است که *سالمونلا*ی غیر تیفوئیدی تهاجمی در درجه اول مسئول بخش عمده‌ای از بیماری‌های گوارشی در محدوده سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۵ بوده است (۶، ۷)، لذا با توجه به اهمیت *سالمونلا*، هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان شیوع *سالمونلا* تیفی‌موریوم در لبنیات صنعتی و سنتی عرضه شده در شهرستان شهرکرد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه‌ها:** ۱۴۰ نمونه شامل ۶۰ نمونه لبنیات صنعتی و ۸۰ نمونه لبنیات سنتی شامل شیر گاو، شیر گوسفند، شیر بز، پنیر، ماست، دوغ و کره به‌صورت تصادفی در مدت دو ماه جمع‌آوری شد. همه نمونه‌ها در شیشه‌های استریل جمع‌آوری یا در بسته‌بندی اصلی خود با برچسب نگهداری شدند. این نمونه‌ها در سریع‌ترین زمان ممکن کنار فلاسک یخ جهت جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه جهت شناسایی مرسوم *سالمونلا* به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی انتقال داده شدند.

**جداسازی سالمونلا:** ابتدا ۲۵ گرم از نمونه لبنی با ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط لاکتوز براث مخلوط و به مدت ۲۴ تا ۴۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. مقدار یک میلی‌لیتر از نمونه غنی شده به ۱۰ میلی‌لیتر محیط سلنیت سیستین (Italy, liofilchem) و یک میلی‌لیتر از نمونه غنی شده به ۱۰ میلی‌لیتر محیط تتراتیونات براث (Italy, liofilchem) منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، از محیط سلنیت سیستین روی محیط‌های *سالمونلا*-شیگلا آگار،

(ایران) خریداری شد. پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای °C ۳۷، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید (۸).

### استخراج DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای

**پلیمراز:** استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های سالمونلا با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز لیتوانی و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. تمامی نمونه‌های DNA تا زمان انجام واکنش PCR در دمای °C ۲۰- نگهداری شدند. پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی جنس سالمونلا و ژن‌های *rfbJ* و *fljB* سالمونلا تیپ‌موریوم و برنامه دمایی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است (۹). جهت انجام تمامی واکنش‌های PCR از دستگاه Master cucle gradient (Eppendorf) استفاده شد.

بیسموت سولفیت آگار و بریلیانت گرین آگار (Italy, biofilchem) به صورت خطی کشت داده شد. به همین ترتیب از تتراتیونات، روی محیط‌های مذکور کشت انجام گرفت. بعد از ۲۴ ساعت تعداد دو یا بیشتر از پرگنه‌های تیپیک به صورت جداگانه در محیط‌های (Triple Sugar Iron) TSI و LIA (Lysine Iron Agar) منتقل و نتایج بر اساس دستورالعمل استاندارد مورد تفسیر قرار گرفت (۸).

### سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی: پس از جداسازی

نمونه‌های سالمونلا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین (۱۰µg)، پنی‌سیلین (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، تری متوپریم سولفامتوکسازول (۵µg) و آموکسی‌کلاو (۱۰µg) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت پادتن طب

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	شرایط دمایی واکنش
<i>invA</i>	F: GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA R: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC ۲۸۴	واسرشت اولیه در دمای °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه ۳۵ سیکل در °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه دمای اتصال °C ۵۶ به مدت ۳۰ ثانیه دمای باز شدن °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه دمای باز شدن نهایی °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه
<i>fljB</i>	F: ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC R: TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG ۵۲۶	واسرشت اولیه در دمای °C ۹۴ به مدت ۶ دقیقه ۳۵ سیکل در °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه دمای اتصال °C ۵۷ به مدت ۱ دقیقه دمای باز شدن °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه دمای باز شدن نهایی °C ۷۲ به مدت ۸ دقیقه
<i>rfbJ</i>	F: CCAGCACCGTTCCAACCTTGATAC R: GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA ۶۶۳	دمای باز شدن °C ۷۲ به مدت ۸ دقیقه

حدت بر پایه ضریب اطمینان ۰.۵ درصد انجام شد.

### نتایج

آزمایشات بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی نشان داد از مجموع ۱۴۰ نمونه لبنیات سنتی و صنعتی، در مجموع ۴۰ نمونه (۲۸/۵۷ درصد) به سالمونلا آلودگی داشتند که این میزان در شیر خام گاو ۲، شیر خام گوسفند ۴، شیر خام بز ۴، پنیر سنتی ۸، پنیر صنعتی ۲، ماست سنتی ۲، دوغ سنتی ۱، کره سنتی ۸ و در کشک سنتی ۹ مورد بود

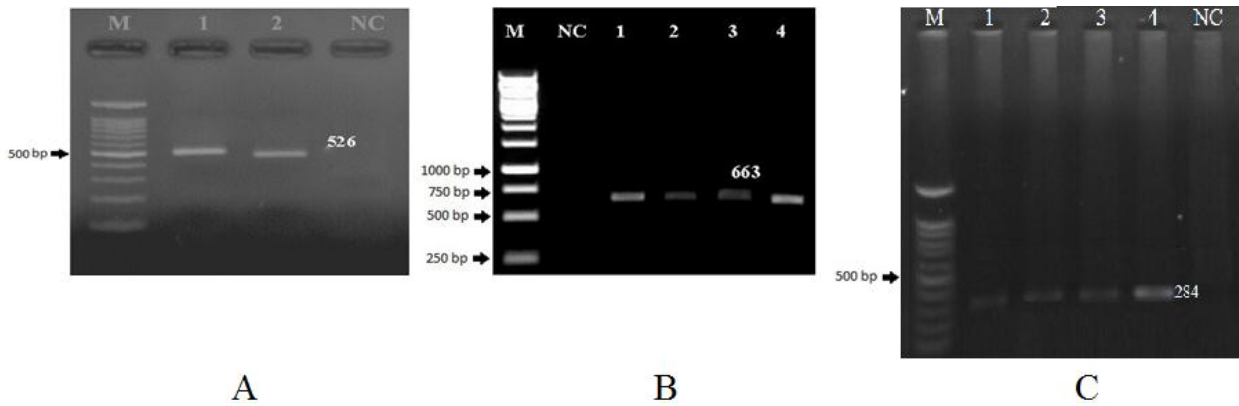
در نهایت بررسی محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و رنگ آمیزی DNA با رنگ سایبرگرین انجام شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مشاهده و مورد بررسی قرار گرفتند.

### بررسی آماری داده‌ها: داده‌های حاصل از این

مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و آزمون‌های آماری مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل شد و اختلاف آماری بین حضور و فراوانی سالمونلا و ژن‌های

داشتند. به طور کلی، از بین این ایزوله‌ها، چهار سرووار *سالمونلا* منحصراً به‌عنوان *سالمونلا* تیفی‌موریوم شناسایی شدند. PCR محصولاتی با اندازه ۲۸۴، ۵۲۶ و ۶۶۳ جفت باز مربوط به ژن‌های *invA*، *fljB* و *rfbJ* به ترتیب در تمام چهار سرووار *سالمونلا* تیفی‌موریوم تولید کرد (شکل ۱).

(جدول ۲). در این بین بیشترین میزان آلودگی در کشک سنتی با ۹ مورد (۶/۴۲ درصد) مشاهده گردید. همچنین در دوغ، کشک، کره و ماست صنعتی هیچ‌گونه آلودگی وجود نداشت. در بین محصولات صنعتی، پنیرهای صنعتی مورد آزمایش ۲ نمونه (۱/۴۲ درصد) به *سالمونلا* آلودگی



شکل ۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تشخیص ژن‌های حدت در *سالمونلا* تیفی‌موریوم جداسازی شده از فرآورده‌های لبنی، شکل A مربوط به ژن *rfbJ*، شکل B مربوط به ژن *fljB* و شکل C مربوط به ژن *invA* است.

جدول ۲- میزان آلودگی به *سالمونلا* در لبنیات سنتی و صنعتی شهرستان شهرکرد

نوع ماده غذایی	تعداد نمونه	میزان آلودگی به <i>سالمونلا</i> (%)	میزان آلودگی به <i>سالمونلا</i> تیفی‌موریوم (%)
شیر خام گاو	۱۰	۲ (۱/۴۲)	-
شیر پاستوریزه گاو	۱۰	۰ (۰)	-
شیر خام گوسفند	۱۰	۴ (۲/۸۵)	-
شیر خام بز	۱۰	۴ (۲/۸۵)	-
پنیر سنتی	۱۰	۸ (۵/۷۱)	-
پنیر صنعتی	۱۰	۲ (۱/۴۲)	-
ماست سنتی	۱۰	۲ (۱/۴۲)	-
ماست صنعتی	۱۰	۰ (۰)	-
دوغ سنتی	۱۰	۱ (۰/۷۱)	-
دوغ صنعتی	۱۰	۰ (۰)	-
کره سنتی	۱۰	۸ (۵/۷۱)	۲ (۱/۴۲)
کره صنعتی	۱۰	۰ (۰)	-
کشک سنتی	۱۰	۹ (۶/۴۲)	۲ (۱/۴۲)
کشک صنعتی	۱۰	۰ (۰)	-
جمع کل	۱۴۰	۴۰ (۲۸/۵۷)	۴ (۲/۸۵)
سطح معنی‌داری		۰/۰۰۱**	۰/۰۰۳*

\*: تفاوت آلودگی محصولات مختلف با احتمال ۹۵٪ معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). \*\*: تفاوت آلودگی محصولات مختلف با احتمال ۹۹٪ معنی‌دار است ( $p < 0.01$ ).

معنی‌داری بین وجود و عدم وجود *سالمونلا* در بین محصولات صنعتی و سنتی وجود دارد ( $p < 0.005$ ).

مطابق نتایج به‌دست آمده از جدول ۳ حاصل از آنالیزهای آماری، نشان داده شد که رابطه آماری

جدول ۳- میزان آلودگی به سالمونلا در لبنیات صنعتی و سنتی شهرستان شهرکرد

نوع محصول	تعداد	میزان آلودگی (%)	عدم آلودگی (%)
صنعتی (پاستوریزه)	۶۰	۲ (۳/۳۳)	۵۸ (۹۶/۶۶)
سنتی (غیر پاستوریزه)	۸۰	۳۸ (۴۷/۵)	۴۲ (۵۲/۵)

مقاومت نسبت به آموکسی‌کلاو با ۵۰ درصد مقاومت بود، که ارتباط معنی‌داری بین جدایه‌ها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود نداشت ( $P < 00/05$ ).

همچنین مطابق آنالیز داده‌های به دست آمده از سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی (جدول ۴)، مشخص شد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم سولفامتوکسازول با ۷۱ درصد و کمترین

جدول ۴- درصد مقاومت جدایه‌های سالمونلا به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	آمی‌سیلین	پنی‌سیلین	جنتامایسین	سولفامتوکسازول	آموکسی‌کلاو
باکتری	۶۰ درصد	۶۵ درصد	۶۳ درصد	۷۱ درصد	۵۰ درصد
سالمونلا					

که در همین راستا، در مطالعه Cavicchioli و همکاران (۲۰۱۵) بر روی ارزیابی آلودگی شیرهای عرضه شده در برزیل به سالمونلا دریافتند که از ۵۱ نمونه، ۲۷ نمونه (۵۲/۲۴ درصد) به سالمونلا آلودگی داشت که بیشتر از نتایج حاصل از تحقیق حاضر بود (۱۷). همچنین نتایج حاصل از تحقیق حاضر پائین‌تر از نتایج مطالعه Muhllherr و همکاران (۲۰۰۳) در سوئیس است (۱۸).

پنیر سفید ایرانی یکی از مهم‌ترین انواع پنیر است که در سطح وسیع و با مصرف بالا در کشور تولید و مصرف می‌شود که نسبت به شیر دارای میزان بالاتری از کلسیم می‌باشد (۱۹)، اما با توجه به مرطوب بودن، وجود نمک کم در برخی از انواع پنیرها و همچنین عدم حرارت‌دهی در برخی از مکان‌های تولید و عرضه پنیر سنتی، لذا این فرآورده به راحتی توسط میکروارگانیسم‌های پاتوژن دچار دگرگونی در خواص ارگانولپتیک شده و سبب ایجاد آلودگی می‌گردد. به‌علاوه پنیرهای سنتی از منابع بالقوه انتقال تب‌مالت حاصل از باکتری بروسلا و سل ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشند (۲۰). در همین راستا در مطالعه حاضر میزان آلودگی در پنیرهای سنتی و صنعتی به سالمونلا از مجموع ۲۰ نمونه، ۱۰ نمونه و در

## بحث و نتیجه‌گیری

شیر به دلیل وجود مواد مغذی، pH مناسب و شرایط اکسیداسیون و احیا (Eh)، بستر مطلوبی جهت رشد و نمو میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشد. در مطالعه حاضر، میزان آلودگی به شیر خام گاو به سالمونلا ۱/۴۲ درصد بود که با نتایج حاصل از تحقیقات Castaneda Salazar و همکاران (۲۰۲۱)، Garbaj و همکاران (۲۰۲۲)، Adzitey و همکاران (۲۰۲۰) و Bedassa و همکاران (۲۰۲۳) مطابقت دارد (۱۳-۱۰). شیر گوسفند به دلیل عدم دوشش به‌وسیله ماشین‌های شیردوشی و همچنین وجود پشم در ناحیه زیر شکم، بیشتر از گاو مستعد آلودگی به میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشد که در مطالعه حاضر ۲/۸۵ درصد از نمونه‌های شیر خام گوسفند به سالمونلا آلودگی داشتند که با نتایج حاصل از تحقیقات تاجبخش و همکاران (۲۰۱۴)، Lee و همکاران (۲۰۲۲) و Cetin و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد (۱۶-۱۴). در دهه گذشته، شیر بز عمدتاً به دلیل خواص تغذیه‌ای متمایز آن در مقایسه با شیر گاو مورد توجه مصرف‌کنندگان قرار گرفته است، به گونه‌ای که بار میکروبیولوژیکی آن برای تولیدکنندگان پنیر حاصل از شیر بز اهمیت بالایی دارد

مجموع ۵۰ درصد بود که با نتایج حاصل از تحقیقات دوستی و همکاران (۲۰۱۷)، Colac و همکاران (۲۰۰۷) و Trmcic و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشته و نشان‌دهنده ریسک بالای آلودگی میکروبی در این محصول است (۲۳-۲۱).

کره یکی از منابع تأمین‌کننده اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در انسان بوده و تأمین‌کننده انرژی روزانه می‌باشد؛ به گونه‌ای که فراوانی اسیدهای چرب غیر اشباع در آن به مصرف علوفه دام ارتباط دارد، لذا به هر میزانی که دام علوفه سبز و تازه مصرف کند، میزان اسیدهای چرب غیر اشباع در آن نیز بالا می‌رود. اسیدهای چرب به میزان اندکی دارای نقش بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم‌ها هستند اما میزان بازدارندگی آنها ناچیز ذکر شده است (۲۴). در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *سالمونلا* در کره‌های سنتی ۵/۷۱ درصد بود که این میزان آلودگی با نتایج حاصل از تحقیق Burnett و همکاران (۲۰۰۰) و Choki و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت و همسویی ندارد (۲۵، ۲۶)، در حالی که مطالعه اسلاملو و همکاران (۲۰۰۹) در ارومیه نشان از عدم وجود *سالمونلا* در کره را گزارش دادند (۲۷). آلودگی کره در مطالعه‌ی حاضر با تحقیق Li و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد (۲۸). به دلیل عدم وجود نهادهای نظارتی در تهیه کره‌های سنتی علاوه بر تقلب چشمگیر، میزان آلودگی‌های باکتریایی بالا در این محصول نیز دور از انتظار نخواهد بود.

کشک یکی از فرآورده‌های شیر به حساب می‌آید که دارای مقادیر زیادی پروتئین بوده و به ازای هر کیلو، ۴۳۰ میلی‌گرم کلسیم دارد (۲۹)، در نتیجه می‌توان از آن به‌عنوان یکی از منابع تأمین‌کننده کلسیم اشاره کرد که قاعدتاً این موضوع افرادی را سوق می‌دهد که جهت تأمین کلسیم مورد نیاز بدن خود به این منبع غذایی رجوع کنند، لذا سالم‌بودن آن از دیدگاه میکروبیولوژیکی حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر ۶/۴۲ درصد کشک‌های نمونه‌گیری شده سنتی دارای آلودگی به *سالمونلا* بودند که با نتایج حاصل از تحقیقات کلانتری و مهدوی (۲۰۱۵)

مبنی بر منفی بودن آلودگی نمونه‌ها به *سالمونلا* همخوانی ندارد (۳۰).

پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک یک تهدیدکننده سلامتی هستند. نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر در خصوص مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آمپی‌سیلین و جنتامایسین با مطالعه حیدرزادی و همکاران (۲۰۲۱) و Garbaj و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد (۸، ۱۱). در خصوص فراوانی ژن‌های *fljB* و *rfljB* در لبنیات نمونه‌گیری شده، مطالعه حاضر با مطالعات امینی و همکاران (۲۰۱۰)، Bisi Johnson و همکاران (۲۰۱۱) و Nashwa و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد (۳۳-۳۱).

نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که لبنیات صنعتی دارای شیوع پائین‌تر *سالمونلا* نسبت به لبنیات سنتی بودند، رعایت الزامات بهداشتی در طول فرآیند دوشش، نگهداری، حمل و نقل، ضد عفونی وسایل حمل و نقل، ضد عفونی وسایل دوشش، جلوگیری از ورود آب آلوده به شیر و همچنین عدم ارتباط خوراک ذخیره شده در سیلو و رعایت زنجیره سرما از زمان دوشش تا تحویل به کارخانه می‌تواند در کاهش آلودگی مدفوعی و در نتیجه آلودگی به پاتوژن‌هایی چون *سالمونلا* نقش قابل توجهی داشته باشد. با توجه به این که حداقل حرارت سالم‌سازی شیر ۷۲ تا ۷۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه برای از بین بردن کامل انواع *سالمونلا* کافی است لذا آلودگی فرآورده‌های لبنی سنتی به گونه‌های *سالمونلا* می‌تواند دلیل محکمی برای عدم سالم‌سازی حرارتی شیر قبل از تهیه فرآورده‌ها یا آلودگی در طول فرآیند تولید باشد. در انتها پیشنهاد می‌شود سالم‌سازی شیر قبل از تولید فرآورده‌های لبنی، رعایت اصول بهداشتی در طول ذخیره‌سازی و انتقال، همچنین سالم‌سازی وسایل شیردوشی، رعایت بهداشت در فرآیند تولید، بسته‌بندی مناسب، نگهداری در شرایط یخچال و سالم‌سازی شیر خام قبل از مصرف، رعایت اصول HACCP و GMP در کارخانه‌ها، عدم استفاده از شیرهای مشکوک به آلودگی بالا، رعایت بهداشت فردی دست‌اندرکاران و صدور کارت

حتی‌الامکان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل رخداد مقاومت ناشی از آنها علیه باکتری‌های گرم‌منفی را به حداقل رساند.

سلامت برای آنها می‌توانند از بروز عفونت‌های سالمونلایی در مصرف‌کنندگان جلوگیری کنند و در نهایت در صورت ابتلا به بیماری‌های گاستروانتریت، اسهال، تب و استفراغ،

## References

1- Rostami F, Rahimi E, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, Bagheri Moghadam M. Isolation and evaluation virulence factors of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* in milk and dairy products. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2014; 8(1): 54-6. [In Persian]

2- Jajere S.M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary world*. 2019; 12(4): 504.

3- Oladapo O.D, Onifade A.K, Bayode M.T. Direct detection of iro B, stn and hil A virulence genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium from non-ripened cheese. *Bulletin of the National Research Centre*. 2022; 46(1): 1-12.

4- Duong V.T, The H.C, Nhu T.D.H, Tuyen H.T, Campbell J.I, Minh P.V, et al. Genomic serotyping, clinical manifestations, and antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis* in hospitalized children in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of clinical microbiology*. 2020; 58(12): e01465-20.

5- Takkinsatian P, Silpskulsuk C, Prommalikit O. Clinical features and antibiotic susceptibility of *Salmonella gastroenteritis* in children: A ten-year review. *Medical Journal Malasia*. 2020; 75: 672-6.

6- Tseng C.F, Chiu N.C, Huang C.Y, Huang D.T.N, Chang L, Kung Y.H, et al. The epidemiology of non-typhoidal *Salmonella gastroenteritis* and *Campylobacter gastroenteritis* in pediatric inpatients in northern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2019; 52(3): 449-55.

7- Ehuwa O, Jaiswal A.K, Jaiswal S. *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods*. 2021; 10(5): 907.

8- Heidarzadi M.A, Rahnema M, Ali-poureskandani M, Saadati D, Afsharimoghadam A. *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Food Hygiene*. 2021;11(2(42)):81-90. [In Persian]

9- Emadi C.S, Hasanzadeh M, Bozorg M.M, Mirzaei S. Characterization of the *Salmonella* isolates from backyard chickens in north of Iran, by serotyping, multiplex PCR and antibiotic resistance analysis. 2009; 64 (2): 77-83. [In Persian]

10- Castañeda-Salazar R, del Pilar Pulido-Villamarín A, Ángel-Rodríguez G.L, Zafra-Alba C.A, Oliver-Espinosa O.J. Isolation and identification of *Salmonella* spp. in raw milk from dairy herds in Colombia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2021; 58: e172805-e.

11- Garbaj A.M, Gawella T.B.B, Sherif J.A, Naas H.T, Eshamah H.L, Azwai S.M, et al. Occurrence and antibiogram of multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from dairy products in Libya. *Veterinary World*. 2022; 15(5): 1185.

12- Adzitey F, Asiamah P, Boateng E. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* isolated from cow milk, milk products and hands of sellers in the Tamale Metropolis of Ghana. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 2020; 2 (1): 64-59.

13- Bedassa A, Nahusenay H, Asefa Z, Sisay T, Girmay G, Kovac J, et al. Prevalence and associated risk factors for *Salmonella enterica* contamination of cow milk and cottage cheese in Ethiopia. *International Journal of Food Contamination*. 2023.11 (1): 10-17.

14- Tajbakhsh F, Rahimi E, Tajbakhsh E. Isolation and identification of *Salmonella typhimurium* from raw cow, sheep and goat milk in Chahamaha Va Bakhteyari Province. *Food Hygiene*. 2014; 4(1): 47-55. [In Persian]

15- Lee J.I, Kim S.S, Park J.W, Kang D.H. Detection of *Salmonella enterica* serovar Montevideo in food products using specific PCR primers developed by comparative genomics. *LWT*. 2022; 165: 113677.

16- Cetin E, Temelli S, Eyigor A. *Salmonella* prevalence and serovar distribution in healthy slaughter sheep and cattle determined by ISO 6579 and VIDAS UP *Salmonella* methods. *Journal of*

*food science and technology*. 2019; 56(12): 5317-25.

**17- Cavicchioli V, Scatamburlo T, Yamazi A, Pieri F, Nero L.** Occurrence of Salmonella, Listeria monocytogenes, and enterotoxigenic Staphylococcus in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Dairy Science*. 2015; 98(12): 8386-90.

**18- Mühlherr J.E, Zweifel C, Corti S, Blanco J, Stephan R.** Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86(12): 3849-56.

**19- Irkin R.** Determination of microbial contamination sources for use in quality management of cheese industry: "Dil" cheese as an example. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2010; 5(1): 91-6.

**20- Kara R, Akkaya L.** Investigation of "Brucella abortus" and "Brucella melitensis" at Cheeses in Afyonkarahisar, Turkey. *British Journal of Dairy Sciences*. 2013; 3(1): 5-8.

