

بررسی حضور ژن‌های کدکننده اکزوتوکسین‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین جداشده از لارو پشه‌ها در منطقه سیستان به روش PCR

بررسی آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای سفید محلی ایرانی

بررسی شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلا، سودوموناس و کلی‌فرم در گوشت بوقلمون کشتار شده و ابزارها در کشتارگاه نجف‌آباد، اصفهان

بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیاکلای، لیستریا و یرسینیا در سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج

بررسی تنوع گونه‌های قارچی عامل عفونت‌های چشمی در شترهای منطقه زابل و ارتباط آن با سن و جنس: نقش شرایط جوی در فراوانی عفونت‌های چشمی

بررسی دو روش کروماتوگرافی تلفیقی و کروماتوگرافی افینیتی برای خالص‌سازی آلفا توکسین باکتری کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A

تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل سلنیوم مخمر و نانوذرات سلنیوم بر جمعیت پروتوزوایی و غلظت آمونیاک شکمبه بره‌های نر پرواری بلوچی (بومی سیستان)

تعیین هویت مولکولی ماکرورابدوس اورنیتوگاستر (*Macrorhabdus ornithogaster*) در پرندگان زینتی

ترپسینه کردن، روشی مناسب برای جداسازی روتاویروس‌های عامل اسهال ویروسی گوساله‌ها: مقاله مروری

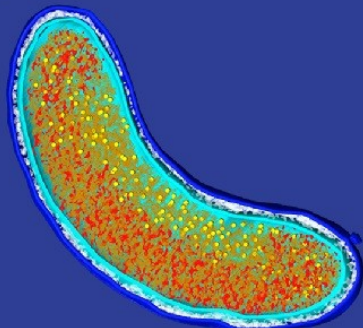
بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های رازیانه و زیره سبز بر روی سویه‌های انتروباکتر فکالیز و اسیتوباکتر بومانی در شرایط آزمایشگاهی

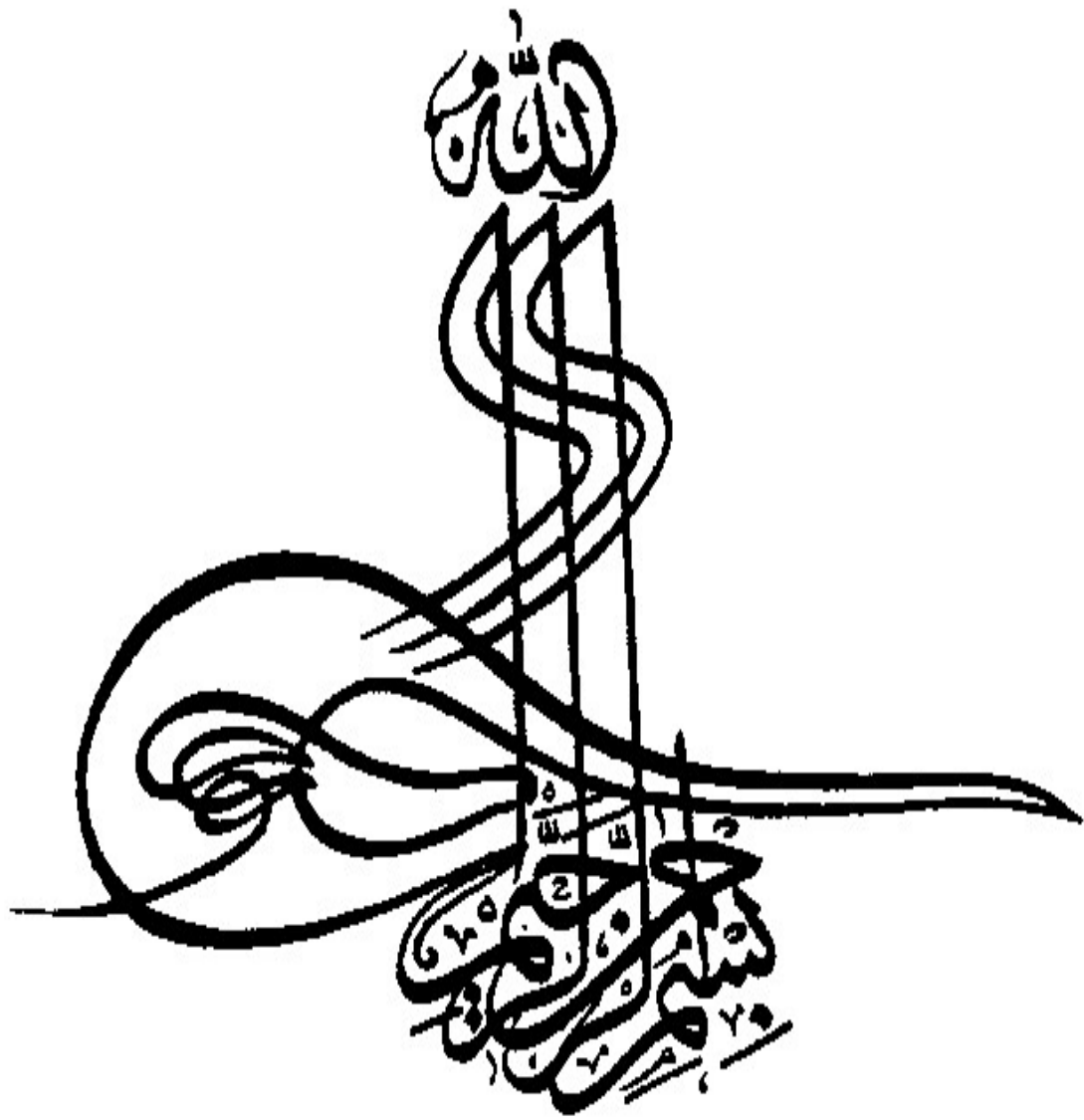
بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جداشده از نمونه‌های مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد

بررسی اثر ارسولیک اسید بر مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های اش‌ریشیاکلای مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف جدا شده از گوشت مرغ

در این قسمت تصویر میکروسکوپ الکترونی کرایو (CryoEM) از باکتری گرم منفی *Pelagibacter* را می‌بینید که اجزای آن به رنگ‌های مختلف در آمده است: غشای خارجی (آبی)، غشای سیتوبلاسمی (سبز آبی)، پپتیدوگلیکان (سفید)، سیتوبلاسم (نارنجی)، نوکلئوئید (قرمز) و ریبوزوم (زرد).

Zhao X, Schwartz CL, Pierson J, Giovannoni SJ, McIntosh JR, Nicastrò D. Three-Dimensional Structure of the Ultraoligotrophic Marine Bacterium "Candidatus *Pelagibacter ubique*". *Appl Environ Microbiol*. 2017 Jan 17;83(3):e02807-16. doi: 10.1128/AEM.02807-16. PMID: 27836840; PMCID: PMC5244296.





دوره ۷، شماره ۲
ناشر: دانشگاه زابل

سرمدبیر:

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



افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی



زابل

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،



محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم



دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

پزشکی زاهدان

تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،



مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده



دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



مهدی راسخ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،



دانشگاه شیراز

دانشگاه زابل

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد



دانشگاه شهرکرد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



دانشگاه فردوسی مشهد

دانشگاه شهید باهنر کرمان

مجید پهلوان: گروه علوم اعصاب بالینی، مرکز پزشکی مولکولی



سعید سالاری: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



(CMM)، دانشگاه کارولینسک

دانشگاه زابل

کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

ویراستار انگلیسی: مسلم فتح الهی، 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

گرافیکست: حمیدرضا حسینی، پژوهشیار، معاونت پژوهش و فناوری، دانشگاه 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

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه تازه‌ها در میکروبی‌شناسی دامپزشکی

از آنجایی که هدف نشریه تازه‌ها در میکروبی‌شناسی دامپزشکی، ارتقا علمی نشریه و پیوستن به نشریات ISI و scopus 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 این‌صورت از کاما "،" باید سود جست (مثال: ۷-۹ 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.



بررسی حضور ژن های کدکننده آگزوتوکسین ها در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی سیلین جدا شده از لارو پشه ها در منطقه سیستان به روش PCR

پریسا حسنین*^۱، وحیده حمیدنیا^۲

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

۲- دانش آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۶ خرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۹ خرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۹ خرداد ۱۴۰۳

doi 10.22034/NFVM. 2024. 461253. 1247

چکیده

استافیلوکوک اورئوس طیف وسیعی از آگزوتوکسین هایی را تولید می کند که در ایجاد بیماری در میزبان نقش دارند. سوپر آنتی ژن های پیروژنیک گروهی از آگزوتوکسین ها هستند که توسط استافیلوکوکوس اورئوس تولید می شوند. این گروه شامل سم سندروم شوک سمی، اکسفولیاتیو و همه انتروتوکسین های این باکتری می باشد. شناسایی این عوامل در شناخت روند بیماری زایی باکتری ضروری است. هدف از این پژوهش بررسی حضور ژن های سندروم شوک سمی (TSST-1)، اکسفولیاتیو A/B و انتروتوکسین های A، B، C، D، E در استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم و حساس به متی سیلین جدا شده از لارو پشه ها در منطقه سیستان به روش PCR بود. این تحقیق بر روی ۵۷ جدایه باکتری استافیلوکوکوس انجام گرفت. جدایه های مقاوم و حساس به متی سیلین با استفاده از روش آگار دیفیوژن و پلیت های حاوی اگزاسیلین مشخص شد. DNA باکتری ها به روش جوشاندن استخراج گردید. با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، ژن های کدکننده سندروم شوک سمی (TSST)، اکسفولیاتیو (ETA, ETB) و انتروتوکسین (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) در این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۵۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، تعداد ۳۲ جدایه مقاوم و ۲۵ جدایه حساس به متی سیلین شناسایی شدند. فراوانی ژن های انتروتوکسین، اکسفولیاتیو و سندروم شوک سمی در جدایه های مقاوم به ترتیب ۵۰ درصد، ۲۱/۸۷ و ۳/۱۲ درصد و در جدایه های حساس به ترتیب ۴۶/۴۰، ۲۵ و ۰ درصد مشاهده شد. نتایج نشان داد شیوع جدایه های مقاوم به متی سیلین و جدایه هایی که توانایی حمل ژن های انتروتوکسین و اکسفولیاتیو را دارند در منطقه سیستان بالا بوده است.

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، استافیلوکوکوس اورئوس، لارو پشه، متی سیلین، انتروتوکسین

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در انسان است که طیف وسیعی از بیماری‌ها، از عفونت‌های پوستی و بافت نرم تا عفونت‌های جدی‌تر مانند پنومونی، اندوکاردیت و سپسیس را ایجاد می‌کند (۱). این باکتری به دلیل تولید اگزوتوکسین‌های مختلف، از جمله سوپراآنتی‌ژن‌ها، نقش مهمی در ایجاد بیماری‌ها دارد. سوپراآنتی‌ژن‌ها به دلیل تحریک سیستم ایمنی به طور غیر طبیعی و گسترده، می‌توانند به ایجاد شرایط بالینی پیچیده‌ای مانند سندروم شوک سمی منجر شوند (۲). در نتیجه، شناسایی و فهم مکانیزم‌های بیماری‌زایی این باکتری برای کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از آن اهمیت بالایی دارد. سوپراآنتی‌ژن‌ها گروهی از اگزوتوکسین‌ها هستند که توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شوند. این سموم قادرند به طور مستقیم با مولکول‌های MHC کلاس II روی سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APCs) و گیرنده‌های TCR روی سلول‌های T باند شده و موجب فعال‌سازی گسترده و غیر طبیعی سلول‌های T شوند (۳). این فعال‌سازی منجر به ترشح مقادیر زیادی از سیتوکین‌ها و ایجاد پاسخ ایمنی شدید و غیر قابل کنترل می‌شود. از جمله سوپراآنتی‌ژن‌های مهم تولیدشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌توان به سم سندروم شوک سمی (TSST-1)، اکسفولیاتیو (ETA، ETB) و انتروتوکسین‌های (SEA، SEB، SEC، SEE، SED) اشاره کرد. این توکسین‌ها با اثرات مختلف خود می‌توانند منجر به بروز شرایط بالینی متنوعی شوند که برخی از آنها می‌توانند زندگی بیمار را به خطر بیندازند (۴). یکی از چالش‌های مهم در کنترل عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) است. MRSA به دلیل مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان عفونت‌های ناشی از آن را دشوارتر می‌کند. این باکتری‌ها معمولاً از طریق ژن *mecA* که کدکننده یک پروتئین بایندر پنی‌سیلین (PBP2a) است، مقاومت خود را به

آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام نشان می‌دهند. این پروتئین به آنتی‌بیوتیک‌ها اجازه نمی‌دهد که به دیواره سلولی باکتری حمله کنند و در نتیجه، باکتری به حیات خود ادامه می‌دهد (۵). مطالعات نشان داده‌اند که سویه‌های MRSA علاوه بر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، ممکن است قابلیت‌های بیماری‌زایی بیشتری نیز داشته باشند که این موضوع نیازمند بررسی دقیق‌تر است (۶). پشه‌ها و لاروهای آنها می‌توانند به عنوان ناقلین میکروارگانیزم‌های مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* عمل کنند. شرایط زیستی ویژه پشه‌ها و لاروهای آنها محیط مناسبی برای رشد و تکثیر باکتری‌ها فراهم می‌کند. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که لارو پشه‌ها می‌توانند به عنوان مخازن طبیعی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* عمل کنند و به انتقال آن در محیط‌های مختلف کمک کنند (۷). در منطقه سیستان، به دلیل شرایط اقلیمی و زیستی خاص، لارو پشه‌ها نقش مهمی در اپیدمیولوژی باکتری‌های مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند. هدف این پژوهش بررسی حضور ژن‌های سندروم شوک سمی (TSST-1)، اکسفولیاتیو A/B و انتروتوکسین‌های A، B، C، D و E در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین جداشده از لارو پشه‌ها در منطقه سیستان به روش PCR بود. با توجه به اهمیت اگزوتوکسین‌ها در بیماری‌زایی و تأثیر مقاومت به متی‌سیلین بر شدت عفونت‌ها، شناسایی و مقایسه فراوانی این ژن‌ها در سویه‌های مقاوم و حساس می‌تواند به درک بهتر از اپیدمیولوژی و روند بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در این منطقه کمک کند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۵۷ جدایه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از لارو پشه‌ها در منطقه سیستان در مطالعه قبلی انجام شد. جدایه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین با استفاده از روش آگار دیفیوژن و پلیت‌های حاوی اگزاسیلین شناسایی شده (۸) و DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن استخراج گردید (۹). سپس با استفاده از

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 Vilber Lourmat) فرانسه برای تعیین وجود باندهای خاص نشان‌دهنده ژن‌های مورد مطالعه است. در این مطالعه از نشانگر وزن مولکولی حداقل ۱۰۰ و حداکثر ۳۰۰۰ جفت باز شرکت فرمنتاز استفاده شد.

روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، ژن‌های کدکننده سندروم شوک سمی (TSST)، اکسفولیاتیو (ETA, ETB)، و انتروتوکسین (SEA, SEB, SEC, SED, SEE)، (جدول ۱) در این باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش PCR: برای انجام واکنش PCR برای ژن‌های مورد مطالعه، حجم کل ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر الگوی DNA، ۱۰ میکرولیتر (Amiqon) 2x Redmaster 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

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

Primer name	Sequence(5' → 3')	Length(bp)
Tsst-1-F	TTCACTATTTGTAAAAGTGTGACACCCACT	180
Tsst-1-R	TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT	
SEA-F	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	560
SEA-R	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	
SEB-F	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	404
SEB-R	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	
SEC-F	GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG	297
SEC-R	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	
SED-F	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG	492
SED-R	GCTGTATTTTCTCCGAGAGT	
SEE-F	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482
SEE-R	CACCTTACCGCCAAAGCTG	
ETA-F	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	190
ETA-R	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	
ETB-F	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612
ETB-R	AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACACT C	
Mec-F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533
Mec-R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	

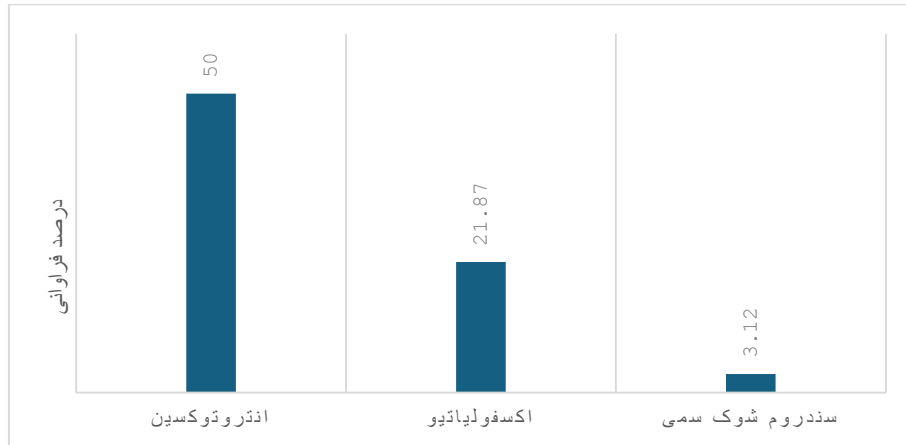
مقاوم به متی‌سیلین و ۲۵ جدایه حساس بودند. که طبق نتایج PCR، در ۳۲ جدایه MRSA مورد بررسی، ۲ جدایه (۶/۲۵ درصد) دارای ژن tsst-1، ۱۶ جدایه (۵۰ درصد)

نتایج

در این پژوهش از ۵۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس کشت داده شده در محیط مولر هینتون آگار، ۳۲ جدایه

ژن *sec* گزارش شد. ژن *sec* در هیچ‌یک از جدایه‌ها مشاهده نشد.

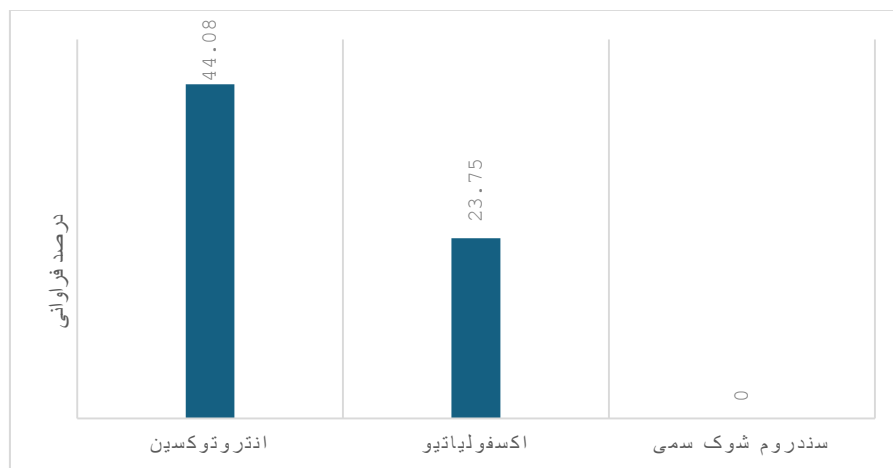
دارای ژن‌های انتروتوکسین که از این میان ۷ جدایه (۲۱/۸۷ درصد) ژن *sea*، ۴ جدایه (۱۲/۵ درصد) ژن *seb*، ۲ جدایه (۶/۲۵ درصد) ژن *sed* و ۲ جدایه (۶/۲۵ درصد)



نمودار ۱- نتایج فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، اکسفولیاتیو و سندروم شوک سمی در جدایه مقاوم به متی‌سیلین

فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، اکسفولیاتیو و سندروم شوک سمی به ترتیب ۴۴/۰۸، ۲۳/۷۵ و ۰ درصد گزارش شد (نمودار ۲).

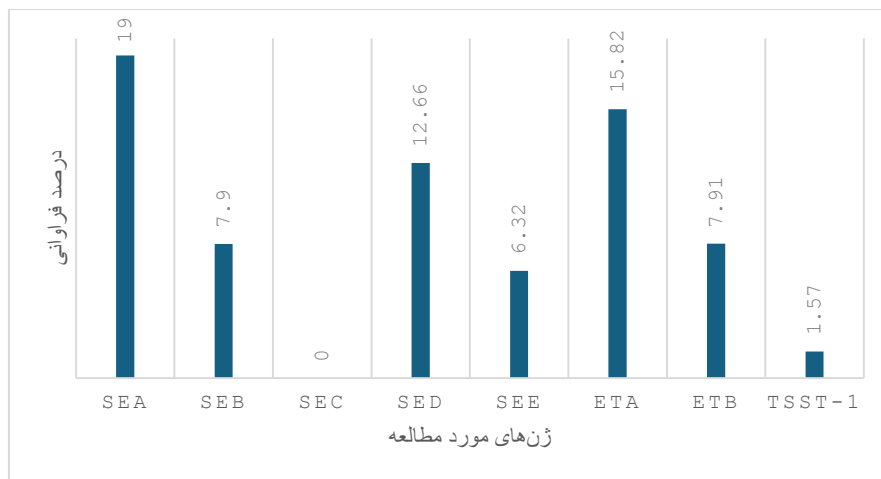
همچنین ۷ جدایه (۲۱/۸۷ درصد) دارای ژن‌های توکسین اکسفولیاتیو A و B بودند که به ترتیب فراوانی ژن *ETA* ۴ جدایه (۵/۱۲ درصد) و فراوانی ژن *ETB* ۳ جدایه (۳۷/۹ درصد) بود. و در جدایه حساس (MSSA)



نمودار ۲- فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، اکسفولیاتیو و سندروم شوک سمی در جدایه‌های حساس به متی‌سیلین

۷/۹، ۱۲/۶۶ و ۶/۳۲ درصد بود.

نمودار ۳ نشان می‌دهد که فراوانی ژن‌های انتروتوکسین *sec*، *seb*، *sea*، *sed* و *see* به ترتیب ۹، ۱۹،



نمودار ۳- فراوانی ژن‌های مورد مطالعه در دو جدایه حساس و مقاوم به متی‌سیلین

بیماری‌ها و مقاومت آن به آنتی‌بیوتیک‌ها پرداخته‌اند. این مطالعات به‌ویژه بر اهمیت ژن‌های کدکننده آگزوتوکسین‌ها و مقاومت به متی‌سیلین تمرکز داشته‌اند. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در انسان است که به‌واسطه تولید انواع آگزوتوکسین‌ها و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، چالش‌های بسیاری در حوزه بهداشت و درمان ایجاد کرده است. این باکتری می‌تواند از طریق ناقلین مختلف، از جمله لارو پشه‌ها، منتقل شود و منجر به شیوع عفونت‌های مختلف در مناطق جغرافیایی متنوع گردد. هدف این مطالعه بررسی حضور ژن‌های کدکننده آگزوتوکسین‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین جداشده از لارو پشه‌ها در منطقه سیستان بوده است.

آگزوتوکسین‌های تولید شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس نقش کلیدی در بیماری‌زایی این باکتری دارند (۱۰). سوپر آنتی‌ژن‌ها مانند TSST-1 با تحریک غیر طبیعی و گسترده سلول‌های T، منجر به ترشح مقادیر زیاد سیتوکین‌ها می‌شوند که می‌تواند به شرایط بالینی پیچیده‌ای مانند سندروم شوک سمی منجر گردد (۱۱). اکسفولیاتیو توکسین‌ها و انتروتوکسین‌ها نیز با اثرات مختلف خود می‌توانند آسیب‌های شدیدی به میزبان وارد کنند. مقاومت به متی‌سیلین (MRSA) یکی از چالش‌های اصلی در درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس

در مطالعه حاضر در مجموع ژن‌های انتروتوکسین بیشترین فراوانی و سندروم شوک سمی کمترین فراوانی را داشت. این نتایج نشان داد که شیوع جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین و جدایه‌هایی که توانایی حمل ژن‌های انتروتوکسین و اکسفولیاتیو را دارند در منطقه سیستان بالا بوده است. این یافته‌ها بر اهمیت کنترل و پیشگیری از گسترش سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در این منطقه تأکید می‌کنند.

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در انسان، نیازمند بررسی‌های دقیق و جامع برای فهم بهتر مکانیزم‌های بیماری‌زایی و ارائه راهکارهای مؤثر برای کنترل عفونت‌های ناشی از آن است. بررسی حضور ژن‌های کدکننده آگزوتوکسین‌ها در سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین جداشده از لارو پشه‌ها در منطقه سیستان، به درک بهتر از اپیدمیولوژی و روند بیماری‌زایی این باکتری کمک می‌کند. نتایج این پژوهش نشان داد که شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و ژن‌های کدکننده آگزوتوکسین‌ها در این منطقه بالا بوده است که این امر نیازمند توجه ویژه و اقدامات مدیریتی مناسب برای کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد. مطالعات متعددی در سراسر جهان به بررسی نقش استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد

اورئوس است. MRSA به دلیل مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان عفونت‌های ناشی از آن را پیچیده‌تر و پرهزینه‌تر می‌کند. ژن *mecA* که کدکننده پروتئین PBP2a است، اصلی‌ترین عامل مقاومت به متی‌سیلین در این باکتری است (۱۲). این پروتئین با تغییر ساختار دیواره سلولی باکتری، از تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری می‌کند، در نتیجه باکتری به حیات خود ادامه می‌دهد. پشه‌ها و لاروهای آنها می‌توانند به‌عنوان ناقلین میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* عمل کنند. شرایط زیستی ویژه پشه‌ها و لاروهای آنها محیط مناسبی برای رشد و تکثیر باکتری‌ها فراهم می‌کند. در منطقه سیستان، به دلیل شرایط اقلیمی و زیستی خاص، لارو پشه‌ها نقش مهمی در اپیدمیولوژی باکتری‌های مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند (۱۳).

این پژوهش با هدف بررسی حضور ژن‌های سندروم شوک سمی (TSST-1)، اکسفولیاتیو A/B و انتروتوکسین‌های A, B, C, D, E در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین جداشده از لارو پشه‌ها در منطقه سیستان به روش PCR انجام شد. نتایج نشان داد که فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، اکسفولیاتیو و سندروم شوک سمی در جدایه‌های مقاوم به ترتیب ۵۰، ۲۱/۸۷، ۳/۱۲ درصد و در جدایه‌های حساس به ترتیب ۱۰/۷۱، ۷/۱۴ و ۰ درصد مشاهده شد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سوپر آنتی‌ژن‌ها نقش مهمی در بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای که توسط Gasemi و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد، نشان داد که TSST-1، یکی از مهم‌ترین سوپر آنتی‌ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، می‌تواند منجر به سندروم شوک سمی شود. این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر که نشان‌دهنده حضور ژن TSST-1 در ۹ درصد از جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین بود (۱۴)، همخوانی دارد.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سویه‌های MRSA

نسبت به MSSA توانایی بیشتری در تولید اگزوتوکسین‌ها دارند. به عنوان مثال، مطالعه‌ای که توسط Lina و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد، نشان داد که سویه‌های MRSA بیشتر مستعد تولید سوپر آنتی‌ژن‌ها و اگزوتوکسین‌ها هستند. نتایج پژوهش حاضر نیز تأیید می‌کند که جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین در مقایسه با جدایه‌های حساس به متی‌سیلین، فراوانی بیشتری از ژن‌های اگزوتوکسین دارا هستند (۱۵). مطالعات منطقه‌ای نیز نشان‌دهنده تفاوت‌هایی در شیوع و نوع ژن‌های اگزوتوکسین در مناطق مختلف هستند. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای که در منطقه خاور میانه توسط Al-Talib و همکاران انجام شد، نشان داد که فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاست (۱۶). در پژوهش حاضر، فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین ۵۰ درصد و در جدایه‌های حساس ۱۰/۷۱ گزارش شد که با نتایج مطالعه Al-Talib همخوانی دارد. مطالعاتی که در سایر نقاط جهان انجام شده‌اند نیز نشان‌دهنده شیوع بالای ژن‌های اگزوتوکسین در سویه‌های MRSA هستند. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای که توسط Chambers and DeLeo (۲۰۰۹) در ایالات متحده انجام شد، نشان داد که سویه‌های MRSA بیشتر مستعد حمل ژن‌های اگزوتوکسین هستند. این مطالعه همچنین بر اهمیت کنترل و پیشگیری از گسترش سویه‌های MRSA تأکید دارد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد (۱۷).

مطالعاتی که به بررسی تأثیرات زیست محیطی بر شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین پرداخته‌اند، نشان می‌دهند که شرایط اقلیمی و زیست محیطی می‌توانند نقش مهمی در گسترش این سویه‌ها داشته باشند. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای که توسط Otter و French (۲۰۱۰) انجام شد، نشان داد که مناطق با شرایط زیست محیطی خاص مانند مناطق گرم و مرطوب، می‌توانند میزان شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین را افزایش دهند. این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر که در منطقه

جامع برای فهم بهتر مکانیزم‌های بیماری‌زایی و ارائه راهکارهای مؤثر برای کنترل عفونت‌های ناشی از آن است. این پژوهش نشان داد که شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و ژن‌های کدکننده آگزوتوکسین‌ها در منطقه سیستم بالا بوده است که این امر نیازمند توجه ویژه و اقدامات مدیریتی مناسب برای کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد. با توجه به اهمیت یافته‌های این پژوهش، ادامه تحقیقات در این زمینه و بررسی‌های گسترده‌تر و دقیق‌تر ضروری است تا بتوان به راهکارهای مؤثرتری برای مقابله با چالش‌های مرتبط با استافیلوکوکوس اورئوس و MRSA دست یافت.

سیستان با شرایط اقلیمی خاص انجام شد، همخوانی دارد (۱۸). نتایج پژوهش حاضر با بسیاری از مطالعات پیشین در زمینه شیوع ژن‌های آگزوتوکسین و مقاومت به متی‌سیلین همخوانی دارد. به‌طور خاص، یافته‌های مربوط به فراوانی بالای ژن‌های انترتوکسین و اکسفولیاتیو در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، با نتایج مطالعات مشابه در مناطق دیگر جهان تطابق دارد. این امر نشان‌دهنده یک الگوی جهانی در مقاومت به متی‌سیلین و توانایی تولید آگزوتوکسین‌ها توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس است.

استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در انسان، نیازمند بررسی‌های دقیق و

References

- 1- Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG JR. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(3): 603-61.
- 2- Tsuji T. [Modulation of Host Immune System by Staphylococcal Superantigen-like (SSL) Proteins]. *Yakugaku Zasshi.* 2021; 141(4): 579-589.
- 3- Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 52.
- 4- Chen H, Zhang J, He Y, Lv Z, Liang Z, Chen J, et al. Exploring the Role of Staphylococcus aureus in Inflammatory Diseases. *Toxins.* 2022; 14(7): 464.
- 5- Ali Alghamdi B, Al-Johani I, Al-Shamrani JM, Musamed Alshamrani H, Al-Otaibi BG, Almazmomi K, et al. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Saudi J Biol Sci.* 2023; 30(4): 103604.
- 6- Kmiha S, Jouini A, Zerriaa N, Hamrouni S, Thabet L, Maaroufi A. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated from Burned Patients in a Tunisian Hospital: Molecular Typing, Virulence Genes, and Antimicrobial Resistance. *Antibiotics.* 2023; 12(6): 1030.
- 7- Souza RS, Virginio F, Riback TIS, Suesdek L, Barufi JB, Genta FA. Microorganism-Based Larval Diets Affect Mosquito Development, Size and Nutritional Reserves in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Front Physiol.* 2019; 10: 152.
- 8- Abusheraida NSA, AlBaker AAH, Aljabri ASA, Abdelrahman HA, Al-Mana H, Wilson GJ, et al. Rapid Visual Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Human Clinical Samples via Closed LAMP Assay Targeting mecA and spa Genes. *Microorganisms.* 2024; 12(1): 157.
- 9- Mkhize S, Amoako DG, Shobo CO, Zishiri OT, Bester LA. Genotypic and Phenotypic Characterizations of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on Frequently Touched Sites from Public Hospitals in South Africa. *Int J Microbiol.* 2021; 2021: 6011045.
- 10- G Abril A, G Villa T, Barros-Velázquez J, Cañas B, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, et al. Staphylococcus aureus Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins (Basel).* 2020; 12(9): 537.
- 11- Krakauer T. Staphylococcal Superantigens: Pyrogenic Toxins Induce Toxic Shock. *Toxins (Basel).* 2019; 11(3): 178.
- 12- Dhungel S, Rijal KR, Yadav B, Dhungel B, Adhikari N, Shrestha UT, et al. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Prevalence, Antimicrobial Susceptibility Pattern, and Detection of mecA Gene among Cardiac Patients from a Tertiary Care Heart Center in Kathmandu, Nepal. *Infect Dis (Auckl).* 2021; 14: 11786337211037355.

13- Chersoni L, Checcucci A, Malfacini M, Puggioli A, Balestrino F, Carrieri M, et al. The Possible Role of Microorganisms in Mosquito Mass Rearing. *Insects*. 2021; 12(7): 645.

14- Ghasemi P, Mahdavi S. Study of Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1) and Methicillin Resistance (MecA) Genes of Staphylococcus aureus Isolates from Local Cheese in Northwest of Iran. *Gene Cell Tissue*. 2018; 5(4): e82372.

15- Agnieszka M, Ewelina P, Dagmara SP, Renata UC, Łukasz S. Association Between the Methicillin Resistance of Staphylococcus aureus Isolated from Slaughter Poultry, Their Toxin Gene

Profiles and Prophage Patterns. *Current Microbiology*. 2018; 75: 1256–1266.

16- Al-Talib H, Yean CY, Al-Khateeb A, et al. A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Panton-Valentine Leucocidin. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 113.

17- Chambers HF, Deleo. FRWaves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(9): 629-41.

18- Otter JA, French GL. Molecular Epidemiology of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Europe. 2010.



Prevalence of genes encoding exotoxins in methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from mosquito larvae in Sistan region by PCR method

Parisa Hasanein^{1*}, Vahideh Hamidnia²

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

2- Master's student, Department of Pathobiology, faculty of Veterinary, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: June 5, 2024; Revise: June 8, 2024; Accept: June 8, 2024

 10.22034/NFVM.2024.461253.1247

Summary

Staphylococcus aureus produces a wide range of exotoxins that makes diseases in the host. Pyrogenic superantigens are a group of exotoxins produced by *Staphylococcus aureus*. This group includes toxic shock syndrome toxin, exfoliative and all enterotoxins of this bacterium. Identifying these factors is essential in understanding the pathogenic process of bacteria. The aim of this study was to investigate the presence of toxic shock syndrome (TSST-1), exfoliative A/B and enterotoxins A, B, C, D, E genes in methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from mosquito larvae in Sistan region by PCR method. This research was conducted on 57 isolates of *Staphylococcus* bacteria. Methicillin-resistant and sensitive isolates were identified using agar diffusion method and oxacillin-containing DNA plates. Bacteria were extracted by boiling method. Using PCR method and specific primers, genes encoding toxic shock syndrome (tst), exfoliative (eta, etb) and enterotoxin (sea, seb, sec, sed, see) were investigated in this bacterium. Out of a total of 57 *Staphylococcus aureus* isolates, 32 resistant isolates and 25 methicillin sensitive isolates were identified. The frequency of enterotoxin, exfoliative and toxic shock syndrome genes in resistant isolates was 50%, 21.87%, 3.12% respectively and in sensitive isolates 44.08%, 23.75% and 0% respectively. The results showed that the prevalence of methicillin-resistant isolates and isolates capable of carrying enterotoxin and exfoliative genes was high in Sistan region.

Keywords: antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*, mosquito larvae, methicillin, enterotoxin



بررسی آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای سفید محلی ایرانی

افشین آخوندزاده بستی^۱، بیژن مرادی^۲، زهره مشاک^{۳*}

۱- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

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

دریافت مقاله: ۰۵ فروردین ۱۴۰۳، بازنگری: ۲۷ خرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۹ خرداد ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.447823.1233

چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز به عنوان یک باکتری گرم مثبت عامل ایجاد عفونت فرصت طلب بسیار کشنده در انسان است که از طریق طیف وسیعی از مواد خوراکی از جمله فراورده‌های لبنی، گوشتی و سبزیجات قابل انتقال به انسان است. هر چند پنیر سفید محلی در کشور ایران تحت شرایط خوب تولید صورت نمی‌گیرد، اما تا کنون بررسی جامعی در باره شیوع سروتیپ‌های مختلف لیستریا مونوسیتوژنز در این فراورده در کشور انجام نشده است. به این منظور شهرهای بابل، قائم‌شهر، آمل، ارومیه، همدان، تهران و گرمسار به عنوان شهرهایی با مصرف بالای پنیر سفید محلی انتخاب شدند و در مجموع تعداد ۳۴۳ نمونه پنیر محلی ایرانی از مراکز فروش این شهرها جمع‌آوری و به آزمایشگاه بهداشت و کنترل مواد غذایی منتقل گردید. جداسازی و شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌ها به کمک غنی‌سازی اولیه و کشت در محیط انتخابی انجام شده، گونه‌های جداسازی شده با روش‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفتند و سپس سروتیپ هر گونه تعیین گردید. در نهایت شمارش نمونه‌های مثبت با روش بیشترین تعداد احتمالی ۵ لوله‌ای انجام شد. در مجموع ۹ مورد از ۳۴۳ نمونه تحت بررسی از نظر وجود لیستریا مونوسیتوژنز مثبت تشخیص داده شد. بیشترین موارد آلودگی از شهر ارومیه (۳ مورد) جداسازی شد. با توجه به احتمال بقای این باکتری در طی فرآوری پنیر سفید محلی، به نظر می‌رسد نظارت بر نحوه تولید، نگهداری و عرضه این فراورده باید افزایش یابد و تا حد امکان تولید این محصول در کارگاه‌هایی انجام شود که تحت نظر نهادهای قانونی فعالیت می‌کنند.

واژگان کلیدی: پنیر سفید محلی ایرانی، لیستریا مونوسیتوژنز، بیشترین تعداد احتمالی، سروتیپ

مقدمه

فرآوری لبنیات سنتی از جمله پنیر سفید محلی، در کشور ایران از نظر بهبود رژیم غذایی مصرف‌کننده و معیشت تولیدکنندگان آنها اهمیت زیادی دارد. افراد زیادی برای محصولات لبنی سنتی به دلیل طعم خاص و خواص تغذیه‌ای مفیدشان ارزش بیشتری قائل هستند (۱-۳). به طوری که، نظرسنجی از مصرف‌کنندگان توسط استال و همکاران (۲۰۰۸) در کنیا و اتیوپی نشان داد که محصولات سنتی هر چند کیفیت میکروبی ضعیف‌تری دارند اما بر محصولات کارخانه‌ای ترجیح داده می‌شوند، زیرا مصرف‌کنندگان به ترتیب طعم و قیمت آنها را ترجیح می‌دهند (۴).

لیستریا مونوسیتوژنز به عنوان یک باکتری میله‌ای گرم مثبت، متحرک، بدون اسپور و عامل ایجاد عفونت فرصت‌طلب و حتی کشنده در انسان است که از طریق طیف وسیعی از مواد خوراکی از جمله فراورده‌های لبنی، گوشتی و سبزیجات قابل انتقال به انسان است. لیستریوز که توسط *لیستریا مونوسیتوژنز* ایجاد می‌شود، عموماً یک بیماری خوش‌خیم برای افراد دارای سیستم ایمنی است. بین ۲ الی ۱۰ درصد افراد بدون بروز علائم بالینی این باکتری را در روده کوچک خود داشته و حامل این میکروارگانیسم محسوب می‌شوند. با این وجود لیستریا می‌تواند برای برخی از افراد، از جمله نوزادان، افراد مسن و بیماران نقص ایمنی، و همچنین افرادی که از دیابت یا بیماری‌های کبدی و کلیوی رنج می‌برند مضر باشد (۵، ۶). مرگ مرتبط با لیستریوز در حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد موارد برای بیماران گروه‌های آسیب‌پذیر رخ می‌دهد (۷). علائم لیستریوز شامل بروز اسهال، تهوع، تب و تشنج است که در فرم تهاجمی منجر به سپتی‌سمی و مننژیت می‌شود. همچنین در خانم‌های باردار می‌تواند منجر به بروز سقط و تولد نوزاد مرده شود (۵، ۶، ۸). در سال ۲۰۱۵، ۲۰۰۶ مورد لیستریوز در اتحادیه اروپا گزارش گردید که منتج به مرگ ۲۷۰ نفر شد. (۸).

در چندین مطالعه نشان داده شده است که میزان

باکتری‌های پاتوژن در محصولات لبنی به کنترل آلودگی در طی مراحل تولید و عرضه بستگی دارد. محمد و همکاران (۲۰۱۸) ویژگی‌های میکروبیولوژیکی پنیر سفید سودانی را بررسی کردند و نشان دادند که در پنیر تولید شده به روش مدرن، کیفیت میکروبی آن بهبود یافته است. پنیر سفید محلی کشور سودان که در کارخانه‌های لبنی تولید می‌شود برای مصرف ایمن‌تر از پنیرهایی می‌باشد که به طور سنتی تولید می‌شوند و برای بهبود کیفیت نیاز به اعمال اقدامات اصلاحی بیشتری دارند (۹). در مطالعه استونیکا کوپیک و همکاران (۲۰۱۹) لبنیات سنتی در مقایسه با لبنیات تجاری آلودگی باکتریایی و قارچی بالاتری را نشان دادند، که علت آن را انتقال دستی شیر خام در روش سنتی در مقایسه با روش تجاری دانستند (۱۰). به طور خلاصه، اگرچه محتوای میکروبی محصولات صنعتی و سنتی ممکن است در طول فرآوری کنترل شود، اما انجام رویه‌های غیر بهداشتی، استفاده از شیر خام آلوده، ظروف غیر بهداشتی، بسته‌بندی نامناسب، عدم نگهداری مناسب محصول و در مجموع فرآوری محصول بدون رعایت شرایط خوب تولید، ممکن است آنها را ناامن کند. پنیرهای محلی اغلب از شیر غیرپاستوریزه تهیه می‌شود، بنابراین وجود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شیر مورد استفاده برای تولید پنیر از اهمیت خاصی برخوردار است (۲، ۳، ۷، ۹).

ویژگی‌های خاص باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* احتمال شیوع این میکروارگانیسم را در فراورده‌های لبنی به ویژه پنیر سفید بیشتر کرده است. جنس لیستریا توانایی تحمل شرایط محیطی مختلف از جمله دمای ۱/۰- الی ۴۵ درجه سلسیوس، pH بین ۴/۵ الی ۹/۵ و نمک ۱۰ درصد را دارد و می‌تواند با تعداد بیش از 10^3 میکروارگانیسم در لیتر بقای خود را در حین پاستوریزاسیون ناقص حفظ نماید (۱۱-۱۳). بزرگ‌ترین شیوع لیستریوز توسط پنیر مکزیک در سال ۱۹۸۵ توسط مصرف پنیر سنتی مکزیک رخ داده است که در پی آن ۱۴۸ نفر جان خود را از دست دادند (۱۴).

بررسی آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای سفید محلی ایرانی

عبیدات و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که پراکندگی سروتیپ‌های مختلف لیستریا مونوسیتوژنز در مناطق مختلف جغرافیایی با یکدیگر متفاوت است و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این میکروارگانیسم با نوع سروتیپ آن همبستگی دارد (۱۵). هر چند مطالعات پراکنده‌ای در ایران در مورد میزان شیوع لیستریا در شیر و فرآورده‌های آن انجام شده است، اما تا کنون بررسی جامعی درباره شیوع سروتیپ‌های مختلف لیستریا مونوسیتوژنز در این فرآورده در شهرهای مختلف کشور انجام نشده است.

با توجه به این که این باکتری از نمونه‌های پنیر محلی قابل جداسازی است و سروتیپ‌های جداسازی شده باکتری فوق در نقاط مختلف می‌توانند با هم متفاوت باشند، لذا هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی کمی نمونه‌های پنیر محلی نقاط مختلف ایران از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: شهرهای بابل، قائم‌شهر، آمل، ارومیه، همدان، تهران و گرمسار به‌عنوان شهرهایی با مصرف بالای پنیر سفید محلی انتخاب شده و طی سال‌های ۱۴۰۰ الی ۱۴۰۲ به ترتیب ۳۰، ۳۰، ۵۳، ۶۰، ۶۰، ۶۰ و ۵۰ نمونه، در مجموع تعداد ۳۴۳ نمونه پنیر محلی ایرانی از مراکز فروش فرآورده‌های لبنی خریداری شد. نمونه‌ها هر یک به مقدار ۱۰۰ الی ۱۵۰ گرم، در ظروف استریل جمع‌آوری و در کنار یخ و طی ۲ الی ۸ ساعت به آزمایشگاه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شد.

شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز: جداسازی و شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز به روش اصلاحی کشور کانادا برای دستورالعمل سازمان غذا و داروی ایالات متحده انجام گرفت (۱۶). به کمک قاشق استریل میزان ۲۵ گرم از هر نمونه برداشته شده و در ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت غنی‌کننده لیستریا (Listeria Enrichment Broth) (مرک/ آلمان) حاوی ۳۷/۵ گرم بر لیتر تیوسیانات پتاسیم (مرک/ آلمان) و ۰/۰۵ گرم بر لیتر

اسید نالیدیکسیک (سیگما/ ایالات متحده) منتقل شد. پس از هم‌زدن به مدت 15 ± 1 دقیقه، محیط کشت‌های غنی‌کننده به مدت ۴۴ الی ۴۸ ساعت در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس از محیط‌های مذکور میزان ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و روی پلیت محیط کشت انتخابی پالکام (PALCAM Listeria Selective Agar) (مرک/ آلمان) محتوی ۰/۰۵ گرم بر لیتر اسید نالیدیکسیک به‌صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای 35 ± 1 درجه سلسیوس قرار گرفت. کلنی‌های خاکستری با هاله مشکی به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مشکوک به لیستریا مونوسیتوژنز در نظر گرفته شد.

تأیید میکروارگانیسم‌های جداسازی شده:

میکروارگانیسم‌های جداسازی شده طی مرحله قبل در پلیت برین هارت اینفیوژن (Brain Heart Infusion agar) (مرک/ آلمان) به‌صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای 35 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای میکروارگانیسم‌های جداسازی شده آزمون‌های لام مرطوب (Wet Mount) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر به‌صورت میکروسکوپ فاز کنتراست، رنگ گرم (Gram Staining)، تحرک در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس، کاتالاز، همولیز و تخمیر قندهای رامنوز، زایلوز و مانیتول انجام شد. میکروارگانیسم‌های دارای حرکت چرخشی در لام مرطوب، با مورفولوژی کوکوباسیل گرم مثبت در رنگ‌آمیزی گرم، دارای تحرک در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد، کاتالاز و همولیز مثبت و دارای توانایی تخمیر قندهای رامنوز، زایلوز و مانیتول به‌عنوان لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی شدند.

سروتایپینگ: باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز

جداسازی شده با آنتی‌سرم اختصاصی (دیفکو/ ایالات متحده) تیمار شد و با توجه به واکنش مشاهده شده، سروتیپ هر میکروارگانیسم شناسایی شد (۱۷).

شمارش لیستریا مونوسیتوژنز: نمونه‌های پنیر که

از نظر حضور لیستریا مونوسیتوژنز مثبت تشخیص داده

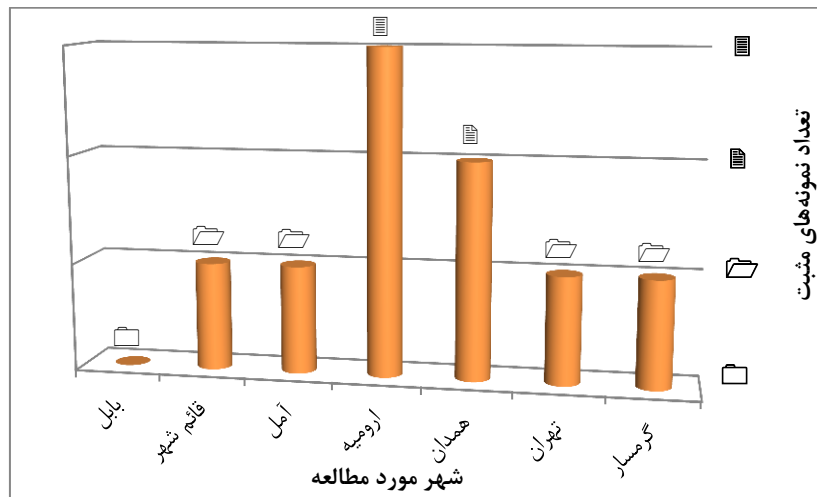
شده بودند جهت شمارش به روش بیشترین تعداد احتمالی (Most Probable Number) یا MPN انتخاب شدند. به این منظور از نمونه‌های مذکور رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱، از هر رقت ۵ لوله در محیط کشت غنی‌کننده لیستریا تهیه شد. محیط کشت‌ها به مدت ۴۴ الی ۴۸ ساعت در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس از هر لوله ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته شد و در محیط کشت اختصاصی لیستریا پالکام آگار کشت داده شد. به کمک بررسی رشد در پلیت‌ها تعداد لوله‌های مثبت مشخص شده و با توجه به مقادیر ارائه شده در جدول MPN، تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های مثبت بر حسب MPN/g گزارش شد.

تحت سیستم عامل ویندوز مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه نتایج به دست آمده از شمارش میکروبی بین شهرهای مختلف و همچنین بین سروتیپ‌های مختلف به کمک آزمون واریانس یک‌طرفه غیر پارامتری (کروسکال-والیس) و آزمون تعقیبی دان با حد احتمال ۰/۰۵ انجام شد. نمودار مربوطه به کمک نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2017 ترسیم شد.

نتایج

از مجموع ۳۴۳ نمونه پنیر سفید محلی مورد بررسی ۹ نمونه (۲/۶ درصد) دارای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تشخیص داده شد. تعداد نمونه‌های دارای لیستریا مونوسیتوژنز به تفکیک شهرها در نمودار ۱ نشان داده شده است.

تحلیل آماری: برای انجام محاسبات آماری نرم‌افزار



نمودار ۱- فراوانی نمونه‌های پنیر سفید محلی دارای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به تفکیک شهرهای مورد مطالعه

مثبت) بود. جزئیات سروتیپ‌های شناسایی شده و شمارش تعداد باکتری در نمونه‌های مربوطه در جدول ۱ ذکر شده است. لازم به ذکر است که در ۲ مورد جداسازی شده از شهرهای آمل و قائم‌شهر میکروارگانیزم‌های جداسازی شده با هیچ یک از سرم‌های تجاری ضدلیستریا واکنش نداده و به صورت سروتیپ ناشناس باقی ماند.

بیشترین موارد آلودگی مربوط به شهر ارومیه (۳ مورد/ ۳۳/۳ درصد موارد مثبت) و پس از آن شهر همدان (۲ مورد/ ۲۲/۲ درصد موارد مثبت) بود.

بیشترین سروتیپ شناسایی شده سروتیپ 1/2a به تعداد ۴ مورد (۴۴/۴ درصد از موارد مثبت) و پس از آن سروتیپ 4b به تعداد ۳ مورد (۲۲/۲ درصد از موارد

بررسی آلودگی به لیستریا مونوسییتوزنز در پنیرهای سفید محلی ایرانی

جدول ۱- شمارش تعداد باکتری لیستریا مونوسییتوزنز و شناسایی سروتیپ‌های مربوطه در نمونه‌های پنیر سفید محلی آلوده به لیستریا مونوسییتوزنز

ردیف	شمارش تعداد باکتری	سرو تیپ	شهر نمونه برداری
	لیستریا مونوسییتوزنز در نمونه (MPN/g)	باکتریشناسایی شده	
۱	۱/۸	4b	قائم شهر
۲	۱۱	-	آمل
۳	۵۸	4b	ارومیه
۴	۹۴	4b	ارومیه
۵	۱/۸	1/2a	ارومیه
۶	۳۸	1/2a	همدان
۷	۱/۸	1/2a	همدان
۸	۳۳	1/2a	تهران
۹	۲	-	گرمسار

هستند که برخی از پنیرهای سفید محلی ایران نیز از این نوع به‌شمار می‌آیند. مطالعات متعدد نشان داده است که بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در طی تولید این فراورده از بین نمی‌روند و حتی لیستریا مونوسییتوزنز قادر است در مراحل از فراوری پنیر، تکثیر یافته و خطر ابتلا را افزایش دهد (۱۹). لانگر و همکاران (۲۰۱۲) طبق گزارشات مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها طی سال‌های ۱۹۹۳ الی ۲۰۰۶ عنوان کردند که در این سال‌ها در نقاط مختلف جهان بالغ بر ۲۷ مورد شیوع بیماری غذازاد از طریق مصرف پنیر سنتی روی داده است (۲۱). همچنین طبق گزارش سازمان غذا و داروی ایالات متحده (۲۰۱۶) از بین ۱۶۰۶ پنیر نیمه‌نرم و سخت تهیه شده از شیر خام که بین سال‌های ۲۰۱۴ الی ۲۰۱۶ از سطح اروپا و ایالات متحده نمونه‌برداری شده بودند، ۱۰ مورد (۰/۶۲ درصد) آلوده به لیستریا مونوسییتوزنز بودند (۲۲).

در مطالعات پیشین وجود این میکروارگانیسم در نمونه‌های پنیر سفید محلی کشور ایران مورد بررسی قرار گرفته است. بهادر و همکاران (۲۰۱۵) بین سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۳ نمونه‌های لبنی و گوشتی جمع‌آوری شده از شهر تهران را به روش جداسازی در محیط انتخابی و تأیید ژنوتیپی مورد بررسی قرار دادند که در این بین ۵ نمونه از ۷۰ مورد پنیر (۷/۱۴ درصد) مثبت تشخیص داده شد (۲۳). میزان آلودگی نمونه‌های پنیر به این میکروارگانیسم در مطالعه نقی‌زاده حیدرلو و همکاران

میانگین تعداد باکتری‌های لیستریا مونوسییتوزنز در نمونه‌های مثبت $26/79 \pm 32/42$ MPN/g بود. با توجه به نتایج تحلیل آماری تعداد شمارش باکتری لیستریا مونوسییتوزنز در نمونه‌های مثبت، در شهر ارومیه به‌طور معناداری بیشتر از شهرهای قائم‌شهر، آمل و گرمسار بود ($p < 0/05$). ارتباط معناداری بین میزان آلودگی میکروبی و سروتیپ‌های جداسازی شده مشاهده نشد ($p > 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

لیستریوز به‌عنوان یک بیماری غذازاد نادر، هر ساله بین ۱/۴ الی ۱/۶ درصد افراد جهان را درگیر می‌کند. اما میزان بالای سقط جنین و همچنین مرگ و میر ناشی از این عفونت در افراد در معرض خطر، انتقال این بیماری را از طریق اغذیه آماده مصرف به‌عنوان یک نگرانی قابل توجه برای سلامت عمومی تبدیل کرده است. به همین دلیل در سال‌های ابتدایی قرن حاضر سازمان‌ها و نهادهای قانونگذار از جمله سازمان جهانی کشاورزی و غذا، سازمان بهداشت جهانی، سازمان غذا و داروی ایالات متحده و کمیته تدوین راهنمای کدکس در بیانیه‌ها و استانداردهای جداگانه خطر انتقال این میکروارگانیسم را ارزیابی کرده و راهکارهایی را برای جلوگیری از آن ارائه نموده‌اند (۱۸-۲۰).

طبق اظهار سازمان بهداشت جهانی یکی از مهم‌ترین مواد غذایی در شیوع لیستریا مونوسییتوزنز پنیرهای نرم

مونوسیتوزنر مورد تأیید قرار گرفت (۲۷). در این مطالعه هیچ یک از فراورده‌های تجاری تهیه شده با شیر پاستوریزه آلودگی به گونه‌های مختلف لیستریا را نشان ندادند. حاج حسینی و همکاران (۲۰۱۴) فراورده‌های مختلف گوشتی و لبنی را با روش استاندارد بین‌المللی و تأیید ژنتیکی بررسی کرده و نشان دادند که از ۲۰ نمونه پنیر نرم شهر قزوین ۹ مورد (۴۵ درصد) آلوده به لیستریا مونوسیتوزنر بوده است (۲۸). اکرمی مهاجری و همکاران (۲۰۱۷) با روشی مشابه، شیر خام و فراورده‌های سنتی شهر یزد را جهت مطالعه خود انتخاب کردند که از بین ۱۲۰ نمونه پنیر سنتی ۹ مورد (۷/۵ درصد) از نظر لیستریا مونوسیتوزنر مثبت بود (۱). مشاک و روشنی (۲۰۱۹) پنیر سنتی کوزه‌ای را در شهرهای سقز، بانه و سنندج از استان کردستان از نظر ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی مورد مطالعه قرار دادند. در نهایت هیچ‌یک از نمونه‌های مورد بررسی (صفر درصد) از نظر لیستریا مونوسیتوزنر مثبت تشخیص داده نشد که این امر می‌تواند به دلیل ماهیت سخت این نوع پنیر و نحوه فراوری آن (رسیدن در کوزه سفالی مدفون به مدت حداقل ۳ ماه) باشد (۲). در مطالعه حاضر برای اولین بار شیوع لیستریا مونوسیتوزنر در نمونه‌های پنیر سفید محلی چند شهر مختلف کشور بررسی شده که کمترین تعداد موارد مثبت مربوط به شهر بابل (صفر) و بیشترین موارد مربوط به شهر ارومیه (۳ مورد) بوده است که از نظر آماری اختلاف معناداری داشته‌اند ($p < 0.05$).

وجود اختلاف آلودگی در نتایج شهرهای مختلف می‌تواند به علت میزان رعایت نکات بهداشتی، شیوه فراوری، نحوه انتقال فراورده، وجود استارترهای لاکتیکی متفاوت و همچنین نوع سروتیب باکتری آلوده کننده باشد (۲، ۹، ۲۹). در مطالعات پیشین نشان داده شده که حدت و مقاومت سروتیب‌های مختلف لیستریا مونوسیتوزنر با هم متفاوت است (۱۷). بنابراین در مطالعه حاضر پس از جداسازی میکروارگانیزم، ویژگی‌های سروتیپی آن نیز بررسی شد که در مطالعات پیشین در کشور ما کمتر مورد

(۲۰۲۱) ۴ از ۴۴ مورد (۹/۰۹ درصد) بود. به این ترتیب که طیف وسیعی از نمونه‌های بالینی، غذایی و دامی مورد بررسی قرار گرفت و از بین مواد غذایی مختلف شامل پنیر، عصاره مرغ، عصاره گوشت، شیر و سوسیس، بیشترین آلودگی مربوط به نمونه‌های پنیر بود (۲۴). دهنوی و همکاران (۲۰۲۱) ۶۰ نمونه پنیر سنتی را از مراکز فروش سطح تهران تهیه نمودند که در این بین ۱ مورد (۱/۶۷ درصد) آلوده به لیستریا مونوسیتوزنر بود. با توجه به تنوع اقلیمی ایران، نامبردگان انجام مطالعات مشابه را در سایر نقاط کشور قویاً توصیه نمودند. در مطالعه حاضر شیوع لیستریا مونوسیتوزنر در ۳۴۳ نمونه جمع‌آوری شده از شهرهای مختلف کشور بررسی شد و در نهایت وجود لیستریا مونوسیتوزنر در ۹ نمونه (۲/۶۲ درصد) مورد تأیید قرار گرفت (۲۵).

