

دوره ۷، شماره ۱
ناشر: دانشگاه زابل

سر دبیر:

تقی زهرایی صالحی؛ tsaleh@ut.ac.ir

مدیر مسئول:

داریوش سعادت؛ saadatdariush@uoz.ac.ir

مدیر اجرایی:

احمد راشکی؛ ah_rashki@usal.es



هیات دبیران:

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

زابل

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهرکرد

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد

افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی زاهدان

مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده

دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد جهانتیغ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه زابل

سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهید باهنر کرمان



کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

وبسایت: nfvm.uoz.ac.ir

پست الکترونیک: nfvm@uoz.ac.ir

پیشگفتار

به نام خدا

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

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

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه تازه‌ها در میکروبی‌شناسی دامپزشکی

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

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

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

شیوه نگارش مقاله:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

نحوه رفرنس نویسی:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می باشد:

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

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

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

* **بحث**

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

مقاله مروری (Review)

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

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

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

مقاله کوتاه (Short Communication)

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

نامه به سردبیر (Letter to Editor)

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

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

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

تعهد نامه

سردبیر 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



دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱-۹


بررسی مقاومت دارویی و فراوانی ژن های بتالاکتاماز *bla_{SHV}* و *bla_{OXA}* در اشریشیاکلی جداسازی شده از جوجه های گوشتی

حسین نوری^۱، محمد جهانتیغ^{۲*}

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

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

دریافت مقاله: ۰۶ اردیبهشت ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۰ خرداد ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۵ تیر ۱۴۰۲

 10.22034/NFVM.2023.393796.1185

چکیده

اشریشیاکلی یکی از شایع ترین عوامل بیماری زا در طیور است که باعث ایجاد کلی باسیلوز می شود. آنتی بیوتیک های بتالاکتام به فراوانی جهت درمان عفونت های ناشی از اشریشیاکلی مورد استفاده قرار می گیرند. تا به امروز تعداد زیادی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) شناسایی شده اند که از آنها می توان به SHV و OXA اشاره نمود که به ترتیب توسط ژن های *bla_{SHV}* و *bla_{OXA}* کددهی می شوند. با توجه به گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی و نیز با در نظر گرفتن اثرات زیان باری که باکتری های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام می توانند بر روی بهداشت عمومی و سلامت حیوانات داشته باشند کنترل و پیشگیری از عفونت های این باکتری دارای اهمیت زیادی است. در مطالعه حاضر ۵۰ جدایه اشریشیاکلی از ۶۰ نمونه سواب کلوآکی جداسازی گردید. نمونه های سواب از جوجه های گوشتی سن ۷ تا ۲۱ روزه مرغداری های سطح شهرستان زابل جمع آوری شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، سفازولین، سفتریوکسیم، سفالوتین، سفتازیدیم و سیفیکسیم انجام شد. همچنین حضور و فراوانی دو ژن *bla_{SHV}* و *bla_{OXA}* با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز در جدایه های اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی مقاومت دارویی نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به سفازولین (۸۰ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به سفتریاکسون (۸ درصد) وجود دارد. فراوانی ژن *bla_{SHV}* و *bla_{OXA}* در نمونه های اشریشیاکلی به ترتیب ۲۴ و صفر درصد بود.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی، مقاومت دارویی، *bla_{SHV}*، *bla_{OXA}*، ESBLs

مقدمه

اشریشیاکلی باکتری گرم‌منفی میله‌ای شکل است که در روده حیوانات خونگرم یافت می‌شود. اغلب گونه‌های اشریشیاکلی بی‌ضرر هستند، اما برخی از انواع آن باعث مسمومیت غذایی در انسان‌ها می‌شوند و گهگاهی شیوع بیماری ناشی از آنها به حذف مواد غذایی مشکوک به آلودگی می‌انجامد. گونه‌های بی‌ضرر این باکتری به‌طور طبیعی در روده انسان وجود دارند و ممکن است با تولید ویتامین K و با پیشگیری از استقرار باکتری‌های آسیب‌رسان درون روده به میزبان سود برسانند. اشریشیاکلی یک جزء عمده در مدفوع است و انتقال مدفوعی- دهانی راه عمده انتقال گونه‌های آسیب‌رسان این باکتری است (۱، ۲، ۳).

کلی‌باسیلوز از مهم‌ترین بیماری‌های پرندگان است. تیپ‌های سرمی متعددی از اشریشیاکلی در محیط حیوانات اهلی و پرنده‌ها وجود دارد. اشریشیاکلی یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا در طیور به شمار می‌رود (۳). این باکتری به‌عنوان عامل بیماری‌زا در انسان، به‌ویژه در بیماران با نقص ایمنی، مطرح بوده و بتالاکتام‌ها به‌وفور جهت درمان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر، شیوع بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (Extended-spectrum beta-lactamases; ESBLs) در بین جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی به‌دست آمده از انسان مورد توجه قرار گرفته است و این مکانیزم مقاومت باعث ایجاد مشکل در درمان بیماری‌های عفونی گردیده است. تا به امروز بیش از ۱۵۰ نوع بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) شناسایی شده‌اند که می‌توان به SHV و OXA اشاره نمود که به‌ترتیب توسط ژن‌های *bla_{SHV}* و *bla_{OXA}* کددهی می‌شوند و هر یک از آنزیم‌های SHV و OXA نیز خود دارای زیرگروه‌هایی هستند. سفالوسپورین‌ها دسته مهمی از داروهای بتالاکتام می‌باشند که هم‌اکنون پنج نسل از آنها تولید شده است و به‌طور وسیع و در کنار سایر داروهای دامی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲، ۴، ۵).

از آنجایی که طیور نقش مهمی در تولید گوشت دارد و نیز با در نظر گرفتن اثرات زیان‌باری که باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌توانند بر روی بهداشت عمومی و سلامت حیوانات داشته باشند و با توجه به درصد بالای مرگ و میر ناشی از این بیماری، کاهش تولید و نیز خسارات ناشی از مصرف دارو، کنترل و پیشگیری از این بیماری از رؤس مهم در مدیریت صنعتی طیور است. لازم به ذکر است که باکتری عفونت‌های متعددی را در طیور مثل سپتی‌سمی، عفونت کیسه زرده و حالت کلی‌گرانولوما را ایجاد می‌کند. میزان تلفات بیماری متغییر و بستگی به نوع آلودگی دارد مثلاً در عفونت کیسه زرده تلفات ممکن است تا ۱۰۰ درصد برسد ولی در کلی‌گرانولوما تلفات انفرادی است (۳). همچنین، با توجه به گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل این بیماری، مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های موجود مقاومت در این باکتری لازم است. در این تحقیق مقاومت دارویی و فراوانی بتالاکتام‌های نوع SHV و OXA (زیرگروه OXA-2) در اشریشیاکلی جداسازی شده از جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از ۶۰ قطعه جوجه گوشتی سن ۷ تا ۲۱ روزه از مرغ‌داری‌های سطح شهرستان زابل و به‌صورت سواب کلواکی انجام گرفت. از ۶۰ نمونه سواب کلواکی جوجه‌ها ۵۰ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شد. جهت جمع‌آوری نمونه‌ها با لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار که حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت مایع (Tryptic soy broth) TSB و سواب استریل با رعایت شرایط استریل و بهداشتی از جوجه‌های سالم نمونه سواب کلواکی گرفته شد و سریعاً به آزمایشگاه میکروبیولوژی دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با آنس روی محیط کشت (Eosin methylene blue agar) EMB Agar کشت داده شد (مرک، آلمان). اشریشیاکلی بر روی محیط EMB کلنی‌هایی به رنگ ارغوانی تیره با جلای

مقدار ۴-۶ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل درون لوله‌های استریل توزیع شد و تعدادی از پرگنه‌های باکتری /اشریشیاکلی توسط آنس استریل درون سرم فیزیولوژی حل شده، به گونه‌ای که کدورت آن معادل کدورت نیم‌مک فارلند شد و در نهایت لوله‌ها شماره‌گذاری شدند و برای کشت در محیط مولر هینتون استفاده شدند (مرک، آلمان).

سبز فلزی ایجاد می‌کند. باکتری قند لاکتوز را تخمیر کرده و اسید تولید می‌کند و اسید موجب کاهش pH در محیط EMB شده و در نتیجه رنگ ارغوانی تیره با جلائی سبز فلزی ایجاد می‌شود. باکتری در محیط کشت (Triple suger iron agar) TSI واکنش اسید/ اسید دارد و H₂S تولید نمی‌کند. از نظر تست IMViC به صورت ایندول مثبت، MR (Methyl red) مثبت، (Voges-Proskauer) VP منفی و سیترات منفی می‌باشد (مرک، آلمان) (۶).

جدول ۱- دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده برای آنتی‌بیوگرام

آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	میزان آنتی‌بیوتیک موجود در هر دیسک (µg)
سفتریاکسون (CEFTRAXON)	CRO 30	۳۰
سفتازیدیم (CEFTAZIDIME)	CAZ 30	۳۰
سفازولین (CEFAZOLIN)	CZ 30	۳۰
سفتیزوکسیم (CEFTIZOXIME)	CT 30	۳۰
سفی‌کسیم (CEFIXIME)	CFM 5	۵
سفالوتین (CEPHALOTHIN)	CF 30	۳۰

method) انجام گردید (۴). ابتدا به وسیله آنس استریل از تک‌کلنی باکتری رشد کرده بر روی محیط EMB برداشته شد و از هر ایزوله به صورت مجزا در محیط LB (Luria Bertoni) به حجم ۵ سی‌سی کشت داده شد. پس از ۱۸-۲۴ ساعت آنکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جدایه‌های مورد نظر در سانتریفیوژ با سرعت ۴۸۰۰-۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و در نهایت مایع رویی آنها تخلیه گردید.

در مرحله‌ی بعد رسوب باکتری با یک میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل یا PBS یک درصد استریل مخلوط و سپس به میکرو تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد. در مرحله بعد میکروتیوپ را در ۴۸۰۰-۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ کرده و مایع رویی تخلیه شد. به‌طور مجدد رسوب باکتری با ۱ سی‌سی آب مقطر دوبار تقطیر استریل مخلوط و در ۴۸۰۰-۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای

برای کشت بر روی محیط مولر هینتون، یک سواب استریل را در مجاورت شعله قرار داده و سوسپانسیون میکروبی به وسیله‌ی آن هم زده شد. سواب به دیواره لوله فشار داده شد تا محلول اضافی از آن گرفته شود. سپس در سطح محیط به صورت یکنواخت بر روی آگار کشت داده شد. در ادامه با استفاده از پنس، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب، ایران) در سطح محیط کشت قرار داده شد (جدول ۱). پس از قرار گرفتن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی برای همه پلیت‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در آنکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند (۴).

سپس با استفاده از خط‌کش قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه گرفته و با استفاده از جدول CLSI (Clinical and laboratory standards institute) (guidelines) میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شد (۷).

استخراج DNA باکتری به روش جوشاندن (Boiling

اتاق سانتریفیوژ شد و در نهایت مایع رویی تخلیه شد. در مرحله‌ی بعدی آزمایش آب مقطر دوبار تقطیر استریل به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به رسوب اضافه گردید و میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت میکروتیوب‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرانجام مایع رویی که دارای DNA بود، به میکروتیوب جدید منتقل گردید و در فریزر ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده‌های بعدی نگهداری گردید (۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): به‌منظور بررسی فراوانی ژن‌های *bla_{SHV}* و *bla_{OXA}* در باکتری‌های جداسازی شده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده گردید. پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق از شرکت پیشگام تهیه شدند. توالی نوکلئوتیدی پرایمر مورد استفاده جهت انجام آزمایش PCR برای شناسایی ژن *bla_{OXA}* و ژن *bla_{SHV}* در جدول ۲- آورده شده است (۸، ۹). حجم محلول استفاده شده برای PCR و برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر جهت PCR برای ژن *bla_{OXA}* و ژن *bla_{SHV}* در جدول ۳ الی ۵ نشان داده شده است.

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول نشان داده شده است.

ژن مورد نظر	اندازه باند (bp)	توالی پرایمر (۵' → ۳')
<i>Bla_{OXA}</i>	۴۸۵	Forward: '-3 AAGAAACGCTACTCGCCTGC → 5
		Reverse: '-3 CCACTCAACCCATCCTACCC → 5
<i>Bla_{SHV}</i>	۶۱۵	Forward: '-3 - GGGTTATTCTTATTTGTCGC' 5
		Reverse: '-3 TTAGCGTTGCCAGTGCTC → 5

جدول ۳- حجم محلول‌های مورد استفاده جهت PCR در جدول نشان داده شده است

مواد مورد نیاز	حجم مورد نیاز (μl)
2x master mix-red	۱۳/۵
Primer (F&R)	۱+۱
DNA (Template)	۲
H2O	۷/۵
جمع کل	۲۵

جدول ۴- برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر جهت PCR برای ژن *bla_{OXA}*

واشرشت‌سازی اولیه	Initial Denaturatuon	C 5min° 94	Cycle 38
واشرشت‌سازی	Denaturatuon	C 1min° 94	
اتصال	Annealing	C 1min° 60	
بسط	Extension	C 45sec° 72	
بسط نهایی	Final Extension	C 5min° 72	

جدول ۵- برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر جهت PCR برای ژن *bla_{SHV}*

واسرشت‌سازی اولیه	Initial Denaturatuon	C 5min° 94	Cycle 30
واسرشت‌سازی	Denaturatuon	C 45sec° 94	
اتصال	Annealing	C 1min° 56	
بسط	Extension	C 1min° 72	
بسط نهایی	Final Extension	C 5min° 72	

جدول ۶- درصد جدایه‌های حساس، نیمه‌حساس و مقاوم/اشریشیاکلی جوجه‌های گوشتی

سفالوتین	سفکسیم	سفتیزوکسیم	سفازولین	سفتازیدیم	سفتریاکسون	
٪۳۶	٪۷۰	٪۷۸	٪۰	٪۵۴	٪۸۸	حساس
٪۴۰	٪۱۲	٪۱۲	٪۲۰	٪۱۰	٪۴	نیمه‌حساس
٪۲۴	٪۱۸	٪۱۰	٪۸۰	٪۳۶	٪۸	مقاوم
٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	جمع کل

معنی‌داری مشاهده شد ($X^2 = 1.3$, $p < 0.001$). چون اختلاف مقاومت بین آنتی‌بیوتیک‌ها در تست آنتی‌بیوگرام وجود دارد لذا نتایج آنالیز آماری از این جهت حائز اهمیت است که نشان می‌دهد این اختلاف تصادفی ناشی از خطاهای میکروبی نیست و کاملاً واقعی می‌باشد. همچنین بر اساس آنالیز آماری، اختلاف نتایج بین آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل اول (سفالوتین و سفازولین) و نسل سوم (سفیکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفتیزوکسیم) کاملاً مشهود است که ناشی از جدیدتر بودن خانواده سفالوسپورین‌های نسل سوم نسبت به نسل اول می‌باشد.

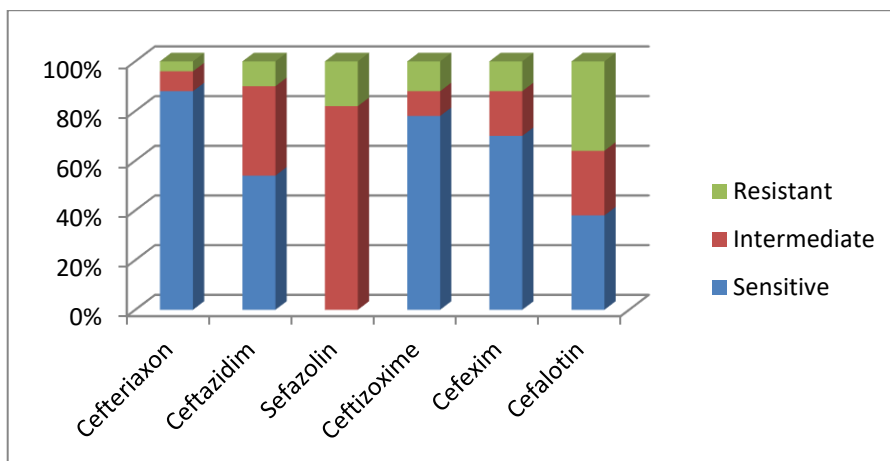
برای الکتروفورز محصول PCR از ژل آگارز یک درصد استفاده گردید.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از بسته "IBM SPSS Statistics 20" از طریق آزمون k-square انجام شد. نتایج به دست آمده از نظر آماری در صورتی که $p < 0.05$ باشد معنی‌دار در نظر گرفته شده‌اند.

نتایج

جدول ۶ درصد جدایه‌های حساس، نیمه‌حساس و مقاوم/اشریشیاکلی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج مقاومت دارویی، مقاومت چندگانه در جدایه‌های اشریشیاکلی یافت نشد.

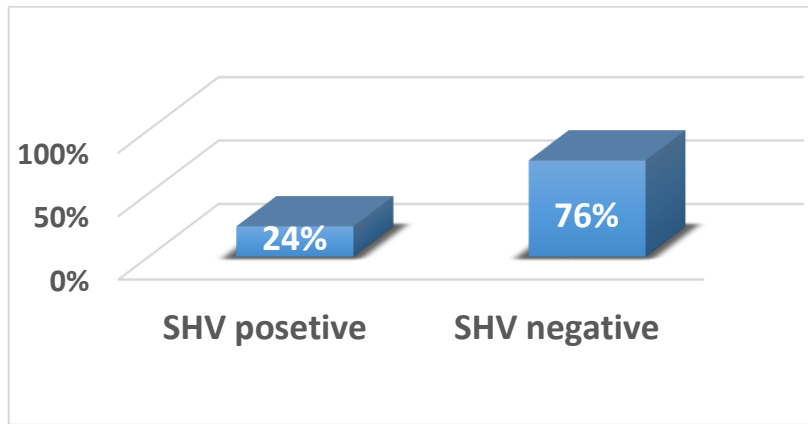
در بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، اختلاف آماری



شکل ۱- میزان مقاومت ضد میکروبی جدایه‌های اشریشیاکلی

درصد (۱۲ نمونه مثبت) می‌باشد. هیچ‌یک از نمونه‌ها دارای ژن *bla_{OXA}* نبود.

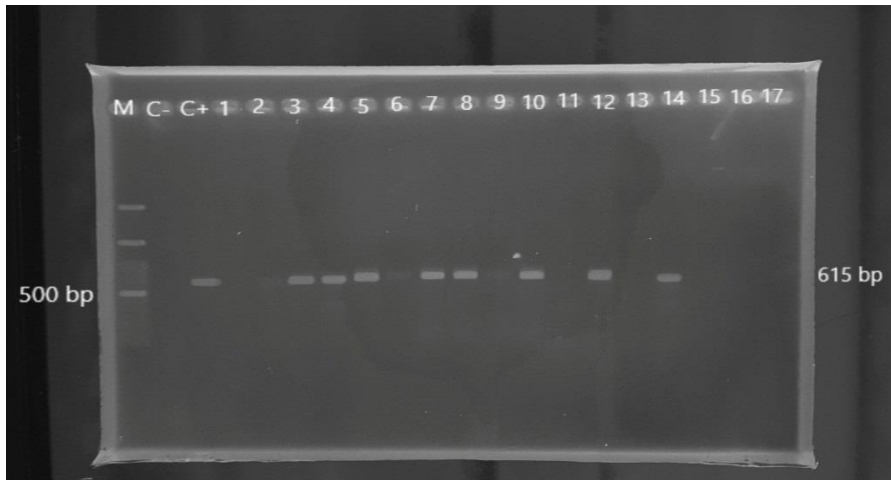
همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، میزان شیوع ژن *bla_{SHV}* در نمونه‌های جوجه‌های گوشتی ۲۴



شکل ۲- نمودار فراوانی ژن *bla_{SHV}* در نمونه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده از جوجه‌های گوشتی

نشان می‌دهد. اندازه این ژن ۶۱۵ جفت باز است.

شکل ۳ نتایج مربوط به PCR ژن *bla_{SHV}* در برخی از اشریشیاکلی‌های جداسازی شده از جوجه‌های گوشتی را



شکل ۳- نتایج مربوط به PCR ژن *bla_{SHV}* / اشریشیاکلی‌های جداسازی شده از جوجه گوشتی. M: مارکر - C: کنترل منفی C+: کنترل مثبت. نمونه‌های ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۳، ۱۱، ۹، ۶، ۲، ۱ منفی و نمونه‌های ۱۴، ۱۲، ۱۰، ۸، ۷، ۵، ۴، ۳ مثبت می‌باشند.

(۱۰). آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها بسیار متنوعند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک، دائماً در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به‌ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به‌طوری که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) شده است (۱۱)، (۱۲، ۱۳، ۱۴). بر اساس عملکرد، آنزیم‌های بتالاکتامازی در چهار کلاس اصلی A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه با بروز مقاومت‌های دارویی در میان باکتری‌های بیماری‌زا، درمان بیماری‌های عفونی با مشکلات فراوانی مواجه شده است. از دیرباز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز مرسوم‌ترین درمان‌های عفونت‌های باکتریایی محسوب می‌شوند. باکتری‌ها با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توانسته‌اند به این کلاس از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت یابند

در مطالعه دیگری، شیوع اشریشیاکلی و سالمونلا و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها در جوجه‌های گوشتی، خوک‌ها، سگ‌ها و کارگران در یک فارم مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی در همه‌ی حیوانات و کارگران شیوع اشریشیاکلی بین ۵۱ تا ۵۳ درصد بود. شیوع اشریشیاکلی در جوجه‌های گوشتی بین ۳۶/۸ تا ۴۷/۶ درصد بود و میزان مقاومت آن به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفتیزوکسیم، انروفلوکساسین، آمپی‌سیلین و اکسی‌تتراسایکلین به ترتیب ۱/۵، ۲/۴، ۲۸/۷، ۶۱/۶ و ۹۱/۵ درصد بود (۱۸).

در مطالعه حاضر نتایج آنتی‌بیوگرام جدایه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده از نمونه‌های جوجه‌های گوشتی بر حسب درصد مقاومت به ترتیب: سفازولین (۸۰ درصد)، سفتازیدیم (۳۶ درصد)، سفالوتین (۱۲ درصد)، سفیکسیم (۱۸ درصد)، سفتیزوکسیم (۱۰ درصد)، سفتریاکسون (۸ درصد) است. نتایج این مطالعه و همچنین سایر مطالعات نشان‌دهنده این است که استفاده از سفالوسپورین‌ها به‌خصوص سفالوسپورین‌های قدیمی‌تر (مانند نسل اول) مثل سفازولین و تا حدودی سفالوتین کارایی لازم را برای درمان عفونت‌های اشریشیاکلی ندارند و باکتری‌ها نسبت به آنها مقاومت پیدا کرده‌اند. دلیل آن احتمالاً استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در طول سالیان متمادی و گذشته می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

بر اساس این طبقه‌بندی، آنزیم SHV در گروه A و آنزیم OXA در گروه D قرار گرفته است. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها، واسطه ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها (نسل سوم) مثل سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و مونوباکتام‌ها مثل آرترونام محسوب می‌شوند. عوامل بازدارنده بتالاکتامازها مانند کلانولینک اسید، سولباکتام و تازوباکتام اثر بازدارندگی بر عملکرد این آنزیم‌ها دارند (۱۵، ۱۶).

مطالعه‌ای برای بررسی مقاومت به سفالوسپورین‌ها در اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا جداسازی شده از جوجه‌های گوشتی انجام شد. در این بررسی تمام سالمونلا انتریکا (۱۰۰ درصد) مقاوم به آمپی‌سیلین و سفازولین و ۷۸/۹ درصد مقاوم به سفتازیدیم بودند و در اشریشیاکلی مولد ESBL، همگی آنها مقاوم به سفتازیدیم و ۶۵/۲ درصد نسبت به سفوکسیتین مقاومت نشان دادند (۱۷).

در مطالعه حاضر از ۶۰ نمونه سواب کلواکی از جوجه‌های گوشتی تهیه شد و در ۵۰ نمونه آن باکتری اشریشیاکلی یافت شد. از این ۵۰ نمونه در ۱۲ نمونه (۲۴ درصد) آن ژن *bla_{SHV}* شناسایی گردید. ولی در هیچ‌کدام از نمونه‌ها ژن *bla_{OXA}* وجود نداشت. لازم به ذکر است که در این تحقیق بتالاکتامازهای نوع SHV، (۹) و OXA، (زیرگروه OXA-2) (۸) در اشریشیاکلی جداسازی شده از جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفته است.

با توجه به مطالعات زیادی که در سرتاسر دنیا انجام گرفته و همچنین نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت ژن *bla_{OXA}* بیشتر در نمونه‌های انسانی یافت می‌شود و در نمونه‌های طیور شیوع کمی به نسبت سایر بتالاکتامازها دارد.

References

1- Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens; 4th Ed.; American Association of Avian

Pathologists, University of Pennsylvania, Kennett Square. 1998, pp: 14-16.

2- Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *J*

Basic Microbial. 2005; 45(5): 403-404.

3- Rajesh C, Rao VDP, Gomez-Villamandos JC, Shukla SK, Banerjee PS. Diseases of poultry and their control. First edition. International Book Distributing Company; 2001.

4- Shahbazi P, Jahantigh M, Salari S. Antibiotic resistance pattern and prevalence of some extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from turkey. *Vet Res Biol Prod*. 2018; 15: 647-679. [In Persian]

5- Jahantigh M, Dizaji RE. Antimicrobial drug resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from chickens farms with colibacillosis infection. *Open J Med Microbiol*. 2015; 5: 159-162. [In Persian]

6- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonar FC. Veterinary Microbiology and Microbial disease. USA: Wiley-Blackwell. 2002.

7- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. In. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

8- Aria M, Farajnia S, Ahadi Khosroshahi S, Naghilli B, Farajnia H, Sanjari A, et al. OXA-10 and OXA-2 ESBLs among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from North West of Iran. *Progress Biolog Sciences*. 2017(7): 191-197. [In Persian]

9- Sadat Seyedjavadi S, Goudarzi M, Sabzehali F. Relation between bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{CTX-M} genes and acute urinary tract infections. *J Acute Dis*. 2016(1): 71-76. [In Persian]

10- AL-Jasser, AM. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global problem. *Kuwait Med J*. 2006; 38(3): 171-185.

11- Bahmani N, Rsmazanzadeh R. Detection of SHV type extended-spectrum B-lactamase and risk factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Pak J Med Sci*. 2013(29): 788-792. [In Persian]

12- Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*. 2008; 13: 19-29.

13- Machado E, Coque TM, Canton R, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62: 296-302.

14- Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent development in β -lactamase and extended spectrum β -lactamases. *BMJ*. 2003; 327: 1209-1213.

15- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1995; 39(6): 1211-1233.

16- AL-Zahrani AJ, Akhtar N. Susceptibility patterns of extended spectrum β -lactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in a teaching hospital. *Pakistan J Med Res*. 2005; 44(2): 64-67.

17- Shahada F, Chuma T, Kosugi G, Kusumoto M, Iwata T, Akiba M. Resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan. *Poultry science*. 2013; 92(6): 1641-1649.

18- Hanson R, Kaneene J, Padungtod P, Hirokawa K, Zeno C. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* in a Farm in Thailand. *Population Medicine Center*. 2014. 23(5): 142-156.



Drug resistance and frequency of beta-lactamases genes of *bla_{SHV}* and *bla_{OXA}* of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens

Hossein Noori¹, Mohammad Jahantigh^{2*}

1- Graduated student, faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

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

Receive: April 26, 2023; Revise: June 10, 2023; Accept: July 6, 2023

 10.22034/NFVM.2023.393796.1185

Summary

Escherichia coli is one of the most common pathogens in poultry that causes Colibacillosis. Until now many Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) were identified that we can refer to SHV and OXA that they are coded by *bla_{SHV}* and *bla_{OXA}*, respectively. Regarding the development of antibiotics resistance and harmful effects of resistant bacteria on beta-lactam antibiotics, they can have an effect on human health and animal health, and due to the high mortality rate of disease, reducing production, as well as damage caused by drug use, it's very important to control and prevention this disease. In the present study, 50 isolates of *Escherichia coli* were collected from 60 cloacal swabs from broiler chicken farms between 7 to 21 days old in Zabol. Antibiogram test was performed by disk diffusion method to investigate drug resistance to Ceftriaxon, Cefazolin, Ceftizoxime, Cephalothin, Ceftazidime and Cefixime. Besides, the frequency of *bla_{SHV}* and *bla_{OXA}* were investigated by PCR. The results showed that the highest resistance was to Cefazolin (80%) and the lowest resistance was to Ceftriaxon (8%). The frequency of *bla_{SHV}* and *bla_{OXA}* genes in *Escherichia coli* isolates was 24% and 0.0%, respectively.

Keywords: *Escherichia coli*, Drug resistance, ESBLs, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*



دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۰-۲۴

ارزیابی حسی و میکروبی خامه قنادی عملگرا (شیرین بیان / موسیلاژ پنیرک / لاکتوباسیلوس پلانتروم)

محمد حسن بیکی^۱، لیلا گلستان^۲، زهره مشاک^{۳*}، محمد احمدی^۲، سیدمهدی جعفری^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد آیت اله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد آیت اله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۳- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۴- استاد، گروه آموزشی مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ بهمن ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۰ اسفند ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۲ اسفند ۱۴۰۲

 10.22034/nfvm.2024.450424.1234

چکیده

این مطالعه با هدف معرفی خامه فراسودمند حاوی عصاره شیرین بیان، موسیلاژ گیاه پنیرک و لاکتوباسیلوس پلانتروم طی مدت ۶۰ روز نگهداری انجام شد. ابتدا لاکتوباسیلوس پلانتروم با آلزینات سدیم و سپس با موسیلاژ گیاه پنیرک استخراج شده به صورت ثانویه پوشش دهی شدند. پس از تهیه خامه قنادی، میکروکپسول های پروبیوتیک (10^7 cfu/g) به تیمارها اضافه شد. در نهایت عصاره شیرین بیان خشک شده در غلظت های (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) و موسیلاژ گیاه پنیرک در غلظت های (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) به ترتیب به منظور جایگزین شکر و چربی به تیمارها اضافه شدند. در مجموع هفت ترکیب فنلی، فلاونوئیدی و کوئرستین شامل جنتیسیک اسید، اسید کافئیک، اسید p-کوماریک، اسید فرولیک، لوتئولین، آپیزین و اسید سیناپیک به غلظت $20 \mu\text{g/mL}$ در عصاره شیرین بیان شناسایی شد. افزودن عصاره شیرین بیان و موسیلاژ گیاه پنیرک سبب کاهش میزان قند کل، کالری و چربی در این تیمارها شد ($p < 0.05$). آلودگی میکروبی (اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کپک و مخمر) در گروه های مورد بررسی طی ۶۰ روز نگهداری مشاهده نشد. ($p > 0.05$). نتایج زنده ماندی پروبیوتیک ها نشان داد، افزودن عصاره گیاه شیرین بیان و موسیلاژ پنیرک سبب افزایش زنده ماندی باکتری های پروبیوتیک می شود ($p < 0.05$). در ارزیابی حسی درصدهای بالای عصاره شیرین بیان و موسیلاژ گیاه پنیرک (۱۵ درصد) از طرف ارزیابان حسی مورد مقبولیت قرار نگرفتند. نمونه های عصاره شیرین بیان و موسیلاژ گیاه پنیرک (۱۰ درصد) پذیرش حسی خوبی از طرف مصرف کننده داشتند ($p < 0.05$) و به عنوان نمونه برتر مطالعه معرفی گردیدند که طی ۴۵ روز با بهترین ارزیابی حسی و میکروبی، اثرات فراسودمند خود را برای مصرف کننده نشان دادند.

واژگان کلیدی: خامه قنادی، لاکتوباسیلوس پلانتروم، عصاره شیرین بیان، موسیلاژ پنیرک، ارزیابی

مقدمه

با تغییرالگوی رفتاری مصرف‌کننده نسبت به مصرف محصولات غذایی سالم و فراسودمند، شیر و فرآورده‌های آن فرصت‌های متعددی برای محققان در جهت توسعه محصولات با خواص فراسودمند و زیست‌فعال را فراهم کردند (۱). خامه قنادی یک نوع امولسیون روغن در آب می‌باشد که در اثر همزدن، هوا به درون بافت آن نفوذ می‌کند و کف ایجاد می‌کند. در طی همزدن، حباب‌های هوا بین چربی و بخش شیر پراکنده شده و تا حدودی توسط فاز چربی احاطه می‌شود. هر چقدر زمان مخلوط کردن بیشتر شود حباب‌های هوا کوچک‌تر شده و تجمع چربی در اطراف آنها افزایش می‌یابد و در نتیجه، حجم کف به همان میزان افزایش می‌یابد و بافت آن سفت‌تر می‌شود. اگر مدت زمان همزدن خامه بیش از اندازه باشد، گلبول‌های چربی با هم یکی شده و شکستن حباب‌های هوا اتفاق می‌افتد، که در پی آن، متلاشی شدن ساختار کف و کاهش هوادهی را به دنبال دارد. این نوع کرم که با نام مینارین نیز به فروش می‌رسد دارای ۳۰ تا ۴۰ درصد چربی (۴۰ درصد) است (۲، ۳). با توجه به افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در مورد سلامتی، تولیدکنندگان مواد غذایی به تولید محصولات کم‌چرب به دلیل کاهش کلسترول و کاهش خطر بیماری عروق کرونر قلب در انسان روی آورده‌اند (۴). بدین منظور، بدون تغییر در ساختار غذا، بافت و احساس دهانی، انواع مختلفی از جایگزین‌های مشتق شده از منابع طبیعی به‌عنوان جایگزین‌های چربی موثر در مواد غذایی کلونیدی پدیدار شده‌اند (۵). گیاه پنیرک (*neglecta Malva*) یک گیاه علفی یکساله از رده *Malva* و خانواده *Malvaceae* است. این گیاه حاوی مقادیر زیادی کربوهیدرات، پروتئین و مقادیر کمی روغن و همچنین رطوبت و خاکستر است همچنین مقادیر قابل توجهی آنتی‌اکسیدان از جمله اسکوربیک اسید، بتاکاروتن، α -توکوفرول و گلوکوتانیون، مواد معدنی مانند آهن، مس، روی، فسفر و منگنز در گیاه پنیرک وجود دارد. فیتوکمیکال‌های کلیدی موجود در

گیاه پنیرک شامل استرول‌ها، فلاونوئیدها، ترکیبات پلی‌فنلی و تریپن‌ها هستند. همچنین ریشه‌ها (۱۱-۵ درصد)، گل‌ها (۱۰-۶ درصد)، برگ (۲۶ درصد) و دم‌برگ (۲۱ درصد) گیاه پنیرک حاوی موسیلاژ است (۶). موسیلاژها عمدتاً از مجموعه‌ای از پلی‌ساکاریدهای پلیمری با وزن مولکولی بالا تشکیل شده‌اند که به اسیدهای آلی متصل شده‌اند و به دلیل ساختار آنیونی خود می‌توانند با سایر پلیمرهای کاتیونی تعامل داشته باشند و در نتیجه می‌توانند به‌عنوان یک عامل افزودنی مواد غذایی، جایگزین چربی، امولسیفایر و تثبیت‌کننده در صنایع غذایی استفاده شوند (۷).

ساکارز (که بیشتر با نام شکر شناخته می‌شود) نیز از ترکیبات اصلی خامه قنادی است. کاهش قند محصولات لبنی برای کاهش قند دریافتی ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، برای چندین دهه از شیرین‌کننده‌های طبیعی برای افزایش طعم غذا و جذب مصرف‌کنندگان استفاده می‌شود (۸). گیاه شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza sp.* از جمله گیاهان علفی است. ۵۰ درصد وزن خشک ریشه شیرین‌بیان قندهای محلول در آب (۱۵-۵ درصد) گلوکز، ساکارز و مانیتول، نشاسته (۳۰-۲۵ درصد)، گلیسیریزین (۱۰-۱۶ درصد)، آمین‌ها (۱-۲ درصد) آسپاراژین، بتائین و کولین) و استرول‌ها (استیگماسترول و بتا سیتوسترول) است (۹). گلیسیریزین با فرمول شیمیایی $C_{42}H_{62}O_{16}$ ترکیب اصلی و تنها ترکیب ساپونینی در ریشه گیاه شیرین‌بیان است که حدود ۶ تا ۱۴ درصد و گاهی تا ۲۰ درصد وزن خشک ریشه را تشکیل می‌دهد. این ماده به‌عنوان یک داروی گیاهی سنتی در کشورهای آسیایی و به‌عنوان شیرین‌کننده و طعم‌دهنده در آب‌نبات‌ها، غذاها و نوشیدنی‌ها در آمریکا و اروپا استفاده می‌شود. قدرت شیرین‌کنندگی گلیسیریزین ۵۰ تا ۱۰۰ برابر ساکارز و دارای شیرینی آهسته رهشی* است و به مدت طولانی طعم آن در دهان باقی می‌ماند.

* Slow Sweetness

ارزیابی حسی و میکروبی خامه قنادی عملگرا (شیرین بیان / موسیلاژ پنیرک ...)

سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم انتخاب شد و با پوشش آلزینات سدیم ریزپوشانی شد. پس از تهیه میکروکپسول‌های پروبیوتیک در خامه قنادی عملگرا، عصاره ریشه شیرین بیان به‌عنوان جایگزین شکر و موسیلاژ گیاه پنیرک به‌عنوان جایگزین چربی استفاده شد و خواص فیزیکوشیمیایی (قند، چربی و کالری کل)، میکروبی (اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کپک و مخمر) و بقاء پروبیوتیک‌ها همچنین خواص حسی (مزه، بو، رنگ بافت و پذیرش کلی) طی مدت زمان ماندگاری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه: گیاه شیرین بیان از عطاری‌های گرگان در فصل زمستان و گیاه پنیرک صغیر از بازار محلی البرز خریداری شدند و پس از تأیید پژوهشکده گیاهان دارویی (واقع در استان البرز) جهت انجام تحقیق استفاده شدند. سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC 1896 به‌صورت ویال‌های لیوفیلیزه ۱ گرمی (10^{12} CFU/Sachet) از مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های صنعتی ایران تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck (آلمان) و محیط‌های کشت استفاده شده از شرکت Q-Lab (کانادا) خریداری شدند.

تهیه عصاره گیاه شیرین بیان: پس از تمیز کردن ریشه‌های گیاه از گل و لای، به کمک قیچی باغبانی به قطعات کوچک تقسیم شد. قطعات ریشه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ هفته خشک شدند. سپس با آسیاب چکشی پودر و درکیسه‌های پلی‌اتیلنی در دمای ۴- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج عصاره شیرین بیان، ۵ گرم از نمونه پودر شده با حلال آب در دستگاه سوکسله (اوج آزما پلاست، ایران) به مدت ۴ ساعت قرار گرفت. عصاره به‌دست آمده در دستگاه تقطیر تغلیظ و به کمک فریز درایر (Martin christ، آلمان) خشک گردید (۱۴).

تهیه موسیلاژ گیاه پنیرک صغیر: ابتدا برگ‌ها و

گلیسیریزین به‌عنوان شیرین‌کننده بدون ایجاد بیماری و عوارضی همچون دیابت، پوسیدگی دندان است و در صنایع غذایی کاربرد دارد (۱۰).

محصولات لبنی رایج‌ترین حامل‌های پروبیوتیک هستند. با این حال، پذیرش مصرف‌کننده و بقای پروبیوتیک‌ها در طول ذخیره‌سازی باید در هنگام ساخت یک محصول پروبیوتیک یا همزیست در نظر گرفته شود. دو معیار مهم برای اثربخشی و موفقیت محصولات پروبیوتیک و پری‌بیوتیک، پذیرش مصرف‌کننده و بقای میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک در طول تولید و نگهداری است (۱۱). ریزپوشانی* یک سیستم مؤثر برای بهبود زنده ماندن پروبیوتیک‌ها در این شرایط است. این ترکیبات فراسودمند همچنین تمایل دارند با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماتریکس تداخل کنند و خواص رئولوژیکی و بافتی را تغییر دهند (۱).

آزمایش میکروبی مواد غذایی یک فعالیت مهم برای بررسی عدم وجود پاتوژن‌ها و همچنین اقدامات کنترلی در کاهش شیوع پاتوژن‌ها به سطوح قابل قبول می‌باشد. کنترل اجباری میکروارگانسیم‌های شاخص بهداشتی، به‌طور غیر مستقیم نشانگر آلودگی بیولوژیکی با میکروارگانسیم‌ها است. بنابراین حضور، میکروارگانسیم‌ها خارج از محدوده استانداردهای مربوطه نشان‌دهنده وجود احتمالی میکروب‌های خاص است (۱۲). مطالعات میکروبی امولسیون‌های روغنی (مانند خامه قنادی) حوزه مهمی از تحقیقات غذایی است که در سال‌های اخیر به‌دلیل افزایش تقاضا برای محصولات غذایی پایدار و ایمن مورد توجه قرار گرفته است. آلودگی میکروبی این دسته از مواد غذایی می‌تواند منجر به تغییراتی در خواص شیمیایی و فیزیکی آن گردد (نظیر اسیدیته و قوام، که می‌تواند سبب ناپایداری و جدا شدن فازهای چربی و آب شود) (۱۳). بنابراین این مطالعه با هدف امکان‌سنجی تولید خامه قنادی عملگرا پروبیوتیک انجام شد. برای این منظور

سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه ساکن باقی ماند تا حباب هوا از سیستم خارج شود (تمام مراحل در عرض ۱ ساعت به صورت هوازی پردازش می‌شوند تا قرار گرفتن در معرض اکسیژن محدود شود) (۱۶).

تهیه خامه قنادی عملگرا فراسودمند: خامه قنادی در آزمایشگاه سنجش پاسارگارد واقع در پارک علم و فناوری دانشگاه تهران تهیه شد. جهت تهیه خامه قنادی ابتدا درصد چربی خامه خروجی از سپراتور با شیر روی ۳۰ درصد تنظیم شد. سپس شیر روی پلیت گرم و مواد خشک شکر (گلستان، ایران)، کنسانتره پروتئین آب پنیر (پگاه، ایران)، وانیل (گله‌ها، ایران)، عصاره شیرین بیان خشک شده به شیر اضافه و همزده شد. در نهایت خامه به شیر اضافه و کاملاً محلول شد. جهت پاستوریزه کردن نمونه‌ها، تیمارها در بن‌ماری (Interscience، فرانسه) با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری و سپس بلافاصله درون آب سرد قرار داده شدند. میکروکپسول‌های پروبیوتیک با میزان 10^7 cfu/g به تمامی تیمارها افزوده شد. نمونه‌های تولیدی درون ظروف پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال قرار گرفت. این عمل به منظور افزایش تبلور چربی و تقویت تشکیل ساختار کف در عمل همزدن انجام گرفت (۱۷). موسیلاژ پنیرک و عصاره شیرین بیان خشک شده قبل از پاستوریزاسیون به نمونه‌های تولیدی خامه‌های عملگرا بر اساس فرمولاسیون ارائه شده در جدول ۱ اضافه شدند.

ساقه‌های پنیرک، خشک و آسیاب شدند. حذف چربی از نمونه، با ۲۰۰ میلی‌لیتر هگزان به مدت یک ساعت و حذف پروتئین آن با ۰/۱ درصد تری‌کلرواستیک اسید انجام شد. مخلوط به دست آمده با سرعت ۱۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) شد. محلول جدا شده با حجم ۲ برابر الکل اتیلیک ۹۶ درصد مخلوط شد و صمغ به صورت رسوب از فاز مایع جدا گردید. رسوب حاصله در آون با دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک شد (۱۵).

تهیه میکروکپسول‌های پروبیوتیک: ابتدا سوبه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت MRS به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری (Binder، آلمان) شد. یک کلنی انتخاب و در ۴۰ میلی‌لیتر MRS broth تازه به مدت ۲۴ ساعت به صورت بی‌هوازی تلقیح شد. شرایط بی‌هوازی با استفاده از یک محفظه بی‌هوازی ($N_2 = 82\%$ درصد، $CO_2 = 10\%$ درصد و $H_2 = 7\%$ درصد) در تمام مدت رشد حفظ شد. جهت میکروکپسول باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با پوشش آلژینات سدیم ابتدا یک محلول سورفکتانت آبی با پراکندگی ۱ درصد (وزنی/وزنی) Tween 80 در محلول بافر فسفات ۰/۵ میلی‌مولار (pH = 7) تهیه شد. سپس یک امولسیون روغن در آب حاوی قطرات نسبتاً بزرگ با مخلوط کردن ۱۰ درصد (وزنی/وزنی) روغن ذرت (لادن، ایران) و ۹۰ درصد (وزنی/وزنی) محلول سورفکتانت با مخلوط‌کن (Labinco، هند) به مدت ۲ دقیقه تهیه شد.

جدول ۱- فرمولاسیون بر حسب درصد خامه‌های قنادی عملگرا فراسودمند

کد تیمار	شکر	کنسانتره پروتئین شیر	وانیل	پودر شیرین بیان	شیر	خامه	موسیلاژ پنیرک	پروبیوتیک
T ₁	۲۰	۰/۲	۰/۱	۰	۱/۵	۷۶/۲	۰	میکروکپسوله
T ₂	۱۵	۰/۲	۰/۱	۵	۱/۵	۷۶/۲	۰	میکروکپسوله
T ₃	۱۵	۰/۲	۰/۱	۵	۱/۵	۷۱/۲	۵	میکروکپسوله
T ₄	۱۰	۰/۲	۰/۱	۱۰	۱/۵	۷۶/۲	۰	میکروکپسوله
T ₅	۱۰	۰/۲	۰/۱	۱۰	۱/۵	۶۶/۲	۱۰	میکروکپسوله
T ₆	۵	۰/۲	۰/۱	۱۵	۱/۵	۷۶/۲	۰	میکروکپسوله
T ₇	۵	۰/۲	۰/۱	۱۵	۱/۵	۶۱/۲	۱۵	میکروکپسوله

شناسایی ترکیبات عصاره گیاه شیرین‌بیان

HPLC* آنالیز HPLC با Beckman HPLC با پمپ مدل ۱۲۷، آشکارساز UV مدل ۱۶۶ و سیستم عامل ۳۲ KARAT Software انجام شد. ترکیبات فنلی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با سرعت کم ۱ میلی‌متر در دقیقه شناسایی شدند. کارکرد ستون دستگاه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تنظیم شده بود. جداسازی در یک سیستم پمپاژ دوگانه با تغییر نسبت ۲/۵ درصد (v/v) اسید استیک در آب (فاز متحرک A) و ۷۰ درصد متانول در آب (فاز متحرک B) انجام شد. برنامه شستشوی گرادیان حلال به شرح زیر بود: ۱۰ تا ۲۶ درصد (v/v) B در ۱۰ دقیقه، تا ۷۰ درصد B در ۲۰ دقیقه و در نهایت تا ۹۰ درصد B در ۲۵ تا ۳۱ دقیقه. حجم تزریق برای همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بود. ترکیبات فنلی با تطبیق زمان ماند و ویژگی‌های طیفی آنها با استانداردها آنالیز شدند (۱۸).

تعیین ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی خامه قنادی:

چربی و قند کل نمونه‌ها بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۱ (۱۳۹۸) و میزان کالری کل با استفاده از دستگاه بمب کالری‌متر بر اساس روش Ayoubi و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد (۲۰، ۱۷، ۱۹).

آزمون میکروبی: برای کلیه آزمون‌های میکروبی در

ابتدا رقت‌های متوالی ده برابر تهیه شد. جهت شمارش کپک و مخمر، ۱ میلی‌لیتر از رقت اولیه (10^{-1}) تهیه شده به پلیت سترون منتقل شد؛ سپس ۱۲ تا ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت کلرامفنیکل آگار[□] به درون پلیت اضافه شد. سپس روی سطح صاف و خنک قرار گرفته تا جامد شدند. پلیت‌ها به صورت وارونه در دمای 1 ± 25 درجه سلسیوس به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد (۲۱)، جهت شناسایی باکتری /شریشیالکی ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از رقت یک‌دهم نمونه‌ها در مجاورت شعله به سه لوله آزمایش حاوی ۱۰

میلی‌لیتر محیط کشت غنی‌کننده بریلیانت گرین بایل لاکتوز برات (دو برابر غلظت) ریخته شد. سه لوله آزمایش کوچک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت غنی‌کننده (با غلظت معمولی) آماده و به هرکدام ۱ میلی‌لیتر از رقت یک‌دهم و به هرکدام از سه لوله دیگر ۱ میلی‌لیتر از رقت یک‌صدم در مجاورت شعله اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. لوله‌های حاوی گاز در لوله دورهام و کدر که با چشم غیر مسلح قابل تشخیص باشند با استفاده از جدول MPN قرائت شدند. از لوله‌های گرمخانه‌گذاری شده که تشکیل گاز داده بودند، با حلقه کشت درون آب پیتونه و لوله‌های بریلیانت گرین بایل لاکتوز برات حاوی لوله دورهام، کشت داده شد. (گرمخانه‌گذاری در ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت). در نهایت ۰/۵ میلی‌لیتر معرف کواکس به لوله آب پیتونه اضافه و پس از ۱ دقیقه آشکار شدن حلقه قرمز رنگ و ایجاد کدورت و گاز در لوله دیگر نشان‌دهنده وجود /شریشیالکی در نمونه‌ها می‌باشد (۲۲). جهت شمارش استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۱ میلی‌لیتر از لوله‌های رقت‌های متوالی ده برابر از 10^{-3} تا 10^{-1} به پلیت‌های حاوی محیط کشت بردپارکر آگار[□] منتقل و کشت سطحی داده شدند؛ سپس پلیت‌ها به صورت وارونه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز گرمخانه‌گذاری شد (۲۳) پس از پایان گرمخانه‌گذاری میزان پرگنه‌ها شمارش و بر اساس Logcfu/g گزارش شد.

زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در زمان نگهداری:

میکروژل‌های آلژینات مرطوب بارگیری شده با لاکتوباسیلوس پلانناروم در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۸ روز تحت شرایط هوازای نگهداری شدند تا ذخیره‌سازی طولانی‌مدت محصولات تجاری را تقلید کنند. زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک طی ۶۰ روز زمان نگهداری (روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰) بررسی شدند (۱۶).

ویژگی ارگانولپتیکی: پس از آموزش‌های مقدماتی

*High-performance liquid chromatography

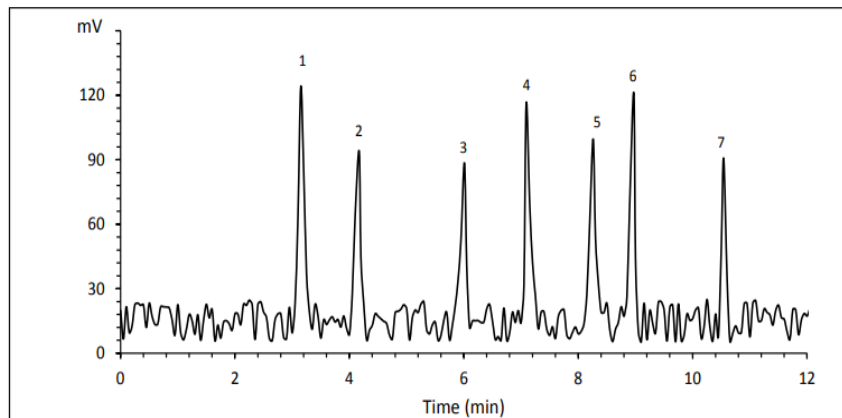
†agar Chloramphenicol

‡Baird-Parker Agar

آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین شد. نتایج آزمون‌های آماری به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ برای مقایسه داده‌ها در نظر گرفته شد. از سوی دیگر، برای تجزیه و تحلیل آماری ارزیابی حسی تیمارها از روش ناپارامتری کروسکال والیس برای مقایسه تیمارها در یک زمان مشخص نگهداری و از روش ناپارامتری فریدمن برای مقایسه یک تیمار طی زمان نگهداری (ماندگاری) استفاده گردید.

نتایج

شکل ۱ ترکیبات شناسایی شده عصاره گیاه شیرین‌بیان به کمک HPLC را نشان می‌دهد. در مجموع هفت ترکیب فنلی به غلظت یکسان در عصاره شیرین‌بیان شناسایی شد.



شکل ۱- ترکیبات فنلی شناسایی شده در عصاره شیرین‌بیان با HPLC

کمترین میزان چربی در نمونه‌های T_7 (نمونه‌های حاوی ۱۵ درصد عصاره و ۱۵ درصد موسیلاژ) مشاهده شد ($p < 0/05$). به دنبال آن نمونه‌های T_5 و در نهایت نمونه‌های T_3 مقدار چربی کمتری داشتند ($p < 0/05$). در سایر تیمارها تفاوت آمار معنادار مشاهده نشد ($p > 0/05$). مطابق جدول ۲، بیشترین میزان کالری در نمونه‌های T_1 (نمونه‌های حاوی ۲۰ درصد شکر) مشاهده شد ($p < 0/05$). افزودن عصاره شیرین‌بیان و موسیلاژ گیاه پنیرک به‌طور

تعداد ۳۰ نفر ارزیاب (۱۵ مرد و ۱۵ زن با محدوده سنی ۲۰-۲۵ سال) جهت ویژگی‌های حسی خامه قنادی (شامل مزه، بو، رنگ بافت و پذیرش کلی) با استفاده از روش هدونیک ۵ نقطه‌ای انتخاب شدند به این ترتیب که حداکثر نمره ۵ به منزله عالی بودن نمونه و ۱ به‌عنوان کمترین نمره نشان‌دهنده بد بودن کیفیت نمونه بود (۲۴). ویژگی ارگانولپتیکی خامه‌های قنادی طی مدت زمان ۶۰ روز نگهداری در یخچال (روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به‌دست آمده در آزمایشات، به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار در سه بار تکرار بیان شد. داده‌های آزمایشات با تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مقایسه و تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها (در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار باشد) با استفاده از

میزان چربی، قند کل و میزان کالری کل نمونه‌های خامه قنادی فراسودمند طی ۶۰ روز نگهداری در جدول ۲ نشان داده شده است.

بالاترین قند کل در نمونه‌های T_1 (نمونه‌های حاوی ۲۰ درصد شکر) مشاهده شد ($p < 0/05$). افزودن عصاره و موسیلاژ سبب کاهش معنادار قند کل شد ($p < 0/05$). این کاهش با افزایش درصد جایگزینی عصاره شیرین‌بیان و موسیلاژ معنی‌دارتر بود ($p < 0/05$). نتایج نشان داد

ارزیابی حسی و میکروبی خامه قنادی عملگرا (شیرین بیان / موسیلاژ پنیرک ...)

معناداری میزان کالری نمونه‌ها را کاهش داد ($p < 0.05$). میزان کالری در نمونه‌های T7 (نمونه‌های حاوی ۱۵ درصد عصاره و موسیلاژ) مشاهده شد ($p < 0.05$).

جدول ۲- میانگین نتایج قند، چربی، قند کل، کالری نمونه‌های خامه قنادی عملگرا پروبیوتیک

تیما	قند کل (درصد)	چربی (درصد)	کالری (Kj/ol)
T ₁	۱۹/۵۳ ± ۰/۴۸ ^a	۲۶/۱۰ ± ۰/۱۰ ^a	۳۳۳/۹۵ ± ۱/۵۳ ^a
T ₂	۱۵/۰۲ ± ۰/۱۸ ^b	۲۶/۱۰ ± ۰/۱۰ ^a	۳۱۵/۵۲ ± ۰/۶۳ ^b
T ₃	۱۴/۸۸ ± ۰/۰۷ ^b	۲۳/۵۰ ± ۰/۱۰ ^b	۲۹۰/۷۶ ± ۱/۲۰ ^d
T ₄	۹/۶۹ ± ۰/۱۵ ^c	۲۶/۱۰ ± ۰/۱۰ ^a	۲۹۴/۲۵ ± ۰/۵۶ ^c
T ₅	۹/۶۱ ± ۰/۰۷ ^b	۲۲/۸۳ ± ۰/۰۶ ^c	۲۶۲/۷۶ ± ۰/۸۵ ^f
T ₆	۵/۴۴ ± ۰/۱۰ ^d	۲۶/۰۷ ± ۰/۱۲ ^a	۲۷۶/۸۹ ± ۰/۰۰ ^e
T ₇	۵/۴۲ ± ۰/۰۷ ^d	۲۰/۲۳ ± ۰/۰۶ ^d	۲۲۱/۷۴ ± ۰/۴۷ ^g

*حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در هر ستون است ($p < 0.05$).

آماري معنادار در زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مشاهده شد ($p < 0.05$). روند کاهشی معنادار زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در تمام گروه‌های مورد بررسی طی ۶۰ روز ماندگاری گزارش شد ($p < 0.05$). افزودن عصاره گیاه شیرین بیان و موسیلاژ پنیرک سبب افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک شد ($p < 0.05$). بالاترین زنده‌مانی پروبیوتک طی ۶۰ روز نگهداری در نمونه T7 مشاهده شد ($p < 0.05$).

نتایج میکروبی در خامه عملگرا طی ۶۰ روز نگهداری نشان داد در هیچ گروه مورد بررسی طی ۶۰ روز رشد باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کپک و مخمر مشاهده نشد ($p > 0.05$).

نتایج زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در خامه عملگرا طی ۶۰ روز نگهداری (جدول ۳) نشان داد، در روز اول تمامی تیمارهای زنده‌مانی یکسان و بدون تفاوت آماری معنادار بود ($p > 0.05$). از روز ۱۵ آزمایش اختلاف

جدول ۳- میانگین نتایج زنده‌مانی پروبیوتیکها (Logcfu/g) در خامه عملگرا طی ۶۰ روز ماندگاری

تیما	روز ۱	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
T ₁	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۹/۱۶ ± ۰/۰۲ ^{Be}	۸/۹۸ ± ۰/۰۳ ^{Cd}	۷/۸۷ ± ۰/۰۲ ^{Dd}	۷/۱۷ ± ۰/۰۲ ^{Eg}
T ₂	۹/۳۲ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۹/۱۹ ± ۰/۰۱ ^{Bde}	۹/۰۷ ± ۰/۰۳ ^{Cc}	۸/۰۶ ± ۰/۰۲ ^{Dc}	۷/۲۶ ± ۰/۰۱ ^{Ef}
T ₃	۹/۳۳ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	۹/۲۱ ± ۰/۰۲ ^{Bd}	۹/۱۵ ± ۰/۰۱ ^{Cb}	۸/۲۳ ± ۰/۰۱ ^{Db}	۷/۴۰ ± ۰/۰۰ ^{Ec}
T ₄	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۹/۲۲ ± ۰/۰۱ ^{Bcd}	۹/۱۲ ± ۰/۰۳ ^{Cb}	۸/۰۹ ± ۰/۰۱ ^{Dc}	۷/۳۳ ± ۰/۰۰ ^{Ee}
T ₅	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۹/۲۷ ± ۰/۰۱ ^{Bab}	۹/۲۳ ± ۰/۰۳ ^{Ca}	۸/۲۷ ± ۰/۰۱ ^{Dab}	۷/۶۶ ± ۰/۰۴ ^{Eb}
T ₆	۹/۳۲ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	۹/۲۵ ± ۰/۰۲ ^{Bbc}	۹/۱۵ ± ۰/۰۲ ^{Cb}	۸/۱۹ ± ۰/۰۲ ^{Db}	۷/۳۷ ± ۰/۰۱ ^{Ed}
T ₇	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۹/۲۹ ± ۰/۰۱ ^{Ba}	۹/۲۶ ± ۰/۰۲ ^{Ba}	۸/۳۵ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۷/۸۶ ± ۰/۰۳ ^{Da}

شاهد مشاهده نشد ($p > 0.05$). با این حال افزایش عصاره از ۵ تا ۱۵ درصد سبب کاهش معنادار ارزیابی حسی مزه نمونه‌ها شد ($p < 0.05$). افزودن موسیلاژ پنیرک تا ۵ درصد تفاوت جزئی در ارزیابی حسی طعم نمونه‌ها را نشان

نتایج خواص ارگانولپتیکی نمونه‌های خامه قنادی عملگرا در جدول ۴ نشان داده شده است. مطابق نتایج افزودن عصاره شیرین بیان تا ۵ درصد تأثیر معناداری بر ارزیابی حسی مزه نمونه خامه قنادی نسبت به نمونه

بافت طی ۶۰ روز نگهداری خامه قنادی در تمام نمونه‌ها گزارش شد ($p < 0/05$). نتایج نشان داد نمونه‌های حاوی غلظت‌های بالاتر عصاره شیرین‌بیان و موسیلاژ طی مدت زمان طولانی‌تری بالاترین امتیاز ارزیابی بافت را داشتند ($p < 0/05$).

بررسی نتایج ارزیابی حسی پذیرش کلی نشان داد (جدول ۴) در روز اول تفاوت آماری معنادار بین تیمارهای مختلف به استثناء نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۱۵ درصد عصاره شیرین‌بیان و موسیلاژ، مشاهده نشد ($p < 0/05$). با این حال، کاهش ارزیابی حسی پذیرش کلی طی ۶۰ روز نگهداری خامه قنادی در تمام نمونه‌ها گزارش شد ($p < 0/05$). نتایج نشان داد نمونه‌های حاوی ۱۵ درصد عصاره شیرین‌بیان بالاترین امتیاز ارزیابی پذیرش کلی را داشتند ($p < 0/05$).

داد ($p < 0/05$). با این حال در غلظت‌های بالاتر موسیلاژ نیز کاهش امتیاز ارزیابی حسی مزه نیز مشاهده شد ($p < 0/05$).

بر اساس نتایج جدول ۴، در روز اول تفاوت آماری معنادار ارزیابی حسی بو و رنگ بین تیمارهای مختلف خامه عملگرا به استثناء نمونه‌های حاوی ۱۰ و ۱۵ درصد عصاره شیرین‌بیان مشاهده نشد ($p < 0/05$). با این حال، کاهش ارزیابی حسی بو طی ۶۰ روز نگهداری خامه قنادی در تمام نمونه‌ها گزارش شد ($p < 0/05$). نتایج نشان داد نمونه‌های حاوی غلظت‌های بالاتر عصاره شیرین‌بیان و موسیلاژ طی مدت زمان طولانی‌تری بالاترین امتیاز ارزیابی بو را داشتند ($p < 0/05$).

نتایج نشان داد (جدول ۴) افزودن عصاره شیرین‌بیان و موسیلاژ سبب افزایش معنادار ارزیابی حسی بافت نمونه‌ها شد ($p < 0/05$). با این حال، کاهش ارزیابی حسی

جدول ۴- میانگین نتایج خواص ارگانولپتیکی نمونه‌های خامه قنادی عملگرا پروبیوتیک

پارامتر	تیمار	روز ۱	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
۱	T ₁	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Db}
	T ₂	۴/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Aab}	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{ABa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{BCa}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{CDa}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Dab}
	T ₃	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Abc}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Abc}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bbc}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{BCbc}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cb}
	T ₄	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{ABcd}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Aabc}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{BCabc}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{CDbc}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Dab}
	T ₅	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Accd}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Abc}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bbc}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bbc}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}
	T ₆	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Accd}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Abc}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bbc}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bbc}	۲/۰۰ ± ۱/۰۰ ^{Bab}
	T ₇	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Accd}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{ABbc}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{BCbc}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{BCa}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Cab}
۲	T ₁	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Eb}
	T ₂	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Dab}
	T ₃	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Da}
	T ₄	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Eb}
	T ₅	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Eb}
	T ₆	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bc}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Cb}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Dc}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Cab}
	T ₇	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Bb}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{BCab}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Cb}
۳	T ₁	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Eb}
	T ₂	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ea}
	T ₃	۴/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Aa}	۳/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Da}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Dab}
	T ₄	۴/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Aa}	۳/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Da}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Dab}
	T ₅	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Aa}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bca}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cb}
	T ₆	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{ABc}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{BCb}	۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Cc}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}

ارزیابی حسی و میکروبی خامه قنادی عملگرا (شیرین‌بیان / موسیلاژ پنیرک ...)

۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Cb}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bab}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ab}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	۳/۶۶ ± ۰/۵۸ ^{Ab}	T ₇
۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bcd}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ac}	T ₁
۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Da}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bab}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ac}	T ₂
۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bab}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aab}	T ₃
۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ea}	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Da}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bab}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ac}	T ₄
۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Aab}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	T ₅
۱/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۱/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ca}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Ba}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Bbc}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Ac}	T ₆
۲/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{Da}	۳/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{CDa}	۳/۶۷ ± ۰/۵۸ ^{B^CCa}	۴/۳۳ ± ۰/۵۸ ^{ABa}	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	T ₇
۷/۱۷ ± ۰/۰۲ ^{Eg}	۷/۸۷ ± ۰/۰۲ ^{Dd}	۸/۹۸ ± ۰/۰۳ ^{Cd}	۹/۱۶ ± ۰/۰۲ ^{Be}	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	T ₁
۷/۲۶ ± ۰/۰۱ ^{Ef}	۸/۰۶ ± ۰/۰۲ ^{Dc}	۹/۰۷ ± ۰/۰۳ ^{Cc}	۹/۱۹ ± ۰/۰۱ ^{Bde}	۹/۳۲ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	T ₂
۷/۴۰ ± ۰/۰۰ ^{Ec}	۸/۲۳ ± ۰/۰۱ ^{Db}	۹/۱۵ ± ۰/۰۱ ^{Cb}	۹/۲۱ ± ۰/۰۲ ^{Bd}	۹/۳۳ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	T ₃
۷/۳۳ ± ۰/۰۰ ^{Ee}	۸/۰۹ ± ۰/۰۱ ^{Dc}	۹/۱۲ ± ۰/۰۳ ^{Cb}	۹/۲۲ ± ۰/۰۱ ^{Bcd}	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	T ₄
۷/۶۶ ± ۰/۰۴ ^{Eb}	۸/۲۷ ± ۰/۰۱ ^{Dab}	۹/۲۳ ± ۰/۰۳ ^{Ca}	۹/۲۷ ± ۰/۰۱ ^{Bab}	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	T ₅
۷/۳۷ ± ۰/۰۱ ^{Ed}	۸/۱۹ ± ۰/۰۲ ^{Db}	۹/۱۵ ± ۰/۰۲ ^{Cb}	۹/۲۵ ± ۰/۰۲ ^{Bbc}	۹/۳۲ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	T ₆
۷/۸۶ ± ۰/۰۳ ^{Da}	۸/۳۵ ± ۰/۰۰ ^{Ca}	۹/۲۶ ± ۰/۰۲ ^{Ba}	۹/۲۹ ± ۰/۰۱ ^{Ba}	۹/۳۳ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	T ₇

*حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری معنادار در هر ستون است (p<0.05).

*حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری معنادار در هر ردیف است (p<0.05).

پنیرش کلی

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات نشان داده که عصاره ریشه شیرین‌بیان حاوی انواع مواد شیمیایی گیاهی از جمله فلاونوئیدها (ایزوفلاونوئیدها، فورمونونتین و لیکیریتین)، ساپونین، تری‌ترپن‌ها (اسید مایع و گلیسیریزین)، قندها، کومارین‌ها، اسیدهای آمینه، نشاسته، تانن‌ها، فیتواسترول‌ها، کولین و ویتامین‌ها (مانند اسید اسکوربیک) است (۲۵). در این مطالعه (شکل ۱)، در مجموع هفت ترکیب فنلی، فلاونوئیدی و کوئرستین شامل جنتیسیک اسید، اسید کافئیک اسید p-کوماریک، اسید فرولیک، لوتئولین، آپیزونین و اسید سیناپیک به غلظت یکسان و ۲۰ μg/mL در عصاره شیرین‌بیان شناسایی شد. فلاونوئیدهای شیرین‌بیان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی فوق‌العاده قوی هستند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدهای شیرین‌بیان بیش از ۱۰۰ برابر قوی‌تر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین E است. بنابراین عصاره شیرین‌بیان می‌تواند به‌طور مؤثر برای فرموله کردن مواد غذایی برای محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو استفاده شود (۲۶). Al-Radadi (۲۰۲۱) طی شناسایی ترکیبات

عصاره شیرین‌بیان با HPLC بیشترین غلظت اسیدهای فنولیک به ترتیب سیناپیک، الاژیک، پروتوکاتچولیک و فرولیک و لوتئولین، روتین و کامفرول شناسایی شده بودند (۲۷). Jan و همکاران (۲۰۲۲)، ترکیبات فنلی مانند اسید وانیلیک، اسید گالیک، اسید کلروژنیک و اسید فرولیک را در عصاره شیرین‌بیان با استفاده از HPLC جدا و شناسایی کردند (۲۸).

در این مطالعه عصاره شیرین‌بیان به‌عنوان جایگزین شکر استفاده شد. نتایج نشان داد (جدول ۲) بالاترین قند کل در نمونه‌های T₁ (نمونه حاوی ۲۰ درصد شکر) مشاهده شد. افزودن عصاره و موسیلاژ سبب کاهش معنادار قند کل شد. این کاهش با افزایش درصد جایگزینی عصاره و موسیلاژ معنادارتر بود. با توجه به جایگزینی شکر با این ترکیبات نتایج به‌دست آمده کاملاً مطابق انتظار بود. محتوای شکر خامه‌های قنادی موجود در بازار به ۲۰ تا ۳۰ درصد وزنی بود که کالری بالا و شاخص گلیسمیک بالاتری را فراهم می‌کند که منجر به عدم سلامتی مصرف‌کنندگان و ابتلا به دیابت و چاقی در آنها می‌شود. شکر یکی از مواد رایج ترکیبات خامه است

درصد عصاره و موسیلاژ معنادارتر بود. به‌طوریکه کمترین میزان کالری در نمونه T7 (نمونه حاوی ۱۵ درصد عصاره و موسیلاژ) مشاهده شد. خامه منبع غنی از چربی، پروتئین و کربوهیدرات است، که خود، به میزان قابل توجهی به افزایش کالری کمک می‌کند. با توجه به کاهش محتوی چربی، شکر و پروتئین کاهش کالری نمونه‌ها دور از انتظار نبود. Khan و همکاران (۲۰۱۸)، نیز کاهش کالری بستنی با جایگزینی شکر با سوکرولوز- مالتوز را نشان دادند (۳۴).
 /شیریشیاکلی، یکی از ۳۰ عضو خانواده باکتریایی انتروباکتریاسه، و یک باکتری کلی‌فرم است. همچنین یکی از ۶ نوع گونه /شیریشیا است. این باکتری گرم‌منفی، غیر اسپورساز، اختیاری، بی‌هوازی، میله‌ای شکل مزوفیل است که در دمای ۷ تا ۴۵ درجه سلسیوس رشد می‌کند. وجود گروه کلی‌فرم در غذا نشان‌دهنده آلودگی به خاک، آب، گیاه، مدفوع، شرایط نامناسب بهداشتی یا وجود پاتوژن‌های روده‌ای است. با این وجود، /شیریشیاکلی یک پاتوژن مهم است، زیرا نشانگر آلودگی مدفوع در غذاها و آب آشامیدنی است. با توجه به این ویژگی، به‌عنوان یک باکتری شاخص در ایمنی و بهداشت مواد غذایی در نظر گرفته می‌شود (۳۵). /شیریشیاکلی به‌عنوان باکتری برجسته در میکروبیوتای بی‌هوازی اختیاری روده، در مدفوع و محیط زیست گسترده است. برخی از سویه‌های بیماری‌زای آن هم با ایجاد توکسین‌های متفاوت، باعث مسمومیت می‌شوند و هم با ایجاد عفونت غذایی از طریق افزایش سلولی باعث گاستروانتریت و آسیب پاتولوژیک کلیه می‌شوند (۳۶). توکسین‌های باکتریایی سومین عامل مهم شیوع بیماری‌های ناشی از غذا در سراسر جهان محسوب می‌شوند. طبق مطالعات انجام شده، بیش از نیمی از همه‌گیری‌های ناشی از غذا مرتبط با توکسین باکتریایی توسط انتروتوکسین‌های /استافیلوکوکسی ایجاد می‌شود (۳۷). /استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری کوکسی گرم‌مثبت است که به‌صورت خوشه‌های منفرد، جفت یا انگور مانند دیده می‌شود. به دلیل تولید رنگدانه کاروتنوئیدی، کلنی‌های این باکتری‌ها به رنگ طلایی به

که شیرینی، بافت و ساختار خامه قنادی را فراهم می‌کند (۲۹). شکر نه تنها طعم و مزه را برآورده می‌کند، بلکه در تعدادی از عملکردها مانند اتصال آب، افزایش دمای جوش، کاهش دمای انجماد محلول‌های آبی، افزایش ویسکوزیته و تغییر رفتار پروتئین‌ها، نشاسته‌ها و هیدروکلوئیدها نقش دارد. به‌طور خلاصه، شکر می‌تواند بر خواص امولسیون تأثیر بگذارد. بنابراین، احتمالاً بر خواص و کیفیت خامه قنادی تأثیر می‌گذارد (۳۰). Zeng و همکاران (۲۰۲۲) طی بررسی اثرات گلوکز و شربت ذرت بر خصوصیات فیزیکی و خواص فرم‌دهی خامه قنادی، نشان دادند غلظت پروتئین سطحی و ویسکوزیته ظاهری امولسیون با افزایش غلظت قند افزایش یافت. آنها نشان دادند افزودن قندها به خوبی می‌تواند ثبات امولسیون، سفتی و پایداری کف خامه قنادی را به‌طور مؤثری بهبود بخشد. این نتایج نشان می‌دهد که مالتودکسترین موجود در شربت گلوکز پایداری امولسیون را بهبود می‌بخشد (۳۱).

نتایج حاصل از آزمون چربی (جدول ۲) نشان می‌دهد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۵ درصد وجود دارد. کمترین میزان چربی در نمونه T7 (نمونه حاوی ۱۵ درصد عصاره و ۱۵ درصد موسیلاژ) مشاهده شد. با توجه به جایگزینی چربی خامه با موسیلاژ پنیرک این نتایج قابل انتظار بود. از طرفی، به نظر می‌رسد محتوای آب بالاتر با محتوای چربی خام کمتر مرتبط است (۳۲). مطابق با نتایج این تحقیق، Temiz و همکاران (۲۰۱۰)، تا افزودن ۵ درصد شربت شیره انگور تأثیر معنادار بر محتوی چربی نمونه‌های بستنی نداشت اما در غلظت‌های بالاتر کاهش چربی نمونه‌های بستنی گزارش شد (۳۳).

بررسی نتایج کالری خامه‌های قنادی (جدول ۲) نشان داد، بیشترین میزان کالری در نمونه‌های T1 (نمونه حاوی ۲۰ درصد شکر) مشاهده شد. افزودن عصاره شیرین‌بیان و موسیلاژ گیاه پنیرک به‌طور معناداری میزان کالری نمونه‌ها را کاهش داد. این کاهش میزان کالری با افزایش

ارزیابی حسی و میکروبی خامه قنادی عملگرا (شیرین‌بیان / موسیلاژ پنیرک ...)

نظر می‌رسند. آنها باکتری‌های اختیاری، بی‌هوازی، غیر متحرک، غیر اسپور، کاتالاز و کواگولاز مثبت هستند (۳۸). خامه قنادی از شیر و اجزای دیگر تشکیل شده است که هریک ممکن است حاوی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای مختلف باشد. تولید خامه قنادی در صورت عدم توجه به روند حرارت کافی بر روی مخلوط این خامه‌ها یا عدم توجه به موازین بهداشتی در طول پروسه تولید آنها، زمینه بروز آلودگی باکتریایی مختلف به خصوص باکتری اشریشیاکلی را فراهم می‌کند (۳۹).

بررسی نتایج میکروبی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کپک و مخمر نمونه‌های خامه قنادی تولیدشده نشانگر عدم رشد آنها در هیچ‌کدام از تیمارها بود. تعداد بالای باکتری‌ها اغلب بیانگر شرایط غیر بهداشتی تولید و نگهداری شیر، بهداشت نامناسب کلیه تجهیزات و ظروف و شرایط نگهداری نامناسب زمان/ دمایی، آلودگی هوا در طول نگهداری و یا توزیع است. کلی‌فرم‌ها به‌طور معمول به‌عنوان یک شاخص برای تعیین کیفیت محصولات غذایی استفاده می‌شوند، علاوه بر این، برای اندازه‌گیری کیفیت روش‌های مورد استفاده برای به حداقل رساندن آلودگی میکروبی محصولات لبنی و به‌عنوان یک شاخص ایمنی تأیید شده در سیستم HACCP استفاده می‌شوند (۴۰). نتایج آزمایشات میکروبی، نشان‌دهنده شرایط بهداشتی مناسب در تولید خامه‌های قنادی است.

جدول ۳ نتایج زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در خامه عملگرا را طی ۶۰ روز نگهداری نشان می‌دهد. بالاترین زنده‌مانی پروبیوتک در نمونه T7 مشاهده شد. اثربخشی سلامتی‌بخش محصولات غذایی پروبیوتیک به تعداد سلول‌های زنده و فعال در هر گرم یا میلی‌لیتر از محصولات در زمان مصرف بستگی دارد. بنابراین اطمینان از میزان بقای بالای پروبیوتیک‌ها در طول تولید و همچنین در طول عمر مفید محصول به‌منظور حفظ اعتماد مصرف‌کننده به محصول پروبیوتیک ضروری است (۴۱). عوامل زیادی بر زنده ماندن میکروارگانیسم‌های

پروبیوتیک در محصولات غذایی در طی تولید، فراوری و ذخیره‌سازی تأثیر می‌گذارند. فاکتورهای شناسایی شده شامل پارامترهای مواد غذایی (pH، اسیدیته قابل تیتر، پتانسیل اکسیداسیون و احیا، فعالیت آبی، وجود نمک، قند و مواد شیمیایی مانند پراکسید هیدروژن، باکتریوسین‌ها، طعم‌دهنده‌های مصنوعی و مواد رنگی) و پارامترهای فرآیند (عملیات حرارتی، دمای انکوباسیون، سرعت خنک شدن محصول) می‌باشد (۴۲). Kozłowicz و همکاران (۲۰۱۹)، گزارش کردند اثربخشی باکتری‌های پروبیوتیک اضافه‌شده به دسرهای شیری تا حد زیادی به دوز تلقیح آنها بستگی دارد. مقدار تلقیح باید به درستی انتخاب شود تا محصول خواص پروبیوتیکی خود را در طول دوره نگهداری حفظ کند (۴۳). استفاده از موسیلاژ پنیرک به‌عنوان یک پری‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود که در بهبود رشد پروبیوتیک‌ها نقش دارد (۴۴). همچنین مطالعات نشان داده عصاره ریشه شیرین‌بیان فرصتی را برای باکتری‌های پروبیوتیک فراهم می‌کند، تا گرادیان اسیدیته/قلیایی محیط‌های مدل را به خوبی تحمل کنند و تعداد آنها را کُندتر کاهش دهند (۴۵). Bustamante و همکاران (۲۰۱۷)، طی بررسی موسیلاژ و پروتئین محلول چیا و بذر کتان به‌عنوان عامل کپسوله‌کننده بر بقای پروبیوتیک (*L. plantarum* و *B. infantis*) زنده‌مانی آنها را در طول ذخیره‌سازی نشان دادند (۴۶). Afzaal و همکاران (۲۰۱۹)، به بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی بستنی پروبیوتیک حاوی باکتری آزاد و میکروکپسول لاکتوباسیلوس کازئی طی ۸۰ روز نگهداری در دمای انجماد پرداختند. نتایج نشان داد استفاده از میکروکپسول‌های هیدروکلوئیدی، زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی را بهبود بخشیده است (۴۷).

آزمایشات ارگانولپتیک به‌طور کلی راهنمای نهایی کیفیت از دیدگاه مصرف‌کننده است. پارامترهای حسی شامل (مزه، بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی) به‌ترتیب در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج، امتیاز حسی بالاتر نمونه‌ها قبل از دوره ذخیره‌سازی را نشان داد. با این حال،

(جایگزین چربی) در تهیه خامه قنادی فراسودمند حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده انجام شد. نتایج به‌دست آمده پتانسیل عصاره ریشه شیرین‌بیان و موسیلاژ گیاه پنیرک را در بهبود پارامترهای فیزیکیوشیمیایی و تولید خامه قنادی عملگرا نشان داد. همچنین نتایج استفاده از موسیلاژ پنیرک به‌عنوان یک پری‌بیوتیک در بهبود رشد پروبیوتیک‌ها را تأیید کرد. بررسی نتایج میکروبی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کپک و مخمر نمونه‌های خامه قنادی تولید شده، نشانگر عدم رشد آنها در هیچ‌یک از تیمارها بود که نشان‌دهنده شرایط بهداشتی مطلوب تولید بود. با توجه به جمع‌بندی مطالب می‌توان گفت استفاده از ۱۰ درصد عصاره شیرین‌بیان، ۱۰ درصد موسیلاژ گیاه پنیرک و میکروکپسول‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم (نمونه T₆) در تهیه خامه قنادی توانست با کاهش قند، چربی و میزان کالری کل نمونه‌ها طی ۴۵ روز اثرات سلامتی‌بخش فراسودمندی خود را نشان دهد.

کاهش ارزیابی تمام پارامترهای حسی طی ۶۰ روز نگهداری در تمام نمونه‌های خامه قنادی مشاهده شد. به‌طور کلی در غلظت‌های بالاتر عصاره شیرین‌بیان (۱۵ درصد) و موسیلاژ (۱۵ درصد) به‌طور قابل توجهی امتیاز حسی نمونه‌ها را کاهش داد. Al-Turki و همکاران (۲۰۰۸) طی بررسی تأثیر عصاره‌های آبی مریم‌گلی، پونه کوهی، مرزنجوش و شیرین‌بیان را بر خواص حسی شیر و محصولات لبنی نشان دادند. لبنه‌های تولید شده با عصاره‌های گیاهی مورد پذیرش شرکت کنندگان قرار گرفت (۴۸). Fakhfakh و همکاران (۲۰۱۷) طی بررسی تأثیر پودر گیاه پنیرک را بر خواص ارگانولپتیکی نان نشان دادند. پارامترهای عطر، مزه، رنگ و بافت نمونه‌ها با افزودن پودر گیاه پنیرک کاهش یافت، با این حال نمونه‌های حاوی ۳ درصد پودر گیاه پنیرک امتیاز پذیرش کلی قابل قبولی داشتند (۴۹).

مطالعه حاضر به‌منظور استفاده از عصاره ریشه شیرین‌بیان (جایگزین شکر) و موسیلاژ گیاه پنیرک

References

- 1- Gaba K, Anand S. Potential of Incorporating a Functional Probiotic Encapsulant in Whipped Cream. *Fermentation*. 2023; 9(11): 928.
- 2- Han YM, Zhu L, Qi XG., Zhang H, Wu GC. 2023. Characteristics of low-fat whipped cream containing protein-based fat replacers. *International Journal of Dairy Technology*. 2023; 76(2): 276-290.
- 3- Torabi P, Moraffah F, Amini M, Pourjabar Z, Kargar S, Hajimahmoodi M. Fatty acid composition of Iranian sweetened confectionery creams, with an emphasis on trans fatty acids. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2022; 105: 104153. [In Persian]
- 4- Abbas HM, Abd El-Gawad MA, Kassem JM, Salama M. Application of fat replacers in dairy products: A review. 2024; 12(2): 319–333.
- 5- Jiang X, Shekarforoush E, Muhammed MK, Whitehead KA, Arneborg N, Risbo J. Lactic acid bacteria as structural building blocks in non-fat whipping cream analogues. *Food Hydrocolloids*. 2023; 135: 108137.
- 6- Dybka-Stępień K, Otlewska A, Góźdz P, Piotrowska M. The renaissance of plant mucilage in health promotion and industrial applications: A review. *Nutrients*. 2021; 13(10): 3354.
- 7- Goksen G, Demir D, Dhama K, Kumar M, Shao P, Xie F, et al. Mucilage polysaccharide as a plant secretion: Potential trends in food and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023; 230: 123146.
- 8- Di Monaco R, Miele NA, Cabisidan EK, Cavella S. Strategies to reduce sugars in food. *Current opinion in food science*. 2018; 19: 92-7.
- 9- Husain I, Bala K, Khan IA, Khan SI. A review on phytochemicals, pharmacological activities, drug interactions, and associated toxicities of licorice (*Glycyrrhiza* sp.). *Food Frontiers*. 2021;2(4): 449-85.
- 10- Kwon YJ, Son DH, Chung TH, Lee YJ. A review of the pharmacological efficacy and safety of licorice root from corroborative clinical trial findings. *Journal of medicinal food*. 2020; 23(1): 12-20.
- 11- Janipour R, Shekarforoush SS, Ghorbani S, Gheisari HR. Effects of Partial Replacement of

Sugar with Fig Syrup on the Survival of Bacillus coagulans and the Physicochemical Properties of Probiotic Ice Cream. *Food Technology and Biotechnology*. 2023; 61(3): 350-6.

12- Zilola E, Akbarali R, Malokhat D. MICROBIOLOGICAL STUDIES OF OIL EMULSIONS. *Universum: технические науки*. 2023; (5-7 (110)): 45-7.

13- Abdelrasoul EO, Moawad AA, Abdel-Salam AB. Microbiological safety and quality survey of some dairy confectioneries with cream filling and topping. *Open Veterinary Journal*. 2023; 13(7): 807-18.

14- Wang QE, Ma S, Fu B, Lee FS, Wang X. Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Biochemical engineering journal*. 2004; 21(3): 285-92.

15- Sabahi S, Abbasi A, Mortazavi SA. Characterization of cinnamon essential oil and its application in Malva sylvestris seed mucilage edible coating to the enhancement of the microbiological, physicochemical and sensory properties of lamb meat during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2022;133(2):488-502.

16- Zhang Z, Gu M, You X, Sela DA, Xiao H, McClements DJ. Encapsulation of bifidobacterium in alginate microgels improves viability and targeted gut release. *Food Hydrocolloids*. 2021;116: 106634.

17- Hosseinpour Z, Karazhiyan H. Physical and chemical properties of whipped cream containing liquorice powder. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*. 2019; 15(4): 419-31. [In Persian]

18- Soltani N, Karami R, Ranjbar M. The interaction of salicylic acid and cold stress on antioxidant enzyme activities in licorice (*Glycyrrhiza glabra*). *J Herbal Drugs*. 2011; 2(1): 7-13. [In Persian]

19- Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. Pasteurized and UHT cream Specifications and test methods. ISIRI no 191. 4th revision, Karaj: ISIRI; 2019 [in Persian]. Available from: <https://standard.inso.gov.ir>

20- Ayoubi A, Porabolghasem M. Substituting sugar with date syrup in cupcake. *Iranian food science and technology research journal*. 2017; 13(5): 808-19. [In Persian]

21- Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. Milk and milk products

– Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds-colony - Count technique at 25°C. ISIRI no 10154. 1st.edition, Karaj: ISIRI; 2007 [in Persian]. Available from: <https://standard.inso.gov.ir>

22- Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. Milk and Milk Products-Enumeration of Presumptive Esherichia coli-Most probable number (MPN). ISIRI no 5234. 1st. Revision, Karaj: ISIRI; 2016 [in Persian]. Available from: <https://standard.inso.gov.ir>

23- Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of coagulase – Positive staphylococci (*staphylococcus aureus* and other species) – Test method Part 1: Technique using baird – parker agar medium. ISIRI no 6806-1. 1st.edition, Karaj: ISIRI; 2005 [in Persian]. Available from: <https://standard.inso.gov.ir>

24- Córdova-Ramos JS, Glorio-Paulet P, Hidalgo A, Camarena F. Effect of technological process on antioxidant capacity and total phenolic content of Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet)= Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) andino. *Scientia Agropecuaria*. 2020; 11(2): 157-65.

25- Abo-Samaha MI, Alghamdi YS, El-Shobokshy SA, Albogami S, El-Maksoud EM, Farrag F, et al. Licorice extract supplementation affects antioxidant activity, growth-related genes, lipid metabolism, and immune markers in broiler chickens. *Life*. 2022; 12(6): 914.

26- Lohar AV, Wankhade AM, Faisal M, Jagtap A. A review on *Glycyrrhiza glabra* linn (liquorice)—An excellent medicinal plant. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci*. 2020; 7: 330-4.

27- Al-Radadi NS. Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles (AuNp) using licorice root extract: Antimicrobial and anticancer study against HepG2 cell line. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021; 14(2): 102956.

28- Jan R, Gani A, Dar MM, Bhat NA. (2022). Bioactive characterization of ultrasonicated ginger (*Zingiber officinale*) and licorice (*Glycyrrhiza Glabra*) freeze dried extracts. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2022; 88: 106048.

29- Ellis AL, Mills TB, Norton IT, Norton-Welch AB. The effect of sugars on agar fluid gels and the stabilisation of their foams. *Food Hydrocolloids*. 2019; 87: 371-81.

30- Clemens RA, Jones JM, Kern M, Lee SY,

Mayhew EJ, Slavin JL, *et al.* Functionality of sugars in foods and health. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2016; 15(3): 433-70.

31- Zeng Y, Zeng D, Liu T, Cai Y, Li Y, Zhao M, *et al.* Effects of glucose and corn syrup on the physical characteristics and whipping properties of vegetable-fat based whipped creams. *Foods*. 2022; 11(9): 1195.

32- Kim YJ, Kang S, Kim YJ, Kim WR, Kim YM, Park S. Calorie reduction of chocolate ganache through substitution of whipped cream. *Journal of Ethnic Foods*. 2017; 4(1): 51-7.

33- Temiz H, Yeşilsu AF. Effect of pekmez addition on the physical, chemical, and sensory properties of ice cream. 2010; 28(6): 538-546

34- Khan S, Rustagi S, Choudhary S, Pandey A, Khan MK, Kumari A, *et al.* Sucralose and maltodextrin-An alternative to low fat sugar free ice-cream. *Bioscience biotechnology research communications*. 2018; 11(1): 136-43.

35- Ekici G, Dümen E. Escherichia coli and food safety. In *The universe of Escherichia coli*. 2019. IntechOpen.

36- Gerba CP. Environmentally transmitted pathogens. In *Environmental microbiology*. 2009; Academic Press.

37- Grispoldi L, Karama M, Armani A, Hadjicharalambous C, Cenci-Goga BT. Staphylococcus aureus enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. *Italian Journal of Animal Science*. 2021; 20(1): 677-90.

38- Huang Z, Yu X, Yang Q, Zhao Y, Wu W. Aptasensors for Staphylococcus aureus risk assessment in food. *Frontiers in Microbiology*. 2021; 12: 714265.

39- Ramos S, Silva V, Dapkevicius MD, Caniça M, Tejedor-Junco MT, Igrejas G, *et al.* Escherichia coli as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production. *Animals*. 2020; 10(12): 2239.

40- Godefay B, Molla B. Bacteriological quality of raw cow's milk from four dairy farms and a milk collection centre in and around Addis Ababa. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 2000; 113(7-8): 276-8.

41- Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*. 2014;9: 225-41.

42- Haynes IN, Playne MJ. Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2002; 57(1): 10.

43- Kozłowicz K, Góral M, Góral D, Pankiewicz U, Bronowicka-Mielniczuk U. Effect of ice cream storage on the physicochemical properties and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions. *LWT*. 2019; 116: 108562.

44- HadiNezhad M, Duc C, Han NF, Hosseinian F. Flaxseed soluble dietary fibre enhances lactic acid bacterial survival and growth in kefir and possesses high antioxidant capacity. *Journal of Food Research*. 2013; 2(5): 152.

45- El-Lahot A, El-Razek A, Amal M, Mas-soud MI, Gomaa EG. Utilization of glycyrrhizin and licorice extract as natural sweetener in some food products and biological impacts. *Journal of Food and Dairy Sciences*. 2017; 8(3): 127-36.

46- Bustamante M, Oomah BD, Rubilar M, Shene C. Effective Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium infantis encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food chemistry*. 2017; 216: 97-105.

47- Afzaal M, Khan AU, Saeed F, Arshad MS, Khan MA, Saeed M, *et al.* Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition*. 2020; 8(3): 1649-56.

48- Al-Turki AI, El-Ziney MG, Abdel-Salam AM. Chemical and anti-bacterial characterization of aqueous extracts of oregano, marjoram, sage and licorice and their application in milk and labneh. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2008; 6(1): 39.

49- Fakhfakh N, Jdir H, Jridi M, Rateb M, Belbahri L, Ayadi MA, *et al.* The mallow, *Malva aegyptiaca* L.(Malvaceae): Phytochemistry analysis and effects on wheat dough performance and bread quality. *LWT*. 2017; 75: 656-62.



Sensory and microbial evaluation of functional confectionery cream (*Glycyrrhiza glabra*/ *Malva mucilage* / *Lactobacillus plantarum*)

Mohammad HassanBeiki¹, Leila Golestan², Zohreh Mashak^{*3}, Mohammad Ahmadi²,
Seyed Mahdi Jafari⁴

1- PhD Student, Department of Food Hygiene, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

4- Professor, Department of Food Process Engineering, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Receive: February 19, 2024; Revise: March 10, 2024; Accept: March 12, 2024

 [10.22034/nfvm.2024.450424.1234](https://doi.org/10.22034/nfvm.2024.450424.1234)

Summary

This study aimed to introduce a beneficial cream containing *Glycyrrhiza glabra* extract/*Malva* mucilage, and *Lactobacillus plantarum* within 60 days of storage. First, *Lactobacillus plantarum* was coated with sodium alginate, and with *Malva mucilage* coated again. After the whipped cream was prepared, probiotic microcapsules (10^7 cfu/g) were added. Finally, dried *Glycyrrhiza glabra* extract (0, 5, 10, and 15%) and the *Malva* mucilage (0, 5, 10, and 15%) were added to the treatments to replace sugar and fat, respectively. In total, seven phenolic, flavonoid, and quercetin compounds including gentisic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, luteolin, apigenin, and sinapic acid were detected at the same concentration, and 20 $\mu\text{g/mL}$ in licorice extract. The addition of licorice extract and *Malva* mucilage decreased the amount of total sugar, calories, and fat in treatments ($p < 0.05$). Microbial contamination (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mold, and yeast) was not observed in all groups during 60 days ($p > 0.05$). The probiotic survival results showed that the addition of licorice extract and *Malva* mucilage increased the survival of probiotic bacteria during 60 days ($p < 0.05$). Sensory evaluation showed that high percentages of licorice extract (15%) and mucilage of *Malva* plant (15%) were not accepted by sensory evaluators. However, the sample of 10% licorice extract and 10 mucilage of *Malva* plant along with microcapsules were well accepted by consumers. This treatment is introduced as the best example of the study, which can show its beneficial effects on the consumer within 45 days with the highest sensory evaluation.

Keywords: Whipped cream, *Lactobacillus plantarum*, licorice extract, *Malva mucilage*, evaluation



بررسی آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در پرندگان بومی (ماکیان، بوقلمون و کبوتر) شهرستان زابل

سمیرا خمر^۱، مریم گنجعلی^{۲*}، داریوش سعادت^۳، فرشته میرشکار^۴، شهین راشکی^۱


۱- بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

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

۳- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۴- عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد زابل، دانشگاه آزاد اسلامی، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ خرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۵ تیر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۸ تیر ۱۴۰۲

 10.22034/nfvm.2023.403193.1191

چکیده

کریپتوسپوریدیوم از انگل‌های مشترک مهم در دام، طیور و انسان است که از نظر بهداشتی و به لحاظ اقتصادی دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در پرندگان بومی (ماکیان، بوقلمون، کبوتر) شهرستان زابل انجام گرفت. در این مطالعه تعداد 534 نمونه مدفوعی از هر کدام از پرندگان بومی شامل ۲۶۰ نمونه از مرغ و خروس‌های بومی، ۱۳۹ نمونه از بوقلمون‌ها و ۱۳۵ نمونه از کبوترها از حومه شهر اخذ گردید. از نمونه‌های مدفوع گسترش تهیه و با روش زیل- نلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، در ۱۱ مورد نمونه‌های اخذ شده از پرندگان، آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم مشاهده شد. میزان فراوانی آلودگی در بوقلمون‌ها ۳/۶ درصد، در ماکیان (مرغ و خروس) ۰/۸ درصد و در کبوتر ۰/۳ درصد تعیین گردید. بیشترین میزان آلودگی در بوقلمون‌ها مشاهده شد، اما به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف پرندگان وجود ندارد. بیشترین آلودگی به کریپتوسپوریدیوم از نظر سن، در پرندگان بیش از یک سال و از نظر محل نگهداری، در پرندگان نگهداری شده در فضای بسته مشاهده شد. میزان آلودگی در فصل زمستان بیشتر از دیگر فصل‌ها بود. و نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در بوقلمون‌های بومی شهرستان زابل نسبت به بقیه پرندگان بومی بیشتر می‌باشد، بنابراین لازم است مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گرفته و راهکارهای مناسبی در رابطه با پیشگیری و کنترل این بیماری ارائه گردد.

واژگان کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، زابل، پرندگان بومی

مقدمه

کریپتوسپورییدیوم یکی از انگل‌های شاخه اپی‌کمپلکسا و یکی از مهم‌ترین انگل‌های پاتوژن روده‌ای که عامل اسهال در انسان و سایر حیوانات و ماکیان است و در بسیاری از مناطق جغرافیایی در دنیا گزارش شده است (۱-۳) و از طریق استقرار در سطح سلول‌های مخاطی دستگاه گوارش و تنفس سبب بیماری و اختلالات فیزیولوژیکی می‌شود (۴، ۵)، بنابراین کنترل و پیشگیری این تک‌یاخته هم از نظر بهداشتی و هم از نظر اقتصادی اهمیت فراوانی دارد. این تک‌یاخته از ارگان‌های مشترک انسان و دام محسوب می‌شود. این تک‌یاخته انگل داخل سلولی خارجی سیتوپلاسمی و در افرادی که نقص سیستم ایمنی دارند، بیماری‌زایی آن واجد اهمیت است (۶). اووسیست این انگل فقط چهار اسپوروزوئیت دارد و اسپوروسیست ندارد و اندازه آن بین ۶-۴ میکرون است (۷). انگل در بیش از ۳۰ گونه از پستانداران، خزندگان، پرندگان و حتی ماهی‌ها گزارش شده، آب نقش مهمی در انتقال بیماری دارد. تا کنون ۲۰ گونه از این جنس شناسایی شده که دو گونه کریپتوسپورییدیوم *بیله‌ای*، *مله‌اگریدیس* (*c. baylei*, *c. meleagridis*) عامل عفونت دستگاه گوارش پرندگان هستند. کریپتوسپورییدیوم علاوه بر دستگاه تنفس طیور، با تخریب بافت روده موجب بروز اسهال و اختلال در هضم و جذب مواد غذایی شده و در طیور صنعتی تخم‌گذار و گوشتی سبب افت تولید و زیان‌های اقتصادی می‌گردد (۸). اهمیت کریپتوسپورییدیوم به این علت است که انگل می‌تواند در طیف وسیعی از حیوانات از جمله گاو، گوسفند، بز، سگ، گربه، اسب، ماکیان و بوقلمون بیماری مشترک ایجاد کند (۹). با توجه به اهمیت زئونوتیک کریپتوسپورییدیوم و احتمال آلودگی آب و غذای انسان به این انگل توسط حیوانات، آگاهی از میزان آلودگی در مخازن انگل و همچنین تدوین برنامه کنترل و پیشگیری متناسب با آن ضروری است. علی‌رغم اینکه در طول دهه اخیر گزارشات در مورد شیوع گونه‌های مختلف کریپتوسپورییدیوم در میزبان‌های مختلف ارائه شده

است. اطلاعات جامعی در مورد آلودگی کریپتوسپورییدیوم در پرندگان بومی شهرستان زابل گزارش نشده است و به دلیل تماس مستقیم از منابع مهم آلودگی انسان محسوب می‌شوند. تحقیق حاضر در راستای بررسی موارد آلودگی کریپتوسپورییدیوم در پرندگان بومی شهرستان زابل انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش تعداد ۵۳۴ نمونه درکل از پرندگان بومی، ۲۶۰ نمونه از مرغ و خروس‌های بومی، ۱۳۹ نمونه از بوقلمون‌ها و ۱۳۵ نمونه از کبوترها از حومه شهر زابل در طی فصول مختلف (بهار، تابستان، پاییز و زمستان) به‌طور تصادفی اخذ و جمع‌آوری گردید. بعد از انجام نمونه‌گیری مشخصات میزبان از جمله سن، جنس را یادداشت کرده و در آخر نمونه‌ها به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل گردید.

برای انجام آزمایش ابتدا نمونه‌ها به روش فرمالین- اتر تغلیظ شده و از رسوب به‌دست آمده گسترش تهیه گردید. گسترش را با متانول و با حرارت به مدت ۵ دقیقه تثبیت کرده و بعد به روش زیل نلسون رنگ‌آمیزی و مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. برای تشخیص و تأیید اووسیست‌ها، نمونه‌ها با عدسی ۱۰۰ و با روغن امرسیون بررسی شدند. اووسیست کریپتوسپورییدیوم به رنگ قرمز در زمینه‌ی سبز یا آبی دیده می‌شود.

روش تجزیه و تحلیل آماری: شیوع آلودگی به

کریپتوسپورییدیوم در پرندگان با حدود اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد. محاسبه حدود اطمینان با استفاده از توزیع دو جمله‌ای انجام شد. در این تحقیق فصل سال، سن، جنسیت و گونه پرنده و نیز محل نگهداری پرنده‌ها به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند و تأثیر آنها بر آلودگی به کریپتوسپورییدیوم با استفاده از آزمون مربع کای مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

حدود اطمینان ۹۵ درصد از ۰/۱ تا ۳/۷ درصد) مشاهده شد. میزان آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در گونه‌های مختلف پرندگان در جدول ۱ نشان داده شده است.

در تحقیق اخیر از مجموع ۵۳۴ پرنده مورد بررسی آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در ۱۱ پرنده (۲/۱ درصد) با

جدول ۱- نتایج آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در گونه‌های مختلف پرندگان

معنی‌داری آماری	شیوع آلودگی به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده آلوده به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده مورد بررسی	گونه پرنده
P=۰/۰۹۹	۰/۰۸	۲	۲۶۰	مرغ و خروس
	۳/۰۶	۵	۱۳۹	بوقلمون
	۰/۰۳	۴	۱۳۵	کبوتر

بوقلمون‌ها (۳/۶ درصد) می‌باشد. با این حال آزمون آماری تفاوت معنی‌داری را در شیوع آلودگی بین گونه‌های مختلف پرندگان مورد بررسی نشان نداد.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان فراوانی آلودگی در بوقلمون‌ها ۳/۶ درصد، در ماکیان (مرغ و خروس) ۰/۸ درصد و در کبوتر ۰/۳ درصد تعیین گردید و بیشترین شیوع آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در

جدول ۲- نتایج آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در فصول مختلف سال

معنی‌داری آماری	شیوع آلودگی به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده آلوده به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده مورد بررسی	فصل سال
P=۰/۰۱۰	۰/۰۰	۰	۱۰۰	بهار
	۰/۰۰	۰	۹۹	تابستان
	۲/۰۵	۵	۲۰۰	پاییز
	۴/۰۴	۶	۱۳۵	زمستان

سرد سال (پاییز و زمستان) است.

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است بیشترین آلودگی به کریپتوسپوریدیوم مربوط به فصول

جدول ۳- نتایج آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در سنین مختلف پرندگان

معنی‌داری آماری	شیوع آلودگی به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده آلوده به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده مورد بررسی	سن
P=۰/۰۶۶۵	۲/۰۱	۴	۱۹۵	پنج ماه و کمتر (جوجه)
	۱/۰۶	۴	۲۴۷	از ۶ ماه تا یک سال
	۳/۰۳	۳	۹۲	بیش از یک سال

بود و کمترین موارد در پرندگان با رنج سنی شش ماه تا یک سال مشاهده شد.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود بیشترین موارد آلودگی مربوط به پرندگان با سن بیش از یک سال

جدول ۴- نتایج آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم بر اساس جنسیت

معنی‌داری آماری	شیوع آلودگی به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده آلوده به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده مورد بررسی	جنسیت
P=۰/۲۹۸	۲/۰۸	۷	۲۴۸	ماده
	۱/۰۱	۳	۲۶۱	نر

همان‌طور که در جدول نشان داده شد بیشترین آلودگی به کریپتوسپوریدیوم مربوط به پرندگان ماده است.

جدول ۵- نتایج آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم بر اساس محل نگهداری پرندگان

معنی‌داری آماری	شیوع آلودگی به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده آلوده به کریپتوسپوریدیوم	تعداد پرنده مورد بررسی	محل نگهداری
P<۰/۰۰۱	۰٪	۰	۱۶۲	قفس
	۰٪	۰	۱۷۸	فضای باز
	۱۱٪	۷	۵۹	فضای بسته (مسقف)

صنعتی را ۴ درصد گزارش کرد (۱۲). همچنین در مطالعه نوری و همکاران در مرغداری‌های اطراف تهران میزان آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم ۲/۲۵ گزارش شده است (۱۳).

در مطالعه حیدری و قره‌خانی در سال ۲۰۱۲ میزان آلودگی طیور بومی در شهرستان همدان و حومه ۲/۵ درصد گزارش شد (۱۴). در مطالعه هاشم‌زاده‌فرهنگ و همکاران در تبریز میزان آلودگی در طیور بومی ۹ درصد گزارش شده است (۸). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه نوری در تهران و قره‌خانی در همدان مشابهت دارد.

میزان آلودگی در بوقلمون‌ها در مطالعه حاضر ۳/۶ درصد گزارش شده است. در مطالعه حیدری و همکاران در بوقلمون‌های محلی حومه شهر همدان با روش مشابه با این مطالعه، آلودگی ۴ درصد گزارش شده است، که با نتیجه مطالعه ما تا حدودی همخوانی دارد. کریپتوسپوریدیوم مله‌اگریدیس یک انگل بیماری‌زا و خطرناک برای انسان محسوب می‌شود و از این لحاظ بعد از گونه‌های کریپتوسپوریدیوم هومینیس و پارووم رتبه سوم را به خود اختصاص داده است (۱۴).

سلطانی الوار و همکاران در بوقلمون‌های شهرستان دزفول میزان آلودگی را ۲ درصد گزارش کردند (۱۵). بررسی‌های کمی در رابطه با میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در بوقلمون‌ها در سطح کشور انجام شده است و بیشتر مطالعات بر اساس مشاهده مقاطع بافتی و کارهای مولکولی می‌باشد.

همان‌طور که در جدول ۵ مشخص است تمامی موارد آلودگی به کریپتوسپوریدیوم مربوط به مرغ، خروس و بوقلمون‌هایی است که در فضای بسته نگهداری شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

کریپتوسپوریدیوم یکی از مهم‌ترین انگل‌های پاتوژن روده‌ای است که سبب اسهال در انسان و سایر حیوانات و ماکیان می‌شود و زمینه‌ساز سایر بیماری‌های روده‌ای و دستگاه گوارش نیز می‌باشد. در ایران مطالعات منتشر شده‌ای در رابطه با آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در طیور بومی و صنعتی در نقاط مختلف ایران وجود دارد. در ایران برای اولین بار این انگل در یک خروس بومی توسط قراگوزلو و خداشناس در سال ۱۹۸۱ گزارش شد (۱۰). مطالعه حاضر برای اولین بار در شهرستان زابل به بررسی وضعیت آلودگی انگل کریپتوسپوریدیوم در گروه‌های مختلف پرندگان پرداخت و نتایج حاصل از این بررسی، آلودگی در پرندگان بومی را به ترتیب در ماکیان (۰/۸ درصد)، بوقلمون (۳/۶ درصد) و کبوتر (۰/۳ درصد) نشان داد. در تحقیق اخیر از مجموع ۵۳۴ پرنده مورد بررسی آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در ۱۱ پرنده (۲/۱ درصد) با حدود اطمینان ۹۵ درصد از ۰/۱ تا ۳/۷ درصد مشاهده شد.

در همین رابطه، هاشم‌زاده‌فرهنگ و همکاران میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در مرغداری‌های گوشتی اطراف شهرستان تبریز را ۵/۲۵ درصد اعلام کردند (۱۱). در مطالعه‌ای در مشهد، عندلیبی میزان آلودگی در طیور

هاشم‌زاده‌فرهنگ و همکاران در مورد آلودگی بیشتر در جنس ماده همخوانی دارد (۸). اما در مطالعه هاشم‌زاده‌فرهنگ و همکاران و پوانوت و همکاران در سال ۲۰۱۲ و رایان در سال ۲۰۱۰ به لحاظ آماری، اختلاف معنی‌داری بین جنس نر و ماده مشاهده نشده است (۸، ۲۰، ۲۱)، علت این اختلاف می‌تواند حجم نمونه‌گیری متفاوت در پرندگان باشد.

در رابطه با محل نگهداری پرندگان، بیشترین میزان آلودگی در پرندگان نگهداری شده در فضای بسته با ۱۱/۹ درصد مشاهده گردید که با توجه به چرخه زندگی و نحوه انتقال انگل (انتقال مدفوعی - دهانی) و ازدحام پرندگان در یک محل، احتمال آلودگی و انتقال آن خیلی بیشتر می‌شود.

کریپتوسپورییدیوم مله‌اگریدیس امروزه به‌عنوان یک گونه زئونوز مطرح است و سلامت پرندگان و پستانداران از جمله انسان را تهدید می‌کند. مدفوع نشخوارکنندگان اهلی، طیور و انسان به‌عنوان یک منبع آلوده‌کننده برای هم‌دیگر عمل می‌کند و نگهداری جداگانه حیوانات و جلوگیری از آلوده شدن آب آشامیدنی به مدفوع هر یک از آنها می‌تواند در پیشگیری از کریپتوسپورییدیوزیس مؤثر باشد. بنابراین با توجه به توان آلوده‌کنندگی گسترده این گونه باید به نقش این انگل در ایجاد همه‌گیری کریپتوسپورییدیوزیس بسیار توجه کرد. در این بررسی از بین پرندگان مورد مطالعه، بیشترین میزان آلودگی در بوقلمون دیده شد. از آنجایی که بوقلمون مهم‌ترین میزبان کریپتوسپورییدیوم مله‌اگریدیس است و با توجه به زئونوز بودن این گونه، لازم است که اقدامات بهداشتی لازم برای جلوگیری از انتقال آلودگی از پرندگان به جوامع انسانی صورت گیرد. در این راستا، آموزش جوامع شهری و روستایی و صاحبان پرندگان می‌تواند از انتقال آلودگی و بروز همه‌گیری در دام‌ها و انسان‌ها در منطقه جلوگیری نماید.

قراگوزلو و همکاران کریپتوسپورییدیوم را از نمونه‌های مدفوع و مقاطع بافتی ۲۹ درصد از بوقلمون‌های مورد مطالعه گزارش نمودند (۱۶). حسین‌زاده مرزناکی و یوسفی در سال ۲۰۱۷ در بوقلمون‌های شهرستان بابل میزان آلودگی را ۱۵ درصد گزارش کردند (۱۷).

از طرفی نتایج حاصل از بررسی حاضر، آلودگی (۰/۳ درصد) کبوترها را نشان داد. در مطالعه‌ی میرزایی و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی ۴۰۰ کبوتر شهرستان کرمان، میزان آلودگی ۲/۵ درصد گزارش شد (۱۸). همچنین در مطالعه نورالهی فرد در مشهد در سال ۲۰۱۰ بر روی ۲۰۰ کبوتر، میزان آلودگی به کریپتوسپورییدیوم ۲/۵ درصد گزارش شده است (۱۹)، که بیشتر از میزان آلودگی در کبوترهای این مطالعه است. تفاوت در این میزان آلودگی را می‌توان به حجم نمونه‌گیری و شرایط متفاوت نگهداری کبوترها نسبت داد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که موارد مثبت آلودگی به کریپتوسپورییدیوم در فصول سرد سال، پاییز و زمستان در پرندگان بومی بیشتر است و بیشترین موارد آلودگی در فصل زمستان با ۴/۴ درصد مشخص شده، که با نتایج مطالعه هاشم‌زاده‌فرهنگ و همکاران در تبریز بر روی طیور بومی، همخوانی دارد (۸). یوسفی و همکاران هم در بررسی کریپتوسپورییدیوم در سال ۲۰۱۷ در بوقلمون‌های شهرستان بابل میزان آلودگی در فصل پاییز را بیشتر از فصل‌های دیگر گزارش کردند (۱۷) احتمالاً علت درصد بالای آلودگی در این فصل، مربوط به تراکم پرندگان در محل نگهداری و نحوه انتقال این انگل (مدفوعی - دهانی) است. در مطالعه پوانوت و همکاران در نیجریه بر روی پرندگان بومی، بیشترین میزان آلودگی در فصول خشک گزارش شده است (۲۰).

بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان آلودگی در پرندگان ماده بیشتر از جنس نر بود و به لحاظ آماری بین آنها اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید که با نتایج مطالعه

References

- 1- **Caccio SM.** Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*. 2005; 47: 185-92.
- 2- **De graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, PEETERS JEA.** review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International journal for parasitology*. 1999; 29: 1269-87.
- 3- **Joachim A.** Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 2004; 51: 251-9.
- 4- **Jamshidi N.** Cryptosporidiosis in humans and animals. Selections of veterinary knowledge and research. 1370(1): 7-15. [In Persian]
- 5- **Taghipour Bazargani T, Baghbazadeh A, Rasouli A.** Cryptosporidiosis is a worldwide disease in animals and humans. Publications of the Islamic Association of Students of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. 1386: 14-31. [In Persian]
- 6- **Jahantigh M.** Infectious diseases of the digestive system of poultry. 1 ed. Tehran: Noor Bakhsh Publications. 2006. 121. [In Persian]
- 7- **Pumipuntu N, Piratae S.** Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Veterinary World*. 2018; 11(5): 681-6.
- 8- **hashemzade farhang h, Shahbazi p, jafari r.** Survey of *Cryptosporidium* parasite infection in poultry farms around Tabriz. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*. 2014; 8(1): 411-6. [In Persian]
- 9- **O'Donoghue PJ.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International journal for parasitology*. 1995; 25(2): 139-95.
- 10- **Gharagozlu MY, Khodashenas M.** Cryptosporidiosis in a native rooster with chronic proliferative enteritis. *Archive of Veterinary*. 1985; 17: 129-38. [In Persian]
- 11- **hashemzadefarhang h, shahbazi p, bahavarnia sr.** The survey on *Cryptosporidium* parasite infection in Tabriz and suburb native poultry. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*. 2014; 8(3): 588-95. [In Persian]
- 12- **Andalibi A.** Investigation of respiratory and gastrointestinal cryptosporidiosis in industrial poultry of Mashhad. Urmia: Urmia; 1992. [In Persian]
- 13- **Nouri M, Bozorgmehri Fard MH, Mosvari N.** Investigation of respiratory and digestive cryptosporidiosis in industrial poultry farms around Tehran. *Veterinary Research Journal (Tehran University)*. 1994; 49(2-1): 93-7. [In Persian]
- 14- **Heydari H, Qarakhani J.** Investigation of the frequency of infection of humans, livestock and poultry with *Cryptosporidium* in Hamadan and its suburbs during the years 2005-2015. *Ibn Sina Clinical Medicine Journal (Scientific Journal of Hamedan University of Medical Sciences and Health Services)*. 2011; 19(3): 67-74. [In Persian]
- 15- **Soltani Alwar M, Razi Jalali MH, and Shahrakani A.** investigation of the frequency of infection of native turkeys of Dezful city with *Cryptosporidium* parasite. *Journal of Veterinary Histobiology*. 2014; 3(1): 1-7. [In Persian]
- 16- **Gharagozlu MJ, Dezfoulian O, Rahbari S, Bokae S, Jahanzede I, Rzavi ANE.** Intestinal Cryptosporidiosis in Turkey in Iran. *J Vet Med*. 2006; 53: 282-5. [In Persian]
- 17- **Hossienzadeh marzenaki J, Yousefi MR.** Survey of *Cryptosporidium* parasite infection of native Turkeys in Babol city. *New Journal of Veterinary Microbiology*. 2019; 2(1): 10-4. [In Persian]
- 18- **Mirzaei M, Mohammadi V, Fatuhi Ardakani R.** Prevalence of intestinal *cryptosporidium* infection in pigeons of Kerman city. *Iranian Veterinary Journal (Shahid Chamran University of Ahvaz)*. 2008; 4(2): 115-21. [In Persian]
- 19- **Nurolahi Fard S, Fathi S, Nowrozi Asl E, Rezaei Saqin Sera H.** Prevalence of *cryptosporidium* infection in pigeons of Mashhad city. The 16th Iranian Veterinary Congress 2010. [In Persian]
- 20- **Pwavenoht B, Jarlath U, Paul A, Idris A.** The Prevalence of *Cryptosporidium* Oocysts in Birds in Zaria, Nigeria. *Borneo Journal, Resour Sciences Technique*. 2013; 2(2): 52-9.
- 21- **Rayan U.** *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibian. *Exp Parasitol*. 2010; 87: 113-20.



Evaluation of *Cryptosporidium* infection in native birds (poultry, turkey and pigeon) in Zabol

Samira Khamar¹, Maryam Ganjali^{*2}, Dariush Saadati³, Fereshteh Mirshekar⁴, Shahin Rashki¹


1- Department of Parasitology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Associated Professor, Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

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

4- Member of Young and Elite Researchers Club, Zabol Branch, Islamic Azad University, Zabol, Iran.

Receive: June 20, 2023; Revise: July 6, 2023; Accept: July 9, 2023

 10.22034/nfvm.2023.403193.1191

Summary

Cryptosporidium is one of the important common parasites in livestock, poultry and humans, which is very important from the health and economic point of view. The aim of the present study was to investigate the infection with *Cryptosporidium* in native birds (chickens, turkeys, pigeons) in Zabol. In this study, 534 fecal samples from each native bird, including 260 samples from native chickens and roosters, 139 samples from turkeys, and 135 samples from pigeons were collected. The samples were stained by the modified Ziehl-Neelsen technique and studied with a light microscope. Based on our results, in 11 cases samples taken from birds were found to be infected with *Cryptosporidium* parasite. The frequency of infection in turkeys was 3.6%, in chickens (chickens and roosters) 0.8% and in pigeons 0.3%. The highest level of contamination was observed in turkeys, but there is no statistically significant difference between different groups of birds. The highest infection with cryptosporidium in terms of age was observed in birds more than one year old and in terms of location, it was observed in birds kept in closed space. The amount of pollution in winter season was more than other seasons. The results of this study showed that the infection with *cryptosporidium* in native turkeys is higher than other birds, so it is necessary to conduct more studies in this field and provide appropriate strategies related to the prevention and control of this disease.

Keywords: *cryptosporidium, zabol, native birds*



مروری بر انواع پری بیوتیک‌های بر پایه‌ی مخمر، شاخصه‌ها، ترکیبات فراسودمند و مکانیزم اثر آنها بر فراسنجه‌های رشد و سلامت در طیور

احسان اسکوئیان^{*}، رضا نورا^۲، مهدی سالاری پور^۱، احسان کریمی^۳، محمد فاصله جهرمی^۱، پریسا شکر یزدان^۱، مجتبی معین جهرمی^۱، مریم نوراللهی^۱

۱- مرکز پژوهش‌های صنعتی و معدنی، خوشه صنعتی زیست‌فناور آرکا، مشهد، ایران.

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

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

دریافت مقاله: ۱۲ مهر ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۸ بهمن ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۵ بهمن ۱۴۰۲

doi 10.22034/nfvm.2024.416769.1204

چکیده

امروزه به دلیل سوء مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، پیدایش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها تهدید جدی برای سلامت طیور تلقی می‌شود. از این رو کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک یکی از راهکارهای اصلی جهت مبارزه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌شمار می‌آید. در این میان، پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر به‌عنوان یکی از بهترین جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شده است. از مهم‌ترین پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر می‌توان به مخمر هیدرولیز شده، مخمر نیمه هیدرولیز شده، مخمر غیر فعال، دیواره سولی مخمر، عصاره مخمر و مخمر اتولیز شده اشاره کرد. پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر حاوی ترکیبات فراسودمندی نظیر ویتامین‌های گروه B، بتا کاروتن، ارگسترول، اسکوربیک اسید، پلی‌آمین‌ها، مایکوسین‌ها، آنزیم‌ها، بتاگلوکان‌ها و مانان الیگوساکاریدها هستند که بسته به روش تولید و فرآوری مقادیر این ترکیبات در محصول نهایی متفاوت خواهد بود. پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر در مقابل شرایط اسیدی و قلیایی دستگاه گوارش مقاوم بوده، و از طریق غیر فعال کردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، بهبود سیستم ایمنی، تحریک رشد پروبیوتیک‌ها، کمک به استقرار فلور میکروبی مفید در دستگاه گوارش، تحریک تولید اسیدهای چرب فرار، کاهش اسیدیته روده، بهبود رشد و تمایز پرزهای روده، تحریک تولید آنزیم‌ها، افزایش تولید پپتیدهای ضد میکروبی راندمان تولید را در طیور بهبود می‌بخشند. پری‌بیوتیک‌ها همچنین تأثیر بسزایی در کاهش ضریب تبدیل و کاهش تلفات ایفا می‌کنند.

واژگان کلیدی: مخمر اتولیز شده، مانان الیگوساکارید، بتاگلوکان، عصاره مخمر، دیواره مخمر

مقدمه

امروزه پیدایش میکروارگانسیم‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها تهدیدی جدی برای سلامت انسان است و عامل اصلی این مشکل سوء مصرف و استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها است. بر اساس گزارش سازمان دامپزشکی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام و طیور در ایران ۱۶ برابر استاندارد جهانی و معادل کل مصرف این اقلام دارویی در اروپاست است (۱). در سال ۲۰۱۴ سازمان بهداشت جهانی از مقاومت دارویی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک "تهدید بزرگ جهانی" نام برد. این سازمان با بررسی آمار مربوط به ۱۱۴ کشور، از افزایش مقاومت دارویی در همه نقاط جهان من جمله ایران خبر داد (۲). این نهاد وابسته به سازمان ملل متحد، با انتشار گزارشی اعلام کرد جهان وارد دوره "پسا آنتی‌بیوتیک" شده است؛ دوره‌ای که عفونت‌های ساده‌ای که برای سالیان طولانی قابل درمان بودند، کشنده شده‌اند (۲). امروزه سوء مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به انتقال آنها به فرآورده‌هایی چون گوشت و تخم‌مرغ شده و از این طریق بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها به چرخه غذایی انسان راه پیدا نموده‌اند (۳).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرفی نظیر تتراسایکلین و سولفانامیدها که در پرورش طیور استفاده می‌شود از طریق فرآورده‌هایی نظیر گوشت و تخم‌مرغ وارد چرخه غذایی انسان شده و اثرات منفی بر باروری در انسان داشته و موجب اختلالات جنینی می‌گردد (۴). بسیاری از تحقیقات صورت گرفته در کشور بر وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در کشور اذعان نموده و بر کاهش سریع مصرف آنتی‌بیوتیک تأکید دارند (۵-۷). با توجه به ارتباط این مهم با سلامت انسان، اهمیت تأمین غذا و همچنین امنیت غذایی که جایگاه مهمی در زندگی اجتماعی، اقتصادی و سیاسی کشورها دارد، برنامه‌های مهمی جهت کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیکی در صنعت پرورش دام و طیور در دستور کار قرار گرفته است (۸-۱۰).

امروزه ظهور میکروارگانسیم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور، منجر به ضریب تبدیل غذایی بالا، تلفات زیاد دوره پرورش و در نتیجه بالا بودن هزینه تولید شده است. از طرفی بالا بودن قیمت تمام شده گوشت در کشور در مقایسه با کشورهای همسایه یکی از موانع اصلی در صادرات این محصولات به کشورهای همسایه می‌باشد. علاوه بر آن با توجه به اینکه حدود ۸۵ درصد از نهاده‌های مصرفی بخش خوراک طیور وارداتی است، با افزایش راندمان تولید عملاً مقادیر چشمگیری صرفه‌جویی ارزی برای کشور به دنبال خواهد داشت. برای حل مشکل راندمان پایین این صنعت رویکرد ارائه شده بهبود ضریب تبدیل غذایی، کاهش تلفات و در نهایت کاهش هزینه‌های تولید می‌باشد که همه این اهداف با استفاده از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی طیور دست یافتنی خواهد بود (۸-۱۰).

پری‌بیوتیک‌ها یکی از جدیدترین و بهترین جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند. به‌طور کلی پری‌بیوتیک به ترکیباتی اطلاق می‌شود که در مقابل شرایط اسیدی و قلیایی دستگاه گوارش مقاوم بوده، به میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا چسبیده و مانع از کلونیزه شدن آنها در دستگاه گوارش شده و همچنین به‌طور اختصاصی توسط میکروارگانسیم‌های مفید دستگاه گوارش قابل استفاده بوده و منجر به افزایش جمعیت میکروارگانسیم‌های مفید روده می‌شوند. پری‌بیوتیک‌ها در دستگاه گوارش توسط میکروارگانسیم‌های مفید (پروبیوتیک‌ها) تخمیر شده و تولید اسیدهای چرب فرار را افزایش می‌دهند. در نتیجه تولید اسیدهای چرب فرار اسیدیته روده کاهش یافته و باکتری‌های بیماری‌زا توانایی تکثیر و کلونیزه شدن در روده را نخواهند داشت (۱۱). پری‌بیوتیک‌ها همچنین باعث افزایش سطح سیستم ایمنی، افزایش تولید پپتیدهای ضد میکروبی، بهبود رشد و تمایز پرزهای روده، تحریک تولید آنزیم‌ها و افزایش راندمان تولید در طیور می‌شود (۱۱-۱۴).

پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر: امروزه یکی از منابع

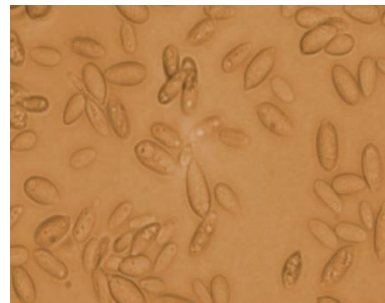
مروری بر انواع پری‌بیوتیک‌های بر پایه‌ی مخمر، شاخصه‌ها، ترکیبات فراسودمند و ...

گونه از این جنس در صنعت در تولید الکل، صنایع غذایی، پروتئین‌های تک‌سلولی، تولید ویتامین، تولید پروتئین‌های نوترکیب و کنترل بیولوژیک کاربرد دارند (۱۲). در بین این گونه‌ها ساکارومایسیس سرویزیه در صنایع غذایی و تولید الکل کاربرد زیادی دارد. علاوه بر آن مخمرهای دیگری نیز که خواص پروبیوتیکی دارند شامل *Torulaspora delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* نیز تاکنون در صنعت شناسایی شده و کاربردهای فراوانی دارند (۱۵). اولین نوع مخمر شناسایی شده که خواص پروبیوتیکی آن نشان داده شده است *Saccharomyces boulardii* می‌باشد. بر اساس بررسی‌های صورت گرفته ترکیبات موجود در درون سلول و دیواره سلولی مخمر به‌عنوان ترکیبات پری‌بیوتیکی محسوب می‌شوند. لذا مشتقات فراوانی از مخمرها نظیر مخمر هیدرولیز شده (hydrolyzed yeast)، مخمر نیمه هیدرولیز شده (partially hydrolyzed yeast)، مخمر غیر فعال (inactive yeast)، دیواره سلولی مخمر (yeast cell wall)، عصاره مخمر (yeast extract) و مخمر اتولیز شده (autolyzed yeast) اشاره کرد که خواص پری‌بیوتیکی آنها به اثبات رسیده است (۱۲). متأسفانه امروزه محصولات تجاری از این نوع که در بازار ایران موجود است تماماً وارداتی هستند.

مخمرها جزء شاخه *Ascomycota* و کلاس *Saccharomycota* طبقه‌بندی می‌شوند. مخمرها جزء یوکاریوت‌ها بوده و در فلور میکروبی دستگاه گوارش موجودات، گیاهان، آب و مواد غذایی وجود دارند. در میان مخمرهایی که جزء شاخه *Ascomycota* طبقه‌بندی می‌شوند جنس ساکارومایسیس معروف‌ترین می‌باشد. ۲۰

اصلی تولید پری‌بیوتیک‌ها مخمرها هستند. مخمرها جزء یوکاریوت‌ها بوده و در فلور میکروبی دستگاه گوارش موجودات، گیاهان، آب و مواد غذایی وجود دارند. امروزه در صنعت از پیکره مخمرهایی نظیر *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus*، *Yarrowia lipolytica*، *Kluyveromyces fragilis*، *Saccharomyces cerevisiae* و *Saccharomyces boulardii* پری‌بیوتیک تولید می‌شود. از مشتقات این پروسه می‌توان به مخمر هیدرولیز شده (hydrolyzed yeast)، مخمر نیمه هیدرولیز شده (partially hydrolyzed yeast)، مخمر غیر فعال (inactive yeast)، دیواره سلولی مخمر (yeast cell wall)، عصاره مخمر (yeast extract) و مخمر اتولیز شده (autolyzed yeast) اشاره کرد که خواص پری‌بیوتیکی آنها به اثبات رسیده است (۱۲). متأسفانه امروزه محصولات تجاری از این نوع که در بازار ایران موجود است تماماً وارداتی هستند.