**21- Doosti A, Doosti E, Rahimi E, Ghasemi-Dehkordi P.** Frequency of antimicrobial-resistant genes in Salmonella enteritidis isolated from traditional and industrial Iranian white cheeses. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: *Biological Sciences*. 2017; 87(1): 73-80. [In Persian]

**22- Colak H, Hampikyan H, Bingol E.B, Ulusoy B.** Prevalence of L. monocytogenes and Salmonella spp. in tulum cheese. *Food Control*. 2007; 18(5): 576-9.

**23- Trmčić A, Chauhan K, Kent DJ, Ralyea R.D, Martin N.H, Boor K.J, et al.** Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science*. 2016; 99(8): 6105-20.

**24- Kumar P, Lee J.H, Beyenal H, Lee J.** Fatty acids as antibiofilm and antivirulence agents. *Trends in microbiology*. 2020; 28(9): 753-68.

**25- Burnett S, Gehm E, Weissinger W, Beuchat L.** Survival of Salmonella in peanut butter and peanut butter spread. *Journal of applied microbiology*. 2000; 89(3): 472-7.

**26- Choki K, Zangmo S, Norbu P.T.** Microbial quality of traditionally produced butter and cheese (datshi). *Bhutan Journal of Animal Science*. 2021; 5(1): 1-7.

**27- Farrokh Eslamlo H, Hami M, Athari S.H, Haji Mohammadi B, Hosseini Jazani N.** The Evaluation of Contamination Rate with E.Coli, Staphylococcus Aureus, Listeria Monocytogenesis and Salmonella Sp. in Handmade Butters in Urmia City. *Nursing and Midwifery Journal*. 2009; 7(3): 10-17. [In Persian]

**28- Li H, Fu X, Bima Y, Koontz J, Megalis C, Yang F, et al.** Effect of the local microenvironment on survival and thermal inactivation of Salmonella in low-and intermediate-moisture multi-ingredient foods. *Journal of food protection*. 2014; 77(1): 67-74.

**29- Somroo A.A, ur Rehman K, Zheng L, Cai M, Xiao X, Hu S, et al.** Influence of Lactobacillus buchneri on soybean curd residue co-conversion by black soldier fly larvae (Hermetia illucens) for food and feedstock production. *Waste Management*. 2019; 86: 114-22.

**30- Kalantary R, Mahdavi S.** Isolation and Molecular Identification of Salmonella spp. from Local Dairy Products in Maragheh City in 2015 (Iran). *Qom Univ Med Sci J*. 2017; 11(10): 98-105. [In Persian]

**31- Amini K, Salehi T.Z, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei S.B.** Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. *African Journal of Microbiology Research*. 2010; 4(21): 2202-10. [In Persian]

**32- Bisi-Johnson M.A, Obi C.L, Vasaikar S.D, Baba K.A, Hattori T.** Molecular basis of virulence in clinical isolates of Escherichia coli and Salmonella species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut pathogens*. 2011; 3: 1-8.

**33- Nashwa M.H, Mahmoud A, Sami S.A.** Application of multiplex polymerase chain reaction (MPCR) for identification and characterization of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium. *Journal of Applied Sciences*. 2009; 5: 2343-8.



## Evaluation of prevalence rate, antibiotic resistance and frequency of *fljB* and *rfljB* genes of *Salmonella Typhimurium* in industrial and traditional dairies

Ebrahim Rahimi<sup>\*1</sup>, Mohammad amin heidarzadi<sup>2</sup>, Najmeh Vahed dehkordi<sup>3</sup>

1- Professor, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Ph.D. student in food hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

3- PhD student in food hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: July 4, 2023; Revise: October 18, 2023; Accept: November 11, 2023

 10.22034/nfvm.2024.405215.1194  20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

Salmonella is one of the gram-negative pathogens, whose presence in food reduces the quality of production and the occurrence of gastroenteritis in humans. The prevalence of salmonella in dairy products and the antibiotic resistance of this bacterium is one of the current crises. The purpose of this study is to investigate the prevalence of *Salmonella Typhimurium* and Enteritidis in traditional and industrial dairy products sold in Shahrekord city and the antibiotic resistance of the isolates. In this study, 140 samples from different traditional and industrial dairies were isolated and transferred to the food hygiene laboratory under sterile conditions, and the samples were evaluated for bacterial isolation by standard methods, and the resistance of the isolates was performed by disk diffusion method. The results showed that out of a total of 60 industrial dairy samples, 2 samples (3.33%) were contaminated and 38 samples (47.5%) out of 80 traditional dairy samples were contaminated with *Salmonella*, and the highest contamination was related to industrial curd (6.42%). And then there was traditional butter and cheese (71.5%); Also, the highest level of resistance was related to sulfamethoxazole (71%) and the lowest resistance was related to Amoxiclav (50%). The results of this study showed that the detection of bacteria by PCR method is preferable to other traditional methods and considering the high occurrence of antibiotic resistance for the treatment of gastroenteritis caused by salmonella, the use of antibiotics for treatment should be minimized.

**Keywords:** dairy, salmonella, gastroenteritis, antibiotic resistance, Shahrekord



## بررسی میزان آلودگی کمپیلوباکتریایی سگ‌ها و گربه‌های خانگی و صاحبان آنها

حسین عبدالله‌زاده<sup>۱</sup>، علی شریف‌زاده<sup>۲\*</sup>

۱- دانش‌آموخته، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.  
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۰۲ مرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۶ شهریور ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۷ شهریور ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2023.408540.1197



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

کمپیلوباکتر ژژونی عامل اصلی ایجاد بیماری کمپیلوباکتریوزیس در انسان و دام می‌باشد. حیوانات خانگی از جمله سگ و گربه، امکان دارد بدون علائم بالینی، ناقل آلودگی بوده و باکتری را از خود دفع نمایند. با توجه به افزایش روزافزون تمایل افراد برای نگهداری سگ و گربه در منزل، هدف از این تحقیق تعیین فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ‌ها و گربه‌های خانگی و صاحبان آنها بود. در این تحقیق ۱۲۲ نمونه مدفوع سگ و گربه‌های خانگی، صاحبان آنها و افراد غیر مرتبط با حیوانات خانگی با دو روش کشت میکروبی و PCR بررسی گردید. در روش میکروبیولوژی فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه و سگ به ترتیب ۸ و ۱۲ درصد و در روش مولکولی ۳۶ و ۴۴ درصد تعیین گردید. در صاحبان گربه‌ها و سگ‌های خانگی نیز هر چند در روش میکروبیولوژی مورد مثبتی مشاهده نگردید ولی در روش مولکولی، فراوانی آلودگی به ترتیب ۲۰ و ۳۲ درصد تعیین گردید و این در حالی است که آلودگی کمپیلوباکتریایی در افراد غیر مرتبط با سگ‌ها و گربه‌های خانگی هم در روش میکروبیولوژی و هم در روش مولکولی مشاهده نشد. شایع‌ترین گونه در همه موارد آلودگی کمپیلوباکتریایی اعم از سگ‌ها و گربه‌های خانگی و صاحبان آنها، کمپیلوباکتر ژژونی بود. نتایج آزمون مربع کای (تست پیرسون) ارتباط معنی‌داری بین آلودگی سگ‌ها و گربه‌های خانگی و آلودگی صاحبان آنها نشان داد ( $p < 0/01$ ). در نهایت به جهت فراوانی قابل توجه آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه‌ها و سگ‌های خانگی، و با نظر به نقشی که می‌توانند برای سلامت جوامع انسانی ایفا نمایند، انجام آزمایش‌های دوره‌ای اهمیت زیادی دارد.

واژگان کلیدی: کمپیلوباکتر، سگ، گربه، انسان

## مقدمه

کمپیلوباکتر، ارگانسمی کوچک و گرم منفی، ترموفیل، میکروآئروفیلیک، فاقد اسپور، منحنی یا ماریچی شکل شبیه حرف s و c به صورت تکی، دوتایی و یا به صورت دسته جمعی دیده می شود که ویژگی حرکت سریع و به شکل رفت و برگشت (چرخشی) را نیز دارد (۱). رایج ترین گونه های کمپیلوباکتر در منابع دامی و غذایی کمپیلوباکتر ژژونی، کولای، لاری و اپسنالیس است. بیماری ناشی از کمپیلوباکتر یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که پراکندگی وسیعی دارد. انتقال بسیاری از گونه های کمپیلوباکتر مدفوعی دهانی است (۲). در بیشتر موارد سگ ها و گربه ها ناقل کمپیلوباکتر می باشند. علائم بالینی کمپیلوباکتریوز غیر اختصاصی است و به شدت و میزان آلودگی بستگی دارد. نشانه های بالینی معمولاً در سگ های کمتر از ۶ ماه دیده می شود. حیوانات وقتی در معرض استرس ناشی از بستری شدن، بیماری همزمان، آبستنی، جابجایی یا جراحی قرار می گیرند، بیشتر مستعد ابتلا به بیماری می شوند. شدت اسهال کمپیلوباکتر متغیر و از یک مدفوع تقریباً آبکی تا یک اسهال خونی موکوسی دیده می شود (۳). همانند سگ ها، برخی گربه های مبتلا به کمپیلوباکتریوز نیز، از نظر بالینی سالم بوده و نشانه های بالینی در سن زیر شش ماه، بیشتر مشهود می باشد (۴). علی رغم اینکه گونه های کمپیلوباکتر به خشک شدن، غلظت بالای گاز اکسیژن و pH پایین (کمتر یا برابر ۴/۷) حساس هستند، آنها هنوز هم یکی از بزرگ ترین علل گاستروانتریت در انسان می باشند (۵).

سالمونلا، شیگلا و کمپیلوباکتر سه عامل اصلی گاستروانتریت های باکتریایی در سراسر دنیا می باشند که بر اساس آمارهای جهانی ۲ تا ۳۵ درصد این گونه گاستروانتریت ها ناشی از کمپیلوباکتر می باشد. در انسان به خصوص کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای شایع ترین گونه ها در ایجاد گاستروانتریت می باشد (۶). باکتری در تحقیقات مشابه از محصولات دام و طیور،

شیر خام، مدفوع مبتلایان به آنتریت و حتی اسپرم نیز جدا گردیده است (۷). در حیوانات خانگی، انتقال گونه های کمپیلوباکتر از طریق ارتباط مستقیم یا غیر مستقیم یا غذای خام یا منابع آلودگی پخته نشده و شیر غیر پاستوریزه، آب و یا ارتباط با مدفوع تازه حیوانات دیگر رخ می دهد (۸). انسان از راه های مختلف مانند آلوده شدن دست در اثر تماس با مدفوع حیوانات خانگی، خوردن آب، گوشت و محصولات لبنی آلوده و البته تماس های شغلی صورت می گیرد. آلودگی متقاطع مواد غذایی نیز عامل مهمی است که در آلودگی انسان نقش دارد (۹).

با توجه به اهمیت آلودگی کمپیلوباکتریایی از نظر بهداشتی و سلامت جوامع انسانی، تشخیص سریع و دقیق این آلودگی در بین حاملان این باکتری (از جمله سگ و گربه) ضروری بوده و به همین جهت این تحقیق با هدف ارزیابی میزان و نوع آلودگی کمپیلوباکتریایی در حیوانات خانگی و صاحبان آنها با دو روش کشت و مولکولی صورت پذیرفت.

## مواد و روش ها

در این بررسی که در آزمایشگاه میکروبی شناسی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد صورت پذیرفت، به روش تصادفی از ۱۲۲ نمونه مدفوع (۲۵ گربه خانگی، ۲۵ مورد صاحبان همان گربه ها، ۲۵ سگ خانگی و ۲۵ مورد صاحبان همان سگ ها و ۲۲ مورد افراد بدون ارتباط با سگ و گربه خانگی)، نمونه گیری صورت پذیرفت. اولویت تحقیق بر آن بود که حیوان و یا انسان مورد نظر، در یک ماه گذشته سابقه استفاده از آنتی بیوتیک را نداشته باشند. از هر نمونه حیوانی یا انسانی، ۲ سوپا اخذ گردید. یکی از سوپاها در میکروتیوب حاوی سرم فیزیولوژی برای بررسی مستقیم مولکولی و دیگری در محیط کشت انتقالی پرستون برات جهت بررسی میکروبی قرار گرفت. در روش میکروبی، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت انتقالی، به محیط campylobacter selective agar حاوی آنتی بیوتیک انتقال و به صورت خطی کشت گردید. هر دو محیط مایع و

## بررسی میزان آلودگی کمپیلوباکتریایی سگ‌ها و گربه‌های خانگی و صاحبان آنها

PCR برای تکثیر این ژن‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دوازده و نیم میکرولیتر مسترمیکس، نیم میکرولیتر از هر پرایمر (10mM)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و دو میکرولیتر از هر نمونه DNA انجام پذیرفت. از DNA استخراج شده جداپه‌های مشکوک به‌عنوان DNA الگو استفاده گردید. در تمام واکنش‌های PCR از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان استفاده گردید. برنامه‌های حرارتی در مورد ژن‌های مختلف متفاوت بود. در مورد ژن اختصاصی جنس و گونه، یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه صورت پذیرفت. برای بررسی و مشاهده محصولات PCR، از ژل آگارز ۱ درصد و اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

جامد، در جای مخصوص تحت شرایط میکروآنروفیلیک به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور حاوی ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پرگنه‌های مشکوک به کمپیلوباکتر (انجام آزمایش اکسیداز بر روی پرگنه‌های با اندازه متوسط) انتخاب و آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، رشد در دمای ۲۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. در روش مولکولی نیز در مورد سواب‌های مدفوعی اخذ شده، DNA مورد نیاز جهت آزمون مولکولی توسط کیت استخراج شرکت سیناژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام و تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری گردید. در آزمون مولکولی از آغازگرهای اختصاصی جنس کمپیلوباکتر و گونه‌های ژرونی و کولای استفاده گردید (۱۰).  
توالی آغازگرهای ژن‌های اختصاصی جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر در جدول ۱ ارایه شده است. مخلوط واکنش

جدول ۱- ژن هدف، توالی نوکلئوتیدی و اندازه محصول آغازگرهای مورد استفاده جهت تشخیص جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر (۱۰)

ژن هدف	جنس/گونه	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	اندازه محصول (bp)	شرکت سازنده آغازگر
SrRNA 16	Genus <i>campylobacter</i>	F:5'- GGATGACACTTTTCGGAGC -3' R: 5'- CATTGTAGCACGTGTGTC -3	۸۱۶	سیناژن
aspartokinase gene	<i>C. coli</i>	F:5'- GGTATGATTTCACAAAGCGAG-3 R: 5'- ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3	۵۰۲	سیناژن
Oxidoreductase	<i>C. jejuni</i>	F:5'- CAAATAAAGTTAGAGGTTAGAATGT-3' R:5'- CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3	۱۶۱	سیناژن

در مورد گربه و سگ ۳۶ و ۴۴ درصد تعیین گردید. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در گربه، آلودگی به گونه کمپیلوباکتر ژرونی ۴۴/۵ درصد، آلودگی همزمان به گونه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای ۳۳/۳ درصد و در ۲۲/۲ درصد، گونه‌های دیگر کمپیلوباکتر تشخیص داده شد. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در سگ، آلودگی به گونه کمپیلوباکتر ژرونی ۶۳/۶ درصد، آلودگی همزمان به گونه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای ۱۸/۲ درصد و ۱۸/۲ درصد نیز گونه‌های دیگر کمپیلوباکتر تشخیص داده شد. فراوانی

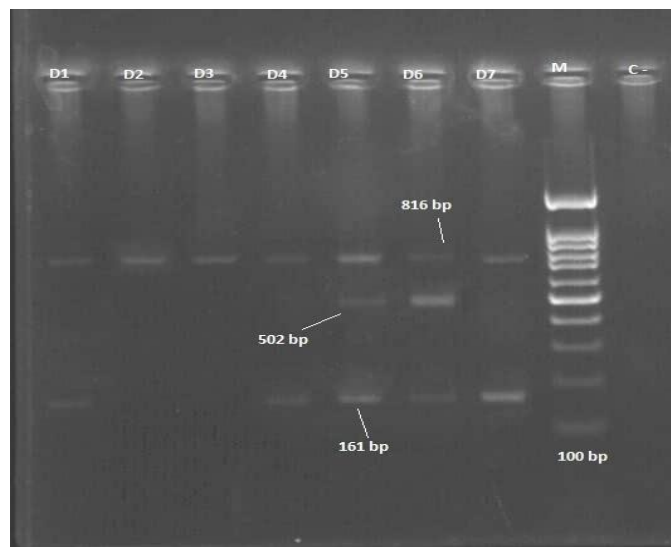
**تحلیل آماری داده‌ها:** نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۷ انجام گرفت. برای بررسی تعیین ارتباط بین آلودگی به کمپیلوباکتر و متغیرهای کیفی از آزمون آماری مربع کای و برای مقایسه قدرت یا توان معنی‌داری بین متغیرها و آلودگی از آزمون فی-کرامرز استفاده گردید.

### نتایج

در بررسی حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه و سگ، با استفاده از روش کشت، به‌ترتیب ۸ و ۱۲ درصد تعیین گردید. این فراوانی در روش PCR به‌ترتیب

گردید که ۸۷/۵ درصد افراد آلوده دارای سگ‌های آلوده نیز بودند. در میان موارد مثبت در صاحبان سگ‌های خانگی، گونه کمپیلوباکتر ژژونی ۷۵ درصد، آلودگی همزمان به گونه‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای ۱۲/۵ درصد و البته ۲۲/۲ درصد گونه‌های دیگر تشخیص داده شد. در ۲۲ نمونه از افراد غیر مرتبط با حیوانات خانگی نیز آلودگی به کمپیلوباکتر مشاهده نگردید.

آلودگی در صاحبان گربه‌های خانگی ۲۰ درصد تعیین گردید. لازم به ذکر است گربه‌های تمامی افراد آلوده، نیز آلوده به کمپیلوباکتر بودند. در میان موارد مثبت آلودگی در صاحبان گربه‌های خانگی در روش مولکولی، فراوانی گونه کمپیلوباکتر ژژونی ۶۰ درصد و سایر گونه‌های دیگر کمپیلوباکتر، ۴۰ درصد تشخیص داده شد. فراوانی آلودگی در صاحبان سگ‌های خانگی نیز ۳۲ درصد تعیین



تصویر ۱- تصویر Multiplex PCR ژن‌های جنس کمپیلوباکتر به همراه گونه‌های ژژونی و کولای: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون C: کنترل منفی، ستون‌های بعدی: قطعه ۸۱۶ جفت بازی مربوط به جنس کمپیلوباکتر و قطعات ۵۰۲ و ۱۶۱ جفت بازی گونه‌های کولای و ژژونی.

### بحث و نتیجه‌گیری

هر ساله، ۲ میلیون مورد مرگ به علت اسهال در دنیا اتفاق می‌افتد. این بیماری یکی از عوامل اصلی مرگ و میر به‌ویژه در کودکان می‌باشد که در مرحله حاد به از دست رفتن آب و الکترولیت و چنانچه مزمن شود باعث عقب افتادگی رشد و سوء تغذیه شده و ممکن است بیمار را به طرف سایر بیماری‌های عفونی سوق دهد (۱۱). کمپیلوباکتر، یک عامل شایع در بروز اسهال باکتریایی در دنیا محسوب می‌شود. مهم‌ترین گونه‌های بیماری‌زای کمپیلوباکتر در انسان شامل کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای می‌باشند. با توجه به افزایش روزافزون تمایل افراد برای نگهداری سگ و گربه در منزل، که به‌عنوان یکی از مخازن پاتوژن‌ها مطرح‌اند، افزایش زمینه

نتایج آزمون مربع کای (تست پیرسون) در گربه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین رده‌های سنی، نوع نگهداری، وضعیت دستگاه گوارش و آلودگی کمپیلوباکتریایی وجود دارد ( $p < 0/01$ ). در گربه ارتباط معنی‌داری بین نوع جنسیت، نژاد و آلودگی کمپیلوباکتریایی مشاهده نگردید ( $p < 0/01$ ). همچنین نتایج آزمون مربع کای (تست پیرسون) نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین سگ‌ها، گربه‌ها و صاحبان آنها از نظر آلودگی وجود دارد ( $p < 0/01$ ). برای مقایسه قدرت یا توان معنی‌داری بین متغیرهای آلودگی کمپیلوباکتریایی نیز از آزمون فی-کرامرز استفاده شد و مشخص گردید یک ارتباط بسیار قوی بین آلودگی سگ‌ها و گربه‌ها با صاحبان آنها از نظر آلودگی به کمپیلوباکتر وجود دارد.

## بررسی میزان آلودگی کمپیلوباکتریایی سگ‌ها و گربه‌های خانگی و صاحبان آنها

اطلاعات در خصوص شیوع عفونت‌های باکتریایی، از جمله کمپیلوباکتر برای اقدامات پیشگیرانه امری ضروری می‌باشد. زندگی کردن با سگ و گربه حامل باکتری کمپیلوباکتر به‌ویژه در یک محیط بسته، همچنین ارتباط مستقیم و عاطفی صاحبان حیوانات خانگی با حیوان خود و ارتباط با مدفوع حیوانات در محیط خانه از جمله عوامل مستعد کننده برای ابتلا به این آلودگی می‌باشند (۱۲).