تفاوت در نوع نمونه‌برداری، تعداد نمونه و روش‌های مختلف آزمایش، مقایسه مطالعات مختلف در این زمینه را با چالش مواجه ساخته است. ضمناً تفاوت جغرافیایی در نقاط مختلف کشور و همچنین تفاوت بین نحوه تهیه پنیر محلی در شهرهای مختلف می‌تواند یکی از دلایل تفاوت نتایج میزان شیوع لیستریا مونوسیتوزنر در مطالعات مختلف باشد. در مطالعه حاضر برای اولین بار، آلودگی پنیر سفید محلی به باکتری لیستریا مونوسیتوزنر در ۷ شهر مختلف کشور مورد بررسی قرار گرفته است. محمودی (۲۰۱۰) وجود لیستریا مونوسیتوزنر را در نمونه‌های شیر خام و فراورده‌های لبنی ۲ تولیدکننده سنتی را در نورآباد ممسنی بررسی کرد که از بین ۶۰ نمونه پنیر سفید سنتی، ۳ نمونه (۵/۰ درصد) آلوده تشخیص داده شد. در این مطالعه هیچ‌یک از نمونه‌های ماست و دوغ آلوده به لیستریا مونوسیتوزنر نبود که می‌تواند به دلیل pH پایین این فراورده‌ها باشد (۲۶). در مطالعه رحیمی و همکاران (۲۰۱۰) طی ۲ سال پی‌پی انواع فراورده‌های لبنی سنتی و تجاری، در ۱۱ شهر استان اصفهان از نظر وجود گونه‌های مختلف لیستریا بررسی شد که از بین ۶۰ نمونه پنیر سنتی، آلودگی ۹ مورد (۱۵/۰ درصد) به لیستریا

بررسی آلودگی به لیستریا مونوسی‌توزنز در پنیرهای سفید محلی ایرانی

مجموع ۸ سویه مختلف لیستریا مونوسی‌توزنز جداسازی شد. هر چند این مطالعه در ردیابی منشاء آلودگی، یافته‌های زیادی نداشت، اما یک مورد از سویه‌های جداسازی شده در سطوح کاری، اتاق رسیدن پنیر و اتاق فرآوری نیز جداسازی شد که نشان‌دهنده راه‌های دیگری برای انتقال این میکروارگانیسم، غیر از انتقال از طریق شیر خام است (۳۳). لطف‌اللهی و همکاران (۲۰۱۷) شناسایی سروتیپ باکتری‌های لیستریا مونوسی‌توزنز جداسازی شده از انسان، غذا و دام را در ایران انجام دادند. از ۱۳۰ نمونه پنیر مورد بررسی ۴ مورد (۳/۱ درصد) مثبت اعلام شد. با توجه به نتایج این مطالعه شیوع سروتیپ‌های بالینی که به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین G مقاوم بودند، به غیر از یک مورد جداسازی شده از پنیر، در سایر سویه‌های جداسازی شده از مواد غذایی یافت نشد (۳۴). در مطالعه عبدالوی و همکاران (۲۰۲۰) به‌طور مشابه چنین مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های پنیر و موارد مرتبط با تولید آن در کشور الجزایر انجام شد. در این مطالعه پنیرها بر اساس نوع به سه دسته تقسیم شد. در ۱۵۰ نمونه مربوط به تولید پنیرهای فشرده مجموعاً ۶ گونه از شیر خام و یک مورد مربوطه به پنیر اصلاح شده، از ۱۳۵ نمونه مربوط به تولید پنیرهای نرم ۱ نمونه از شیر خام و از ۱۰۰ نمونه مربوط به پنیرهای سخت ۱۱ نمونه از پنیرهای رنده شده بسته‌بندی و ۱ نمونه از سطوح جداسازی شد (مجموعاً ۲۰ مورد از ۳۸۵ نمونه) که از این بین ۱۰، ۷، ۲ و ۱ نمونه به ترتیب متعلق به سروتیپ‌های 4b، 1/2b، 1/2a و 4c بودند (۳۵). در مطالعه کنونی نیز ۴ و ۳ سویه جداسازی شده به ترتیب متعلق به سروتیپ‌های 1/2a و 4b بودند. همچنین ۲ نمونه جداسازی شده از شهرهای گرمسار و آمل تعیین سروتیپ نشدند. هر چند تعداد نمونه‌های جداسازی شده در این مطالعه محدود است، اما به‌عنوان یکی از یافته‌ها سروتیپ 4b از نمونه‌های پنیر شهرهای قائم‌شهر و ارومیه واقع در شمال و شمال غرب کشور جداسازی شده‌اند. در حالی که سروتیپ 1/2a از نمونه‌های پنیر شهرهای همدان، تهران و ارومیه

توجه قرار گرفته است. در مطالعه گیلوت و همکاران (۱۹۹۶) طی سال‌های ۱۹۹۰ الی ۱۹۹۲ در کشور بلژیک، سویه‌های مختلف لیستریا مونوسی‌توزنز پس از جداسازی از افراد مبتلا و فراورده‌های غذایی، با روش سروتایپینگ افتراق داده شد. در این میان ۱۷۸ سویه لیستریا مونوسی‌توزنز از نمونه‌های پنیر جداسازی شد که بیشترین سروتیپ متعلق به گروه 1/2a (۷۹/۸ درصد) و سپس سروتیپ‌های 4b (۱۱/۸ درصد) و 1/2b (۵/۰ درصد) بود (۳۰). دا سیلوا و همکاران (۲۰۰۱) با روش‌های بیوشیمیایی، مولکولی و تکنیک‌های سروتایپینگ سویه‌های لیستریا مونوسی‌توزنز جداسازی شده از نمونه‌های پنیر برزیلی را بررسی نموده و بیان داشتند که ۵۹/۹، ۲۷/۵ و ۱۲/۶ درصد از میکروارگانیسم‌های مورد بررسی به ترتیب متعلق به سروتیپ‌های 1/2a، 1/2b و 4b بودند. لازم به ذکر است که هر چند برخی از سویه‌های جداسازی شده فاقد یک یا دو شاخص بیماری‌زا بودند، اما همگی حداقل یک شاخص بیماری‌زا را داشتند و این نشان‌دهنده اهمیت بالینی سه سروتیپ مذکور است (۳۱). پینتادو و همکاران (۲۰۰۵) در خلال سال‌های ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ به بررسی مشخصات سروتیپ‌های لیستریا مونوسی‌توزنز جداسازی شده از ۶۳ نمونه پنیر نرم کشور پرتغال پرداختند که این پنیرها با روش‌های سنتی و با استفاده از شیر خام گوسفند تهیه می‌شوند. از ۶۳ نمونه مورد بررسی ۲۹ مورد (۴۶ درصد) آلوده به لیستریا مونوسی‌توزنز بودند که از این بین ۲۰، ۳ و ۱ مورد به ترتیب دارای سروتیپ‌های 4b، 1/2b و 1/2a بودند و برای ۵ مورد، هیچ سروتیپی مورد شناسایی قرار نگرفت (۳۲). در مطالعه فاکس و همکاران (۲۰۱۱) عوامل بروز آلودگی لیستریا مونوسی‌توزنز در پنیر مورد توجه قرار گرفت و در گونه‌های جداسازی شده از نمونه‌های شیر خام، پنیر، محیط تولید و فروشگاه‌ها، در کنار روش‌های مولکولی از نظر سروتایپینگ هم بررسی شدند. در این مطالعه گسترده که شامل بررسی ۱۶ مرکز تولیدی پنیر در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ در کشور ایرلند بود، در

جداسازی شده است. این دو سروتیپ از نظر بالینی سروتیپ‌های مهمی محسوب می‌شوند و فراوانی شیوع این موارد با سایر مطالعات انجام شده مطابقت نسبی دارد.

طبق استاندارد EN ISO 11290-1: 2017 وجود آلودگی یه یک کلنی لیستریا مونوسی‌توژنز در ۲۵ گرم نمونه می‌تواند موجب مردود شدن آن ماده غذایی شود (۳۶). وابستگی بروز عفونت لیستریوز به سیستم ایمنی میزبان، تعیین دوز عفونت‌زا را برای آن با چالش روبرو کرده است. با این حال مطالعات مختلف تأکید کرده‌اند که ایجاد بیماری توسط لیستریا مونوسی‌توژنز تا حد زیادی به تعداد این باکتری در محصول آلوده بستگی دارد (۳۷). کابو و همکاران (۲۰۰۷) که در ایالت کاتالون کشور اسپانیا، آلودگی فراورده‌های آماده مصرف به لیستریا و سالمونلا را بررسی می‌کردند، نوعی روش نیمه کمی (تهیه رقت‌های ۱۰ برابر از هر نمونه و جستجوی میکروبی برای هر رقت) را برای ارزیابی تعداد میکروارگانیسم‌ها انتخاب کردند. در مجموع تعداد ۷۸ نمونه پنیر تازه مورد بررسی قرار گرفت که از این بین ۱ مورد (۱/۳ درصد) آلوده به لیستریا مونوسی‌توژنز با تعداد بین ۱۰ الی ۱۰۰ CFU/g بود (۳۸). موسوی و همکاران (۲۰۱۴) در یک مطالعه کوتاه به بررسی شیرهای مورد استفاده برای تهیه پنیر سنتی لیقوان در شهر تبریز پرداختند. وی از روش شمارش در محیط کشت اختصاصی پالکام آگار برای ارزیابی کمی نمونه‌ها استفاده کردند و دریافتند که از ۱۸ نمونه شیر مورد بررسی، ۹ نمونه (۵۰ درصد) آلوده به لیستریا مونوسی‌توژنز است و تعداد باکتری لیستریا مونوسی‌توژنز در نمونه‌های آلوده بین ۱۰ الی ۸۰ CFU/ml (به‌طور میانگین ۴۰ CFU/ml) گزارش شد. در مطالعه حاضر از روش ۵-MPN لوله‌ای برای شمارش لیستریا مونوسی‌توژنز استفاده شده است که به نظر می‌رسد نسبت به روش شمارش مستقیم برای شمارش مقادیر کم باکتری لیستریا مونوسی‌توژنز روش مناسب‌تری باشد (۳۹). آوولات و بسه (۲۰۱۶) در یک مطالعه مروری عنوان کردند که مقادیر کم باکتری لیستریا مونوسی‌توژنز در مواد غذایی دارای اهمیت

است و روش شمارش سطحی قادر به بررسی دقیق مقادیر باکتریایی کمتر از ۱۰۰ CFU نیست. بنابراین روش بررسی بیشترین تعداد احتمالی یا MPN را به‌عنوان یکی از روش‌های مناسب برای شمارش این میکروارگانیسم در فراورده‌های غذایی از جمله پنیر معرفی کردند (۴۰). جرارد و همکاران (۲۰۱۸) به جمع‌بندی مطالعات مهم در زمینه جداسازی لیستریا مونوسی‌توژنز از نمونه‌های پنیر پرداختند و کم بودن داده‌ها در زمینه شمارش این باکتری را به‌عنوان یک کمبود مهم در مطالعات مربوطه عنوان کردند (۴۱). با توجه به این که شمارش لیستریا مونوسی‌توژنز اطلاعات مفیدی از شیوع، بقا و بیماری‌زایی این میکروارگانیسم ارائه می‌کند، در مطالعه حاضر به‌عنوان یکی از محدود مطالعات در زمینه شمارش تعداد باکتری لیستریا مونوسی‌توژنز با روش بیشترین تعداد احتمالی MPN که روشی مناسب جهت ارزیابی تعداد کم میکروارگانیسم‌ها است، انجام شد که ۴ نمونه از موارد جداسازی شده دارای شمارش کمتر از ۱۰ MPN/g و ۵ نمونه دارای شمارش بین ۱۰ الی ۱۰۰ MPN/g بودند. بیشترین شمارش باکتری لیستریا مونوسی‌توژنز مربوط به شهر ارومیه و پس از آن شهرهای همدان و تهران بود، به‌طوری که شمارش میکروبی محاسبه شده در نمونه‌های مثبت شهر ارومیه به‌طور معناداری بیشتر از شهرهای قائم‌شهر، آمل و گرمسار بود ($p < 0.05$). در این مطالعه ارتباط معناداری بین میزان آلودگی میکروبی و سروتیپ‌های جداسازی شده مشاهده نشد. جهت بررسی دلایل بروز آلودگی بیشتر در شهر ارومیه بررسی‌های بیشتری درباره الگوی شیوع باکتری لیستریا، شرایط تولید پنیر سنتی و نحوه عرضه آن ضروری به نظر می‌رسد.

در مورد منشاء شیوع لیستریا مونوسی‌توژنز در انواع فراورده‌های لبنی و مخصوصاً پنیر و همچنین راهکارهای کاهش و حذف آن مطالعات بسیاری انجام شده است. بریتو و همکاران (۲۰۰۸) اقدام به بررسی آلودگی‌های لیستریایی در نمونه‌های پنیر محلی در کشور برزیل نمودند. از مجموع ۵۵ نمونه مورد بررسی ۲ مورد مثبت

بررسی آلودگی به لیستریا مونوسی‌توزنز در پنیرهای سفید محلی ایرانی

شیر خام آلوده به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل شیوع لیستریوز عنوان شد، اما در کنار آن عواملی مانند عدم رعایت نکات بهداشتی و نبود نظارت از سوی مراجع معتبر، هشدار داده شد. با توجه به این که در مطالعه حاضر بیشترین موارد آلودگی در شهرهای ارومیه و همدان بوده است، نظارت بر نحوه تولید پنیر محلی در این مناطق اهمیت بالاتری دارد (۴۴). در مطالعه کلانتری‌پور و حنیفیان (۱۳۹۶) فراوانی، تنوع گونه‌ای و ویژگی‌های فنوتیپی سویه‌های لیستریای جداسازی شده از نمونه‌های پنیر سنتی شهر تبریز بررسی شد که از بین ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی مورد بررسی ۵ نمونه آلوده به لیستریا مونوسی‌توزنز بودند. سویه‌های جداسازی شده با تعداد ۸ واحد لگاریتمی تحت آزمون مقاومت حرارتی قرار گرفتند و در نهایت مشخص شد که همگی در دمای ترمیزاسیون (۶۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) دارای مقاومت نسبی هستند، اما در برابر فرایند پاستوریزاسیون غیر فعال می‌شوند. در نهایت با توجه به مشاهده مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به همراه قابلیت تولید بیوفیلم در برخی از سویه‌ها، اعمال کنترل‌های بهداشتی بیشتر پیشنهاد شد. از سوی دیگر نوع پنیر و نحوه فرآوری آن می‌تواند در شیوع و بقای میکروبی مؤثر باشد (۴۵). خدمتی مرصع و همکاران (۱۳۹۸) در بازه زمانی پاییز ۱۳۹۶ الی تابستان ۱۳۹۷، آلودگی به لیستریا مونوسی‌توزنز را در ۱۲۸ نمونه پنیر سنتی عرضه شده در شهر قزوین بررسی کردند که در این بین ۱۴ نمونه (۱۰/۹ درصد) مثبت بودند. از موارد آلوده ۱، ۱، ۹ و ۳ نمونه به‌ترتیب از نوع پنیر کوزه‌ای گوسفندی، کوزه‌ای گاوی، پنیر سفید و ليقوان بودند (۴۶). در مطالعه حاضر نمونه‌های پنیر مورد بررسی همگی از نوع پنیر سفید محلی بودند که از نظر قوام در دسته پنیرهای نرم و نیمه‌نرم طبقه‌بندی می‌شوند.

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه تأییدکننده داده‌های سایر مطالعات انجام شده در سطح کشور است. تولید پنیرهای سنتی خارج از نظارت‌های بهداشتی موجب بروز خطرات بالقوه فراوانی است که ارائه آموزش‌های

بودند که هر دو مربوط به یک واحد تولیدکننده بود. جهت بررسی منشاء بروز این آلودگی نمونه‌های شیر خام، شیر پاستوریزه، پنیر و محیط تولید به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۳۴۴ نمونه مثبت از این تولیدی جداسازی شد که همگی دارای سروتیپ 1/2a بودند. در نهایت ظروف مرحله خنک کردن و تجهیزات ناحیه نگهداری به‌عنوان منابع آلودگی معرفی و انجام مطالعات جامع در نقاط مختلف کشور برزیل توصیه شد. هر چند در مطالعات مختلف عدم پاستوریزاسیون شیر به‌عنوان یک عامل مهم بروز آلودگی در پنیرهای محلی ذکر شده است، اما در مطالعه مذکور هیچ‌یک از نمونه‌های شیر خام آلوده به لیستریا مونوسی‌توزنز نبودند (۴۲). در مطالعه مرادی و همکاران (۱۳۸۷) رفتار باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز در روند تولید پنیر سفید ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور پس از حرارت‌دهی ملایم شیر، سوسپانسیون میکروبی لیستریا مونوسی‌توزنز به آن اضافه شد، به‌طوری که تعداد 10^3 باکتری در هر میلی‌لیتر شیر حاصل شد. سپس به نیمی از نمونه‌ها استارتر لاکتیکی و به سری دوم استارتر لاکتیکی اضافه نشد و در نهایت مشاهده شد که افزایش تعداد باکتری در طی دوره فرآوری در نمونه‌های دارای استارتر به‌طور معناداری کمتر از نمونه‌های فاقد استارتر است (۴۳). بنابراین به نظر می‌رسد که در صورت عدم استفاده از شیرهای استریلیزه برای تهیه پنیرهای محلی، خطر بروز آلودگی با باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز بیش از پیش افزایش یابد. از سوی دیگر یکی از دلایل کم بودن آلودگی به لیستریا در برخی از شهرها می‌تواند نوع استارتر بکار رفته در تهیه پنیر در آن منطقه باشد. در هر صورت بسط این فرضیه نیازمند انجام مطالعات گسترده‌تری است. شاملو و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی شیوع گونه‌های مختلف لیستریا در فراورده‌های لبنی شهر اصفهان پرداختند که از ۹۱ نمونه شیر خام مورد بررسی ۴ مورد (۴/۳۹ درصد) آلوده به لیستریا مونوسی‌توزنز بودند، در حالی که در سایر فراورده‌های لبنی شامل پنیرهای سنتی، این میکروارگانیسم مشاهده نشد. بنابراین هر چند

نمونه‌برداری از محصول نهایی پیش از عرضه به مشتری راه مناسبی برای رصد این گونه آلودگی‌ها می‌باشد. بررسی ارتباط فلور میکروبی پنیرهای محلی و آلودگی به لیستریا مونوسیژنوز می‌تواند به عرضه استارترهای لاکتیکی بهینه، جهت تولید ایمن این فراورده کمک شایانی نماید (۲، ۲۹، ۳۴، ۳۷، ۳۹، ۴۴).

سیاسگزاری

بدین‌وسیله گروه نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از واحد بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ابراز می‌دارد.

References

1- Akrami-Mohajeri F, Derakhshan Z, Ferrante M, Hamidiyan N, Soleymani M, Conti GO, et al. The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria spp* in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). *Food Chem Toxicol*. 2018; 114: 141-4.

2- Mashak Z, Rooshani J. The survey of chemical and microbial characteristics of traditional Koozeh-Cheese (Koopeh) in Kurdistan province. *New Find Vet Microbiol*. 2019; 2(1): 67-80 [In Persian].

3- Vaziri S, Norouzi M. Investigation of the contamination level of local Liqvan Tabriz cheeses with coliforms and *Escherichia coli* in Maragheh city. *Iran J Med Microbiol*. 2011; 5(7): 23-27 [In Persian].

4- Staal SJ, Nin Pratt A, Jabbar MA. Dairy development for the resource poor. Part 2: Kenya and Ethiopia. Dairy development case studies. PPLPI Working Paper 44-2, Rome: Food and Agriculture Organization. 2008; P: 17-26.

5- Doorduyn Y, De Jager CM, Van Der Zwaluw WK, Wannet WJ, Van Der Ende A, Spanjaard L, et al. Invasive *Listeria monocytogenes* infections in the Netherlands, 1995–2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; 25: 433-42.

6- Buchanan RL, Gorris LG, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control*. 2017; 75: 1-3.

7- Sanaa M, Coroller L, Cerf O. Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two

مناسب برای تولیدکنندگان در زمینه بهداشت دام و شیردوشی، شیوه‌های پاستوریزه کردن شیر خام، روش بهینه نظافت ظروف و محیط و نحوه صحیح نگهداری محصول می‌تواند در کاهش آنها مؤثر باشد. همچنین نظارت بر نحوه تولید، نگهداری و عرضه این فراورده باید افزایش یابد و تا حد امکان تولید این محصول در کارگاه‌هایی انجام شود که تحت نظر نهادهای قانونی فعالیت می‌کنند. با توجه به این که فراهم کردن شرایط مناسب بهداشتی و محدود کردن تولید به افراد دارای مجوز بهداشتی با چالش‌های متعددی روبرو است،

soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. *Risk Anal*. 2004; 24(2): 389-99.

8- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J*. 2016; 14(12): e04634.

9- Mohamed OA, El Zubeir IE. Comparative study on chemical and microbiological properties of white cheese produced by traditional and modern factories. *Ann Food Sci Technol*. 2018; 19(1): 115-20.

10- Stobnicka-Kupiec A, Golofit-Szymczak M, Górny R. Microbial contamination level and microbial diversity of occupational environment in commercial and traditional dairy plants. *Ann Agric Environ Med*. 2019; 26(4): 555-65.

11- Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med*. 1985; 312(7): 404-7.

12- Greenwood MH, Roberts D, Burden P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *Int J Food Microbiol*. 1991; 12(2-3): 197-206.

13- Wilson IG. Occurrence of *Listeria* species in ready to eat foods. *Epidemiol Infect*. 1995; 115(3): 519-26.

14- James SM, Fannin SL, Agee BA, Hall B,

- Parker E, Vogt J, et al.** Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1985; 34: 357-9.
- 15- Obaidat MM, Bani Salman AE, Lafi SQ, Al Abboodi AR.** Characterization of *Listeria monocytogenes* from three countries and antibiotic resistance differences among countries and *Listeria monocytogenes* serogroups. *Lett Appl Microbiol.* 2015; 60(6): 609-14.
- 16- Warburton DW, Farber JM, Armstrong A, Caldeira R, Tiwari NP, Babiuk T, et al.** Canadian comparative study of modified versions of the “FDA” and “USDA” methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 1991; 54(9): 669-76.
- 17- Seeliger HP, Höhne K.** Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Vol. 13. Methods in microbiology. Würzburg: University of Würzburg, Academic Press; 1979, P: 31-49.
- 18- US FDA, Centers for Disease Control and Prevention.** Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. College Park, Md: US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition; 2003.
- 19- World Health Organization.** Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. Geneva: Food & Agriculture Org.; 2004.
- 20- Codex Alimentarius Commission.** Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61. Rome: Food and Agriculture Organization and World Health Organization; 2007.
- 21- Langer AJ, Ayers T, Grass J, Lynch M, Angulo FJ, Mahon BE.** Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws—United States, 1993–2006. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(3): 385-91.
- 22- US FDA, FY 2014 – 2016 Microbiological Sampling Assignment - Summary Report: Raw Milk Cheese Aged 60 Days.** Silver Spring: Center for Food Safety and Applied Nutrition; 2016.
- 23- Bahador A, Kalani BS, Valian F, Irajian G, Lotfollahi L.** Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy and meat products. *Avicenna J Clin Microbiol Infect.* 2015; 2(3): 1-6.
- 24- Heidarlo MN, Lotfollahi L, Yousefi S, Lohrasbi V, Irajian G, Talebi M.** Analysis of virulence genes and molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolates from human, food, and livestock from 2008 to 2016 in Iran. *Trop Anim Health Prod.* 2021; 53: 1-9.
- 25- Dehnavi M, Khanjari A, Rezaei E.** Prevalence of *Listeria monocytogenes* in traditional cheeses obtained from food sale centers of Tehran, Iran. *J Food Hyg Saf.* 2021; 7(3): 135-40.
- 26- Mahmoodi MM.** Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and dairy products in Noorabad, Iran. *J Anim Vet Adv.* 2010; 9(1): 16-9.
- 27- Rahimi E, Ameri M, Momtaz H.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control.* 2010; 21(11): 1448-52.
- 28- Haj Hosseini A, Sharifan A, Tabatabaee A.** Isolation of *Listeria monocytogenes* from meat and dairy products. *J Med Microbiol Infect Dis.* 2014; 2(4): 159-62.
- 29- Rabinejad F, Ahani AA, Danesh A.** Surveying contamination rate of local lactic cheese with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Gorgan in 2017. *J Torbat Heydariyeh Univ Med Sci.* 2020, 7(4): 49-57 [In Persian].
- 30- Gilot P, Genicot A, Andre P.** Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(4): 1007-10.
- 31- da Silva MC, Destro MT, Hofer E, Tibana A.** Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. *Int J Food Microbiol.* 2001; 63(3): 275-80.
- 32- Pintado CM, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira MA.** Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiol.* 2005; 22(1): 79-85.
- 33- Fox E, Hunt K, O'Brien M, Jordan K.** *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *Int J Food Microbiol.* 2011; 145: 39-45.
- 34- Lotfollahi L, Chaharbalesh A, Rezaee MA, Hasani A.** Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. *Microb Pathog.* 2017; 107: 425-9.
- 35- Abdellaoui L, Bouayad L, Bensefia SA, Hamdi TM.** Serotyping and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses

produced in the region of Algiers (Algeria). *Veterinaria*. 2020; 69(1): 43-9.

36- International Organization for Standardization. ISO 11290-1 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* Part 1: Detection method. 2nd ed. Geneva: ISO publications. 2017; P: 6.

37- National Advisory Committee on microbiological criteria for foods. Recommendations by The National Advisory Committee on microbiological criteria for foods. The ecology of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 1991; 14(3-4): 216-9.

38- Cabedo L, Barrot LP, Canelles AT. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and Salmonella in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *J Food Protect.* 2008; 71(4): 855-9.

39- Moosavy MH, Esmaceli S, Mostafavi E, Amiri FB. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milks used for Iranian traditional cheese in Lighvan cheese factories. *Ann Agric Environ Med.* 2014; 21(4): 728-9.

40- Auvolat A, Besse NG. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiol.* 2016; 53: 135-49.

41- Gérard A, El-Hajjaji S, Niyonzima E, Daube G, Sindic M. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese - A review. *Int J Dairy Technol.* 2018; 71(4): 825-

43.

42- Brito JR, Santos EM, Arcuri EF, Lange CC, Brito MA, Souza GN, et al. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(15): 4954-61.

43- Moradi B, Mashak Z, Moradi B, AmirMozafari N. The study of behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture processing of Feta Cheese. *Vet Sci.* 7 (1): 965-972. [In Persian]

44- Shamloo E, Jalali M, Mirlohi M, Madani G, Metcalf D, Merasi MR. Prevalence of *Listeria* species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. *Int J Environ Health Eng.* 2015; 4(1): 1-5.

45- Kalantaripour A, Hanifian S. *Listeria* isolated from traditional cheeses of Tabriz area: Occurrence, diversity and phenotypic characteristics. *J Food Microbiol.* 2017; 4(2): 83-96. [In Persian]

46- Khedmati Morasa H, Mahmoudi R, Ghajarbeygi P, Mosavi S, Shahsavari S, et al. *Listeria monocytogenes* contamination in unpasteurized traditional cheese products in Qazvin, Iran. *J Mazandaran Uni Med Sci.* 2019; 29(178): 115-26. [In Persian]

analysis and effects on wheat dough performance and bread quality. *LWT.* 2017; 75: 656-62.



Investigating the contamination of *Listeria monocytogenes* in Iranian local white cheese

Afshin Akhondzadeh Basti¹, Bizhan Moradi², Zohreh Mashak^{*3}

1- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

2- Graduated student, Department of Microbiology, Faculty of Science, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

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

Receive: March 24, 2024; Revise: June 16, 2024; Accept: June 18, 2024

 10.22034/nfvm.2024.447823.1233

Summary

Listeria monocytogenes, as Gram-positive bacteria, is the cause of a opportunistic fatal infection in humans, which can be transmitted via a wide range of food products, including dairy, meat, and vegetables. Local white cheese in Iran is not produced under good manufacturing practices, however a comprehensive study about the prevalence of different serotypes of *Listeria monocytogenes* in this product has not been done yet. Babol, Qaemshahr, Amol, Urmia, Hamedan, Tehran and Garmsar cities were selected as areas with high consumption of local white cheese, and 343 samples were collected from the dairy shops and delivered to the Food Safety and Hygiene Laboratory. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*, from cheese samples were carried out by pre-enrichment and cultivation in the selective media, the isolates were confirmed by biochemical methods, and then the serotype of each species was determined. Finally, the positive samples was enumerated using the five-tubes most probable number method. 9 cases of 343 samples were contaminated for *Listeria monocytogenes*. Most positive cases were isolated from Urmia city (3 cases). Considering the possibility of the survival of this organism during the processing of local white cheese, it seems that the monitoring of the manufacturing, storage and supply should be increased for this product and as much as possible, the production should be done in plants under the supervision of regulatory organizations.

Keywords: Iranian local white cheese, *Listeria monocytogenes*, Most Probable Number, Serotype




بررسی شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا، سودوموناس و کلی فرم در گوشت بوقلمون کشتار شده و ابزارها در کشتارگاه نجف آباد، اصفهان

مهدی حیدری^۱، ابراهیم رحیمی^{۲*}

۱- دانش آموخته 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: ۲۸ آذر ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۶ بهمن ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۷ بهمن ۱۴۰۲

 10.22034/nfvm.2024.431466.1219

چکیده

سالمونلا و سودوموناس از مهم ترین پاتوژن های منتقل شونده از غذا در سراسر جهان هستند که سبب ایجاد مخاطراتی در مصرف کنندگان می شوند، بنابراین پایش آنها در مواد غذایی ضروری است. در همین راستا هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا، سودوموناس و کلی فرم در گوشت بوقلمون کشتار شده و ابزارها در کشتارگاه نجف آباد، اصفهان می باشد. ۱۰۰ نمونه گوشت سینه بوقلمون به صورت تصادفی از کشتارگاه نمونه گیری شده و در شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال داده شد. همچنین نمونه گیری به روش سوپ از ابزار موجود در کشتارگاه انجام شد. شیوع آلودگی به سالمونلا و پسودوموناس با استفاده از آزمون آماری ANOVA انجام شد. نتایج نشان داد که از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۲۴ نمونه به پسودوموناس و ۱۰ نمونه به سالمونلا آلودگی داشتند. آنالیزهای آماری نشان داد بین شیوع سالمونلا و سودوموناس در گوشت های بوقلمون عرضه شده در شهرستان نجف آباد، ارتباط معنی داری وجود ندارد ($p < 0.05$). بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در سالمونلا برای سیپروفلوکساسین و کانامایسین و در سودوموناس مربوط به آمیکاسین بود. با توجه به آلودگی بالا، توصیه می شود در مراحل مختلف کشتار طیور، و همچنین ابزارهای موجود در کشتارگاه توسط ضد عفونی کننده ها پاک سازی شوند تا از تجمع آلودگی به میکروارگانیسم های پاتوژن و آلودگی های بیوفیلمی جلوگیری شود و به این طریق سلامت انسان مورد مخاطره قرار نگیرد.

واژگان کلیدی: سالمونلا، سودوموناس، ایمنی غذایی، مقاومت آنتی بیوتیکی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: ebrahimrahimi55@yahoo.com

مقدمه

فساد میکروبی تا حد زیادی شایع‌ترین علت فساد در مواد غذایی بوده که به‌صورت تغییر در خواص ارگانولپتیکی ظاهر می‌شود. تخمین زده شده است که ۲۵ درصد از تمام غذاهای تولید شده در سطح جهان پس از برداشت یا پس از کشتار به‌دلیل فساد میکروبی از بین می‌روند (۱). عمده‌ترین میکروارگانیسم‌هایی که مواد غذایی را تحت تأثیرات نامطلوب خود قرار می‌دهند شامل *سالمونلا*، *اشریشیاکلا*، *کلی‌فرمها*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کمپیلوباکتر*، *پسودوموناس* و... هستند.

سالمونلا از باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل و گرم‌منفی از خانواده انتروباکتریاسه است. در جنس *سالمونلا*، حدود ۲۶۰۰ سروتیپ با استفاده از طرح استاندارد کافمن- وایت شناسایی شده است و بیشتر این سروتیپ‌ها توانایی سازگاری با میزبان‌های مختلف از جمله انسان را دارند. *سالمونلا* از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذایی در سراسر جهان است و همچنان عامل اصلی گاستروانتریت می‌باشد. درگیری با *سالمونلا* اغلب مربوط به مصرف مواد غذایی با منشاء حیوانی، عمدتاً محصولات طیور است. در سطح جهان، *سالمونلا* غیر تیفوئیدی باعث حدود ۹۳ میلیون مورد گاستروانتریت و ۱۵۵۰۰۰ مرگ در هر سال می‌شود (۲، ۳).

بر اساس این سیستم (کافمن- وایت)، جنس *سالمونلا* بر اساس تفاوت در تجزیه و تحلیل توالی 16SrRNA به دو گونه *Salmonella enterica* و *Salmonella bongori* طبقه‌بندی می‌شوند. گونه‌های *S. enterica* را می‌توان بر اساس ارتباط ژنومی و خواص بیوشیمیایی به شش زیرگونه طبقه‌بندی کرد. سویه‌های *سالمونلا* به غیر از *سالمونلا تایفی* و *سالمونلا پاراتایفی* به‌عنوان NTS (non-typhoidal Salmonella) شناخته می‌شوند و عمدتاً در حیوانات یافت می‌شوند. عفونت‌های NTS با گاستروانتریت یا آنفولانزای معده مشخص می‌شود، که یک بیماری التهابی دستگاه گوارش است که با علائمی مانند اسهال غیر خونی، استفراغ، تهوع، سردرد، گرفتگی عضلات

شکمی و میالژی همراه است. علائمی مانند هیپاتومگالی و اسپلنومگالی کمتر در بیماران مبتلا به NTS مشاهده می‌شود (۴).

کلی‌فرمها به دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های گرم‌منفی گفته می‌شود که دارای محدوده رشد مزوفیل بوده و توانایی تخمیر گلوکز را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس دارند. *کلی‌فرمها* دارای ۱۵ گونه مختلف هستند که مهم‌ترین آنها شامل *انتروکوکا* و *اشریشیاکلا* می‌باشد. حضور *کلی‌فرمها* در مواد غذایی، آب شرب و مواد غذایی خام گویای وجود آلودگی به باکتری‌های مدفوعی می‌باشد (۵).

گوشت بوقلمون از نظر ارزش غذایی دارای پروتئین بالا، کلسترول کم، املاح و اسید آمینه‌های ضروری می‌باشد، بنابراین غذای مطلوبی برای افراد مسن، کودکان در حال رشد، مبتلایان به امراض قلبی و عروقی می‌باشد. سایر آحاد جامعه نیز می‌توانند از گوشت بوقلمون به‌عنوان منبع پروتئین مناسب استفاده نمایند. وضعیت بار میکروبی غذاهای گوشتی و طیور گوشتی، ارتباط نزدیکی با شرایط محیطی و کیفیت میکروبیولوژیکی محل پرورش، کیفیت باکتریولوژیکی آب مورد استفاده، وضعیت بهداشت کشتارگاه و محل عرضه دارد (۶) که در همین راستا، هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سالمونلا*، *سودوموناس* و *کلی‌فرم* در گوشت بوقلمون کشتار شده و ابزارها در کشتارگاه نجف‌آباد، اصفهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت سینه بوقلمون چند ساعت پس از کشتار در مدت ۳ ماه نمونه‌گیری و جهت انجام آزمایشات میکروبی به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. همچنین نمونه‌گیری از طریق سوآپ از ۵ نمونه ابزار پرکاربرد در کشتارگاه شامل چاقو، یخچال، تخته گوشت، ترازو و قلاب آویز گوشت برای ارزیابی

آلودگی باکتریایی انجام شد.

جداسازی *سودوموناس*: به منظور جداسازی

سودوموناس از نمونه‌های گوشت بوقلمون، ۲۵ گرم از نمونه‌ها با ۲۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع پپتون واتر هموزن شد. در این مرحله باکتری غنی شده در محیط پپتون واتر به صورت متراکم در محیط کشت انتخابی PCA (Pseudomonas citrimade Agar)، (Mirmedia،) کشت و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس کلنی‌های مشکوک به *سودوموناس* انتخاب شدند (۷). سپس روی جدایه‌های به دست آمده، آزمون‌های غربالگری نظیر رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، OF، TSI و رشد در محیط کشت مک‌کانکی آگار (Germany, Merck) انجام گرفت. جدایه‌های گرم‌منفی، باسیلی شکل، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، اکسیداتیو، لاکتوز منفی و گلوکز منفی، قادر به رشد در محیط کشت مک‌کانکی آگار *سودوموناس* بودند. برای ارزیابی قابلیت تولید رنگدانه، مقدار ۲۱ میکرولیتر از کشت تازه هر جدایه *سودوموناس* به صورت نقطه‌ای در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. انکوباسیون به مدت ۲۴ تا ۴۱ ساعت در در دمای محیط انجام گرفت (۸).

جداسازی *کلی‌فرم*: برای شمارش کلی‌فرم‌ها از روش

MPN (Most Probable Number) استفاده شد. برای انجام آزمایش از پنج رقت 10^{-1} تا 10^{-5} استفاده شد. بدین ترتیب در کنار شعله مقدار ۱ میلی‌لیتر از مواد غذایی به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه و مخلوط کرده، سپس از محیط ویولت رد بایل آگار ۱۵ میلی‌لیتر به آن اضافه و به صورت ۸ مخلوط گردید تا خوب همگن شده و بعد از حدود ۵ دقیقه که محیط بسته شد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و رشد کلنی بررسی گردید (۹).

جداسازی *سالمونلا*: ابتدا ۲۵ گرم از نمونه‌های

گوشت بوقلمون با ۲۲۵ سی‌سی لاکتوز برات مخلوط و به مدت ۲۴ تا ۴۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

گرمخانه‌گذاری گردید. مقدار یک سی‌سی از نمونه غنی شده به ۱۰ سی‌سی سلنیت سیستی (liofilchem، Italy) و یک سی‌سی از نمونه غنی شده به ۱۰ سی‌سی تتراتیونات برات (liofilchem، Italy) منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، از محیط سلنیت سیستین روی سالمونلا- شینگلا آگار، بیسموت سولفیت آگار و بریلیانت گرین آگار (Italy، liofilchem) به صورت خطی کشت داده شد. به همین ترتیب از تتراتیونات، روی محیط‌های مذکور کشت انجام گرفت. بعد از ۲۴ ساعت تعداد دو یا بیشتر از پرگنه‌های تیپیک به محیط TSI و LIA منتقل شد و نتایج بر اساس دستورالعمل استاندارد مورد تفسیر قرار گرفت (۱۰).

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)، سیپروفلوکساسین (CN)، جنتامایسین (GM)، تری‌متوپریم (TMP)، اکسی‌تتراسایکلین (OTE)، تتراسایکلین (TE)، اریترومایسین (ER)، کانامایسین (KM)، سفوتاکسیم (CX)، آموکسی‌کلاو (AC)، آمیکاسین (AC)، کارباپنم (CP) و کوتریموکسازول (CMZ) روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص گردید (۱۰).

آنالیزهای آماری: شیوع آلودگی به *سالمونلا* و

پسودوموناس با استفاده از آزمون آماری ANOVA انجام شد. همچنین حدود اطمینان ۹۵ درصد برای شیوع محاسبه گردید. شیوع آلودگی به *کلی‌فرم* در بین انواع نمونه‌ها با استفاده از آزمون کوکران Q مقایسه شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ برای تجزیه و تحلیل‌های آماری بهره گرفته شد و برای مقایسه مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها، از آزمون ناپارامتریک فریدمن استفاده شد.

نتایج

سالمونلا آلودگی مثبت داشتند (جدول ۱). آنالیزهای آماری نشان داد بین شیوع سالمونلا و سودوموناس در گوشت‌های بوقلمون عرضه شده در شهرستان نجف‌آباد، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p < 0.05$).

نتایج حاصل از ارزیابی آلودگی به سودوموناس و سالمونلا در گوشت بوقلمون‌های کشتار شده در شهرستان نجف‌آباد نشان داد که از مجموع ۱۰۰ نمونه ۲۴ نمونه (۲۴ درصد) به سودوموناس و ۱۱ نمونه (۱۱ درصد) به

جدول ۱- نتایج شیوع به سالمونلا، سودوموناس و کلی‌فرم در گوشت بوقلمون کشتار شده در شهرستان نجف‌آباد

بakterی هدف	مجموع نمونه‌ها	آلودگی	عدم آلودگی	سطح معنی‌داری
سالمونلا	۱۱ نمونه (۱۱ درصد)	۱۱ نمونه (۱۱ درصد)	۸۹ نمونه (۸۹ درصد)	۰/۰۰۴ ^{NS}
پسودوموناس	۱۰۰ نمونه	۲۴ نمونه (۲۴ درصد)	۷۶ نمونه (۷۶ درصد)	۰/۱۲۸ ^{NS}
کلی‌فرم*		$3/1 \times 10^4 \pm 0/05^a$		-

* هر تیمار نشان‌دهنده ۱۰۰ نمونه می‌باشد.

NS: تفاوت آلودگی نمونه‌های مختلف معنی‌دار نیست.

طبق نتایج به دست آمده از جدول ۲ مشخص شد که بیشترین میزان مقاومت سالمونلا مربوط به سیپروفلوکساسین (۹۷/۵ درصد)، کانامایسین (۹۱/۵ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به اکسی‌تراسایکلین (۴۴/۱۰ درصد) و کارباپنم (۵۰/۴ درصد) می‌باشد. همچنین برای سودوموناس بیشترین مقاومت مربوط به آمیکاسین (۸۸/۵ درصد) بود.

بیشترین میزان مقاومت سالمونلا مربوط به سیپروفلوکساسین (۹۷/۵ درصد)، کانامایسین (۹۱/۵ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به اکسی‌تراسایکلین

جدول ۲- میزان مقاومت سالمونلا و پسودوموناس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

شماره	نام آنتی‌بیوتیک	تعداد سوبه‌های مقاوم به سالمونلا (درصد)	تعداد سوبه‌های مقاوم به سودوموناس (درصد)
۱	آمی‌سلین (AM)	۷۹/۱۲ درصد	۶۴/۶ درصد
۲	سیپروفلوکساسین (CN)	۹۷/۵ درصد	۷۰ درصد
۳	جنتامایسین (GM)	۸۴/۷ درصد	۷۱/۹ درصد
۴	تری‌متوپریم (TMP)	۷۹/۲ درصد	۵۹/۸ درصد
۵	اکسی‌تراسایکلین (OTE)	۴۴/۱۰ درصد	۷۱/۵ درصد
۶	تراسایکلین (TE)	۵۹/۶۰ درصد	۵۲/۵ درصد
۷	اریترومایسین (ER)	۵۷/۱۶ درصد	۶۱ درصد
۸	کانامایسین (KM)	۹۱/۵۰ درصد	۸۰ درصد
۹	سفوتاکسیم (CX)	۷۰/۲۰ درصد	۵۱/۵ درصد
۱۰	آموکسی‌کلاو (AC)	۶۸/۱۰ درصد	۵۹/۵۰ درصد
۱۱	آمیکاسین (AN)	۷۱/۶ درصد	۸۸/۵ درصد
۱۲	کارباپنم (CP)	۵۰/۴ درصد	۶۴/۵ درصد
۱۳	کوتریموکسازول (CMZ)	۵۵/۳ درصد	۷۴/۷ درصد

در آزمایشی دیگر که بر روی میزان آلودگی ابزار موجود در کشتارگاه‌ها به سالمونلا انجام گرفت، نشان داده شد که بیشترین میزان آلودگی مربوط به تخته گوشت و یخچال ۸/۳ درصد به سالمونلا آلودگی داشتند. آزمون

کمترین میزان آلودگی مربوط به یخچال محل نگهداری گوشت‌ها بود. به این ترتیب تخته گوشت ۸۳/۳ درصد و یخچال ۸/۳ درصد به سالمونلا آلودگی داشتند. آزمون

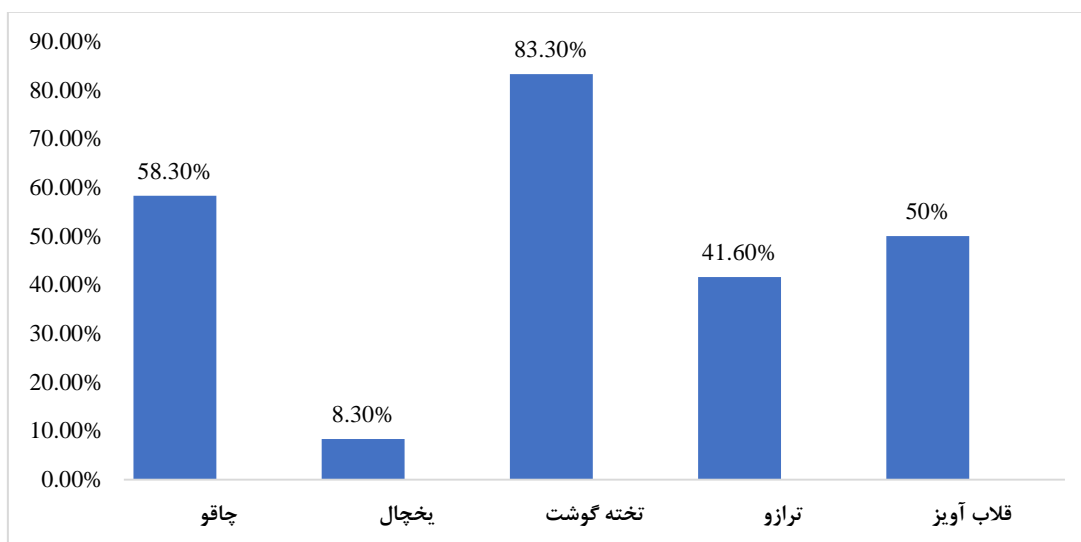
معنی‌داری دارد. جدول (۳) شیوع آلودگی را بر حسب نوع نمونه نشان می‌دهد.

آماري کوران Q نشان داد که شیوع آلودگی سالمونلا در نمونه‌های مختلف اخذ شده از کشتارگاه (چاقو، یخچال، تخته گوشت، ترازو، قلاب آویز گوشت) تفاوت آماری

جدول ۳- شیوع آلودگی به سالمونلا در نمونه‌های اخذ شده از کشتارگاه طیور نجف‌آباد

آلودگی به سالمونلا		شیوع *	تعداد موارد مثبت	تعداد نمونه اخذ شده	نمونه‌ها
حدود ۹۵٪ برای شیوع	حد بالا				
حد پایین	حد بالا				
۰/۳۵	۰/۸۶	۵۸/۳ ^{bc}	۷	۱۲	چاقو
۰/۰۷	۰/۲۷	۸/۳ ^a	۱	۱۲	یخچال
۰/۶۳	۰/۹۷	۸۳/۳ ^c	۱۰	۱۲	تخته گوشت
۰/۲۹	۰/۷۶	۴۱/۶ ^{abc}	۵	۱۲	ترازو
۰/۲۱	۰/۳۶	۵۰ ^{ab}	۶	۱۲	قلاب آویز گوشت

* حروف انگلیسی متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار در شیوع آلودگی نشان می‌دهد



نمودار ۱- شیوع سالمونلا در نمونه‌های اخذ شده از کشتارگاه طیور نجف‌آباد

تولیدات دامی، مربوط به این عفونت‌های مشترک بین انسان و دام به‌ویژه در کشورهای کم درآمد تخمین زده می‌شود. بیشتر بیماری‌های عفونی و کشنده‌ای که انسان را مبتلا می‌کند منشأ حیوانی یا فرآورده‌های حیوانی دارد (۱۱). لذا ارزیابی و پایش آلودگی باکتریایی گوشت بوقلمون حائز اهمیت است. در همین راستا Goksoy و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای مشابه در ترکیه گزارش دادند که ۲۷ درصد آلودگی به سالمونلا، ۳۳/۳ درصد

بحث و نتیجه‌گیری

گوشت طیور در حال حاضر پرمصرف‌ترین گوشت در سراسر جهان است و مصرف آن همچنان رو به افزایش است. سازمان بهداشت جهانی (WHO) هر گونه عفونتی را که به‌طور طبیعی از حیوان به انسان یا از انسان به حیوان منتقل می‌شود به‌عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام تعریف کرده است. سالانه تقریباً ۲/۴ میلیارد مورد بیماری و ۲/۷ میلیون مرگ در انسان همراه با تأثیر منفی بر

سودوموناس و آلودگی کلی فرمی $3/49 \pm 0/31$ بود. در نتیجه فراوانی آلودگی به *سالمونلا* و کلی فرم را بالا گزارش دادند (۱۲)، که با نتایج حاضر از لحاظ میزان آلودگی ارتباطی ندارد. در این مطالعه آلودگی به *سودوموناس* ۲۴ درصد و *سالمونلا* ۱۱ درصد بود، اما آلودگی به کلی فرم $3/1 \times 10^4$ بود که با مطالعه حاضر تا حدودی مطابقت دارد. در مطالعه‌ای جابر و همکاران (۲۰۱۷) در مراکش بر روی آلودگی گوشت کشتارگاهی بوقلمون کشتار شده، ۱۶۸ نمونه مختلف گوشت بوقلمون را در کشتارگاه‌ها جمع‌آوری کرده و گزارش دادند که ۳۵ درصد نمونه‌ها به باکتری‌های مزوفیل آلودگی داشته که میانگین غلظت $7/21$ بار لگاریتمی بود. چهار گونه شناسایی شده نیز در نمونه‌های گوشت وجود داشتند که شامل: *شریشیاکلای* (۶۷/۹ درصد)، *کلبسیلا پنومونی* (۹/۱۷ درصد)، *سودوموناس* (۱۶/۱ درصد) و *سالمونلا* منفی بودند (۱۳)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر در خصوص *سودوموناس* مطابقت داشته اما آلودگی به *سالمونلا* بسیار فراتر از مطالعه نامبرده است.

در مطالعه‌ای که Firildak و همکاران (۲۰۱۵) در ترکیه به منظور تعیین آلودگی باکتریایی لاشه طیور در مراکز کشتار طیور انجام دادند، گزارش دادند که در این مطالعه گونه‌های *سودوموناس* و *سالمونلا* ۵ نمونه آلودگی داشتند (۱۴)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت ندارد. در این تحقیق میزان آلودگی به *سالمونلا* و *سودوموناس* به ترتیب ۱۱ و ۱۸ درصد بود. در پژوهش دیگری Adeyanju و Ishola در نیجریه (۲۰۱۴) بر روی آلودگی در کشتارگاه طیور، نشان دادند که آلودگی *سالمونلا* از ۹۹ نمونه طیور (۵۳ مرغ و ۴۶ بوقلمون) به دست آمده از بازارهای خرده‌فروشی، آلودگی در گوشت مرغ $32/1$ درصد و بوقلمون $16/46$ درصد و *شریشیاکلای* $43/4$ درصد بود (۱۵)، که در خصوص آلودگی گوشت بوقلمون با مطالعه حاضر مطابق و همسو می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Althaus و همکاران (۲۰۱۷) در سوئیس بر روی تجزیه و تحلیل فرآیند میکروبیولوژیک

لاشه جوجه‌های گوشتی انجام شد، ۹۰ لاشه از ۳۰ گله نمونه‌برداری آلودگی باکتریولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد آلودگی لاشه به *سالمونلا* $11/1$ درصد، آلودگی به *شریشیاکلای* $94/4$ درصد، انتروباکتریاسه‌ها ۹۰ درصد آلودگی داشتند (۱۶)، که با نتایج حاصل از این تحقیق همسو است.

در تحقیقی Nidaullah و همکاران (۲۰۱۷) در مالزی بر روی شیوع آلودگی به *سالمونلا* در محیط کشتارگاهی گزارش دادند که سروتیپ‌های *سالمونلا* از ۱۶۱ نمونه از ۱۸۲ نمونه (۸۸/۴۶ درصد) با شیوع ۱۰۰ درصدی در کل لاشه مرغ و برش‌های مرغ و همچنین جعبه حمل و نقل، قفس، درام، چاقو، تخته خردکردن، میز و کف سالن جدا شد. *سالمونلا* به ترتیب از ۹۱/۶۷ درصد، ۸۳/۳۳ درصد و ۶۶/۶۷ درصد دستگاه‌های شستشو، سواب تخلیه و پیش‌بند جدا شد. در این مطالعه ۱۷ سروتیپ با *سالمونلا* آلبانی (۵۷/۱۶۱)، *سالمونلا کوروالیس* (۴۲/۱۶۱) و *سالمونلا برانکاستر* (۳۷/۱۶۱) به عنوان سروتیپ‌های غالب جدا شد (۱۷). در مطالعه حاضر شیوع آلودگی به *سالمونلا* در گوشت بوقلمون ۱۱ درصد بود که بسیار کمتر از مطالعه نامبرده می‌باشد.

مطالعه‌ای Manurung و همکاران (۲۰۲۳) بر روی آلودگی باکتریایی در خطوط کشتارگاهی و تفاوت آن در بازارهای محلی مالزی نشان داد که نتایج تحقیق بر روی ۳۰ نمونه گوشت مرغ در کشتارگاه مرغ، ۱۷ نمونه آلوده به *سالمونلا* را نشان داد. ۲۰ نمونه از ۳۰ نمونه (۶۶ درصد) گوشت مرغ موجود در بازارهای سنتی حاوی *سالمونلا* بودند (۱۸)، در این مطالعه نمونه‌های بوقلمون کشتار شده ۱۱ درصد به *سالمونلا* آلودگی داشتند.

مطالعه‌ای توسط Schwaiger (۲۰۱۲) با هدف بررسی گوشت مرغ و گوشت خوک نمونه‌برداری شده در کشتارگاه نشان داد که ۸۹ نمونه از ۵۲۴ نمونه (۱۶/۳ درصد) آلوده به *سالمونلا* بوده (۱۹)، در مطالعه حاضر شیوع آلودگی به *سالمونلا* ۱۱ درصد بود که تا حدودی با مطالعه نامبرده مطابقت دارد. مطالعه الموتی و همکاران

(۲۰۲۳) بر روی گوشت طیور کشتار شده انجام شد از مجموع ۵۰ نمونه گوشت طیور، ۲۲ درصد آلودگی به سودوموناس را گزارش دادند (۲۶) که مطابق و همسو با مطالعه حاضر است. Yilmaz و همکاران (۲۰۲۳) در ترکیه گزارش دادند که از مجموع ۱۰۱ نمونه گوشت طیور نمونه‌گیری شده در کشتارگاه، ۸۰ نمونه (۷۹/۲۰ درصد) به سودوموناس آلودگی داشتند (۲۷)، که ارتباطی با مطالعه حاضر ندارد. مطالعه‌ای همسو با مطالعه حاضر در نیجریه توسط Ayogu و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد که گزارش دادند از ۵۰ جدایه باکتری که ۲۷ نمونه از بازار خرید و ۲۳ نمونه از کشتارگاه جدا شد، ۳۰ (۶۰ درصد) گونه سالمونلا و ۲۰ (۴۰ درصد) گونه سودوموناس بودند. در مجموع ۱۵ گونه سالمونلا و ۱۲ گونه سودوموناس از بازار خرید و در مجموع ۱۵ گونه سالمونلا و ۸ گونه سودوموناس از کشتارگاه جدا شدند (۲۸)، که با مطالعه حاضر مطابقتی ندارد.

در کشتارگاه‌های طیور، عملیات متداول شامل جوشاندن، کندن (پرزدایی)، سردکردن و بسته‌بندی می‌باشد. در حین و پس از کشتار، آلودگی متقاطع بین محیط کشتارگاه، آب استفاده شده برای کشتار، تجهیزات مورد استفاده و لاشه طیور ممکن است سطح آلودگی لاشه را افزایش دهد. اهمیت جنس سودوموناس در صنایع و بهداشت مواد غذایی نه تنها به دلیل قابلیت فساد آنها، بلکه به دلیل توانایی آنها در چسبیدن و تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح مختلف در محیط‌های مرتبط با مواد غذایی مهم و حائز اهمیت است. بنابراین آنها قادر به مقاومت در برابر شرایط نامطلوب رشد، مانند ضد عفونی هستند و آنها را قادر می‌سازد تا در کارخانه فرآوری مواد غذایی نیز زنده باقی بمانند. بیوفیلم سودوموناس علاوه بر اینکه منبع جدی آلودگی برای دسته‌های بعدی مواد غذایی است که از ناحیه بیوفیلم عبور می‌کنند یا از طریق ذرات معلق در هوا از سطح آلوده منشأ می‌گیرند، ممکن است باکتری‌های بیماری‌زا را جذب کند که یک نگرانی شدید برای صنایع و بهداشت مواد غذایی است. از آنجایی که گونه‌های

(۲۰۱۴) بر روی بررسی آلودگی میکروبی لاشه طیور گوشتی در طی خط کشتار کشتارگاه صنعتی همدان نشان داد که میزان شمارش کلی باکتری‌های هوازی ۱، کلی‌فرم‌ها ۰/۲۷ /شریشیاکلای ۰/۴۷ و استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۸۰ لگاریتمی در لاشه‌های طیور آلودگی وجود داشت (۲۰) که در مطالعه حاضر شیوع $3/1 \log$ بود که مطابقتی وجود ندارد.

صادقی زالی و همکاران (۲۰۱۱) در ارومیه بر روی میزان آلودگی به سالمونلا در اندام‌های مختلف طیور کشتارگاهی دریافتند که از مجموع ۱۴۴۰ نمونه، ۳۶۰ (۲۵ درصد) نمونه‌ها به سالمونلا آلوده بود (۲۱)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر (۱۱ درصد) مطابقت ندارد. در تحقیق دیگری Siriken و همکاران (۲۰۱۵)، بر روی آلودگی لاشه طیور در کشتارگاه‌های صنعتی در ترکیه نشان دادند که شیوع آلودگی به سالمونلا، از مجموع ۱۵۰ نمونه ۶۴ نمونه (۴۲/۶۶ درصد) شناسایی شد (۲۲)، که بسیار فراتر از مطالعه حاضر بود.

در مطالعه Tawyabiur و همکاران (۲۰۲۰)، در ترکیه بر روی آلودگی گوشت بوقلمون به سالمونلا و شریشیاکلای و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نشان دادند که شیوع آلودگی به سالمونلا در گوشت بوقلمون از مجموع ۶۵ نمونه ۱۶ نمونه (۲۴/۶۱ درصد) و بیشترین مقاومت مربوط به اریترومایسین و تتراسایکلین بود (۲۳)، که در مطالعه حاضر سالمونلا ۱۱ درصد آلودگی داشت؛ بنابراین با مطالعه نامبرده مطابقتی ندارد. در مطالعه‌ای توسط Arkali و Çetinkaya (۲۰۲۰) بر روی شیوع سالمونلا در گوشت طیور کشتار شده کشتارگاهی در ترکیه، آلودگی ۲۴ درصدی به سالمونلا را گزارش دادند (۲۴) که بسیار فراتر از مطالعه حاضر است. پژوهشی توسط Heir و همکاران (۲۰۲۰)، با هدف بررسی میزان شیوع سودوموناس در گوشت طیور کشتارگاهی در چین انجام شد که گزارش دادند میزان آلودگی ۵۳/۸۶ درصد بود (۲۵) که بسیار فراتر از مطالعه حاضر (۲۴ درصد) است. در مطالعه‌ای که در عراق توسط Hassan و Jawher

مختلف کشتار طیور، و همچنین ابزارهای موجود در کشتارگاه اعم از قلاب آویز، یخچال، چاقو، تخته و در مجموع محیط کشتارگاه توسط ضد عفونی‌کننده‌ها، پاک‌سازی شود تا از تجمع آلودگی به میکروارگانیسم‌های پاتوژن و آلودگی‌های بیوفیلمی جلوگیری شود و به این طریق سلامت انسان مورد مخاطره قرار نگیرد. همچنین با توجه به اینکه باکتری‌های نامبرده از عوامل گاستروانتریت در انسان و حیوانات می‌باشند لازم است جهت درمان بیماری‌های ناشی از این عوامل بیماری‌زا استفاده از آنتی‌بیوتیک محدود گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه داشتند تشکر به عمل می‌آید.