مخمرها جزء شاخه *Ascomycota* و کلاس *Saccharomycota* طبقه‌بندی می‌شوند. مخمرها جزء یوکاریوت‌ها بوده و در فلور میکروبی دستگاه گوارش موجودات، گیاهان، آب و مواد غذایی وجود دارند. در میان مخمرهایی که جزء شاخه *Ascomycota* طبقه‌بندی می‌شوند جنس ساکارومایسیس معروف‌ترین می‌باشد. ۲۰



شکل ۱- تصویر مخمر زنده (سمت راست) و مخمر خشک اتولیز شده (سمت چپ)

هیدرولیز به‌وسیله اسید و آنزیم‌ها و اتولیز سلولی صورت می‌گیرد. استفاده از روش‌هایی نظیر هیدرولیز اسیدی به

تولید پری‌بیوتیک بر پایه مخمر: فرآیند هیدرولیز مخمر از طریق روش‌های مختلفی نظیر پلاسمولیز،

خاطر هزینه تمام شده و میزان نمک بالا در محصول نهایی و ریسک تولید ترکیبات سرطانزا (monochloropropanol و dichloropropanol) در طی فرایند هیدرولیز محدود شده است. هیدرولیز به وسیله آنزیم‌ها یکی از بهترین روش‌هاست اما مخمر هیدرولیز شده در این روش برای مصارف انسانی توصیه می‌شود (۱۶). اتولیز سلولی توسط آنزیم‌های موجود در خود مخمر انجام می‌شود و پری‌بیوتیکی که بر پایه مخمر برای مصارف دام و طیور تولید می‌شود عموماً بر پایه اتولیز سلولی (autolyzed yeast) بوده چرا که این اقتصادی‌ترین روش تولید پری‌بیوتیک برای مصارف دام و طیور است (۱۶).

مخمرها اغلب با استفاده از منابع ارزان کربنی و از ته نظیر اوره و ملاس در حضور برخی از مواد معدنی و ویتامین‌ها تولید می‌شود. در انتهای تولید شروع فرآیند اتولیز سلولی توسط حرارت و شوک‌های اسمزی در مخمر آغاز می‌شود و آنزیم‌های داخلی شروع به هضم مخمر می‌نمایند (۱۲). فرآیند اتولیز سلولی به‌طور عمومی توسط مخلوط کردن و حرارت بین ۳۰ تا ۶۰ درجه برای ۱۲ تا ۲۴ ساعت صورت می‌گیرد. روند اتولیز و تخریب سلولی از طریق اضافه کردن نمک به محیط کشت افزایش می‌یابد. فرآیند خود هضمی منجر به هضم پروتئین، گلیکوزن، و شکسته شدن دیواره سلولی شده و ترکیباتی نظیر اسیدهای آمینه (گلاپسین، سیستئین، گلوتامیک اسید)، پپتیدها، کربوهیدرات محلول، دیواره سلولی، اسیدهای نوکلئیک، مواد معدنی و ویتامین‌های گروه B آزاد می‌شوند (۱۶، ۱۷). در طی اتولیز سلولی ۵۵ درصد از DNA و ۹۵ درصد از RNA نیز تجزیه می‌شوند.

ترکیبات فراسودمند همراه پری بیوتیک‌های بر پایه مخمر: به‌طور معمول ۵۰ تا ۶۹ درصد وزن خشک مخمر اتولیز شده را پروتئین خام تشکیل می‌دهد، ۱۵ تا ۳۰ درصد کربوهیدرات‌ها و ۳ تا ۱۰ درصد نیز از چربی‌ها تشکیل شده است. برخی از مخمرهای اتولیز شده بسته به نوع مخمر حاوی بتا کاروتن نیز می‌باشند که در بدن طیور

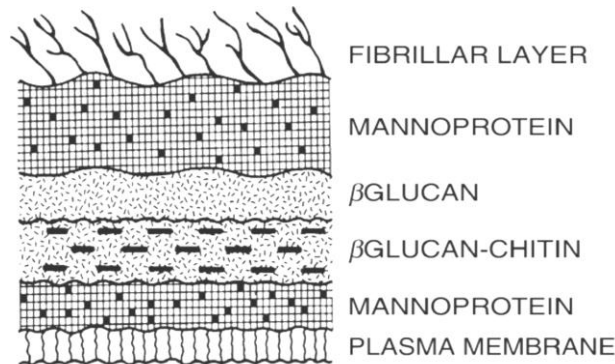
تبدیل به ویتامین A می‌شود. ویتامین A نیز نقش مهمی در رشد و تمایز سلولی و تأمین سلامت طیور دارد (۱۸). از دیگر ترکیبات موجود در مخمر اتولیز شده می‌توان به ergosterol و L-ascorbic acid اشاره کرد. بیش از ۹۰ درصد استرول‌های موجود در مخمر *S. Cerevisiae* به ergosterol اختصاص دارد. این ترکیب در دیواره سلولی مخمر وجود داشته و در ساختار، انعطاف، نفوذپذیری دیواره سلولی مخمر نقش دارد. این ترکیب پیش‌ساز ویتامین D₂ است که در در جذب کلسیم نقش ایفا می‌کند (۱۹). از دیگر ترکیبات موجود در مخمر اتولیز شده می‌توان به ویتامین C اشاره کرد. این ترکیب باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و تقویت سیستم ایمنی در طیور می‌شود.

از دیگر ترکیبات مؤثره موجود در مخمر اتولیز شده پلی‌آمین‌ها (putrescine, spermidine و spermine) هستند که در رشد، تمایز و متابولیسم سلول‌ها نقش دارند. همانندسازی DNA، رونویسی و ترجمه نیز به وجود این پلی‌آمین‌ها نیازمند است. نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهد که پلی‌آمین‌ها توسط برخی مخمرها تولید می‌شود. این پلی‌آمین‌ها با تحریک سلول‌های اپیتلیال روده، باعث افزایش سرعت رشد و تمایز آنها شده در نتیجه سطح جذب را افزایش داده و توان سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی این سلول‌ها را تقویت می‌کنند. در یکی از بررسی‌های اخیر افزایش راندمان رشد در ماهی‌هایی که با جیره حاوی مخمر *Debaryomyces hansenii* تغذیه شدند به تولید پلی‌آمین‌ها توسط این مخمر نسبت داده شده است (۲۰، ۲۱).

از دیگر ترکیباتی که در مخمر اتولیز شده بسته به نوع مخمر می‌توان یافت، مایکوسین‌ها است. مایکوسین‌ها ترکیبات گلیکوپروتئینی هستند که باعث تخریب دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زا شده که رسپتور آن بر روی دیواره آن باکتری‌ها وجود داشته باشد. تولید مایکوسین‌ها در مخمرهای موجود در جنس *Saccharomyces*، *Kluyveromyces* و *Zygosac-charomyces* گزارش شده

مروری بر انواع پری‌بیوتیک‌های بر پایه‌ی مخمر، شاخصه‌ها، ترکیبات فراسودمند و ...

است. پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر: بسیاری از خواص پری‌بیوتیکی مخمرها به بتاگلوکان‌ها و مانان الیگوساکاریدهای موجود در دیواره سلولی آنها نسبت داده شده است. دیواره سلولی در جنس ساکارومایسس از ترکیبات پلی‌ساکاریدی تشکیل شده که در ترکیب با پروتئین‌ها بوده و مانوپروتئین‌ها و بتاگلوکان‌های باند شده با کیتین را تشکیل می‌دهند (۲۴). به‌طور میانگین ۱۵ تا ۲۰ درصد وزن مخمر خشک اتولیز شده از دیواره سلولی مخمر تشکیل شده است و این دیواره سلولی حاوی ۲۰ تا ۵۰ درصد مانوپروتئین (مانان الیگوساکاراید + پروتئین‌ها) و ۳۰ تا ۶۰ درصد بتاگلوکان و ۱ تا ۶ درصد کیتین تشکیل شده است (شکل ۲) (۲۴).



شکل ۲- اجزای تشکیل‌دهنده دیواره سلولی مخمر (۳۷)

اولین مرحله شروع عفونت و ایجاد التهاب توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در روده، اتصال میکروارگانیسم‌ها به موکوس دیواره روده و کلونیزه شدن آنهاست. این اتصال توسط carbohydrate-binding proteins یا Fimbriae موجود در دیواره میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا صورت می‌گیرد. این ضمائم روی سطح باکتری‌ها قرار داشته و باکتری‌ها توسط این ضمائم به دیواره سلولی اپیتلیال روده متصل می‌شوند. سطح دیواره میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند ای‌کلای، سالمونلا و کلستریدیوم‌ها دارای ضمائم Type-I mannose-specific lectin-like fimbriae است. مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌های موجود در مخمر اتولیز

مخمر اتولیز شده همچنین حاوی آنزیم‌هایی نظیر پروتئازها، هیدرولازها و کربوکسی پپتدازها و آمینوپپتیدازها می‌باشد. نتایج بررسی‌های اخیر نشان داده که این آنزیم‌ها رسپتورهای روده‌ای Toxin A را در روده تجزیه نموده و این امر باعث عدم اتصال *Clostridium difficile* به دیواره روده می‌شود (۲۲). علاوه بر آن وجود آنزیم Invertase نیز که باعث تبدیل سوکروز به گلوکوز و فروکتوز شده و باعث شده تا میکروارگانیسم‌های موجود در دستگاه گوارش از این منبع کربنی به راحتی استفاده کنند (۲۳).

بتاگلوکان‌ها و مانان الیگوساکاریدهای موجود در

نقش بتاگلوکان‌ها و مانان الیگوساکاریدها در جذب و حذف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا: ساختار سه بعدی و میزان مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها در دیواره مخمر اثر معنی‌داری بر میزان جذب میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارد. از این رو پتانسیل باند شدن دیواره سلولی هر نوع مخمری با مخمر دیگر متفاوت خواهد بود. بتاگلوکان و مانان الیگوساکاریدها به‌طور خالص توانایی جذب و حذف میکروارگانیسم‌هایی نظیر ای‌کلای و سالمونلا را نداشته و در حقیقت با قرارگیری در ساختار دیواره مخمر و قرارگیری در شکل فضایی خاص، توانایی چسبیدن به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را دارا می‌شوند.

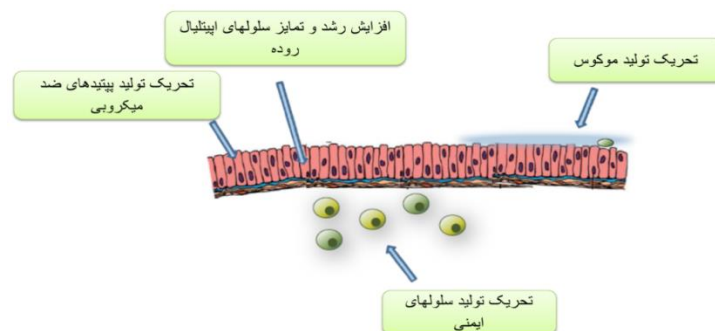
این رو تولید مخمر اتولیز شده از ترکیبی از مخمرهای مختلف راندمان مهار و حذف میکروارگانسیم‌های بیماری‌زای مختلف را افزایش می‌دهد (۲۷).

مکانیزم عمل پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر در

تقویت سیستم ایمنی و سلامت طیور: جمعیت میکروبی دستگاه گوارش طیور بین 10^8 تا 10^{14} کلونی در هر گرم ماده غذایی موجود در روده می‌باشد. استقرار سریع فلور میکروبی مفید در دستگاه گوارش یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که تأمین‌کننده سلامت و زمینه‌ساز بروز حداکثر پتانسیل ژنتیکی در جوجه‌های گوشتی خواهد بود. نتایج گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که مخمر اتولیز شده بر روی استقرار سریع لاکتوباسیلوس‌ها در دستگاه گوارش طیور تأثیر بسزایی دارند. مخمر اتولیز شده با فراهم کردن مانان‌ها، بتاگلوکان‌ها، پپتیدها، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها باعث تحریک و افزایش جمعیت پروبیوتیک‌ها و باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک اسید در روده شده، سیستم ایمنی را تقویت کرده و مقاومت جوجه‌ها را در مقابل ابتلا به بیماری‌ها افزایش می‌دهد. دیواره سلولی مخمر که از مانان‌ها، گلوکان‌ها و کیتین تشکیل شده است باعث تجمع (co-aggregation)، چسبیدن (cohesion) باکتری‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش شده از این رو مقاومت و ماندگاری آنها را در مقابل تغییرات pH مایعات معده و روده افزایش می‌دهد (شکل ۳) (۲۸).

شده تمایل شدیدی به اتصال به این ضمامم داشته از این رو مانع چسبیدن و کلونیزه شدن این میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا در دیواره روده می‌شوند. آزمایشات بسیاری نشان داده است که بتاگلوکان‌ها و مانان‌های موجود در دیواره سلولی مخمر با بلوکه کردن رسپتورهای مانوزی (عوامل اتصال پاتوژن‌ها به دیواره اپیتلیال روده) میزان ابتلا به عفونت‌های روده‌ای و التهاب را کاهش می‌دهند (۲۵).

نتایج تحقیقاتی نشان می‌دهد که جوجه‌هایی که در محیط بدون حضور میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا رشد داده شدند ۱۵ درصد رشد بیشتری نسبت به جوجه‌هایی داشتند که در شرایط عادی در حضور میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا رشد داده شدند (۲۶). این امر به این دلیل است که میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا نیاز به انرژی را در حیوان افزایش داده و راندمان استفاده از مواد غذایی را کاهش می‌دهند (۲۶). اتصال مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها به میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و ممانعت از کلونیزه شدن آنها در روده علاوه بر محافظت طیور از عوامل بیماری‌زا، منجر به صرفه‌جویی در انرژی میزبان شده به طوری که مصرف انرژی میزبان برای ترمیم و نگهداری از سلول‌های اپیتلیال روده در مقابل عوامل بیماری‌زا کاهش می‌یابد و این انرژی صرفه‌جویی شده برای رشد و تولید استفاده می‌شود (۱۲). همچنین نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهد که دیواره سلولی مخمرها بر اساس ترکیبات تشکیل دهنده به صورت اختصاصی علیه میکروارگانسیم‌های بیماری‌زای مختلف عمل می‌کند، از



شکل ۳- اثرات مستقیم مخمر اتولیز شده شامل تحریک رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیال روده، تحریک تولید ترکیبات ضد میکروبی، تحریک تولید موکوس و افزایش تولید سلول‌های ایمنی در سلول‌های اپیتلیال روده (۱۲).

مروری بر انواع پری‌بیوتیک‌های برپایه‌ی مخمر، شاخصه‌ها، ترکیبات فراسودمند و ...

ضد التهابی، واکنش‌های التهابی به وجود آمده در روده در اثر فعالیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زایی نظیر ای‌کلای و لیپوپلی‌ساکاریدهای ناشی از دیواره این باکتری را نیز برطرف می‌کنند (۳۰). به‌طور کلی مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها با باندشدن به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و همچنین جدا نمودن میکروارگانیسم‌های کلونیزه شده از دیواره اپیتلیال روده نقش مؤثری در حذف باکتری‌های بیماری‌زا و کاهش اثرات التهابی باکتری‌هایی نظیر *Clostridium* Spp.، *Salmonella* Spp.، *Campylobacter* spp. و *Coliforms* دارند (جدول ۱) (۳۱).

پری‌بیوتیک تولیدشده از مخمرهایی نظیر *S. cerevisiae* و *S. boulardii* با داشتن مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها علیه بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا من جمله ای‌کلای، کلستریدیوم‌ها، سالمونلا‌ها خاص ضد میکروبی نشان داده‌اند (۲۸). سالمونلا (*Salmonella enterica*) یکی از عوامل اصلی اسهال، التهاب و نکروزیس در روده طیور است. استفاده از مخمر هیدرولیز شده *S. boulardii* حاوی مانوپروتئین‌ها علاوه بر کاهش جمعیت این باکتری بیماری‌زا باعث کاهش التهاب از طریق کاهش بیان ژن‌های التهابی نظیر TNF-alpha در سلول‌های روده می‌شود (۲۹). مخمرها با داشتن خواص

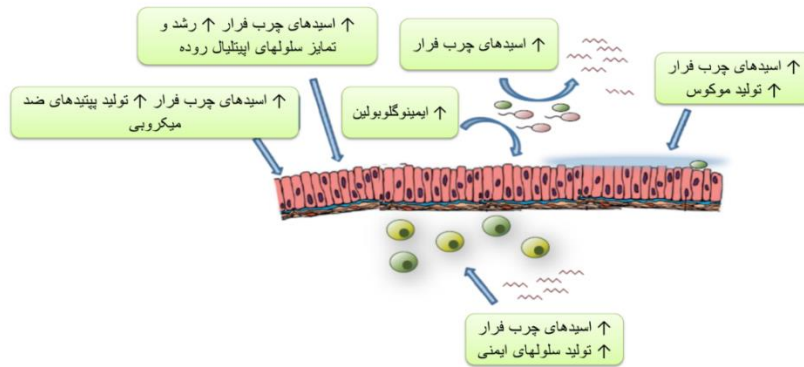
جدول ۱- میزان چسبندگی دیواره سلولی مخمر به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای طیور

درصد	تعداد گونه‌هایی که Bio-Mos توانایی مهار آنها را دارد	تعداد گونه‌ها	باکتری‌های بیماری‌زا
۶۴	۹۲	۱۴۳	<i>E. coli</i>
۶۷	۳۱	۴۶	<i>Salmonella</i> spp.
۸۶	۶	۷	<i>S. enteritidis</i>
۷۰	۷	۱۰	<i>S. typhimurium</i>
۸۰	۴	۵	<i>Clostridium</i> spp.
۱۴	۱	۷	<i>Campylobacter</i>
۵۶	۱۴۵	۲۵۸	Total

Bio-Mos: مخمر اتولیز شده غنی از دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* است (۳۱)

نظیر لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها به‌طور طبیعی در فلور میکروبی دستگاه گوارش وجود دارند. استفاده از مخمر هیدرولیز شده جمعیت این میکروارگانیسم‌های مفید را افزایش داده و در نتیجه این میکروارگانیسم‌های مفید با رقابت برای مواد غذایی، رقابت برای کلونیزه شدن، تولید ترکیبات ضد میکروبی و تقویت سیستم ایمنی مانع از رشد و جایگزینی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در روده طیور می‌شوند (شکل ۴).

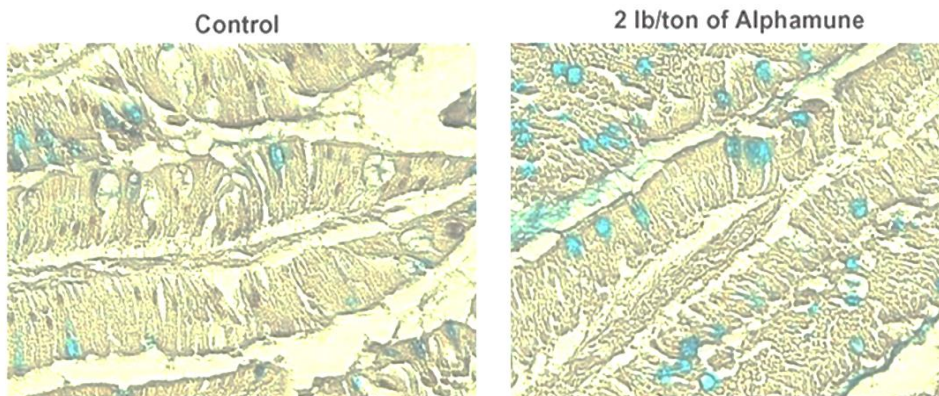
مخمر اتولیز شده غنی از دیواره سلولی باعث تحریک ظهور ژن‌های درگیر در antiviral response و antimicrobial response در سلول‌های اپیتلیال روده شده که در نتیجه تولید پپتیدهای ضد میکروبی افزایش می‌یابد. وجود این پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی از رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند (۳۲). مخمر اتولیز شده به‌طور غیر مستقیم نیز می‌تواند مانع از رشد و جایگزینی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در روده طیور شود. میکروارگانیسم‌های مفید (پروبیوتیک‌ها)



شکل ۴- اثرات غیر مستقیم مخمر اتولیز شده که باعث افزایش رشد پروبیوتیک‌ها و در نتیجه افزایش تولید اسیدهای چرب فرار می‌شود. افزایش تولید اسیدهای چرب فرار باعث افزایش رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیال روده، افزایش تولید پپتیدهای ضد میکروبی، افزایش تولید ایمنوگلوبولین‌ها و سلول‌های ایمنی، و تحریک تولید موکوس می‌شود (۱۳).

الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها علاوه بر تحریک رشد و تمایز در پرزهای روده، جمعیت سلول‌های گوبلت (goblet cell) را در ژژنوم تا ۴۰ درصد افزایش داده است. سلول‌های گوبلت در تولید موسین نقش داشته و مانع اصلی در کلونیزه شدن میکروارگانیسم‌های پاتوژن در روده می‌باشند (شکل ۵).

مخمر اتولیز شده از *S. Cerevisiae* واریته *Carlsbergensis* با غلظت ۰/۲ درصد در جیره در جوجه‌های گوشتی در هفته اول باعث رشد و تمایز پرزهای روده شده که در نتیجه تولید آنزیم‌های لازم برای تجزیه مواد غذایی افزایش یافته است. این امر باعث بهبود راندمان رشد در جوجه‌های گوشتی شده است. ترکیبات موجود در مخمر اتولیز شده من جمله مانان



Sulfomucin goblet cells

شکل ۵- اثر مخمر اتولیز شده تجاری *Alphamune* بر جمعیت سلول‌های گوبلت در ایلئوم جوجه گوشتی در هفت روزگی. سلول‌های گوبلت به رنگ آبی در تصویر نشان داده شده است و تصویر نشان می‌دهد که استفاده از مخمر اتولیز شده تعداد سلول‌های گوبلت را در واحد سطح در ایلئوم افزایش داده است (۳۳).

لنفوسیت‌های B و T، و افزایش سیتوکین‌ها شده که همه این عوامل باعث افزایش سطح سیستم ایمنی در سلول‌های اپیتلیال روده می‌شود (۱۲). افزایش فعالیت این

مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌های موجود در مخمر اتولیز شده باعث فعال شدن فاگوسیتوز در ماکروفاژها، افزایش جمعیت *natural killer cells*.

مروری بر انواع پری‌بیوتیک‌های بر پایه‌ی مخمر، شاخصه‌ها، ترکیبات فراسودمند و ...

عملکرد خوبی نداشته و در نتیجه میزان پاسخ به واکسیناسیون و تولید آنتی‌بادی در خون مناسب نخواهد بود. بررسی‌های اخیر نشان داده که استفاده از مخمر اتولیز شده در جیره طیور باعث تحریک سیستم ایمنی شده و میزان پاسخ به واکسیناسیون و تولید آنتی‌بادی در بدن طیور به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۳۶). توانایی تحریک سیستم ایمنی توسط الیگوساکاریدهای موجود در دیواره سلولی مخمرها به ساختار، شکل فضایی، شاخه‌ها، وزن مولکولی مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌ها بستگی دارد.

مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌های موجود در دیواره مخمر تمایل بالایی (affinity) در اتصال به مایکوتوکسین‌ها دارند (جدول ۲). این امر مانع از جذب مایکوتوکسین‌ها توسط سلول‌های روده می‌شود. علاوه بر آن این ترکیبات با افزایش سطح سیستم ایمنی، جوجه‌ها را در مقابل مایکوتوکسین مقاوم می‌نمایند (۳۷).

سلول‌ها بر عملکرد لایه‌های دفاعی اپیتلیال روده تأثیر گذاشته و از این طریق لایه‌های دفاعی روده ترمیم شده و درمقابل عوامل بیماری‌زا ایمن می‌شود (۳۴). مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان‌های موجود در مخمر هیدرولیز شده با افزایش فعالیت سلول‌های طحال، هتروفیل‌ها، تحریک تولید پپتیدهای ضد میکروبی در بافت اپیتلیال روده و طحال، جوجه‌های گوشتی را در مقابل میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا ایمن می‌کنند (۳۵). افزایش سطح سیستم ایمنی از طریق واکسیناسیون نیز یکی از استراتژی‌های مفید جهت مبارزه با بیماری‌ها است. بیماری‌هایی نظیر نیوکاسل و گامبرو بیماری‌های ویروسی هستند که در صورت بروز تلفات زیانباری به همراه دارند. آنتی‌بادی مادری موجود در خون جوجه‌ها برای هفته اول جوجه‌ها را در مقابل این بیماری‌ها ایمن می‌کند و واکسیناسیون علیه این بیماری‌ها تنها راه مبارزه است. در شرایط آلودگی بالا و استرس، سیستم ایمنی جوجه‌ها

جدول ۲- نرخ جذب مایکوتوکسین‌ها توسط دیواره سلولی مخمر (%)

مایکوتوکسین‌ها	نرخ جذب در pH=3	نرخ جذب در pH=6
افلاتوکسین	60	54
زرالنون	79	79
Deoxynivalenol	15	25

نرخ جذب انواع مایکوتوکسین‌ها در pHهای مختلف متفاوت می‌باشد (۳۷ و ۵۸).

گوشت، مورفولوژی روده را بهبود داده است (۲۸). ترکیبات موجود در مخمر اتولیز شده از طریق باند شدن با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای طیور و جلوگیری از چسبیدن آنها به اپیتلیوم روده، اتصال و حذف سموم میکروبی، جلوگیری از اختلالات دستگاه گوارش، تحریک سیستم ایمنی و خواص ضد التهابی توانسته‌اند راندمان تولید را در طیور گوشتی بهبود دهند (۲۴). مخمر اتولیز شده همچنین حاوی ویتامین‌های گروه B، فولیک اسید، آنتی‌اکسیدانت (گلوکاتینون)، مواد معدنی نظیر سلیوم و کروم می‌باشد. مانان الیگوساکاریدها و بتاگلوکان موجود در دیواره سلولی سیستم ایمنی را فعال می‌کند، کلاسترول را کاهش داده و مایکوتوکسین‌ها را جذب و مهار می‌کند.

نتایج استفاده از پری بیوتیک‌های بر پایه مخمر

در طیور: پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر به‌عنوان یک منبع پروتئینی تک‌سلولی با تحریک رشد باکتری‌های تولیدکننده اسید استیک سلامت دستگاه گوارش را در حیوانات تأمین می‌کنند. این نوع پری‌بیوتیک‌ها از طریق بهبود سیستم ایمنی، مهار سموم میکروبی، و مهار رشد میکروارگانیزم‌های پاتوژن عملکرد حیوانات را بهبود می‌دهند (۲۸). در یکی از بررسی‌ها استفاده از مخمر اتولیز شده *S. boulardii* به میزان یک کیلوگرم در تن جیره طیور آلوده به سالمونلا تا ۲۰ درصد از کلونیزاسیون سالمونلا در دستگاه گوارش طیور کاسته است. در بررسی دیگری استفاده از مخمر اتولیز شده راندمان رشد، کیفیت

نظیر ضریب تبدیل، بهبود عملکرد در واحد سطح، کاهش تلفات و در مجموع افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه‌های تولید را به دنبال داشته باشد (۳۸-۴۰). نتایج گزارش‌های موجود در استفاده از مخمر اتولیز شده در جیره جوجه‌های گوشتی در (جدول ۳) نشان داده شده است.

دیواره سلولی مخمر با جذب عناصر سنگین، جذب و حذف مایکوتوکسین‌ها، کاهش کلسترول، خواص ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی در رشد نمو حیوانات بسیار مؤثر هستند (۲۴). بر اساس گزارش‌های موجود استفاده از مخمر اتولیز شده می‌تواند شاخص‌های اقتصادی تولید

جدول ۳- اثر استفاده از مخمر اتولیز شده بر عملکرد، ضریب تبدیل و برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک در جوجه‌های گوشتی

ردیف	کیلوگرم در تن جیره	خصوصیات	منبع
۱	۰/۱ تا ۲	نتیجه ۲۹ آزمایش، افزایش وزن ۱/۶۱ درصد و کاهش ضریب تبدیل و تلفات به ترتیب به میزان ۱/۹۹ درصد و ۲۱/۴ درصد	(۴۱)
۲	۱	افزایش وزن، بهبود ضریب تبدیل، کاهش جمعیت سالمونلا و ای‌کلای از روده، افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها	(۴۲)
۳	۰/۴	بهبود ضریب تبدیل، کاهش چربی محوطه بطنی و افزایش قطر عضلات سینه	(۴۳)
۴	۱	افزایش وزن، بهبود ضریب تبدیل، بهبود سیستم ایمنی	(۴۶)
۵	۰/۷۵	بهبود یکنواختی در گله، افزایش راندمان تولید	(۴۴)
۶	۰/۲۵	افزایش سیستم ایمنی	(۴۵)
۷	۱	ضریب تبدیل، قابلیت هضم مواد غذایی	(۴۶)
۸	۱	افزایش سیستم ایمنی، کاهش جمعیت سالمونلا	(۴۷)
۹	۱	افزایش وزن	(۴۸)
۱۰	۰/۲	خواص ضد التهابی و افزایش سیستم ایمنی	(۴۹)
۱۱	۰/۲	بهبود عملکرد، خواص ضد التهابی	(۵۰)
۱۲	۱	بهبود سیستم ایمنی و افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی	(۵۱)
۱۳	۰/۲	افزایش سیستم ایمنی، کاهش جمعیت <i>Clostridium perfringens</i>	(۵۲)
۱۴	۲	افزایش عملکرد، بهبود سیستم ایمنی، کاهش جمعیت <i>E. Coli</i>	(۵۳)
۱۵	۱	بهبود ضریب تبدیل، کاهش جمعیت <i>Campylobacter Coli</i>	(۵۴)
۱۶	۰/۵	بهبود ضریب تبدیل، بهبود کیفیت گوشت، بهبود رشد و تمایز پرزهای روده	(۳۹)
۱۷	۲/۵	بهبود ضریب تبدیل، بهبود عملکرد سیستم ایمنی	(۵۵)
۱۸	۱	بهبود ضریب تبدیل، افزایش عملکرد پرزهای روده و سلول‌های گوبلت	(۵۶)
۱۹	۱	کاهش جمعیت سالمونلا، افزایش راندمان رشد	(۵۷)
۲۰	۰/۵	بهبود سیستم ایمنی، کاهش جمعیت <i>E. Coli</i>	(۵۹)

نتیجه‌گیری

مایکوسین‌ها، آنزیم‌ها، بتاگلوکان‌ها و مانان الیگوساکاریدها هستند که بسته به روش تولید و فرآوری مقادیر این ترکیبات در محصول نهایی متفاوت خواهد بود. پری‌بیوتیک‌های از طریق غیر فعال کردن میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا، بهبود سیستم ایمنی، تحریک رشد پروبیوتیک‌ها، کمک به استقرار فلور میکروبی مفید در دستگاه گوارش، تحریک تولید اسیدهای چرب فرار، کاهش اسیدیته روده، بهبود رشد و تمایز پرزهای روده، تحریک تولید آنزیم‌ها، افزایش تولید پپتیدهای ضد

پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر یکی از بهترین جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها در طیور به شمار می‌رود. از مهم‌ترین پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر می‌توان به مخمر هیدرولیز شده، مخمر نیمه هیدرولیز شده، مخمر غیر فعال، دیواره سولی مخمر، عصاره مخمر و مخمر اتولیز شده اشاره کرد. پری‌بیوتیک‌های بر پایه مخمر حاوی ترکیبات فراسودمندی نظیر ویتامین‌های گروه B، بتاکاروتن، ارگسترول، اسکوربیک اسید، پلی‌آمین‌ها،

و کاهش تلفات ایفا می‌کنند.

میکروبی راندمان تولید را در طیور بهبود می‌دهند. پری بیوتیک‌ها همچنین تأثیر بسزایی در کاهش ضریب تبدیل

References

- 1- **Salamatnews**. Antibiotics; An opportunity that has turned into a threat [Internet]. Salamatnews; <http://www.salamatnews.com/news/174175>, updated 2016 Jan 30; cited 2016 Jan. [In Persian]
- 2- **Organization WH**. Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary. 2014.
- 3- **Donoghue DJ**. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poult Sci*. 2003; 82(4): 618-21.
- 4- **Capleton AC, Courage C, Rumsby P, Holmes P, Stutt E, Boxall AB, et al**. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicol Lett*. 2006; 163(3): 213-23.
- 5- **Qavidel M, Rad M, Seifi H, Moradi Bidhandi S, Basami M**. Serotyping, antibiogram typing and molecular typing of *Salmonella* isolated from chickens in Sistan and Baluchistan province. In 8th Congress of Veterinarians of Clinical Sciences of Iran 2013 Oct 23 [In Persian].
- 6- **Khoshdozan Kh, Momeni A, Rozbehan B, Aali S, Damghanian N**. Investigating antibiotic resistance in strains isolated from poultry carcasses in Semnan city. *Vet. l. r*. 2012; 4(1): 31-7 [In Persian].
- 7- **Ghorbani Ranjbari A, Asmaryan, Ghorbani Ranjbari N**. Isolation of *Clostridium perfringens* from some meat poultry in Fars province and drug resistance study. *Vet. l. r*. 2013; 5(1): 39-46 [In Persian].
- 8- **Ismail Begi H**. Antibiotic resistance in the livestock and poultry industry and strategies to combat it [Internet]. Biotechnology Development Headquarter; <https://www.biotechmag.ir/index.php/post/single/150/bio>, updated 2019April 29; cited 2019April [In Persian].
- 9- **Seyed Mostafavi M**. Challenges of Iran's poultry industry and solutions to deal with them [Internet]. Agri-naein; <http://agri-naein.ir/LinkClick.aspx?link=morghdari.pdf&mid=17791>, updated 2012 May 30; cited 2012May [In Persian].
- 10- **Shariatmadari F, Mohiti Asli M**. Feed Additives of Animal, Poultry and Aquatic. Tarbiat Modares Publication. 2008; 229-230. [In Persian]
- 11- **Hajati H, Rezaei M**. The application of prebiotics in poultry production. *Int. J. Poult Sci*. 2010; 9(3): 298-304. [In Persian]
- 12- **Roto SM, Rubinelli PM, Ricke SC**. An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *F. Vet. Sci*. 2015; 2.
- 13- **Venema K, do Carmo AP**. Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends: Caister Academic Press. 2015.
- 14- **Patterson J, Burkholder K**. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci*. 2003; 82(4): 627-31.
- 15- **Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, Shimazaki K**. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J. Dairy Sci*. 2004; 87(12): 4050-6.
- 16- **Cui C, Qian Y, Sun W, Zhao H**. Effects of high solid concentrations on the efficacy of enzymatic hydrolysis of yeast cells and the taste characteristics of the resulting hydrolysates. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2016; 51(5): 1298-304.
- 17- **Ferreira I, Pinho O, Vieira E, Tavela J**. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci. Technol*. 2010; 21(2): 77-84.
- 18- **Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN**. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb. Cell Fact*. 2014; 13(1): 1.
- 19- **Parks LW, Casey WM**. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annual Reviews in Microbiology*. 1995; 49(1): 95-116.
- 20- **Tovar D, Zambonino J, Cahu C, Gatesoupe F, Vázquez-Juárez R, Lésel R**. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*. 2002; 204(1): 113-123.
- 21- **Reyes-Becerril M, Esteban MÁ, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F**. Polyamine determination in different strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* by high pressure liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2011;127(4):1862-5.

- 22- Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O'Keane CJ, Castagliuolo I, *et al.* Saccharomyces boulardii inhibits Clostridium difficile toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *GASTROENTEROLOGY-BALTIMORE THEN PHILADELPHIA*. 1993; 104: 1108.
- 23- Shankar T, Thangamathi P, Rama R, Sivakumar T. Optimization of invertase production using Saccharomyces cerevisiae MK under varying cultural conditions. *Int. J. Biochem. Biophys.* 2013; 1(3): 47-56.
- 24- Bzducha-Wróbel A, Kieliszek M, Błażej S. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. *Eur. Food Res. Technol.* 2013; 237(4): 489-99.
- 25- Yang Y, Iji P, Kocher A, Mikkelsen L, Choct M. Effects of mannanoligosaccharide and fructooligosaccharide on the response of broilers to pathogenic *Escherichia coli* challenge. *Br. Poult. Sci.* 2008; 49(5): 550-9.
- 26- Dibner J, Richards J. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 2005; 84(4): 634-43.
- 27- Ganner A, Stoiber C, Wieder D, Schatzmayr G. Quantitative in vitro assay to evaluate the capability of yeast cell wall fractions from Trichosporon mycotoxinivorans to selectively bind gram negative pathogens. *J. Microbiol. Methods.* 2010; 83(2): 168-74.
- 28- Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol.* 2012; 3: 421.
- 29- Badia R, Brufau MT, Guerrero-Zamora AM, Lizardo R, Dobrescu I, Martin-Venegas R, *et al.* β -Galactomannan and Saccharomyces cerevisiae var. boulardii modulate the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(3): 368-76.
- 30- Huff G, Huff W, Rath N, Tellez G. Limited treatment with β -1, 3/1, 6-glucan improves production values of broiler chickens challenged with Escherichia coli. *Poult. Sci.* 2006; 85(4): 613-8.
- 31- Peuranen S, Kocher A, Dawson K. Yeast cell wall preparations prevent the attachment of enteropathogenic Escherichia coli on broiler gut mucus. *Reprod Nutr Dev.* 2006; 46: S111.
- 32- Brennan K, Graugnard D, Xiao R, Spry M, Pierce J, Lumpkins B, *et al.* Comparison of gene expression profiles of the jejunum of broilers supplemented with a yeast cell wall-derived mannan oligosaccharide versus bacitracin methylene disalicylate. *Br. Poult. Sci.* 2013; 54(2): 238-46.
- 33- de los Santos FS, Donoghue AM, Farnell MB, Huff GR, Huff WE, Donoghue DJ. Gastrointestinal Maturation is Accelerated in Turkey Poult's Supplemented with a Mannan-Oligosaccharide Yeast Extract (Alphamune). *Poult. Sci.* 2007; 86(5): 921-30.
- 34- Altmeyer S, Kröger S, Vahjen W, Zentek J, Scharek-Tedin L. Impact of a probiotic Bacillus cereus strain on the jejunal epithelial barrier and on the NKG2D expressing immune cells during the weaning phase of piglets. *Vet. immunol. immunopathol.* 2014; 161(1): 57-65.
- 35- Shao Y, Wang Z, Tian X, Guo Y, Zhang H. Yeast β -d-glucans induced antimicrobial peptide expressions against Salmonella infection in broiler chickens. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016; 85: 573-84.
- 36- Ghosh T, Haldar S, Bedford M, Muthusami N, Samanta I. Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *J. anim. physiol. anim. nutr.* 2012; 96(2): 275-84.
- 37- Kogan G, Kocher A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest. Sci.* 2007; 109(1): 161-5.
- 38- Stanley V, Winsman M, Dunkley C, Ogunleye T, Daley M, Krueger W, *et al.* The impact of yeast culture residue on the suppression of dietary aflatoxin on the performance of broiler breeder hens. *Appl. Poult. Res.* 2004; 13(4): 533-9.
- 39- Zhang A, Lee B, Lee S, Lee K, An G, Song K, *et al.* Effects of yeast (Saccharomyces cerevisiae) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poult. Sci.* 2005; 84(7): 1015-21.
- 40- Gao J, Zhang H, Wu S, Yu S, Yoon I, Moore D, *et al.* Effect of Saccharomyces cerevisiae fermentation product on immune functions of broilers challenged with Eimeria tenella. *Poult. Sci.* 2009; 88(10): 2141-51.
- 41- Muthusamy N, Haldar S, Ghosh T, Bedford M. Effects of hydrolysed Saccharomyces cerevisiae yeast and yeast cell wall components on

live performance, intestinal histo-morphology and humoral immune response of broilers. *Br. Poult. Sci.* 2011; 52(6): 694-703.

42- **Hooge DM.** Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Int J. Poult. Sci.* 2004; 3(3): 163-74.

43- **Sánchez-Mendoza B, Montelongo-Terriquez A, Plascencia A, Torrentera N, Ware R, Zinn R.** Influence of feeding chromium-enriched enzymatically hydrolyzed yeast on growth performance, dietary energetics and carcass characteristics in feedlot cattle under conditions of high ambient temperature. *Appl. Anim. Res.* 2015; 43(4): 390-5.

44- **Fasina Y, Olowo Y.** Effect of a commercial yeast-based product (Maxigen®) on intestinal villi morphology and growth performance of broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 2013; 12(1); 9-14.

45- **Alizadeh M, Rodriguez-Lecompte J, Yitbarek A, Sharif S, Crow G, Slominski B.** Effect of yeast-derived products on systemic innate immune response of broiler chickens following a lipopolysaccharide challenge. *Poult. Sci.* 2016; pew154.

46- **Gómez S, Angeles ML, Mojica MC, Jalukar S.** Combination of an Enzymatically Hydrolyzed Yeast and Yeast Culture with a Direct-fed Microbial in the Feeds of Broiler Chickens. *Asian Australas J. Anim. Sci.* 2012; 25(5): 665-73.

47- **Lourenço M, Kuritza L, Hayashi R, Miglino L, Durau J, Pickler L, et al.** Effect of a mannanoligosaccharide-supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with Salmonella Enteritidis. *JAPRFS.* 2015; 24(1): 15-22.

48- **Benites V, Gilharry R, Gernat A, Murillo J.** Effect of dietary mannan oligosaccharide from Bio-Mos or SAF-Mannan on live performance of broiler chickens. *JAPRFS.* 2008; 17(4): 471-5.

49- **Shanmugasundaram R, Selvaraj R.** Effect of killed whole yeast cell prebiotic supplementation on broiler performance and intestinal immune cell parameters. *Poult. Sci.* 2012; 91(1): 107-11.

50- **Shanmugasundaram R, Sifri M, Selvaraj RK.** Effect of yeast cell product (CitriStim) supplementation on broiler performance and intestinal immune cell parameters during an experimental coccidial infection. *Poult. Sci.* 2013;

92(2): 358-63.

51- **Li X, Chen Y, Cheng Y, Yang W, Wen C, Zhou Y.** Effect of yeast cell wall powder with different particle sizes on the growth performance, serum metabolites, immunity and oxidative status of broilers. *AFSTDH.* 2016; 212: 81-9.

52- **Alizadeh M, Rogiewicz A, McMillan E, Rodriguez-Lecompte J, Patterson R, Slominski B.** Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance and local innate immune response of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Avian Pathology.* 2016(just-accepted): 1-38.

53- **Yalçın S, Eser H, Cengiz S, Eltan Ö.** Effects of dietary yeast autolysate (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance, carcass and gut characteristics, blood profile, and antibody production to sheep red blood cells in broilers. *JAPR.* 2013; 22(1): 55-61.

54- **Hofacre C, Mathis G, McIntyre D, Broomhead J.** Effects of Original XPC on Cecal Colonization by *Campylobacter coli* in Broiler Chickens: Preliminary Report.

55- **Gao J, Zhang H, Yu S, Wu S, Yoon I, Quigley J, et al.** Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poult. Sci.* 2008; 87(7): 1377-84.

56- **Reisinger N, Ganner A, Masching S, Schatzmayr G, Applegate TJ.** Efficacy of a yeast derivative on broiler performance, intestinal morphology and blood profile. *Livest. Sci.* 2012; 143(2-3): 195.

57- **Mountzouris K, Dalaka E, Palamidi I, Paraskeuas V, Demey V, Theodoropoulos G, et al.** Evaluation of yeast dietary supplementation in broilers challenged or not with Salmonella on growth performance, cecal microbiota composition and Salmonella in ceca, cloacae and carcass skin. *Poult. Sci.* 2015; 94(10): 2445-55.

58- **Xu R, Yiannikouris A, Shandilya UK, Karrow NA.** Comparative Assessment of Different Yeast Cell Wall-Based Mycotoxin Adsorbents Using a Model-and Bioassay-Based In Vitro Approach. *Toxins.* 2023; 15(2): 104.

59- **Morales-Lopez R, Brufau J.** Immune-modulatory effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* cell wall in broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Br. poult. Sci.* 2013; 54(2): 247-51.



A review on yeast-based prebiotics, characteristics, bioactive compounds, and their mechanism of action on growth and health parameters in poultry

Ehsan Oskoueian^{1*}, Reza Noura², Mehdi Salari pour¹, Ehsan Karimi³, Mohammad Faseleh Jahormi¹, Parisa Shokryazdan¹, Mojtaba Moin Jahormi¹, Maryam Noorollahi¹

1- Arka Industrial and Mineral Research Center, Mashhad, Iran.

2- Department of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, Iran.

3- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Receive: October 4, 2023; Revise: February 7, 2024; Accept: February 14, 2024

 10.22034/nfvm.2024. 416769. 1204

Summary

Nowadays, due to the high application of antibiotics, the emergence of pathogenic microorganisms resistant to antibiotics is considered a serious threat to poultry production industry. Therefore, reducing the use of antibiotics and using antibiotic alternatives is one of the main strategies to fight antibiotic resistance. Meanwhile, yeast-based prebiotics have been proposed as one of the best alternatives to antibiotics. The most important yeast-based prebiotics include hydrolyzed yeast, partially-hydrolyzed yeast, inactive yeast, yeast cell wall, yeast extract and autolyzed yeast. Yeast-based prebiotics contain functional compounds in various concentrations such as B vitamins, beta-carotene, ergosterol, ascorbic acid, polyamines, mycosins, enzymes, beta-glucans and mannan oligosaccharides, depending on the production and processing method. Yeast-based prebiotics are resistant to the acidic and alkaline conditions of the digestive system, and by inactivating pathogenic microorganisms, improving the immune system, stimulating the growth of probiotics, helping to establish beneficial microbial flora in the digestive system, and stimulating the production of volatile fatty acids, reducing intestinal acidity, improving the growth and differentiation of intestinal villi, stimulating the production of enzymes, increasing the production of antimicrobial peptides improve the production efficiency in poultry. Prebiotics also play a significant role in reducing the feed conversion ratio and mortality in poultry production industry.

Keywords: *autolyzed yeast, mannan oligosaccharide, beta-glucan, yeast extract, yeast wall*




پروفایل های مقاومت آنتی بیوتیکی و بیوتیپینگ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از لارو پشه: هشدار برای نظارت بر سلامت عمومی

پریسا حسنین^{۱*}، سیامک یاری^۲

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

دریافت مقاله: ۱۹ فروردین ۱۴۰۳، بازنگری: ۳۰ فروردین ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۰۱ اردیبهشت ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.451328.1235

چکیده

تهدید فزاینده سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک یک چالش جدی برای سلامت عمومی جهانی است. هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان مقاومت جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از لارو پشه کولکس در برکه های آب شهرستان زابل بود. تعداد ۱۵۰ نمونه که هر نمونه حاوی ۲۰ لارو پشه از ۱۰ برکه در فصول بهار و تابستان از مناطق شهرستان زابل جمع آوری شد. نمونه ها به آزمایشگاه منتقل و شستشو داده شد سپس ۵ سی سی PBS ۱ درصد به آنها اضافه شد و توسط همزن هموژنیزه گردید. سپس رقت سازی سریالی انجام و در محیط های کشت بردپارکر و مانیتول سالت آگار کشت داده شد. کلنی های رشد کرده با استفاده از روش های بیوشیمیایی رایج میکروبیولوژی تأیید هویت شد. بیوتیپینگ جدایه ها با استفاده از روش پیشنهادی Devriese انجام شد. مقاومت های آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار در دیسک انجام شد. بیشترین میزان مقاومت جدایه ها به آمیکاسین اگراسیلین و آمپی سیلین و بیشترین میزان حساسیت مربوط به سیپروفلوکساسین فورازولیدون و اریترومایسین بود. تجزیه و تحلیل بیوتیپینگ نشان داد که ۴۰ درصد متعلق به اکوار انسانی، ۲۰ درصد به اکوار مرغ و ۵ درصد به اکوار گاوی بود. علاوه بر این، ۱۰ ایزوله بیوتایپ های غیر اختصاصی (NHS) را نشان دادند، در حالی که ۲۵ ایزوله با استفاده از روش مورد مطالعه قابل تایپینگ نبودند. این مطالعه بر نقش بالقوه این ناقلین در انتشار پاتوژن های مقاوم به آنتی بیوتیک در جوامع تأکید و اهمیت این بیماری را برجسته می کند.

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، استافیلوکوکوس اورئوس، لارو پشه، نظارت بر بهداشت عمومی

در سال‌های اخیر، چشم‌انداز بهداشت عمومی جهانی به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر تهدید فزاینده مقاومت آنتی‌بیوتیکی قرار گرفته است، بحرانی که تهدید به تضعیف اثربخشی روش‌های درمانی در پزشکی مدرن شده است (۱). در میان هزاران باکتری بیماری‌زا که به این چالش کمک می‌کنند، *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یک دشمن به‌خصوص قدرتمند است. *استافیلوکوکوس اورئوس* که به خاطر توانایی آن در تکامل سریع و سازگاری با محیط‌های مختلف شناخته شده است، تهدید قابل توجهی برای بیماری‌های عفونی منتشره در جامعه و محیط‌های بیمارستانی است و باعث طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها از آبسه‌های پوستی جزئی تا بیماری‌های سیستمیک تهدیدکننده زندگی می‌شود (۲).

ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در *استافیلوکوکوس اورئوس* این تهدید را بیشتر کرده است، درمان‌های قابل اعتماد را بی‌اثر می‌کند و نیاز به جستجوی استراتژی‌های جایگزین برای مبارزه با این پاتوژن انعطاف‌پذیر دارد (۳). در حالی که توجه و تلاش‌های زیادی برای درک و کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام شده است، مطالعات اخیر شروع به درک و نقش مخازن زیست محیطی در انتشار سویه‌های مقاوم کرده است (۴). یکی از این مخازن برکه‌های حاوی لارو پشه کولکس است که معمولاً در مخازن آب‌های ساکن در مناطق مختلف جغرافیایی یافت می‌شود. در حالی که به‌طور سنتی به‌عنوان ناقلین برای انتقال عوامل عفونی به انسان شناخته می‌شود، این لارو ممکن است مجموعه‌ای متنوع از میکروارگانیسم‌ها، از جمله باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* را در خود جای دهد (۵، ۶). درک پویایی جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در لارو پشه و پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها برای روشن شدن مسیرهای بالقوه انتقال و طراحی مداخلات هدفمند بهداشت عمومی بسیار مهم است (۷، ۸). وقوع گسترده *استافیلوکوکوس اورئوس* در هر

دو محیط بالینی و جامعه بر اهمیت درک محیط زیست و اپیدمیولوژی آن برای توسعه استراتژی‌های مؤثر برای پیشگیری و کنترل تأکید می‌کند (۹). مخازن زیست محیطی، مانند آب‌های ساکن لارو پشه، نشان‌دهنده نقاط بالقوه برای کسب و انتشار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۱۰). لارو پشه به‌عنوان یک ارتباط بین اکوسیستم‌های آبی و زمینی، تعامل با جوامع میکروبی متنوع و تسهیل تبادل مواد ژنتیکی، از جمله ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی عمل می‌کند (۱۱). در مقابل این زمینه، مطالعه حاضر با هدف بررسی پروفایل‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویژگی‌های بیوتیپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از لارو پشه *Culex* ساکن در برکه‌های آبی زابل انجام شد.

از طریق تجزیه و تحلیل جامع پروفایل‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویژگی‌های نمونه‌سازی زیستی، این مطالعه با هدف کمک به درک ما از تعامل پیچیده بین مخازن زیست محیطی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بهداشت عمومی است. با روشن شدن نقش لارو پشه در انتشار سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به دنبال اطلاع رسانی مداخلات هدفمند با هدف کاهش این تهدید در حال ظهور و حفاظت از سلامت عمومی جهانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی *استافیلوکوکوس*

اورئوس: تعداد ۱۵۰ نمونه حاوی ۲۰ لارو پشه *Culex* از ۲۰ آبگیر آب ساکن واقع در شهرستان زابل در فصول بهار و تابستان جمع‌آوری شد. لاروها با استفاده از تله‌های مخصوص استاندارد قرار داده شده در مکان‌های استراتژیک در آب‌ها جمع‌آوری و به ظروف استریل منتقل و برای تجزیه و تحلیل بیشتر به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس در آزمایشگاه لاروها به‌طور کامل با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا هر گونه آلاینده سطحی را از بین ببرند (۱۲، ۱۳). برای جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد ۲۰ لارو پشه به لوله‌های استریل حاوی ۵

پروفایل‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیوتیپینگ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از لارو پشه

(ERY)، امیکاسین (AK)، آمپی‌سیلین (AM)، ریفامپیسین (RIF)، اگزاسیلین (OX) و سفوکسیتین (CFX) و سیپروفلوکساسین (CIP) انجام شد (۱۶، ۱۷). برای انجام تست حساسیت ابتدا یک کلنی از یک کشت خالص شبانه از هر جدایه در نرمال سالین استریل (۰/۸۵ درصد) در لوله‌های آزمایش با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند معادل 1×10^8 سلول تهیه شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی به‌طور یکنواخت در پلیت مولر هینتون آگار با استفاده از سواب استریل کشت داده شد و دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و قطر منطقه مهار اندازه‌گیری شد و نتایج بر اساس مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی تفسیر شد (۱۶، ۱۷).

بیوتیپینگ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس:

بیوتیپینگ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به روش پیشنهادی (۱۹۸۴) Devriese انجام شد (۱۸). این روش متکی به چهار تکنیک بیوشیمیایی متمایز است: تشخیص فعالیت استافیلوکیناز، فعالیت β همولیزین، ویژگی‌های رشد در آگار کریستال ویوله و فعالیت کواگولاز در پلاسمای گاوی. با استفاده از این چارچوب، سویه‌های تحت بررسی به پنج اکووار مخصوص میزبان (HS) شامل انواع $\beta+$ و β انسان، مرغ، گوسفند و گاو، همراه با پنج اکووار غیر اختصاصی (NHS) تقسیم شد (جدول ۱).

میلی‌لیتر محلول سالین استریل (۱٪ PBS) منتقل شد و در زیر هود با استفاده از یک همزن استریل هموژنیزه شد. سپس مخلوط یک‌دست‌شده حاصل به‌طور سریالی رقت‌سازی شد و از رقت مناسب بر روی محیط انتخابی برد پارکر و مانیتول سالت آگار برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس منتقل شد (۱۳). از محیط کشت مانیتول آگار (MSA) و محیط کشت برد پارکر آگار به‌دلیل خواص انتخابی آنها به‌عنوان محیط‌های جداسازی اولیه مورد استفاده قرار گرفت که امکان رشد استافیلوکوکوس اورئوس را در حالی که مانع رشد باکتری‌های دیگر می‌شود، امکان‌پذیر می‌سازد. گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت و دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۴).

سپس پرگنه‌هایی زردرنگ و تخمیر مانیتول و سیاه‌رنگ بر روی محیط بردپارکر، برای تأیید نهایی مورد آزمایشات جون رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های کاتالاز و کواگولاز و دی‌ان‌آز قرار گرفتند. کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت، کوکسی گرم مثبت نشان دهنده استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شد (۱۵).

تست حساسیت آنتی‌بیوتیک: ارزیابی مقاومت

آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس طبق دستورالعمل CLSI و روش دیسک انتشاری بر روی محیط مولر هینتون آگار شرکت ایبرسکو با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شرکت پادتن طب، ایران تتراسایکلین (TET)، جنتامایسین (GEN)، اریترومایسین

جدول ۱- طرح بیوتایپ Devriese توسط Isigidi و همکاران اصلاح شد (۱۹).

پروتئین A	نوع رشد در محیط کریستال ویوله	انعقاد پلاسمای گاوی بین ۲ تا ۶ ساعت	بتا همولیزین	استافیلوکیناز	بیوتیپ یا اکووار
	A/C	-	±	+	انسانی
	A	+	+	-	گاوی
	C	+	+	-	گوسفندی
-	A	-	-	-	مرغی
+	A	-	-	-	شبه مرغی
	A	+	-	+	NHS 1
	A	+	+	+	NHS 2
	A	-	+	-	NHS 3
	C	-	+	-	NHS 4
	C	-	-	-	NHS 5

^aType of growth on crystal violet agar: A—yellow, C—purple; NHS—non-host-specific

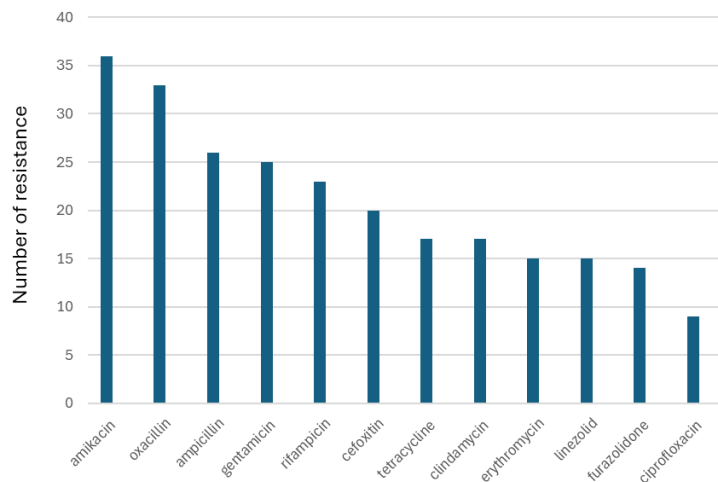
Culex جمع‌آوری شده از استخرهای آبی زابل ایران توسط تست هاس رایج بیوشیمیایی تأیید هویت شد. بر اساس نتایج جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین مقاومت را به نسبت به آمیکاسین (۶۵/۱۵ درصد)، اگزاسیلین (۵۷/۸۹ درصد)، آمپی‌سیلین (۴۵/۶۱ درصد)، ریفامپین (۴۰/۳۵ درصد)، سفاکسیتین (۳۵/۰۸ درصد) نشان دادند. بیشترین حساسیت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۸۴/۲۲ درصد)، فورازولیدون (۷۵/۴۳ درصد)، لینه زولید (۷۳/۶۹ درصد)، اریترومايسين (۷۳/۶۹ درصد)، کلیندامایسین (۷۰/۱۸ درصد) تتراسیکلین (۷۰/۱۸ درصد) بود. نمودار ۱ میزان هشدار دهنده مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های رایج نشان می‌دهد. نمودار ۲ ارزیابی پروفایل‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج نشان می‌دهد.

سنجش تولید فیبرینولیزین توسط باکتری‌ها با استفاده از محیط کشت نوترینت براث با ۳ درصد آگار مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸). سویه *S. aureus* ATCC ۲۵۹۲۳ به‌عنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت. برای تولید کواگولاز، روش زیر دنبال شد: ابتدا پنج قطره از کشت آبگوشت شبانه *S. aureus* به لوله‌های حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر پلاسما ی گاو ۱ به ۵ رقیق شده اضافه شد. سپس از لوله‌ها در یک انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۶ ساعت گرم‌گذاری شد و در هر یک ساعت تشکیل لخته قابل مشاهده شدند (۱۹). برآورد پروتئین A بر اساس پروتکل مشخص شده توسط Keir و همکاران انجام شد (۲۰). ارزیابی واکنش بنفش بلوری با استفاده از روش مایر انجام شد (۲۱).

نتایج

جداسازی و شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس:

در مجموع ۵۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از لارو پشه

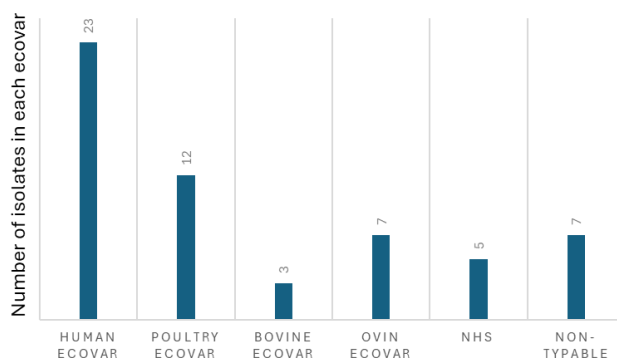


نمودار ۱- پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

می‌کند. علاوه بر این، ۱۰ سویه بیوتیپ‌های غیر اختصاصی (NHS) را نشان می‌دهند، در حالی که ۲۵ سویه از طریق این روش در برابر تایپ مقاومت می‌کنند.

تجزیه و تحلیل نمونه شماره ۲ نشان داد که بیشتر جدایه‌ها ۴۰ درصد را به‌عنوان متعلق به اکوار انسانی، ۲۰ درصد به اکوار مرغ و ۵ درصد به اکوار گاو شناسایی

پروفایل‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیوتیپینگ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از لارو پشه



نمودار ۲- پروفایل بیوتیپینگ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه بینش ارزشمندی در مورد شیوع، حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بیوتیپ‌های جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بازیابی شده از لارو پشه کولکس در زابل ارائه می‌دهد. جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از لارو پشه، نقش بالقوه این ناقلین را در پناه دادن و انتشار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط‌های آبی برجسته می‌کند (۲۲). علاوه بر این، شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جدایه‌ها بر نیاز فوری به اقدامات نظارتی و کنترلی برای جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم در محیط بالینی و محیطی تاکید دارد (۲۳). الگوهای مقاومت مشاهده شده در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با روند جهانی که نشان‌دهنده انتشار گسترده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت‌های باکتریایی است، سازگار است (۲۴، ۲۵). گزارش شده است که سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به تتراسایکلین و جنتامایسین، یکی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در درمان‌های بالینی، مقاومت نشان می‌دهند (۲۶). ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو گزینه‌های درمان را برای کادر بهداشت و سلامت پیچیده‌تر کرده و بر اهمیت استفاده عاقلانه از آنتی‌بیوتیک‌ها و پرهیز از استفاده بی‌رویه و خود درمانی تاکید می‌کند (۲۳). تجزیه و تحلیل بیوتیپینگ، پروفایل‌های فنوتیپی متمایزی را در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که خود نشان‌دهنده تفاوت‌های بالقوه در منشاء زیست محیطی یا

اکولوژیکی و ارتباطات بین میزبان آنها است. غالب بودن جدایه‌های سرووار انسانی نشان‌دهنده ارتباط احتمالی با فعالیت‌های انسانی و آلودگی منابع با منشأ انسانی دارد. با این حال، حضور جدایه‌های سرووار مرغی و گوسفندی، تنوع مخازن بالقوه برای استافیلوکوکوس اورئوس در محیط زیست، از جمله پرندگان و دام‌ها را برجسته می‌کند (۲۷). پویایی زیست محیطی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در زیستگاه‌های آبی ساکن لارو پشه تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله شرایط محیطی، تعاملات میکروبی و فعالیت‌های انسانی است (۲۸). لارو پشه به‌عنوان یک ارتباط بین اکوسیستم‌های آبی و زمینی، تسهیل تبادل جوامع میکروبی و مواد ژنتیکی می‌باشد (۲۹). علاوه بر این، وجود باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیک در آب‌های ناشی از زه‌آب کشاورزی یا تخلیه فاضلاب ممکن است به انتخاب و نگهداری ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت‌های باکتریایی کمک کند (۳۰، ۳۱). یافته‌های این مطالعه پیامدهای مهمی برای بهداشت عمومی و مدیریت محیط زیست در زابل و مناطق مشابه با چالش‌های زیست محیطی مشابه دارد. استراتژی‌های کنترل گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باید شامل نظارت بیشتر بر مخازن زیست محیطی، اجرای برنامه‌های نظارت ضد میکروبی و بهبود شیوه‌های تصفیه فاضلاب برای به حداقل رساندن انتشار باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیک به محیط زیست باشد. علاوه بر این، تلاش‌های تحقیقاتی بین رشته‌ای یکپارچه‌سازی

را در مورد پروفایل‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بیوتیپ‌های آنها ارائه می‌دهد. این یافته‌ها بر اهمیت تلاش‌های مداوم نظارت و کاهش برای مقابله با تهدید بهداشت عمومی ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مخازن زیست محیطی تاکید می‌کند و بر نیاز به رویکردهای مشترک برای مبارزه با این چالش جهانی تاکید می‌کند.

میکروبی‌شناسی، محیط زیست و اپیدمیولوژی برای درک تعاملات پیچیده‌ای که باعث ظهور و انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اکوسیستم‌های متنوع می‌شود، ضروری است.