حیوانات خانگی از جمله سگ و گربه، امکان دارد بدون علائم بالینی آلوده بوده، باکتری را از خود دفع نمایند یا برخی اوقات علائم بالینی مثل اسهال نیز در آنها وجود داشته باشد و به همین دلیل، تشخیص دقیق و سریع این حیوانات به دلیل انتقال به انسان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. تماس با حیوانات خانگی یکی از راه‌های انتقال این میکروارگانیسم است (۱۳). در بررسی حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه، با استفاده از دو روش کشت و PCR، به ترتیب ۸ و ۳۶ درصد تعیین گردید. در صاحبان این گربه‌ها، نیز فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی، ۲۰ درصد تعیین گردید. فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ نیز، با استفاده از دو روش کشت و PCR، به ترتیب ۱۲ و ۴۴ درصد مشاهده گردید. در صاحبان سگ‌های خانگی نیز فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی ۳۲ درصد تعیین گردید. در تحقیقات مشابه نیز فراوانی آلودگی در همین حدود برآورد گردیده است. محزونیه و همکاران در شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر در مدفوع سگ‌ها و گربه‌های به ظاهر سالم با استفاده از روش مولکولی، میزان ابتلا به این آلودگی را ۳۹ درصد گزارش نمودند (۱۴). محمدزاده و همکاران نیز در تحقیقی مشابه درصد آلودگی کمپیلوباکتریایی را در سگ‌های خانگی ۳۰ درصد بیان نمودند که از این میان، کمپیلوباکتر ژرژونی فراوانی بیشتری داشت (۱۵). مصلی نژاد و همکاران نیز با دو روش کشت و PCR در بین ۱۰۱ نمونه گربه، در کشت باکتریایی، تنها ۲ درصد و در روش PCR، ۳۷ درصد آلودگی به کمپیلوباکتر را تعیین نمودند (۱۰). همچنین در بررسی حاضر، ارتباط معنی‌داری بین

رده‌های سنی در گربه و آلودگی به کمپیلوباکتر مشاهده گردید. هرچند در سگ این ارتباط آماری معنی‌دار نبود ولی برخی از محققین دیگر نیز با تقسیم‌بندی رده‌های سنی به سه گروه ۳ تا ۱۲ ماه، ۱۲ تا ۲۴ ماه و ۲۴ ماه به بالا، بیان کردند که میزان آلودگی در سنین زیر ۲۴ ماه، بیشتر از بالای ۲۴ ماه می‌باشد و در این میان، میزان شیوع آلودگی در گروه سنی ۳ تا ۱۲ ماه از همه بالاتر می‌باشد (۱۶). از جمله دلایل این امر می‌توان به ضعف توله‌ها به‌صورت مادرزادی، عدم دسترسی به مادر پس از تولد (عدم خوردن آغوز) و تغذیه از شیر جایگزین‌شونده اشاره نمود. بروز علائم بیشتر در این گونه از حیوانات، می‌تواند به دلیل تولید نشدن میزان کافی از آنتی‌بادی‌های محافظت کننده در بدن باشد. همچنین در این تحقیق ارتباط آماری معناداری بین نوع نگهداری و آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه مشاهده گردید. هرچند این ارتباط در مورد سگ معنادار نبود ولی با نظر برخی محققین همخوان است به شکلی که مشاهده شده است حیواناتی که در مکان‌های متراکم و پناهگاه نگهداری می‌شوند، میزان بیشتری از آلودگی را نشان می‌دهند (۱۷). بدیهی است علت این امر می‌تواند به دلیل تراکم بالای حیوانات و افزایش ارتباط آنها با یکدیگر باشد که این عوامل منجر به انتقال سریع‌تر و بیشتر آلودگی در بین آنها گردد. اصولاً در پناهگاه‌ها و پانسیون‌ها به دلیل تراکم زیاد و معمولاً نبود توانایی مالی و رسیدگی درمانی خوب، انتشار آلودگی راحت‌تر صورت می‌گیرد. همچنین در تحقیق حاضر، یک ارتباط آماری معنادار بین دو متغیر وضعیت دستگاه گوارش و آلودگی کمپیلوباکتریایی در حیوانات مشاهده گردید و فراوانی نسبی موارد مثبت در سگ‌ها و گربه‌های مبتلا به اسهال بیشتر از سگ‌ها و گربه‌های به ظاهر سالم بود. همسو با این تحقیق برخی از محققین دیگر نیز بیان نمودند که میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در سگ‌های مبتلا به اسهال بیشتر از سگ‌های به‌ظاهر سالم می‌باشد که احتمالاً به دلیل بیمار بودن حیوان و دفع اجرام کمپیلوباکتر می‌باشد (۱۸)، البته

بحث عفونت‌های همزمان و ضعف سیستم ایمنی نیز مطرح می‌باشد. در موارد بروز بیماری‌های مختلف و عفونت، خوردن آشغال‌ها و ذره‌های ریز، پس‌مانده‌های غذایی، بلعیدن مواد غذایی، تغییر ناگهانی رژیم غذایی و بسیاری از عوامل دیگر، اسهال اتفاق می‌افتد که متعاقب آن بدن به تدریج ضعیف می‌گردد و این خود عامل بروز بسیاری از آلودگی‌های دیگر از جمله آلودگی به گونه‌های کمپیلوباکتر می‌باشد. همچنین در این تحقیق ارتباط آماری معناداری بین آلودگی سگ‌ها و گربه‌های خانگی با صاحبانشان مشاهده گردید به شکلی که تمامی گربه‌های آلوده دارای صاحبان آلوده و درصد قابل توجهی از سگ‌های آلوده نیز دارای صاحبان آلوده بودند. به هر حال به نظر می‌رسد عمده علت آن را می‌توان در مشترک بودن محل زندگی حیوان خانگی با صاحبش و آلوده کردن محیط توسط حیوان از طریق مدفوع و ارتباط مستقیم دهان حیوان با صورت صاحبش توضیح داد. همچنین در این مطالعه روش PCR درصد موارد آلودگی را بیش از روش کشت تشخیص داده است و در مجموع روش PCR از دقت بالاتری نسبت به روش کشت در این تحقیق برخوردار بوده است. کشت میکروبی مدفوع، نیاز به زمان طولانی دارد. این در حالی است که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زایی نظیر کمپیلوباکتر، سخت رشد و میکروآئروفیلیک می‌باشند. در روش کشت مدفوع، کافی نبودن نمونه و طولانی شدن زمان رسیدن آن به آزمایشگاه، می‌تواند در دقت و صحت نتایج آزمایشگاه مشکل‌آفرین باشد. در روش PCR، توانایی تشخیص عوامل عفونی، در مراحل ابتدایی بیماری و نیز به تعداد کم باکتری بستگی ندارد. این روش، دارای بیشترین دقت و سرعت پاسخگویی نسبت به روش‌های دیگر بوده و توانایی تعیین عوامل بیماری‌زا، تعیین جنس، گونه، تحت گونه میکروارگانیسم و بدون نیاز به آنتی‌بادی‌های متعدد و گران‌قیمت دارد. از آنجایی که کمپیلوباکتر در گروه

باکتری‌های سخت‌رشد قرار دارد و جداسازی باکتری از نمونه‌های شدیداً آلوده مثل مدفوع که دارای تعداد بی‌شماری باکتری‌های سریع‌الرشد هستند بسیار دشوار می‌باشد، روش‌های مولکولی بر پایه PCR می‌تواند جانشین روش‌های کشت در شناسایی کمپیلوباکتر، از نمونه‌های بالینی شود. روش‌های مولکولی برای تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر طی سال‌های اخیر توسعه یافته و هم‌اکنون از نظر تجاری قابل دسترسی هستند و مورد استفاده قرار می‌گیرند و به نظر می‌رسد روش‌های مولکولی می‌توانند جانشین روش‌های کشت در شناسایی کمپیلوباکتر، از نمونه‌های بالینی شوند. کمپیلوباکتر یکی از عوامل مهم بیماری‌زا بوده که گونه‌های متنوع آن از سگ‌ها و گربه‌های اسهالی و سالم از نظر بالینی جدا شده است. شدت بیماری به عوامل متعددی از جمله تعداد ارگانیسم‌های خورده شده توسط میزبان، در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و ظهور آنتی‌بادی محافظ در بدن دارد. به‌طور کلی حیوانات مقاوم‌تر بوده و در بسیاری از موارد، سگ‌ها و گربه‌ها، حاملین بدون علامت بوده و در زمان بروز استرس، به بیماری حساس‌تر خواهند بود. از آنجایی که در بسیاری از کشورهای اروپایی و آمریکایی و حتی در برخی از مناطق ایران بسیاری از مردم حداقل یک سگ را به‌عنوان حیوان خانگی خود نگهداری می‌کنند و در تماس مستقیم با آن هستند، همچنین این سگ‌ها با محیط اطراف خود از جمله حیوانات دیگر در کوچه و خیابان، پارک‌ها و بسیاری از مکان‌های دیگر در ارتباط بوده و برخی از آنها بنابر دلایل متعدد، دارای عادت کوپروفاژی هستند، احتمال آلودگی آنها بسیار بالا است و شانس انتقال آنها به صاحبان خود یا افراد مرتبط، از طریق خود حیوانات یا محیط پیرامون آنها وجود دارد. لذا انجام آزمایش کشت مدفوع یا استفاده از روش مولکولی به‌منظور تشخیص سریع آلودگی احتمالی و درمان به موقع ضروری می‌باشد.

## References

- 1- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Campylobacter*, *Arco-bacter* and *Helicobacter* species. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2013; 1(2): 335-343.
- 2- Acke E, Whyte P, Jones B.R, McGill K, Collinsand J.D, Fanning S. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in cats and dogs in two animal shelters in Ireland. *Veterinary Record*. 2006; 158(2): 51-54.
- 3- Mushi M, Tappe D, Seni J, Moremi N. Evaluation of detection methods for *Campylobacter* infections among underfives in Mwanza City, Tanzania. *pan African Medical Journal*. 2014; 19(392): 2-7.
- 4- Natsos G, Mouttotou N.K, Ahmad S, Kamran Z, Ioannidis A, Koutoulis K.C. The genus *Campylobacter*: detection and isolation methods, species identification & typing techniques. *Journal of the Hellenic veterinary medical society*. 2019; 70(1): 1327-1338.
- 5- Facciola A, Rioso R, Avventuroso E, Lagana P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. *Journal of preventive medicine and hygiene*. 2017; 58(2): 79-92.
- 6- Zenebe T, Zegeye N, Eguale T. Prevalence of campylobacter species in human, animal and food of animal origin and their antimicrobial susceptibility in ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2020; 19(61): 2-11.
- 7- weese J.S. Infectious diseases of the dog and cat, 3rd ed. Greene CE. Elsevier, St. Louis, Missouri, USA. 2007; 48(1): 75-76.
- 8- Bojanic K, Midwinter A, Marshall J, Biggs P, Acke E. Isolation of emerging *campylobacter* species in working farm dogs and their frozen home killed raw meat diets. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation*. 2019; 31(1): 23-32.
- 9- Kim S, Lee Y.M, Hwang I.G, Kang D.H, Woo G.J, Rhee M.S. Eight enrichment broths for the isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated suspensions and ground pork. *Lett Applied Microbiology*. 2009; 49(5): 620-626.
- 10- Mosallanejad B, Gharibi D, Avizeh R, Abbassi R. Isolation and characterization of *Campylobacter spp.* in feces of companion cats in Ah-vaz district by culture and PCR methods. *Iranian Veterinary Journal*. 2020; 16(1): 94-104. [In Persian]
- 11- Hashemzadeh Farhang H. Evaluation of the prevalence of intestinal protozoa in dogs of Tabriz city. *Veterinary Clinical Pathology*. 2018; 12(46): 105-111. [In Persian]
- 12- Nadalian M.G.h, Tajbakhsh H, Mokhber Dezfouli M.R, Akbarein H. A review of the most important Zoonoses with a special vision towards emerging and re-emerging diseases and its status in Iran. *Veterinary Clinical Pathology*. 2017; 11(43): 197-224. [In Persian]
- 13- Arainnejad M.R, Razmi G.R, Khoshnegah J. Molecular detection of canine *Leishmaniasis* using conjunctival swab and buffy coat samples. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016; 9(36): 275-283. [In Persian]
- 14- Mahzounieh M.R, Ghorbani M, Zahraii M.T. Identification of *campylobacter* species in feces of apparently healthy dogs and cats by mPCR. *Comparative pathobiology*. 2012; 10(4): 1101-1106. [In Persian]
- 15- Mohammadzadeh A, Hakimi R, Sharifi A, Ghorbani M. Investigation of *campylobacter* contamination of domestic dogs by PCR. *sanandaj veterinary journal*. 2012; 6(2): 25-31. [In Persian]
- 16- Holmberg M, Rosendal T, Engvall E.O, Ohlson A, Lindberg A. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in Swedish dogs and characterization of *C. jejuni* Isolates. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2015; 57(19): 1-8.
- 17- Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56 (11): 1467-1473.
- 18- Selwet M, Clapa T, Galbas M, Slomski R, porzucek F. The Prevalence of *Campylobacter spp.* and occurrence of virulence genes isolated from dogs. *Polish Journal of Microbiology*. 2015; 64(1): 73-76.



## The survey of *Campylobacter* infection of pets and their owners

Hossein Abdollahzadeh<sup>1</sup>, Ali Sharifzadeh<sup>2\*</sup>

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

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: July 24, 2023; Revise: September 17, 2023; Accept: September 18, 2023

 10.22034/nfvm.2023.408540.1197  20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

*Campylobacter* bacteria is the main cause of *campylobacteriosis* disease in human and animals. Pet animals include dogs and cats may be carriers of contamination and transmitted bacteria without clinical symptoms. Considering the increasing desire of people to keep dogs and cats at home, the purpose of this research was to determine the frequency of *campylobacter* infection in pets and their owners. In this research, 122 feces samples of pets and owners analyzed with microbial and molecular methods. In the microbial method, the frequency of *campylobacter* infection in cats and dogs was determined to be 8 and 12% respectively, and the molecular method, determined to be 36 and 44%. In the owners of pets, the frequency of infection was determined to be 20 and 32% respectively, while *campylobacter* infection was not observed in people unrelated to pets. *Campylobacter jejuni* was the most common species in all cases of *campylobacter* infection. The result of the chi square test (Pearson test) showed a significant relationship between the infection of pets and infection of their owners ( $p < 0.01$ ). Finally, due to the significant frequency of *campylobacter* infection in pets and considering the role they can play for the health of human societies periodic test of very important.

**Keywords:** *Campylobacter*, Dog, Cat, Human



دوره ۶، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۸۲-۷۴

## شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی عوامل باکتریایی ایجادکننده ورم پستان بالینی گاو در تبریز

سولماز اسرافیلی<sup>۱</sup>، مهدی قیامی راد<sup>۲\*</sup>، سیدامین موسوی آرا<sup>۳</sup>

- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.
- ۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.
- ۳- دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

دریافت مقاله: ۱۲ مرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۸ آبان ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۰ آبان ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.409226.1198



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

ورم پستان پرهزینه ترین بیماری تهدیدکننده صنعت پرورش گاو می باشد. این مطالعه توصیفی- مقطعی به منظور شناسایی عوامل باکتریایی ایجادکننده ورم پستان بالینی و تعیین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها در گاوهای شیری صنعتی در سطح شهرستان تبریز انجام شد. در این مطالعه ۲۳۴ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی، مورد بررسی قرار گرفتند. پس از نمونه گیری، جداسازی و تشخیص عوامل باکتریایی با استفاده از روش های متداول میکروبی شناسی و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها با استفاده از دیسک آنتی بیوتیک های مورد استفاده در سطح منطقه انجام شد. *شریشیاکلای* با ۱۸/۸ درصد و استافیلوکوکوس های کوآگولاز مثبت با ۱۷/۹ درصد بیشترین نقش را در ابتلا به ورم پستان در این مطالعه نشان دادند. استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی با ۱۲/۸ و باسیلوس ها با ۱۱/۹ درصد در رتبه بعدی بودند. *استرپتوکوکوکوس یوبریس* با ۱/۷ درصد، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، با ۰/۸۵ درصد، *تروپیرلا پیوژنز*، *کلبسیلا اکسی توکا*، *موراکسلا* و *پاستورلا هرکدام* با ۰/۴۲ درصد سایر جدایه ها را شامل می شدند. از ۸۰ نمونه مورد بررسی، باکتری جدا نشد. مقاومت بالا نسبت به اغلب آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در تمام جدایه ها مشاهده شد. جنتامایسین با ۸۳/۹۵ درصد حساسیت مؤثرترین و پنی سیلین با ۱/۲۳ درصد کم اثرترین آنتی بیوتیک شناخته شدند. جدایه های *شریشیاکلای*، استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی و باسیلاسه بیشترین حساسیت را به جنتامایسین و کمترین حساسیت را به پنی سیلین داشتند. کوتریموکسازول موثرترین و پنی سیلین کم اثرترین دارو علیه استافیلوکوکوس های کوآگولاز مثبت بودند. آنتی بیوگرام و انتخاب صحیح آنتی بیوتیک قبل از شروع به درمان، تأثیر زیادی در کاهش مقاومت میکروبی در موارد ورم پستان خواهد داشت.

**واژگان کلیدی:** ورم پستان بالینی گاو، عوامل باکتریایی، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

ورم پستان (Mastitis) به بروز پاسخ سیستم دفاعی پستان در برابر اجرام بیماری‌زا اطلاق می‌شود (۱). علائم کلینیکی آن ممکن است قابل مشاهده: ورم پستان بالینی یا غیرقابل مشاهده: ورم پستان تحت بالینی باشد (۲، ۳). علائم ورم پستان کلینیکی می‌تواند از یک التهاب فوق حاد تا یک بیماری مزمن متفاوت باشد. گرمی، درد، تورم و سفت شدن پستان، کاهش شیر، ظهور ترشحات، تغییر رنگ، وجود لخته و افزایش سلول‌های سوماتیک در شیر که باعث افت کیفیت شیر می‌شوند از جمله علائم ورم پستان بالینی در گاو می‌باشند (۱، ۴). ورم پستان هم در دوران شیرواری و هم در دوران خشکی دام را مبتلا می‌کند (۳).

ورم پستان بی‌شک مهم‌ترین چالشی است که صنعت پرورش گاو شیری با آن مواجه بوده و از این راه خسارت اقتصادی فراوانی به گاوداری‌ها و صنعت تولید لبنیات وارد می‌کند. از جمله‌ی این خسارات کاهش تولید و افت کیفیت شیر، هزینه‌های دارو و دامپزشکی، هزینه منابع تلف شده مثل حذف یا مرگ احتمالی دام، هزینه حذف شیر در دوره بیماری و تأثیر نامطلوب بر باروری حیوان می‌باشد (۵-۷).

در آمریکا سالیانه حدود یک میلیارد دلار خسارت به صنعت شیر در اثر بیماری ورم پستان وارد می‌شود (۱). از آمار خسارت در کشور ما اطلاعات دقیقی در دست نیست ولی در مطالعه بلورچی و همکارانش در سال ۱۳۸۵، خسارت ورم پستان تحت کلینیکی تقریباً ۴۲۰ میلیارد ریال تخمین زده شد (۸)، که با توجه به افزایش قیمت فراوده‌های لبنی و هزینه‌های جاری، این رقم در حال حاضر بالغ بر میلیاردها تومان خواهد بود. عوامل ایجادکننده ورم پستان گاو از

طریق مصرف شیر به انسان منتقل شده و می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌هایی مثل گلودرد استرپتوکوکی در انسان شود. همچنین در شیردوشی سنتی فرد شیردوش نیز می‌تواند آلودگی را از گاوها کسب نماید (۷، ۹).

طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی (*Staphylococci* Coagulase-negative)، استرپتوکوکوس‌ها خصوصاً استرپتوکوکوس آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae*) و استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه (*Streptococcus dysgalactiae*)، کورینه باکتریوم بویس (*Corynebacterium bovis*)، بعضی از گونه‌های جنس مایکوپلاسما (*Mycoplasma* spp)، برخی از باکتری‌های خانواده آنتروباکتریاسه از جمله اشریشیاکلا (*E. coli*)، کلبسیلا نومونیا (*Klebsiella pneumoniae*) و کلبسیلا اکسی‌توکا (*Klebsiella oxytoca*)، برخی گونه‌های پروتئوس (*Proteus*) و گونه‌هایی از جنس پاستورلا (*Pasteurella* spp)، مانهمیا همولیتیکا (*Mannheimia haemolytica*) سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و... می‌توانند در ایجاد ورم پستان نقش داشته باشند (۳، ۱۰، ۱۱، ۱۲). برای درمان ورم پستان باکتریایی پس از شناسایی عامل ایجادکننده بیماری باید آنتی‌بیوتیک مؤثر بر آن را تجویز کرد. میزان پاسخ به درمان به شناسایی دقیق عامل بیماری، سرعت شروع درمان و عواملی مثل تخلیه کارتیه مبتلا قبل از درمان بستگی دارد (۳-۵). پیدایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان ورم پستان را با چالش‌های عمده مواجه کرده است. این میکروارگانیسم‌های مقاوم به‌عنوان تهدیدی مهم برای حیات انسان به‌شمار

می‌روند (۱۳، ۱۴).

با توجه به اینکه برای اجرای برنامه کنترل ورم پستان داشتن اطلاعات در مورد عوامل مسبب و درمان آن لازم است و از طرف دیگر با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها از جمله باکتری‌های ایجادکننده ورم پستان در سال‌های اخیر و همچنین الگوی متفاوت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی، این مطالعه با هدف شناسایی باکتری‌های ایجادکننده ورم پستان بالینی در گاوداری‌های صنعتی اطراف تبریز و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، انجام پذیرفت.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی طی سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ از ۲۳۴ رأس گاو مبتلا به ورم پستان بالینی، در مجتمع‌های صنعتی پرورش گاو شیری در شهرستان تبریز نمونه‌برداری شد. بدین منظور پس از مشخص شدن گاو بیمار و کارتیه درگیر، پستان با آب تمیز شسته شده و خشک گردید. سپس به‌طور کامل سرپستانک و نوک آن با پنبه استریل آغشته به الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده و پس از تبخیر الکل و خشک شدن کامل کارتیه درگیر، ابتدا چند دوشش اول دور ریخته شد تا میکروب‌های موجود در کانال سرپستانک و نوک آن خارج شوند. سپس ۲۰-۱۰ میلی‌لیتر شیر با دوشیدن پستان و با زاویه ۴۵ درجه وارد لوله‌های استریل که از قبل تهیه شده بود، گردید (۱۵). پس از درج مشخصات نمونه شامل شماره گاو، کارتیه درگیر، تاریخ اخذ نمونه و نوبت بارداری، محل اخذ نمونه، نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد تبریز انتقال داده شدند. تمام نمونه‌ها از گاوهای در مرحله شیروراری اخذ شد و هیچ‌کدام از گاوها قبل از نمونه‌برداری آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند. در ادامه در آزمایشگاه تحت شرایط استریل به لوله‌های آزمایش منتقل و در ۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰

دقیقه سانتریفوژ گردید مایع رویی خارج و از رسوب به‌دست آمده از هر نمونه به‌صورت خطی در محیط‌های کشت، نوترینت آگار، بلاد آگار و پلیت کانت آگار (مرک آلمان) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. جهت خالص‌سازی از پلیت‌هایی که دو نوع کلنی رشد کرده بود مجدداً کشت به عمل آمد. جهت شناسایی و تعیین جنس و گونه باکتری‌های جدا شده طبق توصیه منابع معتبر میکروبی‌شناسی دامپزشکی از خصوصیات بیوشیمیایی و ظاهری کلنی‌ها و آزمایشات رنگ‌آمیزی گرم، کشت در محیط‌های اختصاصی، از جمله آگار خون‌دار (Blood Agar)، مانیتول سالت آگار، مک‌کانکی آگار، ائوزین متیلین بلو آگار (EMB)، محیط اختصاصی جداسازی *استریپتوکوکوس آگالاکتیه* TKT، محیط TSI و همچنین آزمایش‌های سیترات، DNase، کاتالاز، کوآگولاز، متیل رد و وژس پرسکوئر (MR-VP)، حساسیت به باسیتراسین و نوبیوسین، احیای نیترات، اندول، تولید  $H_2S$ ، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز اوره، آزمایش CAMP، حرکت، تخمیر قندها استفاده شد (۱۵، ۱۶).

پس از شناسایی جدایه‌ها برای تعیین حساسیت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی برای درمان ورم پستان در منطقه از روش انتشار از دیسک به روش کربی باوئر (Kirby & Bauer Disc diffusion Method) استفاده شد. به این منظور ابتدا از هر جدایه به‌صورت جداگانه سوسپانسیون میکروبی با کدورتی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه و سپس در سطح محیط مولر هینتون آگار به روش پخش یکنواخت، کشت داده شد. سپس با رعایت شرایط استریل دیسک‌های استاندارد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر در سطح محیط مذکور با فاصله ۲۰ میلی‌متر از هم قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بدین منظور از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام ساخت شرکت هندی هایمدیا شامل: پنی‌سیلین (Penicillin 10 Unit)، جنتامایسین (Gentamicin GM10)، سفیکسیم

(۱۸/۸ درصد جدایه‌ها)، ۴۲ مورد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (۱۷/۹ درصد)، شامل ۳۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس و ۴ جدایه استافیلوکوکوس اینترمدیوس، ۳۰ نمونه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (۱۲/۸ درصد جدایه‌ها)، شامل استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۱۴ مورد، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ۸ مورد، استافیلوکوکوس کاپرا (*Staphylococcus caprae*)، ۶ مورد و ۲ مورد استافیلوکوکوس کروموزن (*Staphylococcus chromogenes*)، ۲۸ جدایه از خانواده باسیلاسه (۱۱/۹ درصد جدایه‌ها) شامل باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس پانتوتنتیکوس (*B. pantothenicus*)، ۴ جدایه استرپتوکوکوس یوبریس (۱۷/۱ درصد) و دو جدایه استرپتوکوکوس آگالاکتیه (۸۵/۰ درصد) بودند. کلبسیلا اکسی‌توکا، تروپیرلا پایوژنز (*Trueperella pyogens*) که قبلاً آرکانو باکتر پایوژنز نامیده می‌شد، مورااکسلا، پاستورلا، هر کدام در یک نمونه (۴۲/۰ درصد جدایه‌ها) شناسایی شدند (جدول ۱). بیشترین موارد ورم پستان در آبستنی دوم و سوم دیده شد ( $P \leq 0.05$ ). شایان ذکر است متوسط ماندگاری گاو در مجتمع‌های مورد مطالعه ۵ شکم زایش می‌باشد. از نظر میزان ابتلا به ورم پستان در فصول مختلف سال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P \geq 0.05$ ).