References

- 1- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microb.* 2002; 78(1): 79-97.
- 2- Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan K-G, Lee LH. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci.* 2015; 8(3): 284-93.
- 3- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Cli infec dis.* 2010; 50(6): 882-9.
- 4- Acheson D, Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Cli infec dis.* 2001; 32(2): 263-9.
- 5- Fatima A, Urooj S, Mirani ZA, Abbas T, Khan MN. Fecal coliform contamination of drinking water in Karachi, Pakistan. *PSM Microb.* 2021; 6(2): 42-8.
- 6- Martini S, Conte A, Tagliazucchi D. Comparative peptidomic profile and bioactivities of cooked beef, pork, chicken and turkey meat after in vitro gastro-intestinal digestion. *J prot.* 2019; 208(12): 103-115.
- 7- Heidarzadi MA, Ayazi N, Vahed Dehkordi

سودوموناس در همه جا وجود دارند و می‌توانند با طیف وسیعی از شرایط و دماهای محیطی سازگار شوند، لذا این مورد خطر آنها را بیش از پیش افزایش می‌دهد (۲۹).

سطوح تجهیزات کشتارگاه طیور منبع قابل توجهی از آلودگی با سویه‌های سودوموناس و سالمونلا است که منجر به فساد گوشت طیور در طی نگهداری بعدی در یخچال می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه با مطالعات پیشین می‌توان نتیجه گرفت که آلودگی با باکتری‌های سودوموناس و سالمونلا از بیماری‌های مهم برای تولید طیور و سلامت انسان است. عامل بیماری‌زا ماهیت مشترک بین انسان و دام است که پس از تماس با لاشه طیور و محصولات مرتبط در کارخانه‌های فرآوری و کشتارگاه‌ها به انسان منتقل می‌شود. لذا با توجه به آلودگی ۱۱ درصدی به سالمونلا و ۲۴ درصدی به سودوموناس توصیه می‌شود در مراحل

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]

8- Jafarzadeh H, Mirzaei H, Hanifian S, Javadi A, Shayegh J. Isolation and identification of some phenotypic features of Pseudomonas in poultry slaughter line. *Food Hygiene.* 2022; 12(1 (45): 17-31. [In persian]

9- Heidarzadi MA, Kohneh Poushi M, Karami M, Sabzibalkhkanlo A, Gorgin Karaji K. Investigating the Amount of Microbial Contamination of Pasteurized Milk in Kermanshah City with Coliform and the Total Number of Bacteria. *J Alter Vet Med.* 2022; 5(12): 702-9.

10- 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]

11- Abd El-Ghany WA. Pseudomonas aeruginosa infection of avian origin: Zoonosis and

one health implications. *Vet World*. 2021; 14(8): 2155.

12- Goksoy E, Kirkan S, Kok F. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. *Poultry sci*. 2004; 83(8): 1427-32.

13- Jaber H, Ijoub R, Zaher A, Chakit M, Rhaïem N, Bourkhiss B, et al. Microbiological study of turkey meat marketed in Kenitra (North-ouost of Morocco). *J Nutr Food Sci*. 2017; 7(620): 20-28.

14- Firildak G, Asan A, Goren E. Chicken carcasses bacterial concentration at poultry slaughtering facilities. *Asian J Bio Sci*. 2015; 8(1): 16-29.

15- Adeyanju GT, Ishola O. Salmonella and Escherichia coli contamination of poultry meat from a processing plant and retail markets in Ibadan, Oyo State, Nigeria. *Springerplus*. 2014; 3: 1-9.

16- Althaus D, Zweifel C, Stephan R. Analysis of a poultry slaughter process: Influence of process stages on the microbiological contamination of broiler carcasses. *Italian J food safe*. 2017; 6(4): 88-97.

17- Nidaullah H, Abirami N, Shamila-Syuhada AK, Chuah LO, Nurul H, Tan TP, et al. Prevalence of Salmonella in poultry processing environments in wet markets in Penang and Perlis, Malaysia. *Vet World*. 2017; 10(3): 286-300.

18- Manurung K, Tafsin M, Patriani P, Simbolon M. Comparative Test on the Level Contamination of Escherichia coli and Salmonella sp. on Broiler Meat at Slaughterhouses and Traditional Markets in Medan. *J Petern Int*. 2023; 11(1): 45-52.

19- Schwaiger K, Huther S, Hölzel C, Kämpf P, Bauer J. Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *Int J Food Microb*. 2012; 154(3): 206-11.

20- Pajohi Alamoti MR, Mohammadzadeh A, Khanjari A. A survey on microbial contamination of broiler carcass during processing in Hamedan industrial abattoir. *Vet Res Bio Products*. 2014; 27(2): 8-13. [In persian]

21- Sadeghi ZM, Hashempour A, Kalbkhani M, Delshad R. Comparative inspection about infection to Salmonella in different organs (heart, liver, ovary, feces) in slaughtered poultry of Urmia industrial slaughter house. *Vet clin lab res J*. 2011; 5(1): 57-61. [In persian]

22- Siriken B, Türk H, Yildirim T, Durupinar B, Erol I. Prevalence and characterization of Salmonella isolated from chicken meat in Turkey. *J food sci*. 2015; 80(5): 1044-1050.

23- Tawyabur M, Islam MS, Sobur MA, Hossain MJ, Mahmud MM, Paul S, et al. Isolation and characterization of multidrug-resistant Escherichia coli and Salmonella spp. from healthy and diseased turkeys. *Antibiotics*. 2020; 9(11): 770-775.

24- Arkali A, Çetinkaya B. Molecular identification and antibiotic resistance profiling of Salmonella species isolated from chickens in eastern Turkey. *BMC vet res*. 2020; 16(1): 1-8.

25- Heir E, Moen B, Åsli AW, Sunde M, Langsrud S. Antibiotic resistance and phylogeny of Pseudomonas spp. isolated over three decades from chicken meat in the Norwegian food chain. *Micro*. 2021; 9(2): 207.

26- Jawher IM, Hasan MG. Antibiotics resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa isolated from meat at Mosul city retails. *Iraqi J Vet Sci*. 2023; 37(2): 363-7.

27- Yilmaz N, Urganci NN, Yildirim Z. Isolation of Pseudomonas aeruginosa from Food and Determination of Their Antibiotic Resistance. *Res square J*. 2023;47(1): 1-17.

28- Ayogu T, Orji J, Nwojiji E, Umezurike R, Ibiam UU. Antibiotic Susceptibility Pattern of Salmonella and Pseudomonas Species Isolated from Meat Market and Ogoja Road Abattoir Effluents in Abakaliki Metropolis. *World J Med Sci*. 2018; 15(1): 34-47.

29- Zarei M, Rahimi S, Fazlara A, Anvari SE. High biofilm-forming Pseudomonas strains isolated from poultry slaughterhouse surfaces: Their importance in the persistence of Salmonella enteritidis in slaughterhouses. *Int J Food Microb*. 2023; 390: 110-126. [In persian]




Investigation of prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Salmonella*, *Pseudomonas* and *coliform* in slaughtered turkey meat and tools in Najaf Abad slaughterhouse, Isfahan

Mahdi heidari¹, 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, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: December 19, 2023; Revise: February 5, 2024; Accept: February 6, 2024

 10.22034/nfvm. 2024. 431466.1219

Summary

Salmonella and *Pseudomonas* are among the most important food-borne pathogens around the world that cause risks for consumers; Therefore, it is necessary to monitor them in food. In this regard, the purpose of this study is to investigate the prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Salmonella*, *Pseudomonas* and *coliform* in slaughtered turkey meat and tools in Najaf Abad slaughterhouse, Isfahan. 100 samples of turkey breast meat were randomly sampled from the slaughterhouse and transferred to the laboratory under sterile conditions. Sampling was also done using the swap method from the tools in the slaughterhouse. The prevalence of *Salmonella* and *Pseudomonas* infection was determined using ANOVA statistical test. The results showed that out of a total of 100 samples, 24 samples were contaminated with *Pseudomonas* and 11 samples were contaminated with *Salmonella*. Statistical analyzes showed that there is no significant relationship between the prevalence of *Salmonella* and *Pseudomonas* in turkey meat sold in Najaf Abad city ($p < 0.05/00$). The highest antibiotic resistance was related to ciprofloxacin and kanamycin in *salmonella* and Amicasin in *pseudomonas*. Due to the high pollution, it is recommended to clean the tools in the slaughterhouse with disinfectants in different stages of poultry slaughtering to prevent the accumulation of pathogenic microorganisms and biofilm pollution. In this way, human health is not endangered.

Keywords: *Salmonella*, *Pseudomonas*, Food safety, Antibiotic resistance




بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلای، لیستریا و یرسینیا در سوسیس و کالباس های عرضه شده در شهرستان کرج

محمدامین امانی^۱، سیدمجید هاشمی^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۰۵ خرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۰۲ تیر ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.457612.1241

چکیده

آلودگی مواد غذایی توسط میکروارگانیسم‌ها، یک نگرانی جدی برای سلامت عمومی است که می‌تواند باعث بیماری‌های منتقله از غذا شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلای، لیستریا و یرسینیا در سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج بود. در این مطالعه تعداد ۱۹۱ نمونه سوسیس و ۱۹۲ نمونه کالباس از مراکز عرضه این محصول در شهرستان کرج به صورت تصادفی نمونه‌گیری و در شرایط سترون به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌ها مطابق روش استاندارد برای ارزیابی آلودگی‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند. از نرم‌افزار SPSS و جهت آنالیز آماری داده‌ها از روش کای اسکوئر استفاده و حد معنی‌دار بودن ($p < 0/05$) در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که بیشترین آلودگی در سوسیس و کالباس مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس بود. آلودگی سوسیس‌ها به اشریشیاکلای ۱۴ نمونه (۷/۳۲ درصد)، سالمونلا ۱۶ نمونه (۸/۳۷ درصد)، استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۲ نمونه (۵۳/۰۴ درصد) و یرسینیا انتروکولیتیکا ۳ نمونه (۱/۵۷ درصد) بود. آلودگی کالباس‌ها به اشریشیاکلای ۱۲ نمونه (۶/۲۵ درصد)، سالمونلا ۱۲ نمونه (۶/۲۵ درصد)، استافیلوکوکوس اورئوس ۴۸ نمونه (۲۵ درصد) و آلودگی به یرسینیا انتروکولیتیکا منفی بود. نتایج نشان داد بین آلودگی سوسیس و کالباس‌ها، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p < 0/05$). با توجه به میزان بالای آلودگی در بین نمونه‌ها، نظارت بیشتر مسئولان بر کیفیت مواد غذایی لازم و ضروری می‌باشد تا از رخداد عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی که سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازد، جلوگیری شود.

واژگان کلیدی: ایمنی غذایی، گاستروانتریت، سوسیس و کالباس، کرج

مقدمه

غذاهای حیوانی مانند گوشت مرغ، گوشت گاو و شیر سرشار از پروتئین بوده که برای رشد و نمو بدن ضروری هستند. از سوی دیگر، غذاهای با منشأ حیوانی، می‌توانند به‌عنوان عاملی برای انتقال میکروارگانیسم‌های پاتوژنی باشند که سبب بیماری و حتی مرگ در مصرف‌کنندگان شوند. بیماری‌های ناشی از غذا در حال تبدیل شدن به یک نگرانی بهداشت عمومی جهانی است. این میکروارگانیسم‌ها سالانه مسئول ۴۸ میلیون بیماری و ۳۰۰۰ مرگ و میر در ایالات متحده هستند (۱). در مقابل، غذاهای آماده (RTE) (Ready to eat) به هیچ‌گونه آماده‌سازی اضافی نیاز ندارند، به استثنای گرم کردن، و این غذاهای RTE اغلب به‌صورت خام یا سرد بدون هیچ‌گونه عملیات حرارتی اضافی مصرف می‌شوند (۲). به‌دلیل گسترش سریع جمعیت و تغییر سبک زندگی از حالت سنتی به مدرن، ساعات کاری طولانی، افزایش مشارکت زنان در خارج از منزل و تغییر عادات غذایی، مصرف مواد غذایی RTE در سال‌های اخیر افزایش یافته است (۳). غذاهای خیابانی نقش‌های مهم اجتماعی-اقتصادی و فرهنگی را ایفا می‌کنند و در سراسر جهان محبوب هستند. غذاهای خیابانی علاوه بر ارائه وعده‌های غذایی مناسب و کم‌هزینه برای جمعیت شهری، منبع درآمدی برای دست‌فروشان به‌ویژه زنان بوده و می‌تواند فرهنگ سنتی محلی، که جاذبه‌ای مهم برای گردشگران است را منعکس کند (۴).

استفاده از مواد غذایی آماده به شیوه‌های گوناگون می‌تواند سلامت مصرف‌کننده را با وجود میکروارگانیسم‌های عامل مسمومیت و عفونت تهدید کند (۵)، که از مهم‌ترین آنها می‌توان به *اشریشیاکلا*، *سالمونلا*، *لیستریا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کمپیلوباکتر*، *پرسینیا* اشاره کرد.

اشریشیاکلا که عضوی از خانواده انتروباکتریاسه‌ها بوده از باکتری‌های روده‌ای می‌باشد که اغلب به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوع در صنایع غذایی یاد می‌شود. این

باکتری گرم‌منفی و میله‌ای بوده که توانایی تشکیل اسپور را نداشته و معمولاً توسط تاژک‌های پری‌تریس حرکت می‌کند. این باکتری با عفونت‌های انسانی از جمله اسهال، عفونت‌های دستگاه ادراری و مننژیت مرتبط است. همچنین ممکن است باعث ایجاد انتريت حاد در انسان و حیوانات شود و یک علت اسهال مسافرتی است که یک بیماری شبیه اسهال خونی بوده که سلامت انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و کولیت هموراژیک که اغلب به‌عنوان اسهال خونی نامیده می‌شود را سبب می‌شود. بیماری اسهال نشان‌دهنده اصلی‌ترین نوع *اشریشیاکلا* در عفونت گوارشی ناشی از مصرف غذاهای RTE آلوده است (۶-۱۰).

سالمونلا، یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، یک پاتوژن مهم غذایی است. از باکتری‌های مرتبط با یکدیگر هم از نظر فنوتیپی و هم از نظر ژنوتیپی تشکیل شده است. از نظر طبقه‌بندی، دو گونه در جنس *سالمونلا* وجود دارد: *S. enterica* (شش زیرگونه) و *S. bongori* (یک زیرگونه)، و بیش از ۲۵۰۰ سرووار مختلف بر اساس آنتی‌ژن‌های سوماتیک (O) و تاژک‌دار (H) تقسیم‌بندی کرد. *سالمونلای* غیر تیفوئیدی عامل اصلی عفونت‌های باکتریایی ناشی از مواد غذایی است و همچنان از نظر عوارض و هزینه‌های اقتصادی، یک مشکل عمده در سراسر جهان است. اگرچه سرووارهای *سالمونلا* تیفی‌موریوم و *انتریتیدیس* شایع‌ترین علت سالمونلوز انسانی در سراسر جهان هستند، سایر سرووارهای *سالمونلا* مرتبط با موارد مسمومیت غذایی در سال‌های اخیر اهمیت پیدا کرده‌اند (۱۱).

استافیلوکوکوس‌ها در همه جای طبیعت وجود دارند. مهم‌ترین گونه در این گروه *استافیلوکوکوس اورئوس* است؛ زیرا برخی از سویه‌ها قادر به ایجاد مسمومیت غذایی در انسان هستند. مخزن اولیه این باکتری روی پوست و غشاهای مخاطی پستانداران و پرندگان است. *استافیلوکوکوس اورئوس* اغلب از گوشت چرخ‌کرده جدا می‌شود. انتروتوکسین با حرارت پایدار است و با عملیات

حین کشتار به بیرون هم انتقال داده می‌شود، به وجود آمده باشد و ممکن است در اثر عدم رعایت مسائل بهداشتی در طول زنجیره کشتار باشد. بخش‌های مرطوب مجاری بدن دام، از قبیل پوزه، دهان، پلک و چشم، سوراخ گوش، مقعد، پشم و پوست، بخش خارجی دستگاه تناسلی و در دام‌های ماده محل خروج شیر از پستان، همگی دارای آلودگی می‌باشند و حاوی انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌های عامل عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذائی می‌باشند. علاوه بر آن در روده دام‌ها انواع میکروب‌های روده‌ای و بین آنها میکروارگانیسم‌های خطرناکی را داشته و سبب انتشار بیماری شوند (۱۵)، با توجه به مخاطرات بهداشتی ناشی از حضور باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی، اطلاع از وضع گذشته و حال آلودگی باکتریایی مواد غذایی با منشاء دامی به باکتری‌های غذازاد و ارزیابی روند این آلودگی‌ها و ارائه راهکارهای مناسب در جهت حذف یا کاهش آنها ضروری می‌باشد. در همین راستا، هدف از مقاله حاضر بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلای، لیستریا و یرسینیا در سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: مطالعه حاضر از نوع مطالعه توصیفی و مقطعی بود. نمونه‌ها با توجه به میانگین شیوع حدود ۳۰ درصدی باکتری‌ها در سوسیس و کالباس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. این مطالعه در زمستان ۱۴۰۲ انجام شد. در این پژوهش تعداد ۳۸۴ نمونه، شامل ۱۹۱ نمونه سوسیس و ۱۹۳ نمونه کالباس از مراکز عرضه این محصول در شهرستان کرج به صورت تصادفی جداسازی و در شرایط سترون به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد.

$$n = z^2 \frac{pq}{d^2}$$

جداسازی اشریشیاکلای: مقدار ۲۵ گرم از نمونه مورد آزمایش وزن شد و داخل ۲۲۵ سی‌سی لاکتوز برات

حرارتی معمولی از بین نمی‌رود. به دلیل پایداری حرارتی انترتوکسین، سطح آلودگی گوشت باید در طول فرآیند تولید تا حد امکان پایین نگه داشته شود. آلودگی اولیه گوشت در هنگام کشتار اتفاق می‌افتد. کمبودهای بهداشتی را نمی‌توان حتی با سخت‌ترین اقدامات بهداشتی در طول فرآیند تولید بعدی جبران کرد. اقدامات بهداشتی میکروبیولوژیکی در تولید گوشت با هدف محافظت از مصرف‌کننده در برابر عوامل بیماری‌زا انجام می‌شود (۱۲). یرسینیا/انتروکولیتیکا یک پاتوژن بسیار شایع از طریق غذا است که باعث عفونت‌های گوارشی (یرسینیوز) در انسان و طیف وسیعی از حیوانات می‌شود. عفونت‌های یرسینیا/انتروکولیتیکا سلامت عمومی و بار اجتماعی و اقتصادی قابل توجهی را بر جمعیت انسانی در بسیاری از کشورها تحمیل کرده است. یرسینیا/انتروکولیتیکا یک پاتوژن غذایی با توزیع گسترده در طبیعت است و معمولاً از حیوانات مختلف، محصولات غذایی و منابع محیطی جدا می‌شود (۱۳). فرآورده‌های گوشتی (سوسیس، کالباس، کباب لقمه، همبرگر، مارتادلا و...) عبارتند از سوسپانسیون پایداری حاصل از گوشت یک یا چند حیوان حلال گوشت که با سایر مواد در داخل پوشش‌هایی طبیعی و یا مصنوعی، در شرایط مناسب پر شده و پس از طی فرآیند حرارتی مناسب برای مصرف آماده می‌شود. عمده‌ترین بخش پروتئین بکار رفته در فرآورده‌های گوشتی، گوشت می‌باشد. این فرآورده‌های تولیدی در ایران عمدتاً از نوع حرارت دیده هستند که در صورت رعایت مسائل فنی و بهداشتی، فاقد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشند. در بین محصولات گوشتی موجود در ایران، فرآورده‌های گوشتی همچون انواع سوسیس و کالباس‌های حرارت دیده جزو پر مصرف‌ترین فرآورده‌های گوشتی هستند و مصرف این فرآورده‌ها در جامعه امروزی از روند رو به رشدی برخوردار بوده است (۱۴).

مهم‌ترین منبع آلودگی‌های موجود در گوشت، دام زنده می‌باشد. فراوانی آلودگی‌ها در لاشه می‌تواند به دلیل وجود بیماری‌های میکروبی موجود در بدن دام، که در

(Merk, Germany) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه 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 شد (۱۶).

جداسازی سالمونلا: مقدار ۲۵ گرم از نمونه‌های با ۲۲۵ سی‌سی محیط کشت لاکتوز برات مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس مقدار یک سی‌سی از نمونه غنی‌شده به ۱۰ سی‌سی سلنیت سیستین (Italy, liofilchem) و یک سی‌سی به ۱۰ سی‌سی تتراتیونات برات (Italy, liofilchem) منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، از محیط سلنیت سیستین روی سالمونلا-شیگلا آگار، بیسموت سولفیت آگار و بریلیانت گرین آگار (Italy, liofilchem) به صورت خطی کشت داده شد. به همین ترتیب از تتراتیونات، روی محیط‌های مذکور کشت انجام داده شد. سپس بعد از ۲۴ ساعت تعداد دو یا بیشتر از پرگنه‌های تیپیک به محیط TSI (Italy, liofilchem) منتقل و نتایج بر اساس دستورالعمل استاندارد مورد تفسیر قرار گرفت (۱۶).

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس: برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس ۵ گرم از نمونه‌های مورد آزمایش 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 ۰/۵ سی‌سی از آن به‌وسیله 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 گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از پایان انکوباسیون در صورت رشد، باکتری‌های با کلنی‌های گرد و سیاه رنگ، جهت انجام کشت تأییدی، از کلونی‌های مشکوک

به‌وسیله 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 سانتی‌گراد 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 شدند (۱۷).

جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا: به میزان وزنی ۳۰/۹۳ گرم از محیط کشت اولیه که PSB (Mirmedia, Iran) بود به داخل ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه شد. سپس برای استریلیزاسیون به اتوکلاو انتقال و مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱۵ پوند و حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد محیط کشت گذاشته شد. سپس مقدار ۴۰ گرم از محیط کشت اصلی یرسینیا انتروکولیتیکا (CIN, Mirmedia, Iran) 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: سفسلودین، ایرگاسان، نوویسین است. ظهور کلنی‌های چشم‌گاو نشان‌دهنده آلودگی به یرسینیا انتروکولیتیکا بود (۱۷).

روش تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی تفاوت بین شیوع آلودگی بین نمونه‌های سوسیس و کالباس‌ها و نیز همبستگی بین شیوع باکتری‌های مختلف در نمونه‌ها از آزمون χ^2 و برای مقایسه بین فراوانی آلودگی باکتری خاص بین نمونه‌های سوسیس و کالباس از آزمون Wilcoxon استفاده شد. حدود اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

مطابق جدول ۱، از مجموع ۱۹۱ نمونه سوسیس،

در بررسی کالباس‌ها ارزیابی آماری نشان داد که از مجموع ۱۹۲ نمونه کالباس عرضه شده بیشترین میزان شیوع آلودگی برای استافیلوکوکوس اورئوس در کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج بود و به ترتیب اشیریشیاکلای، سالمونلا با آلودگی مشابه و سپس یرسینیا انتروکولیتیکا کمترین میزان آلودگی را در کالباس‌ها داشتند. در مقایسه بین فراوانی آلودگی توسط آزمون Wilcoxon مشابه نمونه‌های سوسیس، در نمونه‌های کالباس هم، به‌طور معنی‌دار شیوع استافیلوکوکوس اورئوس فراتر و شیوع یرسینیا انتروکولیتیکا از سایر میکروارگانیسم‌ها کمتر بود و باز هم شیوع اشیریشیاکلای و سالمونلا با هم تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت. در مقایسه فراوانی آلودگی میکروبی بین نمونه‌های سوسیس و کالباس توسط آزمون χ^2 ، تنها تفاوت معنی‌دار در شیوع استافیلوکوکوس اورئوس بود که به‌طور معنی‌دار در نمونه‌های سوسیس بیشتر بود.

آلودگی به اشیریشیاکلای در ۱۴ نمونه (۷/۳۲ درصد)، سالمونلا ۱۶ نمونه (۸/۳۷ درصد)، استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۲ نمونه (۵۳/۴ درصد) و یرسینیا انتروکولیتیکا ۳ نمونه (۱/۵۷ درصد) دیده شد. بیشترین میزان شیوع آلودگی برای استافیلوکوکوس اورئوس بود و به ترتیب سالمونلا، اشیریشیاکلای و یرسینیا انتروکولیتیکا بیشترین و کمترین میزان آلودگی را در سوسیس‌ها داشتند. در مقایسه بین فراوانی آلودگی توسط آزمون Wilcoxon، به‌طور معنی‌دار شیوع استافیلوکوکوس اورئوس فراتر و شیوع یرسینیا انتروکولیتیکا پائین‌تر از سایر میکروارگانیسم‌ها بود. شیوع اشیریشیاکلای و سالمونلا با هم تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. مطابق استاندارد ۲۳۰۲ سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران باکتری‌های پاتوژن جدا شده از نمونه‌های فرآورده‌های گوشتی باید در وضعیت منفی باشند تا کالا از نظر سلامت تأیید شود که بین نتایج حاصل از آلودگی سوسیس‌ها با استاندارد ایران تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/01$).

جدول ۱- توزیع فراوانی آلودگی سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج به باکتری‌های مورد مطالعه

نمونه غذایی	اشیریشیاکلای		سالمونلا		استافیلوکوکوس اورئوس		یرسینیا انتروکولیتیکا	
	درصد	n	درصد	n	درصد	n	درصد	n
سوسیس (n = ۱۹۱)	۷/۳۲ ^a	۱۴	۸/۳۷ ^a	۱۶	۵۳/۴ ^b	۱۰۲	۱/۵۷ ^c	۳
کالباس (n = ۱۹۲)	۶/۲۵ ^a	۱۲	۶/۲۵ ^a	۱۲	۲۵ ^d	۴۸	۰ ^c	۰
جمع (n = ۳۸۳)	۶/۷۸	۲۶	۷/۳۱	۲۸	۳۹/۱۶	۱۵۰	۰/۷۸	۳

در اعداد با حروف انگلیسی متفاوت، تفاوت معنی‌دار با ($p < 0/01$) وجود داشت.

جدول ۲، توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی همزمان به انواع باکتری‌ها را نشان می‌دهد که نمونه‌های مختلف همزمان به کدام باکتری‌ها آلوده بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در نمونه‌های سوسیس، بیشترین همزمانی بین وجود اشیریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس در ۱۴ نمونه و سپس بین اشیریشیاکلای و سالمونلا در یک نمونه دیده شد.

جدول ۲، توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی همزمان به انواع باکتری‌ها را نشان می‌دهد که نمونه‌های مختلف همزمان به کدام باکتری‌ها آلوده بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در نمونه‌های سوسیس، بیشترین همزمانی بین وجود اشیریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس در ۱۴ نمونه و سپس بین اشیریشیاکلای و سالمونلا در یک نمونه دیده شد.

جدول ۲- توزیع فراوانی آلودگی همزمان به انواع باکتری مورد مطالعه در سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج

نوع نمونه	نوع باکتری	سالمونلا		استافیلوکوکوس اورئوس		یرسینیا انتروکولیتیکا	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سوسیس (n= ۱۹۱)	اشریشیاکلای	۱۰	۵/۲	۱۴	۷/۳	۰	۰
	سالمونلا			۱۲	۶/۳	۰	۰
	استافیلوکوکوس اورئوس					۲	۱
کالباس (n= ۱۹۲)	اشریشیاکلای	۱	۰/۵	۰	۰	۰	۰
	سالمونلا			۴	۲/۱	۰	۰
	استافیلوکوکوس اورئوس					۰	۰
جمع (n= ۳۸۳)	اشریشیاکلای	۱۱	۲/۹	۱۴	۳/۶	۰	۰
	سالمونلا			۱۶	۴/۲	۰	۰
	استافیلوکوکوس اورئوس					۲	۰/۵

نمونه‌ها را بر حسب تعداد آلودگی نشان می‌دهد که نمونه‌های مختلف همزمان به چند باکتری آلوده بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در نمونه‌های سوسیس، تعداد موارد دارای دو آلودگی ۸ و سه آلودگی ۱۰ مورد بود و موارد دارای ۴ آلودگی همزمان وجود نداشت. در حالی که در نمونه‌های کالباس موارد دارای دو آلودگی فقط ۵ مورد بود و موارد دارای ۳ یا ۴ آلودگی همزمان وجود نداشت.

در آزمون همبستگی بین فراوانی باکتری‌های مختلف، در نمونه‌های سوسیس همبستگی معنی‌دار بین شیوع اشریشیاکلای و سالمونلا و نیز بین اشریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس با $(p < ۰/۰۱)$ وجود داشت. در نمونه‌های کالباس نیز همبستگی معنی‌دار بین شیوع اشریشیاکلای و سالمونلا با $(p < ۰/۰۱)$ و نیز بین اشریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس با $(p < ۰/۰۵)$ وجود داشت.

جدول ۳، توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی

جدول ۳- توزیع فراوانی نمونه‌های سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج بر حسب تعداد آلودگی

ماده غذایی	دارای یک آلودگی		دارای دو آلودگی		دارای سه آلودگی		دارای چهار آلودگی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سوسیس (n = ۱۹۱)	۸۹	۴۶/۵۹	۸	۴/۱۸	۱۰	۵/۳۲	۰	۰
کالباس (n = ۱۹۲)	۶۲	۳۲/۲۹	۵	۲/۶	۰	۰	۰	۰
جمع (n = ۳۸۳)	۱۵۱	۳۹/۴	۱۳	۳/۴	۱۰	۲/۶	۰	۰

غذاهای RTE مانند سوسیس، کالباس، ساندویچ‌ها، ماهی سرخ شده و غیره به‌عنوان منابع خطرناک آلودگی به میکروارگانیسم‌های پاتوژن در نظر گرفته می‌شوند زیرا چنین مواد غذایی می‌توانند از رشد پاتوژن‌ها حمایت کنند. مصرف غذاهای خیابانی به‌طور بالقوه خطر ابتلا به بیماری‌های ناشی از غذا را افزایش می‌دهد زیرا غذاهای خیابانی به راحتی از منابع مختلف آلوده می‌شوند و

بحث و نتیجه‌گیری

سازمان خوار و بار جهانی، غذاهای خیابانی را به‌عنوان غذاها و نوشیدنی‌های RTE که توسط دست‌فروشان تهیه و یا به فروش می‌رسد، به‌ویژه در خیابان‌ها و سایر مکان‌های عمومی مشابه تعریف می‌کند. غذاهای RTE می‌توانند خام یا پخته، گرم یا سرد باشند و می‌توانند بدون عملیات حرارتی بیشتر مصرف شوند. برخی از

اقدامات ایمنی، کیفیت و بهداشت مناسبی در زمان تهیه، توزیع و عرضه وجود ندارد. در همین راستا، در پژوهش حاضر میانگین آلودگی سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرج به ترتیب از مجموع ۱۹۱ نمونه سوسیس ۱۳۵ نمونه (۴۹/۸۶ درصد) و از مجموع ۱۹۲ نمونه کالباس ۷۲ نمونه (۱۸/۷۹ درصد) به باکتری‌های پاتوژن آلوده بودند. این در حالی است که میزان آلودگی بالا در مطالعه حاضر نشان‌دهنده عدم رعایت بهداشت در طبخ، ذخیره‌سازی، انبار، هندلینگ و عرضه به مصرف‌کنندگان است. مجموع آلودگی به میکروارگانیسم‌های پاتوژن از ۳۸۳ نمونه، ۲۰۷ نمونه (۵۰/۰۴ درصد) بود.

حیدرزادی و همکاران (۲۰۲۳)، در پژوهشی روی آلودگی ساندویچ‌های عرضه شده در شهرستان کرمانشاه گزارش دادند میزان آلودگی در فرآورده‌های گوشتی به استافیلوکوکوس اورئوس ۴۲/۷۱ درصد، اشریشیاکلای ۶/۹ درصد، سالمونلا ۸/۶ درصد و یرسینیا انتروکولیتیکا منفی بود (۱۷)، که همسو با مطالعه حاضر است. آزاد و شاکریان (۲۰۲۳)، در پژوهشی روی آلودگی سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان تهران نشان دادند که میزان آلودگی در سوسیس و کالباس‌های نمونه‌گیری شده از استاندارد ملی ایران بالاتر بود. در سوسیس‌های مورد مطالعه از ۵۰ نمونه ۱۴ نمونه (۲۸ درصد) و در کالباس‌ها از ۵۰ نمونه ۲۰ (۴۰ درصد) آلودگی به میکروارگانیسم‌های اشریشیاکلای، سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس وجود داشته است (۱۸)، که با پژوهش حاضر مطابقتی ندارد. در تحقیقی در نیجریه روی آلودگی به اشریشیاکلای در مواد غذایی آماده (RTE) توسط Beshiru و همکاران (۲۰۲۲) نشان داده شد که ۸۰ نمونه از ۳۰۰ نمونه غذایی (۲۶/۷ درصد) آلوده به اشریشیاکلای بوده است (۱۹)، که درصد آلودگی به اشریشیاکلای در مطالعه حاضر ۲۶ نمونه از ۳۰۰ نمونه (۶/۷۷ درصد) بود که مطابقتی ندارد. مطالعه Parvez و همکاران (۲۰۱۰) بر روی آلودگی غذاهای خیابانی عرضه

شده نشان دادند که ۳۷ نمونه از ۵۰ نمونه (۷۴ درصد) مورد بررسی از غذاهای RTE دارای آلودگی به اشریشیاکلای بودند (۲۰)، که بسیار فراتر از آلودگی به اشریشیاکلای در مطالعه حاضر (۶/۷۷ درصد) است. در پژوهشی که توسط Ema و همکاران (۲۰۲۲) روی آلودگی مواد غذایی عرضه شده در بنگلادش به اشریشیاکلای انجام شد، گزارش دادند که میزان آلودگی به اشریشیاکلای در سالادها، ۴۰ درصد، فرآورده‌های گوشتی ۱۶ و ساندویچ‌ها ۱۶/۷ درصد بود (۲۱)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر در خصوص آلودگی به اشریشیاکلای در فرآورده‌های گوشتی مطابقت ندارد.

Jackson و همکاران (۲۰۱۹) روی آلودگی غذاهای آماده به اشریشیاکلای و سالمونلا نشان دادند که شیوع سالمونلا ۱/۵ درصد و شیوع اشریشیاکلای ۱/۷ درصد بود (۲۲)، که از مطالعه حاضر پائین‌تر بود. تحقیقی توسط Nikiema و همکاران (۲۰۲۱) روی آلودگی غذاهای خیابانی به سالمونلا در بورکینافاسو دریافتند که شیوع سالمونلا ۱۷/۹ درصد (۲۰۱/۳۶) بود (۲۳)، میانگین سالمونلا در مطالعه حاضر ۷/۲۹ درصد بود که پائین‌تر از مطالعه نامبرده می‌باشد. در مطالعه‌ای Raza و همکاران (۲۰۲۱)، روی آلودگی مواد غذایی در پاکستان به سالمونلا دریافتند که تقریباً ۳۸ درصد (۳۲۰/۱۲۱) از نمونه‌های غذایی RTE برای مصرف انسانی مناسب نبودند. آلوده‌ترین نوع غذای RTE شاورما (کباب ترکی/گص) (۴۹ درصد) بود. آلودگی میکروبی نمونه‌های غذایی در تابستان نسبت به فصول دیگر بیشتر بود. تقریباً ۴۰ درصد (۱۲۱/۴۹) از نمونه‌های غذایی که برای مصرف انسانی مناسب نبودند به گونه‌های سالمونلا آلوده بودند. سالمونلا انتریتیدیس (۶۹ درصد) و سالمونلا تیفی‌موریوم (۳۱ درصد) تنها سروارها در بین نمونه‌هایی بودند که برای گونه‌های سالمونلا مثبت بودند (۲۴)، در مطالعه حاضر آلودگی به سالمونلا در سوسیس و کالباس ۷/۲۹ درصد بود که در نتیجه شیوع آلودگی در مطالعه حاضر پائین‌تر از مطالعه نامبرده است.

Rivera و همکاران (۲۰۰۴) در آمریکا روی آلودگی به

سالمونلا در مطالعه نامبرده پائین‌تر از پژوهش حاضر است. به‌طور کلی، غذا می‌تواند در طول تولید آلوده شود و بنابراین هر مرحله از زنجیره فرآوری باید با قوانین بهداشتی صحیح مطابقت داشته باشد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که غذاهای آماده‌ای که در شهرستان کرج عرضه می‌شوند به باکتری‌های پاتوژن آلوده هستند، منشأ احتمالی این آلاینده‌ها به‌دلیل عدم رعایت بهداشت، جابجایی نامناسب مواد غذایی و بالابودن رفت و آمد و پیامد نهایی آن افزایش گرد و غبار در محیط عرضه است. این بدان معناست که این غذاهای آماده، منبع زنده بیماری‌های مختلف هستند. برخی از این بیماری‌ها می‌توانند گسترش یافته و وضعیت همه‌گیر پیدا کنند که خطرات جدی برای سلامتی ایجاد می‌کنند. وجود این میکروارگانیسم‌ها در غذا باعث فساد غذا و مسمومیت غذایی می‌شود. غذا نه تنها باید از نظر تغذیه‌ای متعادل باشد، بلکه باید از نظر میکروبیولوژیکی نیز ایمن باشد. همچنین نیاز به آموزش فروشندگان مواد غذایی خیابانی در خصوص ایمنی و کیفیت مواد غذایی به‌منظور ارتقای ایمنی غذای خیابانی ضروری به نظر می‌رسد.

سالمونلا و اشریشیاکلای در فرآورده‌های گوشتی دریافتند که میزان آلودگی در این فرآورده‌ها به اشریشیاکلای ۲ و سالمونلا ۲ درصد بود (۲۵)، که پائین‌تر از مطالعه حاضر است. نتایج مطالعه سادات کریمی و همکاران (۲۰۱۰) روی آلودگی‌های میکروبی خمیر مرغ دریافتند که ۳۸ درصد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت، ۲۴ درصد اشریشیاکلای، ۱۸ درصد در فاکتور شمارش کلی میکروارگانیسم، از ۱۰۰ نمونه مثبت بودند (۲۶)، میانگین شیوع آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه حاضر ۴۰/۳۶ و اشریشیاکلای ۶/۷۷ درصد بود. صادقی و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای بر روی آلودگی‌های میکروبی در سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهرستان کرمانشاه گزارش دادند که میزان آلودگی میکروبی نمونه‌ها ۱۰۰ درصد کپک و مخمر، ۵۸ درصد کلیفرم، ۵۳ درصد استافیلوکوکوس، ۱۷ درصد اشریشیاکلای و ۳ درصد سالمونلا بود. در ۳ درصد از نمونه‌های جمع‌آوری شده تمامی میکروارگانیسم‌ها حضور داشتند (۲۷). در مطالعه حاضر میانگین آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس ۴۰/۳۶ درصد، اشریشیاکلای ۶/۷۷ و سالمونلا ۷/۲۹ درصد بود که میزان آلودگی

References

- 1- Rahman M, Rahman A, Islam M, Alam M. Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from milk, beef and chicken meat in Bangladesh. *Bang J Vet Med*. 2017; 15(2).
- 2- Bagumire A, Karumuna R. Bacterial contamination of ready-to-eat meats vended in highway markets in Uganda. *Afri J Food Sci*. 2017; 11(6): 160-70.
- 3- Oje O, Ajibade VA, Fajilade OT, Ajenifuja O. Microbiological analysis of ready-to-eat (RTE) foods vended in mobile outlet catering units from Nigeria. *J Adv Food Sci Technol*. 2018; 5: 15-9.
- 4- Andrade AA, Paiva AD, Machado ABF. Microbiology of Street food: understanding risks to improve safety. *J Appl Microb*. 2023; 134(8).
- 5- Barro N, Nikiéma P, Ouattara C, Traoré A. Evaluation de l'hygiène et de la qualité

microbiologique de quelques aliments rue et les caractéristiques des consommateurs dans les villes de Ouagadougou et de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Rev Sci Tec Sci Santé*. 2002; 25: 7-21.

6- Oliveira TC, Abranches MV, Lana RM. Food (in) security in Brazil in the context of the SARS-CoV-2 pandemic. *Cadernos de Saúde Pública*. 2020; 36.

7- Castro-Rosas J, Cerna-Cortés JF, Méndez-Reyes E, Lopez-Hernandez D, Gómez-Aldapa CA, Estrada-Garcia T. Presence of faecal coliforms, Escherichia coli and diarrheagenic E. coli pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *Inter J food microb*. 2012; 156(2): 176-80.

8- Algammal AM, Hetta HF, Batiha GE, Hozzein WN, El Kazzaz WM, Hashem HR, et al. Virulence-determinants and antibiotic-resistance

genes of MDR-E. coli isolated from secondary infections following FMD-outbreak in cattle. *Sci reports*. 2020; 10(1): 19779.

9- Lima CM, Souza IEGL, dos Santos Alves T, Leite CC, Evangelista-Barreto NS, de Castro Almeida RC. Antimicrobial resistance in diarrheagenic Escherichia coli from ready-to-eat foods. *J food sci tech*. 2017; 54: 3612-9.

10- Makharita RR, El-Kholy I, Hetta HF, Abdelaziz MH, Hagagy FI, Ahmed AA, et al. Antibioqram and genetic characterization of carbapenem-resistant gram-negative pathogens incriminated in healthcare-associated infections. *Infec drug resis*. 2020; 3991-4002.

11- Shabnam M, Kwai Lin T. Isolation and molecular sub typing of Salmonella enterica from chicken, beef and street foods in Malaysia. *Sci Res Essays*. 2010; 5(18): 2713-20.

12- 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.

13- Seakamela EM, Diseko L, Malatji D, Makhado L, Motau M, Jambwa K, et al. Characterisation and antibiotic resistance of Yersinia enterocolitica from various meat categories, South Africa. *Onder J Vet Res*. 2022; 89(1): 1-11.

14- Aghalari Z, Hosseini SR, Jafarian S, Rezazadeh M, Mirzaei M, Esmaeili E, et al. Evaluation of chemical and microbial quality of food in northern Iran. *J Health Population Nut*. 2021; 40: 1-6.

15- Pérez-Rodríguez F, Castro R, Posada-Izquierdo G, Valero A, Carrasco E, García-Gimeno R, et al. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat sci*. 2010; 86(2): 4785-4789.

16- 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 Hyg*. 2021;11(2): 81-90. [In persian]

17- 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 Hyg*. 2023; 13(5):53-66. [In persian]

18- Azad A, Shakerian A. Evaluation of Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli, and Salmonella Contamination in Sausages and Bologna Sold in Tehran City, Iran. *J Alternative Vet Med*. 2023; 6(16): 1-11.

19- Beshiru A, Okoh AI ,Igbiosa EO. Processed ready-to-eat (RTE) foods sold in Yenagoa Nigeria were colonized by diarrheagenic Escherichia coli which constitute a probable hazard to human health. *Plos one*. 2022; 17(4):e0266059.

20- Biswas S, Parvez M, Shafiquzzaman M, Nahar S ,Rahman M. Isolation and characterization of Escherichia coli in ready-to-eat foods vended in Islamic University, Kushtia. *J Bio-Sci*. 2010; 18(1): 99-103.

21- Ema FA, Shanta RN, Rahman MZ, Islam MA, Khatun MM. Isolation, identification, and antibiogram studies of Escherichia coli from ready-to-eat foods in Mymensingh, Bangladesh. *Vet World*. 2022; 15(6): 1497.

22- Hull Jackson C, Mota Meira M, Adesiyun A. Bacteriological quality and the prevalence of Salmonella spp. and E. coli O157: H7 in ready-to-eat foods from Barbados, WI. *J Food Safe*. 2019; 39(5): e12666.

23- Nikiema ME, Pardos de la Gandara M, Compaore KA, Ky Ba A, Soro KD, Nikiema PA, et al. Contamination of street food with multidrug-resistant Salmonella, in Ouagadougou, Burkina Faso. *Plos one*. 2021; 16(6): e0253312.

24- Raza J, Asmat TM, Mustafa MZ, Ishtiaq H, Mumtaz K, Jalees MM, et al. Contamination of ready-to-eat street food in Pakistan with Salmonella spp.: implications for consumers and food safety. *Inter J Infec Dis*. 2021; 106: 123-7.

25- Rivera-Betancourt M, Shackelford SD, Arthur TM, Westmoreland KE, Bellinger G, Rossman M, et al. Prevalence of Escherichia coli O157: H7, Listeria monocytogenes, and Salmonella in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *J food protec*. 2004; 67(2): 295-302.

26- Karimi M, Mehrabian S, RAFIEI TR, Samiai B. A study on microbial properties of mechanically deboned chicken meat in meat plan of Tehran. 2010.

27- Sadeghi E, Hashemian A, Mohammadi M, Mohammadi R. Study on the microbiological and chemical characterization of the meat products consumed in Kermanshah in 2012. *Iran J Nut Sci & Food Tech*. 2013; 7(5): 137-145.




Investigation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Yersinia* contamination in sausages and sausages offered in Karaj County

Mohammad Amin Amani¹, Seyed Majid Hashemi^{2*}

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

2- Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: May 25, 2024; Revise: June 20, 2024; Accept: June 22, 2024

 10.22034/nfvm.2024.457612.1241

Summary

Contamination of food by microorganisms is a serious public health concern that can cause foodborne diseases. The purpose of this study was to investigate the contamination with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Yersinia* in sausages and sausages offered in Karaj city. In this study, 191 sausage samples and 192 sausage samples were randomly sampled from the supply centers of this product in Karaj city and transferred to the laboratory under sterile conditions. The samples were tested according to the standard method for contamination evaluation. SPSS software and chi-square method for statistical analysis of data and ($p < 0.05$) was considered as the significance level. The results showed that the most contamination in sausages was related to *Staphylococcus aureus*. Out of a total of 384 samples, the average contamination in sausages and sausages sold in Karaj county was *Escherichia coli* 77.6%, *Salmonella* 7.29%, *Staphylococcus aureus* 40.36% and *Yersinia enterocolitica* 0.78%. The results showed that there is no significant relationship between the contamination of sausages and sausages ($p > 0.05$). Considering the high level of contamination among the samples, it is necessary and necessary for the authorities to monitor the quality of food as much as possible in order to prevent the occurrence of infections and food poisoning that endanger human health.

Keywords: *food safety, gastroenteritis, sausages, Karaj*



بررسی تنوع گونه‌های قارچی عامل عفونت‌های چشمی در شترهای منطقه زابل و ارتباط آن با سن و جنس: نقش شرایط جوی در فراوانی عفونت‌های چشمی

سهراب سربزی رودی^۱، علی سارانی^{۲*}، مهدی راسخ^۳

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

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

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

دریافت مقاله: ۱۰ مرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۸ مرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۹ مرداد ۱۴۰۳



10.22034/nfvm.2024.487242.1263

چکیده

شترها به عنوان منبع ارزشمند پروتئین، و نیروی کار در مناطق خشک و نیمه‌خشک، از اهمیت بالایی برخوردارند. با توجه به نقش کلیدی آنها در اقتصاد و معیشت جوامع محلی، بررسی سلامت این حیوانات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه حاضر، با هدف بررسی تنوع و فراوانی گونه‌های قارچی عامل عفونت‌های چشمی در شترهای منطقه زابل از تعداد ۵۰ نفر شتر به صورت تصادفی نمونه‌برداری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده بر روی محیط‌های کشت اختصاصی کشت داده شده و گونه‌های قارچی موجود شناسایی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد؛ در ۸۸ درصد از شترها (n=۴۴) حداقل یک گونه قارچی وجود دارد که *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با ۱۱ مورد (۲۲ درصد)، فراوان‌ترین گونه و *پنیسیلیوم* با ۹ مورد (۱۸ درصد)، *آسپرژیلوس فلاووس* با ۸ مورد (۱۶ درصد)، *موکور* با ۶ مورد (۱۲ درصد)، *آسپرژیلوس نایجر* و *رایزوپوس* هر کدام با سه مورد (۶ درصد)، *کلادوسپوریوم* با دو مورد (۴ درصد) و *آبسیدیا* و *تریکوفایتون* با یک مورد (۲ درصد) بودند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان آلودگی در شترهای بالای ۲ سال بیشتر بود (۶۸/۱۸ درصد). آنالیز آماری داده‌ها ارتباط معنی‌داری بین سن و جنس با میزان درصد فراوانی قارچ‌های جداسازی شده نشان نداد ($p > 0.5$). همچنین در بررسی حاضر میزان جدایه‌های قارچی در شترهای نر بیشتر از جنس ماده بود ولی تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید ($P = 0.11$). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد شرایط خاص جوی منطقه می‌تواند بر میزان فراوانی قارچ‌های چشمی به‌خصوص در حیوانات بیابان زیست دارای نقش باشد.

واژگان کلیدی: جدایه‌های فلور قارچی، ملتحمه، شتر، شهرستان زابل

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: alisarani@uoz.ac.ir

قارچ‌های موجود در چشم‌های سالم می‌تواند در تشخیص گونه‌های بیماری‌زا و همچنین توسعه درمان‌های ضد قارچی مؤثر، راهگشا باشد (۵).

سطح چشم، به‌ویژه ملتحمه و قرنیه، دارای سیستم دفاعی قوی در برابر عفونت‌های قارچی است. این سیستم دفاعی شامل مکانیسم‌های ایمنی، متابولیک، عوامل ضد میکروبی و سدهای فیزیکی بافتی است. پلک‌ها، لیزوزیم، بتالیزین، لاکتوفرین، ایمونوگلوبولین‌های ترشحی و لکوسیت‌های موجود در لایه پیش‌اشکی از جمله عوامل محافظتی هستند که سطح چشم را در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند. برخی از میکروارگانیسم‌های موجود بر سطح چشم، با اشغال فضای سطحی و مصرف مواد مغذی و تولید مواد مهارکننده مانند پادزیست‌های پلی‌پتیدی از استقرار قارچ‌های فرصت‌طلب ممانعت می‌کنند (۶، ۷). همچنین، اپیتلیوم قرنیه به‌عنوان مهم‌ترین و موثرترین سد در برابر قارچ‌های بیماری‌زا شناخته می‌شود و نقش حیاتی در جلوگیری از بروز عفونت‌های چشمی ایفا می‌کند (۴، ۸). با توجه به نقش اقتصادی و حیاتی شترها، بررسی و مراقبت از سلامت آنها اهمیت ویژه‌ای دارد. بیماری‌های عفونی، از جمله بیماری‌های قارچی، از جمله عوامل تهدیدکننده سلامت شترها هستند که می‌توانند به‌طور چشمگیری عملکرد و سلامت عمومی آنها را تحت تأثیر قرار دهند (۹). عفونت‌های چشمی یکی از مشکلات رایج در شترها به‌شمار می‌رود که اغلب به علت تماس با عوامل بیماری‌زا و شرایط نامناسب محیطی ایجاد می‌شود. این عفونت‌ها می‌توانند به شکل‌های مختلفی بروز پیدا کنند و در صورت عدم درمان مناسب، عوارضی مانند کاهش بینایی و حتی نابینایی در شترها ایجاد کنند که این موضوع می‌تواند پیامدهای اقتصادی نامطلوبی برای جوامع وابسته به شترها به همراه داشته باشد (۱۰، ۱۱).

مطالعات کمی بر روی گونه‌های قارچی چشمی در شترها انجام شده است. به‌عنوان مثال، گینوفریدو و همکاران در تحقیقی بر روی فلور قارچی سه نژاد لاما،

شترها به‌عنوان حیواناتی که به خوبی با شرایط سخت مناطق خشک و نیمه‌خشک سازگار هستند، نقشی اساسی در اقتصاد و معیشت این مناطق ایفا می‌کنند. آنها منابع مهمی برای تولید مواد غذایی چون شیر، گوشت، پشم و همچنین نیروی کار برای حمل و نقل و بارکشی هستند (۱). در شرایطی که تأمین منابع غذایی و ذخایر انرژی به چالشی جهانی بدل شده است، اهمیت شترها به‌عنوان منبع تأمین پروتئین و نیروی کار بیش از پیش آشکار می‌شود. با این حال، سلامت شترها به‌دلیل وجود بیماری‌های عفونی و مشکلات مرتبط با آنها تهدید می‌شود که از جمله این تهدیدات، عفونت‌های قارچی به‌ویژه در ناحیه چشم است. قارچ‌ها به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی چشم حیوانات، تحت شرایط خاصی می‌توانند بیماری‌زا شوند و مشکلات متعددی برای دام و صنعت تولیدی به وجود آورند (۲). عفونت‌های قارچی چشم می‌توانند به‌واسطه خراش‌های سطحی و ورود قارچ‌های فرصت‌طلب به داخل قرنیه ایجاد شوند، به‌خصوص اگر قرنیه توسط مواد گیاهی خراشیده شده باشد. این آسیب‌دیدگی‌ها می‌تواند سد محافظ اپی‌تلیالی قرنیه را ضعیف کند و فرصت مناسبی برای قارچ‌ها فراهم آورد (۳). فلور میکروبی طبیعی سطح چشم، خود می‌تواند یکی از منابع تأمین قارچ‌های عامل کراتومایکوز در حیوانات باشد. در اسب‌ها، عفونت‌های قارچی قرنیه به‌وفور گزارش شده‌اند، در حالی که در گاوها به‌ندرت چنین مواردی دیده می‌شود. آسیب‌های قرنیه و تماس با خاک‌های آلوده و مواد گیاهی نیز به‌عنوان عوامل مستعدکننده‌ای مطرح هستند که می‌توانند به آلودگی قارچی منجر شوند (۴). تشخیص سریع عفونت‌های قارچی قرنیه امکان آغاز سریع درمان و پیشگیری از آسیب‌های جبران‌ناپذیر به قرنیه را برای دامپزشکان فراهم می‌کند. از طرفی، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که گونه‌های قارچی جدا شده از چشم‌های دچار کراتومایکوز شباهت زیادی به قارچ‌های موجود در چشم‌های سالم دارند. از این رو، شناسایی

مواد و روش‌ها

هدف مطالعه و جمع‌آوری نمونه‌ها: این مطالعه با

هدف شناسایی فلور قارچی موجود در چشم شترهای مناطق مختلف شهرستان زابل انجام شد. برای این منظور، ۵۰ شتر با محدوده سنی ۲ تا ۱۰ سال به صورت تصادفی انتخاب شدند.

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه، نمونه‌گیری از

سطح داخلی ملتحمه و پلک سوم چشم شترها با هدف بررسی فلور قارچی این نواحی صورت گرفت. انتخاب ملتحمه و پلک سوم به دلیل تماس مداوم این نواحی با محیط خارجی و احتمال بالاتر آلودگی به میکروارگانیسم‌ها انجام شد. این بخش‌ها به‌عنوان موانع دفاعی طبیعی در برابر عوامل عفونی عمل می‌کنند و بررسی آنها اطلاعات مفیدی درباره وضعیت قارچی این نواحی در شترها فراهم می‌کند. برای اطمینان از دقت و صحت نمونه‌برداری، از سواب‌های استریل استفاده شد. استفاده از سواب‌های استریل دو هدف اصلی را دنبال می‌کند. نخست، جلوگیری از آلودگی‌های خارجی است؛ این امر ضروری است زیرا هرگونه آلودگی محیطی می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تأثیر قرار داده و منجر به شناسایی گونه‌های قارچی شود که در حقیقت در چشم شتر وجود ندارند. دوم، تضمین دقت و اعتبار نتایج نمونه‌گیری است. استفاده از ابزار غیر استریل می‌تواند منجر به نتایج نادرست و افزایش کاذب گونه‌های قارچی شود که در واقع بخشی از فلور طبیعی چشم شتر نیستند.

فرآیند نمونه‌برداری با دقت انجام شد؛ سواب‌ها با حرکت ملایم و چرخشی بر روی سطح داخلی ملتحمه و پلک سوم حرکت داده شدند تا به آرامی قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌های موجود جمع‌آوری شوند، بدون اینکه به بافت حساس چشم آسیبی وارد شود. پس از جمع‌آوری، سواب‌ها بلافاصله در محیط حمل استریل قرار داده شدند و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شدند تا شرایط رشد میکروارگانیسم‌ها حفظ شود و

نشان دادند که آسپرژیلوس، گونه غالب قارچی در چشم این شترسانان است. در مطالعه‌های دیگر که توسط خسروی و همکاران در ایران انجام شد، فلور قارچی چشم و بینی شترهای یک‌کوهانه بررسی شد و گونه‌های کلادوسپوریوم و کاندیدا کورسه‌ای به‌عنوان گونه‌های غالب گزارش شدند (۱۲، ۱۳). بررسی‌های انجام شده بر روی سایر حیوانات اهلی، به‌ویژه اسب و گاو نشان داده است که آلودگی قارچی چشم در این حیوانات نسبتاً شایع است (۱۴). به‌عنوان نمونه، مطالعه‌ای بر روی اسب‌های عرب ایرانی نشان داد که آلودگی قارچی در ۸۸/۳۷ درصد از نمونه‌های مورد بررسی وجود دارد. همچنین، تحقیقی دیگر بر روی گاوهای ایرانی نشان داد که قارچ‌هایی مانند آسپرژیلوس، پنسیلیوم، رودتورلا و کاندیدا در حدود ۲۹ درصد از نمونه‌ها وجود دارند. این یافته‌ها بر اهمیت بررسی و پایش فلور قارچی چشم حیوانات اهلی تأکید دارد، زیرا شناخت این فلور می‌تواند در شناسایی و کنترل گونه‌های قارچی بیماری‌زا که ممکن است مشکلات جدی برای سلامت حیوانات ایجاد کنند، مؤثر باشد (۱۷-۱۵).

با توجه به شرایط خشک و گرد و غبار فراوان در منطقه زابل، احتمال تماس شترها با قارچ‌های بیماری‌زا افزایش می‌یابد. رطوبت کم، بادهای شدید و گرد و غبار فراوان از عوامل محیطی هستند که شرایط رشد و انتشار قارچ‌ها را تسهیل می‌کنند. هدف اصلی این مطالعه، بررسی تنوع گونه‌های قارچی عامل عفونت‌های چشمی در شترهای این منطقه و ارزیابی ارتباط آن با عواملی چون سن و جنس است. این تحقیق اطلاعات مفیدی درباره میزان آسیب‌پذیری گروه‌های مختلف شترها در برابر عفونت‌های قارچی فراهم خواهد کرد و به شناخت بهتر از تأثیر عوامل محیطی و فیزیولوژیکی بر شیوع این عفونت‌ها کمک می‌کند. نتایج این تحقیق می‌تواند به‌عنوان منبعی جهت تدوین برنامه‌های بهداشتی و پیشگیرانه برای کاهش شیوع عفونت‌های چشمی قارچی و ارتقای سلامت شترها و در نهایت جوامع محلی وابسته به این حیوانات ارزشمند، مورد استفاده قرار گیرد.

از هرگونه تغییر یا کاهش کیفیت نمونه جلوگیری گردد. این اقدامات برای حفظ دقت و اطمینان از نتایج نهایی مطالعه اهمیت بسیاری داشت.

کشت نمونه‌ها: پس از جمع‌آوری نمونه‌ها از سطح چشم شترها، این نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند تا مراحل کشت قارچی بر روی محیط‌های کشت مناسب انجام شود. در آزمایشگاه، نمونه‌ها برای رشد قارچ‌ها در محیط‌های کشت خاصی قرار داده شدند که شرایط مناسب برای تکثیر و شناسایی قارچ‌ها را فراهم می‌کند.