در نتیجه، این مطالعه شیوع سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک مرتبط با لارو پشه کولکس در زابل را برجسته می‌کند و بینش‌هایی

References

- 1- Akram F, Imtiaz M, Ikram ul Haq I. Emergent crisis of antibiotic resistance: A silent pandemic threat to 21st century. *Microbial Pathogenesis*. 2023; 174.
- 2- Liu GY. Molecular pathogenesis of Staphylococcus aureus infection. *Pediatr Res*. 2009; 65(5): 71-77.
- 3- Abebe AA, Birhanu AG. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Mechanisms Underlying Drug Resistance Development and Novel Strategies to Combat. *Infect Drug Resist*. 2023; 16: 7641-7662.
- 4- Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, et al. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*. 2023; 11(13): 1946.
- 5- Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015; 5: 28564.
- 6- Nicoletti M. Three scenarios in insect-borne diseases. *Insect-Borne Diseases in the 21st Century*. 2020: 99-251.
- 7- Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*. 2021;10(10): 1310.
- 8- Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, et al. Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol*. 2023; 21(6): 380-395.
- 9- Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 107.
- 10- Abia Akebe LK, Sibanda T, Selvarajan R, El-Liethy MA and Kamika I. Editorial: Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance Determinants: A Ticking Time Bomb for the Future Emergence of Super-Bugs of Environmental and Public Health Importance. *Front Environ Sci*. 2022; 10: 941847.
- 11- Duguma D, Rugman-Jones P, Kaufman MG, Hall MW, Neufeld JD, Stouthamer R, et al. (2013) Bacterial Communities Associated with Culex Mosquito Larvae and Two Emergent Aquatic Plants of Bioremediation Importance. *PLoS ONE* 8(8): e72522.
- 12- Demaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC. The midgut bacterial flora of wild Aedes triseriatus, Culex pipiens, and Psorophora columbiae mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54: 219-223.
- 13- Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. Serratia odorifera a midgut inhabitant of Aedes aegypti mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. *PLoS One*. 2012; 7: e40401.
- 14- Petersen J, McLaughlin S. Laboratory Exercises in Microbiology: Discovering the Unseen World Through Hands-On Investigation. CUNY: City University of New York; 2016.
- 15- Thakur P, Nayyar C, Tak V, Saigal K. Mannitol-fermenting and Tube Coagulase-negative Staphylococcal Isolates: Unraveling the Diagnostic Dilemma. *J. Lab Physicians*. 2017; 9(1): 65-66.
- 16- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 25th edn; 2015. <http://em100.edaptivedocs.net/login>.
- 17- CLSI. M100 Performance Standards for Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne (PA); 2018.

- 18- Devriese LA. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl Bacteriol.* 1984; 56(2): 215-20.
- 19- Hennekinne JA, Kerouanton A, Brisabois A, De Buyser ML. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl Microbiol.* 2003; 94:321–329.
- 20- Kerr S, Kerr GE, Mackintosh CA, Marples RR. A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. *J. Hosp Infect.* 1990; 16: 35–48.
- 21- Meyer W. Schema for the differentiation of habitat variants of *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl Bakteriol Orig.* 1966; 201: 465–481. [PubMed] [Google Scholar]
- 22- Gwenzi W, Chaukura N, Muisa-Zikali N, Teta C, Musvuugwa T, Rzymiski P, et al. Insects, Rodents, and Pets as Reservoirs, Vectors, and Sentinels of Antimicrobial Resistance. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10(1): 68.
- 23- Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, et al. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel).* 2023; 11(13): 1946.
- 24- An NV, Hai LHL, Luong VH, Vinh NTH, Hoa PQ, Hung LV, et al. Antimicrobial Resistance Patterns of *Staphylococcus Aureus* Isolated at a General Hospital in Vietnam Between 2014 and 2021. *Infect Drug Resist.* 2024; 17: 259-273.
- 25- Mourabit N, Arakrak A, Bakkali M, Zian Z, Bakkach J, Laglaoui A. Antimicrobial resistance trends in *Staphylococcus aureus* strains carried by poultry in north of Morocco: a preliminary analysis. *J. Food Qual.* 2021; 5: 8856004.
- 26- Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Can Vet J.* 2011; 52(2): 153-7.
- 27- Thapaliya D, Hellwig EJ, Kadariya J, Grenier D, Jefferson AJ, Dalman M, et al. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on Public Recreational Beaches in Northeast Ohio. *Geohealth.* 2017 14; 1(10): 320-332.
- 28- Lepper HC, Woolhouse MEJ, van Bunnik BAD. The Role of the Environment in Dynamics of Antibiotic Resistance in Humans and Animals: A Modelling Study. *Antibiotics (Basel).* 2022; 11(10): 1361.
- 29- Zouache K, Martin E, Rahola N, Gangue MF, Minard G, Dubost A, et al. Larval habitat determines the bacterial and fungal microbiota of the mosquito vector *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2022; 98(1): fi-ac016.
- 30- Nappier SP, Liguori K, Ichida AM, Stewart JR, Jones KR. Antibiotic Resistance in Recreational Waters: State of the Science. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17(21): 8034.
- 31- Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: *Potential Public Health Implications. Molecules.* 2018; 23(4): 795.




Antibiotic resistance profiles and biotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from mosquito larvae: A warning for public health surveillance

Parisa Hasanein^{1*}, Siamak Yari²

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

2- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Receive: April 7, 2024; Revise: April 18, 2024; Accept: April 20, 2024

 10.22034/nfvm.2024.451328.1235

Summary

The increasing threat of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus* poses a serious challenge to global public health. The aim of this study was to assess the resistance levels of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from mosquito larvae in the water pools of Zabol County. A total of 150 samples, each containing 20 mosquito larvae collected from 10 pools during spring and summer seasons in the Zabol County area, were gathered. The samples were transferred to the laboratory, washed, and then 5 ml of 1% PBS was added to them and homogenized using a homogenizer. Serial dilutions were made and cultured on Baird-Parker and Mannitol Salt Agar media. The grown colonies were identified using standard microbiological biochemical methods. The biotyping of isolates was performed using the Devriese proposed method. Antibiotic resistances were determined using the disk diffusion method. The results showed that 57 isolates of *Staphylococcus aureus* were identified. The highest resistance rates of isolates were to amikacin, oxacillin, and ampicillin, while the highest sensitivity rates were related to ciprofloxacin, fosfomycin, and erythromycin. Biotyping analysis indicated that 40% belonged to human strains, 20% to avian strains, and 5% to bovine strains. Additionally, 10 isolates showed non-specific biotypes (NHS), while 25 isolates were untypeable using the studied probe. These findings emphasize the critical need for continuous surveillance and management strategies to prevent the spread of antibiotic resistance in environmental reservoirs such as mosquito larvae. This study underscores the potential role of these vectors in the dissemination of antibiotic-resistant pathogens in communities and highlights the importance of this disease.

Keywords: antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*, mosquito larvae, public health surveillance



بررسی سرو اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت در گاوها و گوسفندان شهرستان شیراز

داوود هوشیار^۱، سیده ام البنین قاسمیان^{۲*}

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

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

دریافت مقاله: ۲۲ مهر ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۷ اسفند ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۹ فروردین ۱۴۰۳



10.22034/nfvm.2024.420747.1208

چکیده

بروسلوز یکی از شایع ترین بیماری های عفونی در ایران بوده که مشترک بین انسان و دام می باشد و توسط گونه های جنس *بروسلا* ایجاد می گردد. یکی از راه های انتقال بروسلوز به انسان مصرف شیر و فرآورده های سنتی آلوده به باکتری *بروسلا* می باشد. تحقیق حاضر به منظور بررسی سرو اپیدمیولوژیک تب مالت در گاوها و گوسفندان شهرستان شیراز صورت گرفت. از این رو ۱۲۰ نمونه سرمی از گاوها و ۸۰ نمونه سرمی از گوسفندان گرفته شد. ابتدا آزمایش رزینگال به عنوان آزمون سریع اولیه تشخیصی، بر روی تمام نمونه های سرمی انجام شد و مشاهده گردید که از ۲۰۰ نمونه آزمایش رزینگال، ۵ درصد مثبت بودند. سپس نمونه های مثبت در آزمایش رزینگال تحت آزمایش رایت لوله ای قرار گرفتند و مشاهده شد که ۴ درصد نمونه ها مثبت هستند. سپس جهت تشخیص نوع پادتن و تعیین حالت فعال و یا غیر فعال بیماری بر روی سرم های مذکور آزمایش دو مرکاپتواتانول انجام شد که ۳/۵ درصد مثبت بود. با توجه به نتایج مذکور، میزان شیوع بیماری بروسلوز در گاوها و گوسفندان ۳/۵ درصد گزارش شد، که ماده بودن ($OR=7/4$)، مسن بودن ($OR=7/87$) و نگهداری سنتی ($OR=7/27$) خطر ابتلا به بروسلوز را در گاوها و گوسفندان افزایش می دهد. در تحقیق حاضر، آلودگی در دام های مسن بیشتر از دام های جوان مشاهده شد. در نهایت مشاهده شد که آلودگی در دام هایی که به روش سنتی نگهداری می شوند بیشتر از دام هایی است که در واحدهای صنعتی و تولیدی هستند.

واژگان کلیدی: بروسلوز، گاو، گوسفند، شیراز

مقدمه

بروسلوز یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک میان انسان و دام است که انتشار جهانی دارد (۱). مصرف شیر و فرآورده‌های آلوده دامی یکی از راه‌های اصلی انتقال بیماری به انسان است. در ایران گوسفند در مقایسه با گاو درصد آلودگی بالاتری نسبت به بروسلوز دارد. بروسلوز در انسان توسط گونه‌های مختلف باکتری بروسلا که بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس مهم‌ترین آنها هستند، ایجاد می‌شود (۲). بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های دارای اهمیت اقتصادی است که در بیشتر مناطق دنیا در انسان و حیوانات اتفاق می‌افتد (۳). این بیماری در آسیا، خاورمیانه و کشورهای گرمسیر مجاور آنها میزان بروز بالایی در جمعیت انسانی و دامی دارد (۴). بروسلوز تقریباً همواره از طریق تماس مستقیم یا غیر مستقیم افراد با دام‌های آلوده یا فرآورده‌های آنها به انسان منتقل می‌شود (۵). هر چند پیشرفت‌های زیادی در بسیاری از کشورها در کنترل بیماری انجام گرفته است، اما در مناطقی که بیماری در دام‌های اهلی کشورها به‌صورت بومی وجود دارد، منجر به انتقال بیماری و رخداد موارد انسانی به‌صورت متناوب می‌شود (۶، ۷).

عواملی از جمله توسعه صنعت دامپروری و شهرنشینی و کمبود شاخص‌های بهداشتی در دامپروری و تماس مستقیم دست با مواد غذایی با منشأ دامی موجب شده است که بروسلوز هنوز به‌عنوان یک خطر بالقوه برای سلامت انسان‌ها مطرح باشد. به علاوه مصرف لبنیات خام مانند پنیر نیز خطر ابتلا به این بیماری را افزایش می‌دهد (۸، ۹). بر طبق بررسی‌های ما از سال ۱۳۹۳ به بعد میزان بروز بروسلوز در جمعیت انسانی دارای نوسانات زیادی بوده و در سال ۱۳۹۳ با تعداد حدود ۲۱۰۰۰ مبتلا به بالاترین فراوانی رسیده است، اما مجدداً در سال‌های بعد تعداد مبتلایان کاهش یافته است. در سال ۱۳۹۳ استان‌های کردستان، همدان، آذربایجان‌های غربی و شرقی، لرستان و خراسان رضوی بیشترین و استان‌های گیلان، بوشهر و هرمزگان کمترین تعداد مبتلایان انسانی

را داشته‌اند (آمار منتشر شده وزارت بهداشت). رخداد بیماری در انسان به‌طور گسترده‌ای وابسته به مخزن‌های دامی و شیوع بالای عفونت در گوسفند و بز دارد، که معمولاً موجب رخداد بالای عفونت در انسان می‌شود (۱۰). نوع برنامه کنترل بیماری در مناطق بومی وابسته به شیوع سرمی آن در جمعیت دامی است. بیماری در ایران بومی بوده و جزء بیماری‌های استراتژیک است که در برنامه‌های کنترلی سازمان دامپزشکی کشور قرار دارد (۱۱، ۱۲).

برنامه کنترلی بیماری در جمعیت گوسفند و بز فقط شامل واکسیناسیون دام‌ها است. از سال ۱۳۴۲ که واکسن Rev-۱ در مؤسسه رازی تولید شد تا سال ۱۳۵۲ در بره‌ها و بزغاله‌ها و گوسفندان و بزهای بالغ غیر آبستن، مایه‌کوبی با دز کامل این واکسن انجام می‌گرفت، اما در سال‌های بعد از آن به دلیل تداخل در شناسایی دام‌های آلوده با دام‌های واکسینه به روش سرمی واکسیناسیون دام‌های بالغ قطع شد. از سال ۱۳۸۲ با حذف برنامه تست و کشتار، واکسیناسیون دام‌های بالغ با دز کاهنده واکسن ۱- Rev آغاز شد (۱۳، ۱۴) و از ابتدای سال ۱۳۹۵ با هدف تعیین شیوع بروسلوز واکسیناسیون با دز کاهنده Rev-۱ در دام‌های بالغ قطع شد و فقط واکسیناسیون با دز کامل این واکسن در بره‌ها و بزغاله‌ها انجام می‌شود (انتخاب راهبرد مناسب برای کنترل بیماری در هر کشور به چند عامل از جمله سامانه پرورش دام، فرهنگ عمومی دامدار، الگوی گسترش بیماری در منطقه و کشور، ساختار و اعتبارهای دامپزشکی، اهمیت اقتصادی دام‌های کشور و الزامات سیاسی در سطح ملی وابسته است)، بر این اساس راهبرد حذف دام‌های آلوده یا واکسیناسیون جمعیت حساس یا ترکیب هر دو قابل اجرا خواهد بود (۱۵). در مواردی که میزان شیوع بیماری بالاست، اجرای برنامه واکسیناسیون برتری دارد، اما در مواردی که شیوع پایین است برنامه تست و کشتار برای کنترل بیماری مناسب‌تر است و تعیین شیوع بیماری از موارد ضروری برای انتخاب نوع برنامه کنترلی است (۱۶، ۱۷). برنامه کنترل بروسلوز

بررسی سرو اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت در گاوها و گوسفندان شهرستان شیراز

در جمعیت دامی در کشور دارای چالش و مشکلات متعددی است که روند کنترل آن تأثیرگذار است. استان فارس یکی از قطب‌های دامپروری کشور می‌باشد و با توجه به وجود عشایر و تولیدات دامی گسترده به صورت سنتی در این استان، خطر انتقال بیماری تب مالت به مصرف‌کنندگان وجود دارد. از این رو هدف از انجام این تحقیق، بررسی سرو اپیدمیولوژیک و روند بروز بیماری تب مالت در گاوها و گوسفندان شیراز بود.

مواد و روش‌ها

در این بررسی جهت ردیابی و پایش دقیق بیماری بروسلوز، جمعیت دامی شهرستان شیراز به‌عنوان جامعه مورد مطالعه در نظر گرفته شد. از اول فروردین ۱۴۰۱ تا آخر خرداد ۱۴۰۱ اطلاعات همه روستائیان، کشاورزان و دامدارانی که به دلیل بروز علائمی همچون کاهش تولید شیر یا گوشت، نازایی، تولد نوزاد مرده، سقط جنین، جفت ماندگی و همچنین تورم بیضه و اپیدیدیم در حیوان نر به بخش خصوصی و یا شبکه‌های دامپزشکی شهرستان شیراز مراجعه می‌کردند، جمع‌آوری گردید. با توجه به اینکه انجام آزمایشات تکمیلی و تشخیص قطعی این بیماری در دام بر اساس آیین‌نامه اجرایی وزارت جهاد کشاورزی فقط به عهده ادارات کل دامپزشکی استان‌ها می‌باشد، لذا بلافاصله بعد از گزارش مورد آلودگی، اکیپی متشکل از یک دامپزشک، کمک کارشناس و نمونه‌بردار به محل اعزام و از سیاهرگ و داج* دام بیمار و دیگر دام‌های در تماس با این حیوان در محل دامداری و همچنین به‌صورت تصادفی از بقیه حیواناتی که پیرامون کانون احتمالی بیماری قرار داشتند، با استفاده از لوله‌های ونوجکت خلادار، نمونه خون تهیه و به آزمایشگاه مرکزی منتقل شد.

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری به‌صورت خوشه‌ای و تصادفی از گوسفندان و گاوهای مناطق مختلف انجام گردید. از اول فروردین ۱۴۰۱ تا آخر خرداد ۱۴۰۱

اطلاعات همه روستائیان، کشاورزان و دامدارانی که به دلیل بروز علائمی همچون کاهش تولید شیر یا گوشت، نازایی، تولد نوزاد مرده، سقط جنین، جفت ماندگی و همچنین تورم بیضه و اپیدیدیم در حیوان نر به بخش خصوصی و یا شبکه‌های دامپزشکی شهرستان شیراز مراجعه می‌کردند، جمع‌آوری گردید، و بر همین اساس نمونه‌ها خوشه‌بندی شدند. با توجه به تعداد واحدهای صنفی سطح شهر در کل تعداد دام به ۱۳۹۹ رسید، برای سهولت انتخاب به ۱۵۰۰ گرد شد، با توجه به هدف ۱۵ خوشه در نظر گرفته شد، و به‌صورت تصادفی از هر خوشه ۱۵ نمونه انتخاب گردید تا زمانی که تعداد نمونه‌ها به ۲۰۰ نمونه رسید.

پس از لخته شدن خون، طبق روش پاکزاد (نیلسن، ۲۰۰۰) لوله‌ها در سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۵۰۰ rpm قرار داده شد تا سرم آن با رنگ زرد شفاف جدا گردد. آزمایش رزبنگال به‌عنوان آزمون سریع اولیه تشخیصی، بر روی تمام نمونه‌های سرمی انجام گردید. آنتی‌ژن رزبنگال مورد استفاده در همه نمونه‌ها محصول مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با شماره بچ ۱۰۴۹۱۰۰۲ حاوی ۸ درصد جرم میکروبی بروسلا بود که به مقدار هم حجم سرم در یک میکروپلیت به مدت ۲ دقیقه شیک شد و مواردی که دانه‌های آگلوتینه به‌طور مشخص در آنها دیده شد، بر روی آنها آزمایشات تکمیلی رایت و دو مرکاپتوانانول (2ME) انجام شد. آنتی‌ژن سروآگلوتیناسیون رایت مورد استفاده نیز محصول Institut pourquier- Montpellier با شماره بچ ۲۰۰۱۱۰ بود.

جهت انجام آزمایش رایت لوله‌ای، به تفکیک از هر نمونه سرم رزبنگال مثبت، رقت ۱/۱۰ تا ۱/۸۰ تهیه، به هر کدام ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌ژن ده درصد اضافه شد و به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. متناسب با میزان آگلوتیناسیون و شفافیت مایع رویی در آخرین رقت دارای آگلوتینه، جواب از منفی تا ۴ + قرائت گردید. سپس جهت تشخیص نوع پادتن و تعیین

* Jugular Vein

بر اساس شفافیت مایع رویی در آخرین رقت دارای آگلوتیناسیون، قرائت گردید. اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS با استفاده از روش رگرسیون چند متغیره خطی مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه به‌طور کلی ۲۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که فراوانی نمونه‌ها بر اساس گونه، جنس، سن و نوع نگهداری دام‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

حالت فعال و یا غیر فعال بیماری بر روی سرم‌های مذکور آزمایش دو مرکاپتواتانول انجام شد. در این آزمایش قبل از تهیه رقت، پس از ریختن سرم فیزیولوژی و سرم مشکوک و ۰/۲ ملکول گرم در لیتر مرکاپتواتانول به لوله اول، لوله‌ها به مدت یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار گرفتند. پس از زمان مذکور همانند قبل، رقت‌های ۱/۱۰ تا ۱/۸۰ از سرم‌ها تهیه و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت مجدداً در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شدند. نتیجه آزمایش نیز

جدول ۱- طبقه‌بندی نمونه‌های جمع‌آوری شده

متغیر	تعداد (درصد)
گونه	گوسفند (۴۰) ۸۰
	گاو (۶۰) ۱۲۰
جنس	ماده (۶۷/۵) ۵۴
	نر (۳۲/۵) ۲۶
سن	ماده (۸۰/۸۳) ۹۷
	نر (۱۹/۱۷) ۲۳
نوع نگهداری	گوسفند
	گاو
	گوسفند
	گاو
نوع نگهداری	یک سال به پایین (۲۵) ۲۰
	یک سال به بالا (۷۵) ۶۰
	یک سال به پایین (۳۵) ۴۲
	یک سال به بالا (۶۵) ۷۸
نوع نگهداری	گوسفند
	گاو
	گوسفند
	گاو
نوع نگهداری	دامداری سنتی (۱۰۰) ۸۰
	دامداری صنعتی (۰) ۰
	دامداری سنتی (۳۰) ۳۶
	دامداری صنعتی (۷۰) ۸۴

موارد IgM مثبت می‌باشند که میزان آن ۰/۵ درصد می‌باشد. مطابق دستورالعمل سازمان دامپزشکی مواردی آلوده به بروسلاز به حساب می‌آیند که در هر سه تست رزبنگال، رایت و 2ME مثبت باشند، بر همین اساس به موجب نتایج فوق میزان شیوع بیماری بروسلاز ۳/۵ درصد می‌باشد (جدول ۲). بین نمونه‌های گاو و گوسفند از نظر آلودگی به بروسلا بر اساس آزمون آماری T test تفاوت معنی‌داری در موارد مثبت مشاهده نشد ($P > 0/05$).

بر اساس آزمون رزبنگال، آلودگی به بروسلا در گوسفندان بیشتر (۶/۲۵ درصد) و در گاوها کمتر (۴/۱۶ درصد) و در کل دام‌های تحت بررسی ۵ درصد است. در آزمون 2ME از ۸ مورد مثبت در آزمون رایت لوله‌ای جمعاً ۷ (۳/۵ درصد) مورد مثبت بود که ۳ مورد از گاوها (۲/۵ درصد) و ۴ مورد از گوسفندها (۵ درصد) آلوده بودند و در آنها تولید آنتی‌بادی‌های ایمونوگلوبین G (IgG) مثبت بود. ۱ مورد دیگر که در آزمون ME-2 منفی شده بودند، از

جدول ۲- توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی دام‌ها بر حسب روش‌های مختلف تشخیصی

P-value	2ME تعداد (درصد)		رایت لوله ای تعداد (درصد)		رزبنگال تعداد (درصد)		آزمایش
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
۰/۴۳۴	۳ (۲/۵)	۱۱۷ (۹۷/۵)	۴ (۳/۳۳)	۱۱۶ (۹۶/۶۷)	۵ (۴/۱۶)	۱۱۵ (۹۵/۸۴)	گاو
	۴ (۵)	۷۶ (۹۵)	۴ (۵)	۷۶ (۹۵)	۵ (۶/۲۵)	۷۵ (۹۳/۷۵)	گوسفند
	۷ (۳/۵)	۱۹۳ (۹۶/۵)	۸ (۴)	۱۹۲ (۹۶)	۱۰ (۵)	۱۹۰ (۹۵)	جمع

بررسی سرو اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت در گاوها و گوسفندان شهرستان شیراز

در این مطالعه مشخص شد که درصد آلودگی در بین جنس‌های ماده (۳/۹۷ درصد) بیشتر از جنس‌های نر (۲/۰۴ درصد) می‌باشد. در کل درصد آلودگی در گاو ماده ۳/۰۹ درصد و در گاو نر صفر درصد و در گوسفند ماده ۵/۵۵ درصد و در گوسفند نر ۳/۸۴ درصد می‌باشد. با توجه به تست آماری دقیق فیشر ارتباط معناداری بین جنسیت و درصد بیماری مشاهده نشد ($P > 0/05$) (جدول ۳).

از لحاظ سن، در جمعیت گوسفندان، تعداد مبتلایان به بروسلوز از تعداد ۲۰ گوسفند زیر یک سال ۰ مورد و از ۶۰ گوسفند بالای یک سال ۴ مورد (۶/۶۶ درصد) می‌باشد. در حالی که در جمعیت گاوها این مقدار در گاوهای زیر یک سال از تعداد کل ۴۲ مورد، ۱ مورد (۲/۳۸ درصد) و در گاوهای بالای یک سال از ۷۸ مورد

جدول ۳- توزیع دام‌های مثبت برای بروسلوز بر حسب جنس و نوع دام

P-value	گاو تعداد (درصد)		گوسفند (درصد)		جمع تعداد (درصد)		جنس
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
۰/۴۵۶	۰	۲۳ (۱۰۰)	۱ (۳/۸۴)	۲۵ (۹۶/۱۶)	۱ (۲/۰۴)	۴۸ (۹۷/۹۶)	نر
	۳ (۳/۰۹)	۹۴ (۹۶/۹۰)	۳ (۵/۵۵)	۵۱ (۹۴/۴۴)	۶ (۳/۹۷)	۱۴۵ (۹۶/۰۲)	ماده
	۳ (۲/۵۰)	۱۱۷ (۹۷/۷۰)	۴ (۵/۰۰)	۷۶ (۹۵/۰۰)	۷ (۳/۵)	۱۹۳ (۹۶/۵)	جمع

نمونه‌گیری شده تعداد ۲ مورد (۲/۵۶ درصد) مثبت بود. با توجه به تست آماری دقیق فیشر ارتباط معناداری بین سن و درصد بیماری مشاهده گردید ($P < 0/05$). این مشاهده بدین صورت است که میزان آلودگی در جمعیت مسن (۴/۳۴ درصد) بیشتر از جمعیت جوان (۱/۶۱ درصد) می‌باشد (جدول ۴).

از لحاظ سن، در جمعیت گوسفندان، تعداد مبتلایان به بروسلوز از تعداد ۲۰ گوسفند زیر یک سال ۰ مورد و از ۶۰ گوسفند بالای یک سال ۴ مورد (۶/۶۶ درصد) می‌باشد. در حالی که در جمعیت گاوها این مقدار در گاوهای زیر یک سال از تعداد کل ۴۲ مورد، ۱ مورد (۲/۳۸ درصد) و در گاوهای بالای یک سال از ۷۸ مورد

جدول ۴- توزیع دام‌های مثبت برای بروسلوز بر حسب سن و نوع دام

P-value	گاو تعداد (درصد)		گوسفند (درصد)		جمع تعداد (درصد)		سن
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
۰/۰۲۵	۱ (۲/۳۸)	۴۱ (۹۷/۶۲)	۰ (۰)	۲۰ (۱۰۰)	۱ (۱/۶۱)	۶۱ (۹۸/۳۹)	زیر یک سال
	۲ (۲/۵۶)	۷۶ (۹۷/۴۳)	۴ (۶/۶۶)	۵۶ (۹۳/۳۳)	۶ (۴/۳۴)	۱۳۲ (۹۵/۶۵)	بالای یک سال
	۳ (۱/۰۵)	۱۱۷ (۹۵/۸۴)	۴ (۵/۰۰)	۷۶ (۹۵/۰۰)	۷ (۳/۵)	۱۹۳ (۹۶/۵)	جمع

درصد آلودگی در بین دام‌هایی که به صورت سنتی نگه داشته می‌شدند، (۷/۷۵ درصد) بیشتر از دام‌هایی بود که به صورت صنعتی نگه (۱/۱۹ درصد) داشته می‌شدند. با توجه به نتایج به دست آمده، در کل میزان شیوع بیماری بروسلوز در گاوها و گوسفندان ۳/۵ درصد گزارش شد، بررسی نسبت شانس و سطح معناداری آزمون رگرسیون لجستیک چند متغیره خطی نشان داد که ماده بودن ($OR=7/4$)، مسن بودن ($OR=7/87$) و نگهداری سنتی ($OR=7/27$) خطر ابتلا به بروسلوز را در گاوها و گوسفندان افزایش می‌دهد (جدول ۵).

از لحاظ نوع نگهداری، از آنجا که در جمعیت گوسفندی مورد مطالعه تمام نمونه‌ها از دامداری سنتی گرفته شده بود، از تعداد کل ۸۰ گوسفند که همگی آنها به صورت سنتی نگه داشته می‌شدند، ۵ مورد (۶/۲۵ درصد) آلوده بودند. اما در جمعیت گاوها از تعداد کل ۸۴ موردی که به صورت صنعتی نگهداری می‌شدند تنها ۱ مورد (۱/۱۹ درصد) مثبت، و از تعداد کل ۳۶ موردی که به صورت سنتی نگهداری می‌شدند ۴ مورد (۱۱/۱۱ درصد) آنها مثبت بودند. ارتباط معناداری بین نوع نگهداری و درصد بیماری مشاهده گردید ($P < 0/05$). بر همین اساس

جدول ۵- تخمین آلودگی نهایی بر اساس مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره

متغیر	B	Wald	P-value
گونه			
گوسفند	۰/۰۰	-	۰/۴۸
گاو	۰/۰۱۹	۰/۰۰۹	
جنس			
نر	۰/۰۰	-	۰/۰۱
ماده	۲/۰۰	۱۱/۰۵	
سن			
زیر یک سال	۰/۰۰	-	۰/۰۲
بالای یک سال	۲/۰۶	۰/۰۰	
نوع نگهداری			
سنتی	۱/۹۸	۰/۱۵۵	۰/۰۵
صنعتی	۰/۰۰	-	

بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد. در کشورهایی که این بیماری در حیوانات تحت کنترل در نیامده، انتقال آن به انسان به‌طور مکرر اتفاق افتاده و به‌عنوان یک بیماری مهم انسانی باقی مانده است. تاکنون عوامل متعددی مرتبط با تب مالت در گاوها و گوسفندان در سراسر جهان گزارش شده است. برخی از این عوامل شامل سطح بهداشت در مزرعه، اندازه گله، سن دام، جنسیت، سیستم تولید، وجود حیات وحش و گونه‌های مختلف دام در گله می‌باشد (۱۲). در این مطالعه میزان شیوع بیماری تب مالت در گاوها و گوسفندان در شیراز را مورد بررسی قرار دادیم، نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که میزان آلودگی در گوسفندان در مقایسه با گاوها بالاتر بود و این مسأله در هر سه تست انجام شده تأیید شده است. همچنین میزان شیوع بیماری بروسلوز در گاوها و گوسفندان ۳/۵ درصد گزارش شد، که ماده بودن ($OR=7/4$)، مسن بودن ($OR=7/87$) و نگهداری سنتی ($OR=7/27$) خطر ابتلا به بروسلوز را در گاوها و گوسفندان افزایش می‌دهد.

Almuzaini (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای در کشور عربستان شیوع بروسلوز در دام‌های این کشور را ۵/۴۷ درصد گزارش نمود (۱۸). یافته‌های به‌دست آمده در مطالعه حاضر، با نتیجه تحقیقاتی که توسط امر و همکاران (۲۰۰۰) در اریتره انجام شد مغایرت دارد زیرا آنها یافتند که درصد آلودگی در گاوها (۸/۲۰) بیشتر از گوسفندان (۱/۴۰) است (۱۹). همچنین در مطالعات دیگری که توسط ساماها و همکاران (۲۰۰۸) در مصر به‌وسیله تست

رایت لوله‌ای بر روی ۲۷۷۹ دام انجام گرفت مشخص شد که آلودگی در گوسفندان ۴/۸ درصد و در گاوها ۴/۷۳ درصد بوده است (۲۰). همان‌طور که مشاهده می‌شود اختلاف میزان آلودگی بین دو گروه گاوها و گوسفندان در این تحقیق به اندازه‌ای نیست که بتوان ارتباطی بین آن و تحقیق حاضر پیدا کرد. در عربستان سعودی احمد و همکاران (۲۰۰۹) میزان آلودگی در گاوها را ۱۸/۷۰ و در گوسفنداها ۶/۵ درصد اعلام کردند (۲۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود در کشورهای دیگر درصد آلودگی در گاوها بیشتر از گوسفندان است، ولی در تحقیق حاضر که به نوعی اولین تحقیق مقایسه‌ای بین گاوها و گوسفندان یک منطقه در ایران می‌باشد، گوسفنداها درصد آلودگی بالاتری را در مقایسه با گاوها نشان می‌دهند. این مسأله که آلودگی در جمعیت گوسفندان بیشتر از گاوها می‌باشد، ممکن است به علت نظارت‌های بیشتر ادارات دامپزشکی و نهادهای ذیربط نسبت به انجام واکسیناسیون و بررسی‌های بیشتر در گاوها نسبت به گوسفنداها باشد. البته نباید از این نکته غافل شد که تمامی جمعیت گوسفندی مورد بررسی در این مطالعه از بین جمعیت سنتی انتخاب شده بودند و ممکن است این مسأله نیز به‌طور کلی در روند نتایج تأثیرگذار بوده باشد. علت دیگر این امر می‌تواند پرورش کنترل شده‌تر گاوها نسبت به گوسفندان و یا ثابت بودن نسبی محل نگهداری آنها باشد. معمولاً گوسفندان برای چرا به‌صورت گله‌ای به مراتع برده می‌شوند و مدت زمان بیشتری را به‌صورت آزاد در چرا می‌گذرانند و همین مسأله ممکن است احتمال آلودگی آنها را بیشتر کند. مطالعه‌ای که اخیراً در مناطق چوپانی

بررسی سرو اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت در گاوها و گوسفندان شهرستان شیراز

در دام‌های ماده بیشتر از دام‌های نر می‌باشد (۲۷). با این حال، مهم است که توجه داشته باشید که بروسلا می‌تواند در جفت گاوها عفونت کرده و تکثیر شود، که می‌تواند منجر به سقط جنین و دفع باکتری شود، که برابر با احتمال بیشتری برای پاسخ آنتی‌بادی طولانی‌تر در ماده‌ها است. این ممکن است بروز کمی بیشتر در ماده‌ها را توضیح دهد. از سوی دیگر گاو ماده با شروع دوره انتقالی، استرس بی‌سابقه‌ای را پشت سر می‌گذارد که از جمله پیامدهای این استرس، افزایش میزان التهاب بدن و متعاقب آن سرکوب شدن سیستم ایمنی است. این دو فرایند به‌طور مستقیم و غیر مستقیم می‌توانند سبب افزایش احتمال آلودگی در جنس ماده شوند. نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر به این واقعیت اشاره می‌کنند که حیواناتی که جنس نر دارند به علت اینکه عوامل استرس‌زا مانند فیزیولوژی بارداری در آنها مطرح نیست این جنس را کمتر مستعد ابتلا به عفونت بروسلا می‌کند. همچنین دام‌های نر معمولاً برای مدت زمان کوتاه‌تری نگهداری می‌شوند، بنابراین فرصت کمتری برای قرار گرفتن در معرض سایر اعضای گله دارند.

در مطالعه حاضر در ارتباط با سن مشاهده شد که درصد آلودگی می‌تواند با افزایش سن، زیاد شود که این یافته مطابق با نتایج تحقیقات احمد و همکاران است (۲۱). آنها نشان دادند که درصد آلودگی در گاوهای ماده بالای ۴ سال بیشتر از گاوهای جوان است. لذا می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که با افزایش سن به دلیل پایین آمدن فعالیت‌های فیزیولوژیک بدن، درصد آلودگی می‌تواند افزایش یابد. همچنین دام‌های مسن دارای هورمون‌های استروئیدی جنسی و سطوح اریتریتول بالاتری هستند که می‌تواند رشد بروسلا را افزایش دهد. ادبی و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای با بررسی شیوع بروسلا در دام‌های شهر فامنین استان همدان گزارش نمودند که شیوع ابتلاء به این بیماری در دام‌های مسن بیشتر از دام‌های جوان است (۱۰). Almuzaini (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای با بررسی تأثیر سن بر میزان ابتلا به بروسلا

کنیا انجام شد، نشان داد که گاوها و شترها در مقایسه با بزها و گوسفندها به آسانی به بروسلا آلوده می‌شوند. که این مشاهدات را مربوط به شیوه زندگی و چرای دام که توسط کشاورزان منطقه استفاده می‌شود مرتبط دانسته‌اند (۲۲). در مطالعه دیگر عنوان شد که گاو و شتر بر خلاف گوسفندها و بزهایی که در مزارع چرا می‌کردند، معمولاً با هم در سیستم‌های شبانی پرورش می‌یابند. با توجه به این سیستم‌های تولید، نرخ تماس مؤثر بین حیوانات حساس و آلوده به بروسلا در مقایسه با گوسفند و بز احتمالاً در بین گاوها و گله‌های شتر بیشتر می‌شود. همچنین اشتراک مرتع و منابع آبیاری بین چندین گله و/یا حرکت کنترل نشده دام که نمونه‌ای از سیستم‌های تولید دامداری است، احتمال آلوده شدن آنها را به بروسلا افزایش می‌دهد (۲۳).

نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که درصد آلودگی در هر دو نوع دام در جنس ماده بیشتر بوده و ارتباط معنی‌داری بین جنسیت و آلودگی مشاهده می‌شود. تأثیر جنسیت بر سطح عفونت بروسلا در دام می‌تواند متفاوت باشد. بر اساس مطالعه‌ای که در شهرستان ایزولو، کنیا انجام شد، میزان بروز عفونت بروسلا ۰/۰۲ (۹۵ درصد فاصله اطمینان (CI): ۰/۰۰۹-۰/۰۳۶) در ماده‌ها و ۰/۰۱۶ (۹۵ درصد فاصله اطمینان (CI): ۰/۰۰۴-۰/۰۹۱) در بین نرها بود. این نشان می‌دهد که میزان آلودگی در حیوانات ماده در مقایسه با نرها کمی بیشتر است (۲۴). Legesse و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای با بررسی شیوع بروسلا در دام‌های کشور اتیوپی گزارش نمودند که شیوع بروسلا در دام‌های ماده بیشتر از دام‌های نر بوده است (۲۵). Lokamar و همکاران (۲۰۲۲) در بررسی تأثیر جنسیت بر فراوانی بروسلا در دام‌ها گزارش نمودند که شیوع این بیماری در دام‌های ماده که مدت زمان بیشتر نگهداری می‌شوند بیشتر از دام‌های نر است که معمولاً تا سن پروار نگهداری و سپس کشتار می‌شوند (۲۶). Meena و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای در کشور هند گزارش نمودند که شیوع بروسلا

کمپین‌های آموزش بهداشت عمومی کافی و مؤثر برای پیشگیری از بروسلوز حیوانی و مدیریت بهتر سلامت انسان ضروری است (۳۲). نتایج حاصل از بررسی مقطعی نشان داد که گونه‌های مثبت بروسلا به‌طور قابل توجهی با سن و جنس حیوانات مرتبط بود. حیوانات بالغ و ماده به‌ترتیب در مقایسه با حیوانات جوان و نر سطوح بالاتری از مواجهه را داشتند. حیوانات مسن‌تر احتمالاً در مقایسه با حیوانات جوان زمان بیشتری در معرض قرارگرفتن داشتند که می‌توانست شانس عفونت آنها را افزایش دهد، در حالی که ماده‌ها می‌توانستند مکرراً با گونه‌های بروسلا مواجه شوند، زیرا احتمال بیشتری دارد که نسبت به نرها در گله بمانند زیرا برای اهداف پرورشی نگهداری می‌شوند. علاوه بر این، نتایج به‌دست آمده از تحلیل رگرسیون چند متغیره، ارتباط معنی‌داری را بین گونه‌های بروسلا نشان داد. قرار گرفتن در معرض و جنس یا سن حیوانات با توجه به اینکه روش مورد استفاده برای تخمین بروز از طریق کالیبراسیون زمان حیوانات در معرض خطر مقایسه قابل اعتمادی از خطر قرار گرفتن در معرض بین حیوانات ارائه می‌دهد. از آنجایی که در ایران یکی از عوامل اصلی انتقال بروسلا به انسان و به خطر انداختن بهداشت عمومی گوسفندان و گاوان هستند، در نتیجه اقدامات کنترلی و پیشگیرانه این بیماری مثل شناسایی، واکسیناسیون و حذف در راستای مطالعات اپیدمیولوژیکی و اقدامات آگاهی بخشی و آموزشی به انسان‌ها و دامداران در این منطقه بسیار کمک کننده و مهم است.

در دام‌ها گزارش نمود که شیوع بروسلا در دام‌های مسن بیشتر از دام‌های جوان است (۱۸). Bayasgalan و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که سن تأثیر معنی‌داری بر میزان شیوع بروسلوز در دام‌ها دارد و هرچه سن دام افزایش یابد احتمال ابتلاء به بروسلوز افزایش می‌یابد. در واقع، هرچه مدت زمان قرار گرفتن در معرض طولانی‌تر باشد، میکروارگانسیم زمان بیشتری برای پخش و تولید مثل دارد و در نتیجه غلظت میکروارگانسیم در محیط بیشتر می‌شود. این امر احتمال تماس حیوان با میکروارگانسیم و آلوده شدن را افزایش می‌دهد. اگرچه می‌توان ادعا کرد که مثبت بودن بروسلوز با افزایش سن افزایش می‌یابد (۲۸). اگرچه می‌توان ادعا کرد که مثبت بودن بروسلوز با افزایش سن افزایش می‌یابد و در ماده‌ها بیشتر از نرها شایع است، داده‌ها برخی سوگیری‌ها را نشان می‌دهند زیرا اکثر حیوانات مورد آزمایش پیر و ماده بودند. با این حال، اثر سن را می‌توان بر اساس جنسیت تغییر داد. با این وجود، نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر از نظر شیوع بالاتر بروسلا در دام‌های مسن با یافته‌های Mekonnen (۲۰۱۶) و Fatima و همکاران (۲۰۱۶) همخوانی دارد (۲۹، ۳۰). به‌طور مشابه، در یک مطالعه متاآنالیز، گزارش شد که مقدار احتمال تخمینی نشان می‌دهد که حیوانات پس از بلوغ یا مسن‌تر شدن به دلیل افزایش سن، بیشتر از حیوانات جوان یا قبل از بلوغ، سرم مثبت هستند (۳۱).

شیوع سرمی بالای ۵ درصد در حیوانات یا انسان مهم است و نشان دهنده وضعیت اندمیک است. بنابراین،

References

- 1- Zhou K, Wu B, Pan H, Paudyal N, Jiang J, Zhang L, *et al*. ONE health approach to address zoonotic brucellosis: a spatiotemporal associations study between animals and humans. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:521.
- 2- Zeinali M, Doosti S, Amiri B, Gouya MM, Godwin GN. Trends in the Epidemiology of Brucellosis Cases in Iran during the Last Decade. *Iranian Journal of Public Health*.

2022;51(12):2791.

- 3- Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsohis RM. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annual review of microbiology*. 2011;65:523-41.
- 4- Dadar M, Shahali Y, Fakhri Y. Brucellosis in Iranian livestock: A meta-epidemiological study. *Microbial Pathogenesis*. 2021;155:104921.
- 5- Keramat F, Karami M, Alikhani MY,

Bashirian S, Moghimbeigi A, Hashemi SH, et al. Seroprevalence of Brucellosis among general population in Famenin city, western Iran in 2016: The Famenin Brucellosis cohort study. *Archives of Iranian medicine.* 2020;23(11):749-56.

6- Rodríguez-Ezpeleta N, Embley TM. The SAR11 group of alpha-proteobacteria is not related to the origin of mitochondria. *PLoS one.* 2012;7(1):e30520.

7- Martijn J, Vosseberg J, Guy L, Offre P, Ettema TJ. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature.* 2018;557(7703):101-5.

8- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 2020;70(11):5607-12.

9- Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold L-M, Tindall BJ, et al. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in microbiology.* 2020;11:468.

10- Adabi M, Khazaiee S, Sadeghi-Nasab A, Alamian S, Arabestani MR, Valiei Z, et al. Brucellosis in livestock: First study on seroepidemiology, risk factors, and preventive strategies to manage the disease in Famenin, Iran. *Veterinary World.* 2022;15(8):2102.

11- Golshani M, Bouzari S. A review of brucellosis in Iran: epidemiology, risk factors, diagnosis, control, and prevention. *Iranian biomedical journal.* 2017;21(6):349.

12- Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M. Epidemiology of brucellosis in Iran: A comprehensive systematic review and meta-analysis study. *Microbial pathogenesis.* 2017;109:239-47.

13- Bahmani N, Bahmani A. A review of brucellosis in the Middle East and control of animal brucellosis in an Iranian experience. *Reviews and Research in Medical Microbiology.* 2022;33(1):e63-e9.

14- ZareBidaki M, Allahyari E, Zeinali T, Asgharzadeh M. Occurrence and risk factors of brucellosis among domestic animals: An artificial neural network approach. *Tropical Animal Health and Production.* 2022;54:1-13.

15- Williamson B. Victory in the Battle against Brucella: From bench to battlefield. *Vital Record:*

News from Texas A&M HSC; 2013.

16- Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases: Elsevier Inc.; 2014.

17- Brown PJ, de Pedro MA, Kysela DT, Van der Henst C, Kim J, De Bolle X, et al. Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(5):1697-701.

18- Almuzaini AM. An Epidemiological Study of Brucellosis in Different Animal Species from the Al-Qassim Region, Saudi Arabia. *Vaccines.* 2023;11(3):694.

19- Omer M, Skjerve E, Holstad G, Woldehiwet Z, Macmillan A. Prevalence of antibodies to Brucella spp. in cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. *Epidemiology & Infection.* 2000;125(2):447-53.

20- Samaha H, Al-Rowaily M, Khoudair RM, Ashour HM. Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerging infectious diseases.* 2008;14(12):1916.

21- Al-Majali AM, Talafha AQ, Ababneh MM, Ababneh MM. Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Jordan. *Journal of Veterinary Science.* 2009;10(1):61-5.

22- Akoko JM, Pelle R, Lukumbagire AS, Machuka EM, Nthiwa D, Mathew C, et al. Molecular epidemiology of Brucella species in mixed livestock-human ecosystems in Kenya. *Scientific Reports.* 2021;11(1):8881.

23- Racloz V, Schelling E, Chitnis N, Roth F, Zinsstag J. Persistence of brucellosis in pastoral systems. *OIE Revue Scientifique et Technique.* 2013;32(1):61-70.

24- Ng'ang'a CM. Cultural Drivers of Brucellosis and Treatment Pathways for Febrile Illnesses Among Agro Pastoralists in Kilombero District, Tanzania: University of Nairobi; 2022.

25- Legesse A, Mekuriaw A, Gelaye E, Abayneh T, Getachew B, Weldemedhin W, et al. Comparative evaluation of RBPT, I-ELISA, and CFT for the diagnosis of brucellosis and PCR detection of Brucella species from Ethiopian sheep, goats, and cattle sera. *BMC microbiology.* 2023; 23(1): 216.

26- Lokamar PN, Kutwah MA, Atieli H, Gumo S, Ouma C. Socio-economic impacts of brucellosis on livestock production and reproduction performance in Koibatek and Marigat regions, Baringo County, Kenya. *BMC veterinary*

research. 2020; 16(1): 1-13.

27- Meena DS, Sharma L, Bishnoi J, Soni M, Jeph NK, Galav V, et al. Serological and molecular prevalence of *Brucella* spp. among livestock species in Rajasthan, India. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023; 10: 1157211.

28- Bayasgalan C, Chultendorj T, Roth F, Zinsstag J, Hattendorf J, Badmaa B, et al. Risk factors of brucellosis seropositivity in Bactrian camels of Mongolia. *BMC veterinary research*. 2018;14:1-11.

29- Mekonnen K. Study on camel and human brucellosis in Fentale District, East Shoa Zone, Oromia regional state, Ethiopia. *J Biol Agric Healthc*. 2016;6:117-45.

30- Fatima S, Khan I, Nasir A, Younus M, Saqib M, Melzer F, et al. Serological, molecular detection and potential risk factors associated with camel brucellosis in Pakistan. *Tropical Animal Health and Production*. 2016;48:1711-8.

31- Tadesse G. Brucellosis seropositivity in animals and humans in Ethiopia: A meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016; 10(10): e0005006.

32- Dadar M, Omar SS, Shahali Y, Fakhri Y, Godfroid J, Khaneghah AM. The prevalence of camel brucellosis and associated risk factors: a global meta-epidemiological study. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 2022; 14(3): 55-93.



Seroepidemiological Study of Brucellosis in Cows and Sheep in Shiraz

Davoud Hoshyar¹, Seyedeh Ommolbanain Ghasemian^{2*}

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

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

Receive: October 14, 2023; Revise: March 17, 2024; Accept: April 7, 2024



10.22034/nfvm.2024.420747.1208

Summary

Brucellosis is one of the most common infectious diseases in Iran, which is common between humans and animals and is caused by *Brucella* species. One of the ways of brucellosis transmission to humans is the consumption of milk and traditional products contaminated with *Brucella* bacteria. The present study was conducted to investigate the epidemiological situation and the incidence of malt fever in cattle and sheep in Shiraz city. 120 serum samples were taken from cows and 80 serum samples from sheep. First, the rose bengal test was performed on all serum samples as a rapid initial diagnostic test, and it was observed that 5% of the 200 rose bengal test samples were positive. Then the positive samples in the Rose Bengal test were subjected to the Wright tube test and it was observed that 4% of the samples were positive. Then, in order to detect the type of antibody and to determine the active or inactive state of the disease, two mercaptoethanol tests were performed on the said sera, which was 3.5% positive. According to the mentioned results, the prevalence of *Brucellosis* in cattle and sheep was reported to be 3.5%, and being female (OR=7.4), being old (OR=7.87) and traditional keeping (OR=7.27) increase the risk of brucellosis in cows and sheep. In the present research, contamination was observed in old animals more than in young animals. It was observed that the contamination in the animals that are kept in the traditional way is more than the animals that are in industrial and production units.

Keywords: *Brucellosis, cattle, sheep, Shiraz*



بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های نانوکامپوزیتی بر پایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ذرات اکسید روی و لیمون برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

داوود نصیری*

استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد نطقه، دانشگاه آزاد اسلامی، نطقه، ایران.

دریافت مقاله: ۱۴ مهر ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۲ آبان ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۳ آبان ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.419535.1206

چکیده

فساد میکروبی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان زیاد است و نانوکیتوزان، ذرات اکسید روی و لیمون دارای فعالیت آنتی‌میکروبی هستند که می‌توانند برای نگهداری آن استفاده شوند. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های بر پایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی اکسید روی و لیمون برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. در این مطالعه نانوکامپوزیت‌های نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون تهیه شدند و فعالیت آنتی‌باکتریایی آنها علیه لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیپیفی موریوم و اشریشیاکلی با کمک آزمون‌های حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی (MICs و MBCs) به روش میکروداپلوشن بررسی شد. نمونه‌های فیله ماهی تهیه شد و با کمک فیلم‌های پوششی برای مدت یک هفته پوشش داده شدند. فعالیت آنتی‌باکتریایی علیه باکتری‌های مذکور و بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) بررسی شد. بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی برای هر دو آزمون MICs و MBCs به ترتیب در تیمارهای نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون، نانوکیتوزان/لیمون یا نانوکیتوزان/اکسید روی و نانوکیتوزان مشاهده شد. بیشترین میزان بازها و کل باکتری‌های زنده و همچنین شمار لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیپیفی موریوم و اشریشیاکلی به ترتیب در تیمارهای نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون بیشتر بود ($P < 0.05$). این نتایج نشان می‌دهد که فیلم‌های نانوکامپوزیتی بر پایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ذرات اکسید روی و لیمون دارای فعالیت آنتی‌میکروبی هستند و برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌توانند استفاده شوند.

واژگان کلیدی: کیتوزان، اکسید روی، لیمون، ماهی قزل‌آلای، آنتی‌باکتریایی

مقدمه

فساد ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها، سالانه باعث از بین رفتن حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد از میوه‌ها و سبزیجات، ۳۵ درصد ماهی‌ها، ۳۰ درصد غلات و ۲۰ درصد از لبنیات و محصولات گوشتی می‌شود. در کشورهای کمتر توسعه یافته، بیشترین میزان از دست رفتن پس از برداشت، تا مرحله فرآوری رخ می‌دهد، در حالی که در کشورهای توسعه یافته، بیشترین سهم در تولید ضایعات مواد غذایی در سطح خرده فروشی و مشتری است (۱). قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یک گونه ماهی ارزشمند است که به دو شکل تازه و منجمد استفاده می‌شود و در برابر فساد میکروبی آسیب‌پذیر است (۲). بنابراین، بسته‌بندی این ماهی با ترکیبات فعال می‌تواند میزان این فساد را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد. بیشتر بسته‌بندی‌های مواد غذایی مورد استفاده در حال حاضر از مواد سلولزی یا پلیمرهای ارزان قیمت تهیه شده‌اند و نگرانی‌های زیست محیطی زیادی را در مورد آلودگی کوتاه مدت و بلندمدت ایجاد کرده‌اند و فاقد فعالیت ضد میکروبی هستند (۳-۵). این عوامل صنایع غذایی را برای توسعه انواع جدیدی از مواد بسته‌بندی ضد میکروبی و زیست تخریب‌پذیر تحت فشار قرار می‌دهد. چنین مواد نوآورانه‌ای می‌توانند به‌طور قابل توجهی تکثیر باکتری‌ها و قارچ‌ها را کنترل کنند، فساد مواد غذایی را کاهش دهند، کیفیت و ایمنی غذا را افزایش دهند و ماندگاری طولانی‌تری را تضمین کنند (۶، ۷). با وجود این که که بسیاری از پلیمرهای زیستی مانند سلولز، نشاسته، آلژینات و ... به‌عنوان مواد بسته‌بندی بررسی شده‌اند، تنها تعداد کمی از آنها فعالیت ضد باکتریایی دارند (۸). کیتوزان یک پلی‌ساکارید با فعالیت ضد باکتریایی در برابر سویه‌های گرم‌منفی است (۹). کیتوزان و مشتقات آن پلی‌ساکاریدهای زیست تخریب‌پذیر، غیر سمی و زیست سازگار، و همچنین دارای خواص ضد میکروبی، ضد قارچی و کلاته‌کننده هستند (۱۰). کیتوزان یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای زیستی است و برای بسته‌بندی مواد

خوراکی بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است، اما لایه‌های کیتوزان ساده مقاومت مکانیکی پایین و خواص بازدارندگی ضعیفی دارند (۱۱، ۱۲). افزودن نانوذرات به فیلم پلیمری زیستی برپایه‌ی کیتوزان، خصوصیات مکانیکی آن را تقویت می‌کند. برخی از نانوذرات مانند اکسید روی (ZnO) را می‌توان مستقیماً در ماتریس کیتوزان جاسازی کرد و مانند عوامل اتصال عرضی عمل می‌کند (۱۳). آنها دارای ساختار آنتی‌باکتریایی از طریق فعالیت فوتوکاتالیستی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که مسئول ایجاد تنش اکسیداتیو در غشای باکتری هستند (۱۴).

در ساختار فیلم‌های برپایه‌ی کیتوزان همچنین می‌توان از مشتقات گیاهی برای افزایش دادن فعالیت آنتی‌باکتریایی استفاده کرد (۱۵). آن یک مونوترپن است که عمدتاً در مرکباتی مانند لیمو، گریپ فروت، پرتقال و غیره یافت می‌شود (۱۶). لیمونن یک ساختار خوشبوکننده و طعم‌دهنده است و از این رو در محصولاتی از لوازم آرایشی گرفته تا نوشیدنی‌ها و بستنی‌ها یافت می‌شود. لیمونن یک ترکیب فعال زیستی بالقوه است زیرا دارای خواص مختلفی مانند آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان، حشره‌کش و غیره است (۱۷). چندین مطالعه فعالیت آنتی‌باکتریایی لیمونن را گزارش کرده‌اند که می‌تواند برای بسته‌بندی مواد غذایی و پیشگیری از فساد مواد غذایی استفاده شود (۱۸، ۱۹).

با در نظر گرفتن فساد میکروبی بالای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوکیتوزان، ذرات اکسید روی و لیمونن، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های بر پایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی اکسید روی و لیمونن برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد.

مواد و روش‌ها

لیمونن با خلوص ۹۶ درصد و کیتوزان با درجه استیلاسیون تا ۸۵ درصد (وزن مولکولی متوسط)، از شرکت سیگما آلدریج (شیمی، اشتاینه‌ایم، آلمان) تهیه

۷۰- درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت دیگر منجمد شدند. برای به دست آوردن محصولات نهایی، نمونه منجمد به مدت ۴۸ ساعت در خشک‌کن فریز (Christ, Alpha, 1-4) لیوفیلیز شد و برای تجزیه و تحلیل نگهداری شد.

برای بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، پانلی از میکروارگانیسم‌ها شامل لیستریا مونوسیتوزنز (ATCC 19118) به‌عنوان باکتری گرم‌مثبت و همچنین *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028) و *اشریشیاکلی* (ATCC 10536) به‌عنوان باکتری گرم‌منفی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران-ایران) تهیه شد. حداقل غلظت‌های بازدارنده و کشندگی (MICs و MBCs) به روش میکرودیالوشن بررسی شد (۲۲). سوسپانسیون باکتریایی توسط سالین استریل برای غلظت $10^5 \times 1/100$ CFU/mL تنظیم شد و رقت‌هایی در غلظت‌های بین ۲۰/۱۰۰-۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. صفحات میکرو دیالوشن استریل ۹۶ چاهکی آماده شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. MBC به‌عنوان کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده و/یا با مرگ ۹۹/۵۰ درصد تلقیح اولیه در نظر گرفته شد. چگالی نوری هر چاهک در طول موج ۶۵۵ نانومتر توسط Bio-Rad Laboratories (Microplate manager 4.0) در نظر گرفته شد و با یک بلانک و کنترل مثبت مقایسه شد. استریپتومایسین به نوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام شد.

نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) از یک بازار محلی خریداری شد. ماهی‌ها به فیله‌های کوچک (هر کدام ۴۵ گرم، $5 \times 2 \times 3$ سانتی‌متر مکعب) بریده شدند، و سطوح بالایی و پایینی فیله‌ها با فیلم‌هایی (۷ سانتی‌متر \times ۷ سانتی‌متر) پوشیده شدند، همان‌گونه که توسط مطالعات قبلی گزارش شد (۲۳). تمام نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

شد. استات روی، از شرکت مرک (دارمشتات، آلمان) تهیه شد. نانوذرات کیتوزان بر اساس مطالعات قبلی تهیه شد (۲۰). به‌طور خلاصه محلول کیتوزان با استفاده از اسیداستیک به نسبت ۱:۱۰۰ تهیه شد. برای تنظیم pH در ۵/۵۰، محلول آبی ۰/۲۰ مولار هیدروکسید سدیم به‌صورت قطره‌ای اضافه شد و به مدت ۰/۵۰ ساعت توسط پروب سونیکاتور (ساخت Dakshin، توان ۲۴۰ وات، قطر پروب ۱۸ میلی‌متر) سونیکیت شد. ۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی حاوی یک گرم از STPP به‌عنوان عامل اتصال عرضی اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. نانوکامپوزیت‌های کیتوزان/اکسید روی همان‌طور که توسط مطالعات قبلی گزارش شده بود، تهیه شدند (۲۱). به‌طور خلاصه، پس از تهیه محلول استات روی در آب دیونیزه، محلول استات به مدت ۱۵ دقیقه روی s-off 5s۴ به‌صورت پالس سونیکاسیون شد. برای سونیکاسیون محلول، محلول NaOH با سرعت ۱۰ میلی‌لیتر در دقیقه به آن اضافه شد و رسوبات به دست‌آمده فیلتر، شسته و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت خشک و سپس پودر شدند. برای تهیه نانوکامپوزیت کیتوزان/اکسید روی، محلول به دست‌آمده با اکسید روی (۱٪ w/v) تیمار شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق تحت سونیکاسیون قرار گرفت. پس از سونیکاسیون، مانند مرحله قبل، محصول به‌صورت قطره قطره در STPP و NaOH ریخته شد تا هیدروژل تشکیل شود. برای تهیه نانوکامپوزیت‌های کیتوزان/لیمون، کیتوزان/اکسید روی/لیمون حاوی ۰/۲۰ درصد وزن/حجمی از لیمون، ۶/۵۰ میلی‌لیتر از لیمون در محلول‌ها اضافه شد و سپس به آرامی در محلول به دست‌آمده از مرحله اول و دوم قبل از افزودن به محلول STPP تحت شرایط ثابت قطره قطره اضافه شد. با هم‌زدن برای تشکیل یک امولسیون پایدار، سپس برای تولید هیدروژل در STPP ریخته شد. محصولات پیوند متقابل این نانوکامپوزیت‌ها در یک ظرف پتری ریخته شدند، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و سپس در

نگهداری شدند. نمونه‌ها در ۵ گروه قرار گرفتند و در هر گروه ۵ نمونه قرار داشت. نمونه‌های ماهی برای مدت ۷ روز برای آزمایش‌های باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفتند و با فیلم‌های نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ لیمون، نانوکیتوزان، اکسید روی و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمون پوشش داده شدند. یک گروه نیز بدون پوشش و به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

برای بررسی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC)، نمونه‌ها برای مدت زمان ۴ روز نگهداری شدند. بازهای ازته فرار بر اساس مطالعات دیگر اندازه‌گیری شد (۲۴). به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از نمونه‌ها همگن شده، با کمک تقطیر بخار کجدال با محلول آبی هیدروکسید سدیم ۳۰ درصد (w/v) و اسیدبوریک آبی ۴ درصد (v/v) استخراج شد که در برابر ۰/۰۱ نیوتن اسید هیدروکلریک تیترا شد و مقادیر گزارش شد. میزان کل باکتری‌های زنده بر اساس مطالعات قبلی اندازه‌گیری شد (خشنودی نیا، موسوی‌نسب، نصیری و عظیمی‌فر، ۲۰۱۸). به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از هر نمونه ماهی ابتدا خرد شد و به ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی ۰/۹۰ درصد استریل شده منتقل شد و همگن شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر نمونه از هر رقت با آگار شمارش پلیت (Beijing Aoboxing Bio-tech Co., Ltd., Beijing, China) در ظروف پتری مخلوط شد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد و شمارش شد. برای اندازه‌گیری pH، نمونه‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شدند. مخلوط‌ها فیلتر شده و PH آنها با استفاده از pH متر اندازه‌گیری شد.

فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها بر اساس مطالعات قبلی ارزیابی شد (۲۵). به‌طور خلاصه، فیلم‌ها تهیه و با کمک اشعه ماوراء بنفش به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. فیله‌ها (۳×۲×۵ سانتی‌متر مکعب) با

باکتری‌های اشاره شده در بخش‌های قبلی با استفاده از میکروبیوتها به‌صورت جداگانه تا غلظت نهایی تلقیح شدند. روی سطح فیله‌ها، 10^5 CFU/cm² از باکتری‌ها تلقیح شد و با فیلم‌هایی که قبلاً ذکر شد پوشانده شدند و در دمای ۴±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس شمارش شدند.

آنالیزها در پنج تکرار انجام شد و برای اثرات تیمارها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد و مقادیر معنی‌داری بالاتر از ۰/۰۵ بود، بنابراین داده‌ها نرمال بودند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱، SPSS Inc, Chicago, IL) و آنالیز واریانس یک راهه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارها توسط نرم‌افزار Graph Pad Prism (نسخه ۶/۰۷) ترسیم شدند.

نتایج

جدول ۱ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه شده علیه باکتری‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که تیمار کنترل فاقد هرگونه فعالیت آنتی‌باکتریایی بود و نتایج آن در جدول ارائه نشد. با این حال، نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی برای هردو آزمون به ترتیب در تیمارهای استرپتومایسین، نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمون، نانوکیتوزان/ لیمون یا نانوکیتوزان/ اکسید روی و نانوکیتوزان مشاهده شد. غلظت‌های ۲ برابری برای فعالیت کشندگی در مقایسه با مهارکنندگی نیاز بود. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن اکسید روی و لیمون باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی می‌شود. فیلم‌های تهیه شده بر روی تمام باکتری‌ها اثرات نسبتاً مشابهی را نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که بکارگیری اکسید روی و لیمون به‌طور همزمان باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی در مقایسه با حالت مجزا می‌شود.