Cefixime (CFM5)، سفتری‌اکسون (CRO 30)، Ceftriaxone، تایلوزین (TY 30)، تتراسایکلین (T30) Tetracycline، انروفلوکساسین (NFX50) Enrofloxacin و تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول (SXT 1.25/23.75) Trimethoprim/Sulphamethoxazole استفاده شد.

پس از طی زمان انکوباسیون، با استفاده از خط‌کش دقیق قطر هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌های مورد استفاده، بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شده و با استفاده از جدول استاندارد ارائه شده توسط شرکت سازنده دیسک‌های مذکور و استاندارد CLSI میزان حساسیت هر یک از جدایه‌ها، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر به صورت حساس (S)، نیمه‌حساس (I) و مقاوم (R) ثبت گردید (۱۷). آنالیز آماری و ارتباط یافته‌های پژوهش با متغیرهای تحت بررسی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون آماری مربع کای و سطح معنی‌داری  $P \leq 0.05$  انجام گرفت.

## نتایج

از ۲۳۴ نمونه اخذشده از گاوهای شیری آلوده به ورم پستان بالینی در این تحقیق نتیجه کشت باکتریایی ۸۰ نمونه (۳۴/۱۸ درصد) منفی بود. از ۴ نمونه دو نوع باکتری جداسازی شد. باکتری‌های جدا شده از موارد مثبت کشت، به ترتیب شامل: ۴۴ نمونه اشریشیاکلای

جدول ۱- تعداد و درصد باکتری‌های جدا شده از موارد ورم پستان گاو

باکتری‌های جدا شده	تعداد	درصد
عدم شناسایی باکتری	۸۰	۳۴/۱۸
اشریشیاکلای	۴۴	۱۸/۸
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۸	۱۶/۲
استافیلوکوکوس اینترمدیوس	۴	۱/۷
استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی	۳۰	۱۲/۸
گونه‌های باسیلوس	۲۸	۱۱/۹
استرپتوکوکوس یوبریس	۴	۱/۷
استرپتوکوکوس آگالاکتیه	۲	۰/۸۵
کلبسیلا اکسی‌توکا - تروپیرلا پایوژنز - پاستورلا - مورااکسلا	هر کدام یک نمونه	۰/۴۲

## شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل باکتریایی ایجادکننده ورم پستان ...

منفی تنها گروه حساس نسبت به داروی پنی‌سیلین بودند. مقاومت به جنتامایسین فقط در بین استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت و اشریشیاکلای دیده شد. نتایج حاصل از حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک در جدول ۲ نشان داده شده است. شایان ذکر است در مورد جدایه‌های سخت‌رشد و باکتری‌هایی که فقط یک مورد جداسازی وجود داشت آنتی‌بیوگرام صورت نگرفت.

باکتری‌های جدا شده بیشترین حساسیت را به ترتیب نسبت به جنتامایسین با (۸۳/۹۵ درصد موارد)، کوتریموکسازول (تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول) با (۸۱/۴۸ درصد)، انروفلوکساسین (۶۷/۹۰ درصد)، سفتریاکسون (۶۲/۲۰ درصد)، تتراسایکلین (۶۲/۹۶ درصد)، تایلوزین (۳۴/۵۷ درصد)، سیفیکسیم (۲۵/۹۲ درصد) و کمترین حساسیت را نسبت به پنی‌سیلین با (۱/۲۳ درصد) نشان دادند. استافیلوکوکوس‌های کواگولاز

جدول ۲- میزان حساسیت باکتری‌های اصلی جدا شده از موارد ورم پستان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به درصد و تعداد

میزان حساسیت (درصد) باکتری جدا شده	جنتامایسین	کوتریموکسازول	انروفلوکساسین	سفتریاکسون	تتراسایکلین	تایلوزین	سیفیکسیم	پنی‌سیلین
اشریشیاکلای	۹۳/۱ (۴۱)	۷۷/۲۷ (۳۴)	۷۷/۲۷ (۳۴)	۸۶/۳۶ (۳۸)	۴۰/۹ (۱۸)	۵۴/۵۴ (۲۱)	۶۳/۶۳ (۲۴)	۰ (۰)
استافیلوکوکوس اورئوس	۶۳/۱۵ (۲۴)	۸۱/۵ (۳۱)	۶۳/۱۵ (۲۴)	۷۱/۰۵ (۲۷)	۵۲/۶ (۲۰)	۷۱/۰۵ (۲۷)	۱۵/۷ (۵)	۰ (۰)
استافیلوکوکوس اینترمیدیوس	۷۵ (۳)	۷۵ (۳)	۵۰ (۲)	۷۵ (۳)	۵۰ (۲)	۵۰ (۲)	۰ (۰)	۰ (۰)
استافیلوکوکوس کاپره آ	۱۰۰ (۶)	۸۲/۳ (۵)	۵۰ (۳)	۵۰ (۳)	۵۰ (۳)	۶۶/۶۶ (۴)	۳۳/۳ (۳)	۱۶/۶ (۱)
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۱۰۰ (۱۴)	۸۵/۷ (۱۲)	۴۲/۸۵ (۶)	۵۰ (۷)	۶۴/۲۸ (۹)	۶۴/۲۸ (۹)	۲۸/۵ (۴)	۰ (۰)
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۱۰۰ (۸)	۸۷/۵ (۷)	۵۰ (۴)	۳۷/۵ (۳)	۵۰ (۴)	۷۵ (۶)	۰ (۰)	۰ (۰)
استافیلوکوکوس کرومونوس	۱۰۰ (۲)	۱۰۰ (۲)	۰ (۰)	۵۰ (۱)	۵۰ (۱)	۵۰ (۱)	۰ (۰)	۵۰ (۱)
باسیلوس سوبتیلیس	۱۰۰ (۱۴)	۱۰۰ (۱۴)	۷۱/۴ (۱۰)	۴۲/۸۵ (۶)	۸۵/۷۱ (۱۲)	۸۵/۷۱ (۱۲)	۱۴/۲۸ (۲)	۰ (۰)
باسیلوس سرئوس	۱۰۰ (۱۱)	۱۰۰ (۱۱)	۷۲/۷۲ (۸)	۴۵/۴۵ (۵)	۹۰/۹۰ (۱۰)	۹۰/۹۰ (۱۰)	۱۸/۱۸ (۲)	۰ (۰)
باسیلوس پانتوتنتیکوس	۱۰۰ (۳)	۱۰۰ (۳)	۷۵ (۲)	۵۰ (۲)	۱۰۰ (۳)	۱۰۰ (۳)	۰ (۰)	۰ (۰)
استرپتوکوکوس یوبریس	۱۰۰ (۴)	۵۰ (۲)	۵۰ (۲)	۵۰ (۲)	۵۰ (۲)	۵۰ (۲)	۰ (۰)	۰ (۰)

آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در ۲۳۴ نمونه شیر، گاوهای مبتلا به ورم پستان مورد مطالعه قرار گرفتند. باکتری‌های

### بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر با هدف شناسایی عوامل باکتریایی ایجادکننده ورم پستان بالینی گاو و تعیین حساسیت

ایجادکننده ورم پستان بالینی در این مطالعه با اکثر مطالعات انجام شده در سایر مناطق دنیا و مخصوصاً ایران، از جمله مطالعات محمد صادق در گرمسار در سال ۱۳۹۱ (۱۸)، مطالعه سال ۱۳۹۱ سالکی و همکاران در ایلام (۱)، دادخواه در سراب ۱۳۸۹ (۱۹)، فوفا Fufa و همکاران در اتیوپی ۲۰۱۳ (۱۲)، ماهانتش Mahantesh و همکاران در هندوستان (۲۱)، گرین Green و همکارانش در آمریکا (۲۲)، مالینوسکی Malinowski و همکارانش در مجارستان (۲۳) مطابقت داشته و نشانگر این موضوع است که عوامل باکتریایی ذکر شده نقش اصلی را در ایجاد ورم پستان در نقاط مختلف دنیا بازی می‌کنند. البته در فراوانی جدایه‌ها با برخی مطالعات تفاوت‌هایی وجود دارد به طوری که در مطالعه زکی‌زاده بیشترین باکتری جداشده از خانواده استرپتوکوکاسه و در مطالعه صادق‌پور و همکاران استافیلوکوکوس‌ها بود (۷، ۱۴). در مطالعه شکوهی و همکاران در کشت و صنعت پارس کورینه باکتریوم‌ها طیف غالب را در بین باکتری‌های جداشده از ورم پستان به خود اختصاص داده بودند (۲۳). در تحقیق انجام گرفته توسط Mbindyo و همکاران در کنیا استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی با ۴۲/۸ درصد و گونه‌های استرپتوکوکوس با ۲۲/۲ درصد شایع‌ترین عوامل ایجادکننده ورم پستان گزارش شدند (۲۴).

الگوی متفاوت باکتری‌های جداشده از موارد ورم پستان می‌تواند ناشی از تفاوت در حجم نمونه، دوره شیرواری (خشک یا دوشا)، حساسیت نژادی گاوهای تحت مطالعه (در مطالعه حاضر تمام نمونه‌ها از گاوهای هلشتاین اصیل جداسازی شده بود)، نحوه پرورش دام‌ها (سنتی یا صنعتی)، بهداشت دامداری‌های تحت مطالعه، نوع ورم پستان مورد مطالعه (بالینی یا تحت بالینی) باشد. بالا بودن میزان جداسازی/شیرشیاکلای در این مطالعه می‌تواند با بهداشت نامناسب هنگام شیردوشی و درجه آلودگی بستر نیز ارتباط داشته باشد. استافیلوکوکوس‌ها نیز علاوه بر منابع محیطی می‌توانند از کارگران ناقل به گاوها منتقل شوند که بهتر است در این خصوص مطالعات

مستقلی صورت پذیرد. در مورد آلودگی مشاهده شده به اعضاء خانواده باسیلاسه امکان آلودگی محیطی را نیز باید در نظر داشت. در طی تحقیق حاضر از ۸۰ نمونه اخذ شده باکتری جدا نشد. مطالعات مختلف نشان داده که تقریباً ۲۵ تا ۳۰ درصد نمونه‌های بالینی در کشت منفی هستند به طوری که در مطالعه زکی‌زاده و همکاران از ۶۰ درصد نمونه‌ها در مطالعه شکوهی و همکاران از ۳۰ درصد نمونه‌ها و در مطالعه Mbindyo و همکاران در کنیا از ۲۳/۷ درصد نمونه‌ها باکتری جداسازی نشده بود (۷، ۲۴، ۲۵). احتمال دارد بسیاری از این موارد در اثر عفونت‌های کلی‌فرمی باشد که توسط دفاع ایمنی گاو تحت کنترل در آمده باشند (۳، ۱۰)، همچنین ممکن است سایر اجرام ایجادکننده ورم پستان از جمله مخمرها، مایکوپلاسماها که در این مطالعه بررسی نشده‌اند نیز عامل مسبب ورم پستان بوده باشند. آسیب به نمونه در حین انتقال به آزمایشگاه و هر بار انجماد و ذوب کردن نمونه‌ها نیز باعث کاهش باکتری‌های جدا شده می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداشده در این مطالعه مؤید کاهش حساسیت تمامی باکتری‌های جداشده به پنی‌سیلین و حساسیت قابل قبول به جنتامایسین، کوتریماکسازول و سفتریاکسون بود. به طوری که باکتری‌های جداشده بیشترین حساسیت را به ترتیب نسبت به جنتامایسین با ۸۳/۹۵ درصد، کوتریموکسازول (۸۱/۴۸ درصد) و انروفلوکساسین (۶۷/۹۰ درصد)، و کمترین حساسیت را نسبت به پنی‌سیلین با ۰/۲۳ درصد موارد نشان دادند. استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی تنها گروه حساس نسبت به داروی پنی‌سیلین بودند نتایج این بخش از مطالعه با نتایج برخی مطالعات انجام شده از جمله مطالعات مالینوسکی و همکاران (۲۳) و شکوهی و همکاران (۲۴) همخوانی داشته و با برخی دیگر از مطالعات تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. به عنوان مثال در مطالعه صادق‌پور و همکاران بیشترین مقاومت به تایلوزین و استرپتومایسین و کمترین مقاومت به سیپروفلوکساسین

## شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل باکتریایی ایجادکننده ورم پستان ...

شکم اول گزارش شد (۲۵). در مطالعه زکی‌زاده و همکاران و همچنین تحقیق ایاره و میرزایی بیشترین میزان ابتلا در شکم پنجم گزارش شده است (۷). به‌طور کلی مطالعات نشان داده‌اند که با افزایش سن و شکم زایش میزان ابتلا به ورم پستان نیز افزایش می‌یابد (۳، ۵، ۷). با توجه به میزان بالای شیوع بیماری ورم پستان و خسارات قابل توجه بیماری به صنعت پرورش گاو شیری، بهبود مدیریت و به‌کاربردن روش‌های بهداشتی و مراقبت از پستان جهت کاهش موارد ورم پستان الزامی است. همچنین با توجه به تنوع و تفاوت در باکتری‌های ایجادکننده ورم پستان و تفاوت در الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، انجام تست‌های تشخیصی و آنتی‌بیوگرام پیش از شروع درمان، جهت درمان صحیح جزء الزامات می‌باشد.

*اشریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین نقش در ابتلا به ورم پستان کلینیکی را در این مطالعه نشان دادند. مقاومت بالای مشاهده شده در بین جدایه‌ها و احتمال انتقال این مقاومت به جوامع انسانی لزوم برقراری سیستم پایش و اطلاع‌رسانی در خصوص الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل ایجادکننده ورم پستان گاوی در هر منطقه به سبب کاهش ریسک ایجاد مقاومت میکروبی در بین باکتری‌ها را نشان می‌دهد.

**سپاسگزاری:** محققین بر خود لازم می‌دانند از آقای دکتر مسعود نیرومند به سبب همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها و مسئولین محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد تبریز که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

## References

- 1- Salaki K, Moradi H. Bacterial Agent of Mastitis in Dairy Cows Farms in Ilam City. *JIUMS*. 2011; 20(4): 88-95. [In Persian]
- 2- Pantoja J, Hulland C, Ruegg L. Dynamics of Somatic Cell Counts and Intra mammary Infections Across the Dry Period. *Prev Vet Med*. 2009; 1(90): 43-54.

و تترادلتا مشاهده شد (۱۵) به‌طورکلی افزایش مقاومت نسبت به برخی داروها از جمله پنی‌سیلین را می‌توان به استفاده مکرر و بی‌دلیل آنتی‌بیوتیک‌ها توسط دامداران نسبت داد.

اختلافات مشاهده شده در حساسیت باکتری‌های جداشده به آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان با الگوی متفاوت مصرف آنتی‌بیوتیک در درمان ورم پستان در مناطق جغرافیایی مختلف، مصرف خودسرانه دارو در سطح دامداری‌های منطقه، سطح بهداشتی دامپروری‌ها و همچنین کیفیت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در مطالعه در ارتباط دانست. ظهور و گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از معضلات مهم بهداشتی در سراسر جهان می‌باشد که احتمال دارد در اثر تماس با دام‌های آلوده یا مصرف فرآورده‌های حیوانات تحت درمان به جوامع انسانی گسترش یافته و مشکلات عدیده در درمان عفونت‌های میکروبی در انسان را باعث شوند (۱۰، ۱۶).

در این مطالعه از نظر میزان ابتلا به ورم پستان در فصول مختلف سال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P \geq 0.05$ ). اما برخی از محققین اعتقاد دارند میزان وقوع ورم پستان در بسترکتیف در زمستان افزایش می‌یابد (۱۰، ۱۸)، لذا توصیه می‌شود مطالعه در بازه زمانی طولانی‌تری تکرار گردد.

در تحقیق حاضر بیشترین میزان ورم پستان در زایش دوم و سوم و کمترین مورد در شکم اول مشاهده شد. در مطالعه والیمونت Vallimont و همکاران نیز بیشترین وقوع ورم پستان در شکم سوم تا پنجم و کمترین مورد در

- 3- Smith B.P, Van Metre D.C, Pasterla N. Large Animal Internal Medicine. 6<sup>th</sup> edition. 2019; USA. Elsevier; 1231-1310.

- 4- Rafeei barzaki M, Vand yousefi J, Ghods F, Agha tarahomi M. Studying the Prevalence of Bacterial Mastitis in Semnan. Province. *Pajouhesh va Sazandegi*. 1997; 34:110-111. [In Persian]

- 5- **Smith K.L, Todhunter D.A, Schonberger P.S.** Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J DAIRY SCI.* 1985; 68: 1531-1553.
- 6- **Losinger W.C.** Economic impacts of reduced milk production associated an increase in bulk-tank somatic cell count on US dairies. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 2005; 226: 1652-1658.
- 7- **Zakizadeh S, Saremi B, Rashid H, Najafi M, Savar Sofla S.** Factors Affecting Mastitis, the Frequency of Pathogens and Estimation of Genetic Parameters. *IJAS.* 2020; 11(4): 513-526. [In Persian]
- 8- **Bolourchi M, Mokhberdezfouli M.R., Kasravi R, Moghimi E.A, Hovareshti P.** An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herd in Iran. *IJVR.* 2008; 63: 263-266
- 9- **Gindonis V, Taponen S, Myllyniemi A.L, Pyorala S, Nykasenoja S, Salmenlinna S, et al.** Occurrence and characterization of methicillin resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. *Acta Vet.Scand.* 2013; 55(61): 2-8.
- 10- **Edmondson P, Blowey R.** The Veterinary Guide to Mastitis. *Intervet. 2001; UK.* Limited: 1-94.
- 11- **Fadlemlula A, Dughaym A.M, Mohamed G.E, Deib M.K, Zubaidy A.J.** Bovine Mastitis: Epidemiological, Clinical and Etiological Study in a Saudi Arabian Large Dairy Farm. *BJVM.* 2009; 12(3): 199-206.
- 12- **Fufa A, Gemechis F, Bekele M, Alemayehu R.** Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and bacterial isolation in small-holder dairy farms in Addis Ababa city, Ethiopia. *GV.* 2013; 10(6): 647-652.
- 13- **Beena A.K, Ranjini A.R, Riya T.G.** Isolation of psychrotrophic multiple drug resistant pseudomonas from pasteurized milk. *Vet World.* 2011; 4(8): 89-97.
- 14- **Sadeghpour M, Estabraghi E, Mokhtari A, Reihani S.** An Antibiotic Resistance Pattern and Microbial Agents Isolated from Raw Milk Samples from Acute and Sub-Acute Cases of Mastitis in Livestock. *Journal of Payavard Salamat.* 2018; 11(6): 650-659. [In Persian]
- 15- **Quinn P.J, Markey B.K, Leonard F.C, Fitzpatric E.S, Fanning S, Hartigan P.J.** Veterinary Microbiology and Microbial Disease. *Wiley-Black wel.* 2011: 179-263, 837-851.
- 16- **Mahon C.R, Lehman D.C Manuselis G.** Textbook of diagnostic microbiology. 2014 5th ed. USA: *Elsevier Health Sciences:* 762-96.
- 17- **Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI].** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Eleventh Informational Supplement, CLSI document M 100-S. 2016; 26 th Edition. Volume 36, Number 1. ISBN 1-56238-923-8 (Print). CLSI, 1908-1898, Pennsylvania, USA.
- 18- **Mohammadsadegh M, Askari Badouei M, Gorjidooz M, Daneshvar M, Koochakzadeh A.** A Study on the Clinical Mastitis of Holstein Cows on Garmsar Suburban Dairy Farms. *JVM.* 2012; 8(2): 137-148. [In Persian]
- 19- **Dadkhah M.** Prevalence of mastitis caused by bacteria of Enterobacteriaceae family (coliforms) and determination of their antibiotic susceptibility in traditional farms of Sarab city. *The First National Conference on Emerging Veterinary Diseases.* 2010; Islamic Azad University, Babol Branch.
- 20- **Mahantesh M.K, Basappa B.K.** Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Bovine Mastitis. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2011; 2(6): 229-235.
- 21- **Green M.J, Green L, Medley G, Schukken Y, Bradley A.** Influence of Dry Period Bacterial Intramammary Infection on Clinical Mastitis in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 2002; 85(10): 2589-2599.
- 22- **Malinowski E, Lassa H, Smulski S, Klosowska A, Kaczmarowski M.** Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Cows with Mastitis in 2006-2007. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2008; 52: 565-572.
- 23- **Shokohi M, Ahmadizadeh Ch, Kaveh A.** Evaluation of bacterial causes of subclinical mastitis in dairy cattle of Negine sabze Makoo agro-industrial and animal husbandry complex. *Vet. Clin. Pathol.* 2018; 11(44): 379-396. [In Persian]
- 24- **Mbindyo C.M, Gitao G.C, Mulei. C.H M.** Prevalence, Etiology, and Risk Factors of Mastitis in Dairy Cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. *Vet. Med. Int.* 2020.
- 25- **Vallimont, J.E, Dechow C.D, Sattler C.G, Clay J.S.** Heritability estimates associated with alternative definitions of mastitis and correlations with somatic cell score and yield. *J. Dairy Sci.* 2009; 92(7): 3402-3410.



## Identification and Determination of Antibiotic Resistance Pattern of Bacterial Agents that Causes Bovine Clinical Mastitis in Tabriz

Solmaz Esrafil<sup>1</sup>, Medi Ghiami Raad<sup>2\*</sup>, seyed Amin Mousavi Ara<sup>3</sup>

1- M.Sc Graduate in Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

2- Assistant professor, Department of Microbiology, Faculty of basic science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

3- DVM Graduate, faculty of veterinary, Orumiyeh Branch, Islamic Azad University, Orumiyeh, Iran.

Receive: August 3, 2023; Revise: November 9, 2023; Accept: November 11, 2023

 10.22034/nfvm.2024.409226.1198  20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

Mastitis is the costliest disease threatening the cattle breeding industry. This study was designed to identify the bacterial agents that causes clinical mastitis and antibiotic susceptibility of isolates in dairy cattle in agro industrial complexes in Tabriz, Iran. In this study, 234 milk samples were collected from cows with clinical mastitis. The isolates were identified by standard microbiological methods. Antibiotic susceptibility of isolated were performed by disc diffusion method using antibiotic discs, frequently used in veterinary medicine in the region. The most isolated bacteria were *Escherichia coli* with (18/8%) of isolates, followed by Coagulase positive staphylococci (17/9%), Coagulase negative staphylococci (12/8%), Bacillus species (11/9%), respectively. No bacterial agent was isolated from 80 samples. The *Escherichia coli* isolates had the highest susceptibility to Gentamicin (90%) and the lowest sensitivity to Penicillin (0%). This result was also true for isolates of Staphylococcus coagulase negative and isolated bacilli. Cotrimaxazole was the most effective (80.95%) and penicillin-less effective against coagulase-positive staphylococci. Gentamicin was found to be more effective antibiotic among all the tested antibiotics. The least sensitive antibiotic was Penicillin with 1/23% sensitivity. Coagulase negative staphylococcus was only sensitive group of isolates to penicillin. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed the most role in mastitis in this study. Resistance to antibiotics was observed in all isolates. Gentamicin with 83.95% sensitivity was the most effective and penicillin with 1/23% sensitivity was the least effective antibiotics. Antibigram and choosing the correct antibiotic before treatment will have a great effect on reducing microbial resistance in mastitis.

