دانشگاه زابل

تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

فصلنامه- دوره هشتم-شماره اول، بهار ۱۴۰۴

شاپا: ۴۴۹۱-۲۶۴۵

جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما آگالاکتیه از گوسفند و بز در استان گلستان

لاشه‌های بزهای کشتار شده در کرمان؛ مخزن بالقوه‌ی اشریشیاکلی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک های بتالاکتام و چالشی برای سلامت عمومی

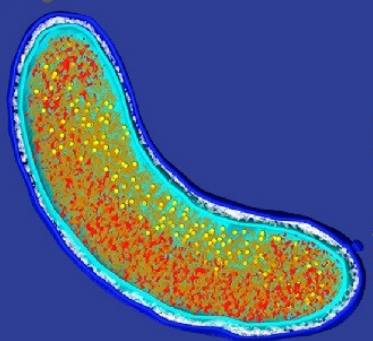
تاثیر سطوح مختلف مکمل روی (اکسید روی، نانو اکسید روی و روی- متیونین) بر جمعیت پروتوزوآیی و نیتروژن آمونیاکی شکمبه بره‌های نر نژاد بلوچی

تعیین هویت ژنتیکی واکسن‌های بیماری بورس عفونی پرندگان در ایران: کمک به انتخاب واکسن مناسب و مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی

بررسی بقایای آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در تخم‌مرغ‌های تجاری به روش الایزا

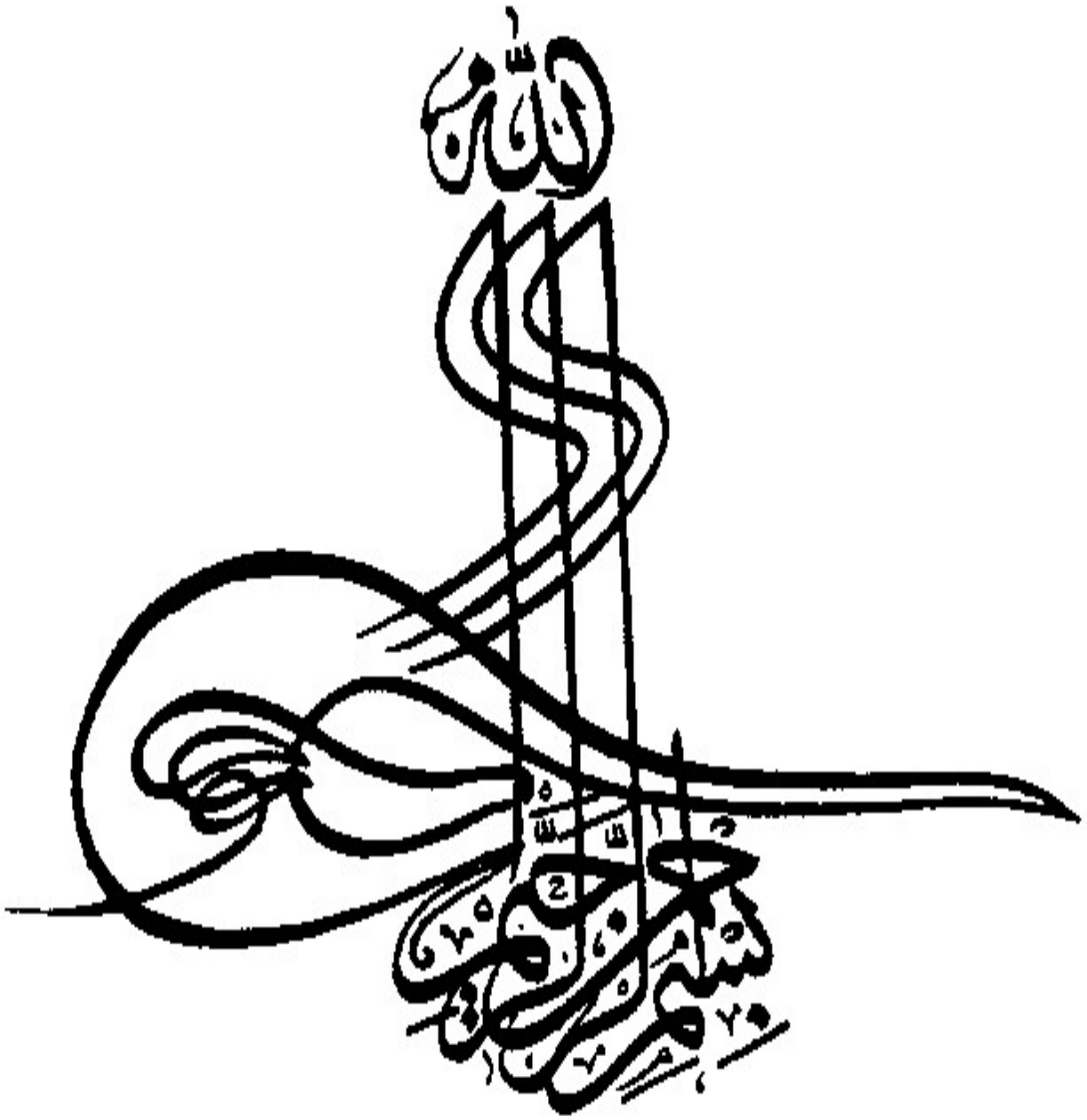
ارزیابی شیوع، ریسک فاکتورها و حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی در بره‌های نوزاد مبتلا به اسهال در استان قزوین

بررسی شیوع سرمی بروسلا و اکینوکوکوس و عوامل خطر آنها در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد



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

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.


بسم الله الرحمن الرحيم

نشریه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

دوره ۸، شماره ۱

ناشر: دانشگاه زابل

سردبیر:
تقی زهرایی صالحی؛ *tsaleh@ut.ac.ir*

مدیر مسئول:
داریوش سعادتی؛ *saadatdariush@uoz.ac.ir*

مدیر اجرایی:
احمد راشکی؛ *ah_rashki@usal.es*

هیات دبیران:

افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد بکائیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

مهدی راسخ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

سعید سالاری: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تقی زهرائی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

مجید پهلوان: گروه علوم اعصاب بالینی، مرکز پزشکی مولکولی (CMM)، دانشگاه کارولینسک

کارشناس نشریه: حبیب دهمرده

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

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

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

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

پست الکترونیک: nfvm@uoz.ac.ir **وبسایت**: nfvm.uoz.ac.ir

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه

تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی

از آنجایی که هدف نشریه تازه‌ها در میکروب شناسی دامپزشکی، ارتقا علمی نشریه و پیوستن به نشریات scopus و ISI 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 میکروب‌شناسی دامپزشکی، دراین مجله پذیرفته می‌شود.

شیوه نگارش مقاله:

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

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

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

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

برای ترازبندی پاراگراف‌ها از justify low استفاده نشود و ترجیحا از گزینه justify یا Medium 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 راحت‌تر 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 به‌صورت 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).

نتـایج: مـتن قسـمت نتـایج بایـد مختصـر و واضـح باشـد می‌تـوان از جـداول، اشـکال، نمودارهـای آمـاری، گراف‌هـا و تصاویر برای تبیـین نتـایج اسـتفاده کـرد. از آوردن جـداول و نمودارهـایی کـه اطلاعـات و داده‌هـای آنهـا در مـتن مقالـه بـه طور کامل آورده شده اسـت، اجتنـاب گـردد. در جـداول و نمودارهـا نبایـد اطلاعـات یکسـانی ارائـه شـود. اگـر تعـداد کمـی یافته و یا یک نتیجه ساده وجود دارد، بهتر است به جای جدول و نمودار، این یافته در متن آورده شود.

تعـداد جـداول و نمودارهـا بایـد متناسـب بـا حجـم مقالـه باشـد. جـدول‌ها بهتـر اسـت بـا اسـتفاده از امکـان Table در Microsoft Word طراحـی شـوند. جـداول بـه صـورت عکـس ارائـه نگردنـد و شـماره‌گذاری متـوالی داشـته باشـند و در مـتن مقالـه بـه شـماره‌ی جـداول بـه صـورت متـوالی اشـاره گـردد. در زیرنـویس جـداول، همـه‌ی اختصـاری‌های غیراسـتاندارد استفاده‌شـده، توضـیح داده شـوند. مـتن جـداول فارسـی باشـد. نمودارهـا در نرم‌افزار Microsoft-Excel با عناوین مشخص و مجزا طراحی شوند و به صورت تصویر درج نگردد.

عکس‌هـا و تصـاویر بـه صـورت فایل‌هـایی از نـوع JPEG و بـا کیفیـت مناسـب آورده شـود. عکس‌هـا بایـد دقیـق و روشن و به نحوی تهیه شـوند کـه از نظـر فنـی چـاپ آن‌هـا بـا کیفیـت مطلـوب در مجلـه مقـدور باشـد. عکس‌هـا و تصـاویر باید شماره‌گذاری متوالی داشته و ترتیب آن‌هـا بـر اسـاس ارجـاع بـه آن‌هـا در مـتن باشـد. اگـر عکـس منتشـر شـده اسـت، منبع اولیه ذکر شود و اجازه‌ی کتبی آن ارائه گردد.

بحث و نتیجه‌گیری: در ایـن قسـمت ضـمن تحلیـل نتـایج به‌دسـت آمـده از تحقیـق، بـه سـایر تحقیقـاتی کـه نتـایج تحقیق اخیر را تأئید و یـا رد می‌کننـد اشـاره شـود. در مـورد تحقیقـاتی کـه نتـایج آنهـا بـا نتیجـه تحقیـق اخیـر همخـوانی نـدارد بایـد در مـورد علـت نـاهمخوانی بحـث شـود و بیـان گـردد کـه تفـاوت مـذکور از کجـا می‌توانـد ناشـی شـده باشـد. عبـاراتی کـه در مقدمـه یـا نتـایج آورده شـده بـا جزئیـات در قسـمت بحـث و نتیجـه‌گیری تکـرار نشـوند. پـاراگراف پایانی به منزله نتیجه‌گیری است. در این پاراگراف روی جنبه‌های مهم و جدید مطالعه تأکید شود.

سپاسـگزاری: از کلیـه‌ی افـراد یـا سـازمان‌هایی کـه در فـراهم کـردن تسـهیلات، کمک‌هـای مـالی و یـا تکنیکـی همکاری نموده‌اند و نام آنهـا جـزء نویسـندگان مقالـه نیسـت، تشـکر بـه عمـل آیـد و نیـز در صـورتی کـه مقالـه برگرفتـه از پایان‌نامه و یا طرح پژوهشی مصوب است، شماره ثبت پایان‌نامه یا طرح پژوهشی هم ذکر شود.