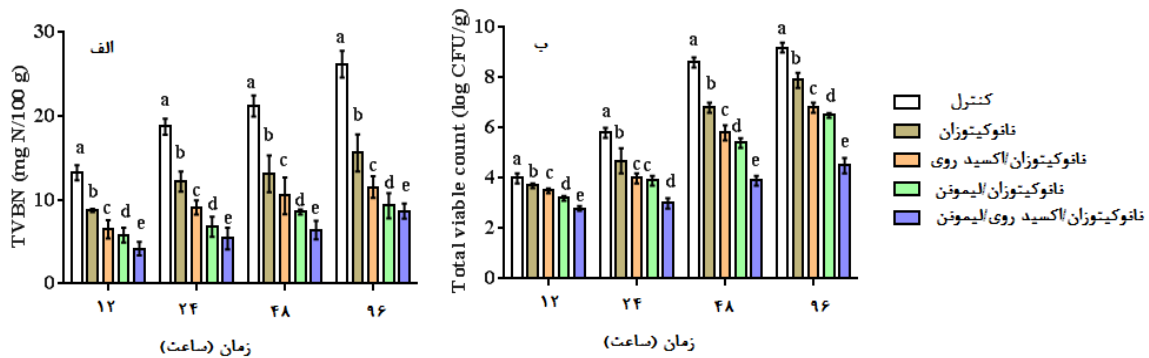
جدول ۱- فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه شده در آزمون‌های MIC و MBC

MIC (میلی گرم / میلی لیتر)			
باکتری‌ها	لیستریا مونوسیژنوز	سالمونلا تیفی موریوم	اشریشیاکلی
نانوکیتوزان	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰
نانوکیتوزان/اکسید روی	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
نانوکیتوزان/لیمون	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵
استرپتوماپسین	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲

MBC (میلی گرم / میلی لیتر)			
باکتری‌ها	لیستریا مونوسیژنوز	سالمونلا تیفی موریوم	اشریشیاکلی
نانوکیتوزان	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
نانوکیتوزان/اکسید روی	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰
نانوکیتوزان/لیمون	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰
نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون	۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵
استرپتوماپسین	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵

شکل ۱، تأثیر فیلم‌های پوششی بر روی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) نمونه‌های ماهی در طی ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با گذشت زمان، میزان بازها و کل باکتری‌های زنده به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. بر اساس نتایج این مطالعه، بیشترین میزان بازها و کل باکتری‌های زنده به‌ترتیب در تیمارهای کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون بود ($P < 0.05$). نتایج برای مقادیر بازهای ازته فرار در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون در زمان ۱۲ ساعت به‌ترتیب 0.89 ± 0.13 ، 0.20 ± 0.75 ، 0.10 ± 0.50 و 0.89 ± 0.10 و 0.80 ± 0.20 بودند، در حالی که در زمان ۲۴ ساعت، مقادیر به‌ترتیب 0.96 ± 0.18 ، 0.75 ± 0.18 ، 0.20 ± 0.12 و 0.96 ± 0.12 بودند. نتایج برای زمان ۴۸ ساعت در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون برای میزان کل باکتری‌های زنده به‌ترتیب 0.20 ± 0.18 ، 0.20 ± 0.18 ، 0.20 ± 0.18 و 0.20 ± 0.18 بودند. این نتایج نشان می‌دهد که کیتوزان می‌تواند در مقایسه با کنترل، اثرات مثبتی در کاهش دادن میزان بازها و کل باکتری‌های زنده داشته باشد. بر اساس یافته‌ها، کیتوزان و اکسید روی اثرات هم‌افزایی در کاهش دادن میزان بازها و کل باکتری‌های زنده دارند.

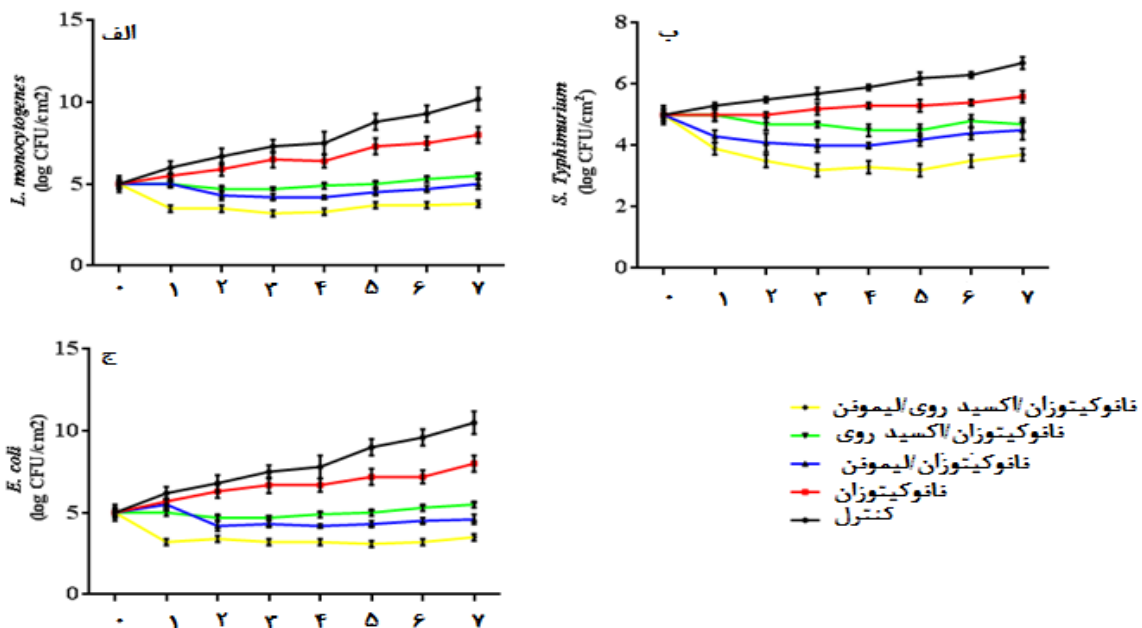
شکل ۱، تأثیر فیلم‌های پوششی بر روی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) نمونه‌های ماهی در طی ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با گذشت زمان، میزان بازها و کل باکتری‌های زنده به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. بر اساس نتایج این مطالعه، بیشترین میزان بازها و کل باکتری‌های زنده به‌ترتیب در تیمارهای کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون بود ($P < 0.05$). نتایج برای مقادیر بازهای ازته فرار در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون در زمان ۱۲ ساعت به‌ترتیب 0.89 ± 0.13 ، 0.20 ± 0.75 ، 0.10 ± 0.50 و 0.89 ± 0.10 و 0.80 ± 0.20 بودند، در حالی که در زمان ۲۴ ساعت، مقادیر به‌ترتیب 0.96 ± 0.18 ، 0.75 ± 0.18 ، 0.20 ± 0.12 و 0.96 ± 0.12 بودند. نتایج برای زمان ۴۸ ساعت در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون برای میزان کل باکتری‌های زنده به‌ترتیب 0.20 ± 0.18 ، 0.20 ± 0.18 ، 0.20 ± 0.18 و 0.20 ± 0.18 بودند. این نتایج نشان می‌دهد که کیتوزان می‌تواند در مقایسه با کنترل، اثرات مثبتی در کاهش دادن میزان بازها و کل باکتری‌های زنده داشته باشد. بر اساس یافته‌ها، کیتوزان و اکسید روی اثرات هم‌افزایی در کاهش دادن میزان بازها و کل باکتری‌های زنده دارند.



شکل ۱- تأثیر فیلم‌های پوششی بر روی بازهای از ته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) نمونه‌های ماهی در طی ۹۶ ساعت حروف غیر مشابه اختلافات معنی‌دار در طی همان زمان را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد.

نتایج برای تمام باکتری‌ها و در تمامی گروه‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌باکتریایی در زمان بررسی اولیه حدود ۵ بود که در گروه کنترل در لیستریا و شریشیاکلی به مقدار ۱۰ واحد در زمان ۷ روز رسید، در حالی که برای سالمونلا تیفی‌موریوم به مقدار ۶ واحد در انتها رسید. این نتایج همچنین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت باکتریایی به ترتیب در گروه‌های نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمونن و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمونن برای تمامی باکتری‌ها بود.

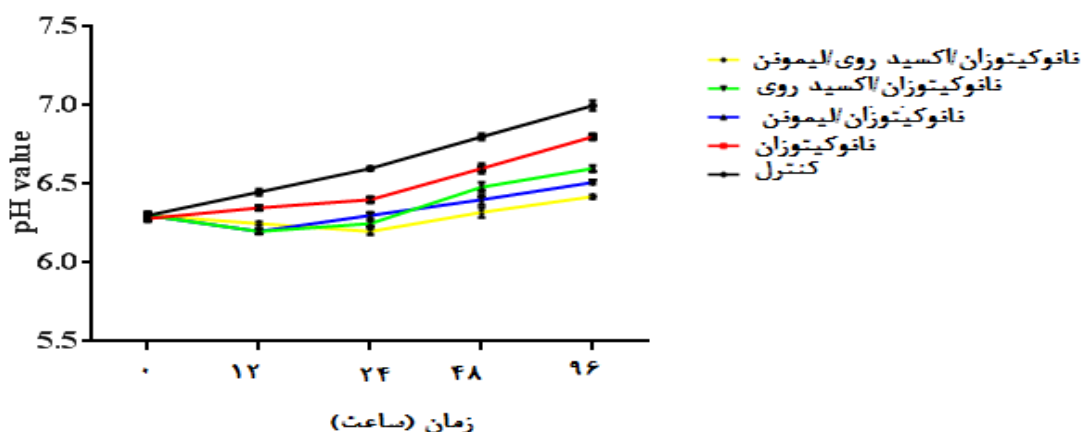
شکل ۲ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های پوششی بر روی نمونه‌های ماهی در طی ۷ روز را نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه همراستا با بخش قبلی بود و بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی به ترتیب نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمونن، نانوکیتوزان/لیمونن، نانوکیتوزان/اکسید روی و نانوکیتوزان مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن اکسید روی و به‌طور قابل توجهی لیمونن، باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی می‌شود و بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی زمانی مشاهده می‌شود که ترکیبی از لیمونن و اکسید روی در ساختار فیلم وجود داشته باشد.



شکل ۲- فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های پوششی بر روی نمونه‌های ماهی در طی ۷ روز

± ۰/۰۱، ۶/۶۰ ± ۰/۰۲، ۶/۴۰ ± ۰/۰۲، ۶/۲۵ ± ۰/۰۲، ۶/۳۰ ± ۰/۰۲ و ۶/۳۰ ± ۰/۰۲ بودند. نتایج برای گروه کنترل در زمان ۴۸ ساعت برای گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون به ترتیب ۶/۸۰ ± ۰/۰۱، ۶/۶۰ ± ۰/۰۲، ۶/۴۸ ± ۰/۰۲، ۶/۴۰ ± ۰/۰۲ و ۶/۳۲ ± ۰/۰۲ بودند و در زمان ۹۶ ساعت در همان گروه‌ها به ترتیب ۶/۶۰ ± ۰/۰۲، ۶/۸۰ ± ۰/۰۲، ۷/۰۰ ± ۰/۰۳، ۶/۶۰ ± ۰/۰۲ و ۶/۴۲ ± ۰/۰۱ بودند.

شکل ۳ مقادیر pH نمونه‌های فیله در زمان‌های مختلف بر حسب ساعت را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که مقادیر در زمان آغاز در تمامی گروه‌ها ۶/۳۰ با انحراف معیار بسیار پایین ۰/۰۲ بودند. نتایج برای زمان ۱۲ ساعت نشان داد که مقادیر به ترتیب در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/اکسید روی، نانوکیتوزان/لیمون و نانوکیتوزان/اکسید روی/لیمون ۶/۴۵ ± ۰/۰۱، ۶/۳۵ ± ۰/۰۱، ۶/۲۰ ± ۰/۰۱، ۶/۲۰ ± ۰/۰۱ و ۶/۲۵ ± ۰/۰۱ بودند و در زمان ۲۴ ساعت به ترتیب در همان گروه‌ها،



شکل ۳- مقادیر pH نمونه‌های فیله در زمان‌های مختلف بر حسب ساعت

وزن مولکولی زیاد در محلول‌های آبی اسیدی حل می‌شود، گروه‌های NH_2 به کاتیون‌های NH_3^+ پروتون‌دار می‌شوند و تعامل الکترواستاتیکی بین NH_3^+ و لیپولی‌ساکاریدها روی غشای سلولی باکتری‌های گرم‌منفی یا تیکویک اسیدها روی باکتری‌های گرم‌مثبت منجر به عدم تعادل در ساخت دیواره سلولی و مرگ باکتری می‌شود. تخریب غشای سلولی می‌تواند از طریق نشت یون‌هایی همانند پتاسیم، فسفات صورت گیرد. در مطالعاتی نشان داده شد که مولکول‌های کیتوزان به سطح باکتری‌ها می‌چسبند، دیواره سلولی را تخریب می‌کنند و باعث نشت مواد باکتریایی به بیرون می‌شوند (۲۸). کیتوزان یک ماده کلاته‌کننده است. زمانی که اسیدیته به زیر نقطه ایزو الکتریک می‌رسد یون‌های پروتون‌دار

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های نانوکامپوزیتی بر پایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ذرات اکسید روی و لیمون برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. نتایج این مطالعه در بخش آزمایشگاهی و بر روی نمونه‌های ماهی نشان داد که نانوکیتوزان دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی ضعیفی است. سازوکارهای آنتی‌باکتریال کیتوزان شامل تخریب کردن غشای سلولی و دیواره سلولی، کلاته کردن مقدار زیادی از کاتیون‌های فلزی، تعامل کردن با اهداف داخل سلولی و ساکن کردن باکتری‌ها است. مطالعات زیادی در زمینه‌ی آزمایشگاهی و روی موجودات زنده، اثرات آنتی‌باکتریایی کیتوزان را گزارش کرده‌اند (۲۶، ۲۷). زمانی که کیتوزان با

آمونیم در زنجیره‌های مولکولی توسط بارهای منفی جذب می‌شوند. کیتوزان و مشتقات آن کاتیون‌های دی‌والان را کلاته می‌کند و باعث ایجاد نابرابری و نهایتاً تخریب غشای سلولی می‌شوند (۲۹). نتایج نشان داد که افزودن اکسید روی باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی شد. مطالعات فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات ZnO را از طریق آزادسازی یون روی (Zn^{2+})، جلوگیری از متابولیسم اسیدهای آمینه و اختلال در سیستم آنزیمی و تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در باکتری‌ها و مرگ باکتریایی گزارش کرده‌اند (۳۰). در این مطالعه، افزودن لیمون نیز باعث افزایش قابل توجه فعالیت آنتی‌میکروبی فیلم‌ها شد. سازوکار آنتی‌باکتریایی لیمون از طریق تخریب کردن و نفوذ در ساختار لیپیدی دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها است که از این طریق پروتئین‌های غشای سلولی تخریب می‌شوند و باعث مرگ باکتری می‌شوند (۳۱). در مجموع هر سه ساختار دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی هستند و از طریق اثرات هم‌افزایی فعالیت آنتی‌باکتریایی خود را بیشتر نشان می‌دهند. این نتایج نشان می‌دهد که برای داشتن یک فعالیت آنتی‌باکتریایی باید تمامی اجزاء وجود داشته باشد. نتایج این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی تفاوتی بین کیتوزان/ لیمون و کیتوزان/ اکسید روی نشان نداد. با این حال، در نمونه‌های ماهی کیتوزان/ لیمون کارایی بهتری نشان داد که این اختلاف ممکن است به علت شرایط کشت و یا محیط کشت ممکن است باشد. در مجموع، ترکیبی از هر سه جزء می‌تواند به‌طور قابل توجهی از رشد میکروب‌ها طی ۷ روز جلوگیری کند که این اثر برای نگهداری نمونه‌های ماهی ارزشمند است. ذکر این نکته ضروری است که در تمامی گروه‌ها، باکتری‌ها به‌صورت فزاینده‌ای رشد می‌کنند ولی در گروه هر سه جزء سرعت آهنگ این رشد بسیار کند است.

میزان کل باکتری‌های زنده، در گروه‌های ترکیب اکسید روی/ لیمون در مقایسه با فرم جداگانه بیشتر بود و در گروه کیتوزان پائین‌تر بود. این نتایج همراستا با نتایج

بخش شمارش باکتریایی بود. مطالعات 10^6 CFU/g را برای قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان آستانه پیشنهاد کرده‌اند (۳۴). نتایج این مطالعه نشان داد که در زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت در گروه کنترل، مقادیر بیش از آستانه بود. در حالی که در دیگر گروه‌ها، این مقادیر در زمان ۹۶ ساعت، این حدود بود. تنها استثناء گروه کیتوزان/ اکسید روی/ لیمون بود که در تمامی زمان‌ها پایین‌تر از آستانه بود. TVC برای مطالعه کیفیت میکروبیولوژیکی غذاها در نظر گرفته می‌شود. نتایج برای TVC نتایج را برای تجزیه و تحلیل میکروبیولوژیکی تأیید می‌کند. معمولاً از TVC به‌عنوان شاخصی برای تازگی گوشت استفاده می‌شود. ظاهراً فیلم‌های تهیه شده، تعداد باکتری‌ها و متعاقباً مقادیر TVC را کاهش می‌دهند. در مجموع، نتایج این بخش نیز بر اثرات هم‌افزایی بین اکسید روی/ لیمون تأکید دارد و این دو میزان باکتری‌ها را کاهش می‌دهند و می‌توانند برای نگهداری ماهی استفاده شوند.

مقدار pH در فیلم‌های دیگر پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت و در گروه کنترل از ۲۴ ساعت افزایش یافت. اگرچه pH افزایش یافته در گروه کنترل ۰/۷ بود، اما تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت. همان‌طور که برای TVBN نشان داده شده است، می‌توان افزایش pH را به افزایش پایه‌های فرار تولید شده نسبت داد و اثرات منفی بر کیفیت نمونه‌ها دارد. نتایج برای pH با نتایج به دست آمده برای TVBN مطابقت دارد.

در مجموع فیلم‌های برپایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ترکیبی از اکسید روی و لیمون توانستند به‌طور قابل توجهی فعالیت آنتی‌میکروبی نشان دهند و در شرایط ترکیبی اثرات بهتری در مقایسه با فرم جداگانه داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که این دو ترکیب می‌توانند برای پوشش دادن فیله‌های ماهی استفاده شوند و از فساد نمونه‌های ماهی جلوگیری کنند. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان ساختارهای محیط زیست دوست در صنعت استفاده شوند. فیلم‌های تولیدی دارای قابلیت استفاده در صنعت بسته‌بندی ماهی و برای پوشش دادن فیله‌های

سپاسگزاری

از تمامی عزیزانی که در اجرای این تحقیق همکاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ماهی هستند و همچنین به‌علت ساختار تجزیه‌پذیر می‌توانند به‌عنوان پوشش‌های آنتی‌باکتریایی قابل تجزیه استفاده شوند.

References

1- Motelica L, Fikai D, Fikai A, Truşcă R D, Ilie CI, Oprea OC, *et al.* Innovative antimicrobial chitosan/ZnO/Ag NPs/citronella essential oil nanocomposite—Potential coating for grapes. *Foods*. 2020; 9(12): 1801.

2- Rastiani F, Jebali A, Hekmatimoghaddam SH, Sadrabad EK, Mohajeri FA, Dehghani-Tafti A. Monitoring the freshness of rainbow trout using intelligent PH-sensitive indicator during storage. *Nutr. Food Sec.* 2019.

3- Motelica L, Fikai D, Oprea OC, Fikai A, Andronescu E. Smart food packaging designed by nanotechnological and drug delivery approaches. *Coatings*. 2020; 10(9): 806.

4- Lemnaru GM, Truşcă RD, Ilie CI, Țiplea RE, Fikai D, Oprea O, *et al.* Antibacterial activity of bacterial cellulose loaded with bacitracin and amoxicillin: In vitro studies. *Molecules*. 2020; 25(18): 4069.

5- Makaremi M, Yousefi H, Cavallaro G, Lazzara G, Goh CBS, Lee SM, *et al.* Safely dissolvable and healable active packaging films based on alginate and pectin. *Polymers*. 2019; 11(10): 1594.

6- Flórez M, Guerra-Rodríguez E, Cazón P, Vázquez M. Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloid*. 2022; 124: 107328.

7- Pires J, Paula CDD, Souza VGL, Fernando AL, Coelho I. Understanding the barrier and mechanical behavior of different nanofillers in chitosan films for food packaging. *Polymers*. 2021; 13(5): 721.

8- Radulescu M, Fikai D, Oprea O, Fikai A, Andronescu E, M Holban A. Antimicrobial chitosan based formulations with impact on different biomedical applications. *Curr. Pharma. Biotechnol.* 2015; 16(2): 128-36.

9- Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 2004; 21(6): 14-25.

10- Cazón P, Vázquez M. Mechanical and

barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film. *Environ. Chem. Lett.* 2020; 18(2): 257-67.

11- Gingasu D, Mindru I, Patron L, Ianculescu A, Vasile E, Marinescu G, *et al.* Synthesis and characterization of chitosan-coated cobalt ferrite nanoparticles and their antimicrobial activity. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 2018; 28: 1932-41.

12- Anaya-Esparza LM, Ruvalcaba-Gómez JM, Maytorena-Verdugo CI, González-Silva N, Romero-Toledo R, Aguilera-Aguirre S, *et al.* Chitosan-TiO₂: A versatile hybrid composite. *Materials*. 2020; 13(4): 811.

13- Avramescu SM, Butean C, Popa CV, Ortan A, Moraru I, Temocico G. Edible and functionalized films/coatings—Performances and perspectives. *Coatings*. 2020; 10(7): 687.

14- Kumar S, Mudai A, Roy B, Basumatary IB, Mukherjee A, Dutta J. Biodegradable hybrid nanocomposite of chitosan/gelatin and green synthesized zinc oxide nanoparticles for food packaging. *Foods*. 2020; 9(9): 1143.

15- Caputo L, Cornara L, Bazzicalupo M, De Francesco C, De Feo V, Trombetta D, *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oils from peels of three citrus species. *Molecules*. 2020; 25(8): 1890.

16- Roy S, Rhim J-W. Fabrication of copper sulfide nanoparticles and limonene incorporated pullulan/carrageenan-based film with improved mechanical and antibacterial properties. *Polymers*. 2020; 12(11): 2665.

17- Gupta A, Jeyakumar E, Lawrence R. Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in Escherichia coli. *Sci. Report.* 2021; 11(1): 13816.

18- Lan W, Wang S, Chen M, Sameen DE, Lee K, Liu Y. Developing poly (vinyl alcohol)/chitosan films incorporate with d-limonene: Study of structural, antibacterial, and fruit preservation properties. *Int. J. Biol.Macromol.* 2020; 145: 722-32.

19- Sun P, Wang Y, Huang Z, Yang X, Dong

F, Xu X, et al. Limonene-thioctic acid-ionic liquid polymer: A self-healing and antibacterial material for movement detection sensor. *Ind. Crops Prod.* 2022; 189: 115802.

20- Chandra Hembram K, Prabha S, Chandra R, Ahmed B, Nimesh S. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artif. cells, Nanomed. Biotechnol.* 2016; 44(1): 305-14.

21- Bhanvase B, Veer A, Shirsath S, Sonawane S. Ultrasound assisted preparation, characterization and adsorption study of ternary chitosan-ZnO-TiO₂ nanocomposite: Advantage over conventional method. *Ultrason. Sonochem.* 2019; 52: 120-30.

22- Rostami H, Kazemi M, Shafiei S. Antibacterial activity of Lavandula officinalis and Melissa officinalis against some human pathogenic bacteria. *Asian J Biochem.* 2012; 7(3): 133-42.

23- Chang S-H, Chen Y-J, Tseng H-J, Hsiao H-I, Chai H-J, Shang K-C, et al. Antibacterial activity of chitosan-poly lactate fabricated plastic film and its application on the preservation of fish fillet. *Polymers.* 2021; 13(5): 696.

24- Amegovu AK, Sserunjogi ML, Ogowok P, Makokha V. Nucleotide degradation products, total volatile basic nitrogen, sensory and microbiological quality of Nile perch (*Lates niloticus*) fillets under chilled storage. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2012; 2(2): 653-66.

25- Woraprayote W, Pumpuang L, Tosukhowong A, Zendo T, Sonomoto K, Benjakul S, et al. Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. *LWT.* 2018; 89: 427-33.

26- Chandrasekaran M, Kim KD, Chun SC. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. *Processes.* 2020;8(9):1173.

27- Li J, Zhuang S. Antibacterial activity of

chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *Europ. Polym. J.* 2020; 138: 109984.

28- Yilmaz Atay H. Antibacterial activity of chitosan-based systems. *Functional chitosan: drug delivery and biomedical applications.* 2019: 457-89.

29- Dai X, Li S, Li S, Ke K, Pang J, Wu C, et al. High antibacterial activity of chitosan films with covalent organic frameworks immobilized silver nanoparticles. *Int. J. Biol.Macromol.* 2022; 202: 407-17.

30- Abbasabadi OR, Farahpour MR, Tabatabaei ZG. Accelerative effect of nanohydrogels based on chitosan/ZnO incorporated with citral to heal the infected full-thickness wounds; an experimental study. *Int. J. Biol.Macromol.* 2022; 217: 42-54.

31- Turina AdV, Nolan M, Zygadlo J, Perillo M. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 2006; 122(2): 101-13.

32- Khoshnoudi-Nia S, Moosavi-Nasab M. Comparison of various chemometric analysis for rapid prediction of thiobarbituric acid reactive substances in rainbow trout fillets by hyperspectral imaging technique. *Food Sci. Nutr.* 2019; 7(5): 1875-83.

33- Moosavi-Nasab M, Khoshnoudi-Nia S, Azimifar Z, Kamyab S. Evaluation of the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in fish fillets using hyperspectral imaging coupled with deep learning neural network and meta-analysis. *Sci. Report.* 2021; 11(1): 5094.

34- Javan AJ, Bolandi M, Jadidi Z, Parsaeimehr M, Vayeghan AJ. Effects of *Scrophularia striata* water extract on quality and shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during superchilled storage. *Iran. J. Vet. Res.* 2015; 16(2): 213.



Investigating the antibacterial activity of nanocomposite films based on nano-chitosan and containing zinc oxide and limonene for preserving rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) samples

Davoud Nasiri

Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Naghadeh Branch, Islamic Azad University, Naghadeh, Iran.

Receive: October 6, 2023; Revise: November 3, 2023; Accept: November 14, 2023

 10.22034/nfvm.2024.419535.1206

Summary

Microbial spoilage is high in rainbow trout and nano-chitosan, zinc oxide and limonene have antimicrobial activity that can be used for its preservation. Therefore, this study was conducted to investigate the antibacterial activity of films based on nano-chitosan and containing zinc oxide and limonene for preserving rainbow trout. In this study, nano-chitosan, nano-chitosan/zinc oxide, nano-chitosan/limonene and nano-chitosan/zinc oxide/limonene nanocomposites were prepared and their antibacterial activities against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* were investigated by microdilution method with the help of minimum inhibitory and/or bactericidal concentration tests (MICs and MBCs). Fish fillet samples were prepared and coated with the help of film for one week. Antibacterial activity against the mentioned bacteria and total volatile basic nitrogen (TVBN) and total viable count (TVC) were investigated. The highest antibacterial activity for both MIC and MBC tests was observed in nanochitosan/zinc oxide/limonene, nano-chitosan/limonene or nano-chitosan/zinc oxide and nano-chitosan treatments, respectively. The highest amount of TVC and TVBN as well as the count of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* were higher in nano-chitosan, nano-chitosan/zinc oxide, nano-chitosan/limonene and nano-chitosan/zinc oxide/limonene treatments, respectively ($P < 0.05$). These results show that nanocomposite films based on nano-chitosan and containing zinc oxide and limonene have antimicrobial activity and can be used to preserve rainbow salmon samples.

Keywords: *Chitosan, zinc oxide, limonene, rainbow trout, antibacterial*



بررسی اثر اسانس اژنول روی تک‌یاخته تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاهی و تجربی

عبدالله خاکی^۱، محمد رضا یوسفی^{۲*}، نادیا طائفی نصر آبادی^۱

۱- گروه انگل‌شناسی دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۲- گروه انگل‌شناسی دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۶ آبان ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۵ آذر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۵ دی ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.425486.1212

چکیده

در این مطالعه اثرات اسانس اژنول که ماده‌ی مؤثر گیاه میخک می‌باشد روی انگل تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاهی و تجربی مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مطالعه آزمایشگاهی از محیط کشت تغییر یافته دیاموند استفاده شد. نمونه انگل از چینه‌دان کبوتر آلوده به این انگل تهیه شد. پس از کشت انگل به دو گروه: گروه یک بدون تیمار یا گروه کنترل و گروه دو، گروه تیمار شده با اسانس اژنول تقسیم شد و برای انجام این مطالعه از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. محیط کشت حاوی انگل و اسانس اژنول به این پلیت‌ها اضافه شد و در نهایت غلظت ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس اژنول به دست آمد و در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با اژنول تعداد تک‌یاخته تریکوموناس گالینه زنده و مرده محاسبه شد. در مطالعات تجربی تعداد ۶۰ کبوتر به گروه‌های تیمار با اسانس اژنول ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم و گروه کنترل تقسیم شد و سپس هر روز تا ۵ روز روزی یک‌بار به صورت خوراکی تحت درمان قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد در مطالعات آزمایشگاهی اسانس اژنول در دوز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بعد از گذشت ۴۸ ساعت سبب مرگ کامل انگل تریکوموناس گالینه می‌شود. در مطالعات تجربی نشان می‌دهد ۵ روز پس از درمان با اسانس اژنول ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن هیچ انگل تریکوموناس گالینه زنده‌ای در این کبوتر مشاهده نمی‌شود. در نتیجه این مطالعات نشان می‌دهد که اسانس اژنول می‌تواند روی انگل تریکوموناس گالینه مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: اژنول، تریکوموناس، کبوتر

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: youssefi929@hotmail.com

مقدمه

تریکوموناس گالینه، انگل تاژکدار متعلق به خانواده تریکومونادیده است و بیماری تریکومونیاژیس در پرندگان را ایجاد می‌کند. این انگل جراحی را در قسمت ابتدایی دستگاه گوارش و گاهی اوقات در قسمت دستگاه تنفسی ایجاد می‌کند (۵، ۲۹). شدت جراحیات بروز این بیماری می‌تواند به شکل تحت بالینی و یا گاهی اوقات شدت جراحیات به قدری شدید است که سبب مرگ پرنده به دلیل انسداد مری و گرسنگی می‌شود (۱۲). بیماری تریکومونیاژیس به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم کاهش جمعیت کبوتر است (۳۵، ۲۸). نیتروایمیدازول‌ها برای درمان بیماری تریکومونیاژیس به‌کار می‌رود. به دلیل تجویز بی‌رویه نیتروایمیدازول‌ها و استفاده از این داروها در پیشگیری از تریکومونیاژیس مقاومت دارویی در انگل شکل گرفته است (۲۳). در میان نیتروایمیدازول‌ها، مترونیدازول به‌طور گسترده بر علیه انگل تریکوموناس گالینه به‌کار می‌رود (۸، ۱۴، ۴). به هر حال به دلیل خطر سرطان‌زا بودن (۳۴) و همچنین مقاومت دارویی (۱۰) در مقابل مترونیدازول یافتن داروی جایگزین برای مقابله با این انگل مهم می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از اسانس و عصاره گیاهان به‌عنوان درمان جایگزین تریکومونیاژیس استفاده شده است (۳۸، ۳۲، ۳۱، ۱۶، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳).

گرچه تحقیقات زیادی روی خاصیت ضد تریکومونیاژیس عصاره و اسانس گیاهی انجام پذیرفته است با این حال به دلیل تنوع ترکیبات شیمیایی گیاه به‌علت منطقه جغرافیایی و زمان برداشت (۱۵)، خیلی از این ترکیبات گیاهی وارد بازار نشده‌اند برای حل این مشکل در این مطالعه ترکیبات فعال گیاه همانند گیاه میخک که ترکیب اسانس اژنول ترکیب اصلی این گیاه است، برای بررسی خواص ضد تریکوموناسی استفاده شده است.

اسانس اژنول مایع بدون بو و زردرنگ متعلق به ترکیبات فنوله بوده و ترکیب اصلی گیاه میخک می‌باشد

(۲۶). مطالعات مختلف خاصیت ضد جرب، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد نماتودی و ضد حشرات این ترکیب را نشان می‌دهد (۳، ۹، ۱۳). خاصیت ضد تک‌یاخته‌ای این ترکیب روی شپستوزوما (۷)، لشمانیا (۲۷)، ژیاودی (۴۳) و تریبونوما (۴۱) گزارش شده است.

مطالعه حاضر جزو اولین مطالعاتی است که اثر اژنول روی انگل تریکوموناس گالینه را در شرایط آزمایشگاهی و تجربی مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

اسانس اژنول: ترکیب اژنول برای انجام این مطالعه از شرکت سیگما و با غلظت ۹۹٪ مربوط به کشور آلمان تهیه شد.

محیط کشت دیاموند: برای انجام این مطالعه از محیط کشت تغییر یافته دیاموند استفاده شد که اجزای تشکیل‌دهنده این محیط کشت به شرح زیر می‌باشد: ابتدا ۸۸۰ سی‌سی آب مقطر درون یک بشر ریخته شده و مقادیر ذکر شده تریپتون، عصاره مخمر، گلوکز، سدیم کلراید، ال-سیستین، سدیم تیوگلاپیکولات، آگار توسط ترازو طبق پروتکل محیط کشت توزین شده و در داخل آب مقطر ریخته می‌شود و در مرحله بعد با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت نیم ساعت این ترکیبات با هم مخلوط می‌شوند. پس از مخلوط شدن در حالت طبیعی pH این محلول در حدود ۵/۶-۵/۳ می‌باشد که با افزودن سود سوزآور pH این محلول را به محدوده ۶/۹-۷/۱ می‌رسانیم. پس از تنظیم pH ادامه مراحل زیر هود استریل و در کنار شعله صورت می‌گیرد و در این مرحله پنی‌سیلین جی، جنتامایسین و آمفوتریسین بی هم به محیط کشت اضافه شده و در نهایت سرم غیر فعال شده و استریل اسب اضافه شد و در پایان برای استریل کردن محیط کشت ساخته شده را از فیلتر سرسرنگی به قطر ۰/۲۲ میکرومتر عبور دادیم و در فالكون‌های استریل به میزان ۱۰ سی‌سی بسته‌بندی شد و محیط کشت‌ها باید به دور از نور و در دمای یخچال نگهداری شدند.

بررسی اثر اسانس اژنول روی تک‌یاخته تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاهی

انگل تریکوموناس گالینه: انگل تریکوموناس گالینه

از کبوتران آلوده و با استفاده از تکنیک اسمیر مرطوب و پس از بررسی اسمیر مرطوب چینه‌دان کبوتر آلوده زیر میکروسکوپ نوری و تأیید انگل تریکوموناس گالینه تهیه شد. نمونه‌های انگل تریکوموناس از چینه‌دان کبوتر آلوده با استفاده از گاوآژ چینه‌دان به دست آمد و سپس به محیط کشت انگل که محیط کشت دیاموند اصلاح شده است انتقال می‌یابد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۳۰) و هر ۴۸ ساعت و پس از رشد لگاریتمی انگل که به تعداد ۱۰۰۰۰ انگل در هر میلی‌لیتر محیط کشت رسید دوباره به محیط کشت جدید انتقال یافت (۳۳).

مطالعات آزمایشگاهی: برای انجام مطالعه از پلیت

۹۶ خانه استریل برای انکوباسیون تروفوزوایت انگل تریکوموناس گالینه با اسانس اژنول استفاده شد. زمانی که محیط کشت حاوی انگل تعداد تروفوزوایت انگل تریکوموناس گالینه به 1×10^4 رسید به چاهک‌ها اضافه شد. برای انجام رقت‌سازی در این مطالعه ابتدا به میزان ۱۸۰ لاندا از محیط کشت حاوی انگل به چاهک شماره ۱ اضافه شد و به چاهک شماره ۲ تا ۴، ۱۰۰ لاندا محیط کشت حاوی انگل اضافه شد و سپس به میزان ۲۰ لاندا از محلول اسانس اژنول به چاهک اول اضافه شد و بعد از مخلوط شدن ۱۰۰ لاندا از چاهک ۱ به چاهک شماره ۲ اضافه شد و ۱۰۰ لاندا از چاهک شماره ۲ به چاهک شماره ۳ اضافه شد و کار تا چاهک شماره ۴ ادامه پیدا کرد و در انتها ۱۰۰ لاندا از چاهک شماره ۴ دور ریخته شد و این مراحل ۳ بار تکرار شد. به این ترتیب غلظت اسانس اژنول در چاهک‌های ۱ تا ۴ به صورت ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید و سپس در زمان‌های ۶ ساعت، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تعداد انگل مرده، زنده به روش لام نونبار شمارش شد برای اندازه‌گیری درصد مرگ و میر انگل میزان ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت انگل روی لام نونبار ریخته شده و با ۲۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو مخلوط شد و سپس ظرف مدت

دو دقیقه زیر میکروسکوپ تعداد انگل‌های مرده که رنگ گرفته‌اند شمارش شد و در نهایت درصد مرگ و میر و زنده‌مانی انگل اندازه‌گیری شد. یکی از چاهک‌ها هم برای گروه کنترل در نظر گرفته شد و در این چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی انگل اضافه شد و درمان روی آن صورت نپذیرفت در نهایت حداقل غلظتی که سبب مرگ و میر کامل انگل تریکوموناس گالینه شد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس اژنول در نظر گرفته شد.

مطالعات برون‌تنی: در روش تجربی با رعایت شرایط

رفاه حال پرنده، تعداد ۶۰ کبوتر عاری از آلودگی با تریکوموناس گالینه انتخاب شد و سپس با محیط کشت که در هر میلی‌لیتر حاوی 4×10^4 تروفوزوایت انگل بود از طریق خوراکی آلوده شدند. یک هفته پس از آلودگی تجربی ۳۰ کبوتر در ۳ گروه تحت بررسی اسمیر مرطوب قرار گرفتند و پس از تأیید آلودگی با انگل تریکوموناس گالینه، کبوتران تحت درمان با اسانس اژنول با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزی یک‌بار و تا ۵ روز به‌صورت خوراکی و تک‌تک کبوتران تحت درمان قرار گرفتند و در گروه شاهد هم ۳۰ کبوتر در ۳ گروه بدون درمان مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان زنده‌مانی و میزان مرگ و میر انگل هر روز پس از درمان با استفاده از روش آزمایشگاهی و با استفاده از لام نونبار و تریپان بلو محاسبه شد.

در این مطالعه در ساعت‌های مختلف ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۴ ساعت، ۶ ساعت، ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت از کبوترهای تحت درمان با رعایت شرایط رفاه حال حیوانات و با سرنگ انسولین و از رگ بال یک سی‌سی خون گرفته شد و پس از جداسازی پلاسما در دمای 20°C فریز شد و سپس در آزمایشگاه میزان اسانس اژنول در خون با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. در نهایت همه پرندگان با رعایت رفاه حال حیوانات به‌طور کامل درمان و به محیط پرورش بازگردانده شدند.

در روش HPLC نمونه اسانس اژنول به نسبت ۱:۱۰ با

تریکوموناس گالینه اسانس اژنول در جدول شماره یک نمایش داده شده است. نتایج ما کارایی بالای اسانس اژنول در مقابل انگل تریکوموناس گالینه را نشان می‌دهد. در گروه تیمار شده با اسانس اژنول ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴۸ ساعت پس از درمان، هیچ انگل تریکوموناس گالینه زنده‌ای مشاهده نشد. حداقل غلظت کشندگی (MIC) در ۴۸ ساعت برای اسانس اژنول دوز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد درصد ممانعت از رشد انگل تریکوموناس گالینه در تیمار اسانس اژنول در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارند و با گذشت زمان و افزایش دوز اسانس اژنول خاصیت کشندگی انگل افزایش می‌یابد.

متانول حل شد. در این روش متانول به‌عنوان فاز متحرک برای آنالیز HPLC در نظر گرفته شد. و در این روش چون متانول به‌عنوان فاز متحرک غلظت ثابتی داشته است و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه به چاهک‌های دستگاه گروماتوگراف در شرایط دمایی اتاق تزریق شد. میزان اسانس اژنول در زمان‌های مختلف در پلاسما اندازه‌گیری شد.

روش های آماری: آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۶ استفاده شد و از برنامه آنالیز واریانس (ANOVA) برای اندازه‌گیری تفاوت‌های گروه‌های مختلف استفاده شد. زمانی تفاوت معنی‌دار است که $P \leq 0.05$ باشد.

نتایج

شرایط آزمایشگاهی: نتایج خاصیت ضد

جدول ۱- درصد مرگ و میر انگل تریکوموناس گالینه در گروه تیمار شده با اسانس اژنول در زمان‌های مختلف

درصد مرگ و میر انگل تریکوموناس گالینه				
زمان (ساعت)	گروه کنترل	گروه های اژنول (میکروگرم بر میلی لیتر)		
		۱.۲۵	۲.۵	۵
۶	. ^۱	۲۰±۳ ^k	۴۱/۶±۳ ^h	۵۱±۴ ^f
۱۲	. ^۱	۳۱/۵±۲/۴ ^j	۴۷/۶±۵/۸ ^g	۷۰/۳±۱/۲ ^d
۲۴	. ^۱	۳۵/۸±۲/۳ ^j	۵۳±۳ ^f	۷۱/۶±۱/۲ ^d
۴۸	. ^۱	۳۶±۱/۳ ^j	۵۶/۶±۴/۶ ^e	۷۹±۱/۵ ^c
				۱۰۰ ^a

در روز دوم، سوم و چهارم پس از درمان کبوتران آلوده با اسانس اژنول کاهش معنی‌داری را در تعداد ترفوزایت انگل تریکوموناس گالینه در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$). در روز پنجم پس از درمان هیچ‌گونه ترفوزایت زنده انگل تریکوموناس گالینه در چینه‌دان کبوترهای آلوده که با اسانس اژنول درمان شدند، مشاهده نشد.

در طی انجام مطالعه در گروه‌های مختلف مورد مطالعه تلفاتی در بین کبوتران آلوده مشاهده نشد و هیچ‌گونه عارضه جانبی برای گروه کبوترانی که با اسانس اژنول تحت درمان قرار گرفته بودند مشاهده نشد. پس از

شرایط تجربی: مطالعات تجربی کارایی اسانس اژنول در دوز ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم را در کبوتران آلوده نشان می‌دهد (جدول شماره ۲). قبل شروع درمان (روز صفر) تعداد ترفوزایت انگل تریکوموناس گالینه که از چینه‌دان کبوترها به دست آمده بود تفاوت معنی‌داری را بین گروه شاهد و تیمار شده با اسانس اژنول نشان نداد.

در روز اول پس از درمان با اسانس اژنول با دوز ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن پرنده سبب کاهش معنی‌دار ترفوزوایت انگل تریکوموناس گالینه در مقایسه با گروه کنترل که هیچ‌گونه درمانی صورت نگرفت، شد ($P < 0.05$).

درمان کبوترهای آلوده با تک‌یاخته تریکوموناس گالینه با اسانس اژنول علائم بالینی درگیری با این انگل در این

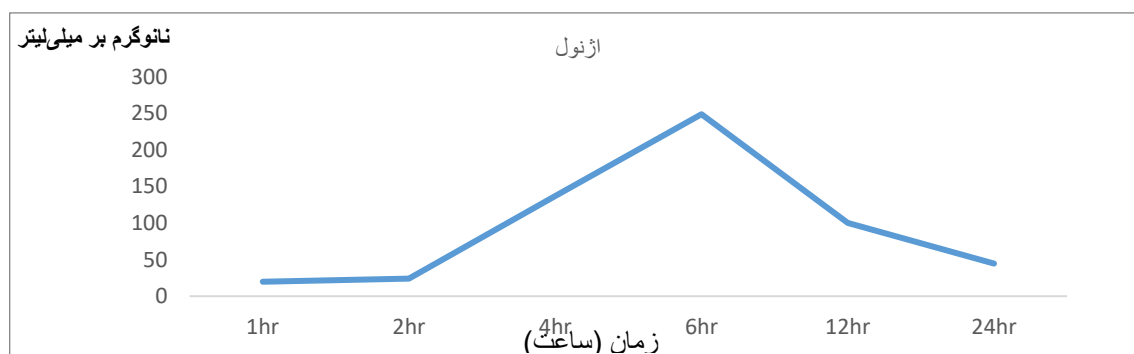
پرندگان به‌طور کامل بهبود یافته بود.

جدول ۲- تعداد ترفوزایت انگل تریکوموناس گالینه در گروه‌های کبوترهای تحت درمان با اسانس اژنول در زمان‌های مختلف

تعداد ترفوزایت $\times 10^4$		
زمان (روز)	گروه کنترل	گروه اژنول (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
۰	۱۱۰/۸۳±۲/۲	۱۱۲/۶۶±۴/۶ ^a
۱	۱۱۸/۳±۴/۶ ^a	۲۲±۱/۵ ^c
۲	۱۱۵±۱/۳ ^a	۱۳/۳۳±۰/۵ ^c
۳	۱۰۹/۱۶±۵ ^a	۲/۳±۰/۳ ^c
۴	۱۱۱/۶۶±۱,۶ ^a	,b
۵	۱۱۵ ^a	,b

علاوه بر این نتایج HPLC نشان می‌دهد مقدار اسانس اژنول در سرم خون پرنده، دو ساعت پس از شروع درمان شروع به افزایش می‌نماید و ۶ ساعت پس از شروع درمان

به بیشترین میزان خود می‌رسد و ۲۴ ساعت پس از شروع درمان میزان اسانس اژنول به کمترین میزان خود در سرم خون پرنده می‌رسد (شکل ۱).



شکل ۱- مقدار اسانس اژنول در سرم خون پرنده در ساعات ۱، ۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از درمان

بحث و نتیجه‌گیری

تریکومونیازیس یکی از بیماری‌های مهم در بسیاری از گونه‌های پرندگان می‌باشد. داروی نیتروایمیدازول همانند مترونیدازول، رونیدازول، کارنیدازول و دیمیتريدازول به‌عنوان داروهایی مهم برای مقابله با ترفوزایت انگل تریکوموناس گالینه محسوب می‌شوند (۱۰). درمان‌های پیشگیرانه با نیتروایمیدازول‌ها برای درمان تریکوموناس گالینه سبب ایجاد جدایه‌های تریکوموناس گالینه مقاوم به نیتروایمیدازول شده است و جدایه‌های انگل تریکوموناس گالینه مقاوم به نیتروایمیدازول در قسمت‌های مختلف جهان گزارش شده است (۱۲، ۲۹، ۳۸). گیاهان از هزاران

سال پیش نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی انسان‌ها داشته‌اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (۳۳). امروزه فراورده‌های گیاهی به‌دلیل دسترسی آسان، راحتی کاربرد و اثرات جانبی کمتر در مقایسه با فراورده‌های شیمیایی برای درمان اکثر بیماری‌های انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۲). به همین علت از عصاره، اسانس گیاه و ترکیبات گیاه برای مقابله با انگل تریکوموناس گالینه استفاده می‌شود. مطالعات Adebajo و همکاران در سال ۲۰۰۹، خاصیت ضد انگل تریکوموناس

گالینه عصاره گیاه *Clausena lansium* را مشاهده نمودند اما عصاره این گیاه در مقایسه با مترونیدازول نمی‌تواند به‌طور کامل انگل *تریکوموناس گالینه* را از بین ببرد (۲). علاوه بر این، این محقق نشان داد آکالوئیدهای کاربازول مشتق شده از گیاه *Murrayakoenigii* و نیشکر خاصیت ضد *تریکوموناسی* دارند ولی در مقایسه با مترونیدازول کارایی پایین‌تری دارا می‌باشند (۱) و همچنین مطالعات *seddik* و همکاران هم نشان می‌دهد گیاه سیر هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط تجربی برای مقابله با انگل *تریکوموناس* قابل مقایسه با داروی مترونیدازول می‌باشد و سبب کاهش رشد ترفوزوایت انگل *تریکوموناس گالینه* می‌شود (۳۳). مطالعات این محققان نشان می‌دهد استفاده از سیر به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به مدت چهار روز متوالی می‌تواند سبب درمان کبوتر آلوده به *تریکوموناس گالینه* گردد.

علی‌رغم مطالعات زیادی که روی عصاره و اسانس گیاهی به‌عنوان خاصیت ضد *تریکوموناسی* انجام شده است با این حال محصولات گیاهی که دارای خاصیت ضد انگل *تریکوموناس* می‌باشند، نفوذ ناچیزی در بازار دارند که می‌تواند به‌علت تغییر در ترکیبات شیمیایی این محصولات، به‌علت زمانی است که گیاه برداشت می‌شود و یا منطقه جغرافیایی است که گیاه برداشت می‌شود و همین امر سبب تغییر در ترکیبات شیمیایی عصاره و یا اسانس گیاه می‌شود (۱۵). برای حل این مشکل، جداسازی ترکیبات زیستی فعال گیاه برای دستیابی به ترکیب ضد *تریکوموناسی* جدید استفاده می‌شود و رویکرد مناسبی برای مقابله با انگل *تریکوموناس گالینه* می‌باشد. در همین زمینه، در مطالعه اخیر به بررسی خواص ضد *تریکوموناس گالینه* اسانس اژنول پرداخته شده است. در مطالعه حاضر مشخص شد اسانس اژنول روی انگل *تریکوموناس* موثر است و با گذشت زمان خاصیت ضد *تریکوموناسی* این ترکیبات افزایش می‌یابد. در این مطالعه اثرات اسانس اژنول در غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی انگل *تریکوموناس گالینه*

تجویز شد و با گروه کنترل که درمانی روی آن صورت نپذیرفت، مقایسه شد. دوزهای پایین اسانس اژنول با گذشت زمان اثرات کشندگی مناسبی روی انگل *تریکوموناس گالینه* ندارد. با این حال غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس اژنول بعد از گذشت ۴۸ ساعت سبب مرگ کامل ترفوزوایت انگل *تریکوموناس گالینه* شد. اسانس اژنول اثرات مؤثری روی این انگل دارد و می‌تواند به‌عنوان روش جایگزین برای سویه‌های مقاوم به مترونیدازول استفاده شود.

مکانیسم ضد انگلی، ضد تک‌یاخته‌ای، ضد کنه، ضد جرب و حشره‌کشی این ترکیب به این دلیل می‌باشد که این ترکیب جزو ترکیبات فنوله و معطر طبیعی می‌باشد و با اتصال به آنزیم NADH دهیدروژناز، فعالیت اکسیداسیون و فسفریلاسیون کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندری را مختل می‌نماید و در نتیجه سبب مرگ انگل می‌شود (۴۰). علاوه بر این، این اسانس دارای خواص شیمی درمانی مناسب برای مقابله با سرطان، ضد التهاب، ضد فیبروتیک، آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی می‌باشد (۲۷، ۲۵، ۳۹، ۶).

در همین راستا مطالعات یوسفی و همکاران نشان داد اسانس درمنه دشتی سبب بهبودی کبوتران آلوده با انگل *تریکوموناس گالینه* می‌شود علاوه بر این نتایج این مطالعه نشان داد اسانس درمنه دشتی در مقایسه با مترونیدازول کارایی بالاتری برای مقابله با این انگل دارا می‌باشد. اسانس اژنول یکی از مهم‌ترین و بالاترین ترکیبات اسانس گیاه درمنه دشتی می‌باشد و احتمالاً خاصیت ضد *تریکوموناسی* اسانس درمنه دشتی را به این ترکیب نسبت می‌دهند (۳۸) و نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر شباهت دارد. مطالعات دیگری هم فعالیت ضد *تریکوموناس گالینه*، اسانس گیاه *Dennettia tripetala* را نشان می‌دهد و مطالعات این محققان نشان می‌دهد اسانس اژنول یکی از مهم‌ترین ترکیبات اصلی این گیاه می‌باشد که همانند مطالعه حاضر خواص ضد *تریکوموناس* این گیاه را به این ترکیب نسبت می‌دهند (۱۱) علاوه بر این مطالعات تبری

و همکاران در سال ۲۰۱۷ خواص ضد تریکوموناس گالینه، آلکالوئید گیاه اسپند را منتشر نمودند، این محققان به این نتیجه رسیدند که ترکیبات هارمین و هارمالین دو ترکیب آلکالوئیدی اصلی در گیاه اسپند می‌باشند که دارای خواص ضد تریکوموناسی همانند اسانس اژنول می‌باشد و به‌عنوان ترکیب طبیعی برای مقابله با تریکوموناس

استفاده می‌شود (۳۶).

پیشنهادات

پیشنهاد می‌شود مطالعات سم‌شناسی و همچنین بررسی پاتولوژیک بافت کبد و کلیه پرندگان مورد آزمایش با اسانس اژنول، جهت بررسی اثرات نامطلوب و عوارض جانبی احتمالی این ترکیب صورت پذیرد.

References

- 1- Adebajo AC, Ayoola OF, Iwalewa EO, Akindahunsi AA, Omisore NO, Adewunmi CO, et al. Anti-trichomonal, biochemical and toxicological activities of methanolic extract and some carbazole alkaloids isolated from the leaves of *Murraya koenigii* growing in Nigeria. *Phytomedicine*. 2006; 13: 246-254.
- 2- Adebajo AC, Iwalewa EO, Obuotor EM, Ibikunle GF, Omisore NO, Adewunmi CO, et al. Pharmacological properties of the extract and some isolated compounds of *Clausena lansium* stem bark: anti-trichomonal, antidiabetic, anti-inflammatory, hepato-protective and antioxidant effects. *Ethnopharmacol*. 2009; 122: 10-19.
- 3- Asha MK, Prashanth D, Murali B, Padmaja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia*. 2001; 72: 669-670.
- 4- Aydın L, Coşkun Ş. Efficacy of carnidazole (Spatrix®) and metronidazole (Flagyl®) against *Trichomonas gallinae* in naturally infected pigeons. *Acta Parasitol Turcica*. 2000; 24(1): 65-66.
- 5- Boal CW, Mannan RW, Hudelson KS. Trichomoniasis in Cooper's hawks from Arizona. *J. Wildlife Dis*. 1998; 34: 590-593.
- 6- Batiha GE, Alkazmi LM, Wasef G, Beshbishy AM, Nadwa EH, Rashwan EK. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules*. 2020; 10: 202.
- 7- El-kady AM, Ahmad AA, Hassan TM. Eugenol, a potential schistosomicidal agent with anti-inflammatory and antifibrotic effects against *Schistosoma mansoni*, induced liver pathology. *Infect Drug Resist*. 2019; 12: 709-719.
- 8- El-Sayed EMA. Some studies on trichomoniasis in pigeons in Sharkia province. M.V.Sc. Thesis, Zagazig Univ, Dept. of Avian and Rabbit Diseases, *Egypt*. 2005.
- 9- El-Zemity SR, Rezk HA, Farok S, Zaitoon AA. Acaricidal activity of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Trends in acarology*. 2010; 541-543.
- 10- Franssen FFJ, Lumeij JT. In vitro nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *J Vet Pharmacol Ther*. 1992; 15(4): 409-415.
- 11- Gbolade AA, Arcoraci T, D'Arrigo M, Olorunmola FO, Biondi DM, Ruberto G. Essential oils of *Dennettia tripetala* Bak. f. stem bark and leaf. Constituents and biological activities. *Planta Medica*. 2009; 75: .PI32.
- 12- Gerhold RW, Yabsley MJ, Smith AJ, Ostergaard E, Mannan W, Cann JD, et al. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae* morphologic complex in the United States. *J. Parasitol*. 2008; 94: 1335-1341.
- 13- He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of Eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 163, 137-143.. Protozoan and helminthes parasites endorsed by imported camels (*Camel dromedaries*) to Egypt. *J. Parasit. Dis*. 2007; 43.
- 14- Helmy NA. Biological studies on trichomoniasis in birds. M.V.Sc.Thesis, (Parasitology Dept.) Fac. of Vet Med Zagazig Univ. *Egypt*. 1995.
- 15- Khalid KA, Essa EF, Ismaiel HM, Elsayed AA. Effects of geographical locations on essential oil composition of navel orange leaves and flowers. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2020; 23: 139-148.
- 16- Khater HF. Ecosmart biorational insecticides: alternative insect control strategies. In:

- Perveen F (ed) Advances in integrated pest management. *InTech Croatia*. 2011; 17–60.
- 17- Khater HF.** Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. *Pharmacologia*. 2012; 3(12): 641–656.
- 18- Khater HF.** Bioactivity of essential oils as green biopesticides: recent global scenario. In: Govil JN, Bhattacharya S (eds) Recent progress in medicinal plants, vol. 37. Essentials oils II. Studium Press LLC, USA. 2013.
- 19- Khater HF, Ramadan MY, El-Madawy RS.** Lousicidal, ovicidal, and repellent efficacy of some essential oils against lice and flies infesting water buffaloes in Egypt. *Vet Parasitol*. 2009; 164: 257–266.
- 20- Khater HF, Hanafy A, Abdel-Mageed AD, Ramadan MY, El-Madawy RS .** Control of the myiasis producing fly, *Lucilia sericata*, with Egyptian essential oils. *Int J Dermatol*. 2011; 50(2): 187–194.
- 21- Khater HF, Ramadan MY, Abdel Mageid AD.** In vitro control of the camel nasal botfly, *Cephalopina titillator*, with doramectin, lavender, camphor, and onion oils. *Parasitol Res*. 2013; 112: 2503–2510.
- 22- Khater HF, Seddiek SA, El-Shorbagy MM, Ali MM.** The acaricidal efficacy of peracetic acid and deltamethrin against the fowl tick, *Argas persicus*, infesting laying hens. *Parasitol Res*. 2013; 112(1): 259–269.
- 23- Lumeij JT, Zwijnenberg RJ.** Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). *Avian. Pathol* . 1990; 19: 165-166.
- 24- Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Custodio JBA, Cavaleiro C, Sousa MC.** Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Expt Parasitol*. 2011; 127: 732-739.
- 25- Mahapatra SK, Roy S.** Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and ocimum gratissimum linn. *Asian Pacific Journal of Trpical Medicine*. 2014; 7(1): 391-397.
- 26- Nejad SM, Özgüneş H, Başaran N.** Pharma-cological and toxicological properties of Eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*. 14, 201.
- 27- Raja MRC, Srinivasan V, Selvaraj S, Mahapatra SK.** Versatile and synergistic potential of eugenol: A review. *Pharm. Anal. Acta*. 2017; 6:1–6.
- 28- Robinson RA, Lawson B, Toms MP, Peck KM, Kirkwood JK, Chantrey J, et al.** Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. *PLoS One*. 2010; 5: 12215.
- 29- Rouffaer LO, Adriaensen C, De Boeck, C, Claerebout E, Martel A.** Racing pigeons: a reservoir for nitro-imidazole-resistant *Trichomonas gallinae*. *Parasitol*. 2014; 100: 360-363.
- 30- Sansano-Maestre J, Garijo-Toledo MM, Gómez-Muñoz MT.** Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. *Avian Pathol*. 2009; 38: 201-207.
- 31- Seddiek SA, Ali MM, Khater HF, El-Shorbagy MM.** Anthelmintic activity of the white wormwood, *Artemisia herba-alba* against *Heterakis gallinarum* infecting turkey poults. *J Med Plants Res*. 2011; 5(16): 3946–3957.
- 32- Seddiek SA, Khater HF, El-Shorbagy MM, Ali MMA.** The acaricidal efficacy of aqueous neem extract and ivermectin against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* in experimentally infested rabbits. *Parasitol Res*. 2013; 112: 2319–2330.
- 33- Seddiek A, El-Shorbagy MM, Khater HF, Ali AM.** The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitol Res*. 2014; 113: 1319-29.
- 34- Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P.** Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis: an emerging problem. *N Engl J Med*. 1999; 341: 292–295.
- 35- Stockdale JE, Dunn JC, Goodman SJ, Morris AJ, Sheehan DK, Grice PV, et al.** The protozoan parasite *Trichomonas gallinae* causes adult and nestling mortality in a declining population of European Turtle Doves. *Streptopelia turtur*. *Parasitology*. 2015; 142: 490-498.
- 36- Tabari MA, Youssefi MR, Esfandiari A, Benelli G.** Toxicity of β -citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Res Vet Sci*. 2017; 114: 36-40. [In Persian]
- 37- Tabari MA, Youssefi MR, Moghadamnia AA.** Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in pigeon (*Columba livia domestica*). *British Poultry Science*. 2017; 58: 236-241.

38- Youssefi MR, Tabari MA, Moghadamia AA. In vitro and in vivo activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2017; 18: 25-29. [In Persian]

39- Xie Y, Yang Z, Cao D, Rong F, Ding H, Zhang D. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). *Ind Crops Prod*. 2015; 77: 780–786.

40- Shang Xf, Dai LX, Yang CJ, Guo X, liu YQ, Miao XL, Zhang JY. A value-added application of eugenol as acaricidal agent: The mechanism of action and the safety evaluation. *Journal of Advanced Research*. 2021; 34: 149-158.

41- Azeredo CM, Soares MJ. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23(5): 762-768.

42- Fazeli-Nasab B, Rahnama M, Mazarei A. Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2017; 27(149): 63-78. [In Persian]

43- de Almeida I, Alviano DS, Vieira DP, Alves PB, Blank AF, Lopes AH, et al. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol. Res*. 2007; 101: 443–452.



In vitro and in vivo activity of Eugenol against *Trichomonas gallinae*

Abdollah Khaki¹, Mohammadreza Youssefi^{2*}, Nadia Taiefi Nasrabadi¹

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

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

Receive: November 17, 2023; Revise: December 16, 2023; Accept: December 26, 2023

 10.22034/nfvm.2024.425486.1212

Summary

This study sought to explore the in vitro and in vivo efficacy of eugenol, the principal compound in the clove plant, against *Trichomonas gallinae* (*T. gallinae*). In the in vitro investigation, Diamond's modified culture medium was employed. The parasite sample was derived from an infected pigeon, cultured, and then maintained in an incubator at 37 °C for 48 hours until the protozoa count reached approximately 1×10^4 parasites per ml of culture medium. Subsequently, two groups were assigned: Group one received no treatment, while group two was treated with eugenol. Ninety-six plates were utilized, and the culture medium containing the parasite and eugenol was added to these plates. Doses of 10, 5, 2.5, and 1.25 µg/ml of eugenol were administered. The number of dead and alive parasites, along with the percentage of parasite mortality, was measured at intervals of 6, 12, 24, and 48 hours post-mixing. For the in vivo experiment, 60 pigeons were experimentally infected with *T. gallinae* and divided into two groups. Group one served as the control, receiving no treatment, while group two was treated with eugenol at a dose of 10 mg/kg for five consecutive days. Results from the in vitro study demonstrated that a concentration of 10 µg/ml of eugenol resulted in 100% lethality in *T. gallinae* after 48 hours. The in vivo study indicated that eugenol at a dose of 10 mg/kg led to 100% recovery five days post-treatment. These findings underscore the effectiveness of eugenol against the *T. gallinae* parasite, suggesting its potential as an alternative treatment.

Keywords: *Trichomonas*, *Eugenol*, *Pigeon*



دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۸۶-۹۶

بررسی شبکه هم‌بیانی *eptA* ژن مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین (*Colistin*) در باکتری *Escherichia coli*

یعثوب شیری*^۱، سمیرا سعادت‌جو^۲، زینب محکمی^۳

۱- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، کلینسین دامپزشکی در زابل، زابل، ایران.

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

دریافت مقاله: ۱۵ آبان ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۴ آذر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۵ آذر ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.424139.1210

چکیده

کولیستین (پلی‌میکسین E) یک آنتی‌بیوتیک پلی‌میکسین (polymyxin) است. پلی‌میکسین به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان آخرین راه‌حل آنتی‌بیوتیک برای درمان باکتری‌های گرم‌منفی مقاوم به دارو استفاده می‌شود. کولیستین غشای خارجی باکتری را نفوذپذیر می‌کند و یکپارچگی غشای داخلی را مختل می‌کند و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شود. لیپید A لیپوپلی‌ساکارید یک جزء اصلی از لایه بیرونی غشای خارجی اکثر باکتری‌های گرم‌منفی می‌باشد که برخی از باکتری‌ها با ایجاد تغییرات در ساختار آن سبب القای مقاومت به کولیستین می‌شوند. لیپید A فسفاتانولامین ترانسفراز (*EptA*) آنزیمی است که مسئول اصلاح لیپید A در باکتری *E. Coli* می‌باشد. به‌منظور بررسی فرایند ژن‌های درگیر در مقاومت به کولیستین شبکه هم‌بیانی متشکل از ۲۹ ژن بازسازی شد. آنالیز ژن آن‌تولوژی نشان داد مسیرهای سنتز لیپیدهای درگیر در ساختار غشای باکتریایی از قبیل بیوسنتز لیپوساکاریدها، بیوسنتز گلیکولیپیدها و بیوسنتز فسفولیپیدها بالاترین تعداد نماینده را در بین ژن‌های موجود در شبکه دارند. آنالیز توپولوژی شبکه نشان داد ژن *pagP* با ۲۷ ارتباط مستقیم با سایر ژن‌های موجود در شبکه بالاترین تعداد ارتباط را دارا بود. در ادامه ژن‌های *eptB*، *arnT*، *basS* و *phoP* هر کدام با ۲۶ ارتباط در ردیف بعدی قرار داشتند. همچنین ژن‌های *pagP* به‌ترتیب با مقادیر (0.03527178) و (1) بالاترین میزان Betweenness Centrality و Closeness Centrality را نشان داد. همچنین ژن *eptB* از منظر مولفه‌ی Betweenness Centrality و Closeness Centrality با مقادیر (0.96428571) و (0.03332764) دومین ژن کلیدی در این شبکه می‌باشد. دسته‌بندی ژن‌های موجود در شبکه نشان داد از دوازده گروه متمایز شده، ژن *eptB* در ۸ دسته و ژن *pagP* تنها در دو دسته مشاهده می‌شود. این نشان می‌دهد که ژن *eptB* در کنار ژن *eptA* نقش کلیدی در القای مقاومت کولیستین دارد.