**Keywords:** Bovine Clinical Mastitis, Bacterial Agents, Antibiotic Resistance Pattern



## بررسی فراوانی ژن های *sitA*، *iutA* و *irp2* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در شهر تبریز در سال ۱۴۰۰

فرانک فیاض<sup>۱</sup>، سامان مهدوی<sup>۲\*</sup>

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.

دریافت مقاله: ۳۱ شهریور ۱۴۰۲، بازنگری: ۳۰ آبان ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۲ آذر ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.417467.1203



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

اشریشیاکلی یکی از مهم ترین میکروب های بیماری زا در طیور محسوب می شود. جدایه های اشریشیاکلی بیماری زای پرندگان قادر به بیماری زایی خارج از محیط روده می باشد. کلی باسیلوز یکی از بیماری های بسیار شایع در صنعت پرورش طیور می باشد که سالیانه موجب بروز خسارات اقتصادی زیادی می گردد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی فراوانی ژن های *sitA*، *iutA* و *irp2* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در شهر تبریز در سال ۱۴۰۰ بود. ۱۰۰ جدایه باکتری اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور با روش های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی به صورت فنوتیپی تعیین هویت شدند. سپس فراوانی ژن های *sitA*، *iutA* و *irp2* در این جدایه ها به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فراوانی ژن های *iutA*، *irp2* و *sitA* در باکتری های اشریشیاکلی مورد آزمایش به ترتیب ۸۸ درصد، ۸۴ درصد و ۶۶ درصد بود. همچنین ۵۲ درصد از جدایه های مورد آزمایش حاوی هر سه ژن مذکور بودند. هیچ نمونه منفی از نظر حضور ژن های مورد مطالعه مشاهده نشد. فراوانی بالای ژن های جذب آهن در باکتری های اشریشیاکلی مورد آزمایش در این تحقیق، ممکن است نشان دهنده حدت بالقوه بالای این جدایه ها باشد. بنابراین ضروری است تا مطالعات بیشتری انجام گیرد و اهمیت چنین احتمالاتی را در اپیدمیولوژی بیماری در طیور ارزیابی نماید.

**واژگان کلیدی:** اشریشیاکلی، ژن های جذب آهن، کلی باسیلوز طیور

## مقدمه

اشریشیاکلی بیماری‌زای خارج روده‌ای ExPEC (*Extraintestinal pathogenic Escherichia coli*) عامل ایجادکننده‌ی کلی‌باسیلوز در طیور و نیز عفونت‌های مختلف در انسان می‌باشد که از این جمله می‌توان به عفونت‌های دستگاه ادراری، مننژیت نوزادان و سپسیس اشاره کرد (۱). این سویه‌ها خسارت‌های اقتصادی زیادی ایجاد می‌کنند که هزینه‌های درمانی و افت بهره‌وری از این جمله می‌باشد (۲). جدایه‌های بیماری‌زای پرندگان، بیماری‌های مختلفی در طیور ایجاد می‌کنند. کلی‌باسیلوز رایج‌ترین عفونت باکتریایی در گله‌های طیور می‌باشد که خسارت‌های اقتصادی زیادی ایجاد می‌کند. اشریشیاکلی‌های بیماری‌زای پرندگان نقش مهمی به‌عنوان پاتوژن منتقله از راه خوراک بر عهده دارند و فراورده‌های طیور، منبع مناسبی از ExPEC از جمله جدایه‌های بیماری‌زا در انسان می‌باشند (۳). سویه‌های بیماری‌زای این باکتری جزء میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش بوده و در شرایط استرس محیطی و تضعیف سیستم ایمنی باعث ایجاد بیماری کلی‌باسیلوز می‌شوند. حدود ۱۵-۱۰ درصد از کلیفرم‌های روده مربوط به سروتیپ‌های بیماری‌زا هستند (۴، ۵). تا به امروز، سیستم‌های مختلف اکتساب آهن در اشریشیاکلی کشف شده است که نقش آنها به‌عنوان فاکتورهای حدت بیشتر در گروه ExPEC و کمتر در سویه‌های DEC (*Diarrheagenic E. coli*) مورد مطالعه قرار گرفته است (۶، ۷). سیدروفورها به‌عنوان عوامل جذب کننده آهن خارج سلولی از مواد معدنی یا ترکیبات آلی در شرایط فقدان آهن عمل می‌کنند. یکی از مهم‌ترین سیدروفورهای شناسایی شده در اشریشیاکلی، سیستم آئروباکتین می‌باشد. جذب کمپلکس فریک-آئروباکتین توسط گیرنده *iuta* غشاء خارجی انجام می‌شود (۸). ژن *iuta* در غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی از جمله اشریشیاکلی قرار دارند و با انتقال سیدروفور هیدروکسامات از پیرامون باکتری به فضای پری‌پلاسم، سبب انباشت و اتصال آنها به گیرنده‌های

پروتئینی پری‌پلاسمی می‌شوند (۹). محصولات حاصل از ژن *sita* در انتقال کاتیون‌های دو ظرفیتی خصوصاً آهن و منگنز نقش مؤثری دارند و به بقای باکتری کمک شایانی می‌نمایند (۱۰). ژن *irp2* (سیستم جذب آهن) تأثیر به‌سزایی در ایجاد بیماری‌زایی و حدت این باکتری دارد و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی این باکتری محسوب می‌گردد. *irp2* شایع‌ترین ژن کدکننده فاکتورهای حدت در ایزوله‌های اشریشیاکلی خارج روده‌ای جدا شده از عفونت دستگاه تناسلی می‌باشد (۱۰). از آنجایی که توانایی جذب آهن با بیماری‌زایی مرتبط است، بررسی ژنتیکی سیستم‌های جذب آهن می‌تواند برای غربالگری سویه‌های اشریشیاکلی بیماری‌زا از اهمیت زیادی برخوردار باشد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی فراوانی ژن‌های *sita* *iuta* و *irp2* در باکتری‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور در شهر تبریز در سال ۱۴۰۰ بود.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری و جداسازی نمونه‌ها:** در این تحقیق، ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی جمع‌آوری شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور بین ماه‌های فروردین تا آبان ۱۴۰۰ در شهر تبریز برای کار تحقیقی اخیر در نظر گرفته شد. بعد از کالبدگشائی طیور مبتلا و مشاهده علائم کلی سپتی‌سمی، در شرایط استریل، با سوآپ از ترشحات سطح بافت و با ایجاد شکاف با لوپ، قسمتی از بافت کبد و قلب در محیط مک‌کانکی آگار کشت داده شد. پس از ۲۴-۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های صاف لاکتوز مثبت انتخاب شده و پس از رنگ‌آمیزی باکتری‌ها به روش گرم، آزمایشات تکمیلی بیوشیمیایی جهت تأیید تشخیص فنوتیپی باکتری‌های اشریشیاکلی صورت گرفت که شامل موارد زیر بود: SIM، سیمون سیترات آگار، متیل رد (Methyl red) MR، وژ پروسکائر VP (Voges Proskauer)، TSI (Triple Sugar Iron agar) و اوره آگار (شرکت مرک، کشور آلمان) (۱۱).  
**استخراج DNA:** استخراج DNA ژنومی به روش

مشخصات و توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۱/۶ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۶ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۰/۳ میکرولیتر DNA (5U/μl) پلیمرز Taq و ۴ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. برنامه دمایی و زمانی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن‌های *sitA*، *iutA* و *irp2* در جدول ۲ آورده شده است. محصول PCR به مدت ۱ ساعت بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. سویه‌های اشریشیاکلی ۵۳۶، ۴۳۸۸۹ و ۲۵۹۲۲ به ترتیب به‌عنوان سویه‌های کنترل مثبت ژن‌های *iutA*، *sitA* و *irp2* استفاده شدند (۱۳). از آب دوبار تقطیر استریل نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جوشاندن انجام شد. استخراج DNA روی ۱۰۰ جدایه کشت شده اشریشیاکلی در محیط کشت قلب مغز (BHI) آگار (شرکت مرک، کشور آلمان) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. ۳-۵ کلنی از هر نمونه در لوله ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE استریل ریخته شد و با استفاده از شیکر کاملاً مخلوط شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد، به‌طوری که سطح آب جوش، دو سوم ویال‌ها را پوشش داد. در نهایت، ویال‌ها با دور ۹۰۰۰ g به مدت ۱۰-۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی ویال‌های حاوی DNA برای آزمایش PCR به اپندورف استریل منتقل شد (۱۲). بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه‌های نانودراپ و الکتروفورز بر روی آگارز ۱/۵ درصد انجام شد.

شناسایی مولکولی ژن‌های مورد مطالعه:

جدول ۱- توالی و ویژگی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های اشریشیاکلی

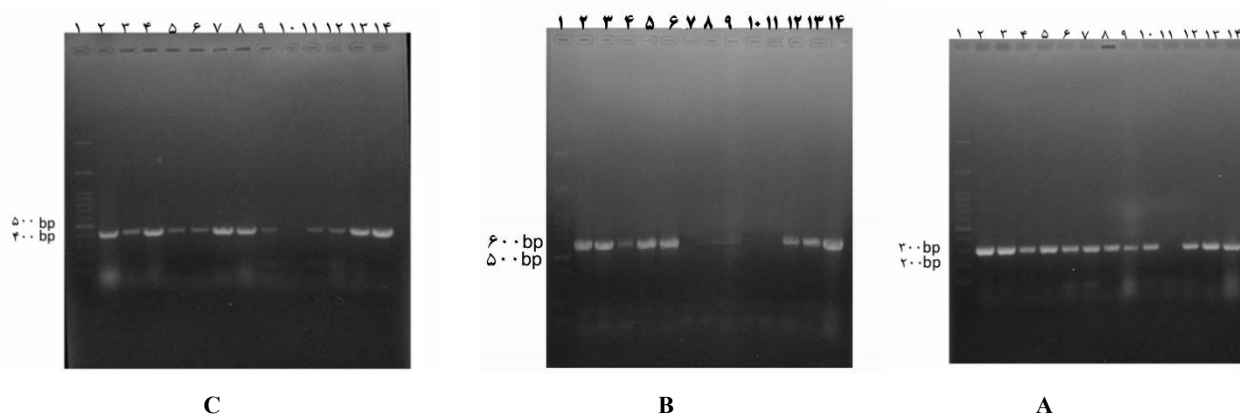
ژن	توالی (۳'→۵')	اندازه محصول (bp)	منبع
<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGGAAGCTG R: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	۳۰۲	۱۴
<i>sitA</i>	F: AGGGGGCACAAGCTGATTCTCG R: TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	۶۰۸	۱۵
<i>irp2</i>	F: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R: AACTCCTGATACAGGTGGC	۴۱۳	۱۶

جدول ۲- شرایط انجام PCR نمونه‌های اشریشیاکلی برای تکثیر ژن‌های مورد آزمایش

مرحله	تعداد چرخه	ژن مورد آزمایش زمان (دقیقه/ثانیه)	دما (سلسیوس)
<i>iutA/sitA/irp2</i>			
واسرشت اولیه	۱	۴/۴/۴	۹۴/۹۴/۹۴
واسرشت شدن	۳۰	۳۰/۳۰/۳۰	۹۴/۹۴/۹۴
اتصال پرایمرها		۳۰/۳۰/۳۰	۵۸/۵۸/۵۸
گسترش		۹۰/۹۰/۹۰	۷۲/۷۲/۷۲
گسترش نهایی	۱	۵/۵/۵	۷۲/۷۲/۷۲

## نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که در میان ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور، تعداد ۸۸ جدایه (۸۸ درصد) دارای ژن *iutA* (شکل ۱- A)، تعداد ۶۶ جدایه (۶۶ درصد) دارای ژن *sitA* (شکل ۱- B) و ۸۴ جدایه (۸۴ درصد) دارای ژن *irp2* (شکل ۱- C) بودند.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *iutA* (A)، *sitA* (B) و *irp2* (C) بر روی آگارز ۱/۵ درصد

جدول ۳- فراوانی ژن‌های مورد مطالعه و فراوانی با هم بودن این ژن‌ها در یک جدایه

ژن	تعداد جدایه‌ها	ترکیب ژن‌ها	تعداد جدایه‌ها
<i>iutA</i>	۸۸	<i>iutA+sitA</i>	۸
<i>sitA</i>	۶۶	<i>iutA+irp2</i>	۰
<i>irp2</i>	۸۴	<i>sitA+irp2</i>	۰
فاقد ژن حدت	۰	<i>iutA+sitA+irp2</i>	۵۲
جمع	۱۰۰		

از نظر گروه‌های (Uropathogenic *Escherichia coli*) سرمی و ژنوتیپ حدت وجود دارد این نظریه را تقویت می‌کند که طیور به‌عنوان حامل اشریشیاکلی‌های ایجادکننده عفونت ادراری مطرح می‌شوند (۱۹). نتایج تحقیق اخیر نشان داد که فراوانی ژن‌های *sitA* *iutA* و *irp2* در باکتری‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در شهر تبریز به ترتیب ۸۸ درصد، ۶۶ درصد و ۸۴ درصد بود. همچنین ۵۲ درصد از جدایه‌های مورد آزمایش، به‌طور همزمان دارای هر سه ژن مورد مذکور بودند. در تحقیقی گزارش شده است که فراوانی

## بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیاکلی‌های جدا شده از انسان و طیور را به ۴ گروه فیلوژنتیک تقسیم‌بندی می‌کنند (۱۷). هر گروه خصوصیات اکولوژی و حدت آن را بیان می‌کند. از این رو، آگاهی از هویت جمعیت باکتریایی در درک اپیدمیولوژی بیماری مهم می‌باشد. شواهد نشان می‌دهد که حدت یک جدایه ExPEC بیش از آن که به ساختار فیلوژنتیک آن مربوط باشد به ساختار اکولوژی آن ارتباط دارد (۱۸). شباهت‌هایی که بین جدایه‌های APEC (Avian UPEC) و Pathogenic *Escherichia coli* (UPEC)

ناشی می‌شود. در این تحقیق، فراوانی ژن های جذب آهن در جدایه های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور نشان می‌دهد که در این جدایه ها برای جذب آهن در شرایط کمبود آهن، ترکیبات کلاته کننده آهن نظیر سیدروفورها توسط باکتری ایجاد می‌شود. از طرف دیگر لازم به ذکر است که حضور ژن های جذب آهن در جدایه های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در این تحقیق به معنی بیان ژن های مذکور و بیماری زایی بیشتر آنها نیست. ضروری است مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد تا اهمیت بالینی این شاخصه های حدت را در میزبان ها ارزیابی نماید و مشخص نماید که طیور به عنوان منبع ژن های حدت در جوامع انسانی و بالعکس مطرح می‌باشند. فراوانی بالای ژن های *sitA* و *iutA* در باکتری های اشریشیاکلی مورد آزمایش در این تحقیق همانند اکثر مطالعات قبلی، می‌تواند نشان دهنده حدت بالقوه بالای این جدایه ها باشد. بنابراین مطالعات بیشتری باید صورت گیرد تا اهمیت عوامل حدت مورد مطالعه در بیماری زایی اشریشیاکلی جدا شده از طیور مشخص شود.

#### سپاسگزاری

از کلیه عزیزانی که در انجام این کار تحقیقی ما را یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ژن های *sitA* و *iutA* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در استان آذربایجان غربی به ترتیب ۸۴/۶ درصد و ۸۸/۵ درصد بود (۲۰). در مطالعه ای فراوانی ژن *iutA* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از کلی باسیلوز طیور ۶۷/۴ درصد گزارش شد (۲۱). در تحقیق دیگری گزارش شد که فراوانی ژن های *sitA*، *iutA* و *irp2* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور به ترتیب ۸۲/۲ درصد، ۸۴/۹ درصد و ۵۸/۸ درصد بود (۲۲). فراز و میرزایی (۱۳۹۹) گزارش کردند که ۵۸ درصد از باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت های ادراری انسان در شهر بروجرد حاوی ژن *irp2* بودند (۲۳). در مطالعه ای، فراوانی ژن های *sitA*، *iutA* و *irp2* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های اسهالی انسان در شهر مشهد به ترتیب ۹۵/۴۵ درصد، ۶۵/۹۱ درصد و ۹۷/۷۳ درصد گزارش شد (۲۴). تفاوت فراوانی ژن های *sitA* و *iutA*، *irp2* در جدایه های به دست آمده از موارد کلی باسیلوز طیور در این مطالعه نسبت به سایر مطالعات نشان دهنده اختلاف در پراکندگی ژن های حدت مذکور در بین سویه های مختلف اشریشیاکلی می‌باشد که این امر احتمالاً از تفاوت های جغرافیایی و نیز اختلاف در منشاء اکولوژیکی سویه های جدا شده (مواد غذایی، انسان و دام)

#### References

- 1- Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; 10(11): 916-932.
- 2- Russo T.A, Johnson J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 2003; 5(5): 449-456.
- 3- Johnson T.J, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson S.J, Rosenberger S.C, Nolan L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(12): 3987- 3996.
- 4- Akond M.A, Hassan S, Alam S, Shirin M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Am J Environ Sci.* 2009; 5(1): 47-52.
- 5- Dissanayake D.R, Wijewardana T.G, Gunawardena G.A, Poxton I.R. Distribution of lipopolysaccharide core types among avian pathogenic *Escherichia coli* in relation to the major phylogenetic groups. *Vet Microbiol.* 2008; 132(3-4): 355-363.
- 6- Gao Q, Wang X, Xu H, Xu Y, Ling J, Zhang D, et al. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection

model. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 143.

7- **Hajihosein-Tabrizi A, Habibi M, Tabasi M, Asadi Karam M.R.** Distribution of genes encoding iron uptake systems among the *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients of Iran. *J Med Microbiol Infect Dis.* 2018; 6(1): 25-30.

8- **De Lorenzo V, Neilands J.** Characterization of iucA and iucC genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1986; 167(1): 350-5.

9- **Hussein A.H, Ghanem I.A, Eid A.A, Ali M.A, Sherwood J.S, Li G, et al.** Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. *Avian Dis.* 2013; 57(3): 602-11.

10- **Martinez J, Cercenado E, Baquero F.** Aerobactin production and plasmid distribution in *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 1989; 60(1): 41-44.

11- **Hitchins A.D, Feng P, Watkins W.D, Rippey S.R, Chandler L.A.** Bacteriological Analytical Manual. 8<sup>th</sup> ed. USA: *FDA publication.* 1998, P: 68-104.

12- **Chen J, Su Z, Liu Y, Wang S, Dai X, Li Y, et al.** Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(6): 717-721.

13- **Schouler C, Schaeffer B, Brée A, Mora A, Dahbi G, Biet F, et al.** Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5): 1673-1678.

14- **Johnson J.R, Delavari P, O'Bryan T.T, Smith K.E, Tatini S.** Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999-2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 2005; 2(1): 38-49.

15- **Runyen-Janecky L.J, Reeves S.A, Gonzalez E.G, Payne S.M.** Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun.* 2003; 71(4): 1919-1928.

16- **Ewers C, JanBen T, Kießling S, Philipp H.C, Wieler L.H.** Rapid detection of virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia*

*coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 2005; 49(2): 269-73.

17- **Sabarinath A, Tiwari KP, Deallie C, Belot G, Vanpee G, Matthew V, et al.** Antimicrobial resistance and phylogenetic groups of commensal *Escherichia coli* isolates from healthy pigs in Grenada. *Webmed Central Veterinary Medicine.* 2011; 2(5): WMC001942.

18- **Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, et al.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(10): 3366-3376.

19- **Rodriguez-Siek K.E, Giddings C.W, Doetkott C, Johnson T.J, Fakhr M.K, Nolan L.K.** Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiol.* 2005; 151(6): 2097-2110.

20- **Ahmadi M, Dadashzadeh S, Ghaniei A.** Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates implicated in poultry colibacillosis and human urinary tract infection. *J Vet Microbiol.* 2019; 15(1): 109-118. [In Persian]

21- **Kafshdouzan K.h, Zahraei Salehi T, Nayeri Fasaei B, Madadgar O, Yamasaki Sh, Hinenoya A, et al.** Distribution of virulence associated genes in isolated *Escherichia coli* from avian colibacillosis. *Iran J Vet Med.* 2013; 7(1): 1-6.

22- **Rodriguez-siek K.E, Giddings C.W, Doetkott C, Johnson T.J, Nolan L.K.** Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res.* 2005; 36(2): 241-256.

23- **Faraz F, Mirzaei M.** The frequency of siderophores *irp2* and *iroN* encoding genes in *Escherichia coli* clinical isolates. *Journal of Isfahan Medical School.* 2020; 37(560): 1448-1453. [In persian]

24- **Imanpanah Z, Hashemi Tabar G.R, Askari Bedoui M, Ghazvini K.** Evaluation of genes encoding iron absorption systems in Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates isolated from diarrhea specimens. *Medical Journal of Mashad University of Medical Sciences.* 2023; 66(1): 132-137. [In Persian]



## Study of the frequency of *iutA*, *sitA* and *irp2* genes in *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis in Tabriz city in 2021

Faranak Fayyaz<sup>1</sup>, Saman Mahdavi<sup>2\*</sup>

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

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

Receive: September 22, 2023; Revise: November 21, 2023; Accept: November 23, 2023



10.22034/nfvm.2024.417467.1203



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

*Escherichia coli* is one of the most important pathogenic microbes in poultry. Avian pathogenic *Escherichia coli* isolates are capable of pathogenicity outside the intestinal environment. Colibacillosis is one of the most common diseases in the poultry industry, which causes a lot of economic losses every year. The aim of this research was to study of the frequency of *iutA*, *sitA* and *irp2* genes in *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis in Tabriz city in 2021. 100 samples of *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis were phenotypically identified by biochemical and staining methods. Then, the frequency of *sitA*, *iutA* and *irp2* genes in these isolates was investigated by molecular method. The results showed that the frequency of *iutA*, *irp2* and *sitA* genes in the tested *Escherichia coli* samples were 88%, 84% and 66%, respectively. Also, 52% of the tested isolates contained all three mentioned genes. No negative samples were observed in terms of the presence of studied genes. In this research, the high frequency of iron absorption genes in *Escherichia coli* samples tested may indicate the high potential virulence of these isolates. Therefore, it is necessary to conduct more studies and evaluate the importance of such possibilities in the epidemiology of the disease in poultry.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Iron absorption genes, Poultry colibacillosis



## اثرات ضد لیشمانیائی بنه کوهی گونه کردی بر لیشمانیا ماژور به روش درون تنی

امیر حبیبی<sup>۱</sup>، غزاله ادهمی<sup>۲\*</sup>، عبدالحسین دلیمی اصل<sup>۳</sup>، سوگل عاطفی<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

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

۳- استاد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

دریافت مقاله: ۰۶ تیر ۱۴۰۲، بازنگری: ۰۶ آذر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۶ آذر ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.403094.1193



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

لیشمانیا یک تک یاخته زئونوز است که باعث ایجاد مشکلاتی در بهداشت عمومی می شود. استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان به عنوان داروهای شیمیایی در درمان لیشمانیوز جلدی با محدودیت ها و عوارض مختلفی همراه است. امروزه عصاره های گیاهی و مشتقات آن منابع امیدوارکننده ای در طب گیاهی هستند. هدف از این مطالعه بررسی اثربخشی عصاره شیره درخت بنه (*Pistacia atlantica*) در استان کردستان بر روی پروماستیگوت های سویه استاندارد لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی و درون سلول های جانوری بود. در این مطالعه غلظت های ۵، ۲۵ و ۵۰ درصد عصاره شیره بنه به زخم های حاصل از پروماستیگوت های تلقیح شده ماژور اضافه شد. اثربخشی درمان با غلظت های مختلف عصاره بنه که بر روی زخم های القایی به قاعده دم موش های Balb/c با پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور کشت شده بود از نظر پیشرفت یا بهبود بیماری و بار انگلی کنترل شدند. طبق نتایج غلظت ۵۰ درصد عصاره بنه بیشترین اثر را در کاهش قطر زخم لیشمانیایی نشان داد. نتایج همچنین نشان داد که بین تعداد اماستیگوت های لیشمانیا ماژور در غلظت های مختلف عصاره و زمان مواجهه تفاوت معنی داری وجود دارد ( $P \leq 0/05$ ). نتایج نشان می دهد میانگین قطر زخم اندازه گیری شده با توجه به زمان های مختلف (هفته اول تا ششم) متفاوت بوده و تفاوت معنی داری از نظر میزان قطر زخم و زمان تأثیر بنه وجود دارد. همچنین با توجه به نتیجه بخشی تأثیر عصاره شیره بنه کردی شناسایی ماده مؤثره پیشنهاد می شود.