منابع: کلیـه‌ی منـابع حتـی منـابع فارسـی بـه انگلیسـی ترجمـه و نوشـته شـوند. در انتهـای منـابع فارسـی بـه زبـان اصـلی آن اشـاره شـود و [In Persian] آورده شـود. منـابع بـه ترتیـب اسـتفاده در مـتن شـماره‌گذاری و طبـق اصـول منابع "ونکوور" مرتـب شـوند، بـرای ارجـاع بـه مقـالات از اعـداد ریاضـی داخـل پرانتـز اسـتفاده شـود بـه طـور مثـال (۱۱). در صورتی که به مراجع پی‌درپـی اشـاره می‌شـود بایـد بـین اولـین و آخـرین شـماره از خـط فاصـله اسـتفاده کـرد، در غیـر این‌صورت از کامـا "،" بایـد سـود جسـت (مثـال: ۷-۹ یـا ۷، ۵). توصـیه می‌شـود جهـت نوشـتن منـابع از نرم‌افـزار مـدیریت منابع از جمله EndNote یاReference Manager استفاده کنید.

نحوه رفرنس نویسی:

مقالـه: نـام خـانوادگی و حـروف اول نـام نویسـنده یـا نویسـندگان (بـین نـام نویسـندگان از کامـا "،" اسـتفاده شـود). عنـوان کامـل مقالـه. نـام کوتـاه شـده مجلـه. سـال انتشـار; دوره(شـماره مجلـه): شـماره صـفحات. در صـورتی‌که تعـداد 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 (*cryptisporidium* 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.

کتـــاب: نـــام خـــانوادگی و حـــروف اول نـــام نویســـنده یـــا نویســـندگان. عنـــوان کتـــاب. شـــماره چـــاپ. شـــهر محـــل چاپ: ناشر; سال انتشار، شماره صفحه

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

مقالـــه کنفرانســـی: نـــام خـــانوادگی و حـــروف اول نـــام نویســـنده یـــا نویســـندگان. عنـــوان مقالـــه کنفـــرانس، نـــام 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: بـیش از ۳ منبـع ذکـر نشـود. نـام خـانوادگی و حـروف اول نـام نویسـنده یـا نویسـندگان. عنـوان وب سـایت [Internet] ، محـل انتشـار: ناشـر; آدرس وبسـایت Available from:، تـاریخ آخـرین بـه روزرسـانی; تـاریخ 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 می‌باشد:

گزارش موردی (CaseReport) باید شامل بخش‌های زیر باشد:

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

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

***بحث**

در تهیـه ایـن مقـالات بایـد توجـه داشـت کـه در صـورتی کـه محقـق بـر روی نمونـه‌های انسـانی کـار می‌کنـد اسـرار بیمار محرمانه بماند و همچنین یک فرم رضایت‌نامه از بیمار تهیه گردد و ضمیمه مقاله شود.

مقاله مروری (Review)

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

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

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

مقاله کوتاه (ShortCommunication)

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 میکروب‌شناسی دامپزشکی، گزارش و نقد گردهمایی‌های آموزش میکروب‌شناسی 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 می بایست تکمیل شود و به همراه فایل های مقاله بارگزاری گردد. اسامی نویسندگان نباید در فایل اصلی مقاله ذکر شود، فایل های مربوطه باید دانلود 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.

نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دانشگاه زابل
دانشکده دامپزشکی

۱

دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ۱- ۱۰

جداسازی و شناسایی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از گوسفند و بز در استان گلستان

پرستو پورغفور لنگرودی*

عضو هیات علمی، بخش تحقیقات بیماری‌های باکتریایی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ اردیبهشت ۱۴۰۲، بازنگری: ۰۳ تیر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۸ تیر ۱۴۰۲

10.22034/NFVM.2023.383539.1173

چکیده

بیماری آگالاکسی یک بیماری عفونی و مسری در گوسفند و بز است که عامل آن *مایکوپلاسما* می‌باشد. اولین مطالعه بیماری آگالاکسی در استان گلستان است که با شناسائی کانون‌های بیماری و نمونه‌گیری از دام‌های مبتلا با روش کشت، سویه‌های دخیل در بیماری آگالاکسی جداسازی و سپس به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مورد شناسایی و تائید قرار گرفت. در این پژوهش نمونه‌های اخذ شده شامل شیر، سوآپ از ضایعات چشم و واژن و پونکسیون از مایعات مفصلی گوسفند و بزهای مشکوک انجام شد. در آزمایش جداسازی بر روی نمونه‌های اخذ شده، جنس *مایکوپلاسما* در نمونه‌های بزی و گوسفندی به‌ترتیب ۵۴/۱۷ و ۹۸/۲۷ درصد تشخیص داده شد. به‌طوری که جنس *مایکوپلاسما* در نمونه‌های شیر، سوآپ چشمی و سوآپ واژنی بزی به‌ترتیب ۷۷/۷۸، ۴۲/۸۵ و۰درصد بود. همچنین در نمونه‌های شیر، سوآپ چشمی، سوآپ واژنی، مایع مفصلی و ترشحات جنین سقط شده گوسفندی به‌ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۶/۳۰، ۱۰۰ ،۱۰۰ و۰درصد جنس *مایکوپلاسما* جدا شد. برای بررسی تأیید حضور جنس *مایکوپلاسما* و *مایکوپلاسما آگالاکتیه* با استفاده از روش PCR و تکثیر ژن ۱۶SrRNA باند اختصاصی جنس در ۱۶۳bp و آغازگر FS2 جهت شناسائی گونه توانائی آغاز تکثیر قطعه‌ای از ژن لیپوپروتئین در ۳۷۵bp انجام شد. تمامی نمونه‌های مثبت جنس جهت جداسازی گونه *آگالاکتیه* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های مثبت با عامل *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها (۷۶/۹۲ درصد) و گوسفندان (۲۴/۵۷ درصد) به‌دست آمد. نتایج نشان می‌دهد که گونه‌های دیگر غیر از *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها (۰۸/ ۲۳ درصد) و گوسفندان (۷۵/۴۳ درصد) می‌تواند وجود داشته باشد.

واژگان کلیدی: *گوسفند و بز، گلستان، مایکوپلاسما آگالاکتیه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: poorghafoor@gmail.com

مقدمه

آگالاکسی در اروپا، آفریقای شمالی و قسمت‌هایی از آسیا شیوع دارد یک بیماری عفونی و مسری در گوسفند و بز (غیر وابسته به جنس) می‌باشد. معمولاً بلافاصله بعد از زایمان بروز کرده و از طریق سه شکل ورم پستان، آرتریت و کونژکتیویت شناخته می‌شود. حیوانات آبستن ممکن است سقط کنند. این بیماری در حیوانات جوان به‌علت عوارض ریوی، کشنده است. این جرم از شیر دفع شده و می‌تواند در بین دو دوره شیردهی در عقده‌های لنفاوی پستان ساکن گردد (۱).

گرچه این بیماری تلفات زیادی ندارد ولی به‌علت طولانی بودن دوره بیماری خسارت اقتصادی زیادی به همراه دارد. تولید شیر حتی پس از بهبودی دام نیز به حالت عادی بر نمی‌گردد. همچنین بالا بودن میزان سقط جنین در گله از جمله خسارات اقتصادی شناخته شده است. در جهت مقابله با بیماری هر ساله جمعیت گوسفند و بز استان با واکسن تولیدی مؤسسه رازی مایه‌کوبی شده ولی در بعضی گله‌ها علی‌رغم انجام منظم مایه‌کوبی همچنان درگیر بیماری می‌شوند (۲).

این بیماری (به‌خصوص در بز) به‌صورت سندرم و با عوامل *مایکوپلاسمائی* مختلف دیگری غیر از آگالاکتیه عارض می‌گردد. بیماری مربوط به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌بایست از دیگر عوامل و گونه‌های مایکوپلاسما همچون *مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم*، *مایکوپلاسما پوتریفسینس*، *مایکوپلاسما مایکوئیدس کاپری* و *مایکوپلاسما مایکوئیدس مایکوئیدس* تیپ کلنی بزرگ تشخیص داده شود (۳، ۴، ۵).

قادرسهی و اخلاقی گزارش کردند که علاوه بر *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (۳۱ درصد) سویه‌های *مایکوپلاسما مایکوئیدس* (۲۵ درصد)، *مایکوپلاسما کاپریکولوم*(۲۲ درصد) و *مایکوپلاسما پوتریفسینس* (۵ درصد) در بروز بیماری آگالاکسی در ایران نقش دارند (۶، ۷). اعرابی و ستوده‌نیا گزارش کردند که مایکوپلاسماهای جداشده از شیر بز و گوسفند بر اساس تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف، به‌خصوص گلوکز مقایسه شده‌اند و برای اولین بار *مایکوپلاسما مایکوئیدس مایکوئیدس* از ایران جداسازی و گزارش شده است (۸).

اعرابی و ستوده‌نیا۴۹۰ نمونه شیر از نواحی مختلف کشور جمع‌آوری و بررسی کردند که از این میان ۹۶ نمونه از نظر آزمایش‌های بیوشیمیائی مثبت بوده و از این تعداد ۲۳ نمونه از نظر سرولوژیکی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* تشخیص داده شد. همچنین این محققین انجام برنامه واکسیناسیون دام‌ها را در سرتاسر کشور توصیه کردند (۹).

ستوده‌نیا و همکاران در مورد واکنش متقاطع مابین دو سویه آگالاکتیه لرستان و AIK2 در سرم گوسفندان واکسینه با واکسن زنده، در ابتدا تعداد ۱۴ رأس بز و گوسفند با واکسن آگالاگسی ایمن کردند و سپس ۷/۵ ماه بعد با سویه حاد AIK2 چلنج دادند. سرم به‌دست آمده از خون آنها توسط آزمایش ممانعت از رشد با پادگن‌های سویه لرستان و AIK2 مجاور گردید و نتیجه‌گیری شد که هر دو پادگن واکنش مشابهی در برابر پادتن‌های تولید شده در دام‌های واکسینه دارند (۱۰).