واژگان کلیدی: لیپوپلی‌ساکارید، آنتی‌بیوتیک، پلی‌میکسین، شبکه ژنی

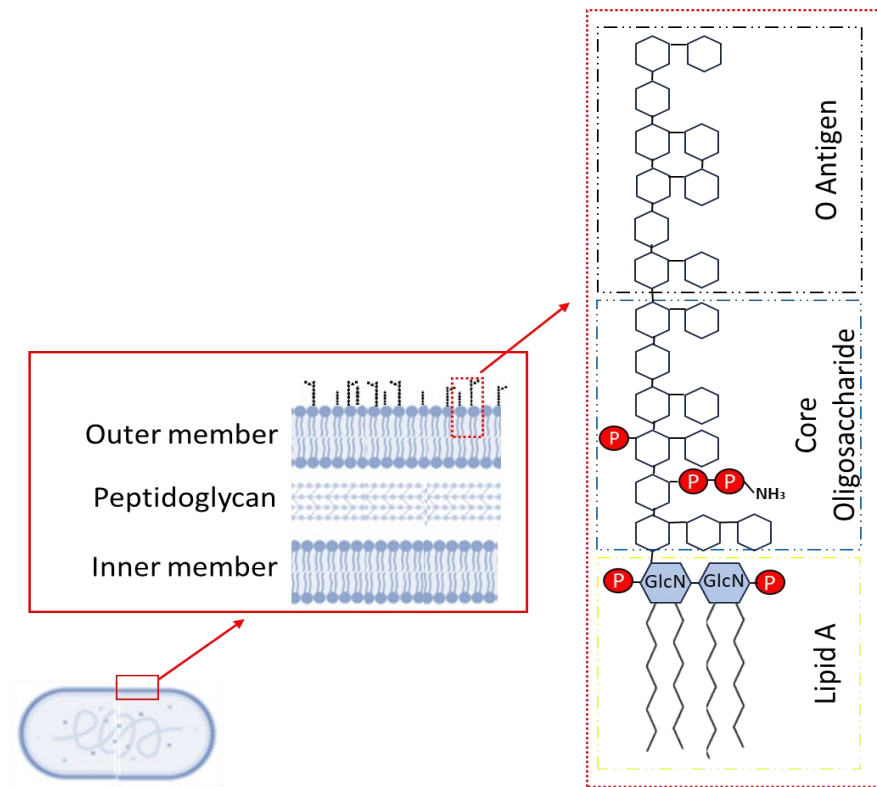
مقدمه

کولیستین (پلی میکسین E) یک آنتی بیوتیک پلی میکسین (polymyxin) است که توسط باکتری خاک *Bacillus polymyxa* تولید می شود (۱). این دارو برای درمان عفونت های حاد و مزمن ناشی از سویه های حساس باکتری های گرم منفی از جمله بیشتر گونه های خانواده انتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*) تأیید شده است (۲). لیپید A لیپوپولی ساکاریدها (lipopolysaccharides - LPS) یک جزء اصلی از لایه بیرونی غشای خارجی اکثر باکتری های گرم منفی را تشکیل می دهد که به عنوان یک سد محافظ در برابر آنتی بیوتیک ها و استرس های محیطی عمل می کند (۳). LPS از سه جزء تشکیل شده است که شامل یک بخش لیپید A، یک هسته الیگوساکارید و یک گروه آنتی ژن O می باشد (شکل ۱). کولیستین با لیپید A روی غشای خارجی باکتری های گرم منفی برهمکنش می کند و پل های کلسیم و منیزیم را که LPS را تثبیت می کنند جابجا می کند. متعاقباً، کولیستین غشای خارجی باکتری را نفوذپذیر می کند و یکپارچگی غشای داخلی را مختل می کند و در نهایت باعث مرگ سلولی می شود (۴). برخی از پاتوژن های گرم منفی، آنزیم هایی ایجاد کرده اند که برای اصلاح ساختار غشایی و ویژگی های بیوشیمیایی خود عمل می کنند و در نتیجه از عمل آنتی بیوتیک های هدایت شده به غشاء جلوگیری می کنند. یک مثال اصلاح قسمت لیپید A در ساختار LPS/LOS است. ادغام ۴-آمینو-۴-دئوکسی-L-آرابینوز (L-Ara4N) و فسفاتانول آمین (pEtN) به بخش لیپیدی A باعث کاهش حساسیت باکتری های گرم منفی به پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی (CAMP) نظیر کولیستین می شود (۵). افزودن L-Ara4N و pEtN به گروه های فسفات لیپید A با بار منفی، برهمکنش الکترواستاتیکی آن را با

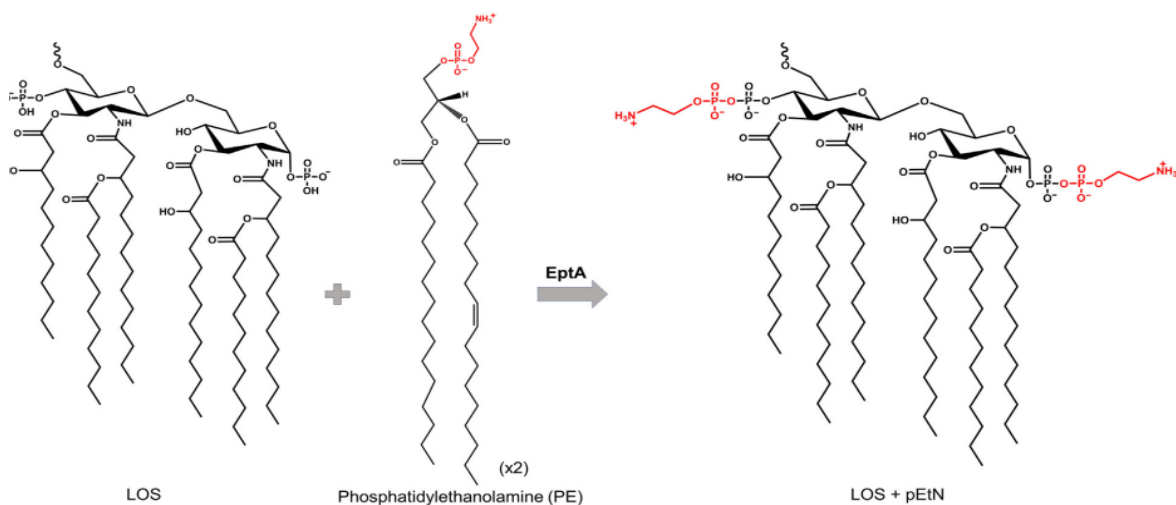
دیامینوبوتیریک اسید (Dab) پلی میکسین با بار مثبت را کاهش می دهد (۶). این برهمکنش کاهش یافته از اختلال غشاء جلوگیری می کند، بنابراین لیز باکتریایی رخ نمی دهد (۷، ۸).

از آنجایی که پلی میکسین به طور فزاینده ای به عنوان آخرین راه حل آنتی بیوتیک برای درمان باکتری های گرم منفی مقاوم به دارو استفاده می شود، این مکانیسم مقاومتی یک مشکل بهداشتی جهانی مهم ایجاد می کند (۹). در یک تحقیق اثر کولیستین را بر روی غشای خارجی نوع وحشی کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) با استفاده از میکروسکوپ کرایو الکترونی (cryo-EM) بررسی کردند. سلول ها پس از ۲ ساعت قرار گرفتن در معرض کولیستین، آسیب های غشایی قابل توجهی از جمله پارگی غشای خارجی، ناپیوستگی پپتیدوگلیکان و حباب های غشایی را نشان دادند (۱۰). به دلیل ماهیت غیر اختصاصی برهمکنش های پلی میکسین با غشاهای پلی میکسین ها مشتاقانه به غشای مرزی سلول های کلیه متصل می شوند که منجر به سمیت کلیوی نامطلوب آن می شود. بنابراین، تلاش هایی برای افزودن آنتی اکسیدان ها به مولکول های پپتید با هدف سرکوب آسیب غشایی ناشی از پلی میکسین انجام شده است (۱۱).

لیپید A فسفاتانول آمین ترانسفراز (*epta*) آنزیمی است که مسئول اصلاح لیپید A با pEtN است (شکل ۲). مطالعات نشان داده در فقدان فعالیت *epta*، حساسیت باکتری به کولیستین بیش از ۱۰۰ برابر افزایش یافته است. بی تردید فرایندهای درمانی طراحی شده برای مهار فعالیت *epta* می توانند برای افزایش کارایی آنتی بیوتیک کولیستین و حمایت از پاکسازی عفونت توسط سیستم ایمنی استفاده شوند (۱۲).



شکل ۱- ساختار مولکولی لیپوپلی ساکارید لایه بیرونی غشای خارجی اکثر باکتری‌های گرم‌مثبت



شکل ۲- افزودن pEIN به گروه‌های فسفات لیپید A به وسیله آنزیم لیپید A فسفات‌انولامین ترانسفراز (eptA) سبب مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک کولیستین می‌گردد.

کولیستین با خطر اجتناب ناپذیر ظهور سویه‌های مقاوم باکتری شده است. در برخی از کشورها به‌طور فعال از کولیستین در درمان بیماری‌های دام استفاده می‌گردد. همین امر موجب افزایش سرعت ظهور سویه‌های مقاوم شده است (۵).

امروزه، برای عفونت‌های جدی ناشی از انتروباکتریاسه تولیدکننده کارباپنماز (carbapenemase)، گزینه‌های درمانی محدود هستند و همیشه به کولیستین تکیه می‌کنند (۱۳). افزایش جهانی انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده کارباپنماز منجر به افزایش استفاده از

پارامترهای Text mining Co-Expression و Experiments میزان همبستگی بیانی ژن *eptA* با سایر ژن‌ها در پایگاه STRING-db مشخص شد (۱۵). جهت بازسازی شبکه هم‌بیانی و آنالیزهای توپولوژی شبکه بر اساس مؤلفه‌های Betweenness Centrality و Closeness Centrality به ترتیب از نرم‌افزار Cytoscape (۱۶) و پلاگین NetworkAnalyzer (۱۷) استفاده شد. مؤلفه Betweenness Centrality عبارت است از میزان مرکزیت یک node در یک شبکه پیچیده و بر اساس تعداد خطوط ارتباطی هر node محاسبه می‌گردد. در مقابل Closeness Centrality عبارت است از کوتاه‌ترین فاصله از یک node به سایر nodeها. به عبارت ساده‌تر میزان بالای Closeness Centrality و Betweenness Centrality برای یک node نشان دهنده اهمیت بالای آن node در شبکه می‌باشد (۱۸-۲۳). آنالیزهای آنتولوژی ژن‌های موجود در شبکه با استفاده از نرم‌افزار تحت وب DAVID انجام شد (۲۴). سپس برای تک تک ژن‌ها Benjamini P-value محاسبه شدند (۲۵).

نتایج

با بررسی مقالات و اطلاعات موجود در پایگاه Uniprot مشخص شد ژن *eptA* همبستگی بالایی با ژن‌های *eptB*، *phoP* و *phoQ* دارد. با وارد کردن این سه ژن به پایگاه داده STRING-db شبکه هم‌بیانی اولیه بر مبنای پارامترهای Co-occurrence، Co-expression و Experiments بازسازی شد. در ادامه با دو مرتبه اضافه کردن ژن‌های پیشنهاد شده پایگاه داده STRING-db نهایتاً شبکه هم‌بیانی متشکل از ۲۹ node به دست آمد (شکل ۳).

توسعه عوامل ضد ویروسی جدید است که اصلاح لیپید A توسط *eptA* را مهار می‌کند یکی از راه‌های اصلی برای مقابله با ظهور مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک کولیسیتین می‌باشد. امیدواریم که مهار *eptA* کارایی پلی‌میکسین را بازیابی کند، از پاکسازی عفونت توسط سیستم ایمنی حمایت کند و تکثیر مقاومت به پلی‌میکسین را به حداقل برساند. مطالعات نشان می‌دهد که *eptA* ممکن است یک هدف عالی برای توسعه دارو برای مبارزه با مقاومت باکتریایی به کولیسیتین باشد. در حالی که پیشتر این کار برای آنزیم Neisseria انجام شده است، تحقیقات بیشتری برای سایر باکتری‌های گرم‌منفی بیماری‌زا مورد نیاز است. درک بهتر مکانیسم کاتالیزوری *eptA* از جمله دخالت یون‌های فلزی محل فعال و حالت‌های ساختاری آنزیمی مختلف، اطلاعات بیوشیمیایی مهمی را برای کمک به توسعه بیشتر بازدارنده فراهم می‌کند (۲).

با اذعان به اهمیت *eptA* در مکانیسم‌های مقاومت به کولیسیتین و پتانسیل آن برای توسعه دارو، درک جامع از جنبه‌های عملکردی *eptA*، در این مطالعه با بررسی پایگاه‌های اطلاعاتی ژنوم باکتریایی و بهره‌مندی از ابزارهای بیوانفورماتیکی جدید، بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن‌های درگیر در فرایند القای مقاومت به واسطه آنزیم لیپید A فسفاتانولامین ترانسفراز، صورت گرفت تا یک دید جامع از ژن‌های کلیدی این مکانیسم ارائه گردد.

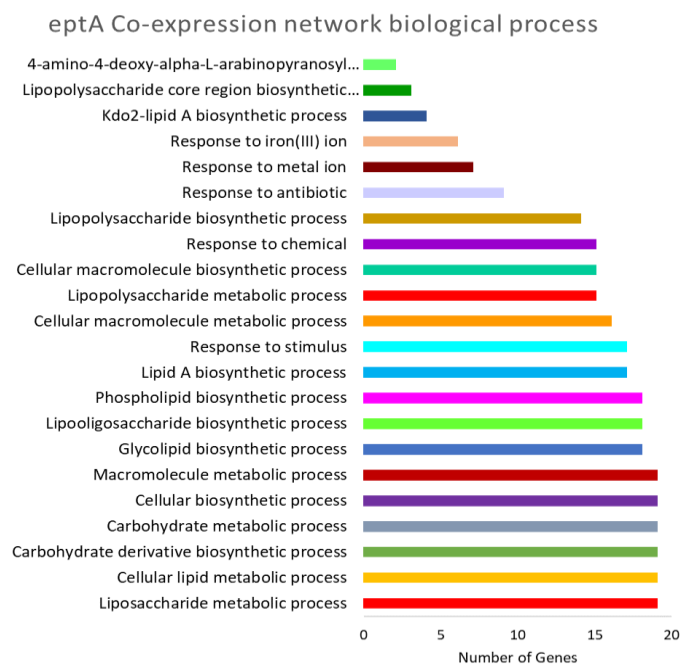
مواد و روش‌ها

در این مطالعه با استفاده از پایگاه داده Uniprot اطلاعات جامع در خصوص ژن *eptA* به‌عنوان ژن کلیدی درگیر در فرایند مقاومت باکتری *Escherichia coli* به آنتی‌بیوتیک کولیسیتین جمع‌آوری شد (۱۴). بر اساس

<i>lpxT</i>	22	0.01994713	0.84375
<i>pmrD</i>	22	0.00765449	0.84375
<i>arnC</i>	22	0.00734555	0.84375
<i>lpxA</i>	21	0.00590315	0.81818182
<i>lpxD</i>	21	0.00590315	0.81818182
<i>arnA</i>	19	0.01468446	0.77142857
<i>pmrR</i>	18	0.00340865	0.75
<i>ais</i>	17	0.00209116	0.72972973
<i>lpxB</i>	17	0.00130658	0.72972973
<i>lpxL</i>	17	0.00130658	0.72972973
<i>lpxP</i>	16	0.00110431	0.71052632
<i>mgrB</i>	16	5.32E-04	0.71052632
<i>arnD</i>	16	3.18E-04	0.71052632
<i>arnE</i>	16	3.18E-04	0.71052632
<i>arnF</i>	16	3.18E-04	0.71052632
<i>ybjG</i>	13	0.00527066	0.65853659
<i>waaA</i>	13	0	0.65853659
<i>yhjJ</i>	5	6.25E-04	0.55102041

بیوسنتز گلیکولیپیدها و بیوسنتز فسفولیپیدها بالاترین فعالیت را داشتند (شکل ۴).

مسیرهای بیولوژیکی فعال در فرایند القای مقاومت به کولیستین نشان داد مسیرهای سنتز لیپیدهای درگیر در ساختار غشای باکتریایی از قبیل بیوسنتز لیپوساکاریدها،



شکل ۴- آنالیز مسیرهای بیولوژیکی فعال در فرایند القای مقاومت به کولیستین در باکتری *E. coli*

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌گردد ژن *pagP* بر اساس آنالیز توپولوژی شبکه نقش کلیدی در تغییر ساختار لیپوپلی‌ساکارید در غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی ایفا می‌کند. *eptA* (که قبلاً *lptA* نامیده می‌شد) اولین بار در *N. meningitidis* به‌عنوان ژنی که یک ترانسفر از pEtN خاص برای لیپید A را کد می‌کند گزارش شد (۲۶). بیان *eptA* توسط سیستم‌های دو جزئی که شامل *pmrA/pmrB* و *phoP/phoQ* هستند، القا یا سرکوب می‌شود (۲۷). *pmrA/pmrB* تنظیم‌کننده اصلی بیان ژن‌هایی است که در اصلاح LPS در گونه‌های مختلف باکتری (مانند *E. coli*، *V. cholerae*، *H. pylori*، *S. Typhimurium*، *S. flexneri* و *N. gonorrhoeae*) نقش دارند (۲۷). سیستم تنظیمی *pmrA/pmrB* از یک تنظیم‌کننده پاسخ سیتوپلاسمی (*pmrA*) و یک حس‌گر کیناز متصل به غشاء (*pmrB*) تشکیل شده است (۲۷). سیستم *phoP/phoQ* از *phoQ* یک حس‌گر کیناز متصل به غشاء، و *phoP* یک تنظیم‌کننده رونویسی مبتنی بر سیتوپلاسم تشکیل شده است (۲۸). مطالعات اخیر نشان داده است که ادغام پالمیتات در لیپید A باکتری *S. typhimurium* به ژن *pagP* فعال شده با *phoP/phoQ* بستگی دارد (۲۹). تغییرات لیپید A با L-Ara4N، pEtN و یا پالمیتات در *E. coli* تنها زمانی دیده می‌شود که سلول‌ها با متاوانادات آمونیوم تیمار می‌شوند و یا در جهش یافته‌های مقاوم به کولیستین مشاهده می‌شود. همبستگی بالای بیان *pagP* و *eptA* دلیلش می‌تواند فعال شدن هر دو ژن تغییر دهنده لیپید A با سیستم *phoP/phoQ* باشد (۳۰).

لیپید A در باکتری‌های گرم‌منفی از تنوع ساختاری زیادی برخوردار است. تاکنون نزدیک ۳۰ نوع آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی لیپید A در باکتری‌های مختلف نشان داده شده است (۳۱). *pagP* در یک زیر گروه از ارگانیس‌های گرم‌منفی عمدتاً بیماری‌زا توزیع

می‌شود. مهارکننده‌های مؤثر *pagP* ممکن است در درمان بیماری‌های عفونی با حساس کردن باکتری‌های گرم‌منفی بیماری‌زا به پاسخ ایمنی ذاتی ارزش داشته باشند. اگرچه چنین مهارکننده‌هایی احتمالاً در درمان عفونت‌های حاد مفید نیستند، اما ممکن است در کنترل شدت آن مفید باشند (۳۲).

ژن *eptB* افزودن یک بخش فسفواتانول آمین (pEtN) را به اسید ۳-دئوکسی-D-ماننو-اکتولوزونیک خارجی (Kdo) در لیپید A کاتالیز می‌کند. این تغییرات LPS بار منفی LPS را کاهش می‌دهد و در نتیجه میل LPS را به کولیستین با بار مثبت کاهش داده و منجر به مقاومت باکتری به کولیستین می‌گردد (۳۳). چهار ژن دیگر در شبکه درگیر در فرایند بیوسنتز Kdo هستند که عبارتند از *lpxP*، *lpxM*، *lpxL* و *waaA*. نتایج توپولوژی شبکه به روشنی نشان می‌دهد ژن *eptB* نقش کلیدی در القای مقاومت به کولیستین دارد. جدول (۲) دسته‌بندی ژن‌های موجود در شبکه را نشان می‌دهد. از دوازده گروه متمایز شده ژن *eptB* در ۸ دسته حضور دارد. در حالی که ژن *pagP* تنها در دو دسته مشاهده می‌شود. همین نکته می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که ژن *eptB* نقش کلیدی‌تری نسبت به ژن *pagP* در القای مقاومت کولیستین دارد. همچنین *eptB* با ۳ فرآیند بیولوژیکی اصلی که شامل فرآیند متابولیک لیپوپلی‌ساکارید، انتقال سیگنال درون سلولی و فرآیند بیوسنتزی الیگوساکارید می‌شود، مرتبط است.

اولین بار در سال ۲۰۱۵ در چین ژن مقاومت به کولیستین *mcr-1* شناسایی شد که با واسطه پلاسمید یک پروتئین pEtN ترانسفر از کدگذاری می‌کند و می‌تواند به‌صورت افقی انتقال یابد. از آن زمان، انواع مختلفی از ژن‌های *mcr* یعنی *mcr-1* تا *mcr-10* از نقاط مختلف جهان شناسایی و گزارش شده‌اند (۳۴). مطالعات نشان داده حضور *mcr-1* بیان ژن *eptB* را در حضور کولیستین افزایش می‌دهد و در نتیجه مقاومت ایجاد می‌کند (۳۳).

جدول ۲- دسته‌بندی ژن‌های شبکه هم‌بیانی *eptA* بر اساس مولفه‌های اشتراکی در پایگاه اطلاعات پروتئینی Uniprot

Term ID	term description	observed gene count	false discovery rate	matching proteins in network (labels)
KW-0472	Membrane	24	0.0021	<i>lpxH, pagP, opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, pldA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0997	Cell inner membrane	22	0.00067	<i>lpxH, opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0812	Transmembrane	22	0.00073	<i>opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, pldA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0808	Transferase	21	9.98E-07	<i>lpxD, lpxA, lpxB, pagP, opgE, lpxK, lpxL, phoQ, lpxM, wcaJ, lpxT, arnB, arnC, arnA, arnT, lpxP, qseC, eptB, waaA, basS, eptA</i>
KW-1133	Transmembrane helix	21	0.0012	<i>opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0443	Lipid metabolism	17	8.41E-17	<i>lpxC, lpxD, lpxA, lpxB, lpxH, lpxK, pgpB, arnB, arnC, arnA, arnD, arnT, arnF, eptB, pldA, eptA, arnE</i>
KW-0441	Lipid A biosynthesis	15	3.65E-21	<i>lpxC, lpxD, lpxA, lpxB, lpxH, lpxK, arnB, arnC, arnA, arnD, arnT, arnF, eptB, eptA, arnE</i>
KW-0448	Lipopolysaccharide biosynthesis	15	1.51E-14	<i>lpxL, lpxM, wcaJ, lpxT, arnB, arnC, arnA, arnD, arnT, arnF, lpxP, eptB, waaA, eptA, arnE</i>
KW-0046	Antibiotic resistance	10	1.14E-07	<i>lpxD, ybjG, arnB, arnC, arnA, arnD, pmrD, bacA, basR, eptA</i>
KW-0597	Phosphoprotein	8	0.0022	<i>phoQ, phoP, ugd, qseB, qseC, cpxR, basS, basR</i>
KW-0902	Two-component regulatory system	7	0.00029	<i>phoQ, phoP, qseB, qseC, cpxR, basS, basR</i>
KW-0012	Acyltransferase	6	0.0018	<i>lpxD, lpxA, pagP, lpxL, lpxM, lpxP</i>

نشان داده در فقدان فعالیت *eptA*، حساسیت باکتری به کولیستین بیش از ۱۰۰ برابر افزایش یافته است (۳۳).
 با برهمکنش اولیه با لیپید A در باکتری‌های گرم‌منفی، فعالیت ضد باکتریایی خود را نشان می‌دهند. مقاومت به پلی‌میکسین از طریق اصلاح لیپید A که تعامل الکترواستاتیک اولیه با پلی‌میکسین‌ها را از بین می‌برد، ایجاد می‌شود. لیپید A در باکتری‌های گرم‌منفی از نوع ساختاری زیادی برخوردار است. ژن *eptA* آنزیمی است که مسئول اصلاح لیپید A با pEtN در باکتری *E. coli* است. در این مطالعه به‌منظور بررسی فرایند مقاومت باکتری *E. coli* به آنتی‌بیوتیک کولیستین، شبکه هم‌بیانی ژن‌های درگیر در این فرایند با محوریت ژن *eptA* بازسازی شد.

هر دو گروه فسفواتانول آمین ترانسفرازهای رمزگذاری شده با کروموزوم (مانند *eptA*، *eptB* و *eptC*) و رمزگذاری شده با پلاسمید (مانند *mcr-1* و *mcr-2*) در باکتری‌های گرم‌منفی گزارش شده‌اند. مقایسه توالی ژن‌های ترانسفراز فسفواتانول آمین در ۱۰ گونه باکتری گرم‌منفی نشان داده که میزان شباهت در میان کروموزوم‌های *eptA*، *eptB* و *eptC* در *E. coli* کم است در حالی که *eptA* بیشترین شباهت را با *mcr-1* و *mcr-2* نشان می‌دهد. هرچند ژن‌های کروموزومی *eptA* و پلاسمیدی *mcr-1* عامل اصلی القای مقاومت هستند، شبکه هم‌بیانی *eptA* به روشی بیانگر اهمیت بالای ژن *eptB* در فرایند القای مقاومت به کولیستین در باکتری *E. coli* را دارد. هر چند مطالعات

شده، ژن *eptB* در ۸ دسته و ژن *pagP* تنها در دو دسته مشاهده می‌شود. این نشان می‌دهد که ژن *eptB* نقش کلیدی‌تری نسبت به ژن *pagP* در القای مقاومت کولیستین دارد.

آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد ژن *pagP* نقش کلیدی در تغییر ساختار لیپوپلی‌ساکارید در غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی ایفا می‌کند. دسته‌بندی ژن‌های موجود در شبکه نشان داد از دوازده گروه متمایز

References

- 1- **Bialvaei AZ, Samadi Kafil H.** Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin.* 2015; 31(4):707-21.
- 2- **Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA.** Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiol Rev.* 2022; 46(1).
- 3- **Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA.** Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2016; 40(4): 480-93.
- 4- **Loho T, Dharmayanti A.** Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Med Indones.* 2015; 47(2): 157-68.
- 5- **Baijal K, Abramchuk I, Herrera CM, Stephen Trent M, Lavallée-Adam M, Downey M.** Proteomics analysis reveals a role for E. coli polyphosphate kinase in membrane structure and polymyxin resistance during starvation. *bioRxiv.* 2023.
- 6- **Rogga V, Kosalec I.** Untying the anchor for the lipopolysaccharide: lipid A structural modification systems offer diagnostic and therapeutic options to tackle polymyxin resistance. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2023; 74(3): 145-66.
- 7- **Tula MY, Filgona J, Kyauta SE, Elisha R.** Screening for some virulent factors among bacterial isolates from surfaces of hospital fomites and hands of healthcare workers. *CMBR.* 2023; 3(1): 9-16.
- 8- **Tula MY, Filgona J, Pukuma MS.** A Systematic review on the status of diarrheagenic Escherichia coli (DEC) pathotypes in Nigeria; the year 2000 – 2022. *CMBR.* 2022; 2(4): 213-29.
- 9- **Shiri Y, Solouki M, Ebrahimi E, Emamjomeh A, Zahiri J.** Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics.* 2020; 112(1): 820-30. [In Persian]
- 10- **Narimisa N, Goodarzi F, Bavari S.** Prevalence of colistin resistance of Klebsiella pneumoniae isolates in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Ann clin microbiol antimicrob.* 2022; 21(1): 29. [In Persian]
- 11- **Chang K, Wang H, Zhao J, Yang X, Wu B, Sun W, et al.** Risk factors for polymyxin B-associated acute kidney injury. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases.* 2022; 117: 37-44.
- 12- **Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR.** Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in medicine.* 2021; 8: 677720.
- 13- **Legese MH, Asrat D, Mihret A, Hasan B, Mekasha A, Aseffa A, et al.** Genomic Epidemiology of Carbapenemase-Producing and Colistin-Resistant Enterobacteriaceae among Sepsis Patients in Ethiopia: a Whole-Genome Analysis. *AAC.* 2022; 66(8): e0053422-e.
- 14- **Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al.** UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(Database issue): D115-D9.
- 15- **Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al.** The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(Database issue): D362-D8.
- 16- **Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al.** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome res.* 2003; 13(11): 2498-504.
- 17- **Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M.** Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics.* 2008; 24(2): 282-4.
- 18- **Shiri Y, Solouki M, Ebrahimi E, Emamjomeh A, Zahiri J.** Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics.* 2019. [In Persian]

19- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimi E, Emamjomeh A, Zahiri J. Unraveling the Transcriptional Complexity of Compactness in Sistan Grape Cluster. *Plant Science*. 2018. [In Persian]

20- Shiri Y, Karimiyan Ma. Reconstitution of Gene Network on Penicillin Resistance in E.coli Using Databases Information. *NFVM*. 2020; 2(2): 1-9. [In Persian]

21- Shiri Y, Mohkami Z, Bidarnamani F. Reconstruction of co-expression network of ampC gene as the main factor of Pseudomonas aeruginosa resistance to the new antibiotic Ceftolozane/Tazobactam. *NFVM*. 2022; 5(1): 96-107. [In Persian]

22- Shiri Y, fazeli nasab B. Evaluation of gene network on tetracycline antibiotic resistance controlled by tetA and tetB genes using databases information. *NFVM*. 2019; 2(1): 88-96. [In Persian]

23- Shiri Y, Khodavirdipour A, Kalkali N. Re-construction of Co-expression Network of Genes Involved in Bacterial Cell Wall Synthesis and Their Role in Penicillin Resistance. *AJCMJ*. 2020; 7(3): 65-71. [In Persian]

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

25- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Sta. Soc Ser B Methodol*. 1995; 57(1): 289-300.

26- Takahashi H, Carlson RW, Muszynski A, Choudhury B, Kim KS, Stephens DS, et al. Modification of lipooligosaccharide with phosphoethanolamine by LptA in Neisseria meningitidis enhances meningococcal adhesion to human endothelial and epithelial cells. *Infect*

Immun. 2008; 76(12): 5777-89.

27- Ly NS, Yang J, Bulitta JB, Tsuji BT. Impact of two-component regulatory systems PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB on colistin pharmacodynamics in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(6): 3453-6.

28- Guo H, Zhao T, Huang C, Chen J. The Role of the Two-Component System PhoP/PhoQ in Intrinsic Resistance of Yersinia enterocolitica to Polymyxin. *Front Microbiol*. 2022; 13: 758571.

29- Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, Trent MS, Miller SI, Raetz CR. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO*. 2000; 19(19): 5071-80.

30- Rubin EJ, Herrera CM, Crofts AA, Trent MS. PmrD is required for modifications to escherichia coli endotoxin that promote antimicrobial resistance. *AAC*. 2015; 59(4): 2051-61.

31- Kawahara K. Variation, Modification and Engineering of Lipid A in Endotoxin of Gram-Negative Bacteria. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(5).

32- Bishop RE. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. *Molecular microbiology*. 2005; 57(4): 900-12.

33- Elizabeth R, Baishya S, Kalita B, Wangkheimayum J, Choudhury MD, Chanda DD, et al. Colistin exposure enhances expression of eptB in colistin-resistant Escherichia coli co-harboring mcr-1. *Scientific reports*. 2022; 12(1): 1348.

34- Protonotariou E, Meletis G, Malousi A, Kotzamanidis C, Tychala A, Mantzana P, et al. First detection of mcr-1-producing Escherichia coli in Greece. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022; 31: 252-5.



Investigation of co-expression network of *eptA* colistin resistance gene in *Escherichia coli*


Yasoub Shiri^{*1}, Samira Saadatjou², Zaynab Mohkami³

1- Horticulture Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.

2- Doctor of General Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Veterinary Clinician in Zabol, Zabol, Iran.

3- Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture Research Center, Zabol Research Institute, Zabol, Iran.

Receive: November 6, 2023; Revise: December 5, 2023; Accept: December 6, 2023

 10.22034/nfvm.2024.424139.1210

Summary

Colistin (polymyxin E) is a polymyxin antibiotic. Polymyxin is increasingly used as a last resort antibiotic for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria. Colistin makes the outer membrane of the bacteria permeable and disturbs the integrity of the inner membrane and finally causes cell death. Lipid A lipopolysaccharide is a main component of the outer membrane of most Gram-negative bacteria, and some bacteria induce resistance to colistin by making changes in its structure. Lipid A phosphoethanolamine transferase (*eptA*) is an enzyme responsible for modifying lipid A in *E. Coli*. In order to investigate the process of genes involved in resistance to colistin, a co-expression network consisting of 29 genes was reconstructed. Gene ontology analysis showed that lipid synthesis pathways involved in bacterial membrane structure such as liposaccharide biosynthesis, glycolipid biosynthesis and phospholipid biosynthesis have the highest number of representatives in the network. Network topology analysis showed that *pagP* had the highest number of connections with 27 direct connections. Next, *eptB*, *arnT*, *basS* and *phoP* genes were in the next row with 26 connections each. Also, *pagP* showed the highest betweenness centrality and closeness centrality with (0.03527178) and (1) respectively. Also, *eptB* is the second key gene in this network from the perspective of Closeness Centrality and Betweenness Centrality with (0.96428571) and (0.03332764). The classification of the genes in the network showed that out of the twelve differentiated groups, *eptB* was found in 8 groups and *pagP* was observed in only two groups. This shows that *eptB*, along with *eptA*, plays a key role in the induction of colistin resistance.

Keywords: *lipo-polysaccharide, antibiotic, polymyxin, gene network*



تعیین انواع پلاسمید بر اساس تیپ رپلیکون و مقایسه آن با انواع شیگاتوکسین و اینتیمین جدایه‌های حیوانی/شریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک


علی نعمتی^۱، مهدی عسکری بدوئی^{۲*}، غلامرضا هاشمی تبار^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۹ دی ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۴ بهمن ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۵ بهمن ۱۴۰۲

 10.22034/nfvm.2024.434828.1222

چکیده

سویه‌های پاتوتیپ/شریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک (STEC) باعث بیماری‌های خطرناکی همچون کولیت هموراژیک (HC) و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) در انسان می‌شوند. در حال حاضر، یکی از چالش‌های مهم در کنترل عفونت‌های ناشی از STEC، ردیابی و شناسایی به موقع سویه‌های بیماری‌زا در نمونه‌های محیطی، غذایی و بالینی است. برای این منظور از ژن‌های *stx* و *eae* به همراه ژن‌های اختصاصی سرورگروپ‌ها در دو پروتوکول استاندارد در اتحادیه اروپا (ISO/TS 13136) و آمریکا (MLG5B.05) استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر، به بررسی انواع رپلیکون‌ها و مقایسه آن با سرورگروپ‌های مهم بیماری‌زا و سویه‌های *stx2* مثبت پرداخته شد تا با شناسایی رپلیکون‌های مهم، بتوان در قدم بعدی از ژن‌های حدت کدشونده بر روی این نوع پلاسمیدها به‌عنوان مارکرهای جایگزین روش‌های ISO/TS 13136 و MLG5B.05 استفاده نمود. بر این اساس، ۹۶ جدایه STEC به دست آمده از میزبان‌های مختلف حیوانی در قالب PCR های تکی و Multiplex PCR ارزیابی شدند. از میان ۸۲ سویه STEC دارای پلاسمید، به ترتیب رپلیکون‌های FIB (۶۹/۸۲) با ۸۴/۱٪، K/B (۲۱/۸۲) با ۲۵/۶٪، B/O (۱۱/۸۲) با ۱۳/۴٪، P (۸/۸۲) با ۹/۷٪، Y (۶/۸۲) با ۷/۳٪، FIA (۳/۸۲) با ۳/۶٪، II (۳/۸۲) با ۳/۶٪ و L/M (۱/۸۲) با ۱/۲٪ بیشترین فراوانی را داشتند. در این مطالعه اگرچه فراوانی پلاسمیدهای FIB قابل توجه بود، اما در مورد سویه‌های بیماری‌زا STEC، ارتباط آنها با پلاسمید K/B نشان داده شد، به طوری که بیشترین جدایه‌های STEC دارای الگوی *stx2 + eae + ehxA* واجد این رپلیکون بودند. بررسی ارتباط نوع پلاسمید با تحت تیپ‌های ژن *stx2* و تعیین محتوای ژنتیکی این پلاسمیدها جهت ارزیابی حدت و شناسایی مارکر ژنتیکی احتمالی از محتوای پلاسمیدی پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: /شریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک، پلاسمید، رپلیکون، مارکر

مقدمه

چند ساعت بعد از به دنیا آمدن نوزاد انسان، باکتری *Escherichia coli* (*E. coli*) در مجرای گوارشی ساکن می‌شود. پس از آن، باکتری *E. coli* و میزبان انسانی با یکدیگر رابطه همزیستی که هر دو طرف سود می‌برند، برقرار می‌نمایند. این باکتری به ندرت باعث ایجاد بیماری در میزبان خود می‌شود، مگر آن که میزبان دارای نقص سیستم ایمنی یا دستگاه گوارش دچار آسیب و التهاب باشد (۱). در عین حال، تعدادی از سویه‌های *E. coli* وجود دارند که با کسب عوامل حدت اختصاصی، توانایی ساکن شدن در جایگاه‌های جدید را به دست آورده‌اند. این سویه‌ها که با این نواحی جدید انطباق پیدا کرده‌اند، می‌توانند طیف وسیعی از بیماری‌ها را در میزبان خود ایجاد نمایند. ویژگی‌های حدت کسب شده، اغلب بر روی عناصر ژنتیکی کد می‌شوند که می‌توانند به شکل‌های مختلف به سایر سویه‌های باکتریایی منتقل گردند (۲، ۳). آن دسته از سویه‌های *E. coli* که به‌طور موفقیت‌آمیزی، عوامل حدت را به‌صورت ترکیبی در خود جای داده‌اند، تحت عنوان پاتوتیپ‌های اختصاصی *E. coli* شناخته می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آنها، پاتوتیپ / شریشیکیلی شیگاتوکسیژنیک (STEC) می‌باشد که توانایی ایجاد اسهال، کولیت هموراژیک و در موارد پیشرفت بیماری سندرم همولیتیک اورمیک یا HUS که یک بیماری حاد کلیوی و کشنده در انسان است را دارد (۴، ۵).

سرگروپ‌های O157, O26, O103 سویه‌های STEC به‌عنوان شایع‌ترین سرگروپ‌های بیماری‌زا در اتحادیه اروپا محسوب می‌شوند که در میان سویه‌های جدا شده از بیماران HUS، سرگروپ‌های O26 و O157 بالاترین فراوانی را داشتند (۶). همچنین بالاترین آمار بیماری و عوارض خطرناک (عفونت HUS، اسهال خونی و موارد بستری شده) مربوط به سویه‌هایی از STEC بوده است که واجد شیگاتوکسین دو (*stx2*) بوده‌اند (۶). نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بین ظهور سویه‌های خطرناک STEC و کسب پلاسمیدهای حدت توسط آنها یک رابطه

مستقیم وجود دارد (۷). ژن‌های حدت کد شونده بر روی این پلاسمیدها، باعث افزایش بیماری‌زایی و بروز علائم شدید در انسان می‌شوند. یکی از راه‌های شناسایی این پلاسمیدها، دسته‌بندی آنها می‌باشد تا از این طریق بتوان پلاسمیدهای مهم و به دنبال آن سویه‌های خطرناک STEC را ردیابی نمود.

یکی از دقیق‌ترین و کم هزینه‌ترین روش‌های دسته‌بندی پلاسمیدها، رپلیکون تایپینگ (Replicon typing) می‌باشد که بر اساس تفاوت‌های ژنتیکی موجود در لوکوس‌های مربوط به ژن‌های رپلیکون و توالی‌های تنظیم‌کننده همانندسازی، ۱۷ نوع رپلیکون مختلف قابل دسته‌بندی است (۷، ۸). جایگاه Replicon مربوط به ماشین همانندسازی پلاسمید می‌باشد و اساس این روش بر این پدیده استوار است که پلاسمیدهایی که دارای ماشین همانندسازی مشابه یا به عبارتی رپلیکون مشابه هستند، به علت رقابتی که بین آنها برای همانندسازی و بقا در سلول باکتری ایجاد می‌شود، نمی‌توانند با هم و به‌طور همزمان در یک باکتری حضور داشته باشند و این عدم سازگاری باعث می‌گردد که در نهایت پس از چندین بار تقسیم سلولی فقط یکی از پلاسمیدهایی که رپلیکون مشابه دارند در سلول باکتری باقی بماند و مابقی حذف شوند (۷). بدین ترتیب، پلاسمیدها را به انواع گروه‌های ناسازگاری یا incompatibility که به اختصار Inc نامیده می‌شود تقسیم‌بندی می‌کنند (۸).

در حال حاضر، یکی از چالش‌های مهم در کنترل عفونت‌های ناشی از STEC، ردیابی و شناسایی به موقع سویه‌های بیماری‌زا در نمونه‌های محیطی، غذایی و بالینی است (۹). برای این منظور از ژن‌های *stx* و *eae* به همراه ژن‌های اختصاصی سرگروپ‌ها در دو پروتکل استاندارد در اتحادیه اروپا (ISO/TS 13136) و آمریکا (MLG5B.05) استفاده می‌شود (۱۰). روش اجرایی جهت تشخیص سویه‌های STEC در هر دو رفرنس به این صورت است که ابتدا ژن‌های شیگاتوکسین (*stx1/stx2*) و اینتیمین (*eae*) ردیابی می‌شوند. در صورت مثبت بودن

(۳۳٪؛ ۳۳/۱۰۰) به جدایه‌های قبلی اقدام شد. بدین ترتیب، در مجموع این پژوهش با مطالعه بر روی ۹۶ جدایه تایید شده STEC که شامل ۳۵ جدایه از گاو، ۳۲ جدایه از گوسفند، ۹ جدایه از بز، ۱۸ جدایه از کیوتر و ۲ جدایه از میمون بودند، انجام گردید.

نمونه‌های اخذشده مربوط به جدایه‌های جدید، طبق منابع استاندارد با استفاده از سوآپ استریل از مدفوع میزبان‌های حیوانی اخذ شد و سپس داخل لوله فالکن همراه با سرم فیزیولوژی و یخ جهت کشت و بررسی خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی منتقل گردیدند (۱۱، ۱۲). هر نمونه بر روی محیط مک‌کانکی آگار کشت داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت، کلونی‌های رشد کرده مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی‌های مشکوک (لاکتوز مثبت با اندازه متوسط) جهت تشخیص، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲).

تعیین هویت جدایه‌های جدید همراه با کشت مجدد جدایه‌های کلکسیون میکروبی جهت استخراج DNA: در مورد جدایه‌های جدید، پس از بررسی خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی آنها، موارد تایید شده از محیط مک‌کانکی آگار به محیط LB آگار منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C استخراج DNA جدایه‌ها انجام گرفت. در مورد جدایه‌های موجود در کلکسیون آزمایشگاه میکروبی‌شناسی، ابتدا تمامی جدایه‌ها در محیط BHI براث کشت و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد تمامی جدایه‌ها در محیط LB آگار کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C استخراج DNA آنها انجام گرفت. استخراج DNA جدایه‌ها به روش جوشاندن انجام شد (۱۳).

نمونه، مرحله بعد به ردیابی سرورگروپ‌های O26, O103, O111, O145, O157 در روش ISO/TS 13136 و ردیابی سرورگروپ‌های O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157 در روش MLG5B.05 پرداخته می‌شود (۹، ۱۰). از معایب اصلی هر دو این پروتوکول‌ها آن است که بسیاری از سویه‌های STEC فاقد ژن *eae* به علت داشتن شیگاتوکسین، سویه‌های پاتوتیپ EPEC به علت داشتن *eae* گونه‌های *E. albertii* به علت داشتن شیگاتوکسین و در نهایت فازهای آزاد حمل‌کننده شیگاتوکسین که همگی در محیط و نمونه‌های غذایی مشکوک وجود دارند منجر به ایجاد واکنش کاذب مارکرهای انتخابی (*stx1/stx2/eae*) مورد استفاده در این دو پروتوکول با عوامل ذکر شده خواهد شد. نتیجه این اتفاق، پیدایش مقدار قابل توجهی از پاسخ‌های مثبت کاذب شامل مجموعه‌ای از سویه‌های غیر STEC یا غیر بیماری‌زا یا با بیماری‌زایی کم خواهد بود که از نظر زمان و هزینه چالش‌زا است (۹).

با توجه به این مشکل، پژوهش حاضر با هدف بررسی نوع رپلیکون پلاسمید در سویه‌های STEC با ریسک بالای بیماری انجام گرفت تا با معرفی پلاسمیدهای مهم بتوان از رپلیکون آنها یا ژن‌های حدت کدشونده بر روی آنها به‌عنوان مارکر جایگزین جهت ردیابی و شناسایی سویه‌های بیماری‌زا STEC استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد بررسی: در این پژوهش در مجموع از ۶۳ جدایه STEC مرتبط با میزبان‌های حیوانی شامل ۲۱ جدایه از گاو، ۲۲ جدایه از گوسفند، ۱۸ جدایه از کیوتر و ۲ جدایه از میمون استفاده گردید. این جدایه‌ها در کلکسیون آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد موجود بود که طی سالیان گذشته (۱۳۹۶ تا ۱۴۰۱) از شهرهای مختلف ایران (تهران، گرمسار، دامغان، سمنان و مشهد) به دست آمده بودند. علاوه بر این ۶۳ جدایه، نسبت به اخذ مجموعاً ۱۰۰ نمونه مدفوعی جدید از میزبان‌های گاو، گوسفند و بز و اضافه کردن موارد شناسایی شده سویه‌های STEC

شناسایی سویه‌های STEC در جدایه‌های جدید و بررسی مجدد جدایه‌های کلکسیون: جهت شناسایی پاتوتیپ STEC در نمونه‌های *E. coli* به دست آمده از جدایه‌های جدید و همچنین بررسی مجدد سویه‌های کلکسیون میکروبی به منظور تأیید قطعی STEC بودن آنها، یک واکنش Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های شیگاتوکسین نوع ۱ و نوع ۲ (*stx1*, *stx2*)، اینتیمین (*eae*) و همچنین انتروهمولیزین (*ehxA*) انجام گردید

(جدول ۱). لازم به ذکر است که برای ردیابی شیگاتوکسین در نمونه‌های اخذ شده از کبوتر، از پرایمر اختصاصی شیگاتوکسین نوع *stx2f* (مختص به سویه‌های STEC کبوتری است) در طی یک مرحله واکنش جداگانه PCR تکی استفاده شد (جدول ۱). دستورالعمل انجام واکنش‌های PCR بر اساس مطالعات Paton 1998 و Schmidt 2000 اجرا شد (۱۴، ۱۵).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی پاتوتیپ STEC

Primer name	Sequence (5'-3' direction)	Amplicon size (bp)	Annealing Tem/Time ¹	Reference
Virulence markers				
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	65°C, 63°C, 59°C/ 60S ²	(14)
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTCTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255		
<i>stx2f</i>	AGATTGGGCGTCATTCCTGCTGTTG TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	428	56°C/ 60S	(15)
<i>eae</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	65°C, 63°C, 59°C/ 60S ²	(14)
<i>ehxA</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534		

¹ Annealing Temperature and Duration

² Touchdown PCR

تعیین سرگروپ جدایه‌های STEC پس از شناسایی قطعی سویه‌های STEC، بررسی نوع سرگروپ آنها انجام شد. لازم به ذکر است که سرگروپ تعدادی از سویه‌های کلکسیون میکروبی از جمله سویه‌های کبوتری (O128, O63, O75) در مطالعه قبلی تعیین شده بود (۳). در نتیجه در مطالعه حاضر تعیین سرگروپ صرفاً برای جدایه‌های جدید (۳۳ جدایه) و آن دسته از سویه‌های کلکسیون میکروبی که سرگروپ آنها از نظر O80 و O146 نامشخص بود، انجام شد.

بر این اساس، شناسایی ۱۳ سرگروپ مهم بیماری‌زا به اضافه سرگروپ‌های O5 و O91 با استفاده از واکنش‌های Multiplex PCR و PCR تکی طبق دستورالعمل مقالات رفرنس انجام شد (جدول ۲). سرگروپ‌های مورد بررسی شامل موارد زیر بودند:

O5, O26, O45, O55, O80, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O146, O157

پنل اول: یک مرحله واکنش Multiplex PCR برای شناسایی سرگروپ‌های زیر انجام شد:

O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145
واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۳/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۵/۶ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید).

از سویه‌های کلکسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

پنل دوم: یک مرحله واکنش Multiplex PCR برای شناسایی سرگروپ‌های زیر انجام شد:

O55, O91

موارد زیر هستند:

O5, O80, O104, O128, O146, O157

برای هر کدام از این سرگروپ‌ها، به صورت جداگانه واکنش در حجم ۱۶ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۸ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی $MgCl_2$ ۱/۵ mM، مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۱ میکرولیتر) و در نهایت ۲ میکرولیتر (معادل ۲۰۰ ng) از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید. از سویه‌های کلکسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی $MgCl_2$ ۱/۵ mM، مقدار ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۱/۶ میکرولیتر) و در نهایت ۲/۵ میکرولیتر (معادل ۲۵۰ ng) از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

از سویه‌های کلکسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

سایر سرگروپ‌های باقی‌مانده به وسیله واکنش PCR تکی به صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین سرگروپ‌های جدایه‌های STEC

Primer name	Sequence (5'-3' direction)	Amplicon size (bp)	Annealing Tem/Time ¹	Reference
<i>Serogroups</i>				
O5	CTTATCCGATTAATGGCTTC TAGTCGATTTGCTTTTATGG	144	50°C/ 50S	(16)
O26	CAATGGGCGGAAATTTAGTA ATAATTTTCTCTGCCGTCGC	155	56°C/ 60S	(17)
O45	TGCAGTAACCTGCACGGGCG AGCAGGCACAACAGCCACTACT	238		
O55	TCCTTATTTGTGTCGGGGG CCAGGAAAGCTGCCAATTATC	207	54°C/ 60S	(18)
O80	TGAGAGCCAAGATCCAAGCA TGGGCCATATTCGAAGTTTGAA	158	55°C/ 30S	(19)
O91	TTGCATCTGGCGCAATAAACACGG ACACCATCCCAAATACCTGCTTGC	616	54°C/ 60S	(17)
O103	TTGGAGCGTTAACTGGACCT GCTCCCGAGCACGTATAAAG	321	56°C/ 60S	
O104	TGAACTGATTTTATAGGATGG AGAACCTCACTCAAATTATG	351	55°C/ 60S	
O111	TGTTTCTTTCGATGTTGCGAG GCAAGGGACATAAGAAGCCA	438	56°C/ 60S	
O113	TGCCATAATTCAGAGGGTGAC AACAAAAGCTAATTGTGGCCG	514		
O121	TCCAACAATTGGTCGTGAAA AGAAAAGTGTGAAATGCCCGT	628		
O128	ATGATTTCTTACGGAGTGC	782	50°C/ 30S	(19)

	CTCTAACCTAATCCCTCCC			
O145	TTCATTGTTTTGCTTGCTCG GGCAAGCTTTGGAAATGAAA	750	56°C/ 60S	
O146	ATTCGGGTAACGACCCTGTGTTGA AGACTGCTAATGCAAGGAACATG G	378	50°C/ 30S	(20)
O157	TCGAGGTACCTGAATCTTTCCTTCTGT ACCAGTCTTGGTGCTGCTCTGACA	894	56°C/ 60S	(17)

¹ Annealing Temperature and Duration

بدین ترتیب ۱۷ رپلیکون مورد بررسی قرار گرفتند که شامل موارد زیر بودند:

B/O, FIC, A/C, P, T, K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y, I1, Frep, X, HI1, N, HI2, L/M

تعیین تیپ رپلیکون پلاسمید در جدایه‌های *STEC* جهت مشخص کردن تیپ رپلیکون پلاسمید بر طبق مطالعه Johnson و همکاران (۷) از سه مرحله واکنش Multiplex PCR در قالب سه پنل استفاده شد.

جدول ۳- پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی رپلیکون پلاسمیدها

Primer name	Sequence (5'-3' direction)	Amplicon size (bp)	Annealing Tem/Time ¹	Reference
Plasmid replicon types				
<u>Panel 1</u>				
B/O-F	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	159	60°C/ 30S	(7)
B/O-R	TCTGCGTCCGCCAAGTTCTGA			
FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262		
FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
A/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465		
A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534		
P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750		
T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
<u>Panel 2</u>				
K/B-F	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	160	60°C/ 30S	(7)
K/B-R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
W-F	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	242		
W-R	GGTGCGGGCATAGAACCGT			
FIIA-F	CTGTCTGTAAGCTGATGGC	270		
FIIA-R	CTCTGCCACAAACTTCAGC			
FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462		
FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGAG			
FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702		
FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
Y-F	AATCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765		
Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			

Panel 3				
II-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	60°C/ 30S	(7)
II-R	TCGTTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
Frep-F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270		
Frep-R	GAAGATCAGTCACACCATCC			
X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTT- GCTGAT	376		
X-R	TGAGAG- TCAATTTTATCTCATGTTTTAGC			
HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471		
HI1-R	TGCCGTTTACCTCGTGAGTA			
N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559		
N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
HI2-F	TTTCTCTGAGTCACCTGTAAACAC	644		
HI2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
L/M-F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785		
L/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			

¹ Annealing Temperature and Duration

پنل اول: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های B/O, FIC, A/C, P, T: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۳ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

پنل دوم: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۳/۶ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

از سوبه‌های کلکسیون میکروبی به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

پنل سوم: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های I1, Frep, X, HI1, N, HI2, L/M: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۴/۲ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

از سوبه‌های کلکسیون میکروبی به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

پراکندگی ژن‌های *stx1*, *stx2*, *stx2f*, *eae*, *ehxA*
در سوبه‌های STEC در میان ۹۶ سوبه STEC بررسی شده، فراوانی ژن‌های شیگاتوکسین (*stx*) بدین شرح بود:

پنل اول: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های B/O, FIC, A/C, P, T: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۳ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

سویه‌هایی که فقط دارای *stx1* بودند شامل ۲۶ جدایه؛ سویه‌هایی که فقط دارای *stx2* بودند شامل ۲۷ مورد و در نهایت سویه‌هایی که هر دو شیگاتوکسین (*stx1 + stx2*) را داشتند شامل ۲۵ جدایه بودند. در رابطه با *stx2f* این ژن تنها در سویه‌های STEC کیوتری یافت شد که ۱۸ سویه از ۹۶ جدایه را شامل می‌شد. همچنین در میان ۹۶ سویه STEC بررسی شده، ۳۲ جدایه دارای ژن *eae* و ۶۲ جدایه دارای ژن *ehxA* بودند.

فراوانی سرگروپ‌های شناسایی شده در

سویه‌های STEC از میان ۹۶ سویه STEC مورد مطالعه، به ترتیب سرگروپ‌های O113 (13/96) با ۱۳/۵۴٪، O5 (13/96) با ۱۳/۵۴٪، O103 (12/96) با ۱۲/۵۰٪، O128 (9/96) با ۹/۳۷٪، O26 (5/96) با ۵/۲۰٪، O91 (3/96) با ۳/۱۲٪، O111 (3/96) با ۳/۱۲٪، O63 (3/96) با ۳/۱۲٪، O75 (3/96) با ۳/۱۲٪، O128 (2/96) با ۲/۰۸٪، O80 (2/96) با ۲/۰۸٪ و O157 (2/96) با ۲/۰۸٪، بیشترین درصد فراوانی را داشتند. در رابطه با ۲۶ جدایه STEC، سرگروپ آنها در میان پانزده سرگروپ مهم بیماری‌زا مورد مطالعه نبود و در نتیجه ردیابی نشد.

مقدار فراوانی انواع رپلیکون پلاسمیدها در

سویه‌های STEC در مجموع از میان ۸۲ سویه STEC دارای پلاسمید، به ترتیب رپلیکون‌های FIB (69/82) با ۸۴/۱۴٪، K/B (21/82) با ۲۵/۶۰٪، B/O (11/82) با ۱۳/۱۴٪، P (8/82) با ۹/۷۵٪، Y (6/82) با ۷/۳۱٪، FIA (3/82) با ۳/۶۵٪، I1 (3/82) با ۳/۶۵٪ و L/M (1/82) با ۱/۲۱٪ بیشترین فراوانی را داشتند (لازم به ذکر است که تعدادی از پلاسمیدها دارای بیش از یک نوع رپلیکون بودند).

در میان ۶۹ جدایه دارای رپلیکون FIB، ۲۵ مورد (۳۶/۲۳٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در رابطه با رپلیکون K/B، از میان ۲۱ جدایه، ۱۲ مورد (۵۷/۱۴٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در مورد رپلیکون P، از میان ۸ جدایه، ۵ مورد (۶۲/۵۰٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در

میان ۶ جدایه دارای رپلیکون Y، ۴ مورد (۶۶/۶۶٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در مورد رپلیکون L/M، ۱ جدایه مربوط به این رپلیکون (۱۰۰٪) دارای تنها ژن *stx2* بود. در نهایت، در ارتباط با رپلیکون‌های B/O، FIA و I1، مورد مثبتی که دارای تنها ژن *stx2* باشد، مشاهده نگردید (نمودار ۱).

در رابطه با رپلیکون FIB، در بین این ۲۵ جدایه دارای *stx2* ۱۸ مورد (۷۲٪) دارای ژن *eae* بودند که الگوی *stx2 + ehxA + eae* نیز در میان (۲/۱۸) ۱۱/۱۱٪ از آنها شناسایی شد. در مورد رپلیکون K/B، در میان ۱۲ جدایه دارای *stx2* ۳ مورد (۲۵٪) دارای ژن *eae* بودند که الگوی *stx2 + eae + ehxA* نیز در یک مورد از ۳ جدایه شناسایی شد. در میان ۵ جدایه دارای *stx2* در رپلیکون P، هر ۵ مورد (۱۰۰٪) دارای ژن *eae* بودند. در رابطه با رپلیکون Y، در بین این ۴ جدایه دارای *stx2* هر ۴ مورد (۱۰۰٪) دارای ژن *eae* بودند. با این حال، الگوی *stx2 + eae + ehxA* در جدایه‌های مربوط به رپلیکون‌های P و Y مشاهده نشد. در نهایت، در مورد رپلیکون L/M، ۱ جدایه مربوط به آن دارای ژن *eae* نبود (جدول ۱).

از لحاظ سرگروپ، در میان ۶۹ جدایه دارای رپلیکون FIB، به ترتیب سرگروپ‌های O5 (11/69) با ۱۵/۹۴٪، O103 (8/69) با ۱۱/۵۹٪، O113 (6/69) با ۸/۶۹٪، O128 (6/69) با ۸/۶۹٪، O26 (4/69) با ۵/۷۹٪ و O157 (2/69) با ۲/۸۹٪ بیشترین فراوانی را دارا بودند. در میان ۲۱ جدایه دارای رپلیکون K/B، به ترتیب سرگروپ‌های O113 (7/21) با ۳۳/۳۳٪، O5 (7/21) با ۳۳/۳۳٪ و O128 (3/21) با ۱۴/۲۸٪ بیشترین فراوانی را دارا بودند. در میان ۱۱ جدایه دارای رپلیکون B/O، به ترتیب سرگروپ‌های O5 (6/11) با ۵۴/۵۴٪ و (3/11) O91 با ۲۷/۲۷٪ بیشترین فراوانی را دارا بودند. در میان ۸ جدایه دارای رپلیکون P، سرگروپ O103 (2/8) با ۲۵٪ بیشترین فراوانی را دارا بود. در میان ۶ جدایه دارای رپلیکون Y، سرگروپ O103 (2/6) با ۳۳/۳۳٪ بیشترین فراوانی را دارا بود. در میان ۳ جدایه دارای رپلیکون FIA،

مورد سروگروپ ۱ جدایه دارای رپلیکون L/M، این سروگروپ جزء موارد مورد مطالعه نبود و بنابراین شناسایی نشد (نمودار ۲).

هر ۳ سویه به سروگروپ O91 (3/3, 100%) تعلق داشتند. در میان ۳ جدایه دارای رپلیکون I1، هر ۳ سویه به سروگروپ O26 (3/3, 100%) تعلق داشتند. در نهایت، در

جدول ۴- توزیع انواع رپلیکون‌های پلاسمید شناسایی شده در سویه‌های STEC بر اساس عوامل حدت (شیگاتوکسین تیپ دو، اینتیمین، انترهمولیزین) و همچنین سروگروپ‌های مهم بیماری‌زا (O103, O26, O157)

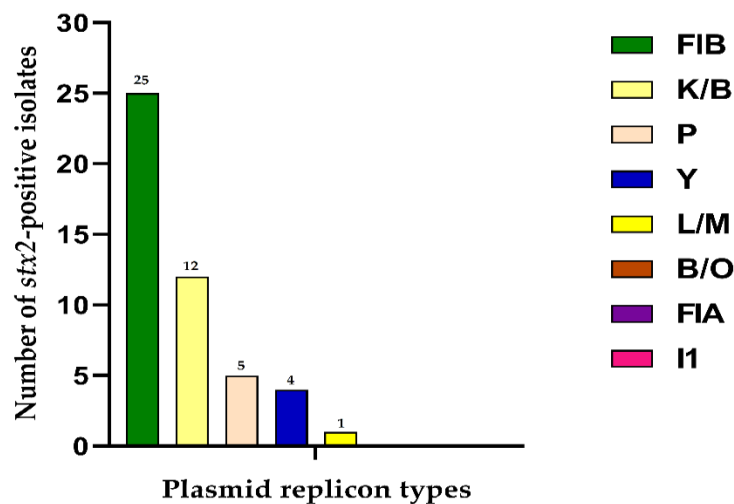
Replicon	<i>stx2</i> (n = 45) ¹	<i>stx2 + eae</i> (n = 21) ²	<i>stx2 + eae + ehxA</i> (n = 3) ³	Important serogroups (n = 19) ⁴
FIB (n = 69)	25/69, 36.2%	18/25, 72%	2/18, 11.1%	14/69, 20.2% (O103 = 8, O26 = 4, O157 = 2)
K/B (n = 21)	12/21, 57.1%	3/12, 25%	1/3, 33.3%	0
B/O (n = 11)	0	0	0	0
P (n = 8)	5/8, 62.5%	5/5, 100%	0	2/8, 25% (O103 = 2)
Y (n = 6)	4/6, 66.6%	4/4, 100%	0	2/6, 33.3% (O103 = 2)
FIA (n = 3)	0	0	0	0
I1 (n = 3)	0	0	0	3/3, 100% (O26 = 3)
L/M (n = 1)	1/1, 100%	0	0	0

¹ *stx2* = 27; *stx2f* = 18.

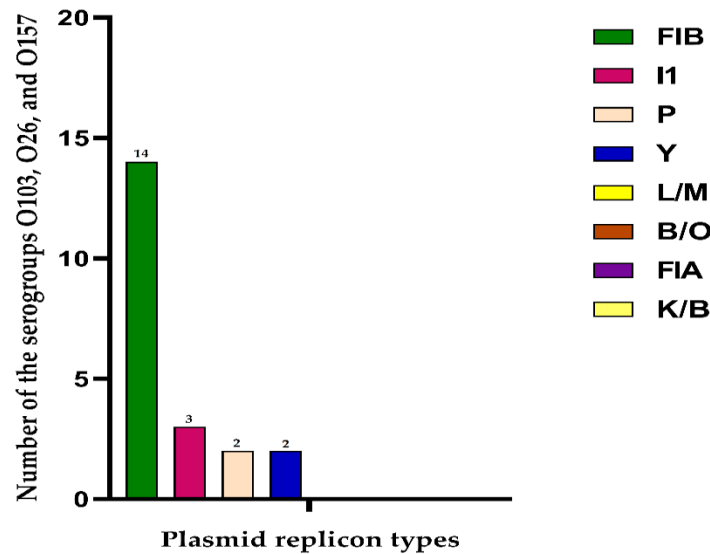
² *stx2 + eae* = 4; *stx2f + eae* = 17.

³ *stx2 + eae + ehxA* = 3; *stx2f + eae + ehxA* = 0.

⁴ Important serogroups are: O103 (n = 12), O26 (n = 5), O157 (n = 2).