واژگان کلیدی: لیشمانیا، درون تنی، بنه کوهی

## مقدمه

لیشمانیازیس توسط گونه‌های متفاوتی از تک‌یاخته لیشمانیا، که توسط جنس ماده پشه فلبوتوموس (پشه خاکی) منتقل می‌شود، ایجاد می‌شود. این بیماری اخیراً در چهار قاره شایع شده و در ۸۸ کشور آندمیک می‌باشد که ۷۲ کشور آن جزء کشورهای در حال توسعه هستند. ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به این بیماری هستند (۸). لیشمانیا جلدی در ۹۸ کشور و ۵ قاره آندمیک است و بیشترین میزان ابتلا در کشورهای افغانستان، برزیل، ایران، الجزایر و سوریه می‌باشد (۳).

لیشمانیازیس گروهی از بیماری‌هاست که با نشانه‌های کلینیکی آشکار همراه می‌باشد. لیشمانیای جلدی، ابتدا به صورت ندول‌های کوچک جلدی تا زخم‌های جلدی گسترش می‌یابد (۴). این بیماری در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری شایع است. متأسفانه لیشمانیازیس به‌عنوان بیماری که به شدت مورد غفلت واقع شده، همچنان وجود دارد، مشخصه این بیماری نیاز به دوره درمان سخت، طولانی و ناکارآمد است که به داروهای شدیداً سمی و قدیمی وابسته می‌باشد (۲، ۱۴).

لیشمانیازیس به‌عنوان بیماری انگلی که به صورت گسترده و جهانی عامل مرگ و میر است در نظر گرفته شده و میلیون‌ها انسان را در طول سال‌ها درگیر کرده است (۱۳). لیشمانیازیس به‌عنوان بیماری‌ای که تهدیدکننده سلامت عمومی است، واگیری و مرگ و میر قابل توجهی را در قاره آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین سبب شده است. افزایش ابتلا به لیشمانیازیس می‌تواند به دلیل گسترش مناطق شهری و تخریب جنگل‌ها، تغییرات محیط زیست و مهاجرت مردم به مناطقی که این بیماری آندمیک است باشد (۱۶).

داروهای پیشنهادی برای لیشمانیازیس ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان، سدیم استیوگلوکونات (پنتوسام) و مگلو مین‌آنتی‌مونات (گلوکانتیم) است که در طی این پنجاه سال استفاده شده است. این داروها عوارض جانبی زیادی را من جمله مسمومیت‌های کلیوی و قلبی در پی

داشته‌اند و این مشکل با ظهور سویه‌های مقاوم به داروها بدتر شده است (۲، ۸). اخیراً خانواده‌های جدیدی از داروها مثل: آمفوتریسین B و میلتفوساین شکل گرفته‌اند که گران قیمت هستند (۲).

عصاره‌های گیاهی یا ترکیبات مشتق شده از گیاهان می‌توانند به‌عنوان منبع جدیدی از ترکیبات دارویی پزشکی باشند. نیاز سریع و اورژانسی به درمان انتخابی، ما را به استفاده از محصولات طبیعی و مشاهده اثرات و پتانسیل اثر استفاده از آنها در درمان بیماری لیشمانیا واداشته است. ایران از کشورهای شناخته شده در این عرصه است به‌خصوص با گیاهان بومی‌ای که دارد که بسیاری از این گیاهان به‌عنوان دارو استفاده می‌شوند در حالی که هیچ پایه علمی برای آن وجود ندارد، در سال‌های اخیر بسیاری از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های انگلی تک‌یاخته‌ای استفاده شده است (۳).

بر اساس مطالعات گذشته گیاه دارویی پسته کوهی کردی (بنه) به‌صورت سنتی در درمان عفونت‌های مختلف بکار رفته است. این گیاه از خانواده آناکاردیاسه و بومی منطقه اورامانات استان کردستان در غرب ایران می‌باشد. این گیاه به‌طور سنتی در درمان زخم معده، التیام زخم‌ها، به‌عنوان ضد التهاب بکار رفته است. همچنین بنه واجد اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی می‌باشد (۵).

از آنجایی که واکسن مشخص و مؤثری برای لیشمانیازیس وجود ندارد حفظ شرایط و بهبود درمانی بیمار همراه با استفاده‌ی خلاقانه از داروهای جدید ابداع شده، تنها راهی است که کنترل لیشمانیا پوستی را ضمانت می‌کند. محصولات طبیعی مثل عصاره گیاهان، چه به‌صورت ترکیبات و چه به‌صورت عصاره استاندارد، فرصت‌های نامحدودی را برای یافته‌های جدید دارویی به‌دلیل در دسترس بودن تنوع زیادی از مواد شیمیایی فراهم می‌کند (۷). تعداد زیادی از عصاره‌های مشتق شده از گیاهان طی تحقیقات بر روی بیماری لیشمانیای پوستی به‌منظور به دست آوردن بهترین تأثیر و کمترین سمیت از

## اثرات ضد لیشمانیائی بنه کوهی گونه کردی بر لیشمانیا ماژور به روش درون تنی

شد. لام‌های تهیه شده را پس از حدود یک دقیقه فیکساسیون با الکل متیلیک و ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی با گیمسا، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده نموده که با دیدن اجسام لیژمن، لیشمانیوز جلدی در موش‌ها تأیید شد. موش‌های آلوده را به‌طور تصادفی به شش گروه به شرح زیر گروه‌بندی نموده و مورد تیمار قرار دادیم.

سه گروه (۱۵ سر موش) تحت درمان با عصاره شیره درخت بنه با غلظت‌های مختلف و گروه چهارم (۵ سر موش) تحت درمان با گلوکانتیم (کنترل مثبت)، گروه پنجم (۵ سر موش) که تحت هیچ درمانی قرار نگرفتند (کنترل منفی) و گروه ششم (پنج سر موش) تحت درمان با اوسرین قرار گرفتند (۷).

گروه کنترل تا پایان تحقیق برای بررسی پیشرفت بیماری، طول زمان زخم، اندازه زخم (میلی‌متر) در طول زمان، بهبود یا عدم بهبود خود به خود، مرگ و میر حیوانات و وجود یا عدم وجود انگل در محل در نظر گرفته خواهد شد. بقیه گروه‌ها به‌عنوان گروه‌های تحت درمان (۳ گروه) با داروهای مورد نظر تیمار و درمان شدند.

موش‌ها از نظر پیشرفت یا بهبود بیماری، مدت زمان زخم، اندازه زخم (میلی‌متر) در طول درمان، بهبود یا عدم بهبود، وجود یا عدم وجود انگل در محل و مرگ و میر کنترل شدند.

قطر زخم‌ها برحسب واحد میلی‌متر جهت محاسبه مساحت زخم و وضعیت بهبودی آنها در ابتدا و پایان مطالعه بررسی و ثبت شد. برای اندازه‌گیری قطر زخم‌ها از کولیس استفاده شد. جهت محاسبه بار انگلی زخم‌ها در شروع درمان (قبل از تجویز اسانس شیره بنه و گلوکانتیم) و نیز در انتهای درمان (قبل از کشتن موش‌ها)، نمونه‌گیری از زخم‌ها انجام شده و بنا به تعریف رتبه‌بندی شدت آلودگی زخم‌ها (بار انگلی) انجام گرفت. در نهایت نتایج در جدول ثبت شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

میان این محصولات طبیعی استفاده شده است که فعالیت آنتی لیشمانیایی با درجه کمی از سمیت در آنها دیده شده است که فرمی از مدیریت درمانی بیماری می‌باشد (۱۵). عوارض جانبی متفاوت و پایدار داروهای موجود و علاوه بر آن، افزایش موارد بیماری، ما را با نیاز فوری برای یافتن یک درمان و ترکیبات دارویی جدید سوق داده است. لذا مطالعه حاضر با توجه به خواص بنه کردی به‌منظور بررسی اثرات ضد لیشمانیائی آن بر روی اماستیگوت لیشمانیا ماژور انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

سویه‌ی استاندارد (MRHO/IR/5/ER) لیشمانیا ماژور از بخش انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. جهت کشت و نگهداری انگل از محیط کشت RPMI640 استفاده شد. به‌منظور کشت انگل، محیط کشت RPMI640 از شرکت *Gibco* خریداری شد. برای ممانعت از رشد باکتری‌ها 100unit/ml پنی‌سلین و 100µg/ml استرپتومایسین و به‌عنوان ماده مکمل سرم جنین گوساله (FBS) ۱۰ درصد به محیط اضافه شد. سپس فلاسک‌ها به انکوباتور ۲۴ درجه منتقل و هر روز با میکروسکوپ اینورت بررسی شد. در صورتی که رنگ محیط زرد شده و پروماستیگوت‌ها وارد فاز ایستایی می‌شدند محیط کشت جدید به آن اضافه می‌گردید این کار تا زمانی انجام شد که انگل به تعداد مورد نیاز رسید برای شمارش انگل‌ها از لام نئوبار استفاده شد.

کشت انگل را تا زمان رسیدن پروماستیگوت‌ها به مرحله ایستائی ادامه داده و سپس با محاسبه حجم مناسب انگل حاوی  $10^6$  پروماستیگوت، ابتدا بعد از استریل کردن ناحیه تزریق، ۰/۲ سی‌سی از محلول حاوی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور با غلظت  $10^6$  انگل در هر میلی‌لیتر در قاعده دم موش‌ها تزریق نموده، پس از گذشت ۲۵ روز زخم در قاعده دم موش‌ها تشکیل شد که برای اطمینان از این که انگل در زخم‌ها وجود دارد، با استفاده از روش نمونه‌برداری مستقیم از زخم‌ها لام تهیه



زخم حاصل از لیشمانیا ماژور در اثر تزریق زیرجلدی پروماستیگوت در ناحیه دم

۲+ : تعداد یک تا ده اماستیگوت در ۱۰ شان میکروسکوپی مشاهده می‌شود.

۳+ : تعداد ده تا صد اماستیگوت در ۱۰ شان میکروسکوپی مشاهده می‌شود.

۴+ : تعداد صد تا هزار اماستیگوت در ۱۰ شان میکروسکوپی مشاهده می‌شود.

۵+ و بیشتر: بیش از ۱۰۰۰ اماستیگوت در ۱۰ شان میکروسکوپی مشاهده می‌شود (۶).

معنی دار بودن از لحاظ آماری بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ (USA, IL, SPSS Inc. Chicago) مورد تحلیل قرار گرفت، تفاوت بین گروه آزمون و گروه کنترل، با آزمون  $t$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد (۴).

پمادی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۱ درصد) درخت بنه با پایه استاندارد اوسرین (Eucerin) تهیه شد. برای تعیین بار انگل، بررسی‌های میکروسکوپی با نمایش آزمایشگاهی بار (تعداد) انگل در زخم‌ها با تهیه اسمیر رنگی در پایان دوره آزمایش، انجام شد. زخم‌ها با اتانول تمیز و در حاشیه زخم با لانست استریل نمونه‌برداری صورت گرفت و با افزودن زخم، نمونه‌برداری انجام شد. اسمیرها در مقابل هوا خشک شده، توسط متانول فیکس و با *Giemsa* رنگ‌آمیزی شدند تا بار انگل‌ها با میکروسکوپ نوری به شرح زیر مشخص شود:

منفی: هیچ اماستیگوتی در ۱۰ شان میکروسکوپی مشاهده نمی‌شود.

۱+ : یک اماستیگوت در ۱۰ شان میکروسکوپی مشاهده می‌شود.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس شیره درخت بنه قبل و بعد از درمان بر اندازه زخم‌ها (سانتی‌متر) در موش‌های Balb/c آلوده به سویه ال‌ماژور

گروه	گروه کنترل (انحراف معیار ± میانگین)	پماد ۵٪ (انحراف معیار ± میانگین)	پماد ۲۵٪ (انحراف معیار ± میانگین)	پماد ۵۰٪ (انحراف معیار ± میانگین)	گلوکانتیم (انحراف معیار ± میانگین)	وازلین (انحراف معیار ± میانگین)
هفته اول	۰٫۶۹±۰٫۱۳	۰٫۶۸±۰٫۱۱	۰٫۶۸±۰٫۲۱	۰٫۶۷±۰٫۱۹	۰٫۶۰±۰٫۱۵۸	۰٫۵۶±۰٫۱۱۴
هفته دوم	۰٫۶۹±۰٫۱۲	۰٫۶۵±۰٫۳۲	۰٫۵۶±۰٫۳۳	۰٫۶۰±۰٫۳۶	۰٫۵۶±۰٫۱۶۷	۰٫۵۸±۰٫۱۰۹
هفته سوم	۰٫۶۳±۰٫۳۵	۰٫۵۹±۰٫۲۲	۰٫۵۹±۰٫۲۱	۰٫۴۹±۰٫۲۲	۰٫۴۲±۰٫۱۳	۰٫۵۶±۰٫۰۵۴
هفته چهارم	۰٫۶۰±۰٫۴۲	۰٫۵۰±۰٫۰۵	۰٫۵۲±۰٫۲۷	۰٫۴۴±۰٫۰۵۲	۰٫۳۴±۰٫۱۳	۰٫۵۶±۰٫۰۵۴
هفته پنجم	۰٫۵۹±۰٫۰۶۰	۰٫۴۴±۰٫۲۶	۰٫۴۱±۰٫۱۰	۰٫۳۴±۰٫۰۴۱	۰٫۲۲±۰٫۱۳	۰٫۶±۰٫۰
هفته ششم	۰٫۵۳±۰٫۰۵۸	۰٫۳۸±۰٫۰۴۴	۰٫۳۲±۰٫۰۲۱	۰٫۲۴±۰٫۰۵	۰٫۲۲±۰٫۱۳	۰٫۶±۰٫۰

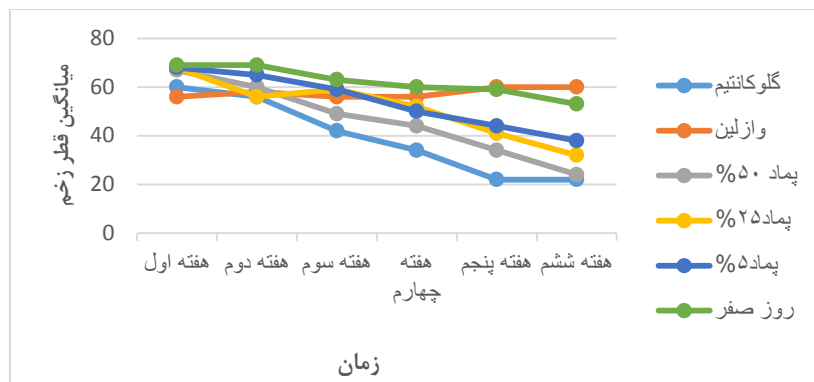
## اثرات ضد لیشمانیائی بنه کوهی گونه کردی بر لیشمانیا ماژور به روش درون تنی

### نتایج

توجه به مقدار پی مشاهده شده برای متغیر زمان که کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد فرض وجود تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف پذیرفته می‌شود یعنی میانگین قطر زخم اندازه‌گیری شده با توجه به زمان‌های مختلف (هفته اول تا ششم) متفاوت بوده و تفاوت معنی‌داری از نظر زمان اندازه‌گیری قطر زخم وجود دارد.

این مطالعه در طول شش هفته صورت گرفت و در پایان هر هفته اندازه‌گیری‌هایی انجام شد که نتایج آن بدین شرح می‌باشد.

با توجه به نتایج آزمون تحلیل واریانس اندازه‌های تکراری می‌توان استنباط کرد که تفاوت معنی‌داری از نظر زمان و تیمار در قطر زخم اندازه‌گیری شده وجود دارد. با



نمودار ۱- نمودار قطر زخم اندازه‌گیری شده به تفکیک تیمارها

دریافت‌کننده پماد ۵۰ درصد مشاهده شد.

### بحث و نتیجه‌گیری

باقیمانده دارویی و اثرات جانبی مضر داروهای متداول در درمان لیشمانیایوز پوستی و عود مجدد در بیماران بهبودیافته افزایش یافته، نیاز ما را در زمینه مطالعات دارویی جهت دستیابی به یک داروی مؤثر و بی‌خطر بالا برده است. بالا بردن قابلیت ضد میکروارگانیسم بنه و قابلیت‌های ضد باکتری، ضد قارچ و ضد سرطانی این عصاره در مطالعات مختلف گزارش شده است (۳). اثرات ضد سرطانی این ترکیب در مطالعات بر روی تومورهای نوروکتودرمال، اسکواموس کارسینومای ریه و سلول‌های هیپاتوما دیده شده است. همچنین پژوهش‌های بالینی نشان می‌دهد که بنه اثرات مؤثرتری بر ترمیم زخم‌ها داشته است لذا با توجه به اهمیت درمان بیماری در کشور ما که روز به روز در حال گسترش به مناطق مختلف است و نیز اثر ناکامل درمان‌های موجود، تأثیر اسانس شیره بنه که یکی از مهم‌ترین گیاهان بومی استان می‌باشد بر روی

با توجه به نمودار فوق با گذشت زمان (از هفته اول به هفته ششم) کاهش معناداری در میانگین قطر زخم ایجاد شده است در اوسرین برخلاف بقیه تیمارها با گذشت زمان میانگین قطر زخم روند افزایشی داشته است.

با توجه به مقادیر پی به دست آمده برای مقایسه زمان‌های نمونه‌برداری (هفته اول تا ششم) می‌توان بیان کرد که در همه گروه‌ها (تیمارها) تفاوت معنی‌دار زمان نمونه‌برداری از نظر بار انگلی موجود در زخم وجود داشته است. در همه گروه‌ها بجز اوسرین بار انگلی در هفته اول بیشترین و در هفته ششم کمترین مقدار بوده است.

نتایج آزمون فوق نشان می‌دهد که در بین تیمارها در هر زمان از نظر میانگین بار انگلی تفاوت معنی‌داری وجود دارد به عبارتی دیگر در هر هفته بعد از نمونه‌گیری تفاوتی از نظر بار انگلی در بین تیمارها مشاهده شده است. همچنین در هفته‌های مختلف در بین تیمارها تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین بار انگلی در نمونه دریافت‌کننده اوسرین و کمترین بار انگلی در نمونه

سالک ناشی از لیشمانیا ماژور در موش‌های بلب سی همانند اثر جوشانده بابونه می‌باشد (۱۷). همین موضوع نشان‌دهنده این است که مطالعه بر روی استفاده ترکیبی از چندین گیاه دارویی بر روی لیشمانیوز جلدی می‌تواند اثرات مفیدتر و مؤثرتری به همراه داشته باشد که این یافته می‌تواند در استفاده از عصاره‌های مختلف به همراه عصاره بنه جهت بررسی میزان بهبودی زخم لیشمانیائی در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

علی‌رغم این، همچنان تعداد مطالعات صورت گرفته در رابطه با خاصیت ضد انگلی بنه محدود می‌باشد مثلاً در مطالعه‌ای که بر روی لیشمانیا دونوانی صورت گرفت عصاره ریشه پسته کوهی گونه ورا (*P. vera*) با غلظت  $4 \mu\text{g/mL}$  و  $8 \mu\text{g/mL}$  به طور قابل ملاحظه‌ای تا (۳/۷۷ درصد) رشد لیشمانیا دونوانی را مهار کرد. در مطالعه دیگری که بر روی پلاسمودیوم فالسی پارووم عصاره برگ‌های خشک گیاه حدود ۶۰/۶ درصد اثر مهارتی علیه این تک‌یاخته داشت (۷). در مطالعات مختلف محصولات طبیعی نظیر: ویزکورستین، لوتئولین، هولامین (استروئید) کورینانتین (ایندول) رودسیاکریدون (آکریدون)، دهیدروکولاریترین (فنانتريدین)، پگانین (کوبینازولین)، لینالول، آگاروفوران، نرولیدول (ترپنویید)، کونفرول (کومارین)، ایزوآپتامین (آلکالوئید). اثرات ضد لیشمانیایی از خود نشان داده‌اند و این مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان طبیعی می‌توانند به‌عنوان داروی سنتی جهت جلوگیری از عود مجدد و درمان لیشمانیوز پوستی بکار روند (۱۷).

نتایج این مطالعه و مطالعات قبلی نشان داد که بنه هم در محیط آزمایشگاه و هم در درون سلول‌های حیوانی دارای خاصیت ضد لیشمانیایی است. قبل از اینکه هرگونه نتیجه‌گیری در ارتباط با میزان اثر بنه بر درمان و بهبود زخم‌های لیشمانیوز پوستی انسان صورت گیرد بایستی غلظت‌های مختلف و روش‌های متفاوت استعمال آن بررسی شود (۴). همچنین با توجه به نتیجه‌بخشی تأثیر عصاره شیره بنه، شناسایی ماده مؤثره بر زخم پیشنهاد می‌شود.

لیشمانیوز جلدی مورد بررسی قرار گرفت (۱، ۳، ۱۲).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره شیره بنه موجب تفاوت معنی‌داری در کاهش قطر زخم می‌شود به‌طوری که در درمان با غلظت‌های مختلف پماد شیره اسانس بنه کاهش قطر زخم مشاهده گردید. به‌طوری که میانگین قطر زخم در استفاده از شیره اسانس بنه در شش هفته کاهش معنی‌داری داشته است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین کاهش میانگین قطر زخم در طول زمان وجود دارد به‌طوری که در تمام گروه‌های درمان در طول زمان میانگین قطر زخم روند کاهشی داشته است اما در استفاده از اوسرین در طول مدت درمانی قطر زخم افزایش داشته است.

نتایج حاصل از این مطالعه همچنین نشان‌دهنده بیشترین تأثیر در کاهش قطر زخم در پماد ۵۰ درصد بوده است همچنین در تمام گروه‌های تیمار، کاهش معنی‌داری از نظر بار انگلی دیده شده است به‌طوری که در طول زمان درمان در بین گروه‌های تیمار کاهش معنی‌داری از نظر بار انگلی دیده شده است که این کاهش بار انگلی در گروه گلوکانتیم بلافاصله پس از استفاده و در هفته اول پس از درمان مشاهده شده و در دو هفته آخر درمان یعنی هفته پنجم و ششم در تمام تیمارها کاهش بار انگلی معنی‌دار بوده است. همچنین بیشترین بار انگلی در گروه اوسرین و کمترین میزان آن در گروه پماد ۵۰ درصد مشاهده شده است.