روز باسکونا*و همکاران پس از کشت و جداسازی *مایکوپلاسما مایکوئیدس* از نمونه‌های مشکوک در ارتباط با نحوه شناسائی سویه F38 *مایکوپلاسما مایکوئیدس* به روش PCR تحقیق نموده و موفق به تعیین توالی DNA آن شدند (۱۱). سولسونا[]و همکاران پس از کشت و جداسازی ۳۱ سویه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، آن را از نظر یکنواختی پروتئینی و متغیر بودن پادگن، مورد بررسی قرار دادند (۱۲). تولا[]و همکاران روی نمونه‌های شیر گوسفندان مبتلا به تورم پستان در ۴ منطقه ایتالیا نسبت به جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* اقدام نمودند و نتیجه‌گیری کردند که این روش یک روش سریع

*- Ros Bascunana

[]- Solsona

[]- Tola

و اختصاصی برای جستجو و جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* است (۱۳، ۱۴). زدولکووا* و همکاران از گوسفندان و بزهای مبتلا به آگالاکسی در اردن نمونه‌برداری کردند و بر روی آنها آزمایش PCR انجام دادند و در نهایت توانستند *مایکوپلاسما آگالاکتیه* را از نمونه‌ها جداسازی نمایند (۱۵).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: جمعیت مورد بررسی در این پژوهش، گوسفند و بزهای استان گلستان بود. نمونه‌گیری مبتنی بر هدف انجام گرفت. بدین صورت که به‌مدت سه سال بر اساس گزارشات دامپزشکان و سایر همکاران بخش خصوصی، گله‌های مشکوک مورد بررسی و معاینات قرار گرفت. نمونه‌ها به‌صورت دوشش از ترشحات پستان، سوآب از ضایعات چشم، سواپ واژنی وپونکسیون از مایعات مفصلی از دام‌های بیمار بسته به اینکه کدام عضو درگیر شده باشد انجام شد (۱۵، ۱۶). ترشحات پستانی، سوآب چشمی و واژنی پس از افزودن به محیط انتقالی[] PPLO Broth و مایعات مفصلی بدون اضافه کردن محیط انتقالی به لوله‌های درپوش‌دار انتقال یافته و در مجاورت یخ در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما ارسال و به‌صورت موازی تحت دو روش کشت و PCR نسبت به جداسازی عامل بیماری اقدام شد. پس از ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط PPLO Broth جهت غنی‌سازی برای یک دوره حدود ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند .پس از اتمام غنی‌سازی نمونه‌ها، جهت جداسازی و غنی‌سازی مایکوپلاسما آگالاکتیه تحت دو روش کشت و PCR ، نمونه را چندین بار پیپتاژ کرده، حدود ۰/۵ میلی‌لیتر را جهت استخراج DNA داخل تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته از باقیمانده نمونه جهت کشت استفاده شد (۱۷).

روش کشت: نمونه‌هائی که در محیط PPLO Broth به آزمایشگاه ارسال شدند ابتدا برای یک دوره‌ی حدود ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون گردیدند. نمونه‌های مایع مفصلی پس از انتقال به آزمایشگاه به محیط PPLO Broth انتقال یافته و برای یک دوره حدود ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون شدند. تمامی محیط‌های PPLO Broth حاوی نمونه، توسط فیلترهای مخصوص سرسرنگی PVDF[] که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتراند، فیلتراسیون شدند. با استفاده از سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتر از محلول براث کشت شده را برداشته، سرنگ را در دهانه فیلتر قرار داده و با فشار کم و به آرامی محلول وارد محیط کشت دوم PPLO Broth (pH 6-8) گردید. سپس این محیط در انکوباتور Co_2 دار قرار گرفته و ۵-۳ روز تحت نظر قرار گرفت. این محیط به‌دلیل دارا بودن فنل رد قرمز رنگ است که در صورت رشد باکتری تغییر رنگ داده و به رنگ زرد متمایل می‌شود. علاوه بر این ایجاد کدورت دال بر رشد باکتری در محیط است (رشد باکتری همیشه سبب تغییر رنگ نمی‌شود). پس از گذشت زمان لازم تغییر رنگ یا ایجاد کدورت مشاهده و ثبت گردید و در هر صورت محیط‌ها مجدداً در PPLO Broth پاساژ داده شد و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، ۰/۲ میلی‌لیتر از هر کدام از محیط‌های مایع روی محیط آگار مایکوپلاسما در پلیت کشت داده شده، به انکوباتور Co_2 دار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۱ روز انکوبه گردیدند. محیط‌های کشت PPLO جامد هر روز با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰x(شکل ۱) از نظر رشد و تشکیل پرگنه‌های مخصوص تحت بررسی قرار گرفتند. چنانچه تغییر رنگ یا ایجاد کدورت در محیط PPLO Broth ناشی از آلودگی مایکوپلاسمائی باشد باید

*- Zendulkova

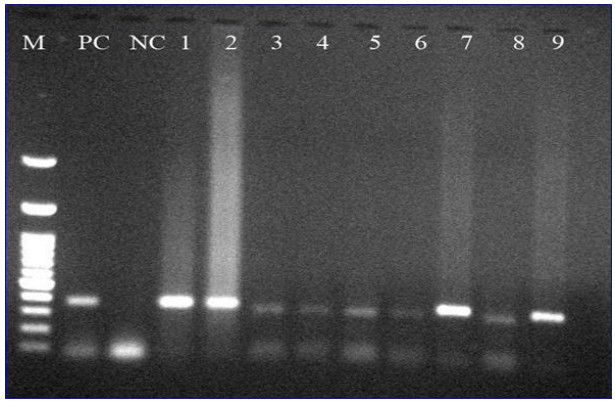
	Gms / Litre
from	250.000
mal tissue	10.000
	5.000
	7.8±0.2

l, standardized to suit performance parameters

[] Poly Vinylidene Fluride

در محیط آگار نیز پرگنه مخصوص تشکیل گردد. در صورت مشاهده‌ی پرگنه شبیه به تخم‌مرغ نیمرو، حضور مایکوپلاسما در نمونه تلقی شد (۱۷).

شکل ۱- تصویر میکروسکوپی ۴۰x پرگنه‌های مشاهده شده بر روی PPLOagar (۲)



شکل ۲- الکتروفورزیز ژل آگار و رنگ‌آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید جهت تشخیص جنس *مایکوپلاسما* (M مارکر، PC نمونه کنترل مثبت، NC نمونه کنترل منفی، نمونه‌های مشکوک)

روش PCR: برای انجام آزمایش PCR در این تحقیق ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه‌های غنی‌شده سانتریفوژ شده و رسوب باکتری تهیه گردید. برای استخراج DNA باکتری روش فنل-کلروفرم و پروتوکل کوجیما و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۱۸). کنترل مثبت استفاده شده جهت انجام واکنش‌های PCR سویه‌ی استاندارد *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (NCTC 10123) و کنترل منفی PPLO Broth بودند. در این پژوهش-ترخیص DNA با استفاده از کیت تجاری PCR Maser Kit تهیه شده از شرکت سیناژن انجام شد- با استفاده از آغازگرهای شناسایی جنس که قادر به تکثیر قطعه‌ای از ژن 16S rRNA به اندازه ۱۶۳ جفت باز بودند و از آغازگرهای FS2 و FS1 که جهت شناسایی گونه *مایکوپلاسما* توانایی تکثیر قطعه‌ای از ژن لیپوپروتئین به اندازه ۳۷۵ جفت باز ویژه گونه *آگالاکتیه* به‌عنوان DNAهای هدف استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* به روش PCR

آغازگر	ژن هدف	توالی	طول(bp)	منبع
FS1	16S rRNA	F: 5-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3 R: 5-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3	163	Kojima et al. 1997
FS2	Lipoprotein	F: 5-AAAGGTGCTTGAGAAATGGC-3	375	Tola et al. 1997

محصول PCR در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و هر میلی‌لیتر از محصول PCR با ۲ میلی‌لیتر از(×4) Loading Buffer مخلوط و محصول در ژل آگار یک درصد که با سایبر رنگ شده بود حرکت داده شد و تحت الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. در سه چاهک اول به‌ترتیب مارکر، کنترل مثبت و کنترل منفی قرار گرفتند.

باندهای ایجاد شده پس از انتقال به دستگاه پرتوتاب ماوراء بنفش مشاهده و تصاویر ثبت شد.

نتایج

در این مطالعه طی سه سال از ۱۷۵ گوسفند مشکوک و ۲۴ بز مشکوک نمونه‌گیری شد (جدول ۲، ۳ و ۴).

جدول ۲- پراکندگی نتایج کشت و PCR جنس مایکوپلاسما

نتایج آزمایش			تعداد نمونه							جمع	
			بز		گوسفند						
کشت	PCR	شیر	سوآب چشمی	سوآب واژن	شیر	سوآب چشمی	سوآب واژن	مایع مفصلی	ترشحات جنین سقط‌شده	بز	گوسفند
+	+	۶	۶	۰	۱۳	۲۲	۱۴	۱	۰	۱۲	۵۰
+	-	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۱
-	+	۱	۰	۰	۳	۴	۰	۰	۰	۱	۷
-	-	۲	۷	۱	۳۸	۵۹	۱۲	۱۱	۱	۱۰	۱۲۱
جمع		۹	۱۴	۱	۵۴	۸۶	۲۶	۱۲	۱	۴	۱۷۹
		۲۴			۱۷۹ (از یک گوسفند چند نمونه گرفته شده است)					۲۰۳	

جدول ۳- پراکندگی نتایج کشت و PCR جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*

نوع دام	نوع نمونه (تعداد نمونه)	نتایج					
		کشت		PCR جنس مایکوپلاسما		PCR گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*	
		+	-	+	-	+	-
بز	شیر (۹)	۶	۱	۷	۰	۶	۱
	سوآب چشمی (۱۴)	۷	۰	۶	۱	۴	۳
	سوآب واژن (۱)	۰	۱	۰	۱	۰	۱
جمع	۲۴	۱۳	۲	۱۳	۲	۱۰	۵
گوسفند	شیر (۱۶)	۱۳	۳	۱۶	۰	۴	۱۲
	سوآب چشمی (۲۷)	۲۳	۴	۲۶	۱	۵	۲۲
	سوآب واژن (۱۴)	۱۴	۰	۱۴	۰	۴	۱۰
	مایع مفصلی (۱)	۱	۰	۱	۰	۱	۰
	ترشحات جنین سقط شده (۱)	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۴- پراکندگی نتایج PCR جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*