نمودار ۱- میزان فراوانی انواع رپلیکون پلاسمیدها در سویه‌هایی از STEC که واجد تنها *stx2* بودند (n = 45)



نمودار ۲- میزان فراوانی انواع رپلیکون پلاسمیدها در سروگروپ‌های مهم بیماری‌زا STEC (n = 19)

بحث و نتیجه‌گیری

دو دستورالعمل رفرنس برای ردیابی سویه‌های STEC وجود دارد که پروتوکل اول در اتحادیه اروپا (ISO/TS 13136) و پروتوکل دوم در آمریکا (MLG5B.05) اجرا می‌شود. در حال حاضر استفاده از هر دو پروتوکل به‌ویژه در نمونه‌های غذایی با چالش همراه است (۲۱، ۲۲). به این جهت که ممکن است هر کدام از مارکرهای *stx1/stx2/eah* در دو یا تعداد بیشتری از ارگانیزم‌های موجود در نمونه مورد بررسی وجود داشته باشند که هیچ ارتباطی با سویه‌های STEC ندارند (۲۳، ۲۴). در نتیجه شناسایی و جایگزین کردن مارکرهای جدید با هدف به حداقل رساندن پاسخ‌های مثبت کاذب می‌تواند از نظر زمانی و مالی بسیار ارزشمند باشد، به‌ویژه اگر مارکرهای جدید توانایی شناسایی سویه‌های به شدت بیماری‌زای STEC که باعث ایجاد HUS در انسان می‌شوند را داشته باشند (۲۵).

مطالعه حاضر با هدف بررسی نوع رپلیکون در سویه‌های بیماری‌زا STEC انجام گرفت تا ارتباط این سویه‌ها با نوع پلاسمید حمل‌کننده مورد بررسی قرار گیرد. در صورتی که نوع خاصی از رپلیکون با سویه‌های خطرناک در ارتباط باشد، می‌توان در قدم بعدی نسبت به شناسایی ژن‌های

حدت حمل شونده توسط آن پلاسمید اقدام نمود. در صورتی که ژن‌های حمل‌شونده توسط آن پلاسمید دارای رپلیکون مشخص باشند و با بیماری‌زایی نیز در ارتباط باشند، می‌توان از رپلیکون آن پلاسمید به‌عنوان یک مارکر احتمالی برای ردیابی سویه‌های به شدت بیماری‌زا STEC استفاده نمود. در این راستا، بررسی نتایج نشان داد که رپلیکون FIB بالاترین فراوانی را در میان سویه‌های STEC مورد مطالعه دارد. همراستا با این پژوهش، در مطالعات دیگر نیز به فراوانی رپلیکون FIB در سویه‌های STEC اشاره شده است (۲۶، ۲۷). به نظر می‌رسد که رپلیکون FIB نه تنها در پاتوتیپ STEC، بلکه در سایر پاتوتیپ‌های *E. coli* نیز از فراوانی بالایی برخوردار است و به‌عنوان شایع‌ترین رپلیکون پلاسمید در *E. coli* شناخته می‌شود (۷). اما در ارتباط با سویه‌های بیماری‌زا STEC، تنها ارتباط آنها با رپلیکون پلاسمید مربوط به رپلیکون K/B بوده است که ۵۷٪ جدایه‌های STEC واجد این رپلیکون، دارای *stx2* بودند و همچنین بیشترین جدایه‌های STEC دارای الگوی *stx2 + eae + ehxA* دارای این رپلیکون بودند. در مطالعه‌ای به ارتباط پلاسمیدهای با رپلیکون K/B با جدایه‌های *E. coli* بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک اشاره شده است که می‌تواند حائز

می‌شوند. در نهایت لازم است که پراکندگی این رپلیکون در سویه‌های کمتر بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا STEC و نیز پاتوتیپ‌های دیگر *E. coli* بررسی شود تا مطمئن شد که پلاسمیدهای مربوط به این نوع رپلیکون اختصاصی سویه‌های به شدت بیماری‌زا STEC هستند. در رابطه با رپلیکون K/B نیز، از آنجایی که پلاسمیدهای واجد این رپلیکون در سویه‌های خطرناک مورد مطالعه شناسایی شدند، بررسی اختصاصیت آنها در سویه‌های STEC جدا شده از بیماران با علائم شدید و همچنین بررسی ارتباط آن با تحت تیپ ژن *stx2* پیشنهاد می‌گردد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری پایانی، این مطالعه نشان داد که پلاسمیدهای با رپلیکون K/B مهم‌ترین نوع پلاسمید در سویه‌های STEC با ریسک بالای بیماری محسوب می‌شوند که بیانگر اهمیت ژن‌های حدت کدشونده بر روی این نوع پلاسمید و نقش آنها در بیماری‌زایی می‌باشد.

سپاسگزاری: بدین‌وسیله از کلیه تکنسین‌های آزمایشگاه /شریشیاکلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، قدردانی می‌شود. پژوهش حاضر در قالب رساله دکتری به شماره ۵۷۲۹۹ انجام گرفته است.

اهمیت باشد (۲۸). در مورد رپلیکون I1 نیز، ارتباط آن با سروگروپ مهم O26 قابل توجه بود، به نحوی که هر ۳ جدایه دارای رپلیکون I1 متعلق به سروگروپ O26 بودند. با این حال، بررسی مطالعات دیگر نشان می‌دهد که رپلیکون FIB همچنان از نظر فراوانی در سویه‌های بیماری‌زا و بالینی STEC در رتبه اول قرار دارد (۲۹). به‌طور کلی رپلیکون‌های خانواده F از جمله رپلیکون FIB به‌طور قابل توجهی در باکتری‌های روده‌ای حضور دارند و با فراهم کردن ژن‌های حدت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک باعث افزایش بیماری‌زایی باکتری می‌شوند (۳۰).

رپلیکون FIB تنها از نظر فراوانی مهم‌ترین نوع رپلیکون در سویه‌های خطرناک STEC محسوب می‌شود، با این حال نتیجه‌گیری در مورد اختصاصی بودن برای سویه‌های خطرناک STEC و کاربرد آن به‌عنوان مارکر نیاز به بررسی بیشتر این رپلیکون در مجموعه‌ای از جدایه‌های STEC، به‌ویژه سروگروپ‌های مهم به دست آمده از بیماران با علائم شدید دارد که تحت تیپ ژن *stx2* آنها مشخص باشد. همچنین لازم است که پلاسمیدهای FIB به دست آمده از این بیماران، از منظر محتوای ژنی به دقت بررسی شوند تا اطمینان حاصل کرد که ژن‌های حدت مسئول تشدید بیماری بر روی پلاسمیدهای با رپلیکون FIB کد

References

- 1- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(2): 123–40.
- 2- Donnenberg MS, Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest*. 2001; 107(5): 539–48.
- 3- Badouei MA, Taban H, Nemati A, Santos LF Dos. Molecular serotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of animal origin in Iran reveals the presence of important non-O157 seropathotypes. *Vet Res Forum*. 2023; 14(5): 267–74.
- 4- Donnenberg M. *Escherichia coli*: pathotypes and principles of pathogenesis.

Academic Press. 2013. 1–273.

- 5- Ohnishi M, Terajima J, Kurokawa K, Nakayama K, Murata T, Tamura K, et al. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(26): 17043–8.

6- European Centre for Disease Prevention and Control. *Chlamydia infection*. In: EC. **STEC infection; Annual Epidemiological Report for 2021**. DC Annu Epidemiol Rep 2021. Stockholm: ECDC; 2022.

- 7- Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ*

Microbiol. 2007; 73(6): 1976–83.

8- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005; 63(3): 219–28.

9- Delannoy S, Beutin L, Fach P. Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(4): 1083–8.

10- Delannoy S, Tran ML, Fach P. Insights into the assessment of highly pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and raw milk cheeses by High Throughput Real-time PCR. *Int J Food Microbiol.* 2022; 366: 109564.

11- Bellwood B, Andrasik-Catton M. Veterinary Technician's Handbook of Laboratory Procedures. *John Wiley & Sons.* 2023.

12- Cappuccino JC, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. Benjamin/Cumming Pub. Co., New York; 1992.

13- Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med J.* 2009; 41(2): 117–22.

14- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*(O111), and *rfb*(O157). *J Clin Microbiol.* 1998; 36(2): 598–602.

15- Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A new Shiga toxin 2 variant (*Stx2f*) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(3): 1205–8.

16- Sánchez S, Llorente MT, Echeita MA, Herrera-León S. Development of three multiplex PCR assays targeting the 21 most clinically relevant serogroups associated with Shiga toxin-producing *E. coli* infection in humans. *PLoS One.* 2015; 10(1): 1–11.

17- DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Anim Heal Res Rev.* 2011; 12(2): 169–85.

18- Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: A comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(8): 2427–32.

19- Istituto Superiore di Sanità. Identification of the VTEC serogroups mainly associated with

human infections by conventional PCR amplification of O-associated genes. *EU Ref Lab E coli.* 2020; 1–8.

20- Liu Y, DebRoy C, Fratamico P. Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. *Mol Cell Probes.* 2007; 21(4): 295–302.

21- ISO (International Organization for Standardization). Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O11. Available online <https://www.iso.org/standard/53328.html>. 2012; ISO/TS 131.

22- Anonymous. Detection, isolation and identification of top seven Shiga Toxin producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Available online at https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-08/MLG-5C02.pdf. 2021.

23- Brandal LT, Tunsjø HS, Ranheim TE, Løbersli I, Lange H, Wester AL. Shiga toxin 2a in *Escherichia albertii*. *Journal of clinical microbiology.* United States. 2015; 53(4): 1454–5.

24- Ooka T, Tokuoka E, Furukawa M, Nagamura T, Ogura Y, Arisawa K, et al. Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(1): 144–6.

25- Asadi Karam M, Bouzari S, Oloomi M, Aslani M, Jafari A. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2010; 2(1): 3–7.

26- Salaheen S, Kim SW, Springer HR, Hovingh EP, Van Kessel JAS, Haley BJ. Genomic diversity of antimicrobial-resistant and Shiga toxin gene-harboring non-O157 *Escherichia coli* from dairy calves. *J Glob Antimicrob Resist.* 2023; 33: 164–70.

27- Castro VS, Polo RO, de Souza Figueiredo EE, Bumunange EW, McAllister T, King R, et al. Inconsistent PCR detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Insights from whole genome sequence analyses. *PLoS One.* 2021; 16(9): 1–26.

28- Berg ES, Wester AL, Ahrenfeldt J, Mo SS, Slettemeås JS, Steinbakk M, *et al.* Norwegian patients and retail chicken meat share cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and IncK/*bla*_{CMY-2} resistance plasmids. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23(6): 407.e9-407.e15.

29- Bumunang EW, Zaheer R, Stanford K, Laing C, Niu D, Guan LL, *et al.* Genomic

Analysis of Shiga Toxin-Producing *E. coli* O157 Cattle and Clinical Isolates from Alberta, Canada. *Toxins (Basel).* 2022; 14(9): 603.

30- Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(12): 2518-2529.



Plasmid Replicon Typing and Comparison with Virulent Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates in Animal Sources

Ali Nemati¹, Mahdi Askari Badouei^{*2}, Gholamreza Hashemi Tabar³

1- PhD Student in Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Receive: January 9, 2024; Revise: February 3, 2024; Accept: February 4, 2024

 10.22034/nfvm.2024.434828.1222

Summary

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are responsible for severe human diseases, such as hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS). Controlling infections associated with STEC poses a significant challenge, particularly in the timely tracking and identification of pathogenic strains in environmental, food, and clinical samples. Currently, the detection protocols in the European Union (ISO/TS 13136) and the United States (MLG5B.05) rely on the genes *stx* and *eae*, along with specific serogroup-associated genes. Here, we investigated various replicons and compared them with major pathogenic serogroups and *stx2*-positive strains to identify crucial replicons that can potentially harbor virulence genes, overcoming the limitations of ISO/TS 13136 and MLG5B.05 methodologies by focusing on the virulence genes encoded on these plasmids as alternative markers. Ninety-six STEC isolates from various animal hosts were subjected to single and multiplex PCR assays. Among the 82 STEC strains carrying plasmids, the prevalence of different replicons, including FIB (69/82, 84.1%), K/B (21/82, 25.6%), B/O (11/82, 13.4%), P (8/82, 9.8%), Y (6/82, 7.3%), FIA (3/82, 3.7%), II (3/82, 3.7%), and L/M (1/82, 1.2%), was determined. While the frequency of FIB plasmids was notable, an association between pathogenic STEC strains and K/B plasmids was observed. Most STEC isolates carrying the *stx2* + *eae* + *ehxA* gene pattern were associated with K/B replicon. The study suggests examining the correlation between plasmid types and *stx2* gene subtypes and determining the genetic content of these plasmids to assess virulence and identify potential genetic markers.

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Plasmid, Replicon, Marker



بررسی شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*، لیستریا مونوسیتوژنز و سودوموناس در شیر خام گاو عرضه شده در شهرستان گچساران

مقداد نظری^۱، ابراهیم رحیمی^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۰۴ آذر ۱۴۰۲، بازنگری: ۰۱ بهمن ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۹ بهمن ۱۴۰۲

doi 10.22034/nfvm.2024.426869.1214

چکیده

باکتری های سرماگرا در شیر خام به دلیل توانایی در تولید آنزیمها و بیوفیلیمهای مقاوم در برابر حرارت، صنایع لبنی را با فساد و مشکلات فنی قابل توجهی مواجه می کنند، همچنین می توانند سبب مخاطراتی از جمله گاستروانتریت در انسان شوند. در همین راستا هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*، لیستریا مونوسیتوژنز و سودوموناس در شیر خام گاو عرضه شده در شهرستان گچساران می باشد. در این مطالعه ۱۰۰ نمونه شیر خام از مراکز عرضه این محصول به صورت تصادفی نمونه گیری و در شرایط سترون به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی انتقال داده شد. نتایج نشان داد که میزان آلودگی به سودوموناس ۳۰ نمونه (۳۰ درصد)، لیستریا مونوسیتوژنز ۱۰ نمونه (۱۰ درصد) و *یرسینیا انتروکولیتیکا* ۴ نمونه (۴ درصد) بود، همچنین آنالیزهای آماری نشان داد که بین میزان آلودگی سودوموناس و *یرسینیا انتروکولیتیکا* و لیستریا مونوسیتوژنز تفاوت آماری معنی دار است ($P < 0.05$). نتایج تست های آنتی بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت در سودوموناس، مربوط به آموکسی کلاو و آمپی سیلین، در لیستریا مونوسیتوژنز مربوط به آموکسی کلاو و سولفامتاکسازول و در *یرسینیا انتروکولیتیکا* پنی سیلین و جنتامایسین بود. با توجه به بالا بودن میزان آلودگی شیرهای خام به میکروارگانیزم های سایکروتروف، توصیه می شود از مصرف شیر به صورت خام خودداری شود و جهت درمان گاستروانتریت ناشی از شیوع باکتری های پاتوژن غذایی محدودیت اعمال گردد.

واژگان کلیدی: سودوموناس، شیر خام، لیستریا مونوسیتوژنز، مقاومت آنتی بیوتیکی، *یرسینیا انتروکولیتیکا*

مقدمه

بیماری و مرگ و میر ناشی از آلودگی‌های مواد غذایی یک تهدید دائمی برای سلامت عمومی و مانع مهمی برای توسعه اجتماعی-اقتصادی در سراسر جهان است. برای اندازه‌گیری بیماری‌های منتقله از غذا (Food Borne Diseases)، سازمان بهداشت جهانی (WHO)، گروه مرجع اپیدمیولوژی بار بیماری‌های منتقله از غذا (Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group) را ایجاد کرد که در اینجا اولین تخمین‌های خود را از بروز، میزان مرگ و میر و بار بیماری ناشی از ۳۱ عامل منتقل شونده از غذا به انسان را گزارش دادند (۱).

شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی با عوارض قابل توجهی در سراسر جهان گزارش شده است و خطری برای جمعیت انسانی به همراه دارد. به‌طور همزمان، در کشورهای در حال توسعه، بیماری‌های اسهالی دلیل اصلی مرگ و میر هستند. در کشورهای صنعتی، بیماری‌های ناشی از غذا نادر نیستند زیرا ۳۰ درصد از جمعیت جهان هر ساله بیماری‌های ناشی از غذا را تجربه می‌کنند. میزان بروز در فرانسه ۱۲۱۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر، ۲۶۰۰ مورد در ۱۰۰۰۰۰ در بریتانیا و بیش از ۲۵۰۰۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در استرالیا و ایالات متحده گزارش شده است. باکتری‌های بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی می‌توانند در مراحل مختلف تهیه غذا منتقل شوند. انتقال باکتری‌های بیماری‌زا، می‌تواند در هنگام ذبح و در تماس گوشت با روده، پوست یا خز حیوان و در نهایت در آشپزخانه در حین تهیه غذا به‌دلیل حمل نادرست رخ دهد (۲).

از آنجایی که شیر جزو مواد غذایی زودفاسدشدنی است که دارای مواد مغذی مورد نیاز رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد، از ادوار گذشته تحت مطالعات و تیمارهای مختلف نگهداری، قرار گرفته است. شیر به‌دلیل فعالیت آبی (Aw)، بالا، pH نزدیک خنثی (محدوده ۶/۶ تا ۶/۸) و ویتامین‌های گروه B و مواد معدنی محیط مطلوبی جهت رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها است.

اگرچه شیر حاوی بسیاری از مواد مغذی معدنی مانند آهن، کبالت، مس و مولیبدن است، اما برخی از آنها مانند آهن ممکن است به شکل قابل استفاده وجود نداشته باشند، همچنین حاوی اسید اورونیک محرک رشد (پیش‌ساز متابولیک پیریمیدین‌ها) است. مهارکننده‌های میکروبی عمده در شیر خام، لاکتوفرین و سیستم لاکتوپراکسیداز هستند. مهارکننده‌های طبیعی با اهمیت کمتری شامل لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی c و سیستم‌های اتصال فولات و ویتامین B12 هستند. لاکتوفرین، یک گلیکوپروتئین، به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی عمل می‌کند (۳).

باکتری‌های سرماگرا که شیر خام و پاستوریزه را فاسد می‌کنند، عمدتاً میله‌ای‌های گرم‌منفی هوازی از خانواده Pseudomonadaceae هستند که ۶۵ تا ۷۰ درصد جدایه‌های سرماگرا از شیر خام مربوط به گونه‌های *سودوموناس* هستند. اگرچه سایر جنس‌ها، از جمله *آئروموناس*، *لیستریا*، *استافیلوکوکوس*، *انتروکوکوس* و خانواده انتروباکتریاسه‌ها ممکن است در شیر خام وجود داشته باشند و تعداد آنها در طول ذخیره‌سازی افزایش یابد، اما زمانی که شیر نگهداری می‌شود، معمولاً توسط هوازی‌های اجباری گرم‌منفی دچار فساد می‌شوند (۳، ۴).

خاک، آب، حیوانات و مواد گیاهی زیستگاه طبیعی باکتری‌های سرماگرای موجود در شیر را تشکیل می‌دهند. مواد گیاهی، مانند چمن و یونجه مورد استفاده برای خوراک دام، ممکن است حاوی بیش از 10^8 سایکروتروف در هر گرم باشد. باکتری‌های سرماگرا جدا شده از آب اغلب تولیدکنندگان فعال آنزیم‌های خارج سلولی هستند و به سرعت در شیر خام نگهداری شده در یخچال رشد می‌کنند (۳، ۴).

لیستریا مونوسی‌توژنز یک پاتوژن غذایی است که عامل بیماری لیستریوزیس در انسان است. این باکتری در درجه اول یک ساپروفیت محیطی است که در محیط‌هایی مانند آب، خاک و پوشش گیاهی یافت می‌شود. در افراد مستعد، مانند نوزادان، سالمندان، زنان باردار و افرادی که دارای

تنوع آنتی‌ژنی در دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی خود بیش از ۵۰ سروتیپ مختلف تقسیم می‌شود. سویه‌هایی با سروتیپ: O:5، O:27، O:3 و O:9 جزو عوامل عمده بیماری غذایی افراد در اروپا، ژاپن، آفریقای جنوبی و کانادا هستند (۹).

یرسینیا انتروکولیتیکا به دلیل توانایی رشد و تکثیر در دمای یخچال از باکتری‌های سرمادوست بوده و تولیدکننده انتروتوکسین است. *یرسینیا انتروکولیتیکا* به وسیله گوشت حیوانات آلوده به خصوص خوک، گاو، گوسفند، بز و طیور و همچنین شیر و سبزی‌های آلوده به انسان منتقل می‌شود. این باکتری عامل بیماری‌های گوارشی متعدد به خصوص در کودکان و نوجوانان می‌باشد که منجر به التهاب قسمت انتهایی ایلیوم، اسهال، تورم عقده‌های لنفاوی مزانتریک، شبه آپاندیسیت، تورم صفق، سوراخ شدن روده‌ها و در موارد حاد موجب آسیب‌های کلیوی، التهاب مزمن مفاصل و اختلال در سیستم اعصاب مرکزی می‌شود (۹، ۱۰)؛ لذا با توجه به مخاطرات ذکر شده، هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*، لیستریا *مونوسیتوژنز* و *سودوموناس* در شیر خام گاو عرضه شده در شهرستان گچساران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: ابتدا ۱۰۰ نمونه شیر خام از ۵ مرکز عرضه این محصول در شهرستان گچساران به صورت تصادفی در ۴ ماه (مرداد، شهریور، مهر و آبان) نمونه‌گیری و سپس در شرایط سترون، داخل لوله‌های استریل درپوش‌دار و در فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد شهرکرد انتقال داده شدند.

جستجوی لیستریا *مونوسیتوژنز*: نمونه‌ها در هر کدام از محیط‌های مغذی به مدت ۲۹ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری و به منظور رشد پرگنه‌های لیستریا، باکتری‌ها از محیط مغذی ثانویه به محیط آگار انتخابی لیستریا (Merck, Palcam agar

نقص ایمنی هستند، عفونت‌ها منجر به لیستریوز مهاجم می‌شود که میزان مرگ و میر بالایی بین ۲۰ تا ۳۰ درصد دارد. به‌عنوان یک پاتوژن منتقله از غذا، لیستریا *مونوسیتوژنز* با چندین تنش فیزیکی و شیمیایی مواجه می‌شود که مانع رشد و بقای آن در طول زنجیره ارزش غذایی می‌شود. این باکتری گرم‌مثبت، میکروآئروفیلیک، میله‌ای شکل، بدون اسپور، متحرک و کاتالاز مثبت است. لیستریا ۷ گونه هستند که مهم‌ترین گونه‌ای که سبب ایجاد لیستریوزیس در انسان و حیوان می‌شود، لیستریا *مونوسیتوژنز* است. لیستریوز به‌طور معمول با علائم شبیه سرماخوردگی بروز می‌کند، اما در لیستریوز تهاجمی علائم شدیدتری مانند سپتیسمی، مننگوانسفالیت و سقط جنین ایجاد می‌شود. حداقل تعداد باکتری برای بیماری‌زای لیستریا *مونوسیتوژنز* وابسته به حساسیت فرد و نوع غذا است (۵، ۶).

جنس *سودوموناس* یکی از متنوع‌ترین گروه‌های زیست محیطی مهم باکتری‌های شناخته شده است. این باکتری‌ها به‌وسیله یک یا تعدادی فلاژل قطبی، متحرک هستند اما برخی سویه‌ها واجد فلاژل‌های جانبی با طول موج‌های متفاوت نیز هستند، به استثنای گونه *سودوموناس مائی* که فاقد فلاژل است. *سودوموناس* یک پاتوژن فرصت‌طلب شایع بیمارستانی است که مسئول بخش وسیعی از عفونت‌های انسانی شامل عفونت‌های دستگاه ادراری است. *سودوموناس* از رایج‌ترین میکروارگانیزم‌های فاسدکننده مواد غذایی به‌ویژه غذاهای با محتوای بالای Aw و pH محدود خنثی، مانند گوشت قرمز، شیر، گوشت سفید و... هستند (۷، ۸).

یرسینیا انتروکولیتیکا پاتوژنی قابل انتقال از طریق مواد غذایی است که در آب، فرآورده‌های لبنی و گوشت یافت می‌شود. این پاتوژن از رایج‌ترین عوامل التهاب دستگاه گوارش ناشی از عفونت‌های مواد غذایی در غرب و اروپای شمالی است و دارای شیوع فزاینده‌ای در ایالات متحده و کانادا می‌باشد. *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر اساس

با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی از جمله تست اکسیداز، کاتالاز، تست MR/VP، بررسی حرکت و تولید اندول در محیط کشت SIM، تولید پیگمان، واکنش در محیط کشت TSI بررسی شدند (۱۲).

سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی: تست آنتی‌بیوگرام به روش Diffusion_Disk انجام گرفت. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با محلول استاندارد ۱/۵ مک‌فارلند، در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از آن دیسک‌های آنتی‌بیوگرام، شامل آمپی‌سیلین (AM)، پنی‌سیلین (PEN)، جنتامایسین (GM)، سولفامتاکسازول (SXT)، آموکسی‌کلاو (AMC)، کانامایسین و آمی‌کاسین روی محیط کشت قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص گردید (۱۴).

آنالیزهای آماری: در مطالعه حاضر از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ و آنالیز آماری کای اسکور برای آنالیز داده‌ها استفاده شد، همچنین برای سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از روش ناپارامتریک فریدمن استفاده شد. سطح معنی‌داری ($p < 00/05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج نشان داد که بیشترین میزان آلودگی در شیر خام عرضه شده در شهرستان گچساران مربوط به سودوموناس بود، در خصوص سایر باکتری‌ها به ترتیب لیستریا مونوسی‌توزنز و سپس یرسینیا انتروکولیتیکا دارای کمترین میزان نسبت به سودوموناس بودند. همچنین آنالیزهای آماری نشان داد که تفاوت بین میزان آلودگی در سودوموناس نسبت به یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریا مونوسی‌توزنز از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). همان‌گونه که در جدول (۱) مشخص شده است، در مجموع میزان آلودگی به سودوموناس ۳۰ نمونه (۳۰ درصد)، لیستریا مونوسی‌توزنز ۱۰ درصد (۱۰ نمونه) و یرسینیا انتروکولیتیکا ۴ درصد (۴ نمونه) بوده است که

(Germany) انتقال داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری در انکوباتور (EC 160, Parsfaraso, Iran) شدند. پرگنه‌های رشد کرده در هر پلیت از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفته و پرگنه‌های رشد کرده، سبز زیتونی به قطر ۱/۵ میلی‌متر که مرکز آنها سیاه یا خاکستری رنگ و اطراف همه آنها هاله سیاه‌رنگ است. پرگنه‌های مشکوک به لیستریا را مورد آزمون رنگ‌آمیزی گرم قرار داده تا گرم‌مثبت یا منفی بودن آنها تشخیص داده شود. سپس روی پرگنه‌های گرم‌مثبت، آزمایش کاتالاز انجام شد. آزمایش حرکت در ۲۵ درجه سلسیوس روی نمونه‌هایی که کاتالاز مثبت بودند انجام و نمونه‌های مثبت مشخص و شمارش شدند (۱۱، ۱۲).

جستجوی یرسینیا انتروکولیتیکا: ابتدا ۳۰/۹۳ گرم از محیط کشت اولیه که (Mirmedia, Iran) PSB بود به داخل ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه شد. سپس برای استریلیزاسیون به اتوکلاو انتقال و مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱۵ پوند و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شد. سپس مقدار ۴۰ گرم از محیط کشت اصلی یرسینیا انتروکولیتیکا (Mirmedia, Iran) CIN به ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه شد. سپس برای استریلیزاسیون در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱۵ پوند و حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از این مرحله، یک ویال مکمل به آرامی به محیط کشت پایه اضافه و در پلیت‌های یکبار مصرف پخش شد. محیط CIN آگار شامل آنتی‌بیوتیک‌هایی از جمله: سفولودین، ایرگاسان، نوویسین است. ظهور کلنی‌های چشم‌گاو نشان‌دهنده آلودگی به یرسینیا انتروکولیتیکا بود (۱۳).

جستجوی سودوموناس: ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه شیر خام بر روی محیط‌های بلادآگار و مک‌کانکی آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری در انکوباتور (EC 160, Parsfaraso, Iran) شدند. پس از رشد باکتری نمونه‌ها از نظر وجود پرگنه‌های مشکوک به سودوموناس بررسی و

بیشترین و کمترین میزان آلودگی به ترتیب برای سودوموناس و *یرسینیا انتروکولیتیکا* بوده است.

جدول ۱- مقایسه درصد آلودگی باکتری‌های مختلف در شیر خام

بakterی	تعداد نمونه	سودوموناس	لیستریا مونوسیتوژنز	یرسینیا انتروکولیتیکا
مرداد	۲۵	(۴ نمونه) ۱۶ درصد	(۱ نمونه) ۴ درصد	(۰)
شهریور	۲۵	(۶ نمونه) ۲۴ درصد	(۳ نمونه) ۱۲ درصد	(۱ نمونه) ۴ درصد
مهر	۲۵	(۸ نمونه) ۳۲ درصد	(۲ نمونه) ۸ درصد	(۲ نمونه) ۸ درصد
آبان	۲۵	(۱۲ نمونه) ۴۸ درصد	(۴ نمونه) ۱۶ درصد	(۱ نمونه) ۴ درصد
مجموع	۱۰۰	(۳۰ نمونه) ۳۰ درصد	(۱۰ نمونه) ۱۰ درصد	(۴ نمونه) ۴ درصد
سطح معنی‌داری	--	۰/۳۴*	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۰۹۶ ^{ns}

ns: تفاوت بین آلودگی نمونه‌های مختلف معنی‌دار نیست. *: تفاوت بین آلودگی نمونه‌های مختلف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



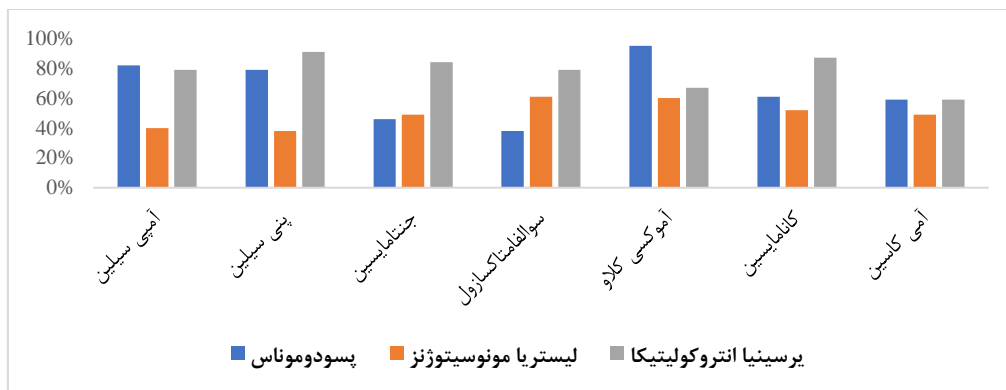
نمودار ۱- شیوع آلودگی باکتری‌ها در مواد غذایی مختلف

مونوسیتوژنز مربوط به آموکسی‌کلاو (۶۰ درصد) و سولفامتاکسازول (۶۱ درصد) و در *یرسینیا انتروکولیتیکا* پنی‌سیلین (۹۱ درصد) و جنتامایسین (۸۴ درصد) بود.

نتایج تست‌های آنتی‌بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت در *سودوموناس*، مربوط به آموکسی‌کلاو (۹۵ درصد) و آمپی‌سیلین (۸۲ درصد)، در لیستریا

جدول ۲- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیک جدایه‌ها

آنتی‌بیوتیک	سودوموناس	لیستریا مونوسیتوژنز	یرسینیا انتروکولیتیکا
آمپی‌سیلین (AM)	۸۲ درصد	۴۰ درصد	۷۹ درصد
پنی‌سیلین (PEN)	۷۹ درصد	۳۸ درصد	۹۱ درصد
جنتامایسین (GM)	۴۶ درصد	۴۹ درصد	۸۴ درصد
سولفامتاکسازول (SXT)	۳۸ درصد	۶۱ درصد	۷۹ درصد
آموکسی‌کلاو (AMC)	۹۵ درصد	۶۰ درصد	۶۷ درصد
کانامایسین (KN)	۶۱ درصد	۵۲ درصد	۸۷ درصد
آمی‌کاسین (AN)	۵۹ درصد	۴۹ درصد	۵۹ درصد
مجموع	۶۵/۷۱ درصد	۴۹/۸۵ درصد	۷۸ درصد



نمودار ۲- میزان مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

شیر خام به دلیل ارزش غذایی بالا، محیطی عالی برای رشد طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها است. بیش از ۱۶۰ گونه باکتری در شیر خام شناسایی شده است. این باکتری‌ها از منابع مختلفی از جمله هوا، خاک، آب، تیت و تجهیزات شیردوشی آلوده منشاء می‌گیرند. نگهداری شیر خام در شرایط یخچال در سطح جهانی برای کنترل باکتری‌های مزوفیل و گرمادوست در شیر خام انجام می‌شود، اما یخچال نیز شرایط ایده‌آلی را برای رشد باکتری‌های سایکروتروف فراهم می‌کند که می‌توان به لیستریا، یرسینیا انتروکولیتیکا و سودوموناس اشاره کرد (۱۵). باکتری‌های سرماگرا را می‌توان با فرایندهای حرارتی معمولی از بین برد، اما بیشتر آنزیم‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها در برابر حرارت مقاوم هستند؛ بنابراین در محصولات لبنی فعال باقی می‌مانند که متعاقب آن سبب فساد در محصول و ایجاد بیماری در انسان می‌شود. بنابراین پایش میکروبی شیرخام از دیدگاه سلامت و ایمنی غذایی حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر نشان داده شد که میزان آلودگی در شیر خام به سودوموناس ۳۰ درصد، لیستریا مونوسیژنوز ۱۰ درصد و یرسینیا انتروکولیتیکا ۴ درصد بود که زنگ خطری برای مصرف‌کنندگان و حتی تولیدکنندگان به سبب عدم رعایت شرایط بهداشتی می‌باشد.

مطالعه رضاپور و حنیفان (۱۳۹۶)، روی بررسی میزان آلودگی و تولید بیوفیلم باکتری‌های سرماگرا در مخازن

شیرخام و تجهیزات فرآوری محصولات لبنی گزارش دادند که تعداد ۸۰ نمونه از شیرخام که شامل ۳۰ نمونه از مخازن شیرخام، ۳۰ نمونه تجهیزات و فرآوری و ۲۰ نمونه از سطوح مختلف نمونه‌گیری شد. نتایج آنها نشان داد که از ۸۰ نمونه، ۲۶/۲۵ درصد آلوده به باکتری‌های سرمادوست بودند که از مجموع آنها ۳۲/۲۵ درصد آلوده به سودوموناس بودند (۱۶)، که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در این مطالعه شیوع آلودگی به سودوموناس ۳۰ درصد بود. زادصفر و همکاران (۱۳۹۲)، بر روی شیوع آلودگی شیر خام گاو نمونه‌گیری شده در شهرستان قم به سودوموناس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جداپه‌ها دریافتند که از مجموع ۱۱۷ نمونه مورد آزمایش ۳۲/۵۵ درصد آلوده به سودوموناس بودند و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها نشان داد که بیشترین مقاومت به سفنازیدیموم و کمترین مقاومت به آمیکاسین وجود داشته است (۱۲)، که مطابق با نتایج حاصل از مطالعه حاضر است. در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت مربوط به آموکسی‌کلاو و آمپی‌سیلین بود. در پژوهشی مختاری و همکاران (۱۳۹۵) بر روی نمونه‌های شیر گاو در شهرستان تهران گزارش دادند که از تعداد ۱۵۰ نمونه، ۵۱ نمونه (۳۴ درصد) آلوده به سودوموناس بودند. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کانامایسین به میزان ۱۰۰ درصد، ۹۴/۲ و ۹۴/۲ درصد به ترتیب مشاهده شد. بیشترین مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین،

آمی‌سیلین و تتراسایکلین مشاهده شد (۱۷)، که با مطالعه حاضر در خصوص میزان شیوع آلودگی به سودوموناس همسو است. همچنین بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر مربوط به آموکسی‌کلاو و آمی‌سیلین بود که با مطالعه نامبرده مطابقت دارد.

شریف‌زاده و همکاران (۱۳۷۹) در یک بررسی به جداسازی *یرسینیا انتروکولیتیکا* و لیستریا مونوسیتوژنز از شیرهای خام و پاستوریزه چهارمحل و بختیاری دریافتند که از مجموع ۴۰۰ نمونه شیر خام و پاستوریزه (هر کدام ۲۰۰ نمونه) برای شیر خام ۳ نمونه (۱/۵ درصد) آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز و ۶ نمونه (۳ درصد) آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* آلوده بود. همچنین در شیرهای پاستوریزه لیستریا مونوسیتوژنز منفی و *یرسینیا انتروکولیتیکا* ۲ مورد مثبت بودند (۱۸)، در مطالعه حاضر شیوع آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز و *یرسینیا* به ترتیب ۱۰ و ۴ درصد بود که در خصوص *یرسینیا انتروکولیتیکا* تا حدودی با مطالعه نامبرده مطابقت دارد.

فضل‌آرا و همکاران (۱۳۹۴) به بررسی آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیرهای گاو عرضه شده در اهواز و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها گزارش دادند که از ۱۵۰ نمونه، ۳۶ نمونه (۲۴ درصد) به *یرسینیا انتروکولیتیکا* آلوده بود. نتایج تست سنجش حساسیت نشان داد که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها به سیپروفلوکسین حساس بودند. پس از آن به ترتیب ۱۵/۷۷ درصد به جنتامایسین، ۱۷/۷۱ درصد به تتراسایکلین، ۲۷/۸۵ درصد به سفنازیدیم، ۳۵/۸۲ درصد به نالیدیکسیک اسید، ۴۱/۷۷ درصد به کانامایسین، ۶۴/۶۷ درصد به تری‌متوپریم سولفامتاکسازول، ۶۴/۱۷ درصد به آموکسی‌سیلین و ۷۱/۱۴ درصد به سفالوتین حساس بودند. همچنین در هیچ‌کدام از جدایه‌ها حساسیت به اریترومایسین مشاهده نشد که نشان‌دهنده‌ی بیشترین مقاومت جدایه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* به این

آنتی‌بیوتیک می‌باشد (۱۹) که با مطالعه حاضر از لحاظ بار میکروبی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که توسط حنیان (۱۳۹۱) بر روی جداسازی، شناسایی و تعیین بیوتیپ *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیماری‌زا از شیرهای پاستوریزه انجام شد نشان داده شد که از تعداد ۲۴۲ نمونه شیر پاستوریزه عرضه‌شده در تبریز *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیماری‌زا در ۱۶ نمونه (۶/۶۱ درصد) از نمونه‌های شیر پاستوریزه مثبت بود (۲۰)، که مطابقتی با مطالعه حاضر ندارد. در این مطالعه شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* ۴ درصد در شیر خام بود.

مطالعه‌ای توسط رحیمی و همکاران (۱۳۸۸) بر روی فراوانی گونه‌های لیستریا مونوسیتوژنز در لبنیات عرضه شده در شهرستان‌های شهرکرد و شیراز انجام شد. آنها گزارش دادند که از تعداد ۱۷۸ نمونه شیر خام گاو، ۳۲ نمونه شیر خام بز، ۴۱ نمونه پنیر سنتی و ۶۰ نمونه پنیر سنتی، ۲۴ نمونه (۱۳/۵ درصد) به لیستریا مونوسیتوژنز آلوده بودند. به ترتیب میزان آلودگی برای شیر خام گاو، گوسفند، پنیر سنتی و بستنی سنتی برابر ۱۱/۱ درصد، ۳/۱ درصد، ۲۴/۴ درصد و ۱۳/۳ درصد بود (۲۱)، که در شیر خام گاو با مطالعه حاضر همسو می‌باشد.

مجتهدی و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای بر روی تعیین فراوانی آلودگی لیستریایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در استان لرستان دریافتند که از مجموع ۷۲۰ نمونه مواد لبنی، در ۹/۷۲ درصد لیستریا مونوسیتوژنز وجود داشت همچنین نتایج تست آنتی‌بیوگرام همه ایزوله‌ها به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، کوتریموکسازول و جنتامایسین حساس بودند و ۵ ایزوله لیستریا مونوسیتوژنز به اریترومایسین مقاوم بود (۲۲)، که همسو با مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آموکسی‌کلاو و سولفامتاکسازول بود.

نوروزی و همکاران (۱۳۹۱) بر روی ارزیابی لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی شده روی ۷۰ نمونه جمع‌آوری شده از فرآورده‌های لبنی مختلف در شهرهای تهران و

بابلسر دریافتند که در مجموع ۱۰ مورد آلودگی با لیستریا مونوسیتوژنز، ۴ مورد لیستریا اینوکوا، ۲ مورد لیستریا ولشیمیری و ۱ مورد لیستریا سلیگری در نمونه‌های شیر، پنیر معمولی و پنیر نرم شناسایی گردید. همچنین در این مطالعه در هیچ یک از نمونه‌های ماست و کره آلودگی لیستریایی مشاهده نگردید. (۲۳) که در خصوص میزان آلودگی با شیر خام مرتبط با مطالعه حاضر می‌باشد.

در مطالعه خالد و عباس (۲۰۱۹) در عراق بر روی آلودگی‌های میکروبی شیر خام به *یرسینیا/انتروکولیتیکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز*، در مجموع ۱۵۰ نمونه شیر گاو، گاو میش و گوسفند از بصره، عراق (۵۰ نمونه از هر گونه) جمع‌آوری شد. بیشترین آلودگی در شیر گاو (۲۴ درصد) و پس از آن شیر گاو میش (۲۲ درصد) و شیر گوسفند (۱۲ درصد) مشاهده شد. بیشترین حساسیت (۱۰۰ درصد) نسبت به استرپتومایسین، آزیترومایسین و جنتامایسین و پس از آن سیپروفلوکساسین و کلرامفنیکل با ۹۳/۳ درصد برای هر کدام مشاهده شد. حساسیت کم نسبت به وانکومایسین (۶/۶۶ درصد) و کلوکساسیلین (۳۳/۳ درصد) مشاهده شد (۲۴)، که برای شیر خام به لیستریا مونوسیتوژنز و *یرسینیا/انتروکولیتیکا* تا حدودی با مطالعه حاضر مطابقت دارد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی لیستریا مونوسیتوژنز مربوط به آموکسی‌کلاو (۶۰ درصد) و سولفامتاکسازول (۶۱ درصد) و در *یرسینیا/انتروکولیتیکا* پنی‌سیلین (۹۱ درصد) و جنتامایسین (۸۴ درصد) بود.

در مطالعه‌ای که توسط Ali و Al-Samarai (۲۰۲۰) بر روی آلودگی شیر خام گاو و بوفالو در عراق انجام گرفت گزارش دادند که از ۲۴۵ نمونه شیر خام گاو و گاو میش (۱۶۸ نمونه شیر خام گاو و ۷۷ نمونه شیر خام گاو میش) ۱۲ درصد به *یرسینیا/انتروکولیتیکا* آلوده بود. بیشترین نمونه‌های آلوده در شیر گاو (۱۴/۲ درصد) و پس از آن شیر گاو میش (۶/۹ درصد) به دست آمد (۲۵)، که با مطالعه حاضر در خصوص شیر خام گاو به *یرسینیا/انتروکولیتیکا* ۴ درصد و لیستریا مونوسیتوژنز ۱۰ درصد

آلودگی وجود داشت و مطابقت دارد.

مطالعه‌ای توسط شریفی‌یزدی و همکاران (۲۰۲۳) بر روی شیوع و ویژگی‌های *یرسینیا/انتروکولیتیکا* و *یرسینیا سودوتوبرکلوزیس* از شیر خام عرضه شده در تهران انجام شد. در این مطالعه ۳۶۰ نمونه شیر خام عرضه شده در شهرستان نمونه‌گیری شد. از ۳۶۰ نمونه شیر خام، ۴ جدایه *یرسینیا/انتروکولیتیکا* (۱/۱ درصد) شامل یک *Y. pseudotuberculosis* (۰/۲۷ درصد) و سه *Y. enterocolitica* (۰/۸۳ درصد) جدا شد (۲۶)، که میزان آلودگی مطالعه حاضر فراتر از آلودگی گزارش شده توسط نامبرده است.

مطالعه Zafar و همکاران (۲۰۲۰) بر روی آلودگی شیر خام به لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که تعداد ۹۰ نمونه از مراکز عرضه مختلف لبنیات شامل ۴۰ نمونه شیر خام، ۲۵ نمونه پنیر و ۲۵ نمونه ماست جمع‌آوری شد. نتایج مطالعه نشان داد که از مجموع ۹۰ نمونه، ۲۴ نمونه (۲۶/۶۶ درصد) برای لیستریا مونوسیتوژنز با بیشترین شیوع در شیر خام (۱۶) و پس از آن پنیر (۵) و ماست (۳) نمونه مثبت تشخیص داده شدند. بیشترین مقاومت برای پنی‌سیلین (۶۳/۱۵ درصد) در بین جدایه‌ها مشاهده شد و پس از آن کلیندامایسین (۵۷/۸۹ درصد)، سیپروفلوکساسین (۲۶/۳۱ درصد) و ریفامپیسین (۲۶/۳۱ درصد) و ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها حساس به آمپی‌سیلین، سفالوتین و کلرامفنیکل بودند (۲۷)، که شیوع لیستریا مونوسیتوژنز فراتر از مطالعه حاضر است. مقاومت پنی‌سیلین در مطالعه حاضر ۷۹ درصد بود که مطابقتی وجود ندارد.

در مطالعه‌ای بر روی شیوع و حساسیت ضد میکروبی گونه لیستریا جدا شده از شیر خام فله در شمال شرقی لهستان انجام شد که در آن ۵۰۰ نمونه شیر فله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در مجموع، از ۵۰۰ نمونه شیر، بر اساس خواص بیوشیمیایی، ۸ جدایه متعلق به جنس لیستریا مونوسیتوژنز (۱/۶ درصد) تایید شد. شناسایی بیشتر سویه‌های لیستریا نشان داد که ۳ سویه متعلق به

ژله‌ای شدن شیر، آزادسازی اسیدهای آمینه و کاهش عملکرد در تولید پنیر می‌شوند که می‌تواند ناشی از تولید پروتئاز باکتریایی باشد. به‌عنوان مثال لیپاز باکتریایی ناشی از فعالیت سرماگراها می‌تواند دمای پاستوریزاسیون را به راحتی تحمل کند. کیفیت شیر خام و فرآورده‌های لبنی با سرد کردن از مزرعه تا کارخانه‌های فرآوری به‌طور قابل توجهی بهبود یافته است. اما متأسفانه شیوه‌های کنونی برای جمع‌آوری و ذخیره‌سازی شیر خام علی‌الخصوص در ایران، باعث رشد باکتری‌های سرماگرا می‌شوند که می‌توانند در دمای زیر ۷ درجه سانتی‌گراد رشد کنند. کلید تضمین ایمنی مواد غذایی فاسد شدنی، کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها است و کنترل دما در طول نگهداری غذا نقش مهمی در محدود کردن تولید مثل میکروارگانیسم‌ها دارد. بنابراین توصیه می‌شود استراتژی‌های پیشگیرانه برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های سرماگرا و آنزیم‌های آنها شامل محدود کردن رشد این باکتری‌ها و غیر فعال کردن آنزیم‌های آنها، حفظ شیوه‌های بهداشتی از مزرعه تا کارخانه رعایت گردد. همچنین جهت درمان گاستروانتریت ناشی از بیماری‌های منتقل شونده از مواد غذایی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به حداقل برسد.

گونه *L. monocytogenes* و ۵ سویه متعلق به گونه *L. innocua* بود. تجزیه و تحلیل حساسیت به عوامل ضد میکروبی نشان داد که همه جدایه‌ها، هر دو متعلق به گونه‌های *L. innocua* و *L. monocytogenes*، به آمپی‌سیلین حساس بودند (۲۸)، که با مطالعه حاضر همسو نمی‌باشد در این مطالعه ۱۰ درصد به لیستریا مونوسی‌توژنز آلودگی وجود داشت. در مطالعه‌ای (۲۰۱۱) که بر روی میزان آلودگی سودوموناس در شیر خام انجام گرفت، محققان گزارش دادند که از مجموع ۵۵ نمونه، ۴۲ نمونه سودوموناس جداسازی شد (۲۹)، که بسیار فراتر از مطالعه حاضر است. در مطالعه‌ای که توسط محمد و همکاران (۲۰۱۵) در مصر صورت گرفت دریافتند که از مجموع ۱۰۰ نمونه تصادفی شیر خام، گونه سودوموناس در ۶ درصد از نمونه‌های شیر خام قابل شناسایی است (۳۰)، که تا حدودی با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

باکتری‌های سرماگرا با محدود کردن ماندگاری شیر خام و محصولات لبنی از طریق تولید آنزیم‌های خارج سلولی پایدار در برابر حرارت، بر جنبه‌های اقتصادی در صنایع لبنی تأثیر می‌گذارند. این آنزیم‌ها همچنین باعث ایجاد مشکلات تکنولوژیکی مانند تشکیل طعم‌های بد،

References

- 1- Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS med.* 2015; 12(12): e1001923.
- 2- Abdul-Mutalib N, Syafinaz A, Sakai K, Shirai Y. An overview of foodborne illness and food safety in Malaysia. *Int Food Res J.* 2015; 22(3): 896.
- 3- Roberts D, Greenwood M. Practical food microbiology: John Wiley & Sons; 2008.
- 4- Fung F, Wang H-S, Menon S. Food safety in the 21st century. *Biomed J.* 2018; 41(2): 88-95.
- 5- Lyytikäinen O, Autio T, Maijala R, Ruutu P, Honkanen-Buzalski T, Miettinen M, et al. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J infec dise.* 2000; 181(5): 1838-41.
- 6- Abdimoghdam Z, Shamloo E, Atefi M. Frequency of *Listeria* species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. *Iran J Nut Sci Food Tech.* 2015; 10(3): 101-7.
- 7- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J molec sci.* 2020; 21(22): 8671. [In persian]
- 8- Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Gen & dise.* 2019; 6(2): 109-19.
- 9- Guillier L, Fravallo P, Leclercq A, Thebault A, Kooh P, Cadavez V, et al. Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections: a systematic review and meta-analysis. *Microb Analys.* 2021; 17: 100141.
- 10- Lamps LW, Havens JM, Gilbrech LJ, Dube PH, Scott MA. Molecular biogrouping of

pathogenic *Yersinia enterocolitica*: development of a diagnostic PCR assay with histologic correlation. *Amr J clin path.* 2006; 125(5): 658-64.

11- Townsend A, Strawn LK, Chapman BJ, Dunn LL. A systematic review of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* prevalence, persistence, and diversity throughout the fresh produce supply chain. *Foods.* 2021; 10(6): 1427.

12- Zadsafar F, Zargar M. Determine the antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from raw milk. *App Bio.* 2013; 3(10): 60-70. [In persian]

13- Alavi SM, Rahimi E, Tajbakhsh E. Identification and characterization of the virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from sheep and goat milk in Shahrekord. *J Mic World.* 2017; 10(3): 256-62. [In persian]

14- Heidarzadi M, Rahnama M, Alipoureskandani 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]

15- Yuan L, Sadiq FA, Burmølle M, Wang N, He G. Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review. *J food protec.* 2019; 82(7): 1148-59.

16- Rezapour R, Hanifian S. Contamination rate and biofilm formation by psychrotrophic bacteria from bulk milk tanks and dairy processing equipments. *J Food Microb.* 2018; 5(2): 79-89. [In persian]

17- Mokhtari AR, Zahraee Salehi T, Amini K, Shahcheraghi F. Isolation *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and genes integron class I of subclinical mastitis in dairy cows in Tehran. *Vet Res Bio Products.* 2016; 29(2): 37-44. [In persian]

18- Sharifzadeh A, Akhavan M, zarasvandi A, Alagha A. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* from raw and pasteurized milks of Chaharmahal and Bakhtiari. *J Food Sci Industry.* 2001; 1(1): 13-6. [In persian]

19- Fazlara A, Zarei M, Mavalizadeh A. Survey on contamination to *Yersinia enterocolitica* in raw cow milk distributed in Ahvaz area and evaluation of antibiotic resistance of isolates. *J Food Mic.* 2016; 3(3): 11-23. [In persian]

20- Hanifian S. Isolation, identification and biotyping of virulent *Yersinia enterocolitica* from pasteurized milk. *Food Hygiene.* 2012; 4(1): 25-33.

[In persian]

21- Rahimi E, Behzadnia A, Shakerian A, Momtaz H. Frequency of *Listeria* species from raw milk, traditional cheese and ice-cream in Shahrekord and Shiraz. *J Mic World.* 2010; 2(4): 243-8. [In persian]

22- Mojtahedi A, Tarrahi MJ, Sepahvand A, Khakpour AD, Radsari E, Ttavasoli M, et al. Frequency determination of *Listeria* contamination in dairy products and their antibiotic resistance pattern, department for controlling food stuffs, Lorestan. *Sci mag yafte.* 2004; 6(3): 27-32.

23- Norowzi J, Moradi Bidhendi S, Shafiee M. Detection of *actA* gene in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products. *J Mic World.* 2013; 6(6): 246-52.

24- Khalid D, Abbas B. Prevalence, antibiotic susceptibility, and virulence factors of *Yersinia enterocolitica* isolated from raw milk in Basrah, Iraq. *Bulg J Vet Med.* 2021; 4(24): 12-23.

25- Ali MM, Al-Samarai FR. Isolation and Molecular Identification of *Yersinia Enterocolitica* in Locally Produced Raw Milk in Iraq. *Bioch Cellul Arch.* 2020; 20(2): 78-91.

26- Sharifi Yazdi S, Mobasseri B, Torabi Bonab P, Sharifi Yazdi S, Mirbagheri Z, Soltan Dallal MM. Prevalence and Characteristics of *Yersinia Enterocolitica* and *Yersinia Pseudotuberculosis* from Raw Milk Supplied in Tehran. *J Nut Food Secu.* 2023; 8(1): 114-21.

27- Zafar N, Nawaz Z, Anam S, Kanwar R, Ali A, Mudassar M, et al. 31. Prevalence, molecular characterization and antibiogram study of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and milk products. *Pure App Bio.* 2020; 9(3): 1982-7.

28- Soltysuik M, Wiszniewskalaszczych A, Wojtacka J, Wysok B. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria* spp. isolated from bulk raw milk in north-eastern Poland. *Med vet.* 2002; 1(2):162-180.

29- De Jonghe V, Coorevits A, Van Hoorde K, Messens W, Van Landschoot A, De Vos P, et al. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *App envment microb.* 2011; 77(2): 714-728.

30- Mohammed GMO, Megahed AA, Nasr SS. Bacteriological and molecular detection of *Pseudomonas* species from raw milk sold in Port-Said City markets. *Egyp J Chem envment Health.* 2015; 1(1): 986-1002.




Investigating the antibiotic resistance of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* isolates in raw cow's milk supplied in Gachsaran County

Meghdad Nazari¹, Ebrahim Rahimi^{2*}

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

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

Receive: November 25, 2023; Revise: January 21, 2024; Accept: January 29, 2024

 10.22034/nfvm.2024.426869.1214

Summary

Psychrotrophic bacteria in raw milk, due to their ability to produce heat-resistant enzymes and biofilms, face the dairy industry with significant corruption and technical problems, and can also cause risks such as gastroenteritis in humans. In this regard, the purpose of this study is to investigate the prevalence of antibiotic resistance of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* isolates in raw milk sold in Gachsaran County. In this study, 100 samples of raw milk were randomly sampled from the supply centers of this product and transferred to the food hygiene laboratory under sterile conditions. The results showed that the level of infection with *Pseudomonas* was 30 samples (30%), *Listeria monocytogenes* was 10 samples (10%) and *Yersinia enterocolitica* was 4 samples (4%), also statistical analysis showed that there was a difference between the level of infection with *Pseudomonas* and *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes*. The difference is statistically significant ($P < 0.05$). The results of antibiotic tests showed that the highest resistance in *Pseudomonas* was related to amoxiclav and ampicillin, in *Listeria monocytogenes* it was related to amoxiclav and sulfamethoxazole, and in *Yersinia enterocolitica* it was penicillin and gentamicin. Due to the high level of contamination of raw milk with psychrotrophic microorganisms, it is recommended to refrain from consuming raw milk and to apply restrictions for the treatment of gastroenteritis caused by the spread of food pathogenic bacteria.

Keywords: *Pseudomonas*, Raw milk, *Listeria monocytogenes*, Antibiotic resistance, *Yersinia enterocolitica*



بررسی آلودگی باکتریایی میگو پرورشی (*Litopenaeus Vannamei*) در استان بوشهر و اثر فرآیند انجماد بر ویژگی های میکروبیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی آن

محمد رضا انصاری^۱، مسعود هماپور*^۲، مریم مصلحی شاد^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد صفادشت، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد صفادشت، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد صفادشت، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۷ بهمن ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۲ اسفند ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۳ اسفند ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.441897.1226

چکیده

میگو یکی از منابع غذایی مهم برای انسان است. مسمومیت های غذایی ناشی از خوردن مواد غذایی دریایی و میگو به عنوان یک خطر مهم جهت سلامتی انسان می باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی باکتریایی میگو پرورشی پاسفید در استان بوشهر و اثر فرآیند انجماد بر ویژگی های میکروبیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی آن می باشد. تعداد ۱۲۰ نمونه میگو به صورت تصادفی انتخاب و جهت ارزیابی بار میکروبی و وضعیت شیمیایی به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون مقایسه دانکن در سطح معنی دار ($P < 0/05$) استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان آلودگی برای اشریشیاکلی ۱۳/۳۵ درصد، سالمونلا ۱۴/۱۸ درصد، استافیلوکوکوس اورئوس ۴۵/۸۳ درصد، لیستریا ۱۰/۸۳ درصد و ویبریو ۱۳/۳۵ درصد بود. آنالیزها نشان داد که بین میکروارگانیسم های مختلف و درصد آلودگی ارتباط معنی داری وجود نداشت. با توجه به نتایج حاصل آنالیز آماری از ۱۲۰ نمونه کشت میگو در محیط کشت و نتایج حاصل آن که مورد بررسی قرار گرفت نشان داد، میزان TVN در چهار مورد روش نگهداری با هم تفاوت معناداری داشتند، همچنین کمترین و بیشترین میزان TVN را به ترتیب نمونه های بسته بندی در تونل انجماد و بلافاصله داشتند. نتایج آلودگی به کلی فرم نشان داد که میزان بار کلی فرم در چهار مورد بررسی کمتر از ۱۰۰ CFU/g و در محدوده استاندارد (کمتر از ۱۰۰ CFU/g) بودند. با توجه به آلودگی بالایی که تمامی نمونه ها به میکروارگانیسم های پاتوژن داشتند، بکارگیری مقررات سختگیرانه توسط سازمان های نظارتی باید بیش از پیش افزایش یابد تا سلامت مردم و جامعه تضمین گردد.

واژگان کلیدی: آلودگی میکروبی، آلودگی شیمیایی، فرآیند انجماد، مواد غذایی دریایی، میگو پاسفید

مقدمه

مسمومیت‌ها و عفونت‌های انسانی ناشی از پاتوژن‌های منتقل شده از مواد غذایی دریایی به فصل، عادات غذایی و وضعیت سیستم ایمنی فرد در معرض بستگی دارد (۱). غذاهای دریایی به دلیل ارزش غذایی بالا در سراسر جهان مورد استقبال قرار می‌گیرند و به‌طور فزاینده‌ای در بین مصرف‌کنندگان محبوب هستند. یکی از این محصولات دریایی میگو است که دارای انواع مختلفی می‌باشد؛ میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*) از فراوان‌ترین انواع پرورشی میگو در ایران و جهان بوده و به علت پایین بودن نیاز غذایی و سطح پائین پروتئین مورد نیاز در جیره غذایی، سرشار بودن از مواد معدنی، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب غیر اشباع و اسیدهای آمینه ضروری جایگاه ویژه‌ای بین فرآورده‌های دریایی دارد. میگو به دلیل داشتن مواد مغذی، محیط مناسبی جهت رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشد که می‌تواند تأثیر نامطلوبی را در خواص ظاهری این محصول داشته باشد و سبب کاهش نگهداری این محصول دریایی شود (۲)، که می‌توان به انواعی از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی اشاره کرد. میگوها و سایر مواد غذایی دریایی مستعد ابتلا به طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌های باکتریایی هستند که اکثر آنها قادر به ایجاد بیماری می‌باشند، برخی از آنها را با ماهیتی ساپروفیت می‌دانند، در عین حال برخی دیگر مانند مایکوباکتریوم، استریپتوکوک، ویبریو، آئروموناس، سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریامونوسیتوزنز و اشریشیاکلی جزء باکتری‌های بیماری‌زا هستند. همچنین برخی از باکتری‌های نامبرده می‌توانند سبب مرگ در مصرف‌کنندگان شوند (۳).

اشریشیاکلی از باکتری‌های گرم‌منفی خانواده انتروباکتریاسه بوده که در دمای مزوفیل قادر به رشد بوده و در محدوده pH ۴/۸ تا ۸ فعالیت داشته و وجود آن در مواد غذایی نشانه آلودگی به مدفوع می‌باشد. اشریشیاکلی به چهار دسته *EPEC*، *EIEC*، *ETEC* و *EHEC* تقسیم‌بندی می‌شود که نوع *EHEC* کشنده بوده و سوبه

معروف *O157H7* در این گروه قرار دارد (۳). سالمونلا از خانواده انتروباکتریاسه‌ها و در دسته باکتری‌های مزوفیل تقسیم‌بندی می‌شود که به دو نوع سالمونلا بونگوری و سالمونلا انتریکا تقسیم‌بندی می‌شود. ۲۶۰۰ سروتیپ مختلف از این باکتری تشخیص داده شده که مهم‌ترین آنها شامل سالمونلا تیفی‌موریوم، پاراتیفی‌موریوم و سالمونلا سنفتنبرگ می‌باشند که با مدل تقسیم‌بندی کافمن وایت دسته‌بندی می‌شوند (۴). استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری‌های گرم‌مثبت، کاتالاز مثبت، فاقد اسپور، فاقد کپسول و به‌صورت سلول‌های کروی بوده که معمولاً خوشه‌های نامنظمی شبیه به انگور تشکیل می‌دهد و دارای بیشترین میزان مسمومیت در دنیا است. این باکتری یک رقابت‌کننده ضعیف بوده و رشد آن در حضور نشاسته و پروتئین تقویت می‌شود. برخی از سویه‌های این باکتری دارای قابلیت بالا در تحمل دمای بالا می‌باشند به گونه‌ای که ۲۰ دقیقه دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس را تحمل می‌کند و در نهایت سبب استفراغ برای شخص می‌شود (۴، ۵).

ویبریو از باکتری‌های گرم‌منفی است. حضور و پراکنش گونه‌های ویبریو در آب‌های ساحلی به عوامل محیطی مختلفی مانند دما، غلظت نمک، pH و وجود مواد مغذی بستگی دارد. این باکتری هالوفیل، مزوفیل، میله‌ای شکل، کاتالاز و اکسیداز مثبت بوده و یک پاتوژن غذایی شناخته می‌شود و به‌طور گسترده در محیط‌های دریایی توزیع شده و اغلب از انواع غذاهای دریایی همچون خرچنگ، میگو و ماهی جدا شده است (۶). لیستریا از باکتری‌های گرم‌مثبت است. شیوع این باکتری بسیار کم بوده اما درصد کشندگی آن بالا است. جزو باکتری‌های سایکروتروف بوده و عمدتاً در سردخانه‌ها و یخچال‌ها رشد و تزايد می‌یابد. گونه انسانی آن لیستریا مونوسیتوزنز بوده که در ۵۰ درجه ناپود می‌شود. حضور هرکدام از باکتری‌های پاتوژن می‌تواند سبب عفونت و مسمومیت در مواد غذایی دریایی شود و همین امر سلامت فرد و جامعه را به خطر می‌اندازد (۷). گوشت میگو پس از مرگ هنوز

بررسی آلودگی باکتریایی میگو پرورشی (*Litopenaeus Vannamei*) در استان بوشهر ...

فعال و از نظر بیوشیمیایی زنده است. تجزیه آلی یا تغییر ترکیب میگو ممکن است توسط عوامل مختلفی ایجاد شود که می‌توان به آنزیم‌ها و فعالیت‌های میکروبیولوژیکی اشاره کرد. بالاترین کیفیت میگو را می‌توان در میگو منجمد بلافاصله پس از برداشت به دست آورد. لذا انجماد یکی از رایجترین و کارآمدترین روش‌ها برای نگهداری مواد غذایی دریایی از جمله میگو است (۸). بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی باکتریایی میگو پرورشی پاسبید (*litopenaeus Vannamei*) در استان بوشهر و اثر فرآیند انجماد بر ویژگی‌های میکروبیولوژیکی و فیزیکیوشیمیایی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: ۱۲۰ نمونه میگو به صورت تصادفی از استخرهای پرورش میگو برداشت شد. به این ترتیب، تعداد ۳۰ نمونه میگو، بلافاصله پس از صید، ۳۰ نمونه قبل از انجماد، سپس ۳۰ نمونه میگو از فریزرهای IQF بعد از ۲، ۴ و ۸ هفته انجماد و ۳۰ نمونه دیگر از میگوها از تونل انجماد بعد از ۲، ۴ و ۸ هفته خارج کرده و قبل از دیفراس، مورد ارزیابی میکروبی و شیمیایی قرار گرفتند.