ترکیبات انتخابی مؤثرکه هیچ نوع سمیتی نداشته باشد نقش مهمی در معرفی درمان جدید برای لیشمانیای پوستی دارد که در این ارتباط می‌توان به اثرعصاره هیدروآتانولیک گیاه علف خوک *selaginella sellowii* اشاره کرد در مطالعه‌ای که به‌وسیله حجازی و همکاران در مورد مقایسه اثربخشی عصاره هیدروآکلکی گیاهان آویشن شیرازی، بومادران، حنا و سیر بر ضایعات جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور در مدل حیوانی موش‌های بلب سی انجام گرفته است اثر گیاه بومادران و آویشن در بهبود زخم

## References

- 1- Albalawi A.E, Althobaiti N.A, Alhasani R.H, Alnomasy S.F. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of Pistacia atlantica methanolic extract against Ehrlich solid tumor in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2022; 12(2): 69.
- 2- Bhattacharya S, Ghosh P, De T, Gomes A, Gomes A, Dungdung S.R. In vivo and in vitro antileishmanial activity of Bungarus caeruleus snake venom through alteration of immunomodulatory activity. *Experimental parasitology*. 2013; 135(1): 126-133.
- 3- Braga F.G, Bouzada M.L.M, Fabri R.L, Matos M.D.O, Moreira F.O, Scio E, et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of ethnopharmacology*. 2007; 111(2): 396-402.
- 4- Dalimi A, Delavari M, Ghaffarifar F, Sadraei J. In vitro and in vivo antileishmanial effects of aloe-emodin on Leishmania major. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2015; 5(2): 96-99. [In Persian]
- 5- Dolatyabi M, Adhami G, Maroofi Y. Effect of Pistacia atlantica (kurdica) oil extract on promastigotes of Leishmania major. *New Findings in Veterinary Microbiology*. 2022; 4(2): 92-99.
- 6- Ebrahimi-Sadr P, Ghaffarifar F, Hassan-Saraf Z.M, Beheshti N. Effect of artemether on the recovery of lesions caused by Leishmania major. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 2013; 16(6). [In Persian]
- 7- Ezatpour B, Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Azadpour M, Ezzatkah F. In vitro and in vivo antileishmanial effects of Pistacia khinjuk against Leishmania tropica and Leishmania major. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.
- 8- Ferreira S.B, Costa M.S, Boechat N, Bezerra R.J, Genestra M.S, Canto-Cavalheiro M.M, et al. (2007). Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2007; 42(11-12): 1388-1395.
- 9- Ghaderi A, Kkhadem Eerfan M.B, Barati M, Ghaderi S. Evaluation of antileishmanial effect of the plant extract of alpha-pinene (Pistacia atlantica) in vitro and in vivo. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2018; 23(5): 32-44. [In Persian]
- 10- Hesami D, Ghaffarifar F, Dalimi Asl A, Nasiri V, Ghasemi E, Jorjani O.N. A study on the effects of Pistacia atlantica Desf. essential oil on Leishmania major in vitro and in vivo. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research (IJMAPR)*. 2019; 35(1): 44-53. [In Persian]
- 11- Jameii F, Dalimi A.A, Karimi M, Ghaffarifar F. Healing effect comparison of selenium and silver nanoparticles on skin leishmanial lesions in mice. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*. 2015; 22(3): 217-223. [In Persian]
- 12- Koko W.S, Al Nasr I.S, Khan T.A, Schobert R, Biersack B. An update on natural antileishmanial treatment options from plants, fungi and algae. *Chemistry & biodiversity*. 2022; 19(1): e202100542.
- 13- Mesquita M.L.D, Desrivot J, Fournet A, Paula J.E.D, Grellier P, Espindola L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100(7): 783-787.
- 14- Plano D, Baquedano Y, Moreno-Mateos D, Font M, Jiménez-Ruiz A, Palop J.A, et al. Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2011; 46(8): 3315-3323.
- 15- Queiroz D.P.D.S, Carollo C.A, Kadri M.C.T, Rizk Y.S, Araujo V.C.P.D, Monteiro P.E.D.O, et al. (2016). In vivo antileishmanial activity and chemical profile of polar extract from Selaginella sellowii. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016; 111: 147-154.
- 16- Rocha L.G, Almeida J.R.G.S, Macedo R.O, Barbosa-Filho J.M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 2005; 12(6-7): 514-535.
- 17- Sangshetti J.N, Khan F.A.K, Kulkarni A.A, Arote R, Patil R.H. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. *Rsc Advances*. 2015; 5(41): 32376-32415.
- 18- Tahir A.E, Ibrahim A.M, Satti G.M, Theander T.G, Kharazmi A, Khalid S.A. The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 1998; 12(8): 576-579.



## Anti leishmanial effects of *Pistacia atlantica* subspecies *Kurdica* on *Leishmania major* in vivo

Amir Habibi<sup>1</sup>, Ghazaaleh Adhami<sup>\*2</sup>, Abdolhosein Dalimi Asl<sup>3</sup>, Sogol Atefi<sup>4</sup>

- 1- Veterinary graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
- 2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
- 3- Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- 4- Veterinary Student, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Receive: June 27, 2023; Revise: November 27, 2023; Accept: December 7, 2023



10.22034/nfvm.2024.403094.1193



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

Leishmaniasis is a protozoan zoonosis that causes problems in public health. The use of pentavalent antimony compounds as chemical drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis is associated with various limitations and side effects. Today, plant extracts and their derivations are the promising sources in herbal medicine. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of oil extract *Pistacia atlantica* Kurdistan province, Iran, on promastigotes of standard strain *Leishmania major* in vitro and in vivo. In this study, 10, 15, 25, and 50% concentrations of plant-based ointment were added to the lesions caused by promastigotes of *Leishmania major*. The effectiveness of treatment with different concentrations of pistacia extract on induced lesions at the base of the tail of Balb/c mice cultured with promastigotes of *Leishmania major* was checked in terms of disease progression or improvement and parasite load. The effect of 50% pistacia extract has the greatest effect on reducing the lesions diameter of *Leishmania* promastigotes, the results showed that there is a significant difference between the number of *Leishmania major* promastigotes in different concentrations of the extract and exposure time. With respect to the calculated P-value for time variable ( $P < 0.05$ ), there was statistically remarkable difference among different time periods, so the mean of the measured lesion was different regarding 6 weeks of experiment, and there observed a statistically significant difference in terms of the time of lesion measurement. Additionally, the prediction, isolation, purification, and application of the effective compounds found in the *Pistacia atlantica* extract is highly suggested for future studies.

**Keywords:** *Leishmania*, *In vivo*, *Pistacia Atlantica*



دوره ۶، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۰۷-۹۸

## ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های ریحان (*Ocimum basilicum L.*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) و زیره سبز (*Cuminum cyminum L.*) در مقایسه با نیسین

محمدعلی نجفی<sup>۱\*</sup>، آرسام آینه‌چی<sup>۲</sup>، ذبیح‌ا... بهمنی<sup>۳</sup>، سارا نجفی قافلستانی<sup>۴</sup>

۱- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، مؤسسه آموزش عالی رودکی، تنکابن، ایران.

۳- استادیار، گروه فرآوری و بیوتکنولوژی آبزیان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، بندرعباس، ایران.

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

دریافت مقاله: ۲۷ فروردین ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۴ خرداد ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۴ تیر ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2023.393370.1184



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### چکیده

ریحان، رزماری و زیره سبز از جمله گیاهان دارویی با کاربردهای غذایی فراوان هستند. هدف از مطالعه حاضر بررسی ترکیبات شیمیایی و خواص ضد باکتریایی اسانس این گیاهان در مقایسه با نیسین بر کنترل رشد مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی است. نمونه‌های اسانس به روش تقطیر با آب به کمک دستگاه کلونجر تهیه و اجزاء آن به وسیله گاز کروماتوگرافی مجهز به طیف‌سنجی جرمی شناسایی گردید. در ادامه اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها در مقایسه با نیسین به روش انتشار در آگار و همچنین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکرودايلوشن در برابر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1337، *لیستریا مونوسییتوزنز* ATCC 19118، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1857، *اشریشیاکلی* PTCC 1763، *پسودوموناس آئروژینوزا* PTCC 1074 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC 14028 بررسی شد. نتایج نشان داد مهم‌ترین جزء در اسانس ریحان ترکیب لینالول (۵۲/۳۳ درصد)، در اسانس رزماری ترکیبات ۱،۸-سینئول (۱۷/۸ درصد)، کامفور (۱۶/۶ درصد)،  $\alpha$ -پینن (۱۳/۶۱ درصد)، و در اسانس زیره‌ی سبز اجزاء کومین‌آلدئید (۳۹/۶۷ درصد)،  $\gamma$ -ترپینن (۱۷/۳۵ درصد) و p-سیمن (۱۵/۹۶ درصد) بودند. تمامی اسانس‌ها و نیسین بر رشد باکتری‌های هدف اثر بازدارندگی داشتند. حساس‌ترین باکتری‌ها در برابر اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره‌ی سبز به ترتیب *سالمونلا تیفی‌موریوم* (۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$ )، *پسودوموناس آئروژینوزا* (۳۱  $\mu\text{g/ml}$ ) و *لیستریا مونوسییتوزنز* (۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$ ) بودند. نتایج به‌دست آمده نشان داد اثر ضد باکتریایی اسانس تحت تأثیر نوع اسانس و سویه باکتریایی هدف قرار دارد. احتمالاً اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز بتوانند به‌عنوان جایگزین مناسب نگهدارنده‌های شیمیایی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژگان کلیدی:** اسانس، بازدارندگی، رشد باکتری، میکرودايلوشن

بخش مهمی از بیماری‌های انسانی ناشی از میکروبه‌های بیماری‌زای غذایی می‌باشد که ضمن به خطر انداختن سلامت مصرف‌کنندگان ضررهای اقتصادی هنگفتی را تحمیل می‌نمایند. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی سالانه از هر ۱۰ نفر یک نفر به بیماری با منشأ غذایی مبتلا شده که منجر به تلفات انسانی نزدیک به ۴۲۰۰۰۰ نفر می‌گردد (۳۱). از جمله مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی می‌توان به لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی‌موریوم، اشریشیاکلی، پسودوموناس آئروژینوزا، لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس اشاره نمود (۱۷، ۲۶، ۲۹). رایج‌ترین راهکار برای کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا افزودن نگهدارنده شیمیایی است که به دلیل اثرات سوء آن بر سلامت انسان با محدودیت‌هایی مواجه شده است. به همین دلیل امروزه علاقه شدیدی به نگهدارنده‌های طبیعی مانند اسانس‌ها پدید آمده است (۱۸، ۲۵). اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که علاوه بر زیست تخریب‌پذیری، و طعم منحصر به فرد دارای خواص ضد میکروبی نیز می‌باشند (۲۵). به همین دلیل علاقه بسیاری به کاربرد این ترکیبات در فرماکولوژی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و بالینی، فیتوپاتولوژی و نگهداری مواد غذایی پدید آمده است (۱۱). از مهم‌ترین گیاهان دارویی-غذایی بومی ایران می‌توان به گیاهان ریحان، رزماری و زیره سبز اشاره نمود. ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* L. از گیاهان مهم خانواده نعناع است که اندام‌های هوایی آن به‌طور سنتی در پیشگیری و درمان اختلالات قلبی-عروقی، گرفتگی قاعدگی، دیابت، ضد اسپاسم، اختلالات گوارشی و عصبی، ضد درد و همچنین تب‌بر کاربرد دارد (۲۴). رزماری (*Rosmarinus officinalis* L) گیاهی چندساله است که به‌عنوان یک گیاه زینتی و معطر کشت می‌شود. برگ‌های رزماری کاربردهای گسترده‌ای به‌عنوان محرک، مسکن ملایم و همچنین در درمان بیماری‌های سردرد،

گردش خون ضعیف و خستگی‌های جسمی دارد (۸، ۱۶). دانه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) با اثرات ضد تشنج، ضد صرع، تقویت‌کننده معده، مدر، ضد نفخ، ضد سوء هاضمه، به‌عنوان محرک تعریق شناخته شده و مصرف آن برای بیماران دیابتی توصیه شده است (۲۱). گزارشات متعدد و متفاوتی از اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی مختلف مانند، آویشن، دارچین، پونه کوهی، نعنا فلفلی، اکالیپتوس، علف لیمو، ریحان، رزماری و زیره سبز در دسترس است. نکته کلیدی تفاوت ترکیبات شیمیایی و تأثیرگذاری اختصاصی و محدود نگهدارنده‌های طبیعی بر روی میکروبه‌های بیماری‌زا است (۶، ۱۴).

نیسین آنتی‌بیوتیک کلاس I شامل ۳۴ اسید آمینه و پنج حلقه (متیل)-لانتیونین است. چندین اسید آمینه غیر معمول از جمله دهیدروآلانین (Dha)، دهیدروبوترین (Dhb)، اسید آمینوبوتیریک (Aba)، لانتیونین (Ala-S-Ala) و  $\beta$ -متیل لانتیونین (Aba-S-Ala) در نیسین شناسایی شده است. این پپتید توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس تولید شده و در پستانداران به راحتی توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک تجزیه می‌شود. به همین دلیل به‌عنوان تنها باکتروسین از سوی سازمان خواربار و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) مجوز استفاده در غذا و نوشیدنی‌ها را دریافت نموده است (۱، ۴).

هدف از انجام این پژوهش شناسایی اجزاء شیمیایی اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز منطقه سیستان با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) و ارزیابی اثربخشی آنها به‌عنوان عوامل ضد میکروبی در برابر مهم‌ترین باکتری‌های مولد بیماری با منشأ غذایی بود تا موثرترین ترکیب ضد میکروب در مقایسه با ترکیب نیسین معرفی گردد.

## مواد و روش‌ها

**تهیه مواد اولیه:** نمونه‌های برگ رزماری، ریحان و زیره سبز از پژوهشگاه کشاورزی زابل (زابل، ایران)، نیسین از شرکت سیگما-آلدریج (دورست، انگلستان) به‌صورت

## ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز ...

سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. کلنی‌های خالص با انجام کشت خطی بر روی محیط کشت تریپتوسوی آگار (TSA) تهیه و با تلقیح مجدد به محیط کشت TSB تکثیر شدند. سوسپانسیون باکتریایی نیم‌مک‌فرلند ( $10^6 \times 1/5 - 1$ ) با استفاده از کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه گردید (۲۳).

### آزمون ضد میکروبی به روش سنجش انتشار در

**آگار:** سوسپانسیون باکتریایی به حجم ۱ میلی‌لیتر به پلیت ۹ سانتی‌متر منتقل و مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت آگار ذوب‌شده به آن اضافه و در هر پلیت چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد گردید. به هر چاهک مقدار  $75 \mu\text{l}$  اسانس گیاه و نیسین با غلظت ۲۰ درصد اضافه و سپس با محیط کشت مذاب نوترینت آگار (۱۰ درصد w/v) پر شد. Tween 80 با غلظت ۵/۵ درصد به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. محلول آبی نیسین به کمک محلول دی‌متیل‌سولفوکسید (۱۰ درصد) تهیه و پس از فیلتراسیون ( $0.2 \mu\text{m}$ ) آماده گردید. پلیت‌های تهیه شده مطابق شرایط ذکر شده گرمخانه‌گذاری و اثر ضد باکتریایی بر حسب میلی‌متر ناحیه بازداری (قطر چاله - قطر هاله) قابل مشاهده گزارش شد. تمامی آزمون‌ها در ۵ تکرار انجام گرفت (۴).

### آزمون تعیین MIC و MBC به روش

**میکرودایلوشن:** MIC و MBC نمونه‌های اسانس و نیسین در برابر سویه‌های هدف ( $10^6 \times 1/5 - 1$ ) به روش میکرودایلوشن و با استفاده از محیط کشت TSB و پلیت ۹۶ خانه انجام شد. رقت‌های سریالی از  $4000 - 15/6 \mu\text{g/ml}$  تهیه گردید. محیط کشت حاوی میکروب هدف به‌عنوان کنترل مثبت و محیط کشت فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ذکر شده گرمخانه‌گذاری و به لحاظ کدورت سنجی در طول موج  $620 \text{ nm}$  توسط اسپکتروفتومتر (سسیل، انگلستان) بررسی گردیدند. کمترین غلظت فاقد رشد باکتری به‌عنوان MIC ثبت شد.

بسته‌بندی و همچنین تمامی ترکیبات شیمیایی و محیط کشت‌های مورد استفاده از برند Merck (دارمشتات، آلمان) خریداری گردیدند. سویه‌های باکتریایی به‌صورت لیوفلیزه از کلکسیون کشت میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

### استخراج اسانس و آنالیز GC-MS. برگ‌ها بدون

ذرات خارجی پس از شستشو با آب، در دمای اتاق خشک و سپس توسط دستگاه خردکن (فلر، چین) پودر شدند. مقدار ۵۰ گرم پودر به دستگاه کلونجر منتقل و استخراج اسانس برای مدت ۳ ساعت به روش تقطیر با آب انجام شد. رطوبت اسانس توسط انیدرو سولفات سدیم خارج و تا زمان استفاده در ویال‌های شیشه‌ای دربسته و تیره درون یخچال نگهداری شد. ترکیبات اسانس 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) بررسی گردید. گاز هلیوم به‌عنوان ناقل، با سرعت  $\text{ml/min}$  ۱/۱ - ۰/۹ به ستون با دمای متغیر ۳۰ تا  $250^\circ\text{C}$  (روند افزایشی  $2/5^\circ\text{C/min}$ ) 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 شدند (۱۰).

### تکثیر سویه‌های باکتریایی: اثر ضد باکتریایی

اسانس و نیسین در برابر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1337، *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC 19118، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1857، *اشریشیاکلی* PTCC 1763، *پسودوموناس آئروژینوزا* PTCC 1074 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC 14028 مورد بررسی قرار گرفت. بسته‌بندی شیشه‌ای حاوی نمونه‌های میکروبی در شرایط استریل شکسته و تمامی سویه‌ها به‌صورت جداگانه به محیط کشت مایع تریپتوسوی برات (TSB) تلقیح شدند. سوسپانسیون *حاوی باسیلوس سرئوس* در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سایر سویه‌ها در دمای ۳۷ درجه

تریپینول (۷/۹۶ درصد) و p-سیمن (۴/۱۱ درصد) بیشترین مقادیر را دارا بودند. همچنین بررسی نتایج به‌دست آمده از شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سبز ۲۳ ترکیب مختلف را نشان می‌دهد که بیشترین به‌ترتیب به اجزاء کومین آل‌دئید (۳۹/۶۷ درصد)،  $\gamma$ -تریپین (۱۷/۳۵ درصد)، p-سیمن (۱۵/۹۶ درصد)،  $\beta$ -پینن (۶/۸۶ درصد) و p-سیمن- $\gamma$ -ال (۴/۴۲ درصد) اختصاص داشت.

#### فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های اسانس و نیسین

به روش انتشار در آگار: نمونه‌های اسانس ریحان، رزماری، زیره سبز و نیسین به‌طور معناداری بر مهار رشد سویه‌های هدف (جدول ۲) مؤثر بودند ( $p < 0.05$ ). بیشترین شعاع بازدارندگی را پسودوموناس آئروژینوزا در برابر اسانس رزماری (۱۸/۱ mm) و کمترین مقدار از تأثیر اسانس زیره سبز بر پسودوموناس آئروژینوزا (۷/۱ mm) و اسانس ریحان بر باسیلوس سرئوس (۷/۲ mm) به‌دست آمد ( $p < 0.05$ ). بررسی اثر بازدارندگی نیسین بر مهار رشد باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری متفاوت بود ( $p < 0.05$ ). حساس‌ترین سویه لیستریا مونوسی‌توزنز با ناحیه بازدارندگی ۱۲/۱ mm و مقاوم‌ترین سویه‌ها سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی به‌ترتیب با نواحی بازدارندگی ۸/۱ mm و ۸/۳ mm ثبت شد ( $p < 0.05$ ).

از خانه‌هایی که فاقد رشد میکروبی بودند، ۵۰ میکرولیتر به محیط کشت نوترینت آگار تلقیح و برای ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کمترین غلظتی که قادر به مرگ ۹۹/۹ باکتری هدف بود به‌عنوان MBC ثبت گردید (۲۳).

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** 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 ۵ درصد انجام شد.