نتایج آزمایش PCR		تعداد نمونه								جمع	
		بز			گوسفند						
جنس	گونه	شیر	سواب چشمی	سواب واژن	شیر	سواب چشمی	سواب واژن	مایع مفصلی	ترشحات جنین سقط شده	بز	گوسفند
+	+	۶	۴	۰	۴	۵	۴	۱	۰	۱۰	۱۴
+	-	۱	۲	۰	۱۲	۲۱	۱۰	۰	۰	۳	۴۳
-	+	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
-	-	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۲
جمع		۷	۶	۱	۱۶	۲۷	۱۴	۱	۱	۱۴	۵۹
		۱۴			۵۹					۷۳	

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج کشت و روش PCR، جنس *مایکوپلاسما* و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از بزها و گوسفندان استان گلستان جدا و تأیید گردید. به‌طوری که مشخص شد در دام‌های مشکوک به بیماری آگالاکسی مسری در بزها ۵۴/۱۷ درصد و نمونه‌های گوسفندی ۹۸/۲۷ درصد به جنس *مایکوپلاسما* آلوده بودند. در تحقیق حاضر تمامی نمونه‌هایی که از نظر جنس *مایکوپلاسما* مثبت تشخیص داده شدند برای جداسازی گونه آگالاکتیه تحت آزمایش PCR قرار گرفتند و درصد نمونه‌های گونه *آگالاکتیه* در گوسفندان از نمونه شیر (۳۰/۷۶ درصد)، سواپ چشم (۲۱/۷۳ درصد)، واژن (۲۵/۵۷۵۷ درصد۲۵) و مایع مفصلی (۱۰۰ درصد)، البته فقط یک مورد مایع مفصلی *مایکوپلاسما* مثبت بود. در بزها از شیر (۱۰۰ درصد) و سواب چشم (۵۷/۱۴ درصد) جدا شد. اما در هیچ‌کدام از نمونه‌های بز گونه *آگالاکتیه* از سواپ واژن جدا نگردید. که این یافته، نتایج برخی از تحقیقات دیگر در ایران و همچنین نتایج پژوهش‌های صورت گرفته در خارج از ایران را تائید می‌نماید، که آلودگی با گونه‌های دیگر *مایکوپلاسما* در بز را عامل ایجاد آگالاکسی ذکرکرده‌اند (۲۰، ۲۲، ۲۳).

طبق تحقیقی که در استان اردبیل انجام شد از ۱۵۱ مورد مشکوک نمونه گیری شد ۳۳ نمونه در کشت مثبت بودند و کلاً پس از انجام PCR ۲۵ نمونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* بودند (۱۹). به دنبال شیوع مشکوک آگالاکسی در اردبیل نمونه‌گیری از ۱۱۶ گوسفند و ۱۶ بز مبتلا به نوع حاد بیماری انجام شد. ۳۳ نمونه (۲۵ درصد) برای نمونه‌های *مایکوپلاسما* مثبت بودند (۲۰). خضری و همکاران در نمونه‌های اخذ شده از گوسفندان منطقه کردستان گزارش کردند که جنس *مایکوپلاسما* در آزمایش کشت و PCR به‌ترتیب در ۳۴/۸ و ۶۶/۷ در صد نمونه‌ها تشخیص داده شد (۲۱). عزی و همکاران در بررسی پنومونی مایکوپلاسمائی در کشتارگاه زیاران، ۲۸۲ نمونه از ۱۲۱۶۸ نمونه ریه ضبطی در کشتارگاه زیاران را به‌طور هفتگی و در طول یک سال مورد مطالعه قرار دادند. این محققین گزارش کردند که جنس *مایکوپلاسما* از ۴ مورد گوسفند و ۲ مورد بز جداسازی گردید که با آزمایش PCR جنس *مایکوپلاسما* نیز تائید گردید (۲۲). در این مطالعه با استفاده از روش PCR، نسبت به مقایسه میزان آلودگی به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گوسفندان و بزهای مشکوک به بیماری آگالاکسی واگیردار اقدام شد. به‌طوری که موارد ابتلا به آگالاکسی با عامل *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها (۷۶/۹۲ درصد) و گوسفندان (۲۴/۵۶ درصد) به‌دست آمد. به عبارت دیگر در این دام‌ها گونه‌های دیگر غیر از *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها و گوسفندان می‌تواند وجود داشته باشد. حسنی طباطبائی و فیروزی گزارش کردند عامل اصلی بیماری آگالاکسی در گوسفند و بز *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌باشد (۴). مرادی و همکاران با

روش کشت و جداسازی در نمونه‌های شیر گوسفندان و بزها در منطقه کردستان، وجود *مایکوپلاسما آگالاکتیه* را مورد بررسی قرار دادند ؛ ۳۶۷ نمونه شیر از گوسفند و بز گرفته شد. در کشت ۲۰ نمونه *مایکوپلاسما* مثبت بودند و در آزمایش PCR ۵ نمونه (۴ نمونه مربوط به گوسفندو ۱ نمونه مربوط به بز) *آگالاکتیه* مثبت بودند (۲۴). خیرخواه و همکاران از کرمان گزارش کردند که از ۱۴۲ نمونه گوسفندی ۵۹ نمونه *مایکوپلاسما* بودند و ۱۷ مورد *آگالاکتیه* ،و از ۸۵ نمونه مربوط به بز ۴۶ نمونه *مایکوپلاسما* که ۲۸ مورد *آگالاکتیه* ثبت شدند (۲۳). خیرآبادی و همکاران با بررسی بر روی ۲۶ گله گوسفند در منطقه چهارمحال بختیاری گزارش کردند گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* به‌ترتیب در نمونه‌های سواب چشم و شیر ۲۲/۲ و ۱۷ در صد با آزمایش PCR مثبت تشخیص داده شد و در ۷۷ درصد گله‌ها حضور این گونه در نمونه‌ها تأیید گردید. همچنین این محققین گزارش کردند که ۲۰ درصد گله‌های مورد مطالعه مبتلا به آگالاکسی عفونی بودند (۲۶). پولادگر و همکاران گزارش کردند که آزمایش PCR مناسب‌ترین روش برای تشخیص گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌باشد به‌طوری که با این روش ۱۹/۱ درصد نمونه‌ها اخذ شده از منطقه خوزستان مثبت تشخیص داده شد (۲۷). در تحقیقی که حیدری و همکارانش در جنوب ایران با استفاده از روش PCR روی ۱۸۳جنین سقط شده گوسفند و ۱۱۷ جنین سقط شده بز انجام دادند ۴۶ نمونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مثبت داشتند (۲۸). در بررسی که عبدی و همکارانش در سیستان و بلوچستان با استفاده از روش PCR روی ۷۸ جنین گوسفند سقط شده انجام دادند ۲۴ مورد مایکوپلاسما آگالاکتیه مثبت داشتند (۲۹). بیات زاده و همکارانش ۱۰۲ نمونه از شیر، ترشحات چشم، گوش و مفاصل گوسفند جمع‌آوری کردند و با استفاده از روش PCR ۱۹ نمونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مثبت داشتند (۳۰). در بررسی نه ساله‌ای که در گوسفندداری‌های اوکراین انجام شد میزان آلودگی به آگالاکسی مسری از ۱/۱۳ ٪ به ۱۴/۴ ٪ افزایش داشت و بیان شد که با افزایش رطوبت هوا تظاهر ورم پستان بیشتر شده و در مواردی خشکی میزان شیوع ورم پستان نصف و بیشتر اشکال مختلط، مفصلی و چشمی بروز نمودند (۳۱). در تحقیقی که با استفاده از PCR روی ۲۵۱ نمونه شیر بز در برزیل انجام شد ۵۰ نمونه آگالاکسی مثبت بودند که اصرار داشتند باید عوامل مدیریتی درست در جهت جلوگیری از انتشار پاتوژن اعمال شود (۳۲). در بررسی دیگری که به روشPCR روی ۲۰۰نمونه شیر بز از سه استان مختلف عراق انجام شد ۱۲ مورد آگالاکسی مثبت بودند (۳۳). در تحقیقی که برای اولین بار در بلغارستان بر روی ۶۷ نمونه شیر گوسفند و بز انجام شد ۱۳ مورد *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مثبت گزارش گردید (۳۴). در بررسی که در ترکیه از ۲۰۲ گوسفند و بز مشکوک به بیماری نمونه‌برداری شد که ۲۸۹ نمونه از شیر، سواپ بینی، سواپ چشم، مایع مفصلی و گوش نمونه‌برداری شد و با جدایه‌های به‌دست آمده پس از انکوباسیون با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بررسی شدند هیچ‌کدام *مایکوپلاسما آگالاکتیه* نبودند (۳۵). نتایج آزمایش کشت و PCR نشان داد که حساسیت روش PCR برتر از روش کشت می‌باشد و زمانی که *مایکوپلاسما*ها در نمونه مقدارش کم باشد و یا به هر علت از بین رفته باشد به‌طور مثال در شرایط نگهداری نامناسب و یا استفاده از آنتی‌بیوتیک در دوره درمانی، با آزمایش کشت قابل شناسایی و ردیابی نمی‌باشد اما با استفاده از آزمایش PCR حضور آن قابل اثبات می‌باشد (۵، ۱۵، ۳۶، ۳۷). با توجه به تعدد نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق به نظر می‌رسد که مناسب‌ترین نمونه برای تأیید حضور جنس *مایکوپلاسما* در آزمایش‌های کشت و PCR در گوسفند شیر، سواپ واژن و سواب چشمی و در بز شیر و سواپ چشمی می‌باشد. همچنین مناسب‌ترین نمونه برای تشخیص گونه *آگالاکتیه* در گوسفند و بز نمونه‌های شیر می‌باشد. در تحقیقات مشابه از تمامی محل‌های مذکور جهت جداسازی عامل

بیماری استفاده شده است (۲۱، ۲۳، ۲۵، ۳۸).

سپاسگزاری

از همکاران محترم در آزمایشگاه رفرنس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به‌خصوص آقای دکتر پوربخش کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitz-Patrik ES, Fanning S, Hartinag PJ. Veterinary microbiology and microbial disease Second Edition, Wiley Blackwell. 2011; 373.

2- Mirian SJ, Pourbakhsh SA, Mohammadi AR, Hemidieh H, Ashtari A, Banani M, *et al*. Isolation and identification of Mycoplasmas which cause contagious Aga-lactia from sheep & goats in Tehran province. *NFVM*. 2019; 2(2): 66-74. [In Persian]

3- Lopes LFV, Silva EC da, Moraes ACA de, Silva ER da, Santoro KR, Batista Ângela MV, *et al*. Mycoplasma agalactiae and the Mycoplasma mycoides cluster in goat herds in the states of Pernambuco and Paraiba Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 2019; 2261–2270.