برای کشت قارچ‌ها، از محیط ساب‌رود دکستروز آگار (SDA) استفاده شد. این محیط کشت به دلیل ترکیب خاص خود که حاوی دکستروز به عنوان منبع اصلی کربن است، شرایط مطلوبی برای رشد قارچ‌ها ایجاد می‌کند. همچنین، برای مهار رشد باکتری‌ها که ممکن است در محیط کشت حضور داشته باشند و مانع از رشد قارچ‌ها شوند، از کلرامفنیکل (HiMedia, India) استفاده شد. کلرامفنیکل یک آنتی‌بیوتیک است که خاصیت ضد باکتری دارد و به این ترتیب مانع از رشد باکتری‌ها و ایجاد آلودگی در کشت می‌شود. علاوه بر این، برای فراهم کردن منابع غذایی غنی و متنوع برای قارچ‌ها، از عصاره مالت (Quelab, Canada) نیز در محیط کشت استفاده شد که به تغذیه بهتر قارچ‌ها کمک می‌کند.

نمونه‌های جمع‌آوری شده بر روی این محیط‌ها قرار گرفتند و سپس پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز در انکوباتور نگهداری شدند. این دما شرایطی ایده‌آل برای رشد قارچ‌ها فراهم می‌آورد. همچنین، مدت زمان ۱۴ روز انکوباسیون به قارچ‌های با سرعت رشد کندتر این فرصت را می‌دهد که به میزان کافی رشد کنند و به‌طور واضح قابل شناسایی شوند. این زمان به‌ویژه برای قارچ‌هایی که در دماهای پایین‌تر به آهستگی رشد می‌کنند، مانند گونه‌های قارچی مختلف در فلور طبیعی چشم حیوانات، ضروری است. در این دوره، قارچ‌ها به‌طور فعال رشد کرده و کلنی‌های قارچی قابل

مشاهده تشکیل می‌دهند. پس از این مدت، پلیت‌ها برای شناسایی انواع قارچ‌ها بررسی می‌شوند و نمونه‌های قارچی از نظر رنگ، اندازه، و شکل ظاهری شناسایی می‌شوند تا در مراحل بعدی برای انجام آزمایشات دقیق‌تر آماده شوند.

بررسی و جداسازی کلنی‌های قارچی: پس از پایان

دوره انکوباسیون، کلنی‌های قارچی تشکیل شده بر روی محیط کشت بررسی شدند.

ارزیابی ظاهری کلنی‌ها: در مرحله ارزیابی ظاهری

کلنی‌ها، کلنی‌های قارچی از نظر ویژگی‌های مختلف بررسی شدند. این ویژگی‌ها شامل رنگ، شکل، اندازه و ویژگی‌های سطحی کلنی‌ها هستند که می‌توانند به شناسایی اولیه قارچ‌ها کمک کنند. رنگ کلنی‌ها می‌تواند بسته به نوع قارچ متفاوت باشد؛ برخی قارچ‌ها کلنی‌هایی با رنگ‌های روشن دارند، در حالی که دیگر قارچ‌ها رنگ‌های تیره‌تری تولید می‌کنند. شکل و اندازه کلنی‌ها نیز می‌تواند از گونه‌ای به گونه دیگر تغییر کند. برخی قارچ‌ها کلنی‌های گرد و منظم تشکیل می‌دهند، در حالی که دیگر قارچ‌ها ممکن است نواحی ناهموار و نامنظم داشته باشند. اندازه کلنی‌ها می‌تواند نشان‌دهنده سرعت رشد و نوع قارچ باشد. ویژگی‌های سطحی کلنی‌ها نیز نقش مهمی در شناسایی قارچ‌ها دارند. برخی قارچ‌ها سطحی مخملی یا پودری دارند، در حالی که برخی دیگر سطح صاف یا ویسکوز دارند. این ویژگی‌ها در تفکیک دقیق گونه‌های قارچی بسیار مؤثر هستند.

پاساژ دادن: پاساژهایی برای جداسازی و

خالص‌سازی کلنی‌ها انجام شد. این مرحله برای اطمینان از خلوص قارچ‌ها و جلوگیری از تداخل گونه‌های مختلف اهمیت دارد.

شناسایی قارچ‌ها: برای شناسایی دقیق گونه‌های

قارچی، از چندین روش تخصصی استفاده شد.

رنگ‌آمیزی لاکتوفنل کاتن بلو: این رنگ‌آمیزی

جهت مشاهده ساختارهای قارچی تحت میکروسکوپ استفاده شد. لاکتوفنل به حفظ ساختار قارچی کمک کرده

و کاتن بلو برای مشاهده بهتر اجزا به قارچ رنگ می‌دهد. **کشت روی لام:** برای بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی برخی از قارچ‌ها، از روش کشت روی لام استفاده شد. در این روش، مقدار کمی از نمونه قارچی بر روی یک لام میکروسکوپی قرار گرفت و همراه با محیط کشت سابورد دکستروز آگار (SDA) بر روی آن قرار داده شد. سپس لام روی محیط کشت گذاشته شد و لام‌ها در داخل پتری‌دیش شیشه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا شرایط مناسبی برای رشد قارچ‌ها فراهم شود. پس از این دوره، لام‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های مناسب، نظیر لاکتوفنل و کاتن بلو، آماده شدند تا ویژگی‌های میکروسکوپی قارچ‌ها به‌وضوح مشاهده شود. این تکنیک به شناسایی ساختارهای میکروسکوپی مانند هاگ‌ها، کلایدوسپورها و دیگر ویژگی‌های تکاملی قارچ‌ها کمک می‌کند. پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها تحت میکروسکوپ نوری قرار گرفته و جزئیات دقیق‌تری از ویژگی‌های قارچ‌ها مشاهده و ثبت گردید. این روش به‌ویژه در شناسایی دقیق گونه‌های قارچی و تفکیک آنها بر اساس ویژگی‌های میکروسکوپی مفید است.

تست‌های بیوشیمیایی: برای شناسایی مخمرها، از تست‌های بیوشیمیایی مانند تست تخمیر قندها استفاده شد. این آزمایش‌ها به تشخیص دقیق گونه‌های مخمری کمک می‌کنند.

تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزارهای آماری مورد تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

مطالعه حاضر با هدف شناسایی و تعیین فراوانی گونه‌های قارچی موجود در چشم شترهای منطقه زابل انجام شد. در این تحقیق، از ۵۰ نمونه شتر از جنس‌های مختلف برای بررسی فلور قارچی سطح چشم استفاده شد. پس از کشت و رشد پرگنه‌ها، ۷ جنس و ۳ گونه قارچی در فلور قارچی چشم شترهای شهرستان زابل شناسایی

شدند.

نتایج نشان داد که از بین نمونه‌های آلوده به قارچ، آسپرژیلوس فومیگاتوس با فراوانی ۲۲ درصد بیشترین شیوع را داشته است. پس از آن به ترتیب پنسیلیوم (۱۸ درصد)، آسپرژیلوس فلاووس (۱۶ درصد) و موکور (۱۲ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در مقابل، گونه‌های آسپرژیلوس نایجر، رایزوپوس، کلادوسپوریوم، آبسیدیا و تریکوفایتون با فراوانی کمتر از ۶ درصد کمترین شیوع را نشان دادند (جدول ۱). آنالیز داده‌ها ارتباط معنی‌داری بین جنسیت شترها و نوع عفونت قارچی نشان نداد ($p > 0.05$). همچنین، اگرچه شترهای بالای دو سال با ۶۸/۱۸ درصد بیشترین میزان آلودگی را داشتند، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

نتایج بر اساس جنس شتر: در جنس نر، آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۱۴ درصد (نمونه ۷) بیشترین فراوانی را داشت. بعد از آن، پنسیلیوم و آسپرژیلوس فلاووس به ترتیب با ۱۰ درصد (نمونه ۵) و ۱۰ درصد (نمونه ۵) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. همچنین، موکور با ۸ درصد (نمونه ۴) از دیگر گونه‌های قارچی با شیوع نسبی بالا بود. سایر گونه‌ها مانند آسپرژیلوس نایجر و رایزوپوس فراوانی کمتری داشتند.

در جنس ماده، آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۸ درصد (۴ نمونه) شیوع کمتری نسبت به جنس نر داشت. پس از آن، پنسیلیوم و آسپرژیلوس فلاووس به ترتیب با ۸ درصد (۴ نمونه) و ۶ درصد (۳ نمونه) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. موکور با ۴ درصد (۲ نمونه) و سایر گونه‌ها نیز فراوانی کمتری در جنس ماده داشتند. در شترهای با سن کمتر از دو سال (≥ 2 سال)، آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۴ درصد (۲ نمونه) بیشترین فراوانی را داشت. پس از آن، پنسیلیوم و آسپرژیلوس فلاووس به ترتیب با ۶ درصد (۳ نمونه) و ۴ درصد (۲ نمونه) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در شترهای بالای دو سال (< 2 سال)، آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۱۸ درصد (۹ نمونه) در این گروه بیشترین شیوع را داشت. پنسیلیوم و آسپرژیلوس

فلاووس به ترتیب با ۱۴ درصد (۶ نمونه) و ۱۲ درصد (۶ نمونه) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

جدول ۱- قارچ‌های جدا شده از ملتحمه چشم شترهای مورد مطالعه به تفکیک سن و جنس

فراوانی جدایه	کل	جنس نر	جنس ماده	≥ ۲ سال	< ۲ سال
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۲۲٪ ۱۱	۱۴٪ ۷	۸٪ ۴	۴٪ ۲	۱۸٪ ۹
پنیسیلیوم	۱۸٪ ۹	۱۰٪ ۵	۸٪ ۴	۶٪ ۳	۱۴٪ ۶
آسپرژیلوس فلاووس	۱۶٪ ۸	۱۰٪ ۵	۶٪ ۳	۴٪ ۲	۱۲٪ ۶
موکور	۱۲٪ ۶	۸٪ ۴	۴٪ ۲	۴٪ ۲	۸٪ ۴
آسپرژیلوس نایجر	۶٪ ۳	۴٪ ۲	۲٪ ۱	۲٪ ۱	۴٪ ۲
رابزویوس	۶٪ ۳	۴٪ ۲	۲٪ ۱	۴٪ ۲	۲٪ ۱
کلادوسپوریوم	۴٪ ۲	-	۴٪ ۲	۲٪ ۱	۲٪ ۱
آبسیدیا	۲٪ ۱	-	۲٪ ۱	۲٪ ۱	-
تریکوفایتون	۲٪ ۱	-	۲٪ ۱	-	۲٪ ۱

به خود اختصاص داده است. پس از آن، قارچ‌های *Penicillium* با ۱۸ درصد، *Aspergillus flavus* با ۱۶ درصد و *Mucor* با ۱۲ درصد از فراوان‌ترین قارچ‌ها در ملتحمه شترها بودند. در ادامه این بحث، به مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر کارهای مشابه انجام شده در ایران و دیگر کشورهای جهان خواهیم پرداخت تا عوامل مؤثر بر این تفاوت‌ها را مورد بررسی قرار داد.

مطالعات پیشین انجام شده در ایران بر روی فلور قارچی چشم دام‌ها نشان‌دهنده تنوعی در انواع قارچ‌های شایع است. به‌عنوان مثال، تحقیق عراقی سوره و سودی در سال ۲۰۱۳ بر روی گاوهای هلشتاین سالم در منطقه ارومیه نشان داد که ۶۰ درصد از نمونه‌ها به قارچ‌ها آلوده هستند و از بین این قارچ‌ها، *Aspergillus fumigatus* با ۲۳ درصد فراوانی، بیشترین درصد آلودگی را در میان گاوها داشت (۱۶). نتایج این مطالعه به‌طور قابل توجهی مشابه با نتایج مطالعه حاضر است که نشان‌دهنده غالب

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر به شناسایی و گزارش جدایه‌های قارچی از ملتحمه چشم شترهای شهرستان زابل پرداخته است. این تحقیق اولین مطالعه در این زمینه در منطقه زابل است که به بررسی وضعیت آلودگی قارچی در شترهای این منطقه می‌پردازد. شترها به‌عنوان حیواناتی با ویژگی‌های فیزیولوژیکی خاص، از جمله مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی مانند دمای بالا، خشکی و گرد و غبار، در مناطق گرمسیری و نیمه‌بیابانی حضور دارند. بنابراین، در این تحقیق به بررسی انواع قارچ‌های شایع در ملتحمه چشم شترها و عوامل مؤثر بر این آلودگی‌ها پرداخته شده است.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که بیشترین درصد آلودگی مربوط به قارچ‌های جنس *Aspergillus* است. در این بین، *Aspergillus fumigatus* با ۲۲ درصد فراوانی، بالاترین درصد آلودگی را در میان شترهای مورد بررسی

قارچ‌های غالب شناسایی شدند. با این حال، در این تحقیق هندی، قارچ‌های *Rhizopus* و *Candida* نیز به‌عنوان قارچ‌های شایع در جمعیت گاوها شناسایی شدند، که این مورد در مطالعه حاضر در شترها مشاهده نگردید. این تفاوت‌ها می‌تواند به نوع دام، شرایط بهداشتی، یا حتی نوع قارچ‌های موجود در محیط‌های مختلف مربوط باشد. همچنین در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۱۵ در مصر انجام شد به شناسایی انواع قارچ‌های موجود در چشم اسب‌ها پرداخته شد و نتایج نشان داد که *Aspergillus* و *Penicillium* نیز از قارچ‌های غالب بودند (۴). در این تحقیق، قارچ‌های *Mucor* و *Rhizopus* نیز در نمونه‌های آلوده شناسایی شدند. یافته‌های این مطالعه مشابه با نتایج تحقیق حاضر است که قارچ‌های *Mucor* و *Rhizopus* نیز در برخی از نمونه‌های آلوده شترها مشاهده شدند، اگرچه درصد آلودگی این قارچ‌ها در مطالعه حاضر کمتر بود. در کشورهای دیگر همچون آمریکا و کشورهای اروپایی، مطالعات گسترده‌ای بر روی فلور قارچی چشم دام‌ها انجام شده است. به‌عنوان مثال، تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ در ایالات متحده بر روی چشم سگ‌ها انجام شد، نشان داد که قارچ‌های *Aspergillus* و *Candida* به‌عنوان قارچ‌های غالب شناسایی شدند (۱۹). این مطالعه نشان‌دهنده نقش بالقوه قارچ‌های *Candida* در عفونت‌های چشمی حیوانات خانگی است، که این نتایج با مطالعه حاضر که هیچ‌گونه قارچ *Candida* شناسایی نکرد، تفاوت دارد.

عوامل مؤثر بر آلودگی قارچی در شترها

شرایط جغرافیایی و اقلیمی: شرایط جغرافیایی و اقلیمی منطقه‌ای که دام‌ها در آن زندگی می‌کنند، یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر نوع و میزان آلودگی قارچی است. منطقه زابل که دارای آب و هوای گرم، خشک و گرد و غبار زیاد است، می‌تواند شرایط مناسبی برای رشد قارچ‌هایی مانند *Aspergillus fumigatus* فراهم کند. به‌ویژه طوفان‌های موسمی که در این منطقه رخ می‌دهند، می‌توانند قارچ‌ها را از محیط‌های دیگر به چشم شترها منتقل کنند و باعث ایجاد عفونت‌های چشمی شوند (۲۰).

بودن *Aspergillus fumigatus* در ملتحمه چشم دام‌ها در مناطق مختلف ایران است. با این حال، یک تفاوت قابل توجه در این دو تحقیق وجود دارد که درصد آلودگی به قارچ‌ها در جمعیت‌های مختلف از جمله جنس و سن دام‌ها است. در مطالعه عراقی سوره و سودی، میزان آلودگی در گاوهای مسن‌تر و گاوهای نر به‌طور معنی‌داری بیشتر بود که این مورد در تحقیق حاضر مشاهده نشد و هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میزان آلودگی بر اساس سن و جنس شترها مشاهده نگردید (۱۷).

در تحقیقی دیگر که توسط خسروی و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی شترهای یک‌کوهانه در ایران انجام شد، به شناسایی قارچ‌هایی همچون *Cladosporium* و *Candida* پرداخته شد که این دو قارچ به‌عنوان قارچ‌های غالب شناسایی شده‌اند (۸). اما در مطالعه حاضر، *Cladosporium* تنها در شترهای ماده با درصد بسیار پایین شناسایی شد و هیچ‌گونه کشت قارچی از جنس *Candida* به دست نیامد. این تفاوت‌ها در میزان و نوع قارچ‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت‌های اقلیمی، جغرافیایی و شرایط محیطی باشد. به‌عنوان مثال، شرایط گرم و خشک منطقه زابل، به‌ویژه با وجود طوفان‌های موسمی و گرد و غبار زیاد، می‌تواند موجب افزایش آلودگی قارچی در این منطقه شود. این شرایط ممکن است برای رشد قارچ‌های خاصی مانند *Aspergillus fumigatus* مناسب‌تر باشد و قارچ‌های دیگر مانند *Candida* و *Cladosporium* در این شرایط کمتر به‌طور طبیعی رشد کنند.

در سطح بین‌المللی، مطالعات بسیاری در زمینه شناسایی و بررسی قارچ‌های موجود در ملتحمه چشم دام‌ها انجام شده است. یکی از مطالعات مهم در این زمینه، تحقیقی است که در سال ۲۰۱۵ در هند بر روی فلور قارچی چشم گاوها انجام شد. در این تحقیق، محققان گزارش کردند که قارچ‌های *Aspergillus* و *Penicillium* به‌عنوان قارچ‌های غالب در چشم گاوها شناسایی شدند (۱۸). این یافته مشابه با نتایج تحقیق حاضر است، زیرا در مطالعه ما نیز *Aspergillus fumigatus* و *Penicillium* از

نتایج تحقیق تأثیرگذار باشد. در تحقیق حاضر، از روش‌های استاندارد کشت قارچ‌ها استفاده شده است، اما روش‌های مختلف می‌توانند باعث تفاوت‌هایی در شناسایی انواع قارچ‌ها شوند. به‌عنوان مثال، برخی از قارچ‌ها ممکن است به‌طور طبیعی در نمونه‌ها رشد نکنند یا به‌خاطر شرایط خاص محیطی، قادر به رشد نباشند.

مطالعه حاضر به شناسایی و گزارش جدایه‌های قارچی در ملتحمه چشم شترهای شهرستان زابل پرداخته است. نتایج نشان‌دهنده غالب بودن قارچ‌های *Aspergillus fumigatus* و *Penicillium* در این منطقه است. این یافته‌ها با مطالعات پیشین در ایران و سایر کشورها مشابه هستند، اما در عین حال تفاوت‌هایی نیز در نوع و میزان آلودگی‌ها وجود دارد که به‌ویژه به شرایط اقلیمی، جغرافیایی و نوع دام بستگی دارد. این تحقیق نشان می‌دهد که توجه به شرایط محیطی و بهداشتی در پیشگیری و درمان عفونت‌های چشمی قارچی در شترها از اهمیت بالایی برخوردار است و نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه احساس می‌شود.

References

- 1- El-Gayoum S. Studies on the mechanism of resistance to camel diseases: Dissertation, Goenttigen. 1986.
- 2- Gionfriddo JR, Gabal MA, Betts DM. Fungal flora of the healthy camelid conjunctival sac. *Am J Vet Res.* 1992; 53(5): 643-5.
- 3- Miller PE, Murphy CJ. Equine vision: normal and abnormal. *Equine Ophthalmol.* 2005; 371-408.
- 4- Tahoun A, Elnafarawy HK, Elmahallawy EK, Abdelhady A, Rizk AM, El-Sharkawy H, et al. Epidemiological and molecular investigation of ocular fungal infection in equine from Egypt. *Vet Sci.* 2020; 7(3): 130.
- 5- Awad R, Ghaith AA, Awad K, Mamdouh Saad M, Elmasyry AA. Fungal keratitis: diagnosis, management, and recent advances. *Clin Ophthalmol.* 2024; 18: 85-106.
- 6- Sousa MED, Araújo MAdS, Mota RA, Porto WJN, Souza AKP, Santos JLD, et al. Fungal microbiota from ocular conjunctiva of clinically

نوع دام و ویژگی‌های فیزیولوژیکی: نوع دام و ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن نیز می‌تواند بر میزان و نوع آلودگی قارچی تأثیر بگذارد. شترها به‌دلیل زندگی در مناطق بیابانی و مواجهه با گرد و غبار زیاد، ممکن است به‌طور طبیعی بیشتر از دیگر دام‌ها در معرض آلودگی قارچی قرار گیرند. این در حالی است که سایر دام‌ها مانند گاوها و اسب‌ها به‌دلیل زندگی در شرایط متفاوت، ممکن است به‌طور متفاوتی به قارچ‌ها آلوده شوند (۲۱).

شرایط بهداشتی و تغذیه‌ای: شرایط بهداشتی و تغذیه‌ای نیز می‌تواند نقش مهمی در میزان آلودگی قارچی داشته باشد. تغذیه با گیاهان خشک و خاردار در مناطق بیابانی می‌تواند باعث آسیب به ملتحمه چشم شترها شود و شرایط را برای رشد قارچ‌های بیماری‌زا فراهم کند. به‌علاوه، استفاده از منابع آبی آلوده به قارچ‌ها یا وجود قارچ‌ها در محیط‌های نگهداری دام‌ها می‌تواند به افزایش میزان آلودگی کمک کند.

روش‌های نمونه‌برداری و کشت: تفاوت در روش‌های نمونه‌برداری و کشت قارچ‌ها نیز می‌تواند بر

healthy horses belonging to the Military Police Cavalry of Alagoas. *Braz J Microbiol.* 2011; 42: 1151-5.

7- Czerwinski SL. Ocular surface disease in New World camelids. *Vet Clin Exot Anim Pract.* 2019; 22(1): 69-79.

8- Khosravi A, Shokri H, Sharifzadeh A. Fungal flora of the eye and nose of healthy dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Iran. *J Camel Pract Res.* 2009; 16: 63-7. [In Persian]

9- Zhu S, Zimmerman D, Deem SL. A review of zoonotic pathogens of dromedary camels. *Eco-health.* 2019; 16(2): 356-77.

10- Khosravi A, Nikaein D, Sharifzadeh A, Gharagozlou F. Ocular fungal flora from healthy horses in Iran. *J Mycol Med.* 2014; 24(1): 29-33. [In Persian]

11- Dutta D, Stapleton F, Willcox M. Ocular surface infection and antimicrobials. *Antibiotics (Basel).* 2022; 11(11): 1496.

12- Scaglione FE, Peano A, Piga S, Meda S,

Bollo E, Cannizzo FT, et al. Scrotal granulomatous aspergillosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *BMC Vet Res*. 2017; 13(1): 79.

13- Korenek NL, Legendre AM, Andrews FM, Blackford JT, Wan PY, Breider MA, et al. Treatment of mycotic rhinitis with itraconazole in 3 horses. *J Vet Intern Med*. 2008; 8: 224-7.

14- Barsotti G, Sgorbini M, Nardoni S, Cozza M, Mancianti F. Occurrence of fungi from conjunctiva of healthy horses in Tuscany, Italy. *Vet Res Commun*. 2006; 30: 903-6.

15- Nouri T, Soreh A. A study on the fungal flora of the healthy ocular surface in native cattle of Iran. *Vet Clin Pathol*. 2014; 8(3): 596-602. [In Persian]

16- Soreh A. Identification of the fungal flora in the conjunctival fornix of equids (horses and mules) in the Urmia region. *Vet Clin Pathol*. 2013; 7(1): 1736-43. [In Persian]

17- Soodi SA. Isolation and identification of conjunctival fungal flora in healthy Holstein cattle in the Urmia region. *Vet Clin Pathol*. 2017; 11(2): 115-21. [In Persian]

18- Tuteja F, Dahiya S, Narnaware S. Prevalence of bacterial and fungal diseases in dromedary camels in the Rajasthan state of India. 2015.

19- Harrington BJ, Lappin MR, O'Dwyer M, et al. Canine Keratomycosis in 11 Dogs: A Case Series (2000-2011). *J Am Anim Hosp Assoc*. 2014; 50(2): 122-128.

20- Thew MR, Todd B. Fungal keratitis in far north Queensland, Australia. *Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 36(8): 721-4.

21- Mo PM, Picard J, Gummow B. The conjunctival fungal microflora of horses in a North Queensland tropical environment and their in vitro susceptibilities to antifungal agents. *Vet Res Commun*. 2023; 47(3): 1641-51.



Investigation of Fungal Species Diversity Causing Ocular Infections in Camels in the Zabol Region and Its Relation to Age and Gender: The Role of Climatic Conditions in the Prevalence of Eye Infections


Sohrab Sarbezi Rudi¹, Ali Sarani^{2*}, Mehdi Rasekh³

1- Post graduate student, Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, University of zabol, zabol, Iran.

2- Assistant Professor, Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, University of zabol, zabol, Iran.

3- Associate Professor, Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, University of zabol, zabol, Iran.

Receive: July 31, 2024; Revise: August 8, 2024; Accept: August 9, 2024

 10.22034/nfvm.2024.487242.1263

Summary

Camels, as a valuable source of protein and labor in arid and semi-arid regions, hold significant importance. Considering their key role in the economy and livelihood of local communities, examining the health of these animals is crucial. In this study, aimed at investigating the diversity and prevalence of fungal species causing ocular infections in camels in the Zabol region, samples were randomly collected from 50 camels. The collected samples were cultured on specialized media, and the fungal species present were identified. The results showed that 88% of camels (n=44) harbored at least one fungal species, with *Aspergillus fumigatus* as the most prevalent, found in 11 cases (22%), followed by *Penicillium* in 9 cases (18%), *Aspergillus flavus* in 8 cases (16%), *Mucor* in 6 cases (12%), *Aspergillus niger* and *Rhizopus* in 3 cases each (6%), *Cladosporium* in 2 cases (4%), and *Absidia* and *Trichophyton* in 1 case each (2%). According to the study results, infection rates were higher in camels over 2 years of age (68.18%). Statistical analysis showed no significant relationship between age or gender and the prevalence rate of isolated fungi ($p>0.5$). Additionally, while male camels exhibited a higher rate of fungal isolates than females, this difference was not statistically significant ($P=0.11$). The findings suggest that the unique climatic conditions of the region may contribute to the prevalence of ocular fungal infections, especially in desert-dwelling animals.

Keywords: *fungal flora isolates, conjunctiva, camel, Zabol*



بررسی دو روش کروماتوگرافی تلفیقی و کروماتوگرافی افینیتی برای خالص سازی آلفا توکسین باکتری کلاستریدیوم پرفرژنس تیپ A

زهرا حشمتی^۱، محسن فتحی نجفی^{۲*}، غلامحسین رونقی^۱، محمود ابراهیمی^۱

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

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

دریافت مقاله: ۸ اسفند ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۰ فروردین ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۱ فروردین ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.445263.1229

چکیده

آلفا توکسین یا فسفولیپاز C (PLC) توسط باکتری کلاستریدیوم پرفرژنس تولید می گردد و خواص کشنده در مونوکرتیک را دارا می باشد. تمامی سویه های کلاستریدیوم قادر به تولید این توکسین می باشند که در توسعه میونکروز کلاستریدی نقش بسزایی را ایفا می کنند. آلفا توکسین باعث بروز علائم در انسان و دام می گردد و تأثیرات کشنده بر سیستم روده ای را نشان می دهد. در این تحقیق سعی بر آن خواهیم داشت که روش های متفاوت خالص سازی و استخراج آلفا توکسین کلاستریدیوم پرفرژنس تیپ A را با هم مقایسه نماییم. روش اول شامل خالص سازی آلفا توکسین با استفاده از تکنیک های ترکیبی کروماتوگرافی شامل رسوب دهی سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی تبادل یون با استفاده از DEAE- Sephadex در مقادیر ۷ و ۹ pH و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با استفاده از Sephadex G-100 بود، روش دوم مبتنی بر استفاده از کروماتوگرافی افینیتی اجرا گردید. درجه خلوص توکسین آلفا در هر مرحله از فرآیند خالص سازی با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی گردید. با بررسی نتایج حاصل از دو روش فوق نتایج زیر حاصل گردید. بازدهی روش اول ۸۸ درصد و بازده روش دوم ۹۱/۷ درصد بود. مقادیر فعالیت ویژه برای روش اول و دوم به ترتیب ۶۹۱۷۰ U/mg و ۱۰۵/۷۱ U/mg محاسبه گردید. نتایج نشان داد که از روش کروماتوگرافی افینیتی می توان برای خالص سازی آلفا توکسین تولید شده از کلاستریدیوم پرفرژنس تیپ A با خلوص بالا و نسبت فعالیت به مقدار پروتئین (HU/mg) ۱۰۸۷۰۰ استفاده گردد.

واژگان کلیدی: آلفا توکسین، کلاستریدیوم پرفرژنس تیپ A، فعالیت آنزیمی، کروماتوگرافی افینیتی، کروماتوگرافی ستونی

مقدمه

کلستریدیوم پرفرنزوس یک باکتری گرم مثبت بی‌هواری است که قادر به تشکیل اسپور می‌باشد. این باکتری در محیط‌های گسترده‌ای مثل خاک، آب، فاضلاب و معمولاً در روده‌ی حیوانات و انسان‌ها حضور دارد که در شرایط خاصی می‌تواند بیماری‌زا باشد (۱). این باکتری در انسان منجر به بیماری قانقاریا و بیماری‌هایی مثل مسمومیت غذایی و آنتریت نکروتیک می‌شود در حالی که در سایر جانوران بیماری‌های روده‌ای و انتروتاکسمیک را بیشتر ایجاد می‌کند. کلستریدیوم پرفرنزوس به سلول‌های سالم هجوم نبرده بلکه توکسین‌ها و آنزیم‌های متعددی تولید می‌کند که مسئول زخم‌ها و علائم بیماری می‌باشند. توکسین‌های تولید شده بستگی به سویه‌ی کلستریدیوم پرفرنزوس دارد و هر نوع توکسین سندروم خاصی را ایجاد می‌کند (۲). بنابراین، تشخیص صحیح نوع سویه کلستریدیوم پرفرنزوس در مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین در اجرای اقدامات پیشگیرنده‌ی مؤثر مثل واکسیناسیون بسیار حیاتی است. سویه‌های این باکتری بر اساس تولید ۴ توکسین اصلی (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) به ۵ ایزوتایپ (A, B, C, D, E) تقسیم می‌شوند (۳). نوع مورد مطالعه در این تحقیق آلفا توکسین بوده است که توکسین آلفا از کلستریدیوم پرفرنزوس تیپ A تولید می‌شود، یک متالوفسفولیپاز است که سبب مسمومیت غذایی می‌شود و مشخصه آن اسهال، ناراحتی شکمی یا حتی مرگ است. با توجه به کاربرد آلفا توکسین در طراحی و تولید کیت تشخیص بیماری آنتیت نکروتیک خالص‌سازی این محصول دارای اهمیت تشخیصی بالایی می‌باشد.

رسوب‌دهی با نمک، دیالیز، استخراج حلال آلی، الکتروفورز و کروماتوگرافی برخی از روش‌های کلاسیک و متعارف مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین هستند. روش‌های کروماتوگرافی به دلیل اثربخشی آنها در اتصال انتخابی و حذف پروتئین‌های با خلوص بالا، به‌طور گسترده‌ای در تحقیقات علمی و کاربردهای صنعتی استفاده می‌شود (۴). کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی

لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی ستونی، کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی افینیتی و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) تنها برخی از تکنیک‌های کروماتوگرافی را نشان می‌دهند (۵). در صنعت، برای استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، از ستون‌هایی با سرعت بالا به دلیل توانایی آنها در حفظ تعادل و شستشوی نمونه‌ها استفاده می‌شود (۶). اصول اصلی کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) میل ترکیبی فاز ساکن کروماتوگرافی است (۵).

در این مطالعه، کروماتوگرافی تلفیقی (رسوب‌دهی با نمک آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی تعویض یونی (pH ۷-۹) و کروماتوگرافی ستونی) را با کروماتوگرافی افینیتی برای خالص‌سازی آلفاتوکسین مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم و رشد: کلستریدیوم پرفرنزوس تیپ A از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی واحد مشهد تهیه گردید. این باکتری به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت غنی جگر رشد داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در محیط پپتون گوشت برای تولید توکسین درون انکوباسیون بی‌هواری قرار داده شد، و در مرحله بعد محلول کشت سانترفیوژ شد، از محلول رویی برای مراحل خالص‌سازی استفاده شد. فعالیت همولیزی و غلظت پروتئین در تمامی مراحل اندازه‌گیری شد. سپس محلول رویی کشت به دو قسمت تقسیم گردید تا در دو روش خالص‌سازی استفاده گردد.

آزمون همولیز کمی: یک میلی‌لیتر خون در دور (۱۳۰۰ rpm) به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شده رسوب (گلوبول قرمز) با دو برابر حجم اولیه محلول بافر PBS شستشو داده شد و به آن ۱۰ برابر PBS اضافه گردید.

۰/۲ میلی‌لیتر نمونه را با ۱ میلی‌لیتر RBC به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور قرار دادیم و در دور (۲۰۰۰g) به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ انجام شد و جذب محلول رویی در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

سانتریفوژ کردیم. جذب محلول رویی را در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری نموده. طول موج‌های به‌دست آمده بایستی مابین کنترل مثبت و منفی باشند. سپس فعالیت آنزیمی را برای نمونه محاسبه و نمودار آن را رسم کردیم. فعالیت آنزیمی به معنای آن مقدار آنزیمی که قادر است در واحد زمان یک درصد خون را لیز کند.

$$\text{محاسبه درصد همولیز} : 100 \times \frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل مثبت}} = \text{همولیز \%}$$

خالص سازی آلفا توکسین روش اول: روش اول برای خالص‌سازی آلفا توکسین در چهار مرحله، شامل رسوب‌دهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی تعویض یونی در دو بازه‌ی pH (۷، ۹) و کروماتوگرافی ستونی انجام شد (مراحل در زیر توضیح داده شده است). بعد از هر مرحله، مقدار پروتئین و فعالیت آن با توجه به روش‌هایی که در قسمت‌های قبلی توضیح داده شد، تعیین گردید. علاوه بر این، حضور آلفا توکسین در هر مرحله با استفاده از الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شد.

رسوب‌دهی آمونیوم سولفات: به محتوای سوپرناتانت کشت باکتری آمونیوم سولفات ۷۰ درصد کم‌کم اضافه شد. ارلن حاوی سوپرناتانت محیط کشت را در محیط سرد روی همزن قرار داده و کم‌کم آمونیوم سولفات به آن اضافه گردید. سپس به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. روز بعد محتوای ارلن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب پروتئینی در مقداری بافر تریس (۲۰ میلی‌مولار، pH، ۷) حل گردید، با کمک روش برادفورد غلظت پروتئین، با آزمون همولایزین کیفی و کمی میزان فعالیت، مورد سنجش قرار گرفت.

کروماتوگرافی تعویض یونی: در این روش ستونی با رزین DEAE-cellulose پر شد و با کمک سیستم بافری تنظیم pH شد. سپس نمونه را به ستون اضافه و

کنترل مثبت واکنش: ۰/۲ میلی‌لیتر PBS را با ۱ میلی‌لیتر RBC به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ کردیم و رسوب را با ۱/۲ میلی‌لیتر آب مخلوط و جذب در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

کنترل منفی واکنش: ۰/۲ میلی‌لیتر PBS را با ۱ میلی‌لیتر RBC به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و در دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه

سنجش مقدار پروتئین (روش برادفورد): به‌منظور بررسی مقدار کمی پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. این روش علاوه بر اینکه روش دقیق و سریع می‌باشد، ترکیبات غیر پروتئینی نیز به میزان کمتری در آن تداخل ایجاد می‌کنند. این روش بر پایه اتصال رنگ کوماسی بلو G250 به پروتئین عمل می‌نماید. استفاده از بلانک حاوی بافر مورد استفاده در این روش به علت اینکه نقطه صفر را روی منحنی استاندارد مشخص می‌کند دارای اهمیت زیادی خواهد بود (۷).

برای هر کدام از نمونه‌های پروتئینی با غلظت مشخص (تهیه شده از آلبومین سرم گاوی) یک آزمون برادفورد انجام گردید که به‌صورت زیر عمل شد:

شاهد: ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد +۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه

نمونه: ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد +۱۰۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی (BSA) و آب به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا اسپکتروفتومتر را در طول موج ۵۹۵ نانومتر تنظیم کرده و سپس دستگاه با محلول بلانک صفر گردید جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. در نهایت با استفاده از برنامه اکسل نمودار رسم گردید و از این نمودار به‌عنوان یک نمودار استاندارد برای تعیین غلظت پروتئین در تمامی مراحل استفاده شد.

اجازه داده شد تا رزین و نمونه به خوبی با هم واکنش دهند. پس از آن با دو بافر طی چند مرحله شستشو داده شد. با بافر اولیه بیشترین چسبندگی پروتئین را ایجاد و با بافر دومی که در غلظت‌های مختلف نمکی ساخته شده‌اند، تمامی پروتئین‌های چسبیده به ستون جدا شدند، جذب نمونه‌های خروجی در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. روی تمامی نمونه‌ها آزمون همولیز صورت گرفت. در این خالص‌سازی انجام شده دو بار ستون با رزین DEAE-cellulose پر شد یک‌بار در pH=۷ و خروجی انتخابی از این مرحله را به pH=۹ رسانده و به ستونی که با رزین DEAE-cellulose با pH=۹ پر شده است تزریق نموده، بر روی تمامی خروجی‌ها آزمون‌های میزان فعالیت و تعیین مقدار پروتئین انجام شد و بهترین خروجی را انتخاب و آن را با آمونیوم سولفات رسوب‌دهی و تغلیظ گردید. در مرحله بعد محلول غلیظ شده را وارد ستون ژل فیلتراسیون کردیم.

کروماتوگرافی ستونی: در این روش در ستونی به ارتفاع ۱۱۵ cm و قطر داخلی ۱/۵ سانتی‌متر که با رزین سفادکس G100 به تعادل رسید انجام گردید. عمل متعادل‌سازی رزین با بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار در pH=۶ انجام شد. جذب نمونه‌های خروجی را در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی و بر روی خروجی‌های دارای جذب، آزمون برادفورد انجام شد.

روش دوم خالص‌سازی: در روش دوم خالص‌سازی محلول رویی سانتریفیوژ شده پس از سنجش تعیین میزان فعالیت و مقدار پروتئین، با استفاده از روش کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) خالص‌سازی گردید و در پایان کار نیز میزان فعالیت و مقدار پروتئین تعیین شد. همچنین آلفا توکسین با استفاده از ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد ردیابی شد.

کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی): در این بررسی از لسیتین به‌عنوان فاز ساکن استفاده شد و آن را

با بافر تریس ۷ pH= به تعادل رساندیم سپس ۲۵ میلی‌لیتر از محلول رویی را که قبلاً سانتریفیوژ کرده و حاوی پروتئین کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A اضافه نموده، به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب سرد برای اتصال پروتئین مورد نظر به لیگاند (لسیتین) قرار دادیم.

سپس به مدت زمان ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. برای خالص‌سازی کامل ناخالصی‌ها این عمل دو بار انجام شد. در مرحله آخر جهت جداسازی پروتئین هدف از فاز ساکن (لسیتین) به آن ۵ میلی‌لیتر بافر در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید این عمل نیز دو بار تکرار شد.

الکتروفورز SDS-PAGE: به‌منظور تعیین خلوص میزان توکسین و همچنین کنترل روند صحیح خالص‌سازی از الکتروفورز استفاده گردید. بدین صورت که نمونه‌ی به‌دست آمده از هر مرحله توسط الکتروفورز بررسی گردید. ابتدا از ژل پلی‌اکریل آمید- سدیم دی‌دوسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲/۵ درصد و سپس رنگ‌آمیزی نیرات قره استفاده شد.

نتایج

میکروارگانیزم و رشد: با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE و سنجش سمیت سلولی، آلفا توکسین در مرحله اولیه رشد باکتری تشخیص داده شد. نتایج حاصل بیانگر این مطلب بود که آلفا توکسین ماندگاری پایینی دارد و نگهداری طولانی مدت نقش مهمی در غیر فعال کردن آلفا توکسین دارد.

خالص‌سازی آلفا توکسین: نتایج حاصل از مقایسه خواص فیزیکی و شیمیایی بکار برده شده خالص‌سازی آلفا توکسین با دور روش مختلف انجام شد و شرایط خالص‌سازی در جدول (۱) مقایسه و خلاصه شد.

جدول ۱- شرایط خالص سازی آلفا توکسین

مرحله	pH	زمان (h)	دما (C°)
سفادکس-pH7,DEAE	۷	۱	۲۵
سفادکس-pH9,DEAE	۹	۱	۲۵
سفادکس-G100	۶	۳	۲۵
کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی)	۷	۱	۴

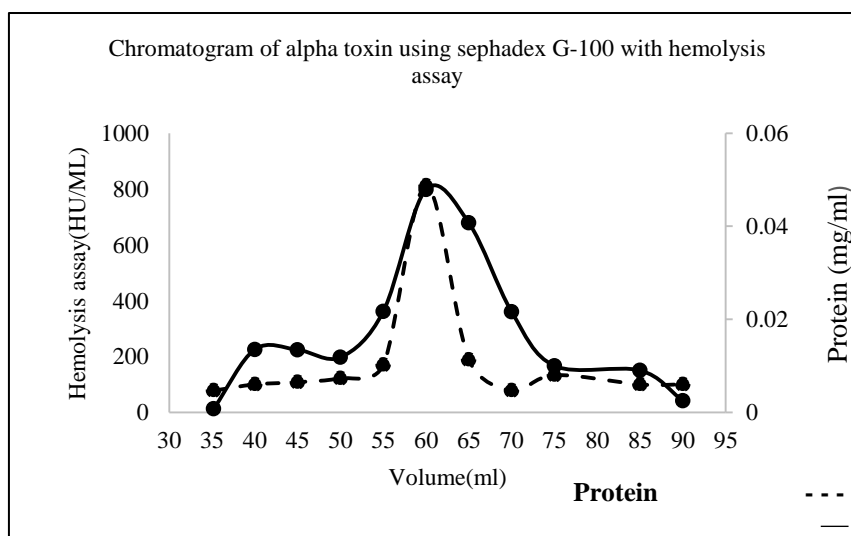
روش اول خالص سازی (کروماتوگرافی ترکیبی):

پس از بهینه سازی محیط کشت، باکتری در حجم انبوه کشت داده شد. برای خالص سازی توکسین آلفا از روش‌های: رسوبدهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی تعویض یونی در دو (pH= ۹ ، pH= ۷) و کروماتوگرافی ستونی G100 به طور پیوسته استفاده شد. نتایج حاصل خالص سازی در جدول (۲) گردآوری شد. نسبت خالص سازی در مرحله رسوبدهی با نمک آمونیوم

سولفات ۱ در نظر گرفته شد، پس از خالص سازی با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی نسبت خالص سازی به ۲۲۸/۳ و بازده آنزیمی ۸۹/۷٪ رسید. سرانجام پروتئین خالص شده از مرحله کروماتوگرافی ستونی G100 با نسبت فعالیت به پروتئین (U/mg) ۶۹۱۷۰ و سرعت خالص سازی ۶۵۴ و بازدهی ۸۸٪ به دست آمد. نتایج خالص سازی در هر مرحله در جدول ۲ گردآوری شده است.

جدول ۲- مراحل خالص سازی کلاستریدیوم پرفرژتس تیپ A (روش اول)

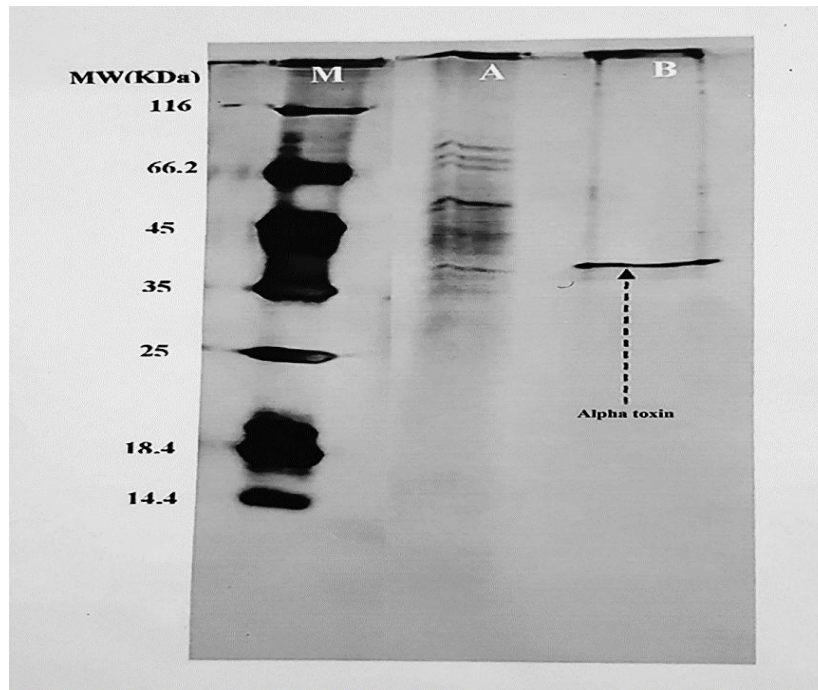
مرحله	پروتئین کل (mg/ml)	فعالیت کل U(HU/mg)	نسبت فعالیت به پروتئین (U/mg)	ضریب خالص سازی	بازده %
کشت	۵۶۰	۵۹۲۰۰	۱۰۵/۷۱	۱	۱۰۰
آمونیم سولفات	۵۴۶	۵۸۵۹۶	۱۰۷/۱	۱/۰۱	۹۸,۹۷
(pH۷) کروماتوگرافی تعویض یونی	۲/۲۵	۵۴۷۰۰	۲۴۳/۱	۲۳۰	۹۲,۴
(pH۹) کروماتوگرافی تعویض یونی	۲/۲	۵۳۱۰۳	۵۴۱۳۸	۲۲۸,۳	۸۹/۷۱
کروماتوگرافی ستونی	۰/۷۲	۵۱۹۷۰	۶۹۱۷۰	۶۵۴	۸۸



شکل ۱- خالص سازی آلفا توکسین با کروماتوگرافی ستونی سفادکس G100

جذب در ۲۸۰ و ۵۷۰ nm قابل مشاهده است. همچنین توکسین آلفا خالص‌شده تک‌باند از این خروجی با وزن مولکولی ۴۳KD در شکل (۲) قابل مشاهده است.

خروجی به‌دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی در مرحله بعد به ستون کروماتوگرافی (سفادکس G100) تزریق شد و نتایج حاصل در شکل (۱) نشان داده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در حجم ۶۰ ml یک پیک



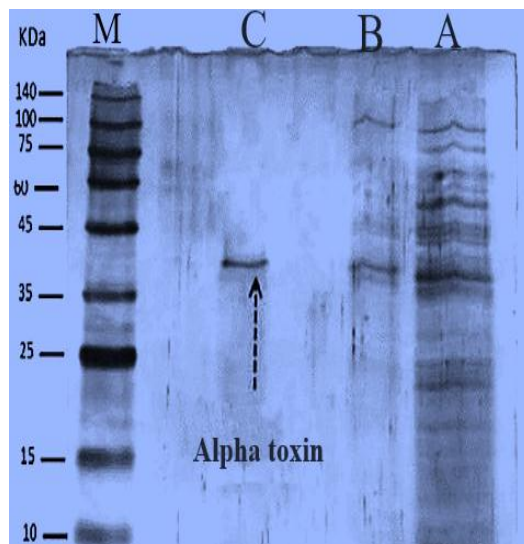
شکل ۲- ژل اکریل آمید ۵/۱۲٪ می‌باشد که ترتیب نمونه‌ها از چپ به راست، M - مارکر (۱۴،۴-۱۱۶ کیلودالتون)، A، رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات، B - کروماتوگرافی ستونی

همگن با بازده ۹۱/۷٪، ۱۰۲۸ برابر خالص‌سازی و فعالیت ویژه ۱۰۸۷۰۰ U/mg خالص شد. آلفا توکسین به‌صورت یک نوار در SDS-PAGE رؤیت شد، شکل (۳). همان‌طور که در SDS-PAGE نشان داده شده است آلفا توکسین استخراج شده از کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A افینیتی (جذب سطحی) در یک مرحله به خلوص بالا رسیده است.

روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی افینیتی):
آلفا توکسین با استفاده از کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با اتصال آلفا توکسین به لسیتین (سوبسترا) خالص گردید. در این روش ناخالصی‌ها حذف و آلفا توکسین در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد از بستر جدا شد. و در نهایت، آلفا توکسین

جدول ۳- خالص‌سازی کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A

مرحله	پروتئین کل (mg/ml)	فعالیت کل U(HU/mg)	نسبت فعالیت به پروتئین (U/mg)	ضریب خالص‌سازی	بازده %
کشت	۵۶۰	۵۹۲۰۰	۱۰۵/۷۱	۱	۱۰۰
کروماتوگرافی افینیتی	۰/۵	۵۴۳۵۰	۱۰۸۷۰۰	۱۰۲۸	۹۱/۷



شکل ۳- تجزیه و تحلیل دو روش خالص سازی؛ از سمت راست به چپ. A: سوپرناتانت آلفا توکسین. B: نمونه خروجی کروماتوگرافی ستونی. C: نمونه‌ی خروجی کروماتوگرافی افینیتی. M: مارکر

بحث و نتیجه گیری

کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A باعث بیماری گانگرن گازی در انسان‌ها می‌شود (۸). در ایجاد این بیماری ابتدا توکسین آلفا ترشح و سپس با مشارکت توکسین بتا و آنزیم‌های هیدرولیتیک باکتری باعث پیشرفت و وخیم شدن بیماری می‌شوند (۹). این سویه (Type A) در مسمومیت‌های غذایی هم دیده شده است (۲). آلفا توکسین (CPA) توسط همه‌ی سویه‌های کلستریدیوم پرفرژنس تولید می‌شود، البته سویه تیپ A مقادیر بیشتری از توکسین آلفا را نسبت به سایر تیپ‌های کلستریدیوم تولید می‌کنند. فسفولیپاز C (PLases C) یک مولکول دوقطبی است و دارای یک سر گروه فسفر و سر دیگر آن glycerophyll glycosylpyridine می‌باشد، بخش دوم آن مسئول کنترل فعالیت کاتالیکی آنزیم (توکسین آلفا) می‌باشد و خواص بخصوصی دارد از جمله آن خصوصیات می‌توان به نقطه ایزوالکتریک ($PI=5/4$) اشاره کرد. این خاصیت باعث شده که باکتری، آنزیمی (توکسین آلفا) را تولید کند که خاصیت کاتالیزی داشته باشد. از جمله باکتری‌هایی که ساختمان پروتئینی آنها، این خاصیت را داشته باشند می‌توان به باکتری‌های گرم مثبتی نظیر سویه‌های لیستریا، سویه‌های باسیل،

کلستریدیوم‌ها، ردکوکوس دریایی و استافیلوکوکوس زرد اشاره کرد (۱۰).

از آنجایی که توکسین آلفا باعث نکروز و مرگ می‌شود در این تحقیق، به بررسی روش‌های خالص سازی آلفا توکسین آن برای یافتن تکنیک‌هایی (نظیر واکسن) برای مقابله با آلفا توکسین پرداخته شده است. انتخاب روش خالص سازی مناسب بسیار اهمیت بالایی دارد، هرچند برخی از تلاش‌ها برای خالص سازی به خلوص بالا نرسیده است.

در این مطالعه، تلفیق دو روش کروماتوگرافی یونی و کروماتوگرافی ستونی برای خالص سازی آلفا توکسین استفاده گردید و نتایج حاصل با روش کروماتوگرافی افینیتی نسبت به فاکتورهای نظیر هزینه کمتر، سرعت بالاتر و سادگی روش نسبت به مطالعات دیگر مقایسه گردید. در کنار تمامی این فاکتورهای بیان شده مهم‌ترین فاکتور فعالیت توکسین می‌باشد که مورد توجه قرار گرفت. در سال ۲۰۱۴، Zayerzadeh و همکاران با استفاده از ترکیب چهار تکنیک کروماتوگرافی تبادل کاتیونی، رسوب دهی با نمک، ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تبادل آنیون به خالص سازی توکسین کلستریدیوم پرفرژنس پرداختند (۱۱). در سال ۲۰۱۲، فتحی نجفی و

همکارنش برای خالص‌سازی اپسیلون توکسین کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A از تلفیق مجموعه‌ای از تکنیک‌ها از جمله دیالیز، رسوب‌دهی با نمک آمونیوم سولفات و با استفاده از کروماتوگرافی آنیونی استفاده کردند (۱۲). در سال ۲۰۱۶، جانسون اریک و همکاران با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی موفق به خالص‌سازی نورو توکسین BoNT/A3 از کلستریدیوم بوتولینوم شدند (۱۳). در سال ۲۰۱۳ Sayadmanesh و همکارانش برای خالص‌سازی نورو توکسین بوتولین از کلستریدیوم بوتولینوم از روش کروماتوگرافی افینیتی (با استفاده از ستون نیکل) استفاده کردند (۱۴). در سال ۲۰۱۱، فتحی نجفی و همکاران با استفاده از رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) و سپس با استفاده از کروماتوگرافی ستونی آلفا توکسین باکتری کلستریدیوم نووی را خالص کردند (۱۵). در سال ۱۹۸۷ ادندال با استفاده از اولترافیلتراسیون و کروماتوگرافی ژل به خالص‌سازی آلفا توکسین از باکتری کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A پرداخت (۱۶). در سال ۱۹۷۶ مولبی و همکارانش از ترکیب چند تکنیک شامل DEAE-Sephadex، کروماتوگرافی Sephadex G-75 و متمرکزسازی ایزوالکتریک برای خالص‌سازی آلفا توکسین از کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A استفاده کردند (۱۷).

متأسفانه تحقیقات کمی راجع به خالص‌سازی آلفا توکسین از باکتری کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A صورت گرفته است. برای مثال: برای فعالیت آنزیمی در سال ۱۹۴۱ وان ۵۴٪ و اسمایس در سال ۱۹۷۴، ۵۶٪ نمونه خالص‌شده آلفا توکسین را به‌دست آوردند. در سال ۱۹۸۵، مک فارلن با انجام روش تغلیظ با آمونیوم سولفات (رسوب دهی با نمک) و سپس تزریق به ستون کروماتوگرافی فعالیت آنزیمی را بهبود بخشید (۱۸). در سال ۱۹۷۶ مولبی و همکارانش از ترکیب چند تکنیک شامل DEAE-Sephadex، کروماتوگرافی Sephadex G-75 و متمرکزسازی ایزوالکتریک برای خالص‌سازی آلفا توکسین از کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A استفاده کردند که به ضریب بازدهی ۲۰۰ و خلوص ۱۰/۴٪ آلفا توکسین

رسیدند (۱۷). در سال ۱۹۸۷ ادندال با استفاده از اولترافیلتراسیون و کروماتوگرافی ژل به خالص‌سازی آلفا توکسین از باکتری کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A پرداخت (۱۶). تولید و خالص‌سازی آلفا توکسین در ابتدای سال ۱۳۹۶ در مؤسسه رازی کلید خورده است. این تحقیقات با بررسی بر روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آلفا توکسین به‌منظور خالص‌سازی به روش ترکیبی رسوب‌دهی با نمک آمونیوم سولفات و همچنین استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی و ستونی صورت گرفته است. نتایج حاصل نشان‌دهنده خلوص ۸۸ درصد محصول نهایی بوده است. روش اول بر مبنای خالص‌سازی با نمک آمونیوم سولفات پایه‌گذاری شده بود ولی روش دوم بر پایه کروماتوگرافی تعویض یونی و ستونی به‌صورت تلفیقی انجام گرفته است. اصول کلی این روش بر پایه تعویض یونی می‌باشد که شامل دو مرحله کروماتوگرافی آنیونی در pH های مختلف به‌ترتیب ۷ و ۹ می‌باشد و در مرحله بعدی با تزریق نمونه‌ی خروجی از کروماتوگرافی آنیونی منجر به خالص‌سازی ۸۸ درصد آلفا توکسین گردیده است. نسبت فعالیت به مقدار پروتئین U/mg ۶۹۱۷۰ می‌باشد و بر طبق شواهد به‌دست‌آمده از SDS-PAGE باند مورد نظر در ۴۳ کیلو دالتون قرار گرفته است. در حالی که در روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی افینیتی)، تنها با یک مرحله خالص‌سازی نسبت فعالیت به پروتئین U/mg ۱۰۸۷۰۰ رسیده است. در مقایسه بین روش کروماتوگرافی افینیتی، درصد افینیتی در این تحقیق ۹۱/۷٪ می‌باشد. روش کروماتوگرافی افینیتی نسبت به روش اول دو مزیت عمده دارد: یکی هزینه کمتر و دیگری مراحل کمتر روش مورد استفاده و قابلیت تولید بیشتر توکسین در مقیاس صنعتی است. مطابق جدول (۱) روش کروماتوگرافی افینیتی از نظر دسترسی به مواد و هزینه انجام شده مقرون به‌صرفه است و مدت زمان خالص‌سازی در روش کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) یک دوم روش کروماتوگرافی تعویض یونی و یک سوم کروماتوگرافی ستونی می‌باشد. همچنین نسبت

نهایت تولید حجم بالاتر نسبت به سایر روش‌ها است.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد بابت تأمین منابع بیولوژیکی برای این مطالعه و کمک‌های آزمایشگاهی و فنی آنها کمال تشکر را داریم.

میزان فعالیت به مقدار پروتئین در روش کروماتوگرافی افینیتی نسبت به روش اول ۱/۵ برابر افزایش داشته است.

کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) یک روش کارآمد و مقرون به‌صرفه برای خالص‌سازی آلفا توکسین تولید شده از باکتری کستریدیوم پرفرژنس تیپ A از نظر خلوص بالا، زمان کمتر مورد نیاز برای خالص‌سازی و در

References

- 1- Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev*. 1991; 55(4): 621-48.
- 2- Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can Vet J*. 1980; 21(5): 141.
- 3- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLD, Pessoa Junior A. Purificação de toxinas produzidas por *Clostridium perfringens*: uma revisão. *Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo*. 2004; 40(2): 151-64.
- 4- Xiong N, Yu R, Chen T, Xue Y-P, Liu Z-Q, Zheng Y-GJJocB. Separation and purification of l- methionine from *E. coli* fermentation broth by macroporous resin chromatography. 2019; 1110: 108-15.
- 5- Coskun OJNcoI. Separation techniques: *Chromatography*. 2016; 156 (2): 3.
- 6- Gagnon PJJocA. Technology trends in antibody purification. 2012; 1221: 57-70.
- 7- Raine J, Clay JW. *Testamenta eboracensia: A selection of wills from the registry at York: The Society*. 1884.
- 8- Uzal F, Vidal J, McClane B, Gurjar A. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *The open toxinology journal*. 2010; 2: 24.
- 9- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLD, Pessoa Junior A. Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: a review. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2004. 40(2): 151-64.
- 10- Titball RW. *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine*. 2009; 27: D44-D7.
- 11- Zayerzadeh E, Fardipour A, Jabbari ARJJocMB. A new purification method for Beta-toxin of *Clostridium perfringens* type C Vaccinal strain. 2014; 3(3-4): 8-13. [In Persian]
- 12- Najafi MF. Purification of epsilon-toxin from vaccinal strain of *Clostridium perfringens* type D. 2012. [In Persian]
- 13- Johnson E, Tepp W, Lin G. Purification, characterization, and use of *Clostridium botulinum* neurotoxin BoNT/A3. Google Patents; 2016.
- 14- Sayadmanesh A, Ebrahimi F, Hajizade A, Rostamian M, Keshavarz HJIBJ. Expression and purification of neurotoxin-associated protein HA-33/A from *Clostridium botulinum* and evaluation of its antigenicity. 2013; 17(4): 165. [In Persian]
- 15- Fathi Najafi M, Hemmati M, Jabbari AR, Mehrvarz M, Aghaipour K. Purification and characterization of alpha-toxin from vaccinal strain of *Clostridium novyi*. 2011.
- 16- Odendaal M. Purification of the alpha toxin of *Clostridium perfringens* type A by ultrafiltration and gel chromatography. 1987.
- 17- Möllby R, Holme T, Nord C-E, Smyth C, Wadström TJM. Production of phospholipase C (alpha-toxin), haemolysins and lethal toxins by *Clostridium perfringens* types A to D. 1976; 96(1): 137-44.
- 18- Logan A, Williamson E, Titball R, Percival D, Shuttleworth A, Conlan J, et al. Epitope mapping of the alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. 1991; 59(12): 4338-42.