#### نتایج

##### نتایج آنالیز GC-MS: نتایج آزمون GC-MS

نمونه‌های اسانس ریحان، رزماری و زیره سبز در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اجزاء اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز به‌ترتیب در سطوح ۹۸/۸۷، ۹۹/۳۱ و ۹۵/۸۵ درصد شناسایی شدند. ۲۹ ترکیب شیمیایی در اسانس ریحان تشخیص داده شد که لینالول (۵۲/۳۳ درصد)،  $\alpha$ -تریپینول (۷/۳ درصد)، اجنول (۶/۵۳ درصد)،  $\alpha$ -تریپینول (۴/۴۴ درصد) و مورول-۵-ان-۴ ( $\alpha$ -۴/۱۸ درصد) به‌ترتیب بیشترین مقادیر ( $< 4$  درصد) را به خود اختصاص دادند. از مجموع ۳۲ جزء شیمیایی تشخیص داده شده در اسانس رزماری، ترکیبات ۱، ۸-سینئول (۱۷/۸ درصد)، کامفور (۱۶/۶ درصد)،  $\alpha$ -پینن (۱۳/۶۱ درصد)، بورنئول (۸/۷۲ درصد)،  $\alpha$ -

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز شناسایی شده با استفاده از GC-MS

ردیف	ریحان		رزماری		زیره سبز	
	RI	درصد	RI	درصد	RI	درصد
۱	۹۳۶	۰/۳۵	۱۰۵۹	۰/۸۱	۹۲۸	۰/۵۳
۲	۹۴۷	۰/۱۶	۱۰۶۹	۱۳/۶۱	۹۳۷	۱/۳۶
۳	۹۷۱	۰/۲۵	۱۰۸۸	۰/۱۵	۹۴۷	۰/۰۸
۴	۹۸۶	۰/۸۳	۱۰۹۳	۶/۱۰	۹۶۷	۶/۸۶
۵	۹۹۷	۱/۵۶	۱۱۴۹	۰/۲۵	۹۸۱	۰/۴۳
۶	۱۰۱۲	۰/۸۱	۱۱۶۱	۱/۱۵	۹۹۸	۰/۵۷
۷	۱۰۱۹	۰/۱۲	۱۱۸۹	۰/۹۶	۱۰۱۳	۰/۰۵
۸	۱۰۲۹	۰/۱۷	۱۲۰۵	۳/۳۷	۱۰۱۵	۰/۰۲
۹	۱۰۳۲	۲/۶۹	۱۲۱۱	۱۷/۸	۱۰۲۱	۱۵/۹۶
۱۰	۱۰۴۱	۴/۱۷	۱۲۴۴	۰/۶۹	۱۰۲۵	۰/۹۲

۰/۲۶	۱۰۲۸	Limonene	۴/۱۱	۱۲۷۹	p-Cymene	۰/۱۵	۱۰۵۳	$\gamma$ -Terpinene	۱۱
۰/۸۷	۱۰۳۰	1,8-Cineole	۰/۱۲	۱۴۳۱	Styrene	۰/۶۹	۱۰۸۰	Fenchone	۱۲
۱۷/۳۵	۱۰۵۶	$\gamma$ -Terpinene	۰/۲۸	۱۴۶۱	1-Octen-3-ol	۵۲/۳۳	۱۰۸۶	Linalool	۱۳
۰/۰۳	۱۱۳۹	Pinocarveol	۱۶/۶	۱۵۰۳	Camphor	۰/۹۳	۱۱۰۷	Camphor	۱۴
۰/۰۷	۱۱۸۰	Terpinen-4-ol	۱/۱۶	۱۵۶۹	Linalool	۱/۸۹	۱۱۵۲	Borneol	۱۵
۰/۲۷	۱۱۹۱	1,3-Cyclohexadiene-1-methanol	۰/۲۲	۱۵۹۱	Borneol	۰/۱۵	۱۱۷۲	Terpinene-4-ol	۱۶
۰/۰۶	۱۱۹۳	o-Cumamol	۰/۲۱	۱۵۹۹	Fenchole	۴/۴۴	۱۱۷۵	$\alpha$ -Terpineol	۱۷
۲۹/۶۷	۱۲۴۰	Cumin-aldehyde	۱/۶۹	۱۶۱۱	Caryophyllene	۰/۶۳	۱۲۴۸	Geraniol	۱۸
۱/۷۵	۱۲۸۲	$\alpha$ -Terpinen-7-al	۱/۸۹	۱۶۲۲	Terpinen-4-ol	۱/۸۲	۱۲۶۹	Bornyl acetate	۱۹
۳/۱۰	۱۲۸۸	$\gamma$ -Terpinen-7-al	۰/۱۲	۱۶۸۹	E-pinocarveol	۶/۵۳	۱۳۶۲	Eugenol	۲۰
۴/۴۲	۱۲۹۱	p-Cymen-7-ol	۳/۴۴	۱۶۹۳	$\alpha$ -Humulene	۰/۴۳	۱۳۶۹	$\alpha$ -Copaene	۲۱
۰/۱۹	۱۲۹۳	Thymol	۲/۱۹	۱۷۰۱	Isoborneol	۰/۳۷	۱۳۸۰	$\beta$ -Cubebene	۲۲
۰/۹۳	۱۳۳۰	p-Metha-1,4-diene-7-ol	۰/۱۳	۱۷۰۸	$\gamma$ -Muuroleone	۱/۶۳	۱۳۸۳	$\alpha$ -Elemene	۲۳
-	-	-	۷/۹۶	۱۷۲۲	$\alpha$ -Terpineol	۰/۹۱	۱۳۹۱	$\beta$ -Elemene	۲۴
-	-	-	۸/۷۲	۱۷۳۵	Borneol	۰/۷۲	۱۴۰۱	Methyl eugenol	۲۵
-	-	-	۰/۶۶	۱۷۶۱	$\Delta$ -Cadinene	۱/۱۵	۱۵۷۳	Spathulenol	۲۶
-	-	-	۰/۰۴	۱۷۹۶	Citronellol	۱/۵۲	۱۵۸۶	Caryophyllene oxide	۲۷
-	-	-	۰/۳۳	۱۹۹۷	Caryophyllene	۴/۱۸	۱۶۳۶	Muurool-5-en-4- $\alpha$ -ol	۲۸
-	-	-	۱/۶۳	۲۰۸۲	Eugenol methyl ether	۷/۳۰	۱۶۵۸	$\alpha$ -Cadinol	۲۹
-	-	-	۰/۸۷	۲۲۱۷	Eugenol	-	-	-	۳۰
-	-	-	۰/۱۳	۲۳۱۹	Thymol	-	-	-	۳۱
-	-	-	۰/۹۲	۲۳۴۹	Carvacrol	-	-	-	۳۲
گروه‌های شیمیایی									
			۸۹/۲۷		۷۰/۵۲		۶۴/۳۳		Monoterpene
			۰/۰۳		۱۶/۳۷		۱۸/۱۸		Sesquiterpene
			۵/۹۴		۱۲/۴۲		۱۶/۳۶		Phenylpropanoids
			۹۵/۸۵		۹۹/۳۱		۹۸/۸۷		جمع کل

RI: زمان بازدارندگی

آئروژینوزا دیده شد. بیشترین سطح ( $2000 \mu\text{g/ml}$ ) MBC برای پseudomonas آئروژینوزا تحت تأثیر اسانس زیره سبز ثبت گردید. مقادیر MIC و MBC نیسین در برابر سویه‌های مختلف متفاوت بود. سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و پseudomonas آئروژینوزا کمترین مقدار ( $63 \mu\text{g/ml}$ ) MIC، و باسیلوس سرئوس کمترین مقدار ( $63 \mu\text{g/ml}$ ) MBC را نشان دادند.

#### مقادیر MIC و MBC نمونه‌های اسانس و نیسین:

بررسی MIC و MBC عوامل ضد میکروبی در برابر باکتری‌های هدف (جدول ۳) نشان می‌دهد کمترین مقدار ( $31 \mu\text{g/ml}$ ) MIC و ( $63 \mu\text{g/ml}$ ) MBC از تأثیرگذاری اسانس رزماری بر پseudomonas آئروژینوزا به دست آمد. همچنین بالاترین مقدار ( $1000 \mu\text{g/ml}$ ) MIC از تأثیرگذاری اسانس ریحان بر باسیلوس سرئوس، رزماری بر سالمونلا تیفی‌موریوم و زیره سبز در برابر پseudomonas

جدول ۲- اثر ضد باکتریایی اسانس‌های ریحان، رزماری، زیره سبز و نیسین (mm) بر روی باکتری‌های هدف به روش سنجش انتشار در آگار

Tween 80	بازدارندگی نیسین (mm)	بازدارندگی اسانس (mm)			میکروارگانیسم	
		زیره سبز	رزماری	ریحان		
NE	12/1 ± 0/2 A,c	14/6 ± 0/2 A,b	17/6 ± 0/2 B,a	9/3 ± 0/3 E,d	لیستریا مونوسیتوزنز	مغزپسته
NE	10/8 ± 0/3 B,c	12/9 ± 0/3 C,b	13/3 ± 0/1 C,a	11/1 ± 0/2 D,c	استافیلوکوکوس اورئوس	
NE	11/2 ± 0/1 B,b	14/1 ± 0/3 B,a	10/2 ± 0/6 D,c	7/2 ± 0/3 F,d	باسیلوس سرئوس	
NE	8/1 ± 0/1 D,d	10/3 ± 0/3 D,b	8/6 ± 0/1 F,c	15/3 ± 0/3 A,a	سالمونلا تیفی موریم	مغزپسته
NE	9/5 ± 0/3 C,c	7/1 ± 0/2 F,d	18/1 ± 0/7 A,a	11/7 ± 0/1 C,b	پسودوموناس آئروژینوزا	
NE	8/3 ± 0/2 D,d	9/7 ± 0/1 E,c	10/5 ± 0/2 D,b	14/4 ± 0/2 B,a	اشریشیاکلی	

حروف متفاوت بزرگ و کوچک به ترتیب در هر ستون و ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. NE: ناحیه بازدارندگی شناسایی نشد. داده‌ها: میانگین ± انحراف معیار

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس‌های ریحان، رزماری، زیره سبز و نیسین (µg/ml) به روش میکرودیالوژن

نیسین (µg/ml)	عامل ضد باکتریایی			غلظت	باکتری	
	زیره سبز	رزماری	ریحان			
125	125	63	250	MIC	لیستریا مونوسیتوزنز	مغزپسته
250	125	63	500	MBC	استافیلوکوکوس اورئوس	
63	250	125	125	MIC	باسیلوس سرئوس	
125	250	250	125	MBC	سالمونلا تیفی موریم	مغزپسته
63	250	500	1000	MIC	پسودوموناس آئروژینوزا	
63	250	1000	2000	MBC	اشریشیاکلی	
125	500	1000	125	MIC		
250	1000	1000	125	MBC		
63	1000	31	500	MIC		
125	2000	63	1000	MBC		
125	500	500	250	MIC		
125	500	1000	250	MBC		

درصد می‌رسد (۵).

## بحث و نتیجه‌گیری

در بسیاری از نقاط جهان طب سنتی گیاهی با هدف کنترل عوامل عفونی مختلف استفاده می‌شود (۱۰). اخیراً اسانس‌ها به دلیل اثرات ضد میکروبی، سازگاری با بدن و محیط زیست مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱). اسانس‌ها ترکیبات پیچیده‌ای از مواد فعال زیستی با ساختارهای مونوسزکوئی و دی‌ترپن‌ها، ترکیبات فنلی، اجزاء گوگرددار و نیز مشتقات فنیل پروپانویید هستند. ترپنوئیدها و فنیل پروپانوییدها اجزای اصلی موجود در اسانس اکثر گیاهان هستند. در بسیاری از موارد مقدار ترپنوئیدها به حدود ۸۰

در بسیاری از نقاط جهان طب سنتی گیاهی با هدف کنترل عوامل عفونی مختلف استفاده می‌شود (۱۰). اخیراً اسانس‌ها به دلیل اثرات ضد میکروبی، سازگاری با بدن و محیط زیست مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱). اسانس‌ها ترکیبات پیچیده‌ای از مواد فعال زیستی با ساختارهای مونوسزکوئی و دی‌ترپن‌ها، ترکیبات فنلی، اجزاء گوگرددار و نیز مشتقات فنیل پروپانویید هستند. ترپنوئیدها و فنیل پروپانوییدها اجزای اصلی موجود در اسانس اکثر گیاهان هستند. در بسیاری از موارد مقدار ترپنوئیدها به حدود ۸۰

## ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز ...

عبور نموده و فعالیت‌های درون سلولی را مختل می‌نمایند (۱۲، ۷). از سویی دیگر با تخریب نظم مولکولی ترکیبات غشاء سیتوپلاسمی، نفوذپذیری افزایش می‌یابد که با از دست دادن ATP، تخلیه یون‌ها و کاهش پتانسیل غشاء همراه است (۲).

نیسین اثر بازدارندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم‌مثبت در مقایسه با گرم‌منفی نشان داد، که با گزارشات منتشر شده تطبیق دارد (۳، ۱۳، ۲۰). تفاوت در ساختار دیواره سلولی، گونه و وضعیت فیزیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها و همچنین غلظت نیسین مورد استفاده از جمله عوامل مؤثر بر قدرت مهارکنندگی رشد بیان شده است (۱۳). نیسین پس از نفوذ در دیواره سلولی میکروب با فسفولیپیدهای آنیونی غشاء سلولی به‌ویژه لیپید نوع II واکنش داده و منافذی را ایجاد می‌نماید. پدید آمدن روزنه‌ها موجب خروج ترکیبات حیاتی مانند اسیدهای آمینه، املاح پتاسیم و هیدروژن و ATP می‌شود. نتیجه چنین رخدادی برهم خوردن تعادل اسمتیک و مکانیسم تنظیم pH درون سلولی است که می‌تواند رشد سلولی را متوقف و حتی منجر به مرگ شود (۹).

نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های آزمون شعاع بازدارندگی و MIC، نشان می‌دهد بیشترین بازدارندگی اسانس ریحان، رزماری و زیره سبز به‌ترتیب در برابر سالمونلا تیفی‌موریوم، پسودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس به‌دست آمده است. این مطلب بیان‌کننده این نکته مهم است که اسانس‌ها اثر یکسانی بر سوبه‌های میکروبی ندارند و در انتخاب نوع اسانس می‌بایست به سوبه هدف نیز توجه داشت. با توجه به نتایج این پژوهش احتمالاً اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز بتوانند رشد باکتری‌های مولد فساد را در صنایع غذایی و دارویی کنترل نمایند. که این مهم مستلزم بررسی‌های دقیق، بالینی، اقتصادی در محیط واقعی غذایی است.

### سپاسگزاری

این پژوهش با بهره‌گیری از گرنت شماره UOZ-GR-

همکاران در سال ۲۰۱۹ بررسی و مهم‌ترین اجزاء شیمیایی اسانس  $\alpha$ -پینن (۱۸/۲۲ درصد)، اکسید کاریوفیلین (۱۴/۴۳ درصد)، ۱، ۸- سینئول (۱۴/۱۵ درصد)، کامفن (۱۲/۱۶ درصد) و D- وربنون (۱۱/۲۱ درصد) گزارش گردید (۲۷). در پژوهشی بیشترین ترکیبات اسانس رزماری  $\alpha$ -پینن (۲۴/۹ درصد)، وربنون (۸/۹ درصد)، وربنون (۸/۵ درصد)، ۸، ۱- سینئول (۸/۲ درصد) و ایزوورنون (۸/۱ درصد) بیان شد (۸). در تحقیقی دیگر مهم‌ترین ترکیبات اسانس زیره سبز کومین آلدئید (۳۰/۸ درصد) و  $\gamma$ - ترپینن (۱۵/۴ درصد) بیان شده است (۲۲). نتایج به‌دست آمده از این گزارشات با تحقیق حاضر مشابهت دارند. اختلاف در مقادیر و وجود برخی ترکیبات را می‌توان ناشی از تأثیرگذاری عواملی چون نوع و سن گیاه، ژنتیک، همچنین عوامل محیطی مانند ناحیه جغرافیایی، ویژگی‌های خاک، شرایط آب و هوایی فصلی، نحوه کاشت و داشت و برداشت گیاه، همچنین روش استخراج اسانس و نوع تجهیزات شناسایی مورد استفاده بر اجزا اسانس دانست (۱۲، ۱۸).

اسانس‌های ریحان، رزماری و زیره سبز و نیز نیسین بر مهار رشد تمامی باکتری‌های مورد بررسی مؤثر بودند. گزارشات متعددی از مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، پسودوموناس آئروژنز، لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس و سالمونلا تیفی‌موریوم تحت تأثیر اسانس‌های ریحان (۲، ۱۵، ۲۳)، رزماری (۱۶، ۱۹) و زیره سبز (۲۱، ۳۰) در دسترس است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در همین رابطه گزارش شده ترکیبات ترپنی و فنلیک اسانس‌ها به‌دلیل خاصیت آب‌گریز خود می‌توانند از ساختار دیواره سلولی باکتری‌ها عبور و وارد سلول شوند. اما محتوای لیپوپلی‌ساکاریدی غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی تا حدودی به‌عنوان مانعی در برابر ماکرومولکول‌ها و ترکیبات آب‌گریز عمل می‌کند که می‌تواند آنها را مقاوم‌تر سازد، با این حال ترکیبات کوچک‌مولکول و آب‌دوست از کانال‌های پروتئینی پورین

صنایع غذایی دانشگاه زابل اعلام می‌دارند.

9955 اجرا گردیده است. نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از دست‌انکاران آزمایشگاه علوم و

## References

- 1- Alhaithloul H.A, Soliman M.H, Ameta K.L, El-Esawi M.A, Elkelish A. Changes in eco-physiology, osmolytes, and secondary metabolites of the medicinal plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* subjected to drought and heat stress. *Biomolecules*. 2020; 10(1): 43-64.
- 2- Amor G, Sabbah M, Caputo L, Idbella M, De Feo V, Raffaele P, et al. Basil Essential Oil: Composition, Antimicrobial Properties, and Microencapsulation to Produce Active Chitosan Films for Food Packaging. *Foods*. 2021; 10(1): 1- 16.
- 3- Anumudu C, Hart A, Miri T, Onyeaka H. Review, Recent Advances in the Application of the Antimicrobial Peptide Nisin in the Inactivation of Spore-Forming Bacteria in Foods. *Molecules*. 2021; 26(18): 1-16.
- 4- Bennett S, Said L.B, Lacasse P, Malouin F, Fliiss I. Susceptibility to Nisin, Bactofencin, Pediocin and Reuterin of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* Causing Bovine Mastitis. *Antibiotics*. 2021; 10(11): 1-12.
- 5- Bolouri P, Salami R, Kouhi S, Kordi M, Asgari Lajayer B, Hadian J, et al. Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules*. 2022; 27(24): 8999. [In Persian]
- 6- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *J. Food Microbiol*. 2023; 24(3): 223-253.
- 7- Carvalho M, Albano H. Teixeira P. In Vitro Antimicrobial Activities of Various Essential Oils Against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Food Qual Hazards Control*. 2018; 5(2): 41-48.
- 8- Caputo L, Trotta M, Romaniello A, De Feo V. Chemical Composition and Phytotoxic Activity of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil. *Natural Product Communications*. 2018; 13(10): 1367-1370.
- 9- Duraisamy S, Balakrishnan E, Ranjith S, Husain F, Sathyan A, Peter A.S, et al. Bacteriocin-a potential antimicrobial peptide towards disrupting and preventing biofilm formation in the clinical and environmental locales. *Environ Sci Polut Res*. 2020; 27(36): 44922–44936
- 10- Etemadi R, Moghadam P, Yousefi F. Evaluation of chemical composition and antimicrobial activities of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil on dental caries pathogens. *J Bas Res Med Sci*. 2020; 7(1): 43-49. [In Persian]
- 11- Firouzi A.F, Baghaeifar S, Taheri E, Farhoudi Sefidan Jadid M, Safi M, Seyyed Sani N, et al. Enhanced anticancer potency of doxorubicin in combination with curcumin in gastric adenocarcinoma. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020; 34(6): e22486. [In Persian]
- 12- Fokou B.H.J, Dongmo M.J.P, Boyom F.F. Essential Oil's chemical composition and pharmacological properties. *Intech Open*. 2022; 86573.
- 13- Ghapanvari P, Taheri M, Jalilian F.A, Dehbashi S, Dezfuli A.A.Z, Arabestani M.R. The effect of nisin on the biofilm production, antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Med Res*. 2022; 27(173): 1-18. [In Persian]
- 14- Gurtler J.B, Garner C.M. A review of essential oils as antimicrobials in foods with special emphasis on fresh produce. *J. Food Prot*. 2022; 85(9): 1300-1319.
- 15- Ilic Z.S, Milenkovic L, Sunic L, Tmucic 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(8): 1-12.
- 16- Jedidi S, Alout F, Selmi H, Rtibi K, Sammari H, Sebai H. Antibacterial Capacity and Inhibitory Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oils on Gastrointestinal Transit in Rats. *Act. Sci. Nutr. Health*. 2023; 7(1): 115-120.
- 17- Li X, Gu N, Huang T.Y, Zhong F, Peng G. *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Front Microbiol*. 2023; 13: 1114199.
- 18- Li Z.H, Cai M, Liu Y.S, Sun P.L, Luo S.L. Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules*. 2019; 24(8): 1-10.

**19- Mendez P.O, Martinez A.C, Estrada E.S, Asorey L.G, Sanchez-Vega R, Monterrubio A.L.R, et al.** Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Garlic (*Allium sativum*) Essential Oils and Chipotle Pepper Oleoresin (*Capsicum annum*) on Beef Hamburgers. *Foods*. 2022; 11(1): 1-18.

**20- Moshtaghi H, Rashidimehr A, Shareghi B.** Antimicrobial Activity of Nisin and Lysozyme on Foodborne Pathogens *Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia Coli* at Different pH. *Food Nutr Res*. 2018; 3(4): 193-201. [In Persian]

**21- Moradi A, Davati N, Emamifar A.** Effects of *Cuminum cyminum* L. essential oil and its nanoemulsion on oxidative stability and microbial growth in mayonnaise during storage. *Food Sci Nutr*. 2023; 0:1-13. [In Persian]

**22- Osanloo M, Eskandari Z, Zarenezhad E, Qasemi H, Nematollahi A.** Studying the microbial, chemical, and sensory characteristics of shrimp coated with alginate sodium nanoparticles containing *Zataria multiflora* and *Cuminum cyminum* essential oils. *Food Sci. Nutr*. 2023; 0(0): 1-15. [In Persian]

**23- Najafi ghaghlestani S, Najafi M.A.** Antibacterial properties of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *NFVM*. 2023; 6(1): 40-51. [In Persian]

**24- Purushothaman B, Prasanna Srinivasan R, Suganthi P, Ranganathan B, Gimbin J, Shanmugam K.** A Comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *Nat Med*. 2018; 18(3): 71-83.

**25- Rahnama M, Noorijangi A, Alipour**

**Eskandani M.** The effect of *Cuminum Cyminum* essence in preventing the growth of *Listeria monocytogenes* in the minced meat of *Schizothorax Zarudnyi*. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Science*. 2018; 6(1): 27-36. [In Persian]

**26- Rapp J.H.D, Dhawan S, Gupta S.K, Gupta T.B, Brightwell G.** Molecular detection and characterization of foodborne bacteria: Recent progresses and remaining challenges. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2023; 22(3): 1463-2487.

**27- Sarmoum R, Soumia H, Biche M, Djazouli Z, Zebib B, Merah O.** Effect of Salinity and Water Stress on the Essential Oil Components of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agron*. 2019; 9(5): 1-10.

**28- Shah R, Al Ismaili S.H, Al-Siaby S.S, Al Nasiri A.M, Al Maskari T.H, Jamal A, et al.** Determination of chemical composition of essential oils extracted from conventional and organically grown Basil (*Ocimum Basilicum*) from different geographical regions. *Sarhad J. Agric*. 2022; 38(2): 532-539.

**29- Shahbazi Y, Shavis N.** Antimicrobial effects of *Mentha spicata* essential oil and methanolic carrot extract against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* fish soup. *Pharm Biomed Res*. 2019; 5(1): 32-38.

**30- Walasek-Janusz M, Grzegorzcyk A, Zalewski D, Malm A, Gajcy S, Gruszeck R.** Variation in the Antimicrobial Activity of Essential Oils from Cultivars of *Lavandula angustifolia* and *L. × intermedia*. *Agron*. 2022; 12(12): 1-13.

**31- World Health Organisation (WHO).** Estimating the burden of foodborne diseases. 2022.



## Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of basil (*Ocimum basilicum* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) in comparison with nisin

Mohammad Ali Najafi<sup>1\*</sup>, Arsam Ayinechi<sup>2</sup>, Zabih allah Bahmani<sup>3</sup>, Sara Najafi Qhaghelestani<sup>4</sup>

1- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

2- Master's student, Department of Food Science and Technology, Rodaki Institute of Higher Education, Tonkabon, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Aquatic Processing and Biotechnology, Fisheries Science Research Institute, Bandar Abbas, Iran.

4- PhD Graduate Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: April 16, 2023; Revise: June 4, 2023; Accept: June 25, 2023



10.22034/nfvm.2023.393370.1184



20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

### Summary

Basil, rosemary and cumin are medicinal plants with many food applications. The purpose of this study is to investigate the chemical composition and antibacterial properties of the essential oils of these plants in comparison with nisin on the growth control of the most important food-borne pathogenic bacteria. Essential oil samples were prepared by water distillation method with the help of Clevenger device and its components were identified by Gas chromatography–mass spectrometry. In the following, the antibacterial property of essential oils compared to nisin by the agar diffusion assay, as well as the minimum growth inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (MBC) by microdilution method against strains of the *Staphylococcus aureus* PTCC1337, *Listeria monocytogenes* ATCC19118, *Bacillus cereus* PTCC1857, *Escherichia coli* PTCC1763, *Pseudomonas aerogenes* PTCC1074, and *Salmonella typhimurium* ATCC14028 were investigated. The obtained results showed that the most important compounds in basil essential oil: linalool (52.33%), in rosemary essential oil: 1,8-cineole (17.8%), camphor (16.6%),  $\alpha$ -pinene (13.61%), and in cumin essential oil: cumin-aldehyde (39.67%),  $\gamma$  - terpinen (17.35%) and p-simen (15.96%) were identified. All essential oils and nisin inhibited the growth of target bacteria. The most sensitive bacteria to essential oils of basil, rosemary and cumin were *Salmonella typhimurium* (125  $\mu$ g/ml), *Pseudomonas aerogenes* (31  $\mu$ g/ml) and *Listeria monocytogenes* (125  $\mu$ g/ml), respectively. The antibacterial effect of the essential oil is affected by the type and the target bacterial strain. Basil, rosemary and cumin essential oils can probably be used as suitable substitutes for chemical preservatives in food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** Essential oil, Inhibition, Bacterial growth, Microdilution



# 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