4- Hassani tabatabaee A, Firoozi R. Livstook bacterial diseases. Tehran university. 2001; 469-484. [In Persian]

5- Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(4): 1094–1156.

6- Ghader sohi A. Detection of Mycoplasma agalactiae and other mycoplasma agents cause agalactiae disease in sheep and goat using PCR and culture in Iran, proposal of a research hold in *RVSRI*. 2007. [In Persian]

7- Akhlaghi F. A study plan to identify Mycoplasma agalactiae and other causative agents of agalaxia disease in sheep and goats by polymerase chain reaction (PCR) and culture in Iran. Karaj: *RVSRI*, Ministry of Education and Research, Ministry of Jihad Construction, 01-0420317000-77. 2016. [In Persian]

8- Sotoudeh Nia A, Arabi I. Isolation and carrying out carbohydrate fermentation test regarding Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides under Mycoides species. *Arch Razi Ins*. 1984; 34: 67-70. [In Persian]

9- Sotoudeh Nia A, Arabi I. Agalaxia disease and its geographical distribution in Iranian sheep and goats. *Arch Razi Ins*. 1986; 36: 75-78. [In Persian]

10- Sotoudeh Nia A, Arabi I, Naseri Rad AA. Cross reaction between two strains of Agalactia Lorestan and AIK2 in the serum of sheep vaccinated with live vaccine. *Arch Razi Ins*. 1988; 38: 76-73. [In Persian]

11- Ros Bascunana C, Mattsson J, Bolske G, Johansson KE. Characterization of the 16S rRNA genes from Mycoplasma sp. strain F38 and development of an identification system based on the polymerase chainreaction. *JB* 1994; 176(9): 2577–2586.

12- Solsona M, Lambert M. Genomic protein homogeneity and antigenic variability of Mycoplasma agalactiae. *Vet Mic*. 1996; 50(1-2): 45-58.

13- Tola S, Idini G, Manuta D, Galleri G. Rapid and specific detection of Mycoplasma agalactia by PCR. *Vet Mic*. 1996; 51(1-2): 77-84.

14- Tola S, Angioi A, Rocchigiani A.M, Idini G, Manunta D, Galleri G, Leori G. Detection of Mycoplasma agalactiae in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet Mic*. 1997; 54(1): 17-22.

15- Zedulkova D, Madanat A, Lany P, Rosenbergova K, Pospisi Z. Detection of Mycoplasma agalactiae by Polymerase Chain Reaction in Jordanian Sheep and goat herds. *Acta vet Brono*. 2007; 76(1): 71-77.

16- Al-Momani W, Nicholas RA, Abo-Shehada MN. Risk factors associated with Mycoplasma agalactiae infection of small ruminants in northern Jordan. *Prev Vet Med*. 2008; 83(1): 1-10.

17- Lotfi M, Banani M, Pourbakhsh SA, Sakhaei D, Akhlaghi F, Asli E. Using PCR and culture methods for Mycoplasma testing in poliomyelitis vaccine. *Arch Razi Ins*. 2009; 64: 109-114.

18- Kojima A, Takahashi T, Kijima M, Ogikubo Y, Nishimura, Y, Ishimura S, *et al*. Detection of mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Bio*. 1997; 25(2): 365-371.

19- Hajizadeh A, Moazeni JG, Akhlagi F, Naserirad A, Motarez B, Soleimani S, *et al*. Isolation and identification of Mycoplasmas causing contagious Agalactia syndrome in sheep & goats by using culture method and PCR in Ardebil prov-

ince. *J Vet Lab Res*. 2012; 24(4): 271-281. [In Persian]

20- Hajizadeh A, Ghaderi R, Ayling R. Species of Mycoplasma causing contagious agalactia in small ruminants in Northwest Ir.*vet italia*. 2018; 54(3): 205-210.

21- Khezri M, Pourbakhsh, SA, Ashtari A, Rokhzad B, Khanbabaie H. Isolation and prevalence of Mycoplasma agalactiae in Kurdish sheep in Kurdistan, Iran. *Vet*. 2012; 5(12): 727-731. [In Persian]

22- Ezzi A, Pourbakhsh SA, Moradi bidhendi S. Study on Mycoplasma pneumonia at the Ziaran abattoir. *Arch. Razi Ins*. 2007; 62(3): 161-166. [In Persian]

23- Kheirkhah, B, Pourbakhsh, SA, Ashtari A, Amini K. Detection of Mycoplasma agalactiae by culture and Polymerase Chain Reaction (PCR) methods from affected sheep to contagious agalactiae in Baft County. *Comp Path*. 2011; 8(1): 423-430. [In Persian]

24- Belloy L, Janovsky M, Vilei M, Pilo P. Molecular epidemiology of Mycoplasma conjunctivae in Caprinae: Transmission across species in natural outbreak. *App & Env Mic*. 2003; 69: 1913-1919.

25- Moradi Bidhendi S, Khaki P, Pilehchian Langroudi R. Isolation and identification of Mycoplasma agalactiae by culture and Polymerase Chain Reaction in sheep and goat milk samples in Kordestan province. Iran. *Arch. Razi Ins*. 2011; 66: 11-16. [In Persian]

26- Kheirabadi KH, Ebrahimi A. Investigation of Mycoplasma agalactiae in milk and conjunctival swab samples from sheep flocks in west central, Iran. Pak. *J Biol Sci*. 2007; 10(8): 1346-1348. [In Persian]

27- Pooladgar AR, Rahimilarki E, Ghaem Maghami S, Hossieni SMH, Ghaleh Golab B. Application of PCR for diagnosis of contagious agalactia in Khuzestan province -Iran. *African J Mic Res*. 2011; 5(28): 5097-5101.

28- Heidari S, Derakhshandeh A, Firouzi R, Ansari-Lari M, Masoudian M, Eraghi V. Molecular detection of Chlamydophila abortus, Coxiella burnetii, and Mycoplasma agalactiae in small ruminants' aborted fetuses in southern Iran. *Trop Animal Health Produc*. 2018; 50(4) :779–785. [In Persian]

29- Abadi EH, Saadati D, Najimi M, Hassanpour M. A Study on Mycoplasma agalactiae and Chlamydophila abortus in Aborted Ovine Fetuses in Sistan and Baluchestan region. *Arch Razi Inst*. 2019; 74(3): 295-301. [In Persian]

30- Bayatzadeh MA, Ashtari A, Pourbakhsh SA, Abtin AR, Barani SM, Ahangaran S. Isolation and identification of Mycoplasma agalactiae by culture and polymerase chain reaction (PCR) from sheep of Qom province, Iran. *Arch Razi Inst*. 2013; 68: 11–16. [In Persian]

31- Volodymyrovych Bohach M, Igorovych Bolotin V, Mykolaivych Bohach D, Tarasivna Piven O, Victorivna Pyvovarova I. Influence of natural and climatic conditions on the distribution and forms of contagious agalactia in sheep in Bessarabia, Ukraine. *J Vet Res*. 2022; 66(3): 345-351.

32- Rodrigo AT, MatosSandra B, SantosRenato V, AlvesEdnaldo J, SilvaMelânia L, MarinhoJosé Wilton P. Ocurrence and risk factors associated with Mycoplasma agalactiae infection in dairy goat herds of Paraíba State, Brazil Livestock Diseases Pesq. *Vet. Bras*. 2019; 39(2): 123-128.

33- Mohanad M, Jameel S, Hasso M. Molecular detection of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma capricolum in mastitic and non mastitic milk of goats by using Real Time Polymerase Chain Reaction. *Iraqi J Vet Med*. 2018; 42(1): 1-6.

34- Vstative C, Uromova V. Molecular detection of Mycoplasma agalactiae by qPCR in sheep and goats from Bulgaria. *Bulg J Vet Med*. 2023.

35- Karatekeil U, Kenar Beytullah. An investigation of contagious agalactia disease of sheep and goats in isparta and afyonkarahisar in Turkey. *India J Anim Res*. 2022; 56(3): 358-361.

36- Amores J, Corrales JC, Martin AG. Comparison of culture and PCR to detect Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subsp. Capri in ear swabs taken from goats. *Vet. Mic*. 2009; 102: 42-48.

37- Bashiruddin JB, Frey J, Konigsson MH, Johansson KE, Hotzel H, Diller HR, *et al*. Evaluation of PCR system for the identification and differentiation of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis: A collaborative trial. *Vet J*. 2005; 169(2): 268-275.

38- Kizil O, Ozdemir H. Clinical, haemological and biochemical studies in goats naturally infected with Mycoplasma agalactiae. Bulletin Vet. *Ins. Pulawy*. 2006; 50: 325-328.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 1-10

Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* from sheep and goat, in Golestan province

Parastoo poorghafour langeroodi

1- Faculty Member, Department of Bacterial Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.

Receive: May 11, 2023; Revise: June 24, 2023; Accept: June 29, 2023

10.22034/nfvm.2023.383539.1173

Summary

Contagious agalactia is a serious disease in sheep and goats caused by Mycoplasma. In this study, according of veterinary organization reports, the animals involved with contagious agalactia disease identification in Golestan province. Strains involved in disease identification by culture method, and then by PCR using specific primers to detect *Mycoplasma agalactiae* was confirmed. In this study, milk samples, swabs of lesions of the eye and ear and puncture of the joint fluid of sheep and goats were suspicious. The genus Mycoplasma in isolation test of sheep and goat samples were 54.17% and 98.72%, respectively. As of the genus Mycoplasma in milk, eye and ear swabs and joint fluid of sampling goat were 77.78%, 42.85%, and0%, respectively. In milk samples, eye and ear swabs and joint fluid of sheep were 100%, 96.30% 100% and 100%, respectively. To confirm the presence of Mycoplasma genus and *Mycoplasma agalactiae*, gene was amplified by using PCR. The SrRNA 16 primer was bands specific gender with bp163 and FS2 primer was ability to identify species by amplified fragment of the gene Lipoprotein with bp 375. All positive genus Mycoplasma samples were made to isolate *Mycoplasma agalactiae*. Positive samples caused by *Mycoplasma agalactiae* in goats and sheep were 76.92% and 24.57%, respectively. Results show that other species of *Mycoplasma agalactiae* in goats (23.08%) and sheep (75.43%) can exist.