Comparative analysis between compound chromatography and affinity chromatography for the purification of Alpha toxin *C.perfringense* type A

Zahra Heshmati¹, Mohsen Fathi Najafi^{2*}, Gholam Hossein Ronaghi¹, Mahmood Ebrahimi¹

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

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

Receive: February 27, 2024; Revise: March 29, 2024; Accept: March 30, 2024

 10.22034/nfvm.2024.445263.1229

Summary

Alpha toxin, sometimes referred to as phospholipase C (PLC), is a significant toxin generated by *C. perfringens* that possesses both deadly and dermonecrotic properties. All strains (A, B, C, D, E) of *C. perfringens* generate varying quantities of this toxin, which is recognized as a key various factor in the development of clostridial myonecrosis. Alpha-toxin is known to significantly influence several human and animal disorders, exhibiting deleterious impacts, specifically on the intestinal system. The primary objective of this research was to conduct a comparative analysis of two distinct purification techniques in order to extract alpha-toxin from *C. perfringens* type A. The first approach involved the alpha-toxin purification through a series of techniques, including ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography using DEAE Sephadex at pH values of 7 and 9, and gel filtration chromatography using Sephadex G-100, while the second approach was implemented using the affinity chromatography. The degree of purity of alpha-toxin was assessed at each stage of the purification process by the utilization of SDS-PAGE. The protein content and hemolysis activity were also quantified at each purification step. Based on the obtained findings, examining these two approaches revealed that the first method yielded a percentage of 88, while the second method yielded percentage of 91.7. The specific activity values obtained from the calculations for the first and second methods were 69170 U/mg and 105.71 U/mg, respectively. Our research shows that affinity chromatography can produce a highly pure alpha toxin with a specific activity of 108700 (HU/mg), produced by *Clostridium perfringens* type A.

Keywords: Alpha-toxin, *Clostridium perfringens* type A, Enzymatic activity, Affinity chromatography, column chromatogr



تاثیر افزودن سطوح مختلف مکمل سلنیوم مخمر و نانوذرات سلنیوم بر جمعیت پروتوزوایی و غلظت آمونیاک شکمبه بره‌های نر پرواری بلوچی (بومی سیستان)

حسین انصاری نیک^۱، محمدرضا دهقانی^{۲*}، مصطفی یوسف‌الهی^۲، امیر موسائی^۳، احمد راشکی^۴، آرش امید^۵

- ۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.
- ۴- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۵- استاد، گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

دریافت مقاله: ۱۵ خرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۰ تیر ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۳ مرداد ۱۴۰۳

doi 10.22034/nfvm.2024.460687.1245

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تأثیر مکمل نانوسلنیوم و سلنیوم-مخمر بر جمعیت جنس‌های مختلف پروتوزوآ و غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از ۳۰ رأس بره نر بلوچی با میانگین وزن اولیه $21/56 \pm 0/33$ کیلوگرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۶ تکرار به مدت ۷۰ روز (۱۴ روز عادت‌پذیری و ۵۶ روز آزمایش) انجام شد. گروه‌های آزمایشی شامل (۱) شاهد (جیره فاقد مکمل سلنیوم)، ۲، ۳ و ۴) به ترتیب تغذیه با ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم از منبع سلنیوم-مخمر و (۵) تغذیه با ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم از مکمل نانوسلنیوم بودند. نتایج نشان داد که تعداد پروتوزوآ در گروه‌های دریافت کننده ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم از منبع سلنیوم-مخمر و ۰/۴ میلی‌گرم به شکل نانوسلنیوم، بیشتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). هر دو منبع سلنیوم مخمر و نانوسلنیوم باعث افزایش گونه افریواسکولکس شدند، در حالی که تنها تیمار نانوسلنیوم تعداد پروتوزوآی داسیتريشای بیشتری در مقایسه با شاهد داشت ($P < 0/05$). همچنین، افزودن ۰/۸ میلی‌گرم سلنیوم از سلنیوم-مخمر و ۰/۴ میلی‌گرم از نانوسلنیوم سبب افزایش تعداد گونه دیپلودینیوم شد ($P < 0/05$). با وجود این، گونه‌های انتودینیوم و ایزوتریشا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. میزان نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در تیمارهای ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم (سلنیوم-مخمر) و ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم به صورت نانو سلنیوم کمتر از گروه شاهد بود. نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن مکمل سلنیوم به شکل نانو سلنیوم و سلنیوم-مخمر می‌تواند سبب افزایش جمعیت پروتوزوآ و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه بره‌های پرواری بلوچی شود.

واژگان کلیدی: بره پرواری، پروتوزوآ، سلنیوم، مخمر

مقدمه

مواد معدنی نقش مهمی در فعال‌سازی آنزیم‌ها، حفظ تعادل یونی، تنظیم واکنش‌های شیمیایی درون سلولی و کمک به حفظ ساختار اسکلتی دارند، بنابراین هرگونه کمبود مواد معدنی باعث اختلال در رشد، تولید مثل و سلامت حیوانات می‌شود (۱۸). در میان عناصر کمیاب، عنصر سلنیوم از اهمیت خاصی برخوردار است که برای سلامتی، ایمنی و عملکرد تولیدی بهینه حیوانات ضروری است (۲، ۲۳). در نشخوارکنندگان، جوامع میکروبی پیچیده و متنوعی در دستگاه گوارش به‌ویژه شکمبه وجود دارد. شکمبه محیطی مناسب برای جمعیت متراکم و متنوعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، پروتوزوا، قارچ‌ها و باکتریوفازها است. اکوسیستم میکروبی شکمبه نقش اساسی در سلامت و تغذیه حیوانات میزبان دارد (۱۲). جمعیت میکروبی توسط عوامل غیر زیستی و زیستی تعیین می‌شود که توسط شرایط محیطی و شبکه پیچیده‌ای از فعل و انفعالات میکروبی بین میکروارگانیسم‌های مختلف هدایت می‌شوند. میکروارگانیسم‌های یوکاریوت مانند پروتوزوا از گونه‌های مختلف، نقشی محوری در تنظیم جمعیت و عملکرد اکوسیستم میکروبی شکمبه و خصوصیات فیزیوشیمیایی آن دارند (۲۰). پروتوزوا حدود ۵۰ درصد از زیست توده میکروبی شکمبه را تشکیل می‌دهند (۵، ۲۵) و این موجودات متحرک در ابتدای تاریخ میکروبیولوژی شکمبه شناسایی شدند (۱۱). با وجود این واقعیت که پروتوزوا بخش بزرگی از زیست توده شکمبه را تشکیل می‌دهند، نقش آنها در تخمیر شکمبه و سهم آنها در متابولیسم و تغذیه میزبان هنوز موضوع بحث قابل توجهی است (۲۴). کاربردهای نانوذرات در زمینه‌های مختلف، به‌دلیل خواص منحصر به فردشان در مقایسه با مواد حجیم، چندین دهه است که یکی از موضوعات اصلی برای تحقیق و بررسی توسط پژوهشگران است. خواص فیزیوشیمیایی نانوذرات عناصری مانند سلنیوم به خوبی شناخته شده و به‌عنوان عوامل ضد سرطان و ضد میکروبی یا حامل‌ها غیر

فعال‌سازی و ریشه‌کن کردن باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ممکن است عمدتاً ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو در محیط باکتریایی باشد (۲۹).

سلنیوم آلی و نانوسلنیوم از طریق انتقال فعال، سلنیت از طریق انتقال غیرفعال و سلنات به‌واسطه ناقل‌های سدیم به‌صورت انتقال فعال جذب می‌شوند. سلنیوم دارای اثر حفاظتی بر پروتوزوای شکمبه است و موجب افزایش بقا و فعالیت آنها می‌شود (۹). Wilsdorf و همکاران در سال ۱۹۸۴ گزارش کردند که سلنیوم مقاومت و فعالیت پروتوزوای شکمبه را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، پروتوزوای می‌توانند بر وضعیت سلنیوم حیوانات اثر بگذارند (۴، ۸). در پژوهشی مشاهده شد که افزودن سلنیوم به جیره باعث افزایش جمعیت پروتوزوای مژکدار موجود در شکمبه می‌شود (۱۶، ۱۷). Wang و همکاران در سال ۲۰۰۹ کاهش نیتروژن آمونیاکی را با استفاده از مخمر سلنیوم در گاوهای شیری گزارش کردند. همچنین، ایشان بهینه رشد میکروبی در گاوهای شیری را با افزودن مقدار ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم به هر کیلوگرم جیره مشاهده کردند.

در پژوهشی گزارش شد که افزودن مکمل سلنیوم آلی تولید پروتئین میکروبی را در شکمبه دام افزایش داد (۲۷). به نظر می‌رسد چون سلنیوم می‌تواند اثرات مثبتی بر جمعیت میکروبی شکمبه و فعالیت آنها بگذارد (۲۲)، می‌تواند منجر به افزایش بازدهی نیتروژن آمونیاکی شود (۲۲).

بسته به عواملی مانند نوع و مقدار سلنیوم خاک، گونه گیاهی و غیره، غلظت سلنیوم در منابع خوراکی گیاهی مورد استفاده در جیره نشخوارکنندگان، به شدت متغیر است. بنابراین، غلظت سلنیوم جیره ممکن است ناکافی باشد و از آن جایی که جذب سلنیوم به‌ویژه از منابع معدنی در نشخوارکنندگان (۳۴ درصد) کمتر از حیوانات تک معده‌ای (۸۵ درصد) است (۲۷)، کمبود سلنیوم می‌تواند تولید را کاهش داده و سلامت دام را به خطر بیندازد (۲۱). با توجه به جذب پایین سلنیوم در دستگاه

مخمر و ۵) تغذیه با جیره حاوی ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم از مکمل نانوسلنیوم. غلظت سلنیوم افزودنی با در نظر گرفتن درصد خلوص مکمل محاسبه شد. جیره‌های آزمایشی (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار سیستم تغذیه‌ای نشخوارکنندگان کوچک (*SRNS نسخه ۱/۹/۵۱۰۵) تنظیم شدند. جیره پایه حاوی ۷۵ درصد کنسانتره و ۲۵ درصد علوفه بود و به‌صورت جیره کاملاً مخلوط (TMR[□]) در اختیار بره‌ها قرار گرفت.

شمارش پروتوزوا: نمونه‌های مایع شکمبه به‌وسیله لوله مری تقریباً ۳ تا ۴ ساعت پس از خوراک صبحگاهی از شکمبه دام گرفته شد. مایع شکمبه به‌وسیله پارچه متقال دو لایه صاف شد، میزان ۱۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبه صاف شده با محلول متیل‌گرین[□] (۱۹) مخلوط شد و برای شمارش پروتوزوا در فضای تاریک نگهداری شد. برای تهیه محلول متیل‌گرین، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول فرمالدئید ۳۵ درصد فراهم شد، سپس مقدار ۸ گرم نمک و ۰/۶ گرم متیل‌سبز به آن اضافه گردید و با ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول تهیه شده در یک مکان تاریک نگهداری شد. بعد از ثابت شدن تک‌یاخته‌ها با استفاده از پیپت پاستور از هر لوله یک قطره مایع شکمبه روی لام نئوبار (DQ) که قسمت وسط آن به ابعاد ۱۰×۱۰ میلی‌متر و به عمق ۰/۱ میلی‌متر مدرج گردیده بود، قرار داده و با گذاشتن لامل بر روی آن در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus CH-2) و با درشت‌نمایی ۱۰× تک‌یاخته‌ها شمارش گردید. تعداد کل تک‌یاخته‌ها یعنی مجموع تک‌یاخته‌های هولوتریش و انتودینومورف در چهار سلول در چهار گوشه قسمت مدرج و چهار سلول در قسمت وسط آن شمارش گردید. هر نمونه سه بار شمارش شد. جمعیت کل پروتوزوا و گونه‌های مختلف پس از شمارش با لام نئوبار به‌صورت زیر تخمین زده شد:

گوارش گوسفند، در تحقیقات دامی مقدار عنصر مذکور را بیش از حد نیاز در نظر می‌گیرند تا آثار مثبت احتمالی آن را شناسایی کنند. با وجود این، عواملی مانند تنوع در منابع مکمل‌های مصرفی، نژاد دام و مرحله تولید آن و شرایط مختلف آب و هوایی و تغذیه‌ای سبب تفاوت در نتایج پژوهش‌های مختلف در رابطه با نیاز گوسفند به سلنیوم و گوناگونی اثرات گزارش شده مکمل‌های مختلف سلنیوم بر سلامت و عملکرد بره‌ها شده است. همچنین اطلاعات کافی در مورد تأثیر سطوح مختلف مکمل آلی سلنیوم مخمر و نانوسلنیوم بر جمعیت پروتوزوای شکمبه بره‌های نر بلوچی بومی سیستان وجود ندارد. از این رو، با توجه به مشاهدات و گزارشات اداره دامپزشکی در رابطه با کمبود سلنیوم در گوسفندان منطقه سیستان و با در نظر گرفتن حساسیت‌های تغذیه‌ای سلنیوم در گوسفند، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف مکمل سلنیوم مخمر و نانوذرات سلنیوم بر جمعیت پروتوزوایی و غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه بره‌های نر پرواری بلوچی انجام شد.

مواد و روش‌ها

دام‌ها و شرایط انجام آزمایش: این پژوهش در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زابل و با استفاده از ۳۰ رأس بره نر بلوچی با دامنه سنی ۶-۵ ماه و میانگین وزن اولیه ۰/۳۳ ± ۲۱/۵۶ کیلوگرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۶ تکرار به مدت ۷۰ روز (۱۴ روز عادت‌پذیری و ۵۶ روز آزمایش) انجام شد. بره‌ها در قفس‌های انفرادی قرار گرفتند و عمل سازگاری بره‌ها با شرایط محیطی و جیره آزمایشی انجام شد. پس از اتمام دوره سازگاری، بره‌ها به شکل تصادفی به یکی از ۵ گروه آزمایشی ذیل اختصاص داده شدند: ۱) گروه شاهد (تغذیه با جیره فاقد مکمل سلنیوم)، ۲) تغذیه با جیره حاوی ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم از مکمل آلی سلنیوم-مخمر، ۳) تغذیه با جیره حاوی ۰/۸ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم از مکمل آلی سلنیوم-مخمر، ۴) تغذیه با جیره حاوی ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم از مکمل آلی سلنیوم-

* Small ruminant nutrition system

† Total mixed ration

‡ Methylgreen-formalin-Salin

(رابطه ۱)

$$A = \frac{B \times 10000 \times C}{5}$$

(رابطه ۲)

$$C = \frac{RF + MFS}{RF}$$

نرمال و رساندن آن به حجم ۱۰۰ میلی لیتر) بود. محلول استاندارد آمونیاک با رقیق شدن محلول استوک به غلظت‌های یک، دو، چهار، شش و هشت میلی مولاری آمونیاک حاصل گردید. ابتدا ۰/۰۰۵ میلی لیتر (۵۰ میکرولیتر) نمونه و استانداردهای تهیه شده به لوله آزمایش منتقل و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به عنوان بلانک برداشته شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر محلول فنول به آنها اضافه و مواد مخلوط شدند. پس از آن ۲ میلی لیتر از محلول هیپوکلریت به لوله‌ها اضافه و مجدداً مخلوط شد. محلول در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شد و پس از خنک شدن، جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر (HALO, model XB10) خوانده شد و در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار آمونیاک برحسب میلی‌مول محاسبه شد.

آنالیز آماری: داده‌های حاصل از اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیت زیر خانواده‌های پروتوزوا در مایع شکمبه با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (ویرایش ۹/۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

در این معادله: Y_{ij} = صفت مورد مطالعه (متغیر وابسته)، μ = میانگین برای صفت مورد مطالعه، T_i = اثر تیمار و e_{ij} = اشتباه آزمایشی بود.

در این معادلات: A = جمعیت پروتوزوا در هر میلی لیتر مایع شکمبه، B = مجموع کل پروتوزوای مشاهده شده در مربعات لام نئوبار، C = نرخ رقت، RF = میزان مایع شکمبه (میلی لیتر)، MFS = میزان محلول نگهدارنده (میلی لیتر) است.

نیتروژن آمونیاکی: به منظور بررسی اثر جیره‌های آزمایشی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه، از هر حیوان یک نمونه ۱۰ میلی لیتری مایع شکمبه برداشته شده و به هر یک از آنها ۰/۲ میلی لیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد شرکت Merck برای تعیین نیتروژن آمونیاکی اضافه گردید (۳). نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند. اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه با استفاده از روش فنول-هیپوکلریت (۳) انجام شد. مواد و محلول‌های این روش شامل محلول فنول (از حل شدن ۰/۱۵ گرم نیتروفری‌سیانید سدیم در ۱/۵ لیتر آب مقطر و سپس اضافه نمودن ۳۳ میلی لیتر فنول ۹۰ درصد و رساندن حجم محلول به ۳ لیتر با آب مقطر)، محلول هیپوکلریت (از حل شدن ۰/۱۵ گرم هیدروکسید سدیم در ۲ لیتر آب مقطر و اضافه نمودن ۱۱۳/۶ گرم دی‌سدیم فسفات هفت آبه با گرم کردن ملایم در حمام آب گرم و افزودن ۱۵۰ میلی لیتر هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به آن پس از خنک شدن و رساندن به حجم سه لیتر با آب مقطر) و محلول استوک ۱۰۰ میلی مولاری آمونیاک (با حل کردن ۰/۶۶۰۷ گرم سولفات آمونیوم در اسید کلریدریک ۰/۱

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیب مواد مغذی جیره پایه

مقدار (درصد)	جیره پایه
۲۵	کاه گندم
۵۰	جو
۱۲	کنجاله سویا
۷	سبوس گندم
۴	روغن آفتابگردان
۰/۵	کربنات کلسیم
۰/۵	بی کربنات سدیم
۱	مکمل مواد معدنی - ویتامینی ۱
مقدار (درصد)	ترکیب شیمیایی جیره پایه
۲/۴۸	انرژی قابل سوخت و ساز (مگا کالری در کیلوگرم)
۱۵/۲	پروتئین خام
۳۵	دیواره سلولی نامحلول در شوینده خنثی (NDF)
۸	خاکستر
۰/۷	کلسیم
۰/۴	فسفر
۰/۰۶	سلنیوم (میلی گرم در کیلوگرم)

غلظت مواد معدنی و ویتامین‌ها در هر کیلوگرم مکمل: کلسیم ۱۹۶، فسفر ۳۰، سدیم ۵۰، منیزیم ۱۸، روی ۳، آهن ۳ و منگنز ۲ گرم؛ مس ۳۰۰، کبالت ۱۰۰، ید ۱۰۰ و آنتی‌اکسیدان ۴۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین A ۵۰۰۰۰۰ واحد، ویتامین D ۱۰۰۰۰۰ واحد و ویتامین E ۱۰۰ میلی‌گرم. ۲. انرژی قابل سوخت و ساز (مگا کالری در کیلوگرم جیره) توسط نرم‌افزار جیره‌نویسی نشخوارکنندگان کوچک (SRNS) محاسبه شده است.

نتایج

نتایج مربوط به تأثیر مقادیر مختلف سلنیوم بر جمعیت پروتوزوا و غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود جمعیت پروتوزوای کل تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفته است و تیمارهای ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم خوراک به شکل مخمر سلنیوم و ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم به شکل نانو، افزایش معنی‌داری را نسبت به دیگر تیمارها نشان دادند ($P < 0/05$). افزودن مقادیر مختلف سلنیوم به جیره از دو منبع سلنیوم مخمر و نانوسلنیوم، به‌طور معنی‌داری باعث افزایش گونه فریواسکولکس نسبت به تیمار شاهد شد در حالی که تعداد داسیتريشا در مایع شکمبه بره‌های تغذیه شده با

جیره حاوی ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم از منبع نانوسلنیوم بالاتر از گروه شاهد بود. شمار پروتوزوا دیپلودینیوم نیز در گروه ۰/۸ میلی‌گرم سلنیوم به شکل مخمر سلنیوم و گروه نانوسلنیوم بیشتر از گروه شاهد و ۰/۴ میلی‌گرم مخمر سلنیوم بود ($P < 0/05$). تعداد گونه‌های انتودینیوم و ایزوتریشا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه نیز تحت تأثیر افزودن مکمل سلنیوم به جیره قرار گرفت ($P < 0/05$). مقدار نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه بره‌های تغذیه شده با ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم از منبع سلنیوم مخمر و ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم به شکل نانوسلنیوم در هر کیلوگرم جیره کمتر از مقدار آن در گروه شاهد و گروه تغذیه شده با ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم بود ($P < 0/05$).

جدول ۲- تأثیر اشکال مختلف سلیوم بر جمعیت پروتوزوا (میلی لیتر/۱۰^۵ ×) و نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه

جیره‌های آزمایشی							نوع پروتوزوا
P-value	SEM	۰/۴ نانو	۱/۲	۰/۸	۰/۴	شاهد	
۰/۳۴	۰/۳۴۱	۴/۹۸	۵/۱	۵/۰۸	۴/۸۹	۵/۱۵	انتودینیوم
۰/۰۲۴	۰/۵۱۲	۲/۳۱ ^a	۲/۶۴ ^a	۲/۲۸ ^a	۲/۵۳ ^a	۰/۸۴۵ ^b	افریواسکولکس
۰/۰۳۲	۰/۰۱۸	۴/۱۳ ^a	۳/۴۸ ^{ab}	۳/۳۵ ^{ab}	۲/۴۷ ^b	۲/۳۱ ^b	داسیتیریشا
۰/۱۷۵	۰/۴۲۶	۲/۱	۱/۹۳	۲/۰۵	۱/۷۸	۱/۸۷	ایزوتیشا
۰/۰۴۵	۰/۵۷۴	۱/۷۲ ^a	۱/۴۴ ^{ab}	۱/۸۴ ^a	۰/۶۷۰ ^b	۰/۶۶۳ ^b	دیپلودینیوم
۰/۰۴۱	۰/۶۳۲	۱۵/۰۹ ^a	۱۴/۵۵ ^a	۱۴/۶۰ ^a	۱۱/۳۴ ^b	۱۰/۹۳ ^b	پروتوزوای کل
۰/۰۵	۰/۶۸۳	۱۲/۱۳ ^b	۱۲/۰۹ ^b	۱۲/۲۷ ^b	۱۴/۲۵ ^a	۱۳/۷۶ ^a	نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم در دسی لیتر)

a-b-c: حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست ($P < 0.05$).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های برخی از پژوهش‌ها حاکی از این است که ماده معدنی سلیوم دارای اثر حفاظتی بر پروتوزوا شکمبه است و ممکن است سبب بهبود فعالیت آنها شود. از سوی دیگر، پروتوزوای شکمبه نیز می‌توانند توازن سلیوم حیوان را تحت تأثیر قرار دهند (۸، ۱۲). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطوح ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم سلیوم در کیلوگرم خوراک به شکل مخمر سلیوم و ۰/۴ میلی‌گرم از منبع نانو سلیوم باعث افزایش پروتوزوا در مایع شکمبه بره‌های پروراری می‌شود. علت این امر را می‌توان به ارتقای توان آنتی‌اکسیدانی محیط شکمبه با افزودن سلیوم آلی و نانو، و به تبع آن افزایش گونه‌های میکروبی موجود در محیط شکمبه از جمله پروتوزوا نسبت داد (۱۷). همچنین نشان داده شده است که سلیوم تأثیرات فیزیولوژیک خود را از طریق سلنوپروتئین‌ها اعمال نموده و کمبود آن می‌تواند بیان mRNA را کاهش دهد (۱۴). در نتیجه گروه‌های دریافت کننده سلیوم ممکن است فعالیت سلنو آنزیم بیشتری برای پروتوزوا داشته باشند (۱۵) و به نظر می‌رسد چنین شرایطی سبب افزایش تعداد پروتوزوا شده باشد. همسو با نتایج حاضر که جنس افریواسکولکس تحت تأثیر افزودن مکمل سلیوم به جیره پایه قرار گرفته و تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به گروه شاهد (بدون مکمل سلیوم)

داشت، Mihalikova و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که جنس افریواسکولکس فقط در محتویات شکمبه گوسفندهای گروه تغذیه شده با مکمل سلیوم مشاهده شد اما در تیمار فاقد مکمل این جنس وجود نداشت، که دلیل آن را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی سلیوم برای حفظ فعالیت افریواسکولکس نسبت داد و این بدان معنی است که سلیوم با ارتقای توان آنتی‌اکسیدانی محیط شکمبه و به تبع آن گونه‌های میکروبی موجود در آن، از جمله افریواسکولکس، باعث بقای آن در محیط شکمبه شده است.

در پژوهش حاضر، مشاهده شد که مکمل کردن ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم سلیوم به شکل نانو سلیوم موجب افزایش داسیتیریشا و ۰/۸ میلی‌گرم سلیوم از منبع مخمر سلیوم و ۰/۴ میلی‌گرم به صورت نانو سلیوم موجب افزایش دیپلودینیوم شد. همسو با این نتایج، در پژوهشی گزارش شد که تیمار سلیوم آلی موجب افزایش معنی‌دار تعداد کل پروتوزوا نسبت به تیمارهای معدنی سلیوم شد. همچنین، تیمار نانو و سلیوم آلی به طور قابل توجهی موجب افزایش گونه‌های داسیتیریشا، دیپلودینیوم و افریواسکولکس نسبت به تیمار معدنی شدند (۶). در پژوهشی دیگر مشاهده شد که سلیوم معدنی به تنهایی (۳۱۰ میکروگرم در کیلوگرم ماده خشک) و به همراه ویتامین E نیز جمعیت زیرگونه‌های دیپلودینیوم،

(۱۶، ۱۷). همچنین، آل‌سعدی و همکاران در سال ۱۳۹۷ نشان دادند که pH و نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه تحت تأثیر مکمل کردن سطوح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم ماده خشک از منبع سلنیوم-متیونین به جیره بره‌های نر کرمانی قرار نگرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از منابع مختلف سلنیوم در جیره احتمالاً می‌تواند با بهبود عملکرد شکمبه موجب افزایش تعداد پروتوزوا و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه شود که در این زمینه میزان ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم جیره به شکل نانو سلنیوم و ۱/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم از منبع مخمر سلنیوم عملکرد بهتری نسبت به شاهد و سطوح ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم مخمر سلنیوم داشت. به‌طور کلی با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر و مقایسه آنها با تحقیقات انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که عواملی مانند مقدار و منبع سلنیوم، نژاد دام، جیره پایه، شرایط فیزیولوژیک دام و عوامل محیطی می‌تواند بر پاسخ دام به مکمل سلنیوم اثر بگذارد و گاهی سبب تفاوت در نتایج شود. انجام پژوهش‌های بیشتر بر روی نژادهای بومی به‌ویژه گوسفند بلوچی می‌تواند به درک بهتر از اثرات سلنیوم بر جمعیت میکروبی شکمبه به‌خصوص پروتوزوا کمک شایانی نماید.

افریواسکولکس و پروتوزوای کل را افزایش داد (۱۷). قربانی و همکاران در سال ۱۳۹۵، در پژوهشی که به‌منظور بررسی تأثیر مکمل روی-متیونین و سلنومتیونین بر جمعیت پروتوزوا بر روی گوسفند انجام شد، گزارش کردند که جمعیت کل پروتوزوا در حضور روی-متیونین، سلنومتیونین و روی-سلنیوم نسبت به گروه شاهد افزایش داشت و بیشترین افزایش را جمعیت زیرخانواده انتودینینه‌ها نشان دادند. همچنین، جمعیت زیرخانواده ایزوتریشیدا، افریواسکولسینه و دیپلودینینه تحت تأثیر سلنیوم قرار نگرفتند که با نتایج به دست آمده در این مطالعه مغایرت دارد.

همسو با نتایج این پژوهش، در برخی پژوهش‌های انجام شده بر روی دام‌های نشخوارکننده (۱۰، ۲۴، ۲۸)، غلظت نیتروژن آمونیاکی با استفاده از سطوح مازاد سلنیوم کاهش یافت که این پژوهشگران افزایش فعالیت میکروبی و بهبود استفاده از نیتروژن خوراک و نیتروژن آمونیاکی جهت ساخت پروتئین میکروبی را از جمله دلایل این کاهش بیان کردند. کاهش نیتروژن آمونیاکی می‌تواند به دلیل اثر مثبت سلنیوم بر رشد میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌های سلولایتیک که منحصر از نیتروژن آمونیاکی استفاده می‌کنند، باشد

References

- 1- Al-Saadi H, Mousaie A, Esmailipour O A, Ziaei N. Effect of organic selenium supplement on growth performance, nutrient digestibility and some blood metabolites of Kermani fattening lambs. *J Res Rum.* 2017; 6(2): 17-30. [In Persian]
- 2- Barceloux DG. Selenium. *J Clin Toxicol.* 1999; 37: 145-172.
- 3- Broderick GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J Dairy Sci.* 1980; 63(1): 64-75.
- 4- Dayrell MD, Ivan M, Hidiroglou M. The effects of ruminal protozoa on selenium status in sheep. *Can.J.Anim.Sci.* 1991; 71: 1269-1270.
- 5- Dehority B. Laboratory Manual for Classification and Morphology of Ruminal Protozoa;

CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1993.

- 6- Dehghani S, Taghizadeh A, Mohammadzadeh H. The effect of different forms of selenium on parameters of gas production, rumen fermentation and rumen protozoa population. *J anim sci res I.* 2018; 11(3): 307-317 [In Persian]
- 7- Faixova Z, Faix S, Leng L, Vaczi P, Makova Z, Szaboova R. Hematological, blood and rumen chemistry changes in lambs following supplementation with Se-yeast. *Acta Vet Bru.* 2007; 76: 3-8.
- 8- Fujihara T, Imamura T, Orden EA. Utilization of protozoal selenium in young Goats. *J Ani Feed Sci.* 2004; 13: 265-268.
- 9- Getachew G, Makkar HPS, Becker K. Tropical browses: content of phenolic compounds,

in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acids and *in vitro* gas production. *J Agri Sci.* 2002. 139: 341-352.

10- Ghorbani A, Noorian Sarwar M A, Moini MM. The effect of zinc and selenium organic supplements on feed consumption, digestibility and parameters of ruminal fermentation in sheep. *J Anim Sci.* 2016; 30(115): 17-36. [In Persian]

11- Gruby D, Delafond HMO. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Comptes Rendus Acad. Des Sci.* 1843; 17: 1304-1308.

12- Hidiroglou M, Jenkins KJ. Influence of defaunation on the utilization of selenomethionine in the sheep. *Ann Biol Anim Biochim Biophys.* 1974; 14: 157-165.

13- Hungate RE. *The Rumen and Its Microbes*; Academic Press: New York, NY, USA, 1966.

14- Juszczuk-Kubiak E, Bujko K, Cymer M, Wicińska K, Gabryszuk M, Pierzchała M. Effect of inorganic dietary selenium supplementation on selenoprotein and lipid metabolism gene expression patterns in liver and loin muscle of growing lambs. *Biol Trace Elem Res.* 2016; 172: 336-345.

15- Mihalikova K, Gresakova L, Boldizarova K, Faix S, Leng L, Kisidayova S. The effects of organic selenium supplementation on the rumen ciliate population in sheep. *Folia Microbiol.* 2005; 50: 353-356.

16- Naziroglu M, Aksakal M, Cay S, Celik S. Effects of vitamin E and selenium on some rumen parameters in lambs. *Acta Vet Hung.* 1997; 45: 447-456.

17- Naziroglu M, Aksakal M, Cay M, Celik S. Effects of vitamin E and selenium on rumen protozoa in lambs. *Tur J Vet Ani Sci.* 1997; 21: 81-90.

18- NRC. *Mineral Tolerance of Animals.* National Academies Press, Washington, DC. USA. 2005; 493 pp.

19- Ogimoto K, Imai S. *Atlas of Rumen Microbiology.* Japan Scientific Society Press, Tokyo.

1981.

20- Pernthaler J. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 537-46.

21- Ramirez BJE, J L. TortoraHernandez, and M. Huerta. Main causes of mortalities in dairy goat kids from the Mexican plateau. *S Rum Res.* 2001; 41: 77-80.

22- Shi L, Xun W, Yue W, Zhang C, Ren Y, Liu Q, et al. Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Ani Feed Sci Tec.* 2011; 163: 136-142.

23- Underwood EJ, Suttle NF. The mineral nutrition of livestock. CAB international, Wallingford, U.K. 1999.

24- Wang C, Liu Q, Yang WZ, Dong Q, Yang XM, He DC, et al. Effects of selenium yeast on rumen fermentation, lactation performance and feed digestibilities in lactating dairy cows. *Liv Sci.* 2009; 126: 239-244.

25- Williams AG, Coleman GS. The Rumen Protozoa; Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience; Springer: New York, NY, USA, 1992.

26- Wilsdorf VG, Heinze W, Krengel B. Studies into the action of sulfamerazine, sulfur, selenium, and/or vitamin E on rumen infusoria of cattle. *Mh.Vet.Med.* 1984; 39: 700-703.

27- Wright PL, Bell MC. Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine. *Am J phys.* 1966; 211: 6-10.

28- Xun W, Shi L, Yue W, Zhang CH, Ren Y, Liu Q. Effect of High-Dose Nano-selenium and Selenium-Yeast on Feed Digestibility, Rumen Fermentation, and Purine Derivatives in Sheep. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 150: 130-136.

29- Alavi M, Rai M, Martinez F, Kahrizi D, Khan H, Rose Alencar de Menezes I, et al. The efficiency of metal, metal oxide, and metalloid nanoparticles against cancer cells and bacterial pathogens: different mechanisms of action. *Cell Mol Biomed Rep.* 2022; 2(1): 10-21.



The effect of adding different levels of selenium-yeast supplement and selenium nanoparticles on the population of protozoa and rumen ammonia concentration of Baluchi fattening male lambs (native of Sistan)

Hossein Ansari Nik¹, Mohammad Reza Dehghani^{2*}, Mostafa Yousef-Elahi², Amir Mousaie³, Ahmad Rashki⁴, Arash Omidi⁵

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

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

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

5- Professor, Department of Animal Health Management, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Receive: June 4, 2024; Revise: June 30, 2024; Accept: August 13, 2024

 10.22034/nfvm.2024.460687.1245

Summary

This study was conducted to investigate the effect of dietary supplementation of selenium nanoparticles (SeNP) and selenium yeast (SY) on ruminal protozoan population and ammonia nitrogen of Baluchi male lambs. Thirty Baluchi lambs with an average initial body weight of 21.56 ± 0.33 kg were used in a completely randomized design with 5 treatments and 6 repetitions for 70 days (14 days of adaptation and 56 days of data collection). The experimental groups were 1) control (without selenium supplement), 2), 3) and 4) were feeding with 0.4, 0.8 and 1.2 mg Se/kg of diet as SY respectively, and 5) feeding with 0.4 mg Se/kg of diet as SeNP. The results showed that the number of protozoa in the ruminal fluid of lambs receiving 0.8 and 1.2 mg of Se/kg of diet as SY and 0.4 mg of Se/kg of diet as SeNP was higher than that of the control group ($P < 0.05$). In addition, both SY and SeNP sources significantly increased the number of *Ophryoscolex* species, while 0.4 mg of Se as SeNP resulted in a significant increase in *Dasytricha* species ($P < 0.05$). Furthermore, dietary supplementation of 0.8 mg of Se as SY and 0.4 mg of Se as SeNP increased the number of *Diplodinium* species ($P < 0.05$). However, the populations of *Entodinium* and *Isotricha* species were not affected by the experimental treatments. Feeding with 0.8 and 1.2 mg of Se as SY/kg of diet and 0.4 mg of Se as SeNP/kg of diet led to decreased ruminal ammonia nitrogen quantity ($P < 0.05$). The results of this research indicated that dietary selenium supplementation as Nano selenium and selenium yeast, can increase the protozoa population and decrease the concentration of ammonia nitrogen in the ruminal fluid of Baluchi fattening lambs.

Keywords: Fattening lamb, Protozoa count, Selenium, Yeast



تعیین هویت مولکولی ماکرورابدوس اورنیتوگاستر (*Macrorhabdus ornithogaster*) در پرندگان زینتی

فاطمه حامیان^۱، نریمان شیخی^{۲*}، غلامرضا نیکبخت بروجنی^۳، سعید چرخکار^۲

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور و پرندگان زینتی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۰۴ آذر ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۳ آذر ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۵ آذر ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2025.426402.1215

چکیده

ماکرورابدویزیس یا مگاباکتریوزیس، سندرم تحلیل برنده پرندگان است که قارچ *Macrorhabdus ornithogaster* آن را ایجاد می‌کند. هدف از این پژوهش، تشخیص مولکولی قارچ ماکرورابدوس اورنیتوگاستر با روش PCR، از مدفوع پرندگان با علائم بالینی و آنالیز فیلوژنی بین جدایه‌های جمع‌آوری شده بود. در این پژوهش ۵۴ نمونه مثبت از بین ۳۰۰ پرندۀ مشکوک مراجعه‌کننده به روش اسمیر مرطوب شناسایی شد. سپس از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تشخیص نهایی استفاده شد. نمونه‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای عمومی (Panfungal) با روش PCR بررسی شدند. برای آنالیز فیلوژنی ۱۵ نمونه تعیین توالی شدند، توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژن مقایسه و درصد شباهت و هم‌پوشانی بین توالی‌ها بررسی شد. از تعداد ۳۰۰ نمونه مدفوع با تکنیک اسمیر مرطوب بررسی شده ۵۴ نمونه مثبت بودند. از این تعداد ۳۳ نمونه با روش PCR مثبت شدند. بر اساس توالی‌یابی، ماکرورابدوس اورنیتوگاستر تنها در دو نمونه کوتوله برزیلی (lovebird) تشخیص داده شد. آنالیز فیلوژنی نمونه‌های مثبت در این مطالعه نشان داد که موارد مثبت جداشده از باجی‌ها و فنچ‌ها، دارای تشابه (۸۶/۷۶ - ۱۰۰ درصد) با توالی‌های ثبت شده در (NCBI) بودند. همچنین، نتایج نشان داد که تکنیک PCR به‌علت دقت، حساسیت و سرعت در روند تشخیص می‌تواند مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: *Macrorhabdus ornithogaster*، پرندگان زینتی، فیلوژنیک

مقدمه

مگاباکتریوز بیماری گوارشی کشنده‌ای با گسترش جهانی است. این پاتوژن گونه‌های مختلف پرندگان از جمله مرغ عشق (Budgerigars)، قناری، شترمرغ، فنج، بوقلمون را درگیر می‌کند (۱، ۲). این بیماری را میکروارگانیزم *Macrorhabdus ornithogaster* که یک مخمر آسکومیست است در پروونتریکولوس (proventriculus) در نزدیکی تقاطع پروونتیکولار-بطنی (proventricular-ventricular junction) پرندگان کلونیزه ایجاد می‌کند (۳-۵). علائم بیماری شامل کاهش وزن مزمن، دیسفاژی، استفراغ، اسهال و مرگ است. ماکرواربدوزیس به‌طور وسیع در بسیاری از گونه‌ها شامل طوطی‌سانان، کبوترسانان، طیور و سایرگونه‌ها شناخته شده است (۶، ۷).

این بیماری در بسیاری از موارد بدون علامت پاتوگنومیک خاصی بوده و در بیشتر موارد تنها علامت مشترک در گونه‌ها لاغری و کاهش اشتها است (۸، ۹). علائم کالبدشکافی معمولاً در بین چینه‌دان و پیش‌معدة به‌صورت التهاب لنفوسیتی مشاهده شده است (۴، ۹). امروزه رایج‌ترین روش مورد استفاده برای تشخیص این قارچ، استفاده از لام خیس بدون رنگ‌آمیزی با بزرگ‌نمایی ۴۰ است. با تجزیه و تحلیل DNA ریبوزمی (rDNA)، به‌ویژه 18 S rDNA و ناحیه دامنه 26 S rDNA، این ارگانیزم به‌عنوان یک مخمر آسکومیست شناسایی شده است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی رونویسی ITS نیز در مطالعات انجام شده در ایران و آلمان گزارش شده است (۱۰، ۱۱).

PCR در حال حاضر، تشخیص مگاباکتریوز با تکنیک مولکولی (PCR) بر روی ضایعات بافتی و نمونه مدفوع انجام می‌شود (۱۲). با این حال، قطعی‌ترین روش تشخیص بر اساس آزمایش PCR بر اساس قطعه پرایمر مد نظر است. از آنجایی که ماکرواربدوزیس اورنیتوگاستر فقط در پرندگان محدودی بررسی شده است (۱۳)، این مطالعه با هدف، ردیابی مولکولی و آنالیز فیلوژنی

ماکرواربدوزیس اورنیتوگاسترهای جداشده در پرندگان زینتی (برای اولین بار در ایران)، و بررسی شباهت‌های ژنتیکی بین توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این پژوهش از تعداد ۳۰۰ پرنده مشکوک (علائم بالینی شامل: لاغری، تهوع، اسهال و کاهش تحرک) ارجاع داده‌شده به کلینیک‌های دامپزشکی تهران، باغ پرندگان لویزان، کلینیک دامپزشکی پاستور، کلینیک دامپزشکی آوین و کلینیک دامپزشکی سیمرغ بعد از انجام اسمیر مرطوب، ۵۴ نمونه آلوده به ماکرواربدوزیس اورنیتوگاسترهای بودند که در مرحله بعد برای تأیید نهایی از تست PCR استفاده شد.

بررسی میکروسکوپی: در مرحله اول مدفوع خیس بدون رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰-۴۰ بررسی شد. گفتنی است که هرچقدر قطر اسمیر نازک‌تر باشد، بهتر می‌توان میکروارگانیزم را تشخیص داد. سپس مدفوع پرندگان با علائم بالینی این بیماری به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم در میکروتیوب ذخیره و فریز شدند.

تشخیص مولکولی:

استخراج DNA به‌منظور تأیید مولکولی قارچ ماکرواربدوزیس اورنیتوگاستر ابتدا با استفاده از کیت استخراج DNA (ایران، تکاپوزیست، DynaBio Blood/Tissue DNA Extraction mini kit) از نمونه‌ها استخراج DNA انجام شد. روش استخراج ستونی بر اساس دستورکار شرکت سازنده انجام شد.

PCR در این پژوهش به‌منظور انجام PCR از پرایمرهای عبدی و همکاران (۲۰۱۹) با آغازگرهای رفت: TCCGTAGGTGAACCTGCGG و برگشت: TCCTCCGCTTATTGATATGC استفاده شد (۱۰). مخلوط واکنش افزوده‌سازی در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هرکدام از

تعیین هویت مولکولی ماکرواربدوس اورنیتوگاستر در پرندگان زینتی

مختلف جهان در بانک ژن (GeneBank) ثبت شده بودند در بانک ژن مطابقت داده شدند و میزان مشابهت و درصد هم‌پوشانی بین توالی‌های به دست آمده بررسی شد. به منظور آنالیز فیلوژنی و رسم درختچه فیلوژنی از نرم‌افزار Mega 5 و الگوریتم Neighbor joining با Bootstrap معادل ۱۰۰۰ بار تکرار انجام شد.

نتایج

اسمیر مرطوب: از بین ۳۰۰ نمونه اولیه، تعداد ۵۴ نمونه مدفوع با اسمیر مرطوب شامل: ۲۳ قناری، ۱۵ عروس هلندی، ۵ لاوبرد، ۴ سهره، ۲ باجی، ۱ توکان، ۱ مرغ عشق انگلیسی، ۱ طوطی خاکستری آفریقایی، ۱ بلبل خرما و ۱ عدد فنچ آلوده به ماکرواربدوس اورنیتوگاستر تشخیص داده شدند (جدول ۱).

PCR با روش PCR از تعداد ۵۴ نمونه اسمیر مرطوب تعداد ۳۳ نمونه در افزوده سازی با پرایمرهای عبیدی و همکاران (۲۰۱۹) باندهایی با وزن‌های مختلف بین ۵۶۷ تا ۶۲۰ در الکتروفورز نشان دادند (نگاره ۱). نتایج مثبت بر اساس (جدول ۱) آورده شده است.

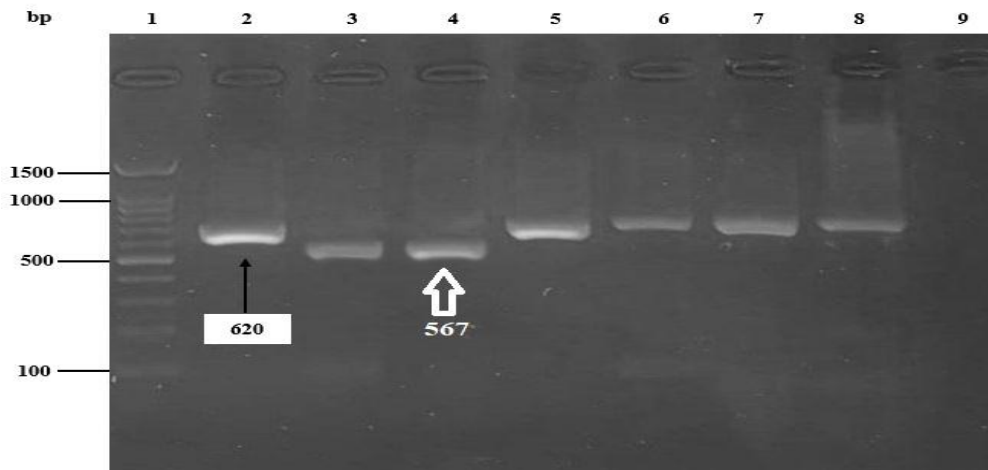
پرایمرها، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂ و یک واحد آنزیم تک‌پلیمرز (Fermentas، آلمان) انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله‌ای، شامل مرحله واسرشته‌سازی ۹۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال ۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله گسترش ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و در انتها یک مرحله گسترش انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

تعیین توالی سنگر: نمونه‌هایی که در واکنش PCR باند مناسب و واضح تشکیل داده بودند و فاقد باند غیر اختصاصی یا اسمیر بودند، انتخاب شدند. مقدار ۳۰ μl از محصول PCR نمونه‌های تأیید شده همراه با آغازگر رفت و آغازگر برگشت، برای تعیین توالی ژن به روش سنگر، به شرکت پیشگام (تهران، ایران) ارسال شدند.

آنالیز فیلوژنی: نتایج نمونه‌هایی که با موفقیت تعیین توالی شده بودند، با نرم‌افزار Bioedit و روش Clatal W بررسی و تجزیه و تحلیل شدند. پس از ویرایش و اصلاح، توالی‌های به دست آمده با سایر توالی‌هایی که قبلاً از نقاط

جدول ۱- میزان آلودگی نمونه‌ها به ماکرواربدوس اورنیتوگاستر با روش اسمیر مرطوب و PCR

نتایج PCR	اسمیر مرطوب	روش تشخیص
		گونه پرنده
۱۲	۲۳	قناری
۱۰	۱۵	عروس هلندی
۴	۵	لاوبرد
۲	۴	سهره
۲	۲	باجی‌ها
۱	۱	توکان
۱	۱	مرغ عشق انگلیسی
-	۱	طوطی خاکستری
-	۱	بلبل خرما
۱	۱	فنچ
۳۳	۵۴	جمع کل



نگاره ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های آلوده به ماکرورابدوس اورنیتوگاستر

محصول PCR با استفاده از ژل ۱/۵ درصدی آگارز ظاهرسازی شد، چاهک ۱؛ DNA Ladder ۱۰۰ جفت بازی. چاهک‌های ۲ کنترل مثبت، چاهک ۳؛ کنترل منفی، چاهک‌های ۴ و ۵ (نمونه‌های مثبت با طول قطعه ۵۶۷ جفت بازی) چاهک‌های ۶، ۷، ۸ (نمونه‌های مثبت با طول ۶۲۰ جفت بازی)

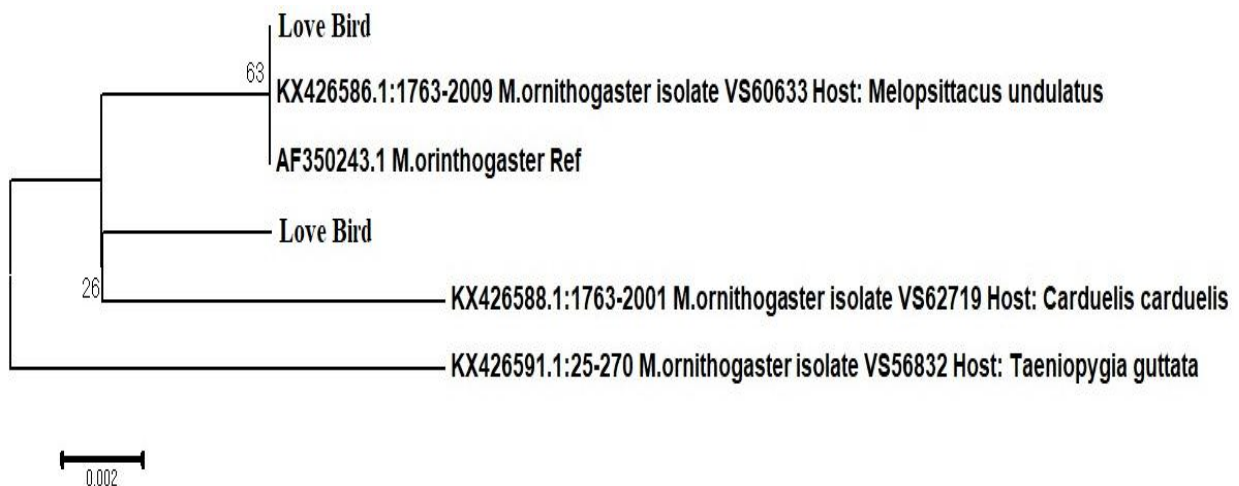
نمونه‌هایی که با موفقیت تعیین توالی شده بودند، با نرم‌افزار بایوآدیت بررسی و تجزیه و تحلیل شدند. پس از ویرایش و اصلاح، توالی‌های به دست‌آمده در بانک ژن مطابقت داده شدند و با توالی‌های دیگری که قبلاً از نقاط مختلف جهان در بانک ژن ثبت شده بودند، مقایسه شدند و میزان مشابهت و درصد هم‌پوشانی بین توالی‌های به دست‌آمده بررسی شد (جدول). منهای مواردی که در تعیین توالی *Cladosporium herbarum*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium polonicum*, *Naganishia albida* و *Alternaria tenuissima* تشخیص داده شدند تنها در دو نمونه با افزوده‌های ۶۲۰ جفت باز، گونه قارچ ماکرورابدوس اورنیتوگاستر تشخیص داده شد که هر دو کد مربوط به کوتوله برزیلی (lovebird) است. نگاره ۲؛ همترازی توالی‌های به دست آمده را نشان می‌دهد. جدول ۲ درصد تشابه توالی‌های این مطالعه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن را نشان می‌دهد.

جدول ۲- درصد تشابه توالی‌های این مطالعه با توالی ثبت‌شده در بانک جهانی ژن

شماره نمونه	جداسازی	درصد شباهت
۵۱	<i>Macrorhabdus orinthogaster</i>	۹۹/۸۳ - ۹۹/۶۶
۲۰۱		
۳۰۱		
۳۰۹	<i>Cladosporium herbarum</i>	۱۰۰ - ۹۹/۲۳
۱۴		
۳۷		
۵۳	<i>Mucor circinelloides</i>	۹۸/۶۴ - ۹۷/۸۷
۳۰۸		
۳۰۵		
۳۰۴	<i>Penicillium polonicum</i>	۹۰/۲۴ - ۸۸/۹۲
۳۰۲		
۲۰۷		
۵۲	<i>Naganishia albida</i>	۸۶/۹۲ - ۸۶/۷۶
۲۰۸	<i>Alternaria tenuissima</i>	۹۹/۶۳ - ۹۹/۴۴
۳۱۰	نتایج توالی قابل تحلیل نبود	



نگاره ۲- هم ترازوی توالی‌های مثبت ماکرواردوس این مطالعه با ژن مرجع AF350243 در بانک جهانی ژن



نگاره ۳- بررسی و آنالیز فیلوژنی با روش Neighbor-joining و تعداد تکرار ۱۰۰۰ برای دو نمونه مثبت با توالی‌های مرجع بانک ژن انجام شد.

توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن بررسی می‌کند. درخت شامل دو خوشه اصلی است. نمونه KX426586.1 که از میزبان مرغ عشق جداسازی شده است، در یک خوشه با توالی مرجع AF350243.1 مربوط به

درخت فیلوژنیک حاصل با استفاده از روش Neighbor-Joining و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap برای ارزیابی میزان اطمینان به گره‌ها ترسیم شد. این درخت روابط تکاملی دو نمونه مثبت مورد مطالعه را با

ماکرورابدوس اورنیتوگاستر قرار دارد. این گره دارای مقدار Bootstrap برابر با ۶۳ است که سطح اعتماد متوسطی را به این شاخه نشان می‌دهد.

در خوشه دوم، دو نمونه KX426588.1 و KX426591.1 که به ترتیب از میزبان‌های *Carduelis carduelis* و *Taeniopygia guttata* جداسازی شده‌اند، قرار گرفته‌اند. این دو نمونه فاصله ژنتیکی کمی با یکدیگر داشته و با توالی‌های مرجع مورد مطالعه قرابت دارند. با این حال، مقدار Bootstrap این گره (۲۶) نشان‌دهنده سطح اعتماد پایین به این شاخه‌بندی است که ممکن است ناشی از تنوع ژنتیکی پایین یا محدودیت داده‌ها باشد. فاصله‌های کوتاه شاخه‌ها در مقیاس ۰/۰۰۲/۰ نیز نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بالا میان این توالی‌ها است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نمونه‌های مورد مطالعه با گونه ماکرورابدوس اورنیتوگاستر مرتبط بوده، اما ممکن است تفاوت‌هایی در سطح میزبان یا تغییرات تکاملی داشته باشند که نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

بحث و نتیجه‌گیری

مخمر ماکرورابدوس اورنیتوگاستر عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب گوارشی در پرندگان زینتی و دیگر پرندگان است که گسترش جهانی دارد. این مخمر معمولاً شکل مزمنی از بیماری به نام مگاباکتریوز یا ماکرورابدوس را در پرندگان وحشی و خانگی ایجاد می‌کند. این بیماری در بسیاری از موارد بدون علامت پاتوژنومیک (Pathogenomic) خاصی بوده و در بیشتر موارد تنها علامت مشترک در گونه‌ها لاغری و کاهش اشتها است (۵، ۱۴). انتقال این بیماری از طریق مدفوع آلوده به این انگل رخ می‌دهد. در مطالعه‌ای Borrelli و همکاران (۲۰۱۵)، توانستند با استفاده از روش مینی‌فلتک (mini-Foltac)، ماکرورابدوس اورنیتوگاستر را تشخیص دهند و در نهایت به این نتیجه رسیدند که مینی‌فلتک روشی معتبر، حساس و کم‌هزینه است (۲). در مطالعه دیگری که Ozmen و همکاران انجام دادند، عفونت‌های هم‌زمان ماکرورابدوس اورنیتوگاستر و آیمیریا دانسنیگی را در باجی‌ها از نظر

آسیب‌های پاتولوژی در اندام‌های مختلف بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که ماکرورابدوس اورنیتوگاستر در پیش‌معده، معده و روده کلونیزه می‌شود (۹).

در مطالعه‌ای Razmyar و همکاران (۲۰۱۷)، در یک گله پرورشی قناری، در شهر مشهد، عفونت در اثر ماکرورابدوس اورنیتوگاستر را گزارش دادند. تعداد بسیار زیادی از ماکرورابدوس اورنیتوگاستر در گسترش مدفوع و گسترش مستقیم از خراشیدن مخاط پیش‌معده در بررسی میکروسکوپ نوری مشاهده شدند که نتایج نهایی بر اساس مشاهدات آسیب‌شناسی روش PCR نشان داد که ماکرورابدوس اورنیتوگاستر به‌عنوان التهاب پیش‌معده مزمن است (۱۵). همچنین در مطالعه دیگری Kheirandish و همکاران (۲۰۱۱)، از مجموع ۵۰۰ باجی تعداد ۱۰ نمونه با کالبدشکافی مبتلا به بیماری مزمن تحلیل برنده گزارش دادند، همچنین در این مطالعه لام‌های بافتی برای آزمایش‌های پاتولوژی از قسمت پیش‌معده، سنگ‌دان و ایسموس (محل بین پیش‌معده و سنگ‌دان) گرفته و بررسی شده‌اند. این مطالعه نشان داده است که بیشترین آسیب‌ها ابتدا در قسمت ایسموس (محل بین پیش‌معده و سنگ‌دان) و به‌مراتب در قسمت پیش‌معده و سنگ‌دان که شامل آتروفی ماهیچه‌ای، ضخیم شدن دیواره بین پیش‌معده و سنگ‌دان، خون‌ریزی و نازک شدن لایه کوئیلین مشاهده شد (۱۶).

در یک مطالعه موردی Babazadeh و همکاران (۲۰۱۵)، عفونت هم‌زمان ماکرورابدوس اورنیتوگاستر و استافیلوکوکوس اورئوس در قناری در ایران تأیید و گزارش شده است (۷). در مطالعه Amir و Mekky (۲۰۲۰)، به اهمیت و حساسیت تکنیک PCR در تشخیص ماکرورابدوس اورنیتوگاستر تأکید شده است (۱). همچنین در مطالعه‌ای توسط Fillipich و همکاران (۱۹۹۸)، دو گروه از باجی‌ها به مدت چند سال به‌منظور بررسی شیوع ماکرورابدوس اورنیتوگاستر و عوامل مؤثر بر آن بررسی شدند، نتایج این مطالعه نشان داد که فاکتور سن بر میزان شیوع ماکرورابدوس اورنیتوگاستر هیچ

تعیین هویت مولکولی ماکرواردوس اورنیتوگاستر در پرندگان زینتی

پرنده‌گانی که سلول‌های مخمر را دفع نمی‌کنند نشان دهد (۱۸)، در مطالعه ما هیچ پرنده‌ای تلف نشد و این مسئله در مطالعه ما قابل بررسی نبود. در مطالعه Powers و همکاران (۲۰۱۸)، از ۱۰۰۶ طوطی، ۱۷۷ مورد در بازرسی پس از مرگ و از نظر بافت‌شناسی آلوده به ماکرواردوس اورنیتوگاستر بودند (۱۹).