جداسازی اشریشیاکلی: مقدار ۲۵ گرم میگو، وزن کرده و داخل ۲۲۵ سی‌سی لاکتوز برات (Merk, Germany) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. مقدار ۱ سی‌سی از محیط نمونه غنی‌شده روی محیط کشت EMB Agar کشت و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، کلنی‌های دارای جلای سبز فلزی انتخاب و برای تأیید در محیط‌های کشت افتراقی شامل سیمون سترات، TSI, MR_VP و SIM کشت داده و نمونه‌های مثبت آنها مشخص خواهد شد (۹).

جداسازی سالمونلا: مقدار ۲۵ گرم میگو، وزن کرده با ۲۲۵ سی‌سی محیط کشت لاکتوز برات مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس مقدار یک سی‌سی از نمونه غنی‌شده به ۱۰ سی‌سی سلنیت‌سیستین (Italy,)

(linfoilchem) و یک سی‌سی به ۱۰ سی‌سی تتراتیونات برات (Italy, linfoilchem) منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، از محیط سلنیت‌سیستین روی سالمونلا شیگلا آگار، بیسموت سولفیت آگار و بریلیانت گرین آگار (Italy, linfoilchem) به صورت خطی کشت داده شد. به همین ترتیب از تتراتیونات، روی محیط‌های مذکور کشت انجام شد. سپس بعد از ۲۴ ساعت تعداد دو یا بیشتر از پرگنه‌های تیپیک به محیط TSI و (Italy, LIA) (linfoilchem) منتقل و نتایج بر اساس دستورالعمل استاندارد مورد تفسیر قرار گرفت (۹).

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس:

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس ۵ گرم میگو به درون ظرف توزین استریل منتقل و سپس میزان ۴۵ سی‌سی محلول رینگر به‌عنوان حلال به آن افزوده شد تا رقت 10^{-1} به دست آید. پس از حل کردن مخلوط کردن و یکدست شدن و ایجاد یک محلول همگن، میزان ۵/۰ سی‌سی از آن به وسیله سمپلر روی محیط برد پارکر آگار (Agar Parker -Baird) به روش کشت سطحی کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از پایان انکوباسیون در صورت رشد، باکتری‌های با کلنی‌های گرد و سیاه رنگ، جهت انجام کشت تأییدی، از کلونی‌های مشکوک به وسیله لوپ استریل روی محیط مانیتول سالت آگار (Salt Manitol Agar) کشت داده و محیط‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و بعد از گذشت ۲ ساعت بر روی کلنی‌های مانیتول مثبت (کلونی‌های زردرنگ دارای هاله زردرنگ) تست Dnase جهت تأیید استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت. همچنین باکتری‌های مورد نظر با تست کواگولاز ارزیابی و نتیجه این تست در مورد استافیلوکوکوس اورئوس مشخص شد (۱۰).

جداسازی لیستریا مونوسیتوزنز:

کدام از محیط‌های مغذی به مدت ۲۹ ساعت در دمای ۳۵

میگو را همراه با ۲ گرم اکسید منیزیم به عنوان کاتالیزور و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و چند عدد پرل شیشه‌ای در داخل بالن هضم کلدال ریخته و آن را به دستگاه کلدال متصل کرده و در ارلن گیرنده که در زیر میرد قرار می‌گیرد (به نحوی که انتهای میرد داخل محلول باشد) مقدار ۲۵ میلی‌لیتر اسید بوریک ۲ درصد و چند قطره معرف متیل اورانژ ۰/۱ درصد الکلی ریخته که در این حالت رنگ آن قرمز رنگ خواهد شد. آنگاه بالن هضم را حرارت داده به نحوی که محتویات آن ظرف ۱۰ دقیقه به جوش آید، از زمان جوش ۲۵ دقیقه عمل تقطیر را ادامه داده که در این حالت آنچه بازهای فرار در گوشت موجود باشد تقطیر و جذب محتویات ارلن گیرنده شده، رنگ محلول را به رنگ آبی در خواهد آمد (به علت اینکه محیط قلیایی می‌گردد) سپس حرارت را قطع کرده و محلول تقطیر شده را به وسیله اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ قرمز تیتیر می‌کنیم و میزان TVN را خواهیم سنجید (۱۲).

روش تعیین میزان کلی‌فرم: برای شمارش کلی‌فرم‌ها از روش MPN (Most Probable Number) استفاده شد. برای انجام آزمایش از پنج رقت 10^{-5} - 10^{-1} استفاده شد. بدین ترتیب در کنار شعله مقدار ۱ میلی‌لیتر از رقت تهیه شده میگو به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه و مخلوط شد. سپس از محیط VRBA (Violet red bile agar) ۱۵ میلی‌لیتر به آن اضافه و به صورت ۸ مخلوط کرده تا خوب هگمن شده و بعد از حدود ۵ دقیقه که محیط بسته شد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و رشد کلنی بررسی شد (۱۱).

روش تعیین توتال کانت: شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در میگو با استفاده از رقت‌های مختلف و تعداد کلنی‌های تشکیل شده بر حسب (Colony) CFU - (Forming unit) در هر میلی‌لیتر گرم میگو که آن را رقیق کرده و به حجم سی‌سی محاسبه شد و با استفاده از محیط کشت Plate Count Skim Milk Agar طبق

درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و به منظور رشد پرگنه‌های لیستریا، باکتری‌ها از محیط مغذی ثانویه به محیط آگار انتخابی لیستریا (Palcam agar (Merck, Germany) انتقال داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری انجام شد. پرگنه‌های رشد کرده در هر پلیت از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت و پرگنه‌های رشد کرده، سبز زیتونی به قطر ۱/۵ میلی‌متر که مرکز آنها سیاه یا خاکستری رنگ و اطراف همه آنها هاله سیاه‌رنگ است. پرگنه‌های مشکوک به لیستریا مورد آزمون رنگ‌آمیزی گرم قرار گرفتند تا گرم مثبت یا منفی بودن آنها تشخیص داده شود. سپس روی پرگنه‌های گرم‌مثبت، آزمایش کاتالاز انجام شد. آزمایش حرکت در ۲۵ درجه سلسیوس روی نمونه‌هایی که کاتالاز مثبت بودند انجام و نمونه‌های مثبت مشخص و شمارش شدند (۱۱).

جداسازی ویبریو: جهت جداسازی ویبریو، مطابق روش استاندارد جستجوی گونه‌های ویبریو در مواد غذایی ارائه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا مورد آزمایش قرار گرفتند. به این صورت، از هر کدام از نمونه‌ها ۲۵ گرم در نایلون‌های پلاستیکی مختص استومایکر، همراه با ۲۲۵ میلی‌لیتر آب پپتونه قلیایی (Merck, Germany)، یکنواخت شدند و در دمای انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۸-۹ ساعت قرار گرفتند. سپس از نمونه‌ها به داخل محیط کشت انتخابی ویبریو (TCBS) (Thisulfate citrate bile salt sucrose agar)، تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکروز آگار (Merck, Germany)، به صورت خطی کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس بر روی پرگنه‌های مشکوک سبز و زرد رشد کرده و آزمایش پدیده کاناگوا نیز بر روی ویبریو پاراهمولیتیکوس جداگانه در محیط کشت آبگوشت سویای حاوی ۳ درصد کلرید سدیم انجام داده شد سپس نمونه‌های مثبت شمارش شدند (۶، ۱۰).

روش تعیین TVN: مقدار ۱۰ گرم از نمونه گوشت

بررسی آلودگی باکتریایی میگو پرورشی (*Litopenaeus Vannamei*) در استان بوشهر ...

استاندارد ۵۲۷۲، اداره استاندارد انجام داده شد (۱۳).

آنالیزهای آماری: در این پژوهش، از آنالیز واریانس یکطرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. آزمون مقایسه دانکن در سطح معنی‌دار ($P < 0.05$) صورت گرفته و نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم 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 به ترتیب 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)، α -تریپنول (۷/۳ درصد)، اجنول (۶/۵۳ درصد)، α -تریپنول (۴/۴۴ درصد) و مورول-۵-ان-۴ (α -۴/۱۸ درصد) به ترتیب 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)، α -پینن (۱۳/۶۱ درصد)، بورنتول (۸/۷۲ درصد)، α -تریپنئول (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)، γ -تریپنین (۱۷/۳۵ درصد)، p -سیمن (۱۵/۹۶ درصد)، β -پینن (۶/۸۶ درصد) و p -سیمن- γ -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 سوبیه‌های هدف (جدول ۲) مؤثر بودند ($p < 0.05$). بیشترین شعاع بازدارندگی را پسدوموناس آئروژینوزا در برابر اسانس رزماری (۱۸/۱ mm) و کمترین مقدار از تأثیر اسانس زیره سبز بر پسدوموناس 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 سوبیه لیستریا مونوسیژنوزا با ناحیه بازدارندگی ۱۲/۱ mm و مقاوم‌ترین سوبیه‌ها سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی به‌ترتیب با نواحی بازدارندگی ۸/۱ mm و ۸/۳ mm ثبت شد ($p < 0.05$).

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
۱۱	۱۰۵۳	۰/۱۵	۱۲۷۹	۴/۱۱	۱۰۲۸	۰/۲۶

۰/۸۷	۱۰۳۰	1,8-Cineole	۰/۱۲	۱۴۳۱	Styrene	۰/۶۹	۱۰۸۰	Fenchone	۱۲
۱۷/۳۵	۱۰۵۶	γ -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	۱۱۷۳	Terpinene-4-ol	۱۶
۰/۰۶	۱۱۹۳	o-Cumenol	۰/۲۱	۱۵۹۹	Fenchole	۴/۴۴	۱۱۷۵	α -Terpineol	۱۷
۳۹/۶۷	۱۲۴۰	Cumin-aldehyde	۱/۶۹	۱۶۱۱	Caryophyllene	۰/۶۳	۱۲۴۸	Geraniol	۱۸
۱/۷۵	۱۲۸۲	α -Terpinen-7-al	۱/۸۹	۱۶۲۲	Terpinen-4-ol	۱/۸۲	۱۲۶۹	Bornyl acetate	۱۹
۳/۱۰	۱۲۸۸	γ -Terpinen-7-al	۰/۱۲	۱۶۸۹	E-pinocarveol	۶/۵۳	۱۳۶۲	Eugenol	۲۰
۴/۴۲	۱۲۹۱	p-Cymen-7-ol	۳/۴۴	۱۶۹۳	α -Humulene	۰/۴۳	۱۳۶۹	α -Copaene	۲۱
۰/۱۹	۱۲۹۳	Thymol	۲/۱۹	۱۷۰۱	Isoborneol	۰/۳۷	۱۳۸۰	β -Cubebene	۲۲
۰/۹۳	۱۳۳۰	p-Metha-1,4-diene-7-ol	۰/۱۳	۱۷۰۸	γ -Muurolene	۱/۶۳	۱۳۸۳	α -Elemene	۲۳
-	-	-	۷/۹۶	۱۷۲۲	α -Terpineol	۰/۹۱	۱۳۹۱	β -Elemene	۲۴
-	-	-	۸/۷۲	۱۷۳۵	Borneol	۰/۷۲	۱۴۰۱	Methyl eugenol	۲۵
-	-	-	۰/۶۶	۱۷۶۱	Δ -Cadinene	۱/۱۵	۱۵۷۳	Spathulenol	۲۶
-	-	-	۰/۰۴	۱۷۹۶	Citronellol	۱/۵۲	۱۵۸۶	Caryophyllene oxide	۲۷
-	-	-	۰/۳۳	۱۹۹۷	Caryophyllene	۴/۱۸	۱۶۳۶	MuuroI-5-en-4- α -ol	۲۸
-	-	-	۱/۶۳	۲۰۸۲	Eugenol methyl ether	۷/۳۰	۱۶۵۸	α -Cadinol	۲۹
-	-	-	۰/۸۷	۲۲۱۷	Eugenol	-	-	-	۳۰
-	-	-	۰/۱۳	۲۳۱۹	Thymol	-	-	-	۳۱
-	-	-	۰/۹۲	۲۳۴۹	Carvacrol	-	-	-	۳۲
گروه‌های شیمیایی									
			۷۰/۵۲		۶۴/۳۳		Monoterpene		
			۱۶/۳۷		۱۸/۱۸		Sesquiterpene		
			۱۲/۴۲		۱۶/۳۶		Phenylpropanoids		
۸۹/۲۷			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 MIC ($31 \mu\text{g/ml}$) و MBC ($63 \mu\text{g/ml}$) 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	تیمه‌ها
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 تیفی‌موریوم	تیمه‌ها
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 میکرودايلوشن

نیسین (µg/ml)	عامل ضد باکتریایی			غلظت	باکتری	
	زیره سبز	رزماری	ریحان			
125	125	63	250	MIC	لیستریا مونوسیتوزنز	تیمه‌ها
250	125	63	500	MBC	استافیلوکوکوس اورئوس	
63	250	125	125	MIC	باسیلوس سرئوس	
125	250	250	125	MBC	سالمونلا تیفی‌موریوم	تیمه‌ها
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		

میگوهای پرورشی آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند (۱۲)، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقتی ندارد. در این مطالعه میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس ۴۵/۸۳ درصد بود. Bantawa و همکاران (۲۰۱۹) بر روی ۸۳ مورد گوشت میگو در نپال گزارش دادند که میزان آلودگی به اشریشیاکلی ۵۴ درصد، سالمونلا ۳۹ درصد، استافیلوکوکوس اورئوس ۶۸ درصد بوده است (۱۴)، که بالاتر از نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر می‌باشد. در مطالعه دیگری Arfatahery و همکاران (۲۰۱۵) بر روی

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه انجماد یک روش مؤثر برای نگهداری مواد غذایی است، با این حال ممکن است در برخی از مواد غذایی حتی سبب کاهش کیفیت آنها شود. میزان افت کیفیت به عوامل زیادی بستگی دارد که می‌توان به سرعت انجماد و ذوب، دمای ذخیره‌سازی، نوسانات دما و حمل و نقل اشاره کرد. در مطالعات Soltan dalal و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ۳۰۰ نمونه میگوی پرورشی و دریایی، مشخص شد که ۳۰ درصد میگوهای دریایی و ۲۰ درصد

میکروارگانیسیم‌های آلوده‌کننده و پاتوژن میگو، دریافتند که آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* از مجموع ۷۴ نمونه ۲۴/۶ درصد بود (۱۵)، که کمتر از مطالعه حاضر می‌باشد، در این مطالعه میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴۵/۸۳ درصد بود که عوامل محیطی و شرایط آب و هوایی بیشترین تأثیر را بر میزان آلودگی می‌گذارد. در گزارشی Beckers و همکاران در سال ۱۹۸۵ بر روی ۵۰ نمونه میگو مشخص کردند که میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۸ درصد بوده است (۱۶)، که تا حدودی با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعات Pinu و همکاران در سال ۲۰۰۷ در بنگلادش مشخص شد که از ۱۰۰ نمونه میگوی مورد آزمایش ۲/۳۴ درصد آلوده به *سالمونلا*، ۵/۶۳ درصد آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱ درصد آلوده به *شریشیاکلی* بود (۱۷)، که با تحقیق حاضر مطابقتی ندارد. در این مطالعه میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴۵/۸۳ درصد، *سالمونلا* ۱۴/۱۸ درصد و *شریشیاکلی* با ۱۳/۳۵ درصد آلودگی بالاتری را نسبت به مطالعه نامبرده دارند. در تحقیق Elal Mus و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۱۰۰ نمونه میگو مشخص شد که ۶ درصد نمونه‌ها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده‌اند و هیچ آلودگی از *سالمونلا* گزارش نشد (۱۸)، که با مطالعه حاضر مطابقتی ندارد.

در مطالعات Ahmed و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی میگوهای صادراتی بنگلادش مشخص شد که از ۱۰ نمونه آزمایش شده تعداد ۳ مورد آلوده به *شریشیاکلی*، ۹ مورد آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱/۵×۱۰^۷ مورد آلودگی به کلی‌فرم داشته است (۱۹)، که با مطالعه حاضر متفاوت می‌باشد. درصد نمونه‌های آلوده به *شریشیاکلی* در این تحقیق ۱۳/۳۵ می‌باشد. به گزارش Hatha و همکاران در سال ۲۰۰۳ مشخص شد که از مجموع ۱۴۱ نمونه میگوی آزمایش شده تنها ۲ درصد آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده‌اند (۲۰)، که در مطالعه حاضر ۴۵/۸۳ درصد به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلودگی وجود داشت، نمونه‌گیری مطالعه حاضر در فصل گرما می‌تواند از

دلایل آلودگی بالا به میکروارگانیسیم‌های پاتوژن باشد. در تحقیق Masri و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی ۱۱ نمونه میگو تعداد ۲ عدد آلوده به *سالمونلا* و میزان آلودگی به *شریشیاکلی* منفی گزارش شد (۲۱)، که در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *سالمونلا* ۱۴/۱۸ و *شریشیاکلی* ۱۳/۳۵ درصد بود. عدم رعایت بهداشت فردی، عدم رعایت شرایط نمونه‌گیری و هندلینگ ماده غذایی و حتی آلودگی ابزارآلات می‌تواند دلیل بر افزایش میزان آلودگی باشد.

به گزارش Koonse و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی ۲۶۱ نمونه میگو صید شده در خلیج فارس مشخص شد که میزان آلودگی به *سالمونلا* ۹ مورد معادل ۳/۵ درصد بوده است (۲۲)، که در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *سالمونلا* ۱۴/۱۸ درصد بود که بالاتر از گزارش نامبرده می‌باشد. مطالعات Raghavan در سال ۲۰۰۳ بر روی نمونه‌های میگو عرضه شده در هندوستان نشان داد که میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا* و *شریشیاکلی* به ترتیب برابر با ۸، ۳ و فاقد نمونه آلوده بوده است (۲۳)، که میزان آلودگی در مطالعه حاضر بیشتر می‌باشد و همسویی بین آنها وجود ندارد.

تحقیق Talukder و همکاران در سال ۲۰۱۹ در بنگلادش بر روی ۳۰ نمونه میگو نشان داد که میزان آلودگی باکتریایی آنها به ترتیب به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیاکلی* برابر با ۱۱ و ۵ عدد بوده است (۲۴)، که در ارتباط با آلودگی به *شریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نمونه‌های حاضر آلودگی بالاتری داشتند. در مطالعه Ayulo و همکاران در سال ۱۹۹۴ از مجموع ۱۷۵ نمونه میگوی مورد آزمایش در برزیل میزان ۲۰ درصد نمونه‌ها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. و از مجموع ۱۰۹ نمونه مورد آزمایش ۹ نمونه به *شریشیاکلی* آلوده بود (۲۵)، که با این مطالعه تا حدودی همسو می‌باشد. میزان آلودگی به *شریشیاکلی* در این تحقیق ۱۳/۳۵ درصد بود. در مطالعات معتمدی‌سده و همکاران بر روی میگوهای بسته‌بندی شده عرضه‌شده در بندرعباس در سال ۱۳۸۹

بررسی آلودگی باکتریایی میگو پرورشی (*Litopenaeus Vannamei*) در استان بوشهر ...

میزان آلودگی به *ایکلای منفی*، *سالمونلا* منفی، *استافیلوکوکوس* ۶۵ درصد و میزان کلی فرم‌ها کمتر از ۳ درصد گزارش شد (۲۶)، که در خصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* تا حدودی ارتباط همسویی وجود دارد اما در خصوص *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* همسویی وجود ندارد. مطالعات رازقی‌منش و همکاران در سال ۱۳۸۹ بر روی ۴۰ نمونه میگو در استان اصفهان مشخص کرد که ۲ نمونه معادل ۵ درصد از آنها به *سالمونلا* آلوده بودند (۲۷)، در این تحقیق آلودگی به *سالمونلا* ۱۴/۱۸ درصد بود.

مطالعات جعفرسنا و شاهی در سال ۱۳۸۹ بر روی ۲۴۵ نمونه میگو در خوزستان مشخص شد که ۳۳ نمونه معادل ۱۳/۴ درصد آلوده به *سالمونلا* بود (۲۸)، که با مطالعه حاضر همسو می‌باشد. *سالمونلا* از آلودگی‌های مرتبط با مدفوع بوده و احتمالاً نزدیکی به منابع آلوده‌کننده از مهم‌ترین دلایل این آلودگی می‌باشد. در پژوهشی رحیمی و همکاران در سال ۱۳۸۸ بر روی میزان آلودگی ماهی و میگوهای تازه و منجمد عرضه‌شده شهرستان اصفهان دریافتند که از مجموع ۲۶۴ نمونه بررسی شده، ۲۰ نمونه (۷/۶ درصد) از نظر *لیستریا* مثبت بودند. گونه *لیستریا* به ترتیب در ۷/۵، ۴/۲، ۱۱/۷ و ۶/۶ درصد از نمونه‌های ماهی تازه، ماهی منجمد، میگو تازه و میگو منجمد جداسازی شد. *لیستریا مونوسیتوزنز* و *L. innocua* به ترتیب در ۱/۹ و ۵/۷ درصد از نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفتند (۲۹)، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همسو می‌باشد، میزان آلودگی در مطالعه حاضر به *لیستریا* ۱۰/۸۳ درصد بود. در مطالعه‌ای که توسط LUFO و همکاران (۲۰۲۳) بر روی شیوع *لیستریا* در میگوهای تازه و منجمد در آلبانیا انجام گرفت مشخص شد که از ۳۳۳ نمونه میگو ۸/۳ درصد آلوده به *لیستریا مونوسیتوزنز* بود. همچنین نتایج حاصل از میگوی منجمد نشان داد که میزان آلودگی ۱/۳ درصد بود (۳۰)، در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *لیستریا* در میگوی تازه ۱۰ درصد و میگوی منجمد ۱۶/۶۸ درصد بود که در خصوص آلودگی میگوی تازه به *لیستریا* مطابقت و همسویی بین مطالعات

وجود دارد. در تحقیق Oyinlola و Balogun (۲۰۲۲) بر روی آلودگی میگو به *لیستریا* نشان داده شد که از مجموع ۱۰۳ نمونه ۲۸ درصد به *لیستریا* آلودگی وجود داشت (۳۱)، که میزان آلودگی به *لیستریا* در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه نامبرده کمتر بود. در تحقیقی از مشاک و همکاران (۲۰۲۱) نشان داده شد که ۱۱/۴۲ درصد از نمونه‌های میگو به *لیستریا* آلوده هستند (۳۲)، که ارتباط معنی‌داری وجود دارد. در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *لیستریا* ۱۰/۸۳ درصد گزارش شد.

سلامتی غذا از گذشته تا امروز موضوع تحقیقات زیادی بوده است. با روش‌های نوینی تلاش شده تا آلودگی مواد غذایی به عوامل بیماری‌زا را کاهش دهند. با این حال شیوع رو به افزایش مسمومیت‌های غذایی یکی از مهم‌ترین مسائل در جوامع امروزی است. افزایش دو برابری سرانه مصرف غذاهای دریایی در سراسر جهان از ۹ کیلوگرم در سال ۱۹۶۱ به ۲۰ کیلوگرم در سال ۲۰۱۵ منجر به توسعه سریع صنعت آبی‌پروری در طی چهار دهه اخیر شده است. این افزایش بیشتر به دلیل رشد سریع جمعیت و بهبود درآمد در برخی از کشورهای در حال توسعه و همچنین تغییر در الگوی غذایی به دلیل افزایش آگاهی از سلامت و ارزش مواد غذایی دریایی در کشورهای پیشرفته است. از آنجایی که در ایران طی دهه اخیر صنعت آبی‌پروری از رشد چشمگیری با توجه به ضرورت ترویج فرهنگ مصرف غذاهای دریایی برخوردار بوده است ضروری است به موازات این‌گونه اقدامات، به جنبه‌های بهداشتی محصولات حاصله برای مصرف انسانی نیز توجه کرد. بنابراین با عنایت به میگوی تازه در بازارهای سطح غیر قابل قبول عرضه بهداشتی ماهی و عفونت‌های ناشی از مصرف ماهی و ماهی‌فروشی، احتمال بروز مسمومیت‌ها و کارگاه‌های میگوی غیر بهداشتی وجود دارد. از طرفی مزارع میگوی ایران که یک منبع درآمد بین‌المللی محسوب می‌شود، طبق قوانین اتحادیه اروپا باید دارای استانداردهای میکروبی و فرآوری باشند (۳۳).

ماهیچه‌ای، تهوع، استفراغ، التهاب معده و روده را به همراه داشته و در موارد جدی به مرگ می‌انجامد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد صفادشت که نهایت همکاری را در انجام این پروژه داشتند قدردانی می‌گردد.

مسمومیت غذاهای دریایی که در اثر مصرف ماهی یا سخت‌پوستان آلوده به سموم میکروارگانیسم‌های دریایی در آسیای جنوب شرقی و آمریکا اتفاق می‌افتد، بیشتر مربوط به *اشریشیاکلی*، *لیستریا*، *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *یرسینیا* و *ویبریو* است. میکروارگانیسم‌های نامبرده در مواد غذایی دریایی عامل اصلی بیماری‌های ناشی از مواد غذایی بوده که عوارضی همچون درد

References

- 1- Zhang X-H, He X, Austin B. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *J Mrin life sci tech*. 2020; 2: 231-45.
- 2- H A, E R, A k. Effect of pre-cooking and cooking on quality and sensory parameters of Peeled and unpeeled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during the condition storage. *J Mrin life sci tech*. 2021; 20(1): 61-72.
- 3- Heidarzadi M-A. A systematic review on the contamination of traditional Iranian fruit juices with *Escherichia coli*. *NFVM*. 2021; 4(1): 83-93. [In persian]
- 4- Rahimi E, Heidarzadi MA. Prevalence of *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Salmonella* in Cream Sweets in Isfahan City and Antibiotic Resistance of the Isolates. 2023; 1(5):1-9. [In persian]
- 5- Pishadast S, Rahnama M, Alipour Eskandani M, Saadati D, Noori Jangi A, Heidarzadi M. Study of antimicrobial effect of nisin and alcoholic extract of garlic on the activity of *staphylococcus aureus* ATCC 1113 in *Tilapia* minced meat during storage at 4° C. *Food Hygiene*. 2021; 11(3 (43)): 37-47. [In persian]
- 6- Rahimi E, Heidarzadi Ma, Vahed dehkordi N. Determining the prevalence of *Vibrio* species in fish and shrimp caught in Qeshm City, Iran. *Food Hygiene*. 2023; 12(48): 31-40. [In persian]
- 7- Rahimi E, Heidarzadi M, Vahed Dehkordi N. Investigation of the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fish, shrimp and eggs presented in Shahrekord city, Iran. *Uti Cult Aquatic*. 2023;12(2):145-56. [In persian]
- 8- Boonsumrej S, Chaiwanichsiri S, Tantratian S, Suzuki T, Takai R. Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. *J Food Eng*. 2007; 80(1): 292-9.
- 9- Heidarzadi MA, Rahnama M, Alipoureskandani 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]
- 10- Heidarzadi MA, Ayazi N, Vahed Dehkordi N, Karami M, Ahmadi SK, Hoseini Nasab SE. Prevalence of contamination of sandwiches with pathogenic microorganisms and antibiotic resistance of isolates in Kermanshah city, Iran. *Food Hygiene*. 2023; 13(51): 53-66. [In persian]
- 11- Belias A, Sullivan G, Wiedmann M, Ivanek R. Factors that contribute to persistent *Listeria* in food processing facilities and relevant interventions: A rapid review. *Food Control*. 2022; 133: 108579.
- 12- Sørensen JS, Bøknæs N, Mejlholm O, Dalgaard P. Superchilling in combination with modified atmosphere packaging resulted in long shelf-life and limited microbial growth in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from capture-based-aquaculture in Greenland. *J Food microb*. 2020; 88: 103405.
- 13- Bratbak G, Heldal M. Total count of viruses in aquatic environments. *Hndbook meth aquatic microb*: CRC Press; 2018. p. 135-8.
- 14- Bantawa K, Sah SN, Subba Limbu D, Subba P, Ghimire A. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Vibrio* isolated from chicken, pork, buffalo and goat meat in eastern Nepal. *BMC rese not*. 2019; 12(1): 1-6.

- 15- Arfatahery N, Mirshafiey A, Abedimohtasab T, Zeinolabedinizamani M. Study of the prevalence of *Staphylococcus aureus* in marine and farmed shrimps in Iran aiming the future development of a prophylactic vaccine. *Proc Vacolog*. 2015; 9: 44-9.
- 16- Beckers H, Van Leusden F, Tips P. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in shrimp. *Epidem Infec*. 1985; 95(3): 685-93.
- 17- Pinu F, Yeasmin S, BARI ML, Rahman M. Microbiological conditions of frozen shrimp in different food market of Dhaka city. *Food sci tech res*. 2007; 13(4): 362-5.
- 18- Mus TE, Cetinkaya F, Celik U. Occurrence of *Vibrio*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in retail fresh fish, mussel and shrimp. *Acta Veterinaria Brno*. 2014; 83(2): 75-8.
- 19- Ahmed T, Baidya S, Sharma BC, Malek M, Das KK, Acharjee M, et al. Identification of drug-resistant bacteria among export quality shrimp samples in Bangladesh. *Asian J Micro Biotec Env Sci*. 2013; 15(4): 31-6.
- 20- Hatha AM, Maqbool T, Kumar SS. Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultured shrimp. *Int J Food Microb*. 2003; 82(3): 213-21.
- 21- Sukmawaty E, Nur F, Suriani S. Bacterial Contamination at Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Aquaculture. *Biodjati*. 2021; 6(1): 136-45.
- 22- Koonse B, Burkhardt W, Chirtel S, Hoskin GP. *Salmonella* and the sanitary quality of aquacultured shrimp. *J food protect*. 2005; 6(12): 14-29.
- 23- Raghavan R. Incidence of human pathogenic bacteria in shrimp feeds-A study from India. 2003.
- 24- Talukder B, Chakma F, Sabuj AAM, Haque ZF, Rahman MT, Saha S. Identification, prevalence and antimicrobial susceptibility of major pathogenic bacteria in exportable shrimp (*Penaeus monodon*) of southern Bangladesh. *Int J Fish Aqu Study*. 2019; 7(1): 96-9.
- 25- Ayulo AMR, Machado RA, Scussel VM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Int J Food Microb*. 1994; 24(1-2): 171-8.
- 26- Sedeh FM, Afsharian R, Zolfagarieh H, Nikbakht M, Shafae SK, Ayazi M, et al. Gamma Radiation Effects on Bacterial Contamination and Organoleptic Characteristics of Frozen *Penaeus Monodon*. *J Nuclear Sci and Tech*. 2010; 31(2): 44.
- 27- Razaghi Manesh M, Ghasemi A, Rahimi E, Shakerian A, Dadar M. Study of *Salmonella* serotypes contaminated in shrimp, lobster and fishes at seafood markets in Isfahan. *Vet Res Biologi Prdt*. 2013; 26(2): 15-9.
- 28- Sana M, Hosseini Siah Z. The determination of total microbial count and prevalence of *Salmonella* in the shrimp supply in Khuzestan province. *Iran J Health Env*. 2018; 11(2): 149-56.
- 29- Rahimi E, Shakerian A, Raissy M. Prevalence of *Listeria* species in fresh and frozen fish and shrimp in Iran. *Annals Microb*. 2012; 62(1): 37-40.
- 30- Lufo L, Beli E, Kaba E. *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* Prevalence in Shrimps from Seafood Industry in Albania.
- 31- Oyinlola K, Balogun A. *Listeria monocytogenes*: Prevalence and contamination profile in different categories of ready-to-eat foods within Ibadan metropolis, Oyo State, Nigeria. *Food App Biosci J*. 2022; 10(1): 1-12.
- 32- Mashak Z, Banisharif F, Banisharif G, Reza Pourian M, Eskandari S, Seif A, et al. Prevalence of *Listeria* Species and Serotyping of *Listeria monocytogenes* Bacteria Isolated from Seafood Samples. *Egypt J Vet Sci*. 2021; 52(1): 1-9.
- 33- Daneshi MH, Motallebi Moghanjoughi A, Golestan L. Effect of glazing and *Spirulina platensis* extract on quality of *Litopenaeus vannamei* during frozen storage. *Iran J Fish Sci*. 2023; 22(1): 36-43.



Investigating the bacterial contamination of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Bushehr province and the effect of the freezing process on its microbiological and physicochemical characteristics


Mohammad Reza Ansari¹, Masoud Hamapour^{*2}, Maryam Moslehishad³

1- Master's student, Department of Food Science and Engineering, Safadasht Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Industry, Safadasht Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Food Science and Industry, Safadasht Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Receive: February 6, 2024; Revise: March 12, 2024; Accept: March 13, 2024

 10.22034/nfvm.2024.441897.1226

Summary

Shrimp is one of the important food sources for humans. Food poisoning caused by eating seafood and shrimp is an important risk to human health. Therefore, the purpose of this study to investigate the bacterial contamination of Pasfid shrimp in Bushehr province and the effect of freeze process on its microbiological and physicochemical characteristics. 120 shrimp samples were randomly selected and transferred to the laboratory to evaluate the microbial load and chemical status. SPSS version 21 software and Duncan's comparison test were used for data analysis at a significant level of $P < 0.05$. The results showed that the contamination rate for *Escherichia coli* was 13.35%, *Salmonella* 14.18%, *Staphylococcus aureus* 45.83%, *Listeria* 10.83% and *Vibrio* 13.35%. The analysis showed that there was no significant relationship between different microorganisms and the percentage of contamination. According to the results of the statistical analysis of 120 samples of shrimp cultivation in the culture medium and the results that were analyzed showed that the amount of TVN in four cases of storage methods had a significant difference, also the lowest and the highest amount of TVN according to the sample The packages were frozen in the tunnel immediately. The results of coliform contamination showed that the amount of coliform load in four investigated cases was less than 100 CFU/g and within the standard range (less than 100 CFU/g). Considering the high contamination that all the samples had with pathogenic microorganisms; The application of strict regulations by regulatory organizations should be increased to ensure the health of people and society.

Keywords: *Microbial Contamination, chemical Contamination, Freezing process, seafood, white shrimp*




فراوانی و توزیع سروتیپ‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از لاروهای مگس خانگی در دامداری‌های گوسفند: پیامدها برای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در منطقه سیستان

نورمحمد مشکین خود^{۱*}

۱- پژوهشگر، مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ شهریور ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۵ شهریور ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.475444.1254

چکیده

اشریشیاکلی یکی از پاتوژن‌های مهم در دامداری است که می‌تواند باعث عفونت‌های جدی در حیوانات و انسان‌ها شود. مگس‌های خانگی به‌عنوان ناقلین بالقوه این باکتری در محیط‌های دامی شناخته می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی سویه‌های *اشریشیاکلی* از لارو مگس خانگی در محل نگهداری گوسفندان در منطقه سیستان و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها انجام شد. در این مطالعه، ۸۰ جدایه *اشریشیاکلی* از لارو مگس خانگی جمع‌آوری شده از محل نگهداری گوسفندان در منطقه سیستان جداسازی شدند. شناسایی سروتیپ‌های مختلف با استفاده از PCR انجام شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج شناسایی سروتیپ‌ها نشان داد که ۲۵ جدایه متعلق به سروتیپ O157، ۸ جدایه به O25، ۱۲ جدایه به O2، ۱۰ جدایه به O6، ۶ جدایه به O1 و ۱۵ جدایه به O4 تعلق دارند، در حالی که بقیه جدایه‌ها شناسایی نشدند. نتایج آزمایش‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۹۸٪ از جدایه‌ها به آموکسی‌سیلین، ۸۴٪ به کلرامفنیکل، ۸۰٪ به امیکاسین و سفازولین، ۶۵٪ به جنتامایسین، ۲۱٪ به ای‌می‌پنم، ۴۷٪ به تتراسایکلین و ۳۳٪ به سفوتاکسیم مقاوم بودند. این مطالعه نشان‌دهنده تنوع بالا در سروتیپ‌های *اشریشیاکلی* و وجود سطح بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های به‌دست آمده از لارو مگس خانگی در منطقه سیستان است. یافته‌ها تأکید بر نیاز به مدیریت بهینه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و کنترل دقیق بهداشت محیط در دامداری‌ها به‌منظور پیشگیری از شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حفظ سلامت عمومی دارند.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی*، لارو مگس خانگی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

مگس‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین حشرات در محیط‌های مختلف، نقش قابل توجهی در اکوسیستم‌های طبیعی و مصنوعی ایفا می‌کنند. این حشرات به‌دلیل توانایی بالای خود در جابجایی و جلب مواد آلی و زباله‌ها، به راحتی در محیط‌های انسانی و دامپروری زندگی می‌کنند و می‌توانند به‌عنوان ناقلین مؤثر عوامل بیماری‌زا عمل کنند (۱). در محیط‌های پرورش دام، به‌ویژه گوسفند، مگس‌ها به‌طور خاص به‌دلیل نزدیکی به منابع آبی، فضولات دامی و سایر مواد آلی، مستعد جذب و انتقال عوامل بیماری‌زا هستند. یکی از مهم‌ترین دلایل نگرانی در ارتباط با مگس‌ها، توانایی آنها در انتقال باکتری‌ها، ویروس‌ها، و انگل‌ها از محیط به موجودات زنده است (۲). این حشرات به‌ویژه در مناطق پرورش دام، شامل گوسفندداری‌ها، به‌دلیل تماس مستقیم و مداوم با مواد آلوده، نظیر مدفوع و زباله‌های دامی، می‌توانند به‌عنوان ناقلین بیماری‌های مختلف عمل کنند (۳). مگس‌ها می‌توانند با نشستن بر روی مواد آلوده و سپس تماس با غذای دام یا حتی با تماس مستقیم با پوست و پوشش بدن آنها، عوامل بیماری‌زا را به دام‌ها منتقل کنند. در پرورش گوسفند، مشکلات بهداشتی و بیماری‌های مختلفی می‌توانند به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق مگس‌ها منتقل شوند (۴). به‌عنوان مثال، عفونت‌های باکتریایی نظیر اسهال در بره‌های نوزاد می‌تواند یکی از نتایج مستقیم فعالیت مگس‌ها باشد. مگس‌ها می‌توانند با انتقال باکتری‌های پاتوژنیک مانند *شریشیاکلی*، که عامل اصلی اسهال در بره‌ها است، نقش مهمی در بروز و گسترش این بیماری‌ها ایفا کنند (۵). این باکتری‌ها می‌توانند به‌دلیل تعامل مستقیم با مواد آلوده نظیر مدفوع، به راحتی از محیط به بدن دام‌ها منتقل شوند. *شریشیاکلی* به‌طور کلی به چندین سروتیپ مختلف تقسیم می‌شود که برخی از آنها می‌توانند به‌طور خاصی در ایجاد اسهال نقش داشته باشند. به‌عنوان مثال، سروتیپ O157 یکی از جدی‌ترین و پرخطرترین

سروتیپ‌های *شریشیاکلی* است که در انسان‌ها و حیوانات می‌تواند باعث عوارض شدید و حتی مرگ شود (۶). دیگر سروتیپ‌های مورد توجه شامل O25، O2 و O6 هستند که نیز در بروز اسهال مؤثرند (۷). شناسایی دقیق سروتیپ‌های *شریشیاکلی* می‌تواند به درک بهتر الگوهای شیوع و انتشار این باکتری کمک کند و در نتیجه راهکارهای مؤثرتری برای کنترل و پیشگیری از عفونت‌ها فراهم آورد. تعیین سروتیپ‌های مختلف می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه اپیدمیولوژی و مدیریت بهداشتی دام‌ها فراهم کند و به تصمیم‌گیری‌های مدیریتی و درمانی کمک کند. یکی از مسائل جدی دیگر در کنترل عفونت‌های باکتریایی، از جمله عفونت‌های ناشی از *شریشیاکلی*، ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. مصرف بی‌رویه و نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها می‌تواند منجر به بروز مقاومت‌های شدید در باکتری‌ها شود. این مقاومت‌ها نه تنها درمان عفونت‌ها را دشوارتر می‌کنند، بلکه می‌توانند منجر به افزایش هزینه‌های درمانی و گسترش عفونت‌های مقاوم به درمان شوند.

تحقیقات نشان داده‌اند که مگس‌ها قادرند با حمل و انتقال انواع مختلفی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها، به‌ویژه در محیط‌های دامی، به افزایش شیوع بیماری‌ها کمک کنند. این حشرات می‌توانند با نشستن بر روی مواد آلوده و سپس تماس با منابع غذایی دام‌ها، باعث گسترش بیماری‌های عفونی و کاهش سلامت عمومی دام‌ها شوند. از این رو، شناسایی و مدیریت منابع آلوده و همچنین کنترل جمعیت مگس‌ها در مناطق پرورش دام، به‌ویژه در گوسفندداری‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۸). در زمینه پرورش گوسفند، یکی از چالش‌های بزرگ، مدیریت بهداشت و کنترل بیماری‌ها است که به شدت تحت تأثیر فعالیت مگس‌ها قرار دارد. مگس‌ها می‌توانند با فعالیت‌های خود در نزدیکی دام‌ها، به‌ویژه در مناطق مرطوب و آلوده، باعث شیوع بیماری‌هایی شوند که می‌توانند به سلامت دام‌ها و در نتیجه به اقتصاد دامپروری آسیب برسانند (۹). به همین دلیل، توجه به بهداشت محیط و اتخاذ اقدامات

فراوانی و توزیع سروتیپ‌های *اشریشیاکلی* جداشده از لاروهای مگس خانگی در دامداری ...

این محیط به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا به خوبی رشد کنند. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از محیط غنی‌کننده مقدار کمی از نمونه گرفته و بر روی محیط MacConkey Agar یا Eosin Methylene Blue (EMB) Agar خطی کشت داده شد. این محیط‌ها به دلیل ویژگی انتخابی خود، رشد باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* را تسهیل کرده و از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کنند. کلنی‌های *اشریشیاکلی* به رنگ صورتی (در مک‌کانکی) یا سبز براق در (EMB) ظاهر می‌شوند که قابل تشخیص هستند. کلنی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مختلف مانند آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز، آزمون اندول، آزمون MR-VP، آزمون سیمون سیترات و آزمون Triple Sugar Iron (TSI) برای بررسی تولید گاز و H₂S مورد تأیید هویت شد (۱۱).

انجام تست آنتی بیوگرام: جدایه‌های تأییدشده *اشریشیاکلی* به روش انتشار دیسک (Kirby-Bauer) بر روی محیط Muller-Hinton Agar برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی مورد آزمایش قرار گرفت (۱۲). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف مانند آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، سفازولین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر بر روی محیط کشت قرار داده شده و پس از انکوباسیون، ناحیه مهارى اطراف دیسک‌ها بررسی و نتایج بر اساس جداول استاندارد تفسیر شد.

استخراج DNA با روش جوشاندن: برای استخراج DNA، کلنی‌های تأییدشده استافیلوکوکوس اورئوس در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شدند. سوسپانسیون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع فوقانی که حاوی DNA بود، به‌عنوان الگوی (Template) برای PCR استفاده شد (۱۳).

انجام PCR: تکنیک PCR برای تعیین سروتیپ‌های آنتی ژن سطحی O با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

پیشگیرانه برای کاهش جمعیت مگس‌ها می‌تواند به‌طور قابل توجهی در کاهش شیوع بیماری‌ها و بهبود سلامت دام‌ها مؤثر واقع شود. در نهایت، مطالعه و بررسی دقیق‌تر نقش مگس‌ها در انتقال عوامل بیماری‌زا و تأثیر آنها بر سلامت دام‌ها می‌تواند به شناسایی نقاط ضعف در مدیریت بهداشت دام و توسعه استراتژی‌های مؤثرتر برای کنترل بیماری‌ها کمک کند. این تحقیق‌ها می‌توانند به ما در درک بهتر رابطه بین مگس‌ها و بیماری‌های دامی، و همچنین در ایجاد روش‌های بهینه برای پیشگیری و کنترل این بیماری‌ها، یاری رسانند.

مواد و روش‌ها

روش نمونه برداری: روش جمع‌آوری نمونه‌های لارو مگس خانگی از محل نگهداری گوسفندان به این صورت انجام شد که تعداد ۲۰ عدد لارو مگس از هر محل نمونه‌برداری با استفاده از پنس استریل برداشت و در ظرف پلاستیکی درب‌دار استریل قرار داده شد. مشخصات محل نمونه‌برداری شامل موقعیت جغرافیایی، تاریخ، فصل نمونه‌برداری و دیگر اطلاعات مرتبط بر روی ظروف ثبت گردید. این فرآیند نمونه‌برداری از ۵۰ محل نگهداری گوسفندان در سه فصل بهار، پاییز و زمستان انجام شد (۱۰).

نمونه‌های جمع‌آوری شده در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شدند و اگر امکان انتقال فوری وجود نداشت، نمونه‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا از رشد و تغییرات غیر مطلوب در لاروها جلوگیری شود. این دما کمک می‌کند تا شرایط اولیه لاروها حفظ شده و نتایج آزمایشگاهی معتبرتر باشد.

روش کشت و شناسایی *اشریشیاکلی*: برای کشت و شناسایی *اشریشیاکلی* از لارو مگس خانگی، ابتدا لاروهای مگس جمع‌آوری شده در آزمایشگاه با استفاده از آب مقطر استریل شسته شدند تا هرگونه آلودگی سطحی احتمالی برطرف شود. پس از شستشو، لاروها به‌صورت یکنواخت خرد شده و در یک محیط غنی‌کننده مانند Nutrient Broth یا Tryptic Soy Broth قرار گرفتند (۱۰).

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

اندازه bp	توالی	نام پرایمرها
189	ATACCGACGACGCCGATCTG	gndbis.F
	CCAGAAATACACTTGAGAC	O1R
274	GTGACTATTTCTGTTACAAGC	O2.R
360	GAAGATGGCTATAATGGTTG	O18.R
450	GGATCAITTTATGCTGGTACG	O16.R
584	AAATGAGCGCCCACCATTAC	O6.R
722	CGAAGATCATCCACGATCCG	O7.R
193	AGGGGCCATTTGACCCACTC	O4.R
239	GTGTCAAATGCCTGTCACCG	O12.R
313	GAGATCCAAAAACAGTTTGTG	O25.R
419	GTAATAATGCTTGCAGAAACC	O75.R
536	TGATAATGACCAACTCGACG	O15.R
672	TACGACAGAGAGTGTCTGAG	O157.R

و حداکثر ۳۰۰۰ جفت باز شرکت فرمنتاز استفاده شد.

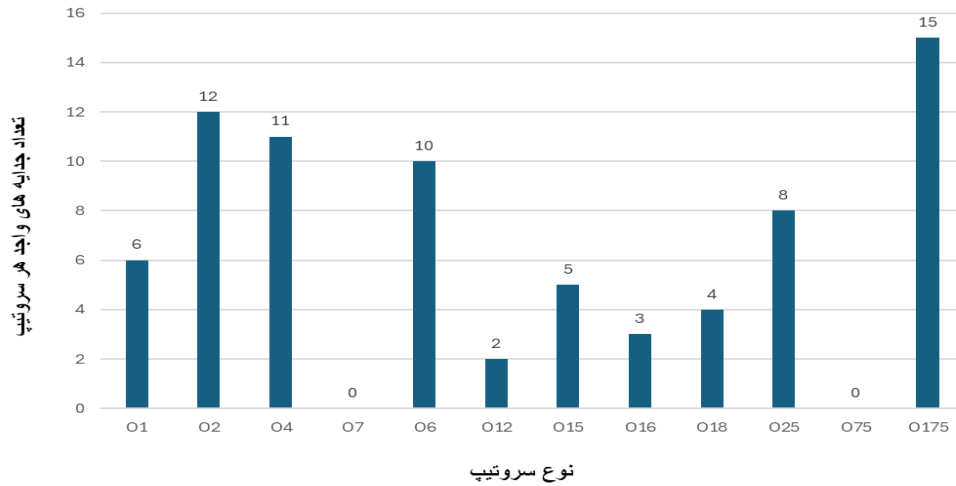
نتایج

در این مطالعه، ۱۰۰۰ نمونه لارو مگس خانگی از ۵۰ محل نگهداری گوسفندان در سه فصل بهار، پاییز و زمستان جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، لاروها شسته و در محیط غنی‌کننده کشت داده شدند. پس از انکوباسیون، کشت خطی بر روی محیط‌های انتخابی انجام شد و کلنی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* شناسایی شدند. در مجموع، ۸۰ جدایه *اشریشیاکلی* از لاروهای مگس خانگی جداسازی شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی نشان داد که از این تعداد، ۲۵ جدایه به سروتیپ O157، ۸ جدایه به O25، ۱۲ جدایه به O2، ۱۰ جدایه به O6، ۶ جدایه به O1 و ۱۵ جدایه به O4 تعلق داشتند (جدول ۲). بقیه جدایه‌ها قابل شناسایی به‌عنوان سروتیپ‌های مشخص نبودند (نمودار ۱).

واکنش PCR: برای انجام واکنش PCR برای ژن‌های

مورد مطالعه، حجم کل ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر الگوی DNA، ۱۰ میکرولیتر ۲ Redmaster x (Amiqon)، و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار) و آب بدون نوکلئاز مخلوط شد. شرایط PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل دناتوره شدن در ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. تجزیه و تحلیل از محصولات PCR توسط ژل الکتروفورز انجام شد. در ژل آگارز ۱/۵ درصد، رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، و تجزیه و تحلیل تصویر با استفاده از Gel Doc 1000 (Vilber Lourmat, فرانسه) برای تعیین وجود آمپلیکون‌های خاص نشان‌دهنده ژن‌های مورد مطالعه است. در این مطالعه از نشانگر وزن مولکولی حداقل ۱۰۰

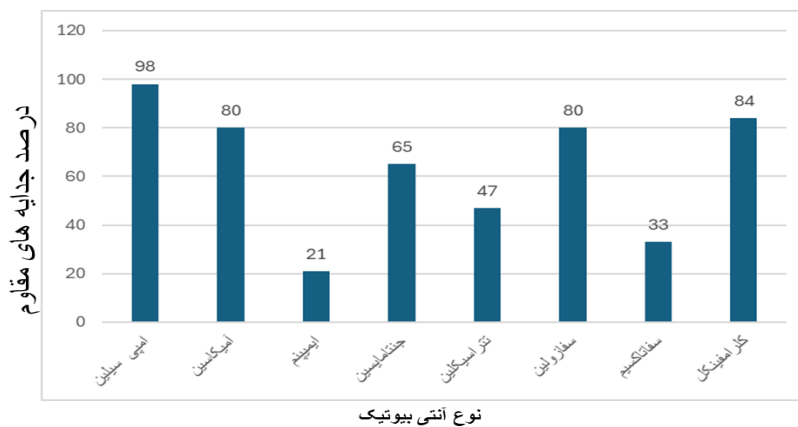
فراوانی و توزیع سروتیپ‌های اشریشیاکلی جدا شده از لاروهای مگس خانگی در دامداری ...



نمودار ۱- توزیع سروتیپ‌های امتی‌ژن O در بین جدایه‌های اشریشیاکلی

به جنتامایسین، ۴۷ درصد نسبت به تتراسایکلین، ۳۳ درصد نسبت به سفوتاکسیم و ۲۱ درصد نسبت به ایمی‌پنم مقاوم بودند (نمودار ۲).

آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن نشان داد که ۹۸ درصد از جدایه‌ها نسبت به آمپی‌سیلین، ۸۴ درصد نسبت به کلرامفنیکل، ۸۰ درصد نسبت به آمیکاسین و سفازولین، ۶۵ درصد نسبت



نمودار ۲- درصد جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

یک هشدار جدی برای کنترل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها و محیط‌های مرتبط با دامداری تلقی شود.

بحث و نتیجه‌گیری

مگس خانگی (*Musca domestica*) به عنوان یکی از مهم‌ترین ناقلان مکانیکی عوامل بیماری‌زا، به ویژه باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها در محیط‌های مختلف، به‌ویژه محیط‌های مرتبط با دامداری‌ها و محل‌های

این نتایج نشان‌دهنده حضور و انتشار سروتیپ‌های مختلف اشریشیاکلی، از جمله سروتیپ O157 که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های زئونوتیک شناخته می‌شود، در لاروهای مگس خانگی مناطق مورد مطالعه است. همچنین، نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که بسیاری از این جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاومت بالایی از خود نشان می‌دهند که می‌تواند به‌عنوان

نگهداری گوسفندان، شناخته می‌شود. وجود این حشرات در چنین محیط‌هایی به دلیل شرایط بهداشتی نامطلوب و تجمع زیاد فضولات، به شدت شایع است (۱۴). بررسی‌های متعدد نشان داده‌اند که مگس‌های خانگی می‌توانند عوامل بیماری‌زای مختلفی را از فضولات و سایر مواد آلوده به انسان و حیوانات منتقل کنند و در نتیجه، نقشی مهم در انتشار بیماری‌های زئونوتیک ایفا کنند. در مطالعه حاضر، ۸۰ جدایه /شریشیاکلی از لارو مگس‌های خانگی که از محل نگهداری گوسفندان در منطقه سیستان جمع‌آوری شده بودند، جداسازی و شناسایی شدند. نتایج نشان داد که برخی از این جدایه‌ها به سروتیپ‌های پاتوژنیک O157 و سایر سروتیپ‌ها تعلق داشتند. سروتیپ O157 یکی از مهم‌ترین سویه‌های /شریشیاکلی است که به دلیل ایجاد بیماری‌های جدی در انسان‌ها، مانند سندرم همولیتیک اورمیک و کولیت هموراژیک، اهمیت بالایی دارد (۶). این یافته‌ها نشان‌دهنده خطر بالقوه انتشار این عوامل پاتوژنیک از طریق مگس‌های خانگی در محیط‌های دامداری است. مطالعات مشابه در ایران نیز نشان‌دهنده وجود /شریشیاکلی در مگس‌های خانگی بوده است. به عنوان مثال، مطالعه‌ای در منطقه هند نشان داد که ۶۵ درصد از مگس‌های خانگی جمع‌آوری شده از دامداری‌های این منطقه حامل /شریشیاکلی بودند (۱۶). این مطالعه همچنین به حضور سروتیپ O157 اشاره کرده و اهمیت آن را در انتقال بیماری‌های زئونوتیک برجسته کرده است. مشابه این نتایج، در یک مطالعه دیگر در آمریکا، وجود /شریشیاکلی در مگس‌های خانگی در محیط‌های مرتبط با دامداری گزارش شد (۱۷). در این مطالعه نیز نسبت بالایی از مگس‌های خانگی حامل سویه‌های پاتوژنیک /شریشیاکلی شناسایی شدند. در مقایسه با مطالعات مشابه در سایر کشورها، مطالعه‌ای در عراق نشان داد که مگس‌های خانگی جمع‌آوری شده از محیط‌های دامداری حامل انواع مختلف باکتری‌های پاتوژن، از جمله /شریشیاکلی، بودند. در این مطالعه، سروتیپ‌های مختلف

/شریشیاکلی، از جمله O157 شناسایی شد که نشان‌دهنده گستردگی جغرافیایی این سویه‌های پاتوژنیک است (۱۸). همچنین، در مطالعه‌ای در ترکیه، مگس‌های خانگی جمع‌آوری شده از محل‌های مرتبط با دامداری نشان دادند که بیش از ۷۰ درصد آنها حامل /شریشیاکلی هستند. در این مطالعه نیز سروتیپ O157 شناسایی شد و محققان تأکید کردند که این مگس‌ها نقش مهمی در انتقال این سویه‌ها به انسان‌ها و دام‌ها ایفا می‌کنند (۱۹). نتایج این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات نشان می‌دهد که مگس‌های خانگی به‌طور گسترده‌ای در انتقال /شریشیاکلی، به‌ویژه سروتیپ‌های پاتوژنیک، نقش دارند. این مسئله به‌ویژه در محیط‌های دامداری و مناطقی که شرایط بهداشتی مطلوبی ندارند، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. یافته‌های ما نشان می‌دهد که لاروهای مگس خانگی در مناطق مورد مطالعه، حامل سویه‌های پاتوژنیک /شریشیاکلی هستند که می‌توانند به راحتی به انسان‌ها و دام‌ها منتقل شوند. در زمینه مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نتایج این مطالعه نشان داد که درصد بالایی از جدایه‌های /شریشیاکلی جدا شده از لارو مگس‌های خانگی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم هستند (۲۰). این مسئله نشان‌دهنده نگرانی‌های جدی در خصوص استفاده نامناسب و بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها است. مطالعه‌ای مشابه در مراکش نیز نشان داد که /شریشیاکلی جدا شده از مگس‌های خانگی، مقاومت بالایی نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک از جمله تتراسایکلین، جنتامایسین و آمپی‌سیلین دارد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد و نشان‌دهنده یک مشکل جهانی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی است (۲۱). عوامل متعددی می‌توانند در ایجاد و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در /شریشیاکلی نقش داشته باشند. یکی از مهم‌ترین این عوامل، استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها است. دامداران اغلب بدون مشورت با دامپزشکان، از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک روش پیشگیرانه استفاده می‌کنند که منجر به ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها

دامداری‌ها انجام شود، از جمله بهبود شرایط بهداشتی، کنترل جمعیت مگس‌ها و استفاده بهینه و دقیق از آنتی‌بیوتیک‌ها. علاوه بر این، آموزش دامداران و کارکنان دامداری‌ها در زمینه بهداشت و مدیریت صحیح استفاده از داروها می‌تواند به کاهش انتشار این بیماری‌ها کمک کند. مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری است تا بتوان به‌طور دقیق‌تری نقش مگس‌های خانگی را در انتقال عوامل بیماری‌زا، به‌ویژه *اشریشیاکلی* و سایر پاتوژن‌های مرتبط با دامداری‌ها، مورد بررسی قرار داد. این مطالعات می‌توانند به تدوین راهکارهای بهداشتی و کنترلی مؤثرتر برای کاهش خطرات ناشی از این عوامل بیماری‌زا کمک کنند.

References

- 1- Nayduch D, Neupane S, Pickens V, Purvis T, Olds C. House Flies Are Underappreciated Yet Important Reservoirs and Vectors of Microbial Threats to Animal and Human Health. *Microorganisms*. 2023; 11(3): 583.
- 2- Underwood WJ, Blauwiel R, Delano ML, Gillesby R, Mischler SA, Schoell A. Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). *Lab. Anim. Sci.* 2015: 623–94.
- 3- Neupane S, Nayduch D, Zurek L. House Flies (*Musca domestica*) Pose a Risk of Respiratory Disease (BRD). *Insects*. 2019; 10(10): 358.
- 4- Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli F, Charoenviriyaphap T, Duvallet G. Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. 2013; 20: 26.
- 5- Brits D, Brooks M, & Villet MH. Diversity of bacteria isolated from the flies *Musca domestica* (Muscidae) and *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae) with emphasis on vectored pathogens. *Afr. Entomol.* 2016; 24(2): 365–375.
- 6- Gambushe SM, Zishiri OT, El Zowalaty ME. Review of *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence, Pathogenicity, Heavy Metal and Antimicrobial Resistance, African Perspective. *Infect Drug Resist.* 2022; 15: 4645-4673.
- 7- Pokharel P, Dhakal S, Dozois CM. The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms*. 2023; 11(2): 344.
- 8- Khamesipour F, Lankarani KB, Honarvar B, Kwenti TE. A systematic review of human

می‌شود. همچنین، آلودگی محیطی ناشی از استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به انتقال این مقاومت به سایر باکتری‌ها منجر شود (۲۲).

در نتیجه‌گیری، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مگس‌های خانگی به‌طور گسترده‌ای در انتقال *اشریشیاکلی* و سویه‌های پاتوژنیک آن، از جمله O157 نقش دارند. این مگس‌ها به‌دلیل مقاومت بالای خود به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، می‌توانند به‌عنوان یک ناقل مهم بیماری‌های زئونوتیک در مناطق دامداری عمل کنند. برای کاهش خطرات مرتبط با انتقال بیماری‌های زئونوتیک از طریق مگس‌های خانگی، باید اقدامات کنترلی مناسب در

pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health*. 2018; 18(1): 1049.

9- Kappes A, Tozooneyi T, Shakil G, Railey AF, McIntyre KM, Mayberry DE, et al. Live-stock health and disease economics: a scoping review of selected literature. *Front Vet Sci*. 2023;10: 1168649.

10- Jacques BJ, Bourret TJ, Shaffer JJ. Role of Fly Cleaning Behavior on Carriage of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Entomol*. 2017; 54(6): 1712-1717.

11- Janezic KJ, Ferry B, Hendricks EW, Janiga BA, Johnson T, Murphy S, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Untreated Surface Waters. *Open Microbiol J*. 2013; 7: 9-19.

12- Nassar MSM, Hazzah WA, Bakr WMK. Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *J Egypt Public Health Assoc*. 2019; 94(1): 4.

13- Akanbi OE, Njom HA, Fri J, Otigbu AC, Clarke AM. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; 14(9): 1001.

14- Clermont O, Johnson JR, Menard M and Denamur E. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 57: 129-136.

15- **Barin A, Arabkhazaeli F, Rahbari S, Madani SA.** The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field. *Med Vet Entomol.* 2010;24(1): 88-90.

16- **Arvind K. Gupta, Dana Nayduch, Pankaj Verma, Bhavin Shah, Hemant V. Ghate, Milind S. and et.al** Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.), *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012; 79(3) , 581–593.

17- **Alam MJ, Zurek L.** Association of *Escherichia coli* O157:H7 with houseflies on a cattle farm. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(12): 7578-80.

18- **Ahmed AS, Ahmed KM, Salih SS.** (2013). Isolation and identification of Bacterial isolates from houseflies in Sulaymaniyah city. *J Eng Technol.* 2013; 31: 24–33.

19- **Baker, S. Z., Atiyae, Q. M., Khairallah, M. S.** Isolation and identification of some species

of bacterial pathogens from *Musca Domestica* and test their susceptibility against antibiotics. *Tikrit J Pure Sci.* 2018; 23(9): 20–27.

20- **Blaak, H., Hamidjaja, R. A., Van Hoek, A. H. A. M., De Heer, L., De Roda Husman, A. M., Schets, F. M.** Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 239–246.

21- **Bouamama L, Sorlozano A, Laglaoui A, Lebbadi M, Aarab A, Gutierrez J.** Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from *Periplaneta americana* and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. *J Infect Dev Ctries.* 2010; 4(4), 194–201.

22- **Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R.** Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to solve it. *Molecules.* 2010; 25(6): 1340.




Frequency and distribution of *Escherichia coli* serotypes isolated from house fly larvae in sheep farms: Implications for antibiotic resistance in Sistan region

NoorMohammad Meshkinkhood*¹

1- Shefa Neuroscience Research Center, Khatamolambia Hospital, Tehran, Iran.

Receive: August 31, 2024; Revise: September 5, 2024; Accept: September 5, 2024

 [10.22034/nfvm.2024.475444.1254](https://doi.org/10.22034/nfvm.2024.475444.1254)

Summary

Escherichia coli is a significant pathogen in animal husbandry, capable of causing severe infections in both animals and humans. Houseflies are recognized as potential carriers of this bacterium in animal environments. This study aimed to isolate and identify *E. coli* strains from housefly larvae in sheep shelters in the Sistan region and to investigate their antibiotic resistance. The objective of this research was to assess the serotype diversity and evaluate the antibiotic resistance patterns of *E. coli* strains isolated from housefly larvae in a specific live-stock area. In this study, 80 *E. coli* isolates were obtained from housefly larvae collected from sheep shelters in the Sistan region. Different serotypes were identified using PCR with specific primers for O surface receptors. The antibiotic resistance of the isolates was assessed using the disk diffusion method. The antibiotics tested included amoxicillin, chloramphenicol, amikacin, cefazolin, gentamicin, imipenem, tetracycline, and cefotaxime. Serotype identification revealed that 25 isolates belonged to serotype O157, 8 isolates to O25, 12 isolates to O2, 10 isolates to O6, 6 isolates to O1, and 15 isolates to O4, while the remaining isolates were not identified. Antibiotic resistance testing showed that 98% of isolates were resistant to amoxicillin, 84% to chloramphenicol, 80% to amikacin and cefazolin, 65% to gentamicin, 21% to imipenem, 47% to tetracycline, and 33% to cefotaxime. This study demonstrates the high diversity of *Escherichia coli* serotypes and the significant level of antibiotic resistance in isolates obtained from housefly larvae in the Sistan region. The findings highlight the urgent need for optimal antibiotic management and stringent environmental health controls in livestock farms to prevent the spread of antibiotic resistance and protect public health.

Keywords: *Escherichia coli*, Housefly larvae, Antibiotic resistance

New Findings in Veterinary Microbiology

Vol. 7, No. 1, Spring & Summer 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