Keywords: *sheep and goat, golestan, Mycoplasma agalactiae, polymerase chain reaction*

نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ۱۱- ۲۱

لاشه‌های بزهای کشتار شده در کرمان؛ مخزن بالقوه‌ی *اشریشیاکلی*های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و چالشی برای سلامت عمومی

شیرین محمدی‌پور[۱]، رضا قنبرپور[۲]، مازیار جاجرمی[۳]*، محبوبه باقری[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲- استاد، گروه تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۴- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ اردیبهشت ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۶ شهریور ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۷ شهریور ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.457540.1237

چکیده

*اشریشیاکلی*های تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یکی از پاتوژن‌های مهم و قابل انتقال از طریق محصولات غذایی با منشأ دامی به انسان می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی *اشریشیاکلی*های جدا شده از لاشه‌های بز در کشتارگاه کرمان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد. در این مطالعه، ۱۵۰ لاشه‌ی بز در کشتارگاه کرمان در یک دوره‌ی زمانی یک‌ساله در سال ۱۴۰۲ مورد بررسی قرار گرفت. از هر لاشه‌ی بز ۲ نمونه سواب شامل یک سواب از سطح داخلی لاشه و یک سواب از سطح خارجی لاشه اخذ گردید. بنابراین مجموعاً ۳۰۰ نمونه سواب (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب) اخذ شد. پس از کشت سواب‌ها و جداسازی باکتری *اشریشیاکلی*، مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتازیدیم با کمک آزمون دیسک دیفیوژن تعیین گردید و به‌وسیله‌ی PCR ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA} در جدایه‌ها ردیابی شد. مجموعاً، ۱۹۰ از ۳۰۰ سواب (۶۳/۳۳ درصد سواب‌ها) از نظر باکتری *اشریشیاکلی* مثبت بودند؛ بنابراین ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمد که ۴۵/۲۷ درصد (۸۶ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۲۶/۳۲ درصد آنها (۵۰ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند. فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{OXA} به‌ترتیب ۸/۹۴ درصد (۱۷ از ۱۹۰ جدایه)، ۷/۸۹ درصد (۱۵ از ۱۹۰ جدایه)، ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) و ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) ارزیابی شد. درنتیجه‌ی این مطالعه، می‌توان لاشه‌ی بز را به‌عنوان یکی از مخازن بالقوه‌ی *اشریشیاکلی* مقاوم به بتالاکتام‌ها و چالشی مهم برای سلامت عمومی در منطقه‌ی کرمان، معرفی کرد.

واژگان کلیدی: *بتالاکتام، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اشریشیاکلی، لاشه بز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: maziar.jajarmi@uk.ac.ir

مقدمه

مقاومت ضد میکروبی یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یکی از تهدیدات مهم و جدی در حوزه سلامت عمومی است و زندگی انسان و حیوانات را به شدت به مخاطره انداخته است (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به حالتی گفته می‌شود که در آن، باکتری‌ها نسبت به اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند، به‌طوری که این داروها دیگر قادر به کشتن یا مهار رشد آنها نیستند (۱). این پدیده معمولاً به‌دلیل تغییرات ژنتیکی در باکتری‌ها رخ می‌دهد که ممکن است از طریق جهش‌های طبیعی یا انتقال ژن‌های مقاومت از سایر باکتری‌ها ایجاد شود (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک چالش بزرگ در درمان بیماری‌های عفونی است، زیرا منجر به کاهش اثربخشی داروها، طولانی‌تر شدن مدت بیماری، افزایش هزینه‌های درمان و افزایش مرگ و میر می‌شود (۲). استفاده بیش از حد و نادرست از عوامل ضد میکروبی در پزشکی و دامپزشکی منجر به ایجاد یک فشار انتخابی به نفع باکتری‌های مقاوم موجود در فلور طبیعی بدن انسان و حیوان و نهایتاً گسترش این میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۲).

آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین عوامل ضد میکروبی برای درمان عفونت‌های باکتریایی در انسان و حیوانات هستند و این امر به‌دلیل طیف وسیع اثربخشی، دسترسی به فرم‌های خوراکی و قیمت پایین‌تر نسبت به سایر دسته‌های ضد میکروبی است (۳). مقاومت نسبت به این دسته‌ی آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی صورت می‌پذیرد. یکی از این مکانیسم‌ها تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) مانند TEM، CTX-M، OXA و SHV است که به‌وسیله ژن‌هایی مانند bla_{TEM}، $bla_{CTX\text{-}M}$، bla_{OXA} و bla_{SHV} بیان می‌شوند (۴). این آنزیم‌ها باعث تخریب حلقه‌ی بتالاکتام در آنتی‌بیوتیک‌های مذکور می‌شود و ژن‌های کدکننده‌ی آنها معمولاً بر روی عناصر ژنتیکی متحرک (مانند پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها) قرار دارند که این امکان را فراهم می‌کنند که به راحتی توسط انتقال افقی ژن از یک باکتری به باکتری دیگر، حتی بین گونه‌های مختلف باکتریایی، منتقل شوند (۴). این امر منجر به شکست‌های درمانی مکرر یا کاهش اثربخشی بتا-لاکتام‌های وسیع‌الطیف به‌عنوان یکی از خطوط اول درمان در پزشکی و دامپزشکی می‌شود.

اشریشیاکلی، یک باکتری گرم منفی، عضو میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم و از مهم‌ترین پاتوژن‌های منتقله از طریق غذا است (۵). مواد غذایی مخصوصاً مواد غذایی با منشأ دامی طی فرآیندهای مختلف تولید و فرآوری ممکن است به این باکتری آلوده شوند (۶). از جمله مواد غذایی که مستعد آلودگی به این باکتری هستند، گوشت انواعی از حیوانات است که در کشتارگاه ذبح می‌شوند. منشأ اصلی این باکتری در گوشت، مدفوع حیوانی است که در حال کشتار می‌باشد ولی ممکن است به‌واسطه‌ی آلودگی‌های محیطی مانند خاک و آب نیز این باکتری در گوشت قرار بگیرد (۶). چنانچه این باکتری از طرق مختلفی مانند مصرف آب و غذای آلوده به مدفوع وارد دستگاه گوارش شود، بسته به عوامل حدتی که دارد می‌تواند باعث بیماری‌های جدی از جمله اسهال، کولیت هموراژیک (HC) و سندرم اورمی همولیتیک (HUS) در انسان و بعضاً حیوان گردد (۷) و چنانچه این باکتری دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد، طبیعتاً باعث بروز مشکلات فراوانی در زمینه‌ی درمان آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های ایجاد شده می‌شود (۵).

گوشت بز، گوشتی با ارزش بالا و از مهم‌ترین تامین‌کنندگان پروتئین در سبد غذایی انسان بوده و همچون سایر محصولات غذایی با منشأ دامی، ممکن است ناقل پاتوژن‌های مختلفی باشد (۸). از این رو هدف از انجام این مطالعه ردیابی باکتری *اشریشیاکلی* در سطوح مختلف لاشه‌ی بز در کشتارگاه کرمان و پس از آن بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی فنوتیپی علیه بتالاکتام‌ها و در ادامه بررسی حضور ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، $bla_{CTX\text{-}M}$ و bla_{OXA} در جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از سطوح

مختلف لاشه‌ی بز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری اشریشیاکلی: در این مطالعه، ۱۵۰ لاشه‌ی بز در کشتارگاه کرمان در یک دوره‌ی زمانی یک ساله در سال ۱۴۰۲ مورد بررسی قرار گرفت. از هر لاشه بز ۲ نمونه سواب شامل یک سواب از سطح داخلی لاشه و یک سواب از سطح خارجی لاشه در کشتارگاه اخذ گردید. بنابراین تعداد ۳۰۰ نمونه سواب از ۱۵۰ لاشه‌ی بز به‌دست آمد (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب). سواب‌ها در داخل محیط انتقالی کری بلیر (میکرومدیا، اتحادیه اروپا) در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شدند.

سواب‌ها ابتدا در محیط مک‌کانکی آگار (مرک، آلمان) به‌صورت خطی کشت داده شدند و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از انکوباسیون، کلنی‌های لاکتوز مثبت، صاف، گرد و محدب به‌عنوان کلنی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی*، در نظر گرفته شدند. جهت تأیید بیوشیمیایی کلنی‌های مشکوک، از تست IMViC [شامل بررسی تولید ایندول (I)، بررسی انجام تخمیر از نوع اسیدهای مخلوط (M)، بررسی انجام تخمیر بوتاندیولی (V) و بررسی قابلیت استفاده از سیترات (C)]، استفاده گردید (۹).

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی فنوتیپی علیه بتالاکتام‌ها: ابتدا هر جدایه‌ی خالص *اشریشیاکلی* در محیط نوترینت براث کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. پس از ایجاد کدورتی معادل کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند، از سوسپانسیون باکتریایی به‌دست آمده، با کمک سواب استریل، باکتری‌ها به محیط مولرهینتون آگار انتقال داده شد و به‌صورت چمنی کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید، سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاولانیک اسید (شرکت پادتن طب، ایران)، به‌وسیله یک پنس استریل و در مجاورت شعله، به فاصله‌ی تقریبی ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر و دیواره‌ی پلیت، روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در نهایت قطر ناحیه عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مذکور با کمک کولیس اندازه‌گیری شد و نتایج با استانداردهای ارائه شده در CLSI سال ۲۰۲۳ مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند (۱۰).

جهت تعیین قابلیت تولید ESBLs از روش دیسک ترکیبی (Combined Disk Method) استفاده گردید. در این روش پس از اندازه‌گیری قطر ناحیه عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مذکور، چنانچه قطر این هاله در اطراف سفوتاکسیم کلاولانیک اسید نسبت به سفوتاکسیم / یا قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف سفتازیدیم کلاولانیک اسید نسبت به سفتازیدیم، بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر باشد، باکتری مورد بررسی، تولیدکننده‌ی ESBL ارزیابی خواهد شد (۱۰).

ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها: برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد که در این روش ابتدا باکتری‌های خالص روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار کشت داده شدند و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، یک کلنی خالص از باکتری مورد نظر در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل (موجود در میکروتیوب‌های استریل) سوسپانسه گردید. میکروتیوب‌ها در دستگاه بلاک حرارتی (اپندورف، آلمان) در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) سرد شده و پس از آن به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به داخل میکروتیوب‌های استریل جدید منتقل شد و به‌عنوان نمونه DNA استخراج شده در

دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی نگهداری شدند (۱۱).