بر اساس مطالعه‌ی Sullivan و همکاران (۲۰۱۷)، PCR سوآپ‌های جمع‌آوری شده از کلواک، احتمال بیشتری برای تشخیص ماکرواردوس اورنیتوگاستر نسبت به FGS در طوطی‌ها داشته است. Poleschinski و همکاران (۲۰۱۹)، عفونت ماکرواردوس اورنیتوگاستر را ۵۳/۸۰ درصد با معاینه میکروسکوپی و ۴۶/۲۰ درصد با آزمایش مدفوع به‌روش PCR گزارش کردند (۲۰) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه حاضر موارد مثبت با روش PCR (۳۳ نمونه مثبت) در حالی که در روش اسمیر مرطوب (۵۴ نمونه مثبت) تشخیص داده شد. در مطالعه Kojima و همکاران (۲۰۲۲)، در کشور ژاپن تنوع ژنتیکی کمی بین ماکرواردوس اورنیتوگاسترهای جدا شده از پرندگان خانگی گزارش شده است (۲۱). مطالعه ما با این مطالعه همخوانی داشت و تفاوت بسیار کمی بین ماکرواردوس اورنیتوگاسترهای جدا شده وجود داشت. با این حال، در برخی تحقیقات برای آنالیز فیلوژنی پیشنهاد شده از ناحیه *rDNA* ۲۶R استفاده شود. به‌طور خاص این ناحیه فاصله بین ژنی را تقویت می‌کند.

هرچند در این پژوهش تعداد کمی پرنده بررسی شدند، اما نتایج مهمی را نشان داد. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که آلودگی به ماکرواردوس اورنیتوگاستر در لاوبرد وجود دارد و نتایج تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی این مسئله را تأیید کرده است. بررسی فیلوژنی موارد مثبت جدا شده از باجی‌ها و فنچ‌ها نشان داد که نمونه‌های ماکرواردوس اورنیتوگاستر در این مطالعه دارای شباهت ۸۶/۷۶ درصد تا ۱۰۰ درصد با نمونه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن هستند. در سایر

تأثیری نداشته، در صورتی که میزان شیوع با فاکتور جنسیت رابطه مستقیمی داشته، به‌طوری که میزان شیوع در نرها بیشتر از ماده‌ها بود (۱۷).

در مطالعه Sullivan و همکاران (۲۰۱۷)، در یک گله ۱۰۰ تایی باجی که آلوده به ماکرواردوس اورنیتوگاستر بودند، در بررسی سوآپ‌های ناحیه کلواک با روش PCR نشان داده شد که این روش بسیار دقیق‌تر و کارآمدتر است (۱۴). در مطالعه Phalen (۲۰۰۶)، بهترین و دقیق‌ترین روش برای تشخیص ماکرواردوس اورنیتوگاستر تهیه لام بافتی و تشخیص پاتولوژی آن از قسمت ایسموس (محل بین پیش‌معده و سنگ‌دان) و قسمت پیش‌معده و سنگ‌دان معرفی شده است و اعتقاد بر این بوده که این آزمایش نسبت به تهیه لام از مدفوع حساس‌تر و بعد از آن PCR حساسیت بیشتر و دقیق‌تری دارد (۴). همچنین در مطالعه Abdi-Hachsoo و همکاران (۲۰۱۹)، ژنوم ماکرواردوس اورنیتوگاستر در یک گزارش موردی قناری که با میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی گرم قارچ را تشخیص داده بودند، با استفاده از پرایمر پنفنگال ژنوم ماکرواردوس اورنیتوگاستر را ردیابی و تأیید کردند (۱۰).

در مطالعه دیگری Paula و همکاران (۲۰۱۸)، شیوع ماکرواردوس اورنیتوگاستر در بین عروس هلندی، مرغ عشق (Budgerigars) کوتوله برزیلی (lovebird) به‌ترتیب ۷۳/۶۸ درصد (۱۴/۱۹)، ۴۰/۹۰ درصد (۹/۲۲) و ۵۰ درصد (۲/۴) در اوپابا، ایالت Minas Gerais شده است (۱۸). دلایل تفاوت در نتایج می‌تواند به وضعیت عمومی پرنده، تفاوت در حجم نمونه، روش‌های مدیریتی، انتشار جغرافیایی ماکرواردوس اورنیتوگاستر یا روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص این مخمر باشد. همچنین دفع متناوب ماکرواردوس اورنیتوگاستر در برخی از نمونه‌های پرندگان بیمار را نمی‌توان رد کرد، زیرا احتمال دارد منجر به حداقل رساندن شیوع این مخمر در جامعه مورد مطالعه شود. بازرسی پس از مرگ از سیستم گوارش ممکن است موارد دیگری از عفونت ماکرواردوس اورنیتوگاستر را در

کاهش وزن، لاغری، دفع غذای هضم نشده، ملنا، اسهال و استفراغ می‌تواند ناشی از آلودگی به ماکروآبیدوس / اورنیتوگاستر باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قداری و تشکر خود را از دانشگاه آزاد اسلامی و همکاری تخصصی سرکار خانم دکتر شبنم هاشمی ادا می‌کنند. این مقاله بخشی از رسالهٔ دکتری تخصصی است.

References

- 1- Amer M, Mekky H. Avian gastric yeast (AGY) infection (macrorhabdiosis or megabacteriosis). *Bulg J Vet Med.* 2020; 23(4): 397-410.
- 2- Borrelli L, Dipineto L, Rinaldi L, Romano V, Noviello E, Menna LF, et al. New diagnostic insights for *Macrorhabdus ornithogaster* infection. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(11): 3448-50.
- 3- Madani SA, Ghorbani A, Arabkhazaeli F. Successful treatment of macrorhabdiosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) using sodium benzoate. *J Mycol Res.* 2014; 1(1): 21-7. [In persian]
- 4- Phalen D. Implications of *Macrorhabdus* in clinical disorders. *Clin Avian Med.* 2006; 2: 705.
- 5- Baron HR, Stevenson BC, Phalen DN. Comparison of in-clinic diagnostic testing methods for *Macrorhabdus ornithogaster*. *J Avian Med Surg.* 2021; 35(1): 37-44.
- 6- Robino P, Ferrocino I, Rossi G, Dogliero A, Alessandria V, Grosso L, et al. Changes in gut bacterial communities in canaries infected by *Macrorhabdus ornithogaster*. *Avian Pathol.* 2019; 48(2): 111-20.
- 7- Babazadeh D, Ghavami S, Nikpiran H, Dorestan N. Acute megabacteriosis and staphylococcosis of canary in Iran. *J World's Poult Res.* 2015; 5(1): 19-20. [In persian]
- 8- Tomaszewski EK, Logan KS, Snowden KF, Kurtzman CP, Phalen DN. Phylogenetic analysis identifies the 'megabacterium' of birds as a novel anamorphic ascomycetous yeast, *Macrorhabdus ornithogaster* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53(4): 1201-5.
- 9- Ozmen O, Aydogan A, Haligur M, Adanir

نمونه‌ها، توالی به دست‌آمده با توالی ماکروآبیدوس / اورنیتوگاستر شباهتی نداشت. تفاوت در نتایج گسترش لام و PCR ممکن است به دلیل حضور آلودگی بالا با سایر قارچ‌ها باشد. به‌طور کلی آغازگرهای استفاده شده دیدی کلی از حضور انواع آلودگی‌های قارچی به دست می‌دهد و برای بررسی تطابق PCR با نتایج گسترش لام باید از آغازگرهای اختصاصی ماکروآبیدوس / اورنیتوگاستر استفاده شود. در نهایت نتایج این مطالعه نشان داد که در پرندگان ارجاع داده شده به کلینیک‌ها با علائمی نظیر افسردگی،

- R, Kose O, Sahinduran S. The Pathology of *Macrorhabdus ornithogaster* and *Eimeria dunsingi* (Farr, 1960) Infections in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Israel J Vet Med.* 2013; 68(4).
- 10- Abdi-Hachesoo B, Sharifiyazdi H, Haddad-Marandi MR, Kalantari M. Phylogenetic evaluation of *Macrorhabdus ornithogaster* isolated from a case of canary (*Serinus canaria*). *Comp Clin Path.* 2019; 28: 275-8. [In persian]
- 11- Puestow R, Cramer K, Krautwald-Junghanns M-E, Schmidt V. Ribosomal DNA fragments analysis of avian pathogenic *Macrorhabdus ornithogaster*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 201; 131(1): 58-64.
- 12- Sheykhi A, Sheikhi N, Charkhkar S, Brujeni GN. Detection and characterization of circovirus in canary flocks. *Avian Dis.* 2018; 62(2): 137-42. [In persian]
- 13- Brunthaler R, Teufelbauer N, Seaman B, Nedorost N, Bittermann K, Matt J, et al. Trichomonosis in Austrian Songbirds—Geographic distribution, pathological lesions and genetic characterization over nine years. *Animals.* 2022; 12(10): 1306.
- 14- Sullivan PJ, Ramsay EC, Greenacre CB, Cushing AC, Zhu X, Jones MP. Comparison of two methods for determining prevalence of *Macrorhabdus ornithogaster* in a flock of captive budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J Avian Med Surg.* 2017; 31(2): 128-31.
- 15- Razmyar J, Movassaghi AR, Rezaee M. An outbreak of severe *Macrorhabdus ornithogaster* infection in common canaries (*Serinus canarius*

domesticus), Molecular and pathological assay. *Iran J Vet Sci Technol.* 2016; 8(1): 64-8. [In persian]

16- Kheirandish R, Salehi M. Megabacteriosis in budgerigars: diagnosis and treatment. *Comp Clin Path.* 2011; 20: 501-5. [In persian]

17- Filippich L, Hendrikz J. Prevalence of megabacteria in budgerigar colonies. *Aust Vet J.* 1998; 76(2): 92-5.

18- Paula Id, Linhares FP, Kanayama CY, Carvalho Sd, Bittar ER, Campos M, Bittar J. Megabacteria (*Macrorhabdus ornithogaster*) in psittacids kept in commercial establishments in the municipality of Uberaba-MG. *PUBVET.* 2018; 12(2): 1-4.

19- Powers LV, Mitchell MA, Garner MM.

Macrorhabdus ornithogaster infection and spontaneous proventricular adenocarcinoma in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Pathol.* 2019; 56(3): 486-93.

20- Poleschinski JM, Straub JU, Schmidt V. Comparison of two treatment modalities and PCR to assess treatment effectiveness in macrorhabdosis. *Journal of avian medicine and surgery.* 2019;33(3):245-50.

21- Kojima A, Osawa N, Oba M, Katayama Y, Omatsu T, Mizutani T. Validation of the usefulness of 26S rDNA D1/D2, internal transcribed spacer, and intergenic spacer 1 for molecular epidemiological analysis of *Macrorhabdus ornithogaster*. *J Vet Med Sci.* 2022; 84(2): 244-50.



Molecular identification of *Macrorhabdus ornithogaster* in companion bird

Fateme Hamian¹, Nariman Sheikhi^{2*}, Gholamreza Nikbakht Brujeni³, Saeid Char-khkar²

1- Ph.D. Student in Avian Hygiene and Medicine, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: November 24, 2023; Revise: December 3, 2024; Accept: December 5, 2024

 10.22034/nfvm.2025.426402.1215

Summary

Macrorhabdosis, also known as Megabacteriosis, is a wasting disease in birds caused by the fungus *Macrorhabdus ornithogaster*. This study aimed to detect the fungus using PCR from the feces of birds showing clinical signs of infection, and to perform a phylogenetic analysis of the collected isolates. In this study, 54 positive samples were detected among the 300 suspicious birds referred to the wet smear method. Subsequently, the polymerase chain reaction (PCR) technique was employed for the final diagnosis. Positive samples were then subjected to PCR analysis using panfungal primers. For phylogenetic evaluation, 15 samples were sequenced, and the resulting sequences were compared with entries in the World GeneBank to assess their similarity and overlap. A total of 300 stool samples were subjected to analysis using the wet smear technique, of which 54 were found to be positive. Furthermore, 33 samples were identified as positive using the PCR method. Sequencing revealed the presence of *M. ornithogaster* in only two samples from lovebirds. Phylogenetic analysis showed an 86.76%-100% similarity between the isolates from budgerigars and finches and sequences recorded in the NCBI database. These findings highlight that PCR is an effective diagnostic tool for *M. ornithogaster* due to its speed, accuracy, and sensitivity.

Keywords: *Macrorhabdus ornithogaster*, companion birds, phylogenies



تریپسینه کردن، روشی مناسب برای جداسازی روتاویروس های عامل اسهال ویروسی گوساله ها: مقاله مروری

روزبه فلاحی*

دانشیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۰۶ خرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۵ مرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۷ مرداد ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.459586.1242

چکیده

روتاویروس های گروه A، عامل اصلی اسهال در اکثر گونه های دام هستند و مرگ و میر گوساله های زیر یک ماه به دلیل اسهال روتاویروسی در بسیاری از کشورها شایع است و هر ساله خسارات اقتصادی هنگفتی را به بار می آورد. برای تشخیص سریع بیماری می توان از روش های سرولوژیکی و مولکولی استفاده کرد، اما جداسازی و شناسایی ویروس با توجه به خصوصیات بیولوژیکی و ساختار خاص آن با روش های معمول بسیار دشوار بوده و به روش های خاص کشت سلول و نیز تیره های سلولی مناسب احتیاج دارد. تلاش برای تهیه واکسن از سویه های بومی جدا شده در هر کشور به کنترل، مبارزه و احیاناً ریشه کن کردن آن کمک می کند و تا حد زیادی از زیان های اقتصادی ناشی از این بیماری جلوگیری می کند. به طور کلی، روتاویروس ها به مقدار کمی تنها در تعداد محدودی از تیره های سلولی تکثیر می شوند و عفونت لازم برای جداسازی ویروس را در کشت های سلولی ندارند. اما وجود تریپسین در شرایط خاصی باعث افزایش تکثیر و تیتراژ ویروس در کشت سلولی می شود. از طرف دیگر، تریپسین بیش از حد در کشت سلولی نیز برای سلول سمی بوده و باعث مرگ سلولی می شود. این مقاله به تشریح عملکرد تریپسین در عفونت زایی روتاویروس ها و روش استاندارد و کاربردی در غلظت غیر سمی آن برای تیره های سلولی مناسب جهت جداسازی روتاویروس ها می پردازد.

واژگان کلیدی: کشت سلولی، جداسازی، روتاویروس، تریپسین، اسهال ویروسی گوساله ها

مقدمه

روتاویروس‌ها عامل اصلی اسهال در حیوانات پرورشی در جهان هستند. علائم بالینی، تشخیص و اپیدمیولوژی این بیماری در همه گونه‌ها یکسان است (۱، ۲). روتاویروس‌ها اغلب باعث اسهال در گوساله‌های ۱ تا ۲ هفته‌ای می‌شوند. برخی از گوساله‌ها مجدداً با روتاویروس‌ها آلوده می‌شوند و یا به‌طور مداوم ویروس را از طریق مدفوع دفع می‌کنند، اما عفونت در گوساله‌های مسن (بیش از یک ماه) اغلب تحت بالینی است (۲). اسهال روتاویروسی سلامت گوساله‌ها را به خطر می‌اندازد و تولید را در گاو‌ها کاهش می‌دهد. همچنین منجر به کاهش وزن و افزایش مرگ و میر می‌شود. همچنین پتانسیل ابتلا به بیماری مشترک بین انسان و دام را نیز دارد (۳). هفت گروه روتاویروسی از A تا G وجود دارد. گروه‌های A، B و C در انسان و حیوانات یافت می‌شوند، در حالی که ویروس‌های گروه D، E، F و G فقط در حیوانات وجود دارند (۷-۳). این گروه‌ها با پروتئین کپسید میانی (VP6) مشخص می‌شوند. مهم‌ترین مشخصه آنتی‌ژنی روتاویروس‌ها ویژگی سروتیپی آنهاست و بر اساس تعریف نوع تعیین شده توسط روش‌های سرولوژیکی و عمدتاً با آزمایش‌های خنثی‌سازی است. در هر گروه از روتاویروس‌ها، سروتیپ‌ها بر اساس تست‌های کاهش پلاک و خنثی‌سازی با سرم هیپرایمیون به چند سروتیپ تقسیم می‌شوند. همچنین طبق تعریف، ژنوتیپ نوعی است که با روش‌های غیر سرولوژیکی مانند RT-PCR، هیبریداسیون یا تعیین توالی ژنومی تعیین می‌گردد. با استفاده از این آزمایش‌ها، حدود ۱۴ سروتیپ و ۵۱ ژنوتیپ از پروتئین VP7 شناسایی شده که نوع G نامیده می‌شوند و ۱۴ سروتیپ و ۵۸ ژنوتیپ از پروتئین VP4 که نوع P نامیده می‌شوند (۴، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱). تکنیک‌های کشت سلولی معمولاً برای جداسازی ویروس برای اهداف تشخیصی و همچنین تکثیر ویروس برای تولید واکسن یا شناسایی بیشتر ویروس از نظر تنوع آنتی‌ژنی یا تعیین توالی ژن‌های آن استفاده می‌شوند. به‌طور کلی جداسازی روتاویروس‌ها

در شرایط آزمایشگاهی به چند دلیل بسیار مشکل است. این ویروس‌ها را نمی‌توان به‌طور معمول از نمونه‌های مدفوع جدا کرد (۱۲). این ویروس‌ها تنها در تعداد محدودی از تیره‌های سلولی و به میزان کمی تکثیر می‌شوند و عفونت لازم برای جداسازی ویروس را ندارند. اما وجود آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند تریپسین در شرایط خاصی باعث افزایش تکثیر و تیترو ویروس در کشت‌های سلولی می‌شود. از طرف دیگر، مقدار بیش از حد این آنزیم‌ها در کشت سلولی سمی بوده و باعث مرگ سلولی می‌شوند. بنابراین، یک روش استاندارد و عملی در غلظت غیر سمی آن با استفاده از تیره سلولی مناسب برای جداسازی روتاویروس‌ها ضروری است (۳).

ویژگی‌های روتاویروس‌ها: روتاویروس‌ها از خانواده رئوویریده (Reoviridae) هستند. ذرات کامل ویروسی بدون پوشش بوده و دارای قطر ۷۵-۱۰۰ نانومتر می‌باشند و از یک کپسید پروتئینی سه‌لایه متشکل از یک لایه بیرونی، یک لایه میانی و یک لایه داخلی تشکیل شده‌اند. این ویروس‌ها به گرما و pH بسیار مقاوم هستند (۴، ۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۵). ۶۰ زائده به طول ۱۲۰ آنگستروم از سطح صاف لایه بیرونی بیرون آمده و به این ویروس ظاهری چرخ‌مانند داده است. شکل ظاهری روتاویروس‌ها به دلیل پروتئین VP6 (لایه میانی) است (۱۳، ۱۵). ژنوم این ویروس‌ها دارای ۱۱ قطعه RNA دو رشته‌ای (dsRNA) است (۱، ۳، ۶، ۷، ۸، ۱۳، ۱۵، ۱۶). این ویروس‌ها دارای RNA پلیمرز وابسته به RNA و سایر آنزیم‌هایی هستند که قادر به تولید نسخه‌های RNA سرپوش‌دار می‌باشند (۱، ۳، ۱۳). به دلیل وجود ژنوم‌های قطعه قطعه شده، بازآرایی ژنتیکی اغلب در این ویروس‌ها دیده می‌شود (۱، ۳، ۱۳). تکثیر ویروس در سیتوپلاسم سلول‌های آلوده رخ می‌دهد (۱، ۳، ۱۳). کشت ویروس در شرایط آزمایشگاهی با افزودن آنزیم‌های پروتئولیتیک تسهیل می‌شود. این آنزیم‌ها از طریق جداکردن پلی‌پپتید کپسید VP4 خارجی به VP5 و VP8، باعث افزایش عفونت و تسهیل ورود ویروس به سلول‌ها می‌شوند. VP8

تریپسینه کردن، روشی مناسب برای جداسازی روتاویروس‌های ...

با گیرنده‌های روی سلول میزبان که برای اتصال ویروس ضروری هستند، تعامل دارد و باعث افزایش عفونت روتاویروس‌ها می‌شود و VP5 می‌تواند نفوذ غشای سلولی را افزایش دهد (۱، ۳، ۶، ۱۱، ۱۳). این ویروس‌ها سیر مورفونیک منحصر به فردی دارند به‌عنوان مثال، ذرات ویروس با جوانه زدن به شبکه آندوپلاسمی تشکیل می‌شوند و به‌طور موقت دارای یک غشاء می‌شوند. ویروس‌های بدون غشاء با لیز سلول آلوده آزاد می‌شوند (۲، ۹). روتاویروس‌ها دارای شش پروتئین ساختمانی شامل VP1، VP2، VP3، VP4، VP6، VP7 و VP7 و شش پروتئین غیر ساختمانی هستند (۴، ۷، ۸، ۱۰، ۱۴، ۱۵). VP4 یک هم‌گلوپتینین است و در بسیاری از سویه‌های ویروس وجود دارد و نقش اتصال ویروس به سلول را ایفا می‌کند. به موجب اثر پروتئولیتیکی تریپسین، VP4 به دو پروتئین VP5 (با وزن مولکولی تقریبی ۶۰ کیلودالتون) و VP8 (۲۸ کیلودالتون) تبدیل شده که نفوذ ویروس را به داخل سلول تسهیل می‌کند و باعث افزایش عفونت و تیتراژ ویروس می‌شود (۱۶، ۱۷). اگر تریپسین به نمونه‌های مدفوع اضافه نشود، عفونت ویروس در کشت سلولی بسیار کاهش می‌یابد و حتی از بین می‌رود (۶، ۱۲، ۱۸). در این حالت ذرات ویروسی با عمل اندوسیتوز از سطح سلول‌ها حذف می‌شوند و بنابراین عفونت رخ نمی‌دهد (۱۹).

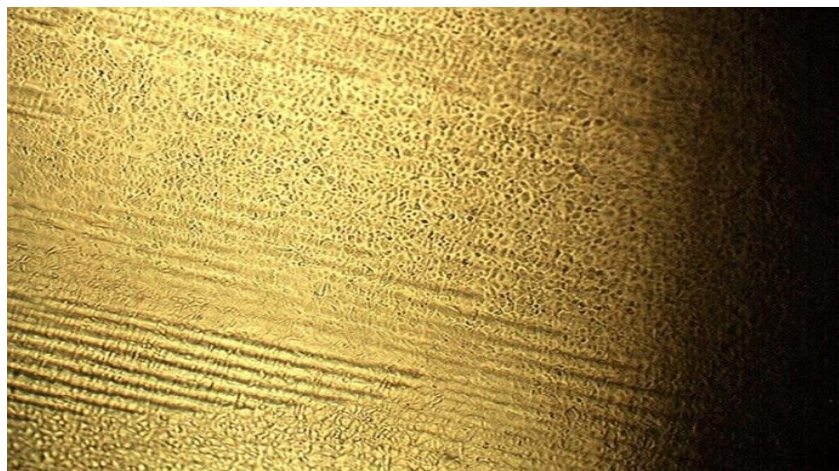
مراحل جداسازی روتاویروس‌ها از نمونه‌های

مدفوع به روش تریپسینه کردن: با رعایت اصول اخلاقی، نمونه‌های مدفوع پس از تحریک رکتوم حیوان (گوساله‌های ۳-۰ ماهه) تهیه می‌شود. نمونه‌های مدفوع با کاردک چوبی تهیه شده و در ظروف استریل درب‌دار ریخته می‌شود. پس از ثبت مشخصات آنها در اسرع وقت (کمتر از ۱۲ ساعت) و بر روی یخ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی منتقل می‌شوند و تا زمان آزمایش در دمای 8°C - قرار داده می‌شوند (۱، ۴، ۸، ۱۱، ۱۴، ۱۵، ۲۰، ۲۱). اگر نمونه‌برداری در زمان شروع بیماری و اوج علائم بالینی انجام شود، احتمال جداسازی ویروس بیشتر است. انتقال سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه و آماده‌سازی و

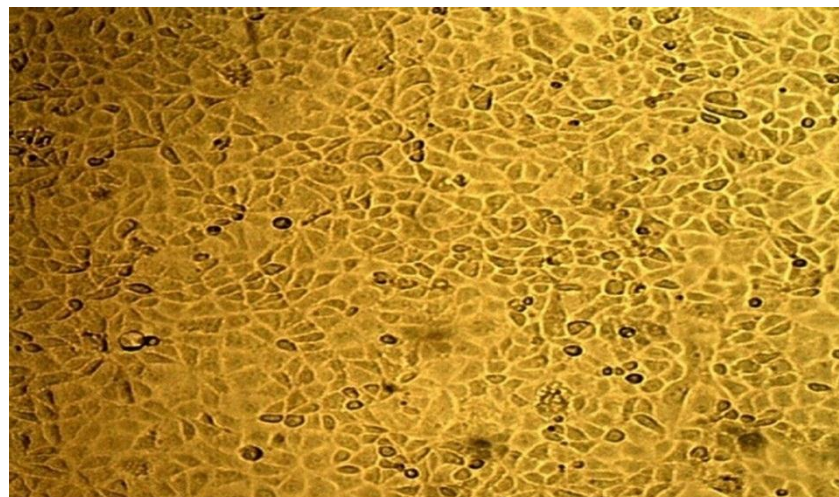
تلقیح سریع به تیره‌های سلولی بدون نگهداری در فریزر نیز به فرآیند جداسازی ویروس کمک می‌کند (۵، ۱۰، ۱۸). تهیه سوسپانسیون مدفوعی ۱۰٪ با استفاده از محلول فسفات بافر سالین (PBS) (۱ گرم مدفوع در ۱۰ میلی‌لیتر PBS، $\text{pH}=7/2$) جهت جداسازی ویروس از نمونه‌های مدفوعی که از نظر آلودگی روتاویروس در تست‌های تشخیصی مثبت هستند صورت می‌گیرد. برای مخلوط و همگن کردن سوسپانسیون، می‌توان از دستگاه ورتکس (Vortex) استفاده کرد یا می‌توان آن را به‌صورت دستی انجام داد (۱، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۱). سپس سانتریفیوژ در 3000 دور در دقیقه در دمای 4°C به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه و برداشت مایع رویی به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر صورت می‌گیرد (۵، ۶، ۷، ۸، ۱۱، ۱۴). مرحله بعد عبور دادن از فیلتر $0/45$ میکرون برای حذف باکتری‌های موجود در مدفوع و ریختن آن در میکروتیوب‌های استریل، تریپسینه کردن نمونه با تریپسین به میزان ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و انکوباسیون در دمای 37°C به مدت ۳۰ دقیقه می‌باشد (۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۸، ۲۱). شستشوی سلول‌های MA104 رشد یافته (با سطح پوششی ۹۰-۸۰ درصد) در لوله‌های کشت سلولی و فلاسک‌های کشت سلولی ثابت (شکل‌های ۱ و ۲) با محلول PBS یا محیط کشت، برای سه مرتبه به‌منظور حذف سرم از کشت سلولی صورت می‌گیرد (۶، ۷، ۱۰، ۱۲، ۱۸). مرحله بعد، تلقیح نمونه تریپسینه شده به سلول‌های رشد یافته MA104 در لوله‌های کشت سلولی و فلاسک‌های کشت سلولی ثابت می‌باشد. مقدار تلقیح برای لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری با سطح کشت ۶ سانتی‌متر مربع، $0/5-0/2$ میلی‌لیتر و برای فلاسک‌های کشت سلولی با سطح کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع، ۱ میلی‌لیتر است (۵، ۶، ۱۰). اعلام شده‌اند، به‌عنوان کنترل منفی تلقیح می‌شوند (۶، ۱۰). همچنین در هر سری از کار، یک فلاسک و لوله کشت سلولی حاوی همان سلول، بدون تلقیح نمونه مدفوع و تلقیح با محلول PBS در شرایط مشابه به همراه

به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه و جمع‌آوری محلول رویی صورت می‌گیرد (۵، ۶، ۱۰). سپس افزودن تریپسین به مقدار ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و قرار دادن در انکوباتور 37°C انجام می‌گردد (۶). لازم به ذکر است که تلقیح در سلول‌های جدید همانند روش قبل صورت می‌گیرد (۶). در صورت عدم مشاهده CPE، پاساژ کور تا ۵ مرتبه متوالی ادامه می‌یابد (۶، ۱۰، ۱۸). یک پاساژ اولیه (P0) و حداقل ۵ پاساژ کور (P1-P5) برای هر نمونه داده می‌شود (۵، ۶، ۱۰). در مجموع در صورت عدم مشاهده CPE در این ۶ پاساژ، می‌توان این نمونه را با اطمینان بالا منفی در نظر گرفت (۵، ۶، ۱۰). در صورت مشاهده CPE در هر پاساژ ممکنه، هنگامی که میزان تخریب سلولی به حدود ۸۰ درصد رسید به فریزر -70°C منتقل می‌شود. عمل ذوب و انجماد برای سه مرتبه انجام و سپس به سلول جدید تلقیح می‌شود (کشت ثابت) و حداکثر ۲-۳ پاساژ دیگر به منظور افزایش تیترو ویروس ادامه داده می‌شود. اگر CPE به‌طور مکرر در پاساژهای انجام شده مشاهده گردید، آماده‌سازی جهت تأیید تشخیص با روش RT-PCR انجام می‌گردد (۷-۵). ابتدا روش RT-PCR دو مرحله‌ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VP6 از نظر روتاو ویروس گروه A بر طبق دستورالعمل‌ها انجام می‌گیرد (۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۲). به منظور شناسایی ژنوتیپ نمونه‌های مثبت روتاو ویروس، PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VP7 برای شناسایی ژنوتیپ G و پرایمرهای اختصاصی ژن VP4 برای ژنوتیپ P انجام می‌گیرد (۵، ۶، ۸، ۱۱). به منظور شناسایی ژنوتیپ G نمونه‌های مثبت روتاو ویروس از محصول اولیه PCR ژن VP7، واکنش Semi nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنوتیپ‌های G5، G6، G8، G10، G11 و غیره برای تعیین تایپ G انجام می‌شود (۷-۵). RT-PCR مؤثرترین روش برای تایپ نمونه‌های مثبت روتاو ویروس می‌باشد. PCR نسبت به روش‌های سروتا پینگ مانند الیزا حساس‌تر و سریع‌تر است (۶، ۲۳، ۲۴).

نمونه‌های تلقیح شده به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود (۶، ۱۰). انکوباسیون در دمای 37°C به مدت ۱-۱/۵ ساعت به منظور جذب ویروس به داخل سلول انجام می‌گیرد. لوله‌های کشت سلولی تلقیح شده در دستگاه کشت لوله چرخان که در انکوباتور است قرار داده می‌شوند (شکل ۳) سرعت چرخش دستگاه کشت لوله چرخان بر روی $0/4$ دور در دقیقه تنظیم می‌شود که کند می‌باشد. فلاسک‌های کشت ثابت نیز در انکوباتور قرار داده می‌شوند (۶، ۷، ۱۸). نمونه تلقیح شده در پایان زمان جذب ویروس از لوله‌ها و فلاسک‌های کشت سلولی تخلیه نمی‌گردد (۶). مرحله بعد افزودن محیط (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی گلوکز بالا، تریپسین و محیط تریپتوز فسفات برات (TPB) جهت غنی‌سازی می‌باشد (تریپسین به میزان $0/5$ میکروگرم در میلی‌لیتر و محیط TPB به میزان ۱۰ درصد به DMEM اضافه می‌شود). مقادیر بیشتر از $0/5$ میکروگرم در میلی‌لیتر تریپسین در محیط کشت، باعث سمیت سلولی می‌شود (۶، ۷، ۱۰، ۲۱). مرحله بعد قرار دادن لوله‌های کشت سلولی تلقیح شده در دستگاه کشت لوله چرخان و فلاسک‌های کشت سلولی تلقیح شده در انکوباتور 37°C می‌باشد (۶). به مدت ۱۴ روز، همه لوله‌ها و فلاسک‌های کشت سلولی روزانه زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده می‌شوند تا اثرات ضایعات سلولی (CPE) مشاهده شود (۵، ۶). در عرض ۱۴ روز پس از بررسی کشت‌های سلولی، در صورت تغییر شدید pH، با استفاده از اسید کلریدریک (HCl) یک نرمال و یا سود سوزآور (NaOH) یک نرمال pH تنظیم می‌گردد (۶). در صورت عدم مشاهده CPE در ۱۴ روز پس از بررسی، لوله‌ها و فلاسک‌ها به فریزر -70°C منتقل می‌شوند تا از آنها پاساژ کور تهیه شود (۶، ۱۸). برای این کار عمل ذوب و انجماد برای سه مرتبه انجام می‌شود (ذوب در دمای اتاق و انجماد در فریزر -70°C) سپس جمع‌آوری نمونه از لوله‌ها یا فلاسک‌های کشت سلولی به مقدار کافی و سانتریفیوژ در $3000-4000$ دور در دقیقه



شکل ۱- سلول های MA104 رشد یافته در سیستم کشت لوله چرخان (بزرگنمایی: x ۲۵) (۶)



شکل ۲- سلول های MA104 رشد یافته در سیستم کشت سلولی ثابت (بزرگنمایی: x ۴۰) (۶)



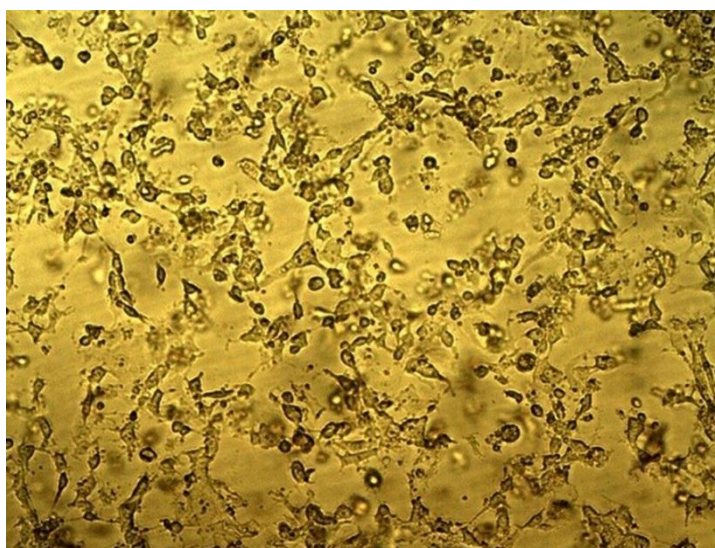
شکل ۳- دستگاه کشت لوله چرخان حاوی لوله های کشت سلولی تلقیح شده در انکوباتور 37°C (۶)

می‌یابد. به طوری که در آخرین پاساژها CPE، ۱-۲ روز پس از تلقیح مشاهده می‌شود و سریع‌تر از قبل (پس از ۱-۲ روز از شروع CPE) به حداکثر میزان تخریب می‌رسد. CPE را می‌توان به صورت گرد، تیره، طویل و مثلثی شدن سلول‌ها و تخریب تدریجی شبیه به رشته‌ای از مروارید مشاهده کرد. در نمونه‌های کنترل منفی، هیچ‌گونه آسیب سلولی پس از پاساژ اولیه و کور نباید مشاهده شود.

معمولاً ظهور CPE از روز سوم یا چهارم پس از تلقیح شروع می‌شود و پس از ۲-۳ روز به حداکثر تخریب سلولی می‌رسد که حدود ۸۰-۹۰ درصد است (شکل‌های ۴ و ۵). در حداکثر تخریب سلولی، لوله‌ها و فلاسک‌های حاوی CPE به فریزر 70°C منتقل می‌شوند و پس از ۳ مرتبه عمل ذوب-انجماد، مجدداً بر روی سلول‌های جدید تلقیح می‌شوند و این کار تا ۳-۴ مرتبه ادامه می‌یابد. با افزایش تعداد پاساژها، زمان ظهور CPE پس از تلقیح کاهش



شکل ۴- CPE در سلول‌های MA104 در سیستم کشت لوله چرخان (بزرگنمایی: x ۲۵) (۵، ۶)



شکل ۵- CPE در سلول‌های MA104 در سیستم کشت سلولی ثابت (سلول‌های آسیب‌دیده بزرگ، گرد، تیره، مثلثی و گرانوله) (بزرگنمایی: x ۴۰) (۵، ۶)

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت روتاویروس در گوساله‌ها باعث خسارات اقتصادی سنگین به دلیل سرایت و مرگ و میر، هزینه‌های بالا و همچنین کاهش رشد می‌شود. روتاویروس‌ها تنوع آنتی‌ژنی زیادی دارند و این مسئله مشکلاتی را در تشخیص، اپیدمیولوژی و واکسیناسیون ایجاد می‌کند (۱)، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۱، ۱۴، ۲۵). روتاویروس‌های گروه A با توجه به ویژگی‌های آنتی‌ژنی و توالی ژنومی پروتئین‌های VP4 و VP7 به ژنوتیپ‌های G و P تقسیم می‌شوند. این ژنوتیپ‌ها را می‌توان با روش‌های سرولوژیکی یا مولکولی شناسایی کرد (۶، ۸، ۱۱). بر این اساس سروتیپ‌ها یا ژنوتیپ‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. تاکنون ۵۱ ژنوتیپ G و ۵۸ ژنوتیپ P در روتاویروس‌های گروه A شناسایی شده‌اند (۸). از میان آنها، ۸ ژنوتیپ G شامل G1، G3، G5، G6، G7، G8، G10 و G11 و ۶ ژنوتیپ P شامل P[1]، P[5]، P[11]، P[14]، P[17] و P[21] در اسهال روتاویروسی گاوی نقش دارند و از بین آنها ژنوتیپ‌های G6، G8 و G10 و همچنین P[1]، P[5] و P[11] به دلیل شیوع بالای آنها در سراسر جهان قابل توجه هستند (۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱). Sunil-chandra و Mahalingam (۱۹۶۶) ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی و غیر اسهالی از گوساله‌های گاو میش ۱۵۰-۱ روزه از ۷ گاوداری مختلف در سریلانکا را با روش الیزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال آزمایش کردند. از این تعداد، ۲۸ نمونه از نظر روتاویروس گروه A مثبت بودند. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، آنها را تریپسینه کرده (به میزان ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و به سلول‌های MA104 در سیستم کشت لوله چرخان تلقیح کردند. سپس محیط نگهدارنده حاوی تریپسین (به میزان ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و محیط تریپتوز فسفات مایع را به سلول‌ها اضافه کردند و پس از ۶-۴ پاساژ متوالی موفق به جداسازی ویروس شدند. کشت سلولی در لوله و قرار دادن آن در دستگاه کشت لوله چرخان با سرعت کم، سطح کشت را در تمام دیواره‌های داخلی آنها فراهم کرده و

تریپسینه کردن، روشی مناسب برای جداسازی روتاویروس‌های ...

باعث افزایش سطح کشت سلول می‌شود. همچنین پس از افزودن نمونه ویروسی، این چرخش ملایم شانس بیشتری را برای قرار گرفتن ویروس‌ها در سطح کشت سلولی فراهم می‌کند. ظهور CPE معمولاً در ۴ روز پس از تلقیح مشاهده شد. با تکرار پاساژ، زمان مشاهده CPE حتی به ۲ روز پس از تلقیح کاهش یافت. با افزایش تعداد پاساژ سلول‌ها با CPE، در پاساژ نهم، ویروس به تکثیر و ظهور علائم CPE در سیستم کشت ثابت نیز عادت کرد. در روش نمونه‌های تهیه شده از سلول‌های حاوی CPE، در روش آنتی‌بادی فلورسنت غیر مستقیم، با استفاده از آنتی‌سرم هیپرایمیون، روتاویروس گروه A تأیید شد (۱۹). گزارش‌هایی در مورد حساسیت تیره‌های سلولی کلیه میمون (BSC-1 و LLC-MK2) و همچنین سلول‌های فیبروبلاستی دیپلوئید انسانی (MRC-5) و تیره سلولی کلیه خوک (IBRS-2) به روتاویروس‌ها وجود دارد که ۱۰-۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تریپسین به محیط کشت اضافه می‌شود (۱۲). همچنین گزارشی از جداسازی روتاویروس گاوی از سلول کلیه میمون (BSC-1) وجود دارد (۱۲). تکثیر روتاویروس گاوی نیز در سلول‌های Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) گزارش شده است (۱۰). در بسیاری از تحقیقات، استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند پانکراتین و تریپسین برای جداسازی روتاویروس‌ها توصیه شده است. این آنزیم‌ها پروتئین ساختمانی VP4 را به VP8 و VP5 می‌شکنند و با این عمل، اتصال و ورود ویروس به سلول تسهیل می‌شود (۱۰). بسیاری از محققان افزایش تیتراژ روتاویروس‌های گاوی را در حضور تریپسین توصیف کرده‌اند. اگر تریپسین به نمونه‌های مدفوع اضافه نشود، عفونت ویروس در کشت سلولی بسیار کاهش می‌یابد و حتی از بین می‌رود (۶، ۱۲، ۱۹). با روش‌های معمول، جداسازی روتاویروس‌ها امکان پذیر نیست. برای اولین بار در سال ۱۹۶۹، روتاویروس به‌عنوان عامل اسهال در گوساله‌های نوزاد معرفی شد (۱۲). Babiuk و همکاران (۱۹۷۷) از سلول‌های کلیه میمون (BSC-1) و محیط EMEM برای جداسازی

محیط کشت توسط Sato و همکارانش در سال ۱۹۸۱ ارائه شد (۵، ۶، ۱۲). افزودن تریپسین به محیط کشت نه تنها عفونت‌زایی ویروس را افزایش می‌دهد، بلکه تعداد ذرات عفونی را نیز افزایش می‌دهد. ذرات ویروسی معیوب نسبت به ویروس‌های کامل به تریپسین حساس‌ترند و در حضور تریپسین از بین می‌روند. تریپسین همچنین اینترفرون را غیر فعال می‌کند. بنابراین، تریپسین باعث افزایش عفونت می‌شود (۱۲). مکانیسم اثر تریپسین توسط Arias و همکاران در سال ۱۹۹۸ ارائه شد و این است که VP4 به VP5 و VP8 شکسته می‌شود. آنها از سلول‌های MA104 ۴۸ ساعته برای تلقیح ویروس استفاده کردند. آنها توصیه کردند که پس از تلقیح نمونه به کشت سلولی و زمان لازم برای جذب نمونه تلقیح شده، در صورتی که نمونه برداشته نشود و محیط کشت حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تریپسین به آن اضافه گردد، بهترین نتیجه حاصل خواهد شد. به‌عنوان کنترل منفی از محلول PBS ۰/۱ مولار و $pH=7.2$ استفاده شد. تخریب کامل سلولی ۹۶ ساعت پس از ظهور CPE رخ داد. همچنین مقادیر بیشتر از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از تریپسین در محیط کشت باعث سمیت سلولی می‌شود (۱۲). Rodriguez و همکاران (۲۰۰۴) روتاویروس گاوی را با استفاده از سلول‌های MA104 جدا کردند (۲۶). Villarreal و همکاران (۲۰۰۶) موفق به جداسازی روتاویروس از جوجه‌ها با استفاده از سلول‌های MA104 شدند (۱۸). Castrucci و همکاران (۱۹۸۳) روتاویروس گاوی را با استفاده از سلول‌های MA104 و تریپسین کردن نمونه‌های مدفوع و افزودن تریپسین به محیط نگهداری، جدا کردند. آنها نتوانستند ویروس را بدون استفاده از تریپسین جدا کنند (۳۱-۲۷).

روتاویروس گاوی استفاده کردند. قبل از تلقیح، سلول‌ها دو بار با محلول هنکس (Hanks) شسته شده تا سرم از محیط خارج شود. از نمونه‌های اسهالی گوساله‌ها که در روش ایمونوفلورسانس ۱۰۰ درصد آلوده به روتاویروس گاوی بودند، ذرات ویروسی در ۴۲ درصد نمونه‌های مدفوع در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد. آنها با تریپسین کردن نمونه‌ها و تلقیح آنها در کشت سلولی، موفق به جداسازی ویروس در ۷۵ درصد از نمونه‌ها شدند. با حذف تریپسین، فقط در ۱۵ درصد از نمونه‌ها ویروس جدا شد (۱۲). به‌طور کلی، جداسازی روتاویروس‌ها دشوار است. برای سایر ویروس‌ها می‌توان از چندین سلول مختلف استفاده کرد، اما برای روتاویروس‌ها، مناسب‌ترین سلول، MA104 است (این سلول توسط OIE به‌عنوان بهترین سلول برای جداسازی روتاویروس‌ها معرفی شده است) (۷-۵). در ابتدا تصور می‌شد که وجود برخی آنتی‌بادی‌ها در مدفوع، از جداسازی ویروس در کشت سلولی جلوگیری می‌کند و تریپسین آن آنتی‌بادی‌ها را غیر فعال می‌کند و در نتیجه ویروس را آلوده می‌کند. اما بعداً مشخص شد که این فرضیه درست نیست. فرضیه‌هایی که اکنون مورد بحث قرار می‌گیرند عبارتند از اینکه تولید تعداد زیادی از ذرات ویروسی که معیوب هستند و قادر به تکثیر نیستند، همچنین تولید و نشت برخی از مهارکننده‌ها مانند اینترفرون در داخل محیط کشت و نیز وجود برخی از مواد در خارج از پیکره ویروس یا اجزای سلول میزبان از پوشش‌برداری و تکثیر ویروس جلوگیری می‌کنند (۱۲). اولین جداسازی روتاویروس‌ها از کشت سلولی در سال ۱۹۷۲ توسط Mebus و همکاران انجام شد. در سال ۱۹۶۹، آنها برای اولین بار بیماری اسهال روتاویروسی را در گوساله‌ها توصیف کردند. روش تریپسین کردن نمونه قبل از تلقیح و افزودن تریپسین به

References

1- Aliyu AM, Aminu M, Ado SA, Jatau ED. Epidemiological studies on rotavirus associated

with diarrhoea among calves and children in Kaduna state, Nigeria. *BAJOPAS*. 2018; 11: 101-105.

- 2- Radostitis OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Saunders-Elsevier, Philadelphia. 2007.
- 3- Geletu US, Usmael MA, Bari FD. Rotavirus in calves and its zoonotic importance. *Vet Med Int*. 6639701. 2021.
- 4- Ahmed NU, Khair A, Hassan J, Noor Ali Khan MAH, Rahman AK, Hoque MA, et al. Risk factors for bovine rotavirus infection and genotyping of bovine rotavirus in diarrheic calves in Bangladesh. *PLOS ONE*. 2022; 17: e0264577.
- 5- Fallahi R. Isolation and G-typing of rotaviruses from diarrheal calves in Tehran and Alborz provinces, Iran. Paper presented at: The 1st International Congress of Large animal Internal Medicine, School of Veterinary Medicine, Shiraz, Iran, 6 May 2016; (p: 1-4). [In Persian]
- 6- Fallahi R, Bakhshesh M, Lotfi M. Isolation and G-typing of rotaviruses from diarrheal calves in Tehran and Alborz provinces, Iran. *Arch Razi Inst*. 2015; 70: 237-243.
- 7- Pardo-Mora D, Vargas-Bermudez DS, Oliver-Espinosa O, Jaime-Correa J. Molecular characterization of rotaviruses isolated from calves with bovine neonatal diarrhea (BND) in Colombia. *Infectio*. 2018; 22: 99-104.
- 8- Aksoy E, Kara E, Yagci BB, Azkur AK. Investigation of bovine coronavirus and bovine rotavirus in calves with neonatal diarrhea in Kırıkkale and surrounding provinces. *MAKU Journal of Health Sciences Institute*. 2021; 9: 38-46.
- 9- Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MA, Leite JP, Richtzenhain LJ. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil. 1996-1999. *Vet Microb*. 2004; 99: 167-173.
- 10- Ates O, Yesilbag K. Characterization of bovine rotavirus isolates from diarrheic calves in Turkey. *Mol Biol Rep*. 2023; 50: 3063-3071.
- 11- Liu X, Yan N, Yue H, Wang Y, Zhang B, Tang C. Detection and molecular characteristics of bovine rotavirus A in dairy calves in China. *J Vet Sci*. 2021; 22, e69.
- 12- Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J Clin Microbiol*. 1977; 6: 610-617.
- 13- Bertoni E, Aduriz M, Bok M, Vega C, Saif L, Aguirre D, et al. First report of group A rotavirus and bovine coronavirus associated with neonatal calf diarrhea in the northwest of Argentina. *Trop Anim Health Pro*. 2020; 52: 2761-2768.
- 14- Medeiros TNS, Lorenzetti E, Massi RP, Alfieri AF, Alfieri AA. Neonatal diarrhea and rotavirus A infection in beef and dairy calves, Brazil, 2006-2015. *Pesqui Vet Bras*. 2020; 40: 7-11.
- 15- Patel J, Mathakiya R, Golaviya A. Detection of bovine rotavirus from diarrheic bovine calves in Gujarat region, India. *Int J Current Microbiol App Sci*. 2019; 8: 1282-1293.
- 16- Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol*. 2004; 78: 2310-2318.
- 17- Estes MK, Cohen I. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. 1989; 53: 410-449.
- 18- Villareal LY B, Uliana G, Valenzuela C, Chacon JLV, Saidenberg ABS, Sanches AA, et al. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. *Braz J Poultry Sci*. 2006; 8: 187-191.
- 19- Sunil-Chandra NP, Mahalingam S. Isolation and subgrouping of rotaviruses from buffalo calves in Sri Lanka. *Res Vet Sci*. 1996; 60: 187-189.
- 20- Fallahi R, Sadri R. Preparation of primary cell culture from honey bee (*Apis mellifera*) by enzymatic disaggregation and planting method. Paper presented at: 13th Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AITVM) Conference, Bangkok, Thailand, 24 August 2010, (p: 212-213).
- 21- Fallahi, R. Review on application and preparation of cell cultures of honey bee (*Apis mellifera*) Research in Karyotic Cell & Tissue. 2020; 1: 37-43. [In Persian]
- 22- Gomara MI, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*. 2002; 76: 6596-6601.
- 23- Asmah RH, Green J, Armah GE, Galimore CI, Gray JJ, et al. Rotavirus G and P genotypes in rural Ghana. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 1981-1984.
- 24- Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 1338-1340.
- 25- Brunauer M, Roch FF, Conrady B. Prevalence of worldwide neonatal calf diarrhoea caused by bovine rotavirus in combination with bovine

coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium spp*: A meta-analysis. *Animals*. 2021; 11, 1014.

26- Rodriguez CAR, Brandao PE, Ferreira F, Gregori F, Buzinaro MG, Jerez JA. Improved animal rotavirus isolation in MA104 cells using different trypsin concentration. *Arquivos do Instituto Biologico, Sao Paulo*. 2004; 71: 437-441.

27- Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, Cilli V, Donelli G, Angelillo G, *et al*. A study of cytopathic rotavirus strains isolated from calves with acute enteritis. *Comparative Immunology. Microbiol Infec Dis*. 1983; 6: 253-264.

28- Martin CSS, Lopez T, Arias F, Lopez S.

Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol*. 2004; 78(5): 2310-2318.

29- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary Virology*. 3rd Edition, Academic Press, San Diego, California. 1999.

30- Altenburg BC, Graham DY, Estes MK. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol*. 1980; 46, 75-85.

31- Knipe DM, Howley PM. Rotaviruses and their replication, In: Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, and Roizman B. *Fields Virology*. 6th edition, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013; p: 1347-1401.




Trypsinization is a Suitable Method to Isolate Rotaviruses Causing Viral Diarrhea in Calves: A Review

Roozbeh Fallahi

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

Receive: May 26, 2024; Revise: August 5, 2024; Accept: August 7, 2024

 [10.22034/nfvm.2024.459586.1242](https://doi.org/10.22034/nfvm.2024.459586.1242)

Summary

Group A rotaviruses are the main cause of diarrhea in most livestock species, and the death of calves under one month due to rotavirus diarrhea is common in many countries and causes huge economic losses every year. Serological and molecular methods can be used for quick diagnosis of the disease, but isolation and identification of the virus causes the disease in terms of the specific biological and structural characteristics of this virus is very difficult in usual methods, and needs to special methods of cell culture and suitable cell line. The effort to prepare a vaccine from the native strains isolated in each country helps to control, combating and possibly eradicate it and prevents the economic losses caused by this disease to a great extent. In general, rotavirus small amount reproduces only in a limited number of cell lines and they do not have the infectivity necessary to isolate the virus. But the presence of trypsin, under certain conditions, increases the proliferation and titer of the virus in cell cultures. On the other hand, too much trypsin in cell culture is toxic and causes cell death. This article describes the function of trypsin in the infectivity of rotaviruses, and standard and practical method in its non-toxic concentration for the appropriate cell line to isolate rotaviruses.

Keywords: *Cell culture, Isolation, Rotavirus, Trypsin, Viral diarrhea of calves*




بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های رازیانه و زیره سبز بر روی سویه‌های انتروباکتر فکالیس و اسینتوباکتر بومانی در شرایط آزمایشگاهی

یحیی مرادی^۱، مهدی رشدی ملکی^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران.

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

دریافت مقاله: ۱۵ اردیبهشت ۱۴۰۳، بازنگری: ۲۴ خرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۷ خرداد ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.455730.1236

چکیده

برای مقابله با کمبود ترکیبات ضد میکروبی جدید و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گیاهان می‌توانند یک راه حل بالقوه باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی آزمایشگاهی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های رازیانه و زیره سبز بر روی سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و اسینتوباکتر بومانی می‌باشد. در این روش محلول اسانس در غلظت معین به دیسک‌های استریل اضافه و به محیط کشت میکروبی انتقال داده شدند. برای بررسی بازدارندگی رشد به روش دیسک انتشاری از سوسپانسیون باکتری بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار اضافه گردید و همچنین برای بررسی MIC و MBC اسانس مورد نظر رقت‌های 10^1 و 10^2 تهیه شد و در آخر دانسیته نوری در طول موج ۵۴۰ اندازه‌گیری گردید. نتایج بازدارندگی از رشد به روش دیسک انتشاری نشان داد که دو باکتری اسینتوباکتر بومانی و انتروباکتر فکالیس قطر $1/2$ میلی‌متر ایجاد کرده است. نتایج MIC و MBC اسانس زیره سبز بر روی اسینتوباکتر بومانی در رقت 10^3 (MIC) به میزان $0/078$ در غلظت 2000 ppm اثر مهاری ایجاد کرد و در MBC در رقت 10^2 به میزان $0/135$ در این باکتری اثر کشندگی نیز دارد. در انتروباکتر فکالیس در رقت 10^1 هر دو MIC و MBC به میزان $0/311$ در غلظت 2000 ppm اثر مهاری و کشندگی دارند. با توجه به گسترش مقاومت دارویی در سویه‌های بیماری‌زا گیاهان دارویی با اثرات ضد میکروبی گزینه مناسب با عارضه کم می‌باشند.

واژگان کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، انتروباکتر فکالیس، اسانس زیره سبز، اسانس رازیانه، مقاومت دارویی

سازمان بهداشت جهانی (WHO) اعلام کرده که ۸۰ درصد کشورهای در حال توسعه از داروهای سنتی مشتق شده از گیاهان دارویی بهره مند هستند (۱، ۲). در حالی که تعداد کل گونه‌های گیاهی تقریباً ۳۷۴۰۰۰ گونه تخمین زده می‌شود، تنها ۲۸۱۸۷ گونه توسط انسان‌ها به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. (۳، ۴). WHO همچنین نام بیش از ۲۰،۰۰۰ گونه از گیاهان دارویی را ثبت کرده است و گیاهان دارویی را یکی از منابع بالقوه داروهای جدید توصیف کرده است (۵، ۶).

بیش از ۱۰۰ کشور، مقرراتی را برای گیاهان دارویی تدوین کرده‌اند. و بیش از ۱۳۴۰ گیاه با فعالیت ضد میکروبی مشخص وجود دارد و بیش از ۳۰،۰۰۰ ترکیب ضد میکروبی از گیاهان جدا شده است (۷). علاوه بر این، تخمین زده شده است که ۱۴ تا ۲۸ درصد از گونه‌های گیاهی عالی، دارویی هستند و ۷۴ درصد از ترکیبات زیست‌فعال مشتق‌شده از گیاهان بر اساس کاربردهای پزشکی کشف شده‌اند (۸).

استفاده گسترده، نامناسب، نامنظم و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ظهور مقاومت ضد میکروبی شده است و بسیاری از داروهای موجود در حال حاضر را بی‌اثر کرده است (۹). بنابراین، تقاضای فزاینده‌ای برای تولید عوامل ضد میکروبی جدید وجود دارد که قادر به کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقابله با توسعه مقاومت باشند. این مسأله محققان را به جداسازی و شناسایی مواد شیمیایی زیست‌فعال جدید از گیاهان، برای مقابله با مقاومت میکروبی هدایت کرده است (۱۰).

ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی ممکن است رشد باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و تک‌یاخته‌ها را با مکانیسم‌های متفاوتی نسبت به ضد میکروبی‌های کنونی مهار کنند و ممکن است ارزش بالینی قابل توجهی در درمان سویه‌های میکروبی مقاوم داشته باشند (۱۱). برخی از این ترکیبات فعال هم فعالیت ضد باکتریایی ذاتی و هم فعالیت‌های اصلاح‌کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان

می‌دهند و برخی از آنها اگرچه به تنهایی به‌عنوان آنتی‌بیوتیک مؤثر نیستند، وقتی با آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیب شوند، می‌توانند به غلبه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها کمک کنند (۱۲).

اسینتوباکتر بومانی شایع‌ترین گونه‌ای است که از نمونه‌های بالینی جدا می‌شود. این باکتری از عوامل بیماری‌زای فرصت طلب بوده که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. *اسینتوباکتر بومانی* از خون، خلط، پوست، مایع پلور و ادرار جدا می‌شود. بیماری‌زایی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به توانایی این ارگانیزم در تولید بیوفیلم بر سطوح و سلول‌های انسان و مقاومت آن نسبت به مواد ضد میکروبی مرتبط می‌شود. بسیاری از سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به چندین دارو مقاوم بوده و درمان عفونت‌های ناشی از آن می‌تواند دشوار باشد (۱۳).

انتروباکتر فکالیس باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. انتقال *انتروکوکوس فکالیس* اغلب زمانی اتفاق می‌افتد که سویه‌های اندوژنوس به سایر نقاط بدن راه پیدا می‌کنند. به‌طور مثال، *انتروکوکوس فکالیس* ممکن است در حین فعالیت لوله گوارش یا دستگاه تناسلی وارد جریان خون شده و قسمت‌های دیگر بدن را آلوده کند و باعث بروز عفونت‌هایی مانند اندوکاردیت شود. با این وجود *انتروکوکوس فکالیس* می‌تواند از فردی به فرد دیگر نیز منتقل شود. این انتقال از طریق تماس مستقیم با افراد و یا استفاده‌ی مشترک از تجهیزات پزشکی آلوده صورت گرفته و اغلب سبب ایجاد سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌شود. بیماران دارای نقص ایمنی در معرض خطر بالای ابتلا به عفونت هستند (۱۴).

وانکومایسین معمولاً در موارد عفونت‌های *انتروکوکوسی* مقاوم به دارو مؤثر است اما در مواردی مقاومت به وانکومایسین نیز گزارش شده است. در صورت بروز مقاومت به وانکومایسین ممکن است لینزولید تجویز شود. معمولاً برای جلوگیری از ابتلای بیماران بستری به عفونت‌های *انتروکوکوسی*، به‌ویژه *انتروکوکوس فکالیس*، به بیماران که مبتلا به اختلالات دریچه قلب هستند، قبل از

ملی آمریکا) انجام شد. این روش به‌ویژه برای شناسایی ترکیبات مختلف در روغن‌های اسانسی استفاده می‌شود. اسپکتروم‌های جرمی حاصل از این تجزیه و تحلیل با اسپکتروم‌های موجود در کتابخانه‌ها مقایسه شده و ترکیبات شناسایی می‌شوند (۱۶).

باکتری‌های مورد استفاده: در این مطالعه از باکتری‌های اسیتوباکتر بومانی ATCC 1137 و انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 استفاده گردید. این سوبیه‌ها از شرکت راسژن شیراز تهیه شدند.