جهت شناسایی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA} در جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از لاشه‌ی بز، از PCR سیمپلکس با کمک پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده شد. از سویه رفرانس *اشریشیاکلی* ATCC 35218 برای ژن bla_{TEM}، از سویه رفرانس *کلبسیلا* ATCC 700603 برای ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{OXA} و bla_{SHV} به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از آب مقطر استریل نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. برنامه دمایی عبارت بود از یک سیکل یک مرحله‌ای شامل ۱۰ دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ ۳۵ سیکل ۳ مرحله‌ای، هر مرحله شامل ۳۰ ثانیه واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{OXA} و ۱ دقیقه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ در نهایت یک سیکل یک مرحله‌ای شامل ۱۰ دقیقه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱۱– ۱۴).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA}

هدف	توالی (′۳-′۵)	اندازه‌ی محصول (bp)	منبع
bla_{TEM}	5′-GCGGAACCCCTATTTG-3′ 5′-ACCAATGCTTAATCAGTGAG-3′	۹۶۴	(۱۱)
bla_{SHV}	5′-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3′ 5′-GATTTGCTGATTTCGCTCGG-3′	۷۹۵	(۱۲)
bla_{CTX-M}	5′ -CGATGTGCAGTACCAGTAA-3′ 5′-TTAGTGACCAGAATCAGCGG-3′	۵۸۵	(۱۳)
bla_{OXA}	5′-TCAACTTTCAAGATCGCA-3′ 5′-GTGTGTTTAGAATGGTGA-3′	۶۰۹	(۱۴)

نتایج

همان‌طور که ذکر شد در این مطالعه از هر لاشه بز ۲ نمونه سواب شامل یک سواب از سطح داخلی لاشه و یک سواب از سطح خارجی لاشه اخذ گردید. بنابراین تعداد ۳۰۰ نمونه سواب از ۱۵۰ لاشه‌ی بز (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب) در کشتارگاه کرمان جمع‌آوری شد. از میان ۳۰۰ نمونه سواب مذکور، باکتری *اشریشیاکلی* از ۶۳/۳۳ درصد سواب‌ها (۱۹۰ از ۳۰۰ سواب) از طریق روش‌های کشت، جداسازی شد و با کمک تست‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت، ولی از ۳۶/۶۷ درصد سواب‌ها (۱۱۰ از ۳۰۰ سواب) باکتری *اشریشیاکلی* جداسازی نگردید. با این حال نمی‌توان نتیجه گرفت که سواب‌های فاقد *اشریشیاکلی*، به مفهوم لاشه‌های عاری از این باکتری هستند، زیرا ممکن است تنها در محل سواب‌گیری این باکتری وجود نداشته، ولی در قسمت‌های دیگر لاشه موجود باشد.

با توجه به جداسازی باکتری *اشریشیاکلی* از ۱۹۰ سواب، ازین پس تمامی فراوانی‌ها برمبنای ۱۹۰ جدایه محاسبه و بیان می‌گردد؛ از میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*، ۴۶/۸۴ درصد آنها (۸۹ از ۱۹۰ جدایه) متعلق به سواب‌های خارجی، و ۵۳/۱۶ درصد آنها نیز (۱۰۱ از ۱۹۰ جدایه) متعلق به سواب‌های داخلی لاشه بودند. همچنین از میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*، مجموعاً ۴۵/۲۷ درصد آنها (۸۶ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم مقاوم بودند و ۲۶/۳۲ درصد آنها نیز (۵۰ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند (جدول ۲). در این مطالعه جدایه‌هایی شناسایی شدند که به‌طور همزمان به هر دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند که فراوانی آنها ۱۸/۹۴ درصد (۳۶ از ۱۹۰ جدایه) محاسبه گردید. همچنین بر اساس روش انتشار دیسک ترکیبی، فراوانی سویه‌های تولیدکننده‌ی ESBL، ۱۳/۶۸ درصد (۲۶ از

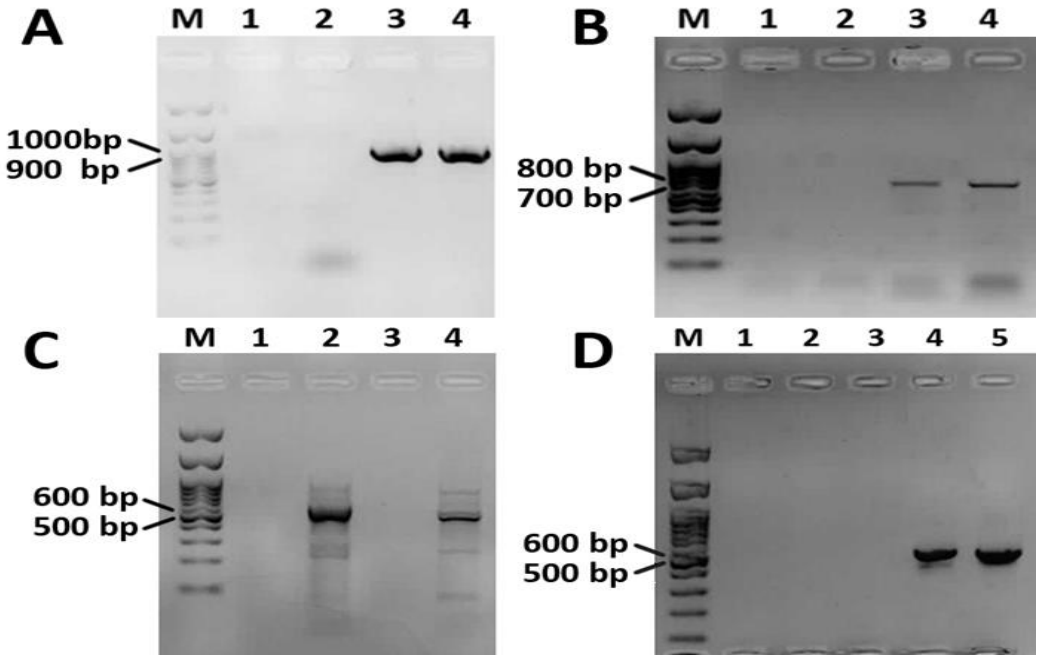
۱۹۰ جدایه) به‌دست آمد.

جدول ۲- تعداد و درصد جدایه‌های *اشریشیاکلی* حساس، نیمه‌حساس و مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در میان ۱۹۰ جدایه‌ی *اشریشیاکلی*

نوع آنتی‌بیوتیک	حساس؛ (درصد) تعداد	نیمه حساس؛ (درصد) تعداد	مقاوم؛ (درصد) تعداد	جمع
سفوتاکسیم	۳۷ (۱۹/۴۷)	۶۷ (۳۵/۲۶)	۸۶ (۴۵/۲۷)	۱۹۰ (۱۰۰)
سفتازیدیم	۴۸ (۲۵/۲۶)	۹۲ (۴۸/۴۲)	۵۰ (۲۶/۳۲)	۱۹۰ (۱۰۰)

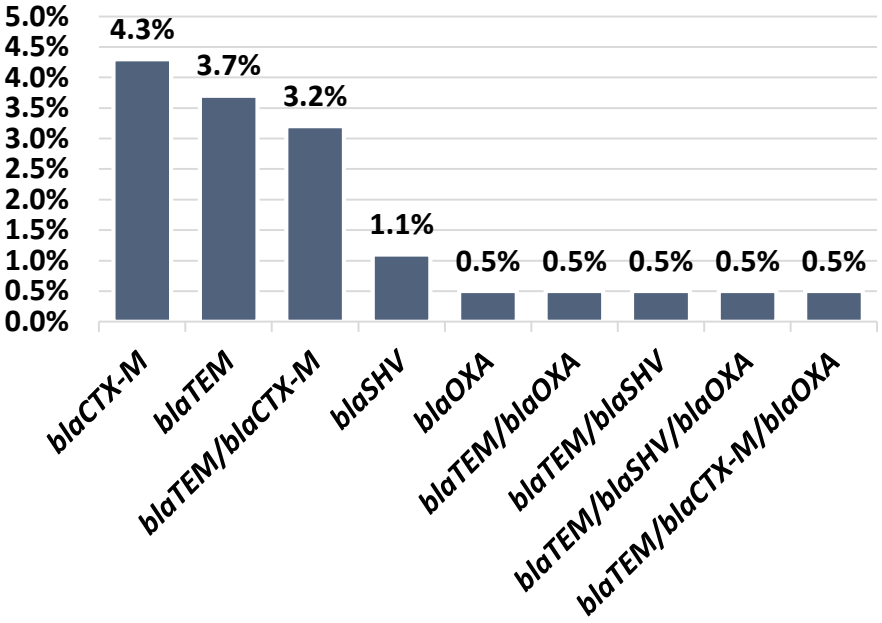
در این مطالعه، ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA}، در تمام ۱۹۰ جدایه‌ی *اشریشیاکلی* با کمک PCR مورد ردیابی قرار گرفت و به‌ترتیب در موقعیت‌های ۹۶۴، ۷۹۵، ۵۸۵ و ۶۰۹ جفت باز بر روی ژل آگارز پس از الکتروفورز شناسایی شدند (شکل ۱). فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{OXA} به‌صورت جداگانه، به‌ترتیب ۸/۹۴ درصد (۱۷ از ۱۹۰ جدایه)، ۷/۸۹ درصد (۱۵ از ۱۹۰ جدایه)، ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) و ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) ارزیابی شدند. در این مطالعه ۱۰ درصد جدایه‌ها (۱۹ از ۱۹۰ جدایه) دارای فقط یک ژن مقاومت بودند. همچنین ۵/۲۶ درصد جدایه‌ها (۱۰ از ۱۹۰ جدایه) حاوی بیش از یک ژن به‌طور همزمان بودند.

مجموعاً ۹ پروفایل مختلف از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌دست آمد که فراوانی هر یک در میان ۱۹۰ جدایه در شکل ۲ نشان داده شده است: bla_{CTX-M} (۸ از ۱۹۰ جدایه؛ ۴/۳ درصد)، bla_{TEM} (۷ از ۱۹۰ جدایه؛ ۳/۷ درصد)، bla_{TEM}/bla_{CTX-M} (۶ از ۱۹۰ جدایه؛ ۳/۲ درصد)، bla_{SHV} (۲ از ۱۹۰ جدایه؛ ۱/۱ درصد)، bla_{OXA} (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد)، bla_{TEM}/bla_{OXA} (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد)، bla_{TEM}/bla_{SHV} (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد)، $bla_{TEM}/bla_{SHV}/bla_{OXA}$ (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد) و $bla_{TEM}/bla_{CTX-M}/bla_{OXA}$ (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد) (شکل ۲).