آزمایش دیسک آگار دیفیوژن: این روش معمول‌ترین شکل ارزیابی مواد ضد میکروبی است. در این روش ابتدا محلول اسانس را در غلظت معین به دیسک‌های استریل اضافه کرده و سپس دیسک‌ها به محیط کشت میکروبی انتقال داده می‌شود. برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) برای باکتری‌ها تهیه گردید. سپس غلظت نیم مک فارلند از نمونه‌های میکروبی مورد آزمون که در مرحله رشد لگاریتمی بودند تهیه گردید و در سطح محیط‌های کشت، کشت داده شد. دیسک‌های آماده شده از عصاره‌ها و فراکشن‌های مورد بررسی، پس از خشک شدن کامل حلال ترکیبات، بر روی محیط‌های کشت داده شده منتقل گردید. به‌منظور مشخص نمودن اثرات ضد میکروبی حلال مورد استفاده برای ترکیبات که DMSO بود، یک دیسک DMSO حاوی غلظت مشابهی از نمونه‌های مورد بررسی تهیه و استفاده شد. کشت‌ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۲۴-۱۸ ساعت برای باکتری‌ها گرماگذاری شد. نتایج بر اساس روش Kirby bauer و بر حسب میلی‌متر قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شدند (۲۴).

بررسی بازدارندگی از رشد به روش دیسک انتشاری: پس از تلقیح سوسپانسیون باکتری با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

عمل روده یا مجاری ادراری پنی‌سیلین و جنتامایسین داده می‌شود. در حال حاضر واکنشی برای جلوگیری از ابتلا به عفونت ناشی از انتروکوکوس فکالیس در دسترس نیست (۱۵). با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برخی باکتری‌ها، مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های زیره سبز و رازیانه بر روی اسیتوباکتر بومانی و انتروباکتر فکالیس در شرایط آزمایشگاهی را طراحی کرده تا اثرات مفید اسانس‌های این گیاهان در درمان عفونت‌های حاصله مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

روش اسانس‌گیری: پس از تهیه گیاهان مورد نظر به‌صورت خشک شده، نمونه‌های گیاهی با استفاده از دستگاه آسیاب پودر و برای اسانس‌گیری آماده شدند. برای تهیه اسانس، از کلونجر استفاده شد. به این صورت که مقدار ۶۰ گرم از پودر خشک گیاه را در ۱/۵ لیتر آب مقطر درون بالن دستگاه ریخته و روی بخاری برقی به مدت ۴ ساعت گذاشته تا جوشانده شود و توسط شیر تخلیه عصاره از عرق گیاهی جداسازی شد.

تجزیه ترکیبات شیمیایی اسانس‌های مورد آزمایش به روش GC/MS. آنالیز کروماتوگرافی اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی نوع Perkin Elmer انجام شد. در این روش، از ستون، با استفاده از ضربه الکترونیکی تحت انرژی ۷۰ eV طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه‌ریزی دما به این شکل بود که در ابتدا دما به مقدار ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه تنظیم شد، سپس با افزایش ۸ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به مدت ۱۸ دقیقه به دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد رسید. بردار گاز از هلیوم با جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. تحلیل اسپکتروم‌های جرمی (GC-MS) از روغن‌های اسانسی به‌وسیله مقایسه آنها با اسپکتروم‌های جرمی موجود در کتابخانه‌های وایلی Wiley NBS75K.L و NIST/EPA/NIH (نسخه ۲۰۰۲، مؤسسه استانداردهای

در انکوباتور نگهداری شدند. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر اسانس معادل ۵ میلی‌گرم، با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر شش میلی‌متر بارگزاری شده و متانول به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس دیسک‌های کاغذی حاوی اسانس در فاصله‌های مشخص قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC): برای حل

نمودن اسانس‌های رازیانه و زیره سبز از محلول ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکساید استفاده شد، به این صورت که ابتدا به میزان ۰/۱ گرم از اسانس‌های مورد مطالعه به لوله‌های آزمایش محتوی ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکساید افزوده شد و با استفاده از شیکر لوله آزمایش تا ایجاد یک سوسپانسیون شیری رنگ تکان داده شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC): جهت

تعیین کمترین غلظت کشندگی اسانس‌های گیاهی، ابتدا با کمک پنس استریل، دیسک‌هایی را که به‌منظور تعیین MIC در سطح آگار گذاشته شده بودند برداشته و سپس توسط لوب استریل از ناحیه عدم رشد ایجاد شده در زیر هر دیسک، نمونه‌برداری کرده و در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌های کشت به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوباتور شدند. کمترین رقتی از اسانس‌ها که توانسته بود موجب مرگ باکتری شود، از عدم رشد باکتری در پلیت مشخص گشته و به‌عنوان MBC آن اسانس در نظر گرفته شد.

تست دانسیته نوری (OD): برای مشاهده جذب

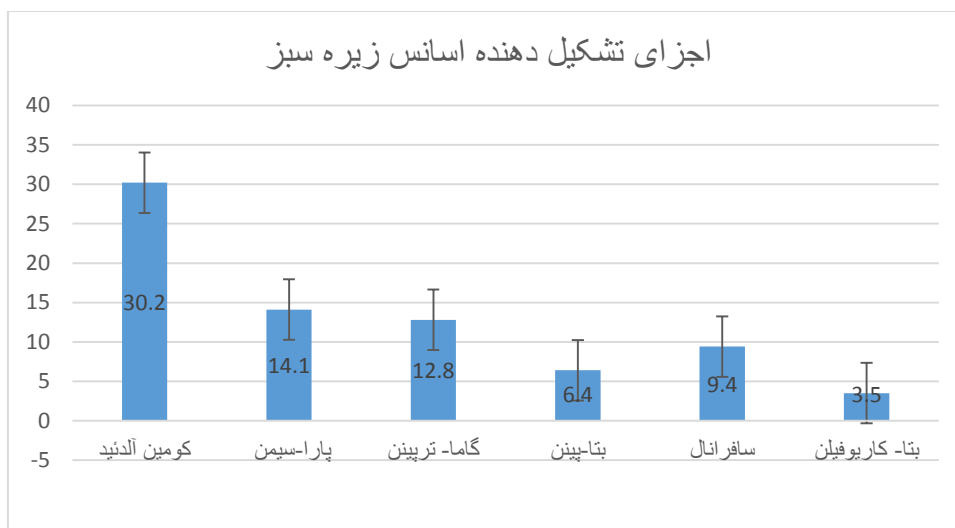
نمونه‌ها، روی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

اسانس‌های گیاهی اضافه گردید. سپس مقدار ۰/۵ سی‌سی باکتری در غلظت نیم مک فارلند به محیط کشت‌های حاوی باکتری تلقیح شد. نمونه‌های کنترل مثبت (حاوی محیط کشت و میکروارگانیزم فاقد اسانس گیاه) برای نشان دادن مشخصات رشد میکروبی میکروارگانیزم و کنترل منفی (حاوی محیط کشت و عصاره گیاه فاقد میکروارگانیزم) تا نشان دهد که هیچ آلودگی باکتریایی در محیط وجود ندارد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد (۱۷).

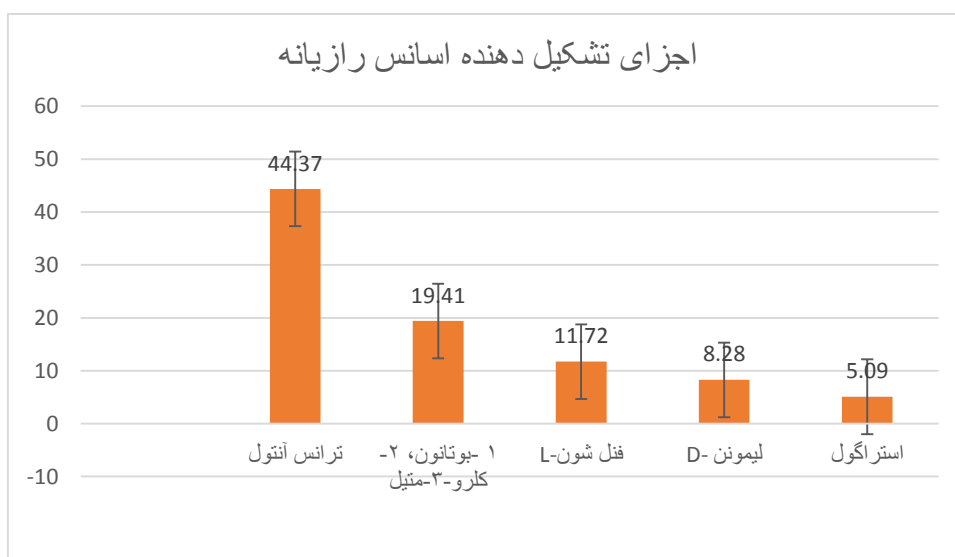
نتایج

نتایج حاصل از تجزیه و ترکیب اسانس‌ها به

روش GC/MS در اسانس زیره سبز ۲۰ ترکیب فعال شناسایی گردید که فراوانی ۸۳/۷ درصد از اسانس را تشکیل داد. اجزای مهم تشکیل‌دهنده این ترکیب شامل کومین آلدئید (۳۰/۲ درصد)، پارا-سیمن (۱۴/۱ درصد)، گاما-ترپنین (۱۲/۸ درصد)، بتا-پینن (۶/۴ درصد)، سافرانال (۹/۴ درصد) و بتا-کاربوفیلین (۳/۵ درصد) تعیین شد. در اسانس رازیانه ۲۵ ترکیب فعال شناسایی گردید که فراوانی ۹۷/۵۲ درصد از اسانس را تشکیل داد. اجزای مهم تشکیل‌دهنده این ترکیب شامل ترانس آنتول (۴۴/۳۷ درصد)، ۱-بوتانون، ۲-کلرو-۳-متیل (۱۹/۴۱ درصد)، L-فنل شون (۱۱/۷۲ درصد)، D-لیمونن (۸/۲۸ درصد) و استراگول (۵/۰۹ درصد) شناسایی شد. تمامی ترکیبات و شاخص کواتس هر دو اسانس رازیانه و زیره را نشان می‌دهد. نمودارهای ۱ و ۲ مقدار فراوانی ترکیبات فعال اسانس‌های زیره سبز و رازیانه را نمایش می‌دهد.



نمودار ۱- اجزای تشکیل دهنده اسانس زیره



نمودار ۲- اجزای تشکیل دهنده اسانس رازیانه

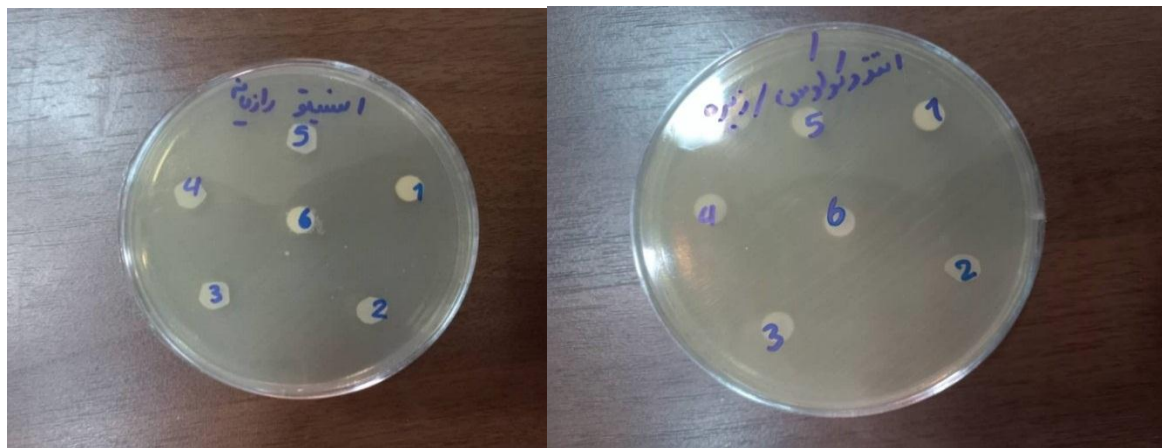
میکروارگانسیم‌های مقاوم شناخته شده دهه‌های اخیر می‌باشد. اما اسانس رازیانه نتیجه منفی در برابر باکتری‌ها از خود نشان داد. جدول ۱ میزان عدم ایجاد هاله را نشان می‌دهد.

نتایج بازداری از رشد به روش دیسک انتشاری:
نتایج این روش نشان داد که اسانس زیره سبز عملکرد بهتری بر روی دو باکتری *انتروباکتر فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی* دارد نظر به اینکه هر دو باکتری از جمله

جدول ۱- نتایج بازداری اسانس‌ها به روش دیسک انتشاری

اسانس رازیانه			اسانس زیره سبز			نام باکتری
قطر هاله عدم رشد			قطر هاله عدم رشد			
R	R	R	۱/۲	۱/۱	۱/۱	<i>انتروباکتر فکالیس</i>
R	R	R	۱/۱	۱/۲	۱/۱	<i>اسینتوباکتر بومانی</i>

R= Resistant



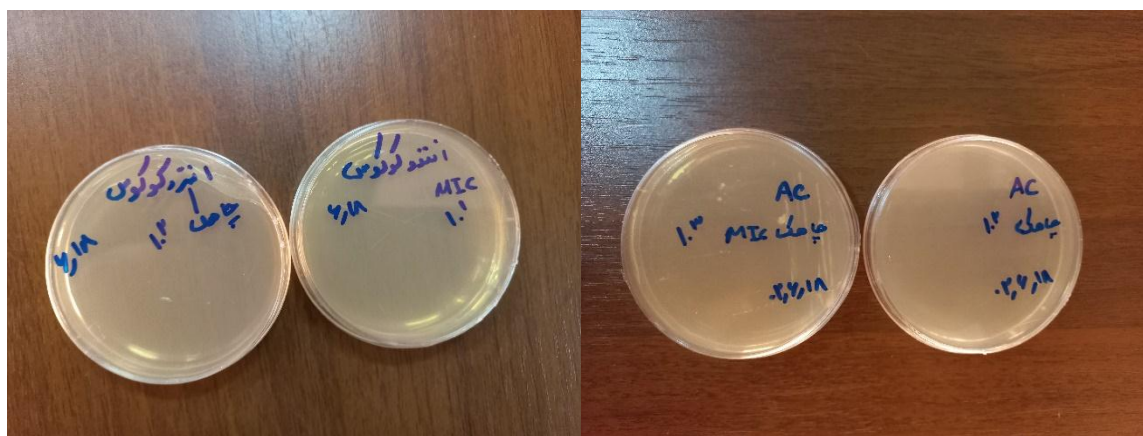
شکل ۱- انتشار دیسک اسانس‌های زیره سبز و رازیانه بر روی دو باکتری *انتروباکتر فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی*

۰/۱۳۵ در این باکتری اثر کشندگی دارد. همچنین بر روی *انتروباکتر فکالیس* در رقت 10^1 به میزان ۰/۳۱۱ در غلظت ۲۰۰۰ ppm اثر مهاری و کشندگی را ایجاد می‌کند. جدول ۳ نتایج MIC و MBC اسانس زیره سبز را در غلظت ۲۰۰۰ ppm نشان می‌دهد.

نتایج آزمایش‌های MIC و MBC نشان داد که اسانس زیره سبز دارای اثرات ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد. به طوری که MIC اسانس زیره سبز بر روی *اسینتوباکتر بومانی* در رقت 10^3 به میزان ۰/۰۷۸ در غلظت ۲۰۰۰ ppm اثر مهاری دارد و MBC در رقت 10^2 به میزان

جدول ۳- نتایج MIC و MBC اسانس زیره سبز با غلظت ۲۰۰۰ ppm

شاهد	رقت ۱۰	رقت ۹	رقت ۸	رقت ۷	رقت ۶	رقت ۵	رقت ۴	رقت ۳	رقت ۲	رقت ۱	اسانس	باکتری
۰/۴۴۳	۰/۴۳۹	۰/۳۳۰	۰/۳۸۶	۰/۱۶۲	۰/۰۸۴	۰/۱۰۱	۰/۱۲۴	۰/۰۷۸	۰/۱۳۵	۰/۲۱۱	زیره	<i>اسینتوباکتر بومانی</i>
۰/۵۶۳	۰/۵۸۴	۰/۷۶۱	۰/۵۲۵	۰/۵۴۱	۰/۵۶۳	۰/۵۱۸	۰/۳۴۷	۰/۲۷۹	۰/۲۴۶	۰/۳۱۱	زیره	<i>انتروکوکوس فکالیس</i>



شکل ۲- MIC زیره سبز در *انتروباکتر فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی*

محاسبه درصد بازدارندگی از رشد اسانس زیره

سبزه: نتایج نشان داد که اسانس زیره سبز با غلظت ۲۰۰۰ ppm و رقت ۰/۰۷۸ بیشترین اثر بازدارندگی

۵۳/۷۲ درصد) را بر اسنتیوباکتر بومانی و همچنین در رقت ۰/۳۱۱ کمترین اثر بازدارندگی (۱۷/۰۵ درصد) را بر انتروباکتر فکالیس داشت.

جدول ۴- درصد بازدارندگی از رشد اسانس زیره سبز

GI%	dc	dt	اسانس	باکتری
۵۳/۷۲	۰/۴۴۳	۰/۲۰۵	زیره سبز	اسنتیوباکتر بومانی
۱۷/۰۵	۰/۵۶۳	۰/۴۶۷	زیره سبز	انتروکوکوس فکالیس

$$GI \% = (dc - dt) / dc * 100$$

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه نتایج بازدارندگی از رشد به روش دیسک انتشاری نشان داد که اسانس زیره سبز در انتروباکتر فکالیس و اسنتیوباکتر بومانی با قطر هاله عدم رشد ۱/۲ میلی‌متر مشاهده گردید. در اسانس رازیانه هاله عدم رشد مشاهده نشد.

دانشمند و همکاران در مطالعه خود، نتایج آزمون ضد میکروبی بر اساس تست انتشار دیسک را این‌گونه گزارش کردند که، اثر ضد میکروبی اسانس زیره سبز با ایجاد بزرگ‌ترین هاله عدم رشد به باسیلوس سرئوس با قطر ۴۴ میلی‌متر و بعد از آن به ترتیب به باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا فلکسنری و اشریشیاکلی مشاهده گردید. در مطالعه حاضر اثر اسانس زیره سبز در هر دو باکتری انتروباکتر فکالیس و اسنتیوباکتر بومانی به یک میزان قطر هاله عدم رشد مشاهده شد. نتایج هر دو مطالعه نشان داد که با توجه به نوع باکتری مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها تضاد وجود دارد (۱۸).

در مطالعه جلالی و همکاران، نتایج انتشار دیسک در چند عصاره گیاهی از جمله آویشن، اکالیپتوس، بابونه، رزماری و مریم‌گلی نشان داد که فقط عصاره اکالیپتوس روی هر دو تیپ لیستریا مونوسیتوزنز 4a و 4b اثر گذاشته و هاله عدم رشد ایجاد شده ۱۱/۲۵ میلی‌متر می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از دو اسانس مورد استفاده فقط زیره سبز روی دو باکتری مورد مطالعه اثر گذاشته و هاله عدم رشد ۱/۲ میلی‌متری را ایجاد کرد.

می‌توان گفت که نتایج هر دو مطالعه در یک راستا می‌باشد (۱۹).

نتایج انتشار دیسک در مطالعه عابدی و همکاران نشان داد که اسانس زیره سبز با ایجاد هاله عدم رشد به ترتیب بر روی کاندیدا آلبیکنس با ۳۳/۵۷ میلی‌متر، ساکارومایسس سروزیه با ۳۳/۵۱ میلی‌متر، باسیلوس سرئوس با ۲۰/۵ میلی‌متر و استافیلوکوکوس اورئوس با ۱۹/۱ میلی‌متر بیشترین و کمترین قطر هاله را ایجاد کردند. نتایج انتشار دیسک در مطالعه حاضر نشان داد که زیره سبز در دو باکتری مورد مطالعه انتروباکتر فکالیس و اسنتیوباکتر بومانی با هاله عدم رشد ۱/۲ میلی‌متر به طور یکسان ایجاد کرده است که با توجه به بیشترین مقدار هاله ایجاد شده در مطالعه عابدی و همکاران در هر دو مطالعه تضاد وجود دارد (۲۰).

تحقیقات دانشمندان اهمیت آنتی‌میکروبی گیاهان دارویی در سال‌های اخیر را بر همه آشکار و به خاطر عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها بر بدن انسان توصیه به تولید و مصرف داروهای طبیعی کردند. تا به حال بیش از ۲۰۰۰ گونه از گیاهان دارویی با خاصیت ضد میکروبی شناسایی شده‌اند که در طی تحقیقات آزمایشگاهی از اسانس این گیاهان بیشترین کاربرد درمانی را گزارش کردند (۲۱). امروزه مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌ها به یک معضل جهانی تبدیل شده است. همان‌طور که در طی مطالعات انجام شده مشخص گردیده، میزان مقاومت در هر منطقه متفاوت می‌باشد که

بستگی به فرهنگ و آگاهی اجتماعی آن منطقه دارد. راه حل مناسب برای مبارزه با میکروپهای مقاوم استفاده از ترکیبات بدون عارضه یا با کمترین عارضه برای انسان می‌باشد که اسانس‌های گیاهی دارای عملکردی مناسب بوده و چون دارای ترکیبات آلی طبیعی می‌باشند شانس بقاء برای درمان بلندمدت و حتی جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توانند داشته باشند (۲۲).

نتایج آزمایش‌های MIC و MBC در مطالعه حاضر نشان داد که MIC اسانس زیره سبز بر روی *اسیتوباکتر بومانی* در رقت 10^3 به میزان $0/078$ در غلظت 2000 ppm اثر مهاری دارد و MBC در رقت 10^2 به میزان $0/135$ در این باکتری اثر کشندگی دارد. همچنین بر روی *انتروکوکوس فکالیس* در رقت 10^1 به میزان $0/311$ در غلظت 2000 ppm اثر مهاری و کشندگی ایجاد می‌کند (۲۵).

علیزاده بهبهانی و همکاران با بررسی MIC و MBC اسانس رازیانه به این نتایج دست پیدا کردند که به ترتیب در حداقل غلظت مهارکنندگی برای *اشریشیاکلی* 100 میلی‌گرم، *استافیلوکوکوس اورئوس* 25 میلی‌گرم و *کاندیدا آلبیکنس* 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین میزان حداقل غلظت کشندگی برای *اشریشیاکلی* 200 میلی‌گرم، *استافیلوکوکوس اورئوس* 50 میلی‌گرم و *کاندیدا آلبیکنس* 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد. در مطالعه حاضر اسانس رازیانه در هر دو باکتری مورد مطالعه *اسیتوباکتر بومانی* و *انتروباکتر فکالیس* مقاومت 100 درصدی نشان داد و با مطالعه علیزاده بهبهانی تضاد نتایج ملاحظه گردید (۲۳).

در مطالعه شیری و همکاران بر روی اسانس زیره سبز و شوید با اثرات آنتی‌باکتریال بر روی *اشریشیاکلی* O157 و *استافیلوکوکوس اورئوس*، نتایج MIC و MBC نشان داد که اثرات مهاری روی دو باکتری مذکور به ترتیب 10 و 5 میلی‌لیتر بوده و اثرات کشندگی هر دو اسانس بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *اشریشیاکلی* O157 بود. در مطالعه حاضر اثرات آنتی‌باکتریال زیره سبز بر روی دو

باکتری *اسیتوباکتر بومانی* و *انتروباکتر فکالیس* بیشتر بوده و در اسانس رازیانه مقاومت از خود نشان داد و می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که به‌خاطر خواص قوی آنتی‌باکتریال اسانس زیره سبز هر دو مطالعه در یک راستا بودند (۲۴).

مطالعه مریم برراهی و همکاران در مراکش، با بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس رازیانه بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسیتوباکتر بومانی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* انجام شد. نتایج MIC نشان داد که اثرات ضد میکروبی اسانس رازیانه در رقت‌های $1/100$ تا $1/5000$ در *اشریشیاکلی* خاصیت بازدارندگی دارد اما در *اسیتوباکتر بومانی* در رقت‌های $1/3000$ و $1/5000$ خاصیت بازدارندگی مشاهده شد که نشان از توانایی ایجاد مقاومت حتی برای گیاه در این باکتری وجود دارد. در نتایج MBC خاصیت کشندگی در هر دو باکتری *اسیتوباکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در رقت‌های $1/500$ تا $1/2000$ مشاهده گردید.

گیاهان دارویی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف دارای خواص درمانی زیادی از جمله خواص ضد میکروبی هستند. علاوه بر گونه‌های گیاهی مختلف، یک گونه گیاهی خاص روئیده شده در مناطق جغرافیایی مختلف نیز، از نظر ترکیبات فیتوشیمیایی و در نتیجه اثرات ضد میکروبی متفاوت است. همچنین فرآوری‌های مختلفی که روی گیاهان صورت می‌گیرد بر روی توان ضد میکروبی آنها موثر می‌باشد. میکروارگانیسم‌های مختلف، مقاومت متفاوتی نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارند کم‌اینکه باکتری‌های گرم مثبت معمولاً حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند، اما از آنجا که روش یا روش‌های استاندارد برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی گیاه وجود ندارد، نتایج به‌دست آمده از مطالعات مختلف بسیار متفاوت می‌باشد.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی

حمایت انجام شده است. در پایان از زحمات آقای جاوید تقی‌نژاد تشکر می‌گردد.

ارشد متعلق به آقای یحیی مرادی به کد ۲۸۰۰۲۹۰۵۰۷۰۱۸۱۶۵۳۰۰۲۰۱۶۲۸۰۶۴۲۹ بوده که تمامی هزینه مطالعه حاضر به صورت شخصی و بدون

References

- 1- Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *Biomed Res Int*. 2013.
- 2- Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS*. 2006; 8: E239-53.
- 3- Christenhusz MJ, Byng JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. 2016; 261(3): 201-17.
- 4- MNPS Medicinal Plant Names Services (MNPS) [accessed on 14 August 2021]. Available online: <https://www.kew.org/science/our-science/science-services/medicinal-plant-names-services>.
- 5- Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacol*. 2001; 74(3): 217-20.
- 6- Yadav RN, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *J. Phytol*. 2011; 3(12).
- 7- Pandey AK, Kumar S. Perspective on plant products as antimicrobials agents: a review. *PHARMA*. 2013; 4(7): 469-80.
- 8- Baym M, Stone LK, Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science*. 2016; 351(6268): aad3292.
- 9- Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog*. 2016; 95: 32-42.
- 10- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74(3): 417-33.
- 11- Shankar SR, Rangarajan R, Sarada DV, Kumar CS. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical screening of *Wrightia tinctoria* L. *Phcog J*. 2010; 2(14): 19-22.
- 12- Ody P. The complete medicinal herbal: a practical guide to the healing properties of herbs. Simon and Schuster. 2017.
- 13- Anton Y P, Harald S, David L P. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):538-82.
- 14- Saito HE, Harp JR, Fozo EM. Incorporation of exogenous fatty acids protects *Enterococcus faecalis* from membrane-damaging agents. *Appl. Environ. Microbiol*. 2014; 80(20): 6527-38.
- 15- Van Tyne D, Gilmore MS. Friend turned foe: evolution of *enterococcal* virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol*. 2014; 68: 337-56.
- 16- Barrahi M, Esmail A, Elhartiti H, Chahboun N, Benali A, Amiyare R, et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) seed essential oil against some pathogenic bacterial strains. *Casp. J. Environ. Sci*. 2020; 18(4): 295-307.
- 17- Akbarpour A, Rahimnejad Najarkalani M, Sadeghi agbash M, Feyzi F. Investigating the antibacterial properties of the extracts of the thirst-quenching plant and henna leaves against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. 3th International Conference on Researches in Nanotechnology & Nanoscience, Tehran-Iran. 2022; 1-12. [In Persian]
- 18- Daneshmandi S, Soleimani N, Sattari M, Pourfathollah A. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminum cyminum essential oil. *AMUJ*. 2010; 13(2): 75-82. [In Persian]
- 19- Jalali M, Abedi D, Gasemi N, Chaharmahali A. Investigating the antimicrobial effects of hydroalcoholic extracts of a number of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* bacteria. *JSKUMS*. 2006; 8(3): 25-33. [In Persian]
- 20- Abedi T, Asefi N, Hanifian S, Dehghan S. Inhibitory effect of *Carum copticum*, *Rosa damascena* mill, *Anethum graveolens* and *Cuminum cyminum* essential oils on some food-borne microbes. 2022; 11(44): 31-44. [In Persian]
- 21- Singh R, Shushni MA, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab. J. Chem*. 2015; 8(3): 322-8.
- 22- Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med.*

Chem. 2003; 10(10): 813-29.

23- Alizadeh behbahani B, Noshad M, Falah F. Investigation of antimicrobial activity of Fennel essential oil on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning and its interaction with kanamycin antibiotic. *FSCT.* 2019; 16(91): 233-241. [In Persian]

24- Shiri Y, Neyriz NM. Co-effects of lactic acid and sodium chloride on the antibacterial ac-

tivity of cumin and dill essential oils under laboratory conditions. 2022; 27(98): 1-13. [In Persian]

25- Barrahi M, Esmail A, Elhartiti H, Chahboun N, Benali A, Amiyare R, et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) seed essential oil against some pathogenic bacterial strains. *Casp. J. Environ. Sci.* 2020; 18: 295-307.




Investigation of the antimicrobial properties of fennel and green cumin essential oils on strains of *Enterobacter faecalis* and *Acinetobacter baumannii* under laboratory conditions

Yahya Moradi¹, Mehdi Roshdi Maleki^{2*}

1- Graduated student, Department of Microbiology, Malekan Branch, Islamic Azad University, Malekan, Iran.

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

Receive: May 4, 2024; Revise: June 13, 2024; Accept: June 16, 2024

 10.22034/nfvm.2024.455730.1236

Summary

To combat the shortage of new antimicrobial compounds and the increase in antibiotic resistance, plants could be a potential solution. The aim of the present study is to investigate the antimicrobial properties of fennel and green cumin essential oils against strains of *Enterococcus faecalis* and *Acinetobacter baumannii* under laboratory conditions. In this method, the essential oil solution was added at a specific concentration to sterile discs and transferred to a microbial culture medium. To examine growth inhibition, the disc diffusion method was used with a bacterial suspension on a plate containing Mueller-Hinton agar, and the MIC and MBC of the essential oil were also examined at dilutions of 10^1 and 10^{10} , and finally, the optical density was measured at a wavelength of 540 nm. The results of the growth inhibition by the disc diffusion method showed that both bacteria, *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus faecalis*, created a 1.2 mm diameter. The results of MIC and MBC of green cumin essential oil on *Acinetobacter baumannii* at a dilution of 10^3 (MIC) showed an inhibitory effect at 0.078 in a concentration of 2000 ppm, and at MBC in a dilution of 10^2 , it had a lethal effect at 0.135 in this bacterium. In *Enterococcus faecalis*, at a dilution of 10^1 , both MIC and MBC had an inhibitory and lethal effect at 0.311 in a concentration of 2000 ppm. Given the spread of drug resistance in pathogenic strains, medicinal plants with antimicrobial effects are a suitable option with fewer side effects.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, green cumin essential oil, fennel essential oil, drug resistance



دوره ۷، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۰۴-۱۱۶

بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جداشده از نمونه‌های مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد

نجمه واحد دهکردی^۱، ابراهیم رحیمی^{۲*}، نوشا ضیا جهرمی^۳

- ۱- دانشجوی دکترای تخصصی 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.
 - ۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
- دریافت مقاله: ۲۲ اسفند ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۴ خرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۵ تیر ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2024.448204.1232

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به دلیل توانایی در ایجاد طیف گسترده‌ای از مسمومیت‌های غذایی، از مهم‌ترین تهدیدکننده‌های سلامتی بشر بوده که پایش آن در مواد غذایی حائز اهمیت است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جداشده از نمونه‌های مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد بود. ۴۵۰ نمونه مواد غذایی شامل لبنیات سنتی، سالاد و ناگت از مراکز عرضه در شهرستان شهرکرد به صورت تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. از روش استاندارد برای جداسازی استافیلوکوکوس و از روش diffusion Disk برای ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به لبنیات ۱۴ درصد، سالاد ۱۰/۶۶ درصد و ناگت ۲/۲ درصد بودند. شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های لبنیات ۷۱ درصد، سالادها ۶۴/۵۸ درصد و ناگت ۳۰ درصد بود. بیشترین و کمترین شیوع ژن به ترتیب مربوط به SEA (۳۹/۲۴ درصد)، SEB (۱۷/۱۸ درصد)، SEC (۱۴/۴۹ درصد)، SED (۲/۲۷ درصد) و SEE (۵/۸۸ درصد) بود. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به جنتامایسین، سولفامتاکسازول و کمترین مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین و آمیکاسین بود. نظر به فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و حضور همزمان چندین ژن کدکننده در لبنیات، سالاد و ناگت‌ها، ضرورت وجود نظارت‌های بهداشتی بر تولید و عرضه نگهداری مواد غذایی را بیشتر می‌کند، همچنین استفاده از آنتی‌بیوتیک در خصوص رخداد مسمومیت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس باید محدود گردد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مسمومیت غذایی، ایمنی غذایی، شهرکرد

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: ebrahimrahimi55@yahoo.com

مقدمه

طی سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۵، دپارتمان‌های بهداشت ۵۷۶۰ مورد شیوع بیماری ناشی از غذا را گزارش کردند. اکثر این همه‌گیری‌ها در رستوران‌ها یا کترینگ‌ها رخ می‌دهد که وضعیت ذخیره‌سازی، آماده‌سازی، بسته‌بندی، سرو یا فروش مواد غذایی به‌طور مستقیم به مصرف‌کننده بدون نظارت ناظران بهداشتی صورت می‌گیرد (۱). مواد غذایی عرضه شده در خیابان نقش مهمی در تضمین سلامتی مصرف‌کنندگان دارد. مطابق آمار منتشر شده، حدود ۲/۵ میلیارد نفر روزانه غذای مصرفی روزانه خود را از مواد غذایی خیابانی دریافت می‌کنند (۲). علیرغم ارزش اجتماعی-اقتصادی عرضه مواد غذایی خیابانی، جنبه‌های مربوط به ایمنی باید در نظر گرفته شود، زیرا بخشی از غذاهای سنتی اغلب در شرایط نامناسب و بدون کنترل قانونی یا نظارت بهداشتی تهیه و فروخته می‌شوند که می‌تواند خطر ابتلا به بیماری‌های ناشی از غذا را افزایش دهد. مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی که از این طریق سبب آلودگی مواد غذایی و به طبع آن انسان‌ها می‌شوند شامل ویروس‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، انگل‌ها و ... هستند که در بین آنها باکتری‌ها و قارچ‌ها از عمده‌ترین نگرانی‌ها برای جامعه می‌باشند (۳).

در دهه‌های اخیر، قرار گرفتن در معرض پاتوژن‌های مقاوم به عوامل ضد میکروبی از طریق زنجیره غذایی به‌طور فزاینده‌ای گزارش شده که باعث شیوع بیماری‌های ناشی از غذا شده است. محصولات تازه در چندین نقطه در طول زنجیره تولید تا عرضه، با تماس مستقیم و غیر مستقیم با کودهای حیوانی، آبیاری با آب تصفیه‌نشده، عدم رعایت اصول بهداشتی در مراکز عرضه، به عوامل بیماری‌زای باکتریایی آلوده می‌شوند. از عمده‌ترین پاتوژن‌هایی که سبب آلودگی مواد غذایی می‌شوند، می‌توان به *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شرشیاکلاسی*، *کمپیلوباکتر*، کلی‌فرم‌های مدفوعی و سایر عوامل اشاره کرد (۴).

استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری‌های گرم مثبت

بوده که می‌تواند با شیوع مسمومیت غذایی در مقیاس بالا همراه باشد، که در آن انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (SEs) (*Enterotoxin Staphylococcus aureus*) تولیدکننده *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان پاتوژن ایجادکننده شناخته شده‌اند. *استافیلوکوکوس اورئوس* فاکتورهای بیماری‌زای بسیاری از جمله پروتئازها، انتروتوکسین‌ها، همولیزین‌ها، لوکوسیدین‌ها و عوامل تعدیل‌کننده ایمنی تولید می‌کند. اصطلاح سوپرانتی‌ژن معمولاً به توکسین سندرم شوک سمی (TSST-1) و انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) اشاره دارد که توسط *S. aureus* تولید می‌شوند. انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (SEs)، به‌عنوان یکی از قوی‌ترین عوامل بیماری‌زایی در نظر گرفته می‌شوند که توانایی تحریک تکثیر لنفوسیت T و القای آزادسازی سیتوکین‌ها را دارند و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شوند. *استافیلوکوکوس اورئوس* معمولاً در بینی و دستگاه تنفسی و روی پوست یافت می‌شود (۵-۷).

کشف آنتی‌بیوتیک‌ها به درمان بیماری‌های عفونی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* کمک کرد، اما در عرض چند سال پس از معرفی پنی‌سیلین، مقاومت به *استافیلوکوکوس اورئوس* ظاهر شد. اولین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به پنی‌سیلین در سال ۱۹۴۲ شناسایی شد. آنتی‌بیوتیک نیمه‌سنتزی متی‌سیلین در دهه ۱۹۵۰ طراحی شد و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin Resistance) (MRSA) (*Staphylococcus aureus*) از نظر بالینی در دهه ۱۹۶۰ شناسایی شد. اولین گونه‌های MRSA در بریتانیا یافت شد و این همه‌گیری عمدتاً محدود به اروپا بود. اندکی بعد، MRSA در ایالات متحده، ژاپن و استرالیا نیز شناسایی شد (۸، ۹). با توجه به مخاطرات ذکر شده در خصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، هدف از مطالعه حاضر مطالعه فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جداشده از

بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده اتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ...

باکتری‌های مورد نظر با تست کواگولاز ارزیابی و نتیجه این تست در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* مشخص شدند (۱۰).

شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین: برای این منظور تمامی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌ها از نظر مقاومت نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و اگزاسیلین (۱ میکروگرم) در محیط کشت مولر هینتون آگار ارزیابی شدند و ایزوله‌هایی که به صورت همزمان نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند، به عنوان ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند (۱۱).

انجام واکنش PCR استخراج DNA از باکتری به وسیله‌ی کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. DNA استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس برای انجام واکنش PCR از جفت پرایمرهای طراحی شده بر اساس ردیف نوکلئوتیدی ژن *StrRNA16* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، استفاده شد. توالی پرایمرها به شرح زیر می‌باشد:

5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' F و
3'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-5' R.

پرایمرهای رفت و برگشت مورد استفاده در این مطالعه از پایگاه داده NCBI با کد دسترسی MN982872 تهیه شدند.

جهت تشخیص ژن rRNA، ۱۶S از دستگاه Mastercycler gradient (Mastersycler, Germany) استفاده شد. حجم کلی واکنش PCR، ۳۰ میکرولیتر و شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر F و R، ۱۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناکلون، ایران) ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱۲ میکرولیتر آب فوق خالص عاری از نوکلئاز (یکتا تجهیز آزما، ایران) بود. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه برای واسرشت شدن DNA الگو، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه

نمونه‌های مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: تعداد ۴۵۰ نمونه از مواد غذایی شامل ناگت (ناگت گوشت ۵۰ نمونه و مرغ، ۵۰ نمونه)، فرآورده‌های لبنی سنتی (شیر خام ۵۰ نمونه، ماست سنتی ۵۰ نمونه، پنیر سنتی ۵۰ نمونه و کره سنتی ۵۰ نمونه) و غذاهای آماده مصرف (سالاد سبزیجات ۵۰ نمونه، سالاد فصل ۵۰ نمونه، سالاد سزار ۵۰ نمونه و سالاد ماکارونی ۵۰ نمونه) از مراکز عرضه محصولات در شهرستان شهرکرد، استان چهارمحال و بختیاری به صورت تصادفی از اردیبهشت تا شهریور ۱۴۰۲، نمونه‌برداری و در سریع‌ترین زمان ممکن در شرایط سترون به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، جهت انجام آزمایش‌ها انتقال داده شد.

روش جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس: برای جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵ گرم از نمونه‌های مورد آزمایش به درون ظرف توزین استریل منتقل و سپس میزان ۴۵ سی‌سی محلول رینگر به عنوان 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 ۰/۵ 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 گرماگذاری شدند. بعد از پایان گرماگذاری در صورت رشد، باکتری‌های با کلنی‌های گرد و سیاه‌رنگ، جهت انجام آزمایش‌های 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 سانتی‌گراد قرار گرفته و روی کلنی‌های مانیتول مثبت (کلونی‌های زردرنگ) تست Dnase جهت تأیید *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت. همچنین

آنزیم Polymerase Taq DNA معادل ۱ میکرولیتر انجام شد. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۵ دقیقه (دنا تورا سیون اولیه)، سپس ۳۰ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه (دنا تورا سیون)، ۵۰ درجه سلسیوس ۱ دقیقه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه (طول‌سازی) و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۵ دقیقه (طول‌سازی نهایی) بود. به منظور تأیید وجود قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد با رنگ‌آمیزی Safe stain استفاده شد. در تمام واکنش‌های PCR، از آب مقطر فاقد DNA به عنوان کنترل منفی و از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس 10357 ATCC و همچنین نمونه‌های DNA مثبت از نظر ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌ها به عنوان کنترل مثبت، استفاده شد. جدول (۱).

سلسیوس ۱ دقیقه (دنا تورا سیون)، ۵۳ درجه سلسیوس ۱ دقیقه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه (طول‌سازی) و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس ۸ دقیقه به منظور طول‌سازی نهایی بود. سپس تمام نمونه‌هایی که از نظر حضور ژن rRNA 16 S مثبت بودند، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز چندتایی (PCR Multiplex) برای ردیابی توکسین‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی شدند. واکنش PCR چندتایی (مولتی‌پلکس) جهت ردیابی ژن‌های کدکننده توکسین‌ها در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل 5 میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۵ میکرولیتر MgCl2 با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱۰ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر F و R با غلظت ۱۰۰ نانومولار، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱/۲۵ واحد

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های هدف استافیلوکوکوس اورئوس در واکنش PCR

منبع	اندازه محصول (Pb)	توالی پرایمر (5'-3')	ژن هدف
	(۵۴۴)	ACGATCAATTTTTACAGC TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	SEA
	(۴۱۶)	GAATGATATTAATTCGCATC TCTTTGTCGTAAGATAAACTC	SEB
(۱۱)	(۲۵۷)	GACATAAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCCA	SEC
	(۳۳۴)	TTACTAGTTTGGTAATATCTCCTT CCACCATAACAATTAATGC	SED
	(۲۰۹)	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC CTTTTTTTTCTCGGTCAATC	SEE

آنتی‌بیوتیک‌ها اندازه‌گیری شد (۱۳).

آنالیز آماری: در مطالعه حاضر برای بررسی داده‌ها، از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد. آنالیزهای آماری از نوع ANOVA بود. در این مطالعه روابط آماری بین نوع ماده غذایی و ارتباط معنی‌دار بودن یا نبودن مقایسه شد. سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد. جهت ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از آزمون آماری ناپارامتریک فریدمن استفاده شد.

نتایج

مطابق جدول ۲ نتایج نشان داد که از مجموع ۲۰۰ نمونه لبنیات سنتی به ترتیب بیشترین و کمترین میزان

سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی: تست آنتی‌بیوگرام به روش diffusion_Disk انجام گرفت. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با محلول استاندارد ۰/۵ 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)، تتراسیکلین (TE)، اریترومایسین (ER)، کانامایسین (KM)، سفوتاکسیم (CX) و آمیکاسین (AC) روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، میزان مقاومت جدایه‌ها به

بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده اتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ...

اورئوس مثبت مقاوم به متی‌سیلین نشان داد که از مجموع ۲۰۰ نمونه لبنیات سنتی به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی به ترتیب برای شیر خام (۲۶/۹۸ درصد)، کره سنتی (۲۶/۹۸ درصد)، پنیر سنتی (۱۲/۶۹ درصد) و ماست سنتی (۴/۷۶ درصد) بود. در نمونه‌های سالاد از مجموع ۱۵۰ نمونه، سالاد فصل (۶۴/۵۸ درصد)، سالاد ماکاونی (۴ درصد) و سالاد سزار (۲/۶۶ درصد) و آلودگی ناگت‌ها از مجموع ۱۰۰ نمونه ناگت گوشت (۳۰ درصد) و در ناگت مرغ آلودگی وجود نداشت.

آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به شیر خام (۴۸ درصد)، کره سنتی (۴۰ درصد)، پنیر سنتی (۱۳ درصد) و ماست سنتی (۱۲ درصد) بود. در نمونه‌های سالاد عرضه شده از مجموع ۱۵۰ نمونه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی مربوط به سالاد فصل (۲۰/۶۶ درصد)، سالاد ماکارونی (۶ درصد) و سالاد سزار (۵/۳۳ درصد) بود و برای نمونه‌های ناگت، از مجموع ۱۰۰ نمونه، ناگت گوشت (۸ درصد) بیشترین و ناگت مرغ (۲ درصد) کمترین میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس را داشتند. همچنین نتایج نمونه‌های استافیلوکوکوس

جدول ۲- شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین به تفکیک در نمونه‌های لبنیات سنتی، سالاد و ناگت عرضه شده در شهرستان شهرکرد

نوع ماده غذایی	نمونه‌های تفکیک شده	تعداد نمونه‌ها	شیوع استافیلوکوکوس اورئوس	شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین
لبنیات سنتی	شیر خام	۵۰	۲۴ نمونه (۴۸ درصد)	۱۷ نمونه (۲۶/۹۸ درصد)
	ماست سنتی	۵۰	۶ نمونه (۱۲ درصد)	۳ نمونه (۴/۷۶ درصد)
	پنیر سنتی	۵۰	۱۳ نمونه (۲۶ درصد)	۸ نمونه (۱۲/۶۹ درصد)
	کره سنتی	۵۰	۲۰ نمونه (۴۰ درصد)	۱۷ نمونه (۲۶/۹۸ درصد)
	مجموع	۲۰۰ نمونه	۶۳ نمونه (۳۱/۵ درصد)	۴۵ نمونه (۷۱ درصد)
سالاد	سالاد فصل	۵۰	۳۱ نمونه (۲۰/۶۶ درصد)	۲۱ نمونه (۶۴/۵۸ درصد)
	سالاد سزار	۵۰	۸ نمونه (۵/۳۳ درصد)	۴ نمونه (۲/۶۶ درصد)
	سالاد ماکارونی	۵۰	۹ نمونه (۶ درصد)	۶ نمونه (۴ درصد)
	مجموع	۱۵۰	۴۸ نمونه (۳۲ درصد)	۳۱ نمونه (۶۴/۵۸ درصد)
ناگت	گوشت	۵۰	۸ نمونه (۸ درصد)	۳ نمونه (۳۰ درصد)
	مرغ	۵۰	۲ نمونه (۲ درصد)	-
	مجموع	۱۰۰	۱۰ (۱۰ درصد)	۳ نمونه (۳۰ درصد)

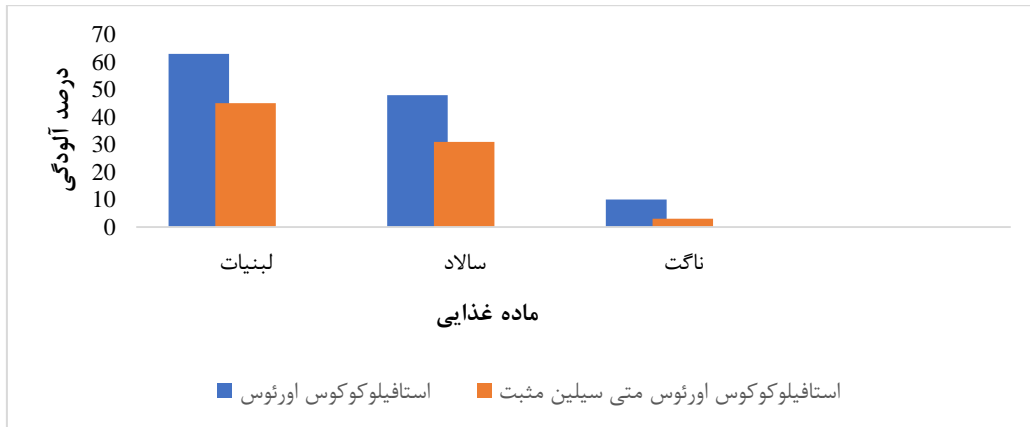
درصد)، سالاد ۴۸ نمونه (۱۰/۶۶ درصد) و ناگت ۱۰ نمونه (۲/۲ درصد) به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند. همچنین شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های لبنیات ۴۵ نمونه (۷۱ درصد)، سالادها ۳۱ نمونه (۶۴/۵۸ درصد) و ناگت ۳ نمونه (۳۰ درصد) بود.

نتایج نشان داد که از مجموع ۴۵۰ نمونه مواد غذایی بیشترین و کمترین شیوع آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به ترتیب مربوط به لبنیات ۴۵ نمونه، سالاد ۳۱ نمونه و ناگت ۳ نمونه بود. آنالیزهای آماری نشان داد بین مواد غذایی مختلف نمونه‌گیری شده در شهرستان شهرکرد ارتباط آماری معنی‌دار وجود نداشت ($p < 0/05$). مطابق جدول ۲، لبنیات ۶۳ نمونه (۱۴)

جدول ۳. شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در لبنیات سنتی، سالاد و ناگت عرضه شده در شهرستان شهرکرد

نوع ماده غذایی	تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده	شیوع استافیلوکوکوس اورئوس	شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین	سطح معنی‌داری
لبنیات سنتی	۲۰۰	۶۳ نمونه (۱۴ درصد)	۴۵ نمونه (۷۱ درصد)	۰/۰۰۳ ^{NS}
سالاد	۱۵۰	۴۸ نمونه (۱۰/۶۶ درصد)	۳۱ نمونه (۶۴/۵۸ درصد)	۰/۰۰۲۴ ^{NS}
ناگت	۱۰۰	۱۰ نمونه (۲/۲ درصد)	۳ نمونه (۳۰ درصد)	۰/۰۰۱۳ ^{NS}
مجموع	۴۵۰	۱۲۱ نمونه (۲۶/۸۸ درصد)	۷۹ نمونه (۶۵/۲۸ درصد)	-

NS: تفاوت بین آلودگی در نمونه‌های مختلف معنی‌دار نیست.



نمودار ۱- شیوع آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در لبنیات سنتی، سالاد و ناگت عرضه شده در شهرستان شهرکرد

درصد) و SEE (۵/۸۸ درصد) بود. به این ترتیب بیشترین آلودگی به SEA مربوط به ماست سنتی و ناگت گوشت، SEB مربوط به ناگت گوشت، SEC مربوط به سالاد فصل، SED و SEE مربوط به کره سنتی بود.

مطابق جدول ۴- نتایج جدایی‌های استافیلوکوکوس اورئوس متی‌سیلین مثبت نشان داد که بیشترین و کمترین ژن حامل مربوط به SEA (۳۹/۲۴ درصد)، SEB (۱۷/۱۸ درصد)، SEC (۱۴/۴۹ درصد)، SED (۲/۲۷)

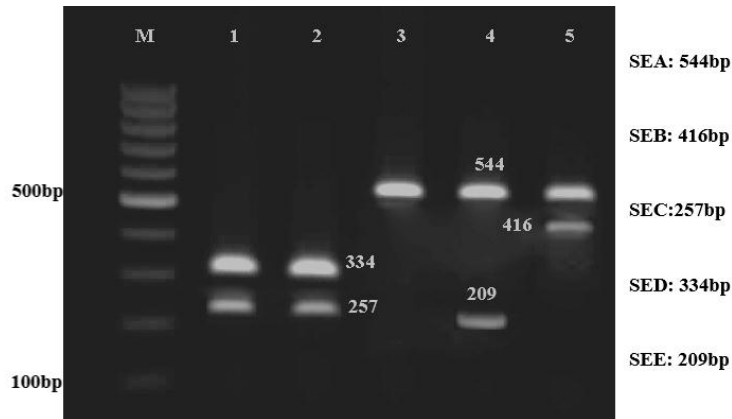
جدول ۴- فراوانی ژن‌های انترونوکسین در جدایی‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های لبنیات سنتی، سالاد و ناگت عرضه شده در شهرستان شهرکرد

شیوع ژن‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین					نمونه‌های متی‌سیلین مثبت
SEE	SED	SEC	SEB	SEA	
-	۵/۸۸ (۱/۱۷) درصد	۵/۸۸ (۱/۱۷) درصد	۱۷/۶۴ (۳/۱۷) درصد	۲۳/۵۲ (۴/۱۷) درصد	شیر خام
-	-	-	-	۶۶/۶۶ (۲/۳) درصد	ماست سنتی
-	-	۱۲/۵ (۱/۸) درصد	-	۶۲/۵ (۵/۸) درصد	پنیر سنتی
۵/۸۸ (۱/۱۷) درصد	۱۱/۷۶ (۲/۱۷) درصد	۱۷/۶۴ (۳/۱۷) درصد	۵/۸۸ (۱/۱۷) درصد	۴۱/۱۷ (۷/۱۷) درصد	کره سنتی
-	۴/۷۶ (۱/۲۱) درصد	۱۹/۰۴ (۴/۲۱) درصد	۲۳/۸۰ (۵/۲۱) درصد	۴۲/۸۵ (۹/۲۱) درصد	سالاد فصل
-	-	-	-	۲۵ (۱/۴) درصد	سالاد سزار
-	-	۱۶/۶۶ (۱/۶) درصد	۱۶/۶۶ (۱/۶) درصد	۱۶/۶۶ (۱/۶) درصد	سالاد ماکارونی
-	-	-	۳۳/۳۳ (۱/۳) درصد	۶۶/۶۶ (۲/۳) درصد	ناگت گوشت
-	-	-	-	-	ناگت مرغ
۵/۸۸ (۱/۱۷) درصد	۷/۲۷ (۴/۵۵) درصد	۱۴/۴۹ (۱۰/۶۹) درصد	۱۷/۱۸ (۱/۶۴) درصد	۳۹/۲۴ (۳/۱۷۹) درصد	مجموع

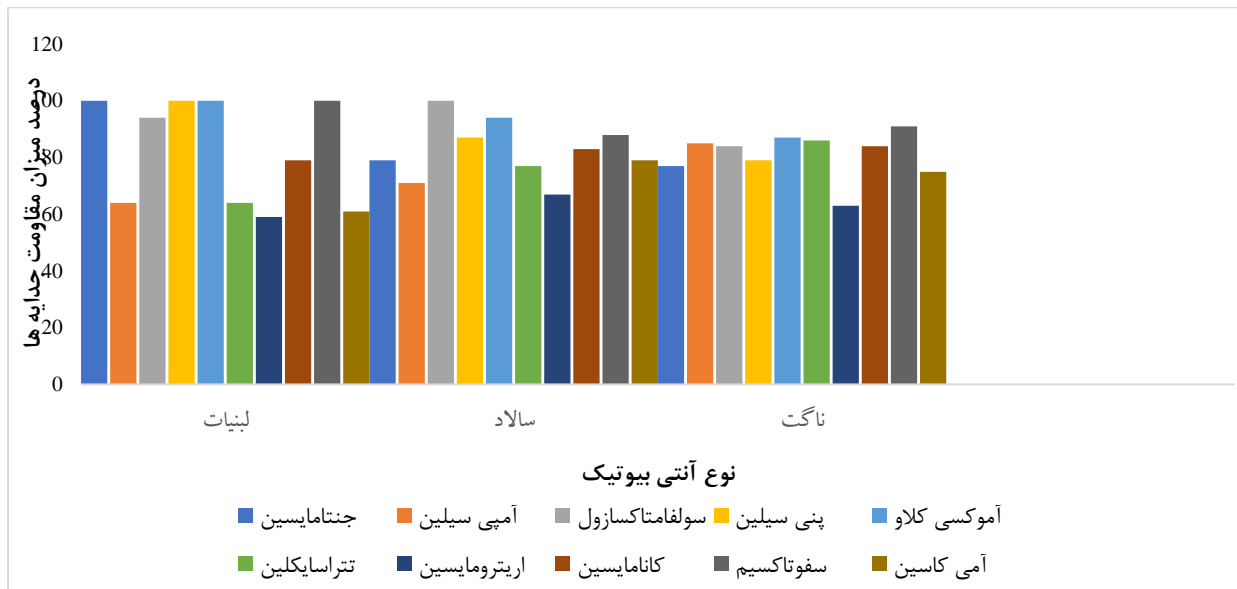
بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده اترتوتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ...

مقاومت مربوط به جدایه‌های آمیکاسین (۶۱ درصد)، اریترومایسین (۶۳ درصد) و تتراسایکلین و آمپی‌سیلین (۶۴ درصد) بود. نتایج نشان داد ارتباط معنی‌داری بین جدایه‌های مقاوم و نوع ماده غذایی وجود نداشت ($p > 0.05$).

مطابق جدول ۵- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، بیشترین مقاومت مربوط به جدایه‌های جنتامایسین، سولفامتاکسازول (۱۰۰ درصد)، آموکسی‌کلاو (۱۰۰ درصد)، پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد) بود؛ همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان



تصویر ۲. ژن‌های حدت SEA, SEB, SEC, SED و SED/استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در لبنیات سنتی، سالاد و ناگت عرضه شده در شهرستان شهرکرد



نمودار ۲- وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در لبنیات سنتی، سالاد و ناگت عرضه شده در شهرستان شهرکرد

جدول ۵- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های لبنیات، سالاد و ناگت‌های عرضه شده در شهرستان شهرکرد

مواد غذایی	جنتامایسین (%)	آمپی‌سیلین (%)	سولفاکتازاسازول (%)	پنی‌سیلین (%)	آموکسی‌کلاو (%)	تتراسایکلین (%)	اریترومایسین (%)	کانامایسین (%)	سفتاکسیم (%)	آمیکاسین (%)
لبنیات	۱۰۰	۶۴	۹۴	۱۰۰	۱۰۰	۶۴	۵۹	۷۹	۱۰۰	۶۱
سالاد	۷۹	۷۱	۱۰۰	۸۷	۹۴	۷۷	۶۷	۸۳	۸۸	۷۹
ناگت	۷۷	۸۵	۸۴	۷۹	۸۷	۸۶	۶۳	۸۴	۹۱	۷۵

بحث و نتیجه‌گیری

مشکلات بهداشتی مرتبط با غذا، ناشی از آلودگی مواد غذایی یا سوء تغذیه، تأثیری جهانی بر سلامت و اقتصاد عمومی دارد؛ به‌ویژه، بیماری‌های منتقله از غذا یک مسئله اصلی برای سلامت عمومی است و تعداد فزاینده‌ای از شیوع و موارد پراکنده بیماری مرتبط با انواع مختلف غذاها وجود دارد که بیماری‌های ناشی از غذا، مسئول حدود ۶۰۰ میلیون بیماری و ۴۲۰۰۰۰ مرگ در هر سال هستند (۱۴). همچنین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بدون پیروی از دستورالعمل‌های استاندارد یک روش معمول در کشورهای در حال توسعه است که باعث واگرایی ژنتیکی و افزایش مقاومت دارویی در *استافیلوکوکوس اورئوس* شده است (۱۵)، محققان نشان دادند که بیشترین موارد شیوع بیماری‌های ناشی از غذا در بیمارستان‌ها به‌دلیل مصرف مواد غذایی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) است. بروز انواع مختلف بیماری‌های گوارشی که با استفراغ، تهوع، گرفتگی عضلات شکمی، ضعف و اسهال شناخته می‌شوند و همچنین سندرم شوک سمی به سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت داده می‌شود. در همین راستا هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد بود، که نتایج این مطالعه گویای فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بود. نتایج نشان داد که بیشترین آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس*

مربوط به لبنیات ۱۴ درصد، سالاد ۱۰/۶۶ درصد و ناگت ۲/۲ درصد بودند. شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های لبنیات ۷۱ درصد، سالادها ۶۴/۵۸ درصد و ناگت ۳۰ درصد بود. بیشترین و کمترین شیوع ژن به‌ترتیب مربوط به SEA (۳۹/۲۴ درصد)، SEB (۱۷/۱۸ درصد)، SEC (۱۴/۴۹ درصد)، SED (۲/۲۷ درصد) و SEE (۵/۸۸ درصد) بود. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به جنتامایسین، سولفاکتازاسازول و کمترین مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین و آمیکاسین بود. از دلایل عمده آلودگی بالا به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌توان به تماس مستقیم نمونه‌های سالاد و لبنیات با خاک، آب‌های آلوده، کود حیوانی و فضولات انسانی و حیوانی و عدم رعایت بهداشت در طول طبخ، ذخیره‌سازی، آماده‌سازی و عرضه مواد غذایی اشاره کرد. در پژوهش انجام شده توسط گودرزی و همکاران (۲۰۱۶)، بر روی آلودگی سالادهای عرضه شده در شهرستان بندرعباس گزارش دادند که ۴۰ درصد از نمونه‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند (۱۶)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقتی ندارد. Esemu و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای بر روی شیوع آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی عرضه شده در کامرون، گزارش دادند که از مجموع ۴۲۰ نمونه، ۵۲/۷۸ درصد سالادها به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند؛ همچنین بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سیپروفلوکساسین بود (۱۷)، که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقتی ندارد. در این پژوهش سالاد ۱۰/۶۶ درصد

بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ...

گزارش دادند که پنیر سنتی و شیر خام به ترتیب ۴/۱۲ و ۵/۴۹ درصد آلودگی داشتند (۲۳)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقتی ندارد. در این تحقیق آلودگی به پنیر و شیر خام به ترتیب ۴۸ و ۲۶ درصد بود.

Grispoldi و همکاران (۲۰۱۹)، در پژوهشی بر روی آلودگی شیرخام به انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در ایتالیا، گزارش دادند که SEA ۳۵/۲۹ درصد، SEB ۵/۸۸ درصد، SEC ۵/۸۸ درصد، در مطالعه حاضر در خصوص SEC دقیقاً مطابقت دارد، اما در خصوص سایر انتروتوکسین‌ها مطابقتی وجود ندارد. Oliveria و همکاران (۲۰۲۲)، بر روی آلودگی شیر خام در پرتغال، دریافتند که ژن‌های SEA و SEB به ترتیب ۱۶ و ۶/۵ درصد وجود داشتند (۲۵)، که با نتایج مطالعه حاضر مطابق است.

در مطالعه‌ای توسط Keyvan و همکاران (۲۰۲۰) در ترکیه، بر روی آلودگی شیر خام به انتروتوکسین‌های متی‌سیلین مثبت گزارش دادند که ۶۹ نمونه آلودگی وجود داشته است که از نمونه‌های آلوده ۱۶/۶ درصد به انتروتوکسین‌ها آلوده بودند که SEB و SEE بیشترین آلودگی را در بین انتروتوکسین‌ها داشتند (۲۶)؛ که در خصوص آلودگی شیر خام کمتر از مطالعه حاضر می‌باشد اما در خصوص آلودگی ژن‌ها همسو با مطالعه حاضر است. Sadek و poriem در مطالعه‌ای مشابه، بر روی شیر خام در مصر، گزارش دادند که آلودگی در شیر خام، پنیر و ماست سنتی به ترتیب ۶۲/۵ درصد، ۲۷ و ۰ درصد بودند، همچنین شیوع آلودگی به ژن SEC ۲/۷ درصد بود (۲۷) که با مطالعه حاضر همسو است.

در مطالعه Ibrahim و همکاران (۲۰۱۸) در مصر از مجموع ۳۰ نمونه ناگت تهیه شده به صورت تصادفی، ۳۰ درصد آنها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (۲۸)، که در مطالعه حاضر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ناگت‌ها، ۲/۲ درصد بود. در مطالعه Shylaja و همکاران (۲۰۱۸) در هندوستان بر روی آلودگی مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس*، از مجموع ۳۰ ناگت تهیه شده

و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای سولفامتاکسازول بود. تحقیق Bilgin و همکاران (۲۰۱۹) بر روی نمونه‌های سالاد عرضه شده در استانبول ترکیه گزارش دادند که از مجموع ۵۰ نمونه ۳۶ درصد به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند (۱۸)، که میزان آلودگی گزارش شده فراتر از نتایج مطالعه حاضر است. هم‌راستا با پژوهش حاضر، مومنی شهرکی و همکاران (۲۰۲۰)، شیوع آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های سالاد در شهرکرد را ۸/۵۱ درصد و مقاومت ۱۰۰ درصدی جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتاکسازول، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و شیوع ژن SEA را ۴۲/۸۵ درصد گزارش دادند (۱۹)، که مطابق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر است.

در مطالعه‌ای افشاری و همکاران (۲۰۲۲)، بر روی آلودگی مواد غذایی نمونه‌گیری شده در مشهد به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین دریافتند که نمونه‌های سالاد بیشترین مقاومت را به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین داشته و شیوع آلودگی ۱۲/۵۷ درصد بود است (۲۰)، که مطابق با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر است.

Doudaran و همکاران (۲۰۲۲) بر روی آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در لبنیات سنتی تهیه شده در استان البرز، گزارش دادند که ۲۰/۶۶ درصد آلوده و آلودگی شیر خام ۱۶/۶۶ درصد و پنیر سنتی ۳۳/۳۳ درصد بوده است (۲۱)، که متفاوت‌تر از نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. در این مطالعه آلودگی لبنیات ۱۰/۶۶ درصد بود که آلودگی به شیر خام و پنیر سنتی ۴۸ و ۲۶ درصد بود. در مطالعه‌ای توسط Goncalves و همکاران (۲۰۲۳) بر روی آلودگی لبنیات سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در هندوستان گزارش دادند که ۱۳/۳ درصد به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند (۲۲) که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در تحقیقی توسط Phiri و همکاران بر روی آلودگی لبنیات سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در چین،

طبخ غذا، نوع نگهداری و بسته‌بندی اشاره کرد. بنابراین؛ شیوع بالای *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین نمونه‌های مورد آزمایش و وجود MRSA در غذاهای آماده، ضرورت اجرای اقدامات بهداشتی در آشپزخانه‌های فست فودی و غذاهای خیابانی را برجسته می‌کند. در آینده، توصیف مولکولی و اکولوژیکی سویه‌های MRSA جدا شده باید برای تعیین منشأ آلودگی انجام شود. آگاهی بهتر از اقدامات بهداشتی دقیق در هنگام جمع‌آوری مواد اولیه، تهیه غذا، نگهداری، نگهداری و سرو باید به دست اندرکاران مواد غذایی آموزش داده شود و در نهایت جهت درمان مسمومیت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده از آنتی‌بیوتیک محدود شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه داشتند تشکر به عمل می‌آید.

به‌صورت تصادفی، ۱۹ مورد معادل میزان ۶۳/۳ درصد آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند و به ترتیب (۸۷/۹۵ درصد)، ۵ (۲۶/۳۲ درصد)، ۳ (۱۵/۷۹ درصد) و ۲ (۱۰/۵۳ درصد) برای SEA و SEB مثبت بودند (۲۹) که متفاوت‌تر از تحقیق حاضر می‌باشد. فراوانی آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ناگت‌های این مطالعه ۲/۲ درصد و آلودگی به ژن‌های انتروتوکسین‌زای SEA و SEB به ترتیب ۶۶/۶۶ و ۳۳/۳۳ درصد بود.

میزان آلودگی در ناگت‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعه حاضر ۲/۲ درصد بود (۳۰، ۳۱) که با مطالعه حاضر مطابقتی ندارد و میزان آلودگی در مطالعه حاضر پائین‌تر از مطالعات نامبرده می‌باشد. در حالی که با مطالعات (۳۲-۳۴) در خصوص شیوع ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* متی‌سیلین مثبت SEA و SEB در ناگت گوشت مطابقت دارد.

از مهم‌ترین دلایل عدم مطابقت مطالعه حاضر با سایر مطالعات می‌توان به خطای آزمایشگر، تفاوت در شیوه

References

- 1- Moritz E, Ebrahimzadeh S, Wittry B, Holst M, Daise B, Zern A, et al. Foodborne Illness Outbreaks at Retail Food Establishments—National Environmental Assessment Reporting System, 25 State and Local Health Departments, 2017–2019. *Morb Mor Week Report*. 2023; 72(6): 1-10.
- 2- Jaffee S, Henson S, Unnevehr L, Grace D, Cassou E. The safe food imperative: Accelerating progress in low-and middle-income countries: *World Bank Pub*. 2018; 1(1): 85-110.
- 3- Andrade A, Paiva A, Machado A. Microbiology of street food: understanding risks to improve safety. *J App Microb*. 2023; 134(8): 55-67.
- 4- Rahman M, Alam M, Luies S.K, Kamal A, Ferdous S, Lin A, et al. Contamination of fresh produce with antibiotic-resistant bacteria and associated risks to human health: A scoping review. *Inter J envi res health*. 2022; 19(1): 350-360.
- 5- Le HHT, Dalsgaard A, Andersen PS, Nguyen H, Ta Y, Nguyen T. Large-scale *Staphylococcus aureus* foodborne disease poisoning outbreak among primary school children.

Mic Res. 2021; 12(1): 43-52.

6- Krakauer T. Staphylococcal superantigens: pyrogenic toxins induce toxic shock. *Toxins*. 2019; 11(3): 170-178.

7- Ramadan HA, El-Baz AM, Goda RM, El-Sokkary MM, El-Morsi RM. Molecular characterization of enterotoxin genes in methicillin-resistant *S. aureus* isolated from food poisoning outbreaks in Egypt. *J Health, Popu Nut*. 2023; 42(1): 78-86.

8- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van W, Van A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lanc infec dis*. 2005; 5(12): 751-762.

9- Masimen MAA, Harun NA, Maulidiani M, Ismail WW. Overcoming methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) using antimicrobial peptides-silver nanoparticles. *Antibiotics*. 2022; 11(7): 948-951.

10- Pishadast S, Rahnema M, Alipoureskandani M, Saadati D, Noorijangi A, Heidarzadi MA. 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(43): 37-47.[In persian]

11- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J clin mic*. 2000; 38(3): 1032-1038.

12- De C, De T, De M, Arcuri F. Diversity of Staphylococcus coagulase-positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes. *Bolet Cen Pes Process Aliment*. 2019; 36(1): 15-21.

13- 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(42): 81-90. [In persian]

14- Franz B, Jojo R. Film & History: *Int dis J*. 2019; 49(2): 34-36.

15- Aziz S, Saeed NM, Dyary HO, Ali MM, Abbas RZ, et al. Divergent analyses of genetic relatedness and evidence-based assessment of therapeutics of Staphylococcus aureus from semi-intensive dairy systems. *BioMed Res Inter*. 2022; 20(22): 44-52.

16- Goudarzi B, Alipour V, Rezaei L, Dindarlu K, Heidari M, Rahmaniyan O. Bacteriological quality of ready to use salads at restaurants in Bandar Abbas Abstract. *J Prevent Med*. 2016; 3(3): 31-38.

17- Esemu SN, Njoh ST, Ndip LM, Keneh NK, Kfusi JA, Njukeng AP. Ready-to-Eat Foods: A Potential Vehicle for the Spread of Coagulase-Positive Staphylococci and Antimicrobial-Resistant Staphylococcus aureus in Buea Municipality, South West Cameroon. *Cana J Infec Dis Med Mic*. 2023; 20(23): 14-21.

18- Bilgin Z, Bayrakal GM, Dümen E, Ekici G. Prevalence and PCR Sensitivity Comparison of Toxoplasma gondii, Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in Salads and Appetizers Consumed in Istanbul. *Turk J Agri-Food Sci Tech*. 2019; 7(5): 737-742.

19- Rahimi E, Safarpoordehkordi F, Shakerian A. Study the frequency of enterotoxin encoding genes and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated

from vegetable and salad samples in Chaharmahal Va Bakhtiari province. *J Food Mic*. 2020; 2(2): 42-55. [In persian]

20- Afshari A, Taheri S, Hashemi M, Norouzy A, Nematy M, Mohamadi S. Methicillin-and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci isolated from hospital foods: Prevalence and antimicrobial resistance patterns. *Cur Microb*. 2022; 79(11): 326-334.

21- Doudaran H.O, Mahsk Z, Kohdar V. Distribution Of Antibiotic Resistance Genes Amongst The Staphylococcus Aureus Strains Isolated From Raw Milk And Traditional Dairy Products. *J Pharma Neg Res*. 2022; 97(35): 38-41.

22- Goncalves J.L, Mani R, Sreevatsan S, Ruegg PL. Apparent prevalence and selected risk factors of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and non-aureus staphylococci and mammaliicocci in bulk tank milk of dairy herds in Indiana, Ohio, and Michigan. *JDS comm*. 2023; 4(6): 489-95.

23- Phiri B.S, Hang'ombe BM, Mulenga E, Mubanga M, Maurischat S, Wichmannschauer H, et al. Prevalence and diversity of Staphylococcus aureus in the Zambian dairy value chain: A public health concern. *Int J Food Mic*. 2022; 37(5): 109-117.

24- Grisoldi L, Massetti L, Sechi P, Iulietto MF, Ceccarelli M, Karama M, et al. Characterization of enterotoxin-producing Staphylococcus aureus isolated from mastitic cows. *J dairy sci*. 2019; 102(2): 1059-1065.

25- Oliveira R, Pinho E, Almeida G, Azevedo NF, Almeida C. Prevalence and diversity of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw milk from Northern Portugal. *Fron Mic*. 2022; 13(2): 70-83.

26- Keyvan E, Yurdakul O, Erdi Ş. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxigenic staphylococcus aureus in raw milk: A screening study. *Kocat Vet J*. 2020; 13(2): 104-109.

27- Sadek OA, Koriem AM. Molecular Detection of entrotoxigenic Genes for Sstaphylococcus aureus organism isolated from raw milk and some milk products. *Ass Vet Med J*. 2020; 66(167): 48-61.

28- Ibrahim H, Hassan M, Amin R, Shawky N, Elkoly R. The Bacteriological Quality Of Some Chicken Meat Products. *Benha Vet Med J*. 2018; 35(1): 50-57.

29- Shylaja M, Goud S, Samatha K, Pradeep

C. Studies on the incidence of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxins in different meat and meat products. *Pharma J.* 2018; 7(4): 669-673.

30- Gaafar R, Hassanin FS, Shaltout F, Zagloul M. Molecular detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in some ready to eat meat based sandwiches. *Benha Vet Med J.* 2019; 37(1): 22-26.

31- Morshdy AE, Mahmoud AF, Khalifa SM, Salah WM, Darwish WS, El Bayomi RM. Prevalence of *Staphylococcus aureus* AND *Salmonella* Species in Chicken Meat Products Retailed in Egypt. *Slov Vet Res.* 2023; 60(12): 115-129.

32- Abbasi K, Tajbakhsh E, Momtaz H.

Antimicrobial resistance, virulence genes, and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat and meat products. *J Food Safe.* 2021; 41(6): 129-143.

33- Savariraj WR, Ravindran NB, Kannan P, Rao VA. Occurrence and enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from retail chicken meat. *Food Sci Tech Int.* 2021; 27(7): 619-625.

34- Saadati A, Mashak Z, Yarmand MS. Prevalence and Molecular Characterization of Enterotoxin- and Antibiotic Resistance-Encoding Genes in the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Recovered from Poultry Meat. *Egypt J Vet Scie.* 2021; 52(2): 163-173.



Study of frequency of enterotoxin coding genes and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates isolated from food samples supplied in Shahrekord County

Najmeh Vahad Dehkordi¹, Ebrahim Rahimi^{2*}, Noosha Zia jahromi³

1- Ph.D. Student in Food Hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

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

3- Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad university, Shahrekord, Iran.

Receive: March 12, 2024; Revise: June 13, 2024; Accept: July 15, 2024

 10.22034/nfvm.2024.448204.1232

Summary

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is the most important threats to human health due to its ability to cause a wide range of food poisoning, and its monitoring in food is important. The purpose of this study was to investigate the frequency of enterotoxin coding genes and the antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates isolated from food samples supplied in Shahrekord city. 450 food samples including traditional dairy products, salad and nuggets were randomly collected from supply centers in Shahrekord city and transferred to the laboratory. The standard method was used to isolate staphylococcus and the diffusion disk method was used to evaluate antibiotic resistance. The results showed that the highest contamination with *Staphylococcus aureus* was related to dairy products (14%), salad (10.66%) and nuggets (2.2%). The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy samples was 71%, salads 64.58% and nuggets 30%. The highest and lowest prevalence of genes were respectively related to SEA (39.24%), SEB (17.18%), SEC (14.49%), SED (2.27%) and SEE (5.88%). The results of antibiotic resistance showed that the highest resistance was related to gentamicin, sulfamethoxazole, and the lowest resistance was related to ampicillin and amikacin. Due to the abundance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the simultaneous presence of several coding genes in dairy products, salad and nuggets, the need for health supervision on the production and supply of food storage increases, as well as the use of Antibiotics should be limited in cases of poisoning caused by *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, Food poisoning, Food safety, Shahrekord




بررسی اثر ارسولیک اسید بر مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف جدا شده از گوشت مرغ

المیرا شمشادی^۱، لیلا اسدپور^{۲*}

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی رشت، رشت، ایران.

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی رشت، رشت، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ اردیبهشت ۱۴۰۳، بازنگری: ۲۱ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۰ آذر ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2025.458471.1239

چکیده

در سال‌های اخیر، مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از چالش‌های جدی در حوزه پزشکی است. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به سرعت در حال گسترش هستند و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها را دشوار کرده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی ارسولیک اسید در برابر سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف جدا شده از گوشت مرغ می‌باشد. اثر مهاري ارسولیک اسید بر جدایه‌های مورد مطالعه به روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهاري یا MIC به روش براث میکرودايلوشن و اثر ضد بیوفیلمی آن به روش میکروپلیت ارزیابی شد. همچنین تأثیر ارسولیک اسید بر زنده‌مانی *اشریشیاکلی* به روش سنجش Time Kill و اثر آن بر بیان ژن‌های بیوفیلم *fimH* و *csGA* به روش Real time-PCR بررسی شد. در این مطالعه، ارسولیک اسید اثر مهاري بر رشد همه جدایه‌ها نشان داد و MIC آن بین ۰/۴ تا ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. درصد مهار بیوفیلم در شرایط تیمار شده با غلظت‌های زیر مهاري ارسولیک اسید در ۶ جدایه مورد مطالعه بین ۵۱/۲ تا ۶۷/۳ درصد متغیر بود همچنین در مطالعه حاضر تیمار با غلظت تحت مهاري ارسولیک اسید سبب کاهش بیان ژن‌های *fimH* و *csGA* گردید. نتایج این مطالعه بیانگر اثر مهاري ارسولیک اسید بر رشد جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز و کاهش قدرت تشکیل بیوفیلم آن است. انجام مطالعات درون تنی می‌تواند امکان کاربرد بالینی آن در کنترل عفونت ناشی از جدایه‌های مقاوم به دارو را روشن سازد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی*، ارسولیک اسید، ضد بیوفیلمی، بتالاکتاماز

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های گسترده در علوم و صنایع غذایی، بیماری‌های منتقله از غذا همچنان یکی از جدی‌ترین تهدیدات بهداشت عمومی در سراسر جهان به‌شمار می‌رود، که هر ساله صدها میلیون نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این مشکل در کشورهای در حال توسعه و در میان افرادی که به ضعف سیستم ایمنی و یا سوء تغذیه مبتلا هستند، در حال افزایش است. ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به‌ویژه در بیماری‌های منتقله از غذا، چالشی جدی برای سلامت عمومی ایجاد کرده است (۱). *اشریشیاکلی* باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور است که در خانواده انتروباکتریاسه قرار دارد. *اشریشیاکلی* طیف مختلفی از عفونت‌ها مثل مسمومیت غذایی، اسهال در بالغین، اسهال کشنده در کودکان، عفونت ادراری، سیستیت، پیلونفریت، ابرسه‌های شکمی، پنومونی، استنومیلیت، عفونت بافت نرم و باکتریومی ایجاد می‌کند. *اشریشیاکلی* یکی از پاتوژن‌های رایج در بیماری‌های منتقله از غذا می‌باشد و توانایی بالای آن در فساد گوشت مرغ که از مهم‌ترین منابع پروتئینی مورد مصرف در ایران است، در مطالعات مختلف گزارش شده است (۲، ۳). امروزه مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های پاتوژن به یک معضل بزرگ در امر درمان تبدیل شده است. در طول ۵ دهه گذشته افزایش مقاومت در *اشریشیاکلی* نیز دیده شده است. عمده‌ترین روش مقابله این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌ها می‌باشد که به دو صورت کروموزومی (بسیاری از باکتری‌های گرم منفی) و پلاسمیدی (*استافیلوکوکوس اورئوس*) تولید می‌شوند. با توجه به اهمیت باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز لازم است تدابیر درستی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط این ارگانسیم‌های مقاوم اتخاذ شود. یکی از گزینه‌های مورد توجه در سال‌های اخیر دستیابی به ترکیبات مهارکننده آنزیم بتالاکتاماز است (۴).

در این راستا، تحقیقات گسترده‌ای برای کشف ترکیبات طبیعی با خاصیت ضد باکتریایی انجام شده است. محصولات طبیعی مشتق شده از ضایعات فراوری میوه به‌عنوان منبع متابولیت‌های ضد باکتریایی جدید شناخته شده‌اند. یکی از این ترکیبات، اسید ارسولیک، یک متابولیت ثانویه است که به دلیل اثرات ضد باکتریایی، ضد التهابی و ضد سرطانی خود، به‌طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. ارسولیک اسید بر مسیرهای پیام‌رسانی سلولی، القای آپوپتوز و کاهش رشد تومور مؤثر بوده به‌عنوان یک ترکیب امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان سرطان در نظر گرفته می‌شود (۵). اخیراً فعالیت ضد میکروبی ارسولیک اسید در برابر باکتری‌های مختلف از جمله *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری*، *ویبریو کرا*، *انتروکوکوس فیکالیس* و *لیستریا مونوسیتوز* نشان داده شده است (۶). ارسولیک اسید می‌تواند به‌طور هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک‌ها برای افزایش فعالیت آنها استفاده شود و کارآمدی آن در پراکندگی بیوفیلم تولید شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* اثبات گردیده است (۵). با توجه به خواص بیولوژیک ارسولیک اسید هدف این مطالعه، ارزیابی اثرات مهاری آن بر رشد و بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *اشریشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی باکتری
اشریشیاکلی: در سال ۱۴۰۲ تعداد ۹۰ نمونه گوشت مرغ از مراکز فروش در استان گیلان جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده بر روی محیط‌های کشت آگار مک‌کانکی و آگار EMB کشت داده شدند. سپس کلونی‌های لاکتوز مثبت رشد کرده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شامل بررسی تولید اندول، واکنش متیل رد، واکنش وژ پروسکوئر، تولید اوره آز، مصرف سیترات، تخمیر گلوکز و دکربوکسیلایون ارنیتین و لیزین تعیین هویت گردیدند (۲).

شناسایی مولکولی جدایه‌های اشریشیاکلی

استخراج DNA استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. به این ترتیب که یک کلنی از محیط برداشته و در محیط BHI براث درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری حل و به مدت ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد میکروتیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد. برای لیز سلول‌ها سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد، پس از آن محلول در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده در نظر گرفته شد (۷).

بررسی حضور ژن *uspA* در واکنش PCR جهت

شناسایی مولکولی و تأیید تشخیص اشریشیاکلی از واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن پروتئین USP استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است (۸). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس PCR (سیناژن، ایران)، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۲۰ پیکومول) اختصاصی ژن *uspA*، ۱ میکرولیتر، DNA الگو ۳ میکرولیتر، آب مقطر ۷/۵ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۹ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای طویل شدن نهایی اضافه گردید. از باکتری اشریشیاکلی ATCC 25922 به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

الکتروفورز محصول PCR برای تأیید صحت انجام

PCR و اطمینان از طول درست قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی DNA safe stain (سیناژن، ایران) الکتروفورز گردید. برای این کار، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۲ میکرولیتر از

بافر بارگزاری مخلوط و درون چاهک‌های ژل بارگزاری شدند. در چاهک اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و در چاهک‌های بعدی نمونه‌ها ریخته شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل بر روی صفحه دستگاه ترانس ایلومیناتور مجهز به دوربین تحت اشعه UV قرار داده شد و تصویربرداری گردید.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های

اشریشیاکلی: تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیاکلی توسط تست آنتی‌بیوگرام (دیسک دیفیوژن) و مطابق استاندارد CLSI انجام شد (۹). برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدروت ۰/۵ مک فارلند به صورت چمنی و پر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از کشت دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده شامل جنتامایسین، اریترومایسین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، تتراسیکلین، کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین تحت شرایط استریل با استفاده از پنس استریل به کشت منتقل شد. بعد از قرار دادن دیسک‌ها در پلیت بسته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت پلیت بررسی و با استفاده از خط‌کش قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. بررسی فنوتیپی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در جدایه‌های مورد مطالعه به روش دیسک ترکیبی و طبق دستور عمل CLSI انجام شد. بدین منظور در تست آنتی‌بیوگرام از دیسک‌های سفنازیدیم و سفنازیدیم + کلوالانیک اسید استفاده شد. در صورتی که تفاوت قطر هاله عدم رشد در دیسک تنها و دیسک حاوی مهارکننده کلوالانیک اسید بزرگ‌تر / مساوی ۵ میلی‌متر بود، سویه مورد مطالعه مولد آنزیم در نظر گرفته شد (۹).

ارزیابی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها

به روش میکروپلیت: برای بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم

ابتدا از جدایه‌های مورد مطالعه در محیط تریپتیکاز سوی برات (مرک، آلمان) حاوی ۱ درصد گلوکز سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. سپس به هر چاهک الیزا ۲۰۰ میکرولیتر از این کشت اضافه شد و میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از انکوبه شدن، چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو شدند تا باکتری‌هایی که نجسبیده‌اند جدا شوند. در مرحله بعد، سایر باکتری‌هایی که به چاهک چسبیده‌اند با استفاده از ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. بعد از آن هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال و بوله ۰/۲ درصد رنگ‌آمیزی شد و بعد از ۵ دقیقه رنگ با آب مقطر شستشو داده شد.

بعد از خشک شدن پلیت‌ها، آنالیز کمی بیوفیلم با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر از گلاسیال استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک و خواندن جذب نوری آنها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر محاسبه شد. در ارزیابی بیوفیلم تشکیل شده بر اساس میزان جذب نوری، سویه‌ها به‌عنوان تولیدکننده قوی بیوفیلم ($OD > 1.500$)، تولیدکننده بیوفیلم ($0.500 > OD > 1.500$) و بیوفیلم منفی ($OD < 0.500$) در نظر گرفته شدند (۱۰).

بررسی اثر مهارى ارسولیک اسید بر جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی به روش انتشار از دیسک:

به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی ارسولیک اسید بر جدایه‌های اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، از روش انتشار از دیسک استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدروت ۰/۵ مک‌فارلند به‌صورت چمنی و پر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از کشت دیسک‌های آغشته به ۰/۱ میلی‌گرم میلی‌گرم ارسولیک اسید تحت شرایط استریل با استفاده از پنس استریل به کشت منتقل شد. بعد از قرار دادن دیسک‌ها در پلیت بسته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت پلیت بررسی و با استفاده از

خطکش قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

تعیین MIC ارسولیک اسید به روش برات میکرودایلوشن: جهت بررسی کمترین غلظت مهارکننده رشد ارسولیک اسید بر جدایه‌های اشریشیاکلی، در میکروپلیت ۹۶ خانه سری رقت‌های متوالی از ارسولیک اسید در محیط کشت مولر هینتون برات تهیه شد. سپس از جدایه‌های اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف کشت تازه با کدورتی معادل با استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. سپس از سوسپانسیون میکروبی حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد (۱۱).

بررسی اثربخشی ارسولیک اسید در برابر جدایه

اشریشیاکلی با استفاده از روش محاسبه زمان کشتار (Time kill assay): اثربخشی ارسولیک اسید در برابر جدایه اشریشیاکلی با استفاده از روش محاسبه زمان کشتار در فواصل زمانی مختلف در یک دوره ۲۴ ساعته تعیین شد. در این سنجش، سوسپانسیون باکتریایی $10^5 \times 5$ CFU/mL در لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر مولر هینتون برات همراه با غلظت‌های MIC، 2MIC، 1/2MIC از ارسولیک اسید کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در فواصل زمانی (۰، ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت) انکوباسیون، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت هر چاهک برداشته شد و به‌صورت متوالی (۱:۱۰) با PBS رقیق شد و برای تعیین زنده ماندن باکتری‌ها در پلیت‌های مولر هینتون آگار کشت داده شد (۱۲). آزمایش زمان کشتار در دو تکرار مستقل انجام شد تا نتایج به‌دست آمده از اعتبار بیشتری برخوردار باشد.

بررسی اثر ارسولیک اسید بر مهار بیوفیلم

اشریشیاکلی: اثرات کمی ضد بیوفیلمی به روش میکروپلیت ۹۶ خانه بررسی شد. روش کار همانند ارزیابی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم بود با این تفاوت که محیط

۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت با قرار دادن میکروتیوب در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واکنش متوقف گردید. صحت انجام واکنش سنتز cDNA از طریق انجام الکتروفورز روی ژل آگارز تأیید گردید.

انجام واکنش Real time-PCR:

Real time-PCR سنتز شده به‌عنوان الگو در واکنش Real time-PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این واکنش از ژن *gapA* به‌عنوان ژن استاندارد استفاده شد. پرایمر اختصاصی ژن‌های مورد بررسی به‌صورت لیوفیلیزه از شرکت متابیون (آلمان) تهیه گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT.NO:Q ۹۲۱۰ کره جنوبی به‌صورت زیر انجام شد:

۱۰ میکرولیتر از mix (2x) with syber green ، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۱۰ میکرومول) ۱ میکرولیتر، cDNA الگو (۱ میکروگرم) ۱ میکرولیتر، آب مقطر ۷ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به‌ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه بود. تغییر بیان ژن از طریق $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

تریپتیکاز سوی براث حاوی غلظت تحت MIC ارسولیک اسید بود. چاهک‌های حاوی محیط به تنهایی و ارسولیک اسید به تنهایی عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سنجش کمی بیوفیلم پس از انکوباسیون به‌صورت درصد تعیین شد. میزان جذب نوری چاهک‌های فاقد ارسولیک اسید به‌عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (۱۳). این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد.

بررسی اثر ارسولیک اسید بر بیان ژن‌های *fimH* و *csgA*

استخراج RNA و سنتز cDNA:

از جدایه‌های اشریشیاکلی تیمار شده با غلظت تحت MIC ارسولیک اسید که حضور ژن‌های *fimH* و *csgA* در آنها با واکنش PCR تأیید شده بود، استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن (سیناژن، ایران) انجام گردید. همچنین از کشت باکتری بدون حضور مواد ضد میکروبی به‌عنوان کنترل استفاده شد. بلافاصله از RNA استخراج شده برای ساخت cDNA با استفاده از کیت RT شرکت سیناژن استفاده شد. بدین ترتیب که ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده همراه با ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر با اضافه کردن آب DEPC treated در میکروتیوب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و پس از آن ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط به آرامی spin شد و ۱۰ میکرولیتر cDNA synthesis mix به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش، میکروتیوب به مدت

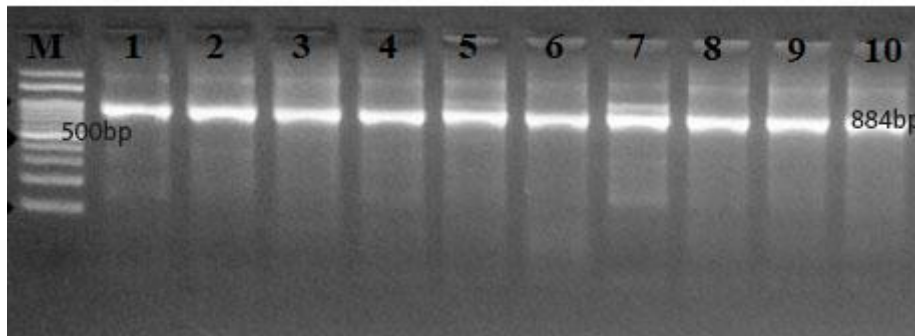
جدول ۱- نام و توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR و Real time PCR

کاربرد	منبع	توالی نوکلئوتیدی (۵' به ۳')	نام ژن
PCR	۷	CCGATACGCTGCCAATCAGT	<i>uspA-F</i>
		ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	<i>uspA-R</i>
Real time-PCR	۱۴	GCAGAGGTGTCATTATATCCC	<i>fimH-F</i>
		CGTTCAGTTAGGACAGGTTC	<i>fimH-R</i>
Real time-PCR		CCCGTATACGAGTTGTCAGA	<i>csgA-F</i>
		GCTCAATCGATCTGACCCAA	<i>csgA-R</i>
Real time-PCR	۱۵	ACTTACGAGCAGATCAAAGC	<i>gapA-F</i>
		AGTTTCACGAAGTTGTCGTT	<i>gapA-R</i>

نتایج

باکتری مورد مطالعه: از تعداد ۹۰ نمونه مورد بررسی، ۵۲ جدایه باسیل گرم منفی، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی که در محیط TSI به صورت اسید-اسید H₂S منفی و گاز مثبت بود، تست حرکت آن مثبت

، ایندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و همچنین سیمون سترات آن منفی بود به عنوان *اشریشیاکلی* در نظر گرفته شدند و در واکنش PCR تشخیص باکتری تأیید شد. الکتروفورز محصول PCR ژن *uspA* در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *uspA* در جدایه‌های *اشریشیاکلی*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: محصول ۸۸۴ جفت بازی ژن *uspA* در باکتری *اشریشیاکلی* ATCC 25922، ستون‌های ۱۰-۲: محصول ۸۸۴ جفت بازی ژن *uspA* در جدایه‌های مورد مطالعه

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: در بررسی

فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به تتراسیکلین (۷۸/۸۴ درصد) و کوتریموکسازول (۷۶/۹۲ درصد) بود. مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شامل اریترومايسين ۶۳/۴۶ درصد، سیپروفلوکساسین ۴۴/۲۳

درصد، سفنازیدیم ۱۳/۴۶ درصد، و سفوتاکسیم ۱۱/۵۴ درصد بود و جنتامایسین مؤثرترین (۹۶/۱۵ درصد حساسیت) آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه بود (جدول ۲). در این بررسی ۲۲ جدایه (۴۲/۳۱ درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی و ۶ جدایه (۱۱/۵۴ درصد) مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند.

جدول ۲. تست آنتی‌بیوگرام جدایه‌های *اشریشیاکلی* مورد مطالعه

تعداد (درصد) مقاومت	آنتی‌بیوتیک
۲ (۳/۸۵)	جنتامایسین
۶ (۱۱/۵۴)	سفوتاکسیم
۷ (۱۳/۴۶)	سفنازیدیم
۲۳ (۴۴/۲۳)	سیپروفلوکساسین
۳۳ (۶۳/۴۶)	اریترومايسين
۴۰ (۷۶/۹۲)	کوتریموکسازول
۴۱ (۷۸/۸۴)	تتراسیکلین
۲۲ (۴۲/۳۱)	مقاومت چندگانه

بررسی قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌ها: در

بررسی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌ها، ۳۸ جدایه (۷۳/۱ درصد) قادر به تولید بیوفیلم بودند که از این تعداد ۲۳ جدایه (۴۴/۲۳ درصد) تولیدکننده بیوفیلم

قوی بودند. ۶ جدایه با قابلیت تولید بیوفیلم قوی و مولد ESBL، برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

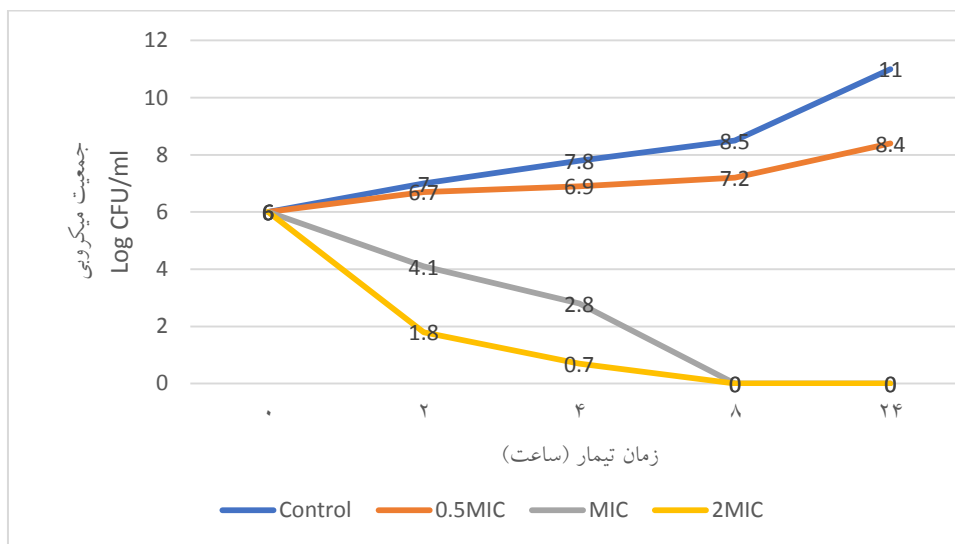
اثر مهارى ارسولیک اسید بر جدایه‌های *اشریشیاکلی*: اثر ارسولیک اسید بر مهار رشد جدایه‌های

ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نمونه شاهد به ۱۱ رسید. در تیمار باکتری با غلظت $1/2MIC$ الاژیک اسید کاهش تدریجی تعداد باکتری‌ها در زمان‌های بین ۰ تا ۲۴ ساعت مشاهده شد و الاژیک اسید باعث کاهش $2/6$ واحدی در $\log_{10} CFU/ml$ پس از ۲۴ ساعت مواجهه شد. در تیمار با غلظت MIC و $2MIC$ الاژیک اسید تعداد سلول‌های سودوموناس آئروژینوزا زنده به شدت کاهش یافت و هیچ سلول زنده پس از ۸ ساعت در جدایه‌های آزمایش شده مشاهده نشد. همچنین مشاهده شد که کاهش جمعیت باکتریایی ایجاد شده توسط الاژیک اسید به غلظت الاژیک اسید و زمان قرار گرفتن در معرض آن بستگی دارد.

اشریشیاکلی به روش انتشار از دیسک و تعیین MIC بررسی شد. قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده توسط $0/1$ میلی‌گرم ارسولیک اسید در جدایه‌های مورد بررسی بین ۷ تا ۱۵ میلی‌متر متغیر بود. کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) ارسولیک اسید در جدایه‌های مولد بتالاکتاماز به روش براث میکرودایلوشن بررسی شد. این مقدار در جدایه‌های مورد بررسی بین $0/4$ تا $1/6$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود.

اثر ارسولیک اسید بر زمان کشتار اشریشیاکلی:

فعالیت باکتری‌کشی الاژیک اسید در برابر جدایه منتخب اشریشیاکلی بر حسب تغییرات در $\log_{10} CFU/ml$ سلول‌های زنده در نمودار ۱ نشان داده شده است. در نمودار سنجش زمان کشتار، $\log_{10} CFU/mL$ پس از ۲۴

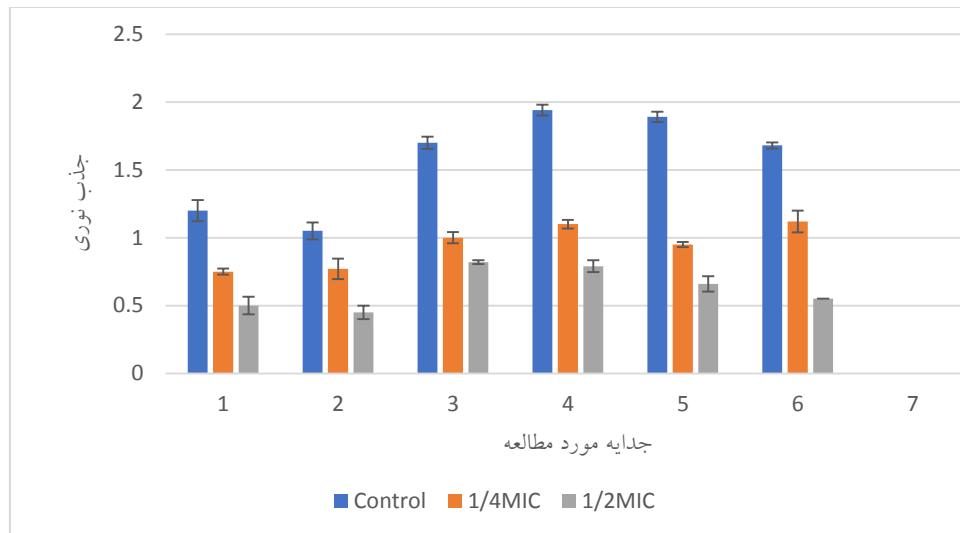


نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف ارسولیک اسید بر زنده‌مانی اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز

بیوفیلم در شرایط تیمار شده با غلظت تحت MIC ارسولیک اسید در ۶ جدایه مورد مطالعه بین $51/2$ تا $67/3$ درصد متغیر بود (نمودار ۲).

اثر مهاری ارسولیک اسید بر تشکیل بیوفیلم

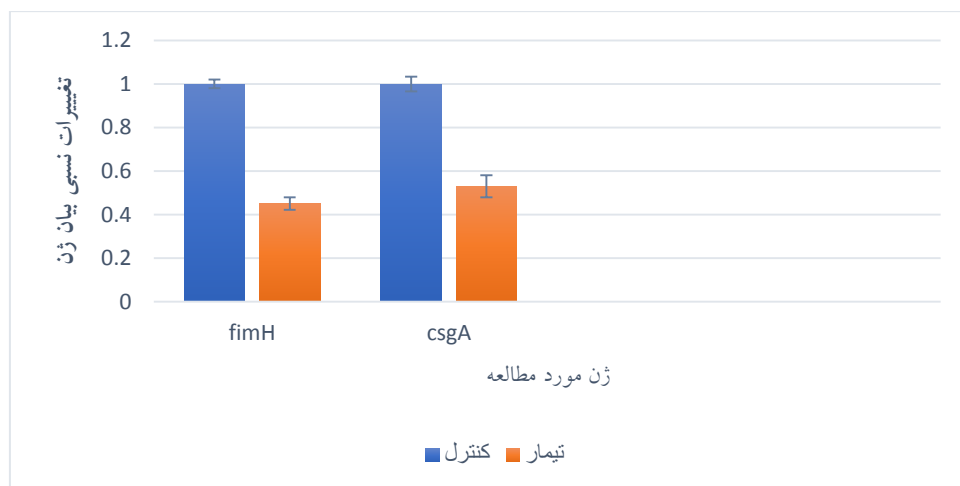
جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی: ارسولیک اسید در غلظت‌های $1/2MIC$ و $1/4MIC$ قادر به کاهش قدرت اتصال اشریشیاکلی‌های مورد مطالعه گردید. درصد مهار



نمودار ۲- جذب نوری جدایه‌های /شریشیالکی تحت تیمار با غلظت‌های 1/4MIC و 1/2MIC در مقایسه با شاهد

احتمال یک درصد معنی‌دار است و ارسولیک اسید به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد موجب کاهش بیان ژن فوق شده است (نمودار ۳). آنالیز آماری با t-test و نرم‌افزار SPSS انجام شده است.

اثر ارسولیک اسید بر بیان ژن‌های *csgA* و *fimH* : بررسی بیان ژن‌های *csgA* و *fimH* ، در باکتری /شریشیالکی تحت تیمار با غلظت SubMIC ارسولیک اسید نشان داد که تفاوت بین تیمار و کنترل در سطح



نمودار ۳- تغییرات بیان ژن‌های *csgA* و *fimH* در نمونه شاهد و تحت تیمار با ارسولیک اسید

مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی می‌باشند. اعضای این خانواده به‌طور معمول نسبت آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند و این مقاومت ناشی از مکانیسم‌های متعدد ذاتی اکتسابی است در حال حاضر، کاهش حساسیت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های /شریشیالکی مشاهده

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بین باکتری‌ها یک مشکل جهانی است و علاوه بر شکست درمان، موجب گسترش مقاومت بین سایر باکتری‌ها و پدید آمدن سویه‌های مقاوم‌تر می‌شود. اعضای خانواده انتروباکتریاسه شامل

می‌شود. چالش پزشکی امروز جستجوی روش‌های جایگزین در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۲). انواع زیادی از مولکول‌ها با پتانسیل فعالیت ضد میکروبی از متابولیسم ثانویه گیاهان تولید می‌شوند. اکثر این مولکول‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی ضعیف‌تری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تولیدی از باکتری‌ها یا قارچ‌ها هستند. با این حال، این ترکیبات می‌توانند به صورت هم‌افزایی با داروهای ضد میکروبی برای تقویت اثر آنها عمل کنند و به میزان کمک کنند تا بر عفونت غلبه کند. ترکیبات گیاهی از جمله، پنتا سیکلیک تری‌ترین‌ها به دلیل فعالیت‌های دارویی متعدد همراه با سمیت کم برای سلول‌های یوکاریوتی به شدت مورد توجه هستند (۱۶، ۱۷).

در این مطالعه از ۹۰ نمونه گوشت مرغ، در ۵۲ مورد باکتری اشریشیاکلای شناسایی شد که ۷۳/۱ درصد این جدایه‌ها مولد بیوفیلم، ۴۲/۳۱ درصد دارای مقاومت چندگانه دارویی و ۱۱/۵۴ درصد مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند. از باکتری‌های جداسازی شده تعداد ۶ جدایه با قدرت تولید بیوفیلم قوی و مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف انتخاب گردید و اثر ارسولیک اسید بر مهار رشد و تشکیل بیوفیلم آنها بررسی شد. در این مطالعه ارسولیک اسید اثر مهاری بر رشد همه جدایه‌ها نشان داد و MIC آن در ۶ جدایه مورد مطالعه بین ۰/۴ تا ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در نتایج به دست آمده توسط Wojnicz و همکاران، مقادیر MIC ارسولیک اسید برای سویه‌های مختلف انتروکوکوس فیکالیس بین ۳۲ تا ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۱۸). در مطالعه Fontanay و همکاران مقادیر MIC ارسولیک اسید در برابر سویه‌های بالینی انتروکوکوس فیکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس بزرگتر/ مساوی ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۱۹). نتایج Horiuchi و همکاران نشان داد که MIC ارسولیک اسید در برابر باکتری‌های گرم منفی بالاتر از MIC آن در سویه‌های گرم مثبت است (۲۰). این تفاوت در مقادیر MIC می‌تواند ناشی از تفاوت در روش‌های مورد استفاده

برای تعیین مقدار MIC، گونه‌های مختلف باکتری‌های آزمایش شده و تفاوت در منشأ این میکروارگانیسم‌ها باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی با لیپوپلی ساکارید در برگچه بیرونی و فسفولیپیدها در برگچه داخلی هستند. این ساختار خاص یک مانع مؤثر در برابر نفوذ ترکیبات ضد میکروبی در گرم منفی است. از آنجایی که اسانس‌های گیاهی و اجزای آنها ماهیتی آبگریز دارند، غشای پلاسمایی حاوی لیپید باکتری را هدف قرار می‌دهند و غشا را نفوذپذیرتر می‌کنند (۲۱). در مطالعه‌ای Broniatowski و همکاران دریافتند که تری‌ترین‌های پنج حلقه‌ای از جمله ارسولیک اسید با فسفولیپیدهای غشاهای باکتریایی تعامل کرده و موجب تخریب غشا، از بین رفتن پایداری سلول و مرگ باکتری می‌شوند (۲۲). این یافته می‌تواند اثر مهاری ارسولیک اسید بر جدایه‌های مورد مطالعه را توجیه کند در بررسی اثر ارسولیک اسید بر کشتار جدایه‌های مورد مطالعه، اثر مهاری آن بر رشد جدایه‌ها، پس از ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت مشاهده شد. بیشترین کاهش تعداد باکتری‌ها پس از ۸ ساعت مشاهده شده و پس از ۲۴ ساعت این کاهش به طور قابل توجهی بیشتر شده است. در مطالعه مشابهی Kim و همکاران نیز نشان دادند که ارسولیک اسید رشد فرم پلانکتونی استریپتوکوکوس سابرینوس را مهار کرده و در غلظت 1/2MIC به طور مؤثری بقا باکتری را کاهش می‌دهد (۲۳).

در مطالعه حاضر ارسولیک اسید در غلظت 1/2MIC توانست تشکیل بیوفیلم جدایه‌های اشریشیاکلی را بین ۵۱/۲ تا ۶۷/۳ درصد مهار کند. در مطالعه Potera و همکاران هم مشخص شد ارسولیک اسید در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قادر است تشکیل بیوفیلم در *E. coli* K-12 و *P. aeruginosa* PAO1 را به ترتیب ۷۹ و ۸۷ درصد مهار کند (۲۴). این تفاوت در مقادیر مهار ممکن است به علت تفاوت در غلظت ارسولیک اسید و شرایط آزمایشی بین دو مطالعه باشد. همچنین مشخص شده است که ارسولیک اسید قادر به مهار تشکیل بیوفیلم

می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مؤثر در خاصیت ضد بیوفیلمی ارسولیک اسید باشد.

نتایج این مطالعه بیانگر اثر مهارى ارسولیک اسید بر رشد جدایه‌های /شیریشیالکی مولد بتالاکتاماز و کاهش قدرت تشکیل بیوفیلیم آنهاست. انجام مطالعات درون‌تن می‌تواند امکان کاربرد آن در کنترل رشد و عفونت ناشی از جدایه‌های مقاوم به داروی این باکتری را روشن سازد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت است. نویسندگان مقاله از حمایت حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت کمال تشکر را دارند.

References

- 1- Zahedi M, Rahimi E, Zahedi M, Momtaz H, Shojaii H. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* in marketed meat in Shahrekord in 2014. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2017; 19(2): 88-97.
- 2- Liaqat Z, Khan I, Azam S, Anwar Y, Althubaiti EH, Maroof L. Isolation and molecular characterization of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* from chicken meat in Pakistan. *Plos one*. 2022; 17(6):e0269194.
- 3- Safarpordehordi F, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Poultry Meat Supply in Isfahan. *Iran J Med Microbiol*. 2014; 8(2): 41-47.
- 4- Moghanni M, Dashtgard A, Barzegari-Esfeden Z. Prevalence of extended spectrum β -Lactamase producing *Escherichia coli* among hospitalized and outpatient children in Shohada Hospital in Qaen during 2017-2018. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2018; 22(2): 214-21.
- 5- Schito AM, Caviglia D, Piatti G, Zorzoli A, Marimpietri D, Zuccari G, et al. Efficacy of Ursolic Acid-Enriched Water-Soluble and Not Cytotoxic Nanoparticles against Enterococci. *Pharmaceutics*. 2021; 13(11): 1976.
- 6- Qian W, Wang W, Zhang J, Wang T, Liu M, Yang M, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-

استافیلوکوکوس اورئوس و پراکندگی بیوفیلیم تولید شده توسط این باکتری است (۲۵، ۲۶). رشد باکتری‌های پاتوژن در بیوفیلیم‌ها تهدید جدی برای سلامت انسان است. چون در بیوفیلیم، باکتری از دسترس سیستم ایمنی و آنتی‌بیوتیک‌ها مصون می‌ماند. با توجه به اینکه بیوفیلیم‌ها عوامل بیماری‌زایی مهم در باکتری‌ها هستند مهار بیوفیلیم توسط ارسولیک اسید اهمیت بسزایی دارد. در مطالعه حاضر ارسولیک اسید موجب کاهش بیان ژن‌های *csgA* و *fimH* شد که هر دو نقش مهمی در تشکیل بیوفیلیم دارند. در مطالعه دیگری تأثیر معنی‌دار ارسولیک اسید بر کاهش بیان ژن‌های مؤثر در بیوفیلیم کلبسیلا پنومونیه گزارش گردید (۶). این یافته‌ها نشان می‌دهند که کاهش بیان ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلیم

resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antibiot*. 2020; 73(6): 382-91.

7- Hojati Z, Zamanzad B, Hashemzadeh M, Molaie R, Gholi-pour A. The FimH gene in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection. *Jundishapu J Microbiol*. 2015; 8(2).

8- Osek J, Dacko J. Development of a PCR-based method for specific identification of genotypic markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *J Vet Med, Series B*. 2001; 48(10): 771-8.

9- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100, 31st ed. Wayne, PA. 2023.

10- Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiologic Methods*. 2003; 54(2): 269-76.

11- Macêdo NS, Barbosa CR, Bezerra AH, Silveira ZD, da Silva L, Coutinho HD, et al. Evaluation of ellagic acid and gallic acid as efflux pump inhibitors in strains of *Staphylococcus aureus*. *Biology Open*. 2022; 11(10): bio059434.

12- Ghrairi T, Hani K. Enhanced bactericidal effect of enterocin A in combination with thyme essential oils against *L. monocytogenes* and *E. coli* O157: H7. *J Food Sci Technol*. 2015; 52: 2148-56.

13- Martínez A, Manrique-Moreno M, Klaiss-Luna MC, Stashenko E, Zafra G, Ortiz C. Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10(12): 1474.

14- Scotti R, Stringaro A, Nicolini L, Zanelato M, Boccia P, Maggi F, et al. Effects of Essential Oils from *Cymbopogon* spp. and *Cinnamomum verum* on Biofilm and Virulence Properties of *Escherichia coli* O157: H7. *Antibiotics*. 2021; 10(2): 113.

15- Shakerimoghaddam A, Ghaemi EA, Jamali A. Effects of ZnO nanoparticles on initial adhesion and fimH gene expression level of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical and Basic Research*. 2017;1(3): 25-8.

16- Song X, Li J, Wang Y, Yuan G, Lai S, Yi H, et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Ursolic Acid Derivatives. *Int J Sci*. 2019; 8(09): 20-3.

17- Sundaramoorthy NS, Mohan HM, Subramaniam S, Raman T, Selva Ganesan S, Sivasubramanian A, et al. Ursolic acid inhibits colistin efflux and curtails colistin resistant *Enterobacteriaceae*. *AMB Express*. 2019; 9: 1-2.

18- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Korze-kwa K, Kicia M, Hendrich A. Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. *Adv Clin Exp Med*. 2017; 26(3): 483-90.

19- Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic ac-

ids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol*. 2008; 120: 272–276.

20- Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull*. 2007; 30: 1147–1149.

21- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar RJ. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(4): 1561-8.

22- Broniatowski M, Flasiński M, Zięba K, Miśkowiec P. Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidyl-glycerols in model systems. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838:2530–2538.

23- Kim MJ, Kim CS, Park JY, Lim YK, Park SN, Ahn SJ, et al. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutans streptococci isolated from Koreans. *Int J Oral Sci*. 2011; 36(1): 7-11.

24- Potera C. Forging a link between biofilms and disease, *Science*, 1999; 19: 1837-1838.

25- Jyothi JS, Putty K, Reddy YN, Dhana-lakshmi K, Umair MH. Antagonistic effect of ursolic acid on *Staphylococcal* biofilms. *Vet World*. 2018;11(10): 1440.

26- Qin N, Tan X, Jiao Y, Liu L, Zhao W, Yang S, et al. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Sci Rep*. 2014; 4(1): 5467.



Investigating the effect of ursolic acid on growth and biofilm formation inhibition and in beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry meat

Elmira Shemshadi¹, Leila Asadpour^{2*}

1- Graduated Student, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2- Associate Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Receive: May 19, 2024; Revise: November 11, 2024; Accept: November 30, 2024

 [10.22034/nfvm.2025.458471.1239](https://doi.org/10.22034/nfvm.2025.458471.1239)

Summary

The challenge of today's medicine is to find alternatives in treatment of infections caused by antibiotic-resistant bacteria. Many types of molecules with antimicrobial potential are produced through the secondary metabolism of plants. This study was aimed to investigate the antimicrobial and anti-biofilm properties of ursolic acid against broad-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* isolated from poultry meat. The inhibitory effect of ursolic acid against the test isolates was investigated using disk diffusion methods. MIC determination and its anti-biofilm effect were investigated using broth microdilution and microtiter plate methods respectively. Additionally, the effect of ursolic acid on the survival of *E. coli* has been checked by Time Kill assay and its effect on the expression level of *fimH* and *csgA* biofilm genes was analyzed by Real time-PCR. In this study, ursolic acid showed an inhibitory effect on the growth of all isolates, with MIC values ranging between 0.4 and 1.6 mg/ml. The percentage of biofilm inhibition in the conditions treated with the concentration of 1/2 MIC of ursolic acid in the 6 studied isolates varied between 51.2 and 67.3%. Furthermore, in the present study, treatment with sub-MIC concentrations of ursolic acid significantly decreased the expression of the *fimH* and *csgA* genes. The results of this study indicate the inhibitory effect of ursolic acid on the growth of beta-lactamase-producing *E. coli* isolates and the reduction of its biofilm formation ability. In vivo studies are required to further clarify its potential clinical application in controlling infections caused by drug-resistant isolates.

Keywords: *E. coli*, Ursolic acid, antibiofilm, betalactamase

New Findings in

Veterinary Microbiology



University of Zabol

Biannual, Volume 7, Issue 2, Autumn 2024 & Winter 2025

ISSN: 4491-2645

Prevalence of genes encoding exotoxins in methicillin-resistant and sensitive Staphylococcus aureus isolated from mosquito larvae in Sistan region by PCR method
Investigating the contamination of Listeria monocytogenes in Iranian local white cheese

Investigation of prevalence and pattern of antibiotic resistance of Salmonella, Pseudomonas and coliform in slaughtered turkey meat and tools in Najaf Abad slaughterhouse, Isfahan

Investigation of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria and Yrisina contamination in sausages and sausages offered in Karaj County

Investigation of Fungal Species Diversity Causing Ocular Infections in Camels in the Zabol Region and Its Relation to Age and Gender: The Role of Climatic Conditions in the Prevalence of Eye Infections

Comparative analysis between compound chromatography and affinity chromatography for the purification of Alpha toxin C.perfringense type A

The effect of adding different levels of selenium-yeast supplement and selenium nanoparticles on the population of protozoa and rumen ammonia concentration of Baluchi fattening male lambs (native of Sistan)

Molecular identification of Macrorhabdus ornithogaster in companion bird

Trypsinization is a Suitable Method to Isolate Rotaviruses Causing Viral Diarrhea in Calves: A Review

Investigation of the antimicrobial properties of fennel and green cumin essential oils on strains of Enterobacter faecalis and Acinetobacter baumannii under laboratory conditions

Study of frequency of enterotoxin coding genes and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates isolated from food samples supplied in Shahrekord County

Investigating the effect of ursolic acid on growth and biofilm formation inhibition and in beta-lactamase-producing Escherichia coli isolated from poultry meat

A 3D model of a Pelagibacter bacterium. The major cellular components include the outer membrane (blue), inner membrane(cyan), peptidoglycan (white), cytoplasm (orange), nucleoid (red) and ribosome-like orbs (yellow spheres).

Zhao X, Schwartz CL, Pierson J, Giovannoni SJ, McIntosh JR, Nicastro D. Three-Dimensional Structure of the Ultraoligotrophic Marine Bacterium "Candidatus Pelagibacter ubique". Appl Environ Microbiol. 2017 Jan 17;83(3):e02807-16. doi: 10.1128/AEM.02807-16. PMID: 27836840; PMCID: PMC5244296.