شکل ۱- آزمون PCR برای شناسایی ژن‌های مقاومت علیه بتالاکتام‌ها. A. ژن bla_{TEM} [۹۶۴ جفت باز (bp)] M: لدر (۱۰۰ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲: نمونه منفی. ۳: نمونه مثبت. ۴: کنترل مثبت. B. ژن bla_{SHV} (۷۹۵ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲: نمونه منفی. ۳: نمونه مثبت. ۴: کنترل مثبت. C. ژن

***bla*$_{CTX-M}$**(۵۸۵ جفت باز) M: لدر (۱۰۰ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲: کنترل مثبت. ۳: نمونه منفی. ۴: نمونه مثبت. D. ژن ***bla*$_{OXA}$** (۶۰۹ جفت باز) M: لدر (۱۰۰ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲ و ۳: نمونه منفی. ۴: نمونه مثبت. ۵: کنترل مثبت.



شکل ۲- فراوانی پروفایل‌های مختلف ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها در میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که ذکر شد در این مطالعه تعداد ۳۰۰ نمونه سواب از ۱۵۰ لاشه‌ی بز (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب) در کشتارگاه کرمان مورد بررسی قرار گرفت که از میان ۳۰۰ نمونه سواب اخذ شده، باکتری *اشریشیاکلی* از ۶۳/۳۳ درصد سواب‌ها (۱۹۰ از ۳۰۰ سواب) جداسازی گردید. نمونه سواب را نمی‌توان نماینده‌ی کل لاشه برای جداسازی باکتری *اشریشیاکلی* دانست چرا که ممکن است این باکتری در محلی غیر از محل سواب‌گیری در لاشه وجود داشته باشد. مطالعات زیادی در دنیا به بررسی کیفیت میکروبی گوشت بز در کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه پرداخته است اما روش کار اکثر آنها از نظر نمونه‌گیری و جداسازی عامل میکروبی، با یکدیگر و با مطالعه‌ی حاضر متفاوت می‌باشد. در ادامه به برخی تحقیقاتی که بر روی جداسازی باکتری *اشریشیاکلی* از گوشت بز متمرکز بوده‌اند به‌ترتیب سال انتشار اشاره می‌گردد. در مطالعه‌ی ریفیاندی و همکاران (۲۰۲۲) در اندونزی از گوشت بز در حال عرضه در ۵ مرکز فروش، نمونه‌گیری انجام شد (از هر مرکز یک نمونه‌ی ۲۵۰ گرمی) و با کمک روش شمارش کلنی نشان داده شد که تمام نمونه‌های گوشت بز (۱۰۰ درصد) آلوده به *اشریشیاکلی* بوده است (۱۵). همچنین، در مطالعه‌ی نگاش و همکاران (۲۰۲۱) در اتیوپی از سطح داخلی و خارجی ۱۲ لاشه‌ی بز در کشتارگاه با کمک سواب، نمونه‌گیری انجام شد و با انجام آزمایش شمارش کلنی نشان داده شد که سطوح مختلف همه‌ی لاشه‌های بز تحت بررسی (۱۰۰ درصد) به باکتری *اشریشیاکلی* آلوده می‌باشد (۱۶). سینگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور هندوستان باکتری *اشریشیاکلی* را در ۲۹ مورد از ۶۱ نمونه گوشت بز (۴۷/۵ درصد) در حال عرضه در مراکز خرده‌فروشی گوشت با کمک روش کشت مورد شناسایی قرار دادند (۱۷). تانگانیکا و همکاران (۲۰۱۷) در کشور مالاوی در قاره آفریقا با کمک سوآب از ۳۴ لاشه بز در کشتارگاه نمونه‌گیری انجام دادند و پس از کشت، باکتری *اشریشیاکلی* را از ۲۹/۴ درصد لاشه‌های بز (۱۰ لاشه) جداسازی نمودند (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر مانایکا و

همکاران در سال ۲۰۱۶ در تانزانیا، ۱۲۴ نمونه‌ی ۲۵۰ گرمی گوشت بز را از کشتارگاه اخذ نموده و با کمک روش شمارش کلنی، حضور باکتری *اشریشیاکلی* را در ۹۶/۸ درصد نمونه‌های گوشت شناسایی نمودند (۱۹). از نظر حجم نمونه، تمامی مطالعاتی که ذکر شد تعداد نمونه‌ی کمتری را نسبت به مطالعه‌ی حاضر بررسی کرده‌اند. هر چند فراوانی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در مطالعه‌ی حاضر از تمامی مطالعات مذکور پایین‌تر بود، با این حال مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که میزان آلودگی لاشه‌ی بز به *اشریشیاکلی* بسته به حجم نمونه، نوع نمونه‌گیری و روش ردیابی عامل متفاوت می‌باشد. از طرفی، بدون شک تأثیر عواملی چون شرایط بهداشتی کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه و همچنین شیوه‌های فرآوری گوشت در کشورهای مختلف، مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر آلودگی میکروبی گوشت می‌باشند (۲۰). با توجه به فراوانی نسبتاً بالای باکتری *اشریشیاکلی* در نمونه‌های تحت بررسی در این مطالعه (۶۳/۳۳ درصد)، اهمیت نظارت مستمر و بهبود فرآیندهای بهداشتی کشتارگاه‌ها در کرمان بیش از پیش برجسته می‌گردد. در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، روش‌های رعایت بهداشت گوشت، بازرسی‌های بهداشتی و قوانین مربوطه در کشتارگاه‌ها هنوز به‌خوبی استقرار نیافته یا بروزرسانی نشده است (۲۰).

همان‌طور که در بخش نتایج نیز ذکر شد، با توجه به شناسایی ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی* در این مطالعه، فراوانی‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی برمبنای ۱۹۰ جدایه محاسبه گردیده است. ازین رو در مطالعه‌ی حاضر از میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*، مجموعا ۴۵/۲۷ درصد آنها (۸۶ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۲۶/۳۲ درصد آنها (۵۰ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند. سینگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور هندوستان با بررسی ۲۹ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* از گوشت بز، فراوانی مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و سفتازیدیم را ۱۰۰ درصد گزارش نمودند (۱۷) که به‌طور قابل توجهی بالاتر از نتایج به‌دست آمده در مطالعه‌ی حاضر بود. همچنین سینگ و همکاران گزارش دادند که تمامی ۲۹ جدایه *اشریشیاکلی* تحت بررسی (۱۰۰ درصد) به‌طور همزمان نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم دارای مقاومت می‌باشند (۱۷)، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر فراوانی جدایه‌هایی که به‌طور همزمان به هر دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند، ۱۸/۹۴ درصد (۳۶ از ۱۹۰ جدایه) محاسبه گردید که پایین‌تر از مطالعه‌ی سینگ و همکاران بود. آبرهام و همکاران در کشور اتیوپی در سال ۲۰۱۹ فراوانی مقاومت نسبت به سفتازیدیم (۲۱)، و در مطالعه‌ای دیگر دیولو و همکاران در اتیوپی در سال ۲۰۱۵ فراوانی مقاومت نسبت به سفوتاکسیم را در جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از لاشه‌ی بز، صفر درصد اعلام کردند (۲۲)، که لازم به ذکر است تعداد لاشه‌های بز تحت بررسی در دو مطالعه‌ی اخیر به‌ترتیب ۳ و ۲ لاشه بوده است که بسیار حجم نمونه‌ی کوچکی نسبت به مطالعه‌ی حاضر است. در مطالعه‌ای که مانایکا و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تانزانیا، بر روی ۱۲۰ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از ۱۲۴ نمونه‌ی گوشت بز انجام داده بودند، هیچ‌یک از جدایه‌های تحت بررسی نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم نبودند (۱۹) که در مقایسه با نتایج مطالعه‌ی حاضر بسیار متفاوت است. تعداد جدایه‌های تحت بررسی در تمامی مطالعاتی که ذکر شد نسبت به تعداد جدایه‌های تحت بررسی در مطالعه‌ی حاضر، کمتر است. بنابراین علاوه بر عواملی چون تفاوت‌ها در نوع آنتی‌بیوتیک مصرفی در مناطق تحت بررسی (که باعث شکل‌گیری جمعیت‌های میکروبی مقاوم در میزبانان مختلف می‌شود)، عواملی چون حجم نمونه و روش بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند از عوامل تأثیرگذار بر شباهت‌ها و تفاوت‌ها میان نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر باشد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیاز به بهبود روش‌های کنترل و مدیریت تجویز آنتی‌بیوتیک در دامداری‌ها و کشتارگاه‌های منطقه کرمان را برجسته می‌کند.

در این مطالعه، در میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*

تحت بررسی، فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{OXA} ، به‌ترتیب ۸/۹۴ درصد، ۷/۸۹ درصد، ۲/۱ درصد و ۲/۱ درصد ارزیابی شدند. در مطالعه‌ی سینگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور هندوستان فراوانی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} را در میان ۲۹ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از گوشت بز، به‌ترتیب ۴۴/۸ درصد (۱۳ جدایه) و ۳/۴ درصد (۱ جدایه) اعلام کردند (۱۷). همچنین سینگ و همکاران گزارش دادند که تنها یک جدایه *اشریشیاکلی* تحت بررسی (۳/۴ درصد) به‌طور همزمان ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} را دارا بودند (۱۷)، در حالی که در مطالعه حاضر فراوانی جدایه‌هایی که به‌طور همزمان هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{SHV} را داشتند، ۱/۱ درصد (۲ از ۱۹۰ جدایه) محاسبه گردید که با مطالعه‌ی سینگ و همکاران تا حدودی همسو می‌باشد. از آنجایی که در پایگاه‌های جستجوی مقالات، مطالعه‌ی دیگری در مورد شناسایی ژن‌های مذکور در *اشریشیاکلی* با منشأ گوشت و لاشه‌ی بز پیدا نشد، لذا در ادامه به چند مورد از مطالعات بر روی نمونه‌های دیگری چون شیر در حیوان بز پرداخته خواهد شد. در مطالعه‌ای که توسط ساتپاتی و همکاران در سال ۲۰۲۳ در منطقه‌ی پنجاب انجام شد، فراوانی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{OXA} در ۲۲ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از ۱۲۵ نمونه شیر متعلق به بزهای نژاد بیتال، به‌ترتیب ۱۰۰ درصد، ۶۲/۵ درصد، ۲۵ درصد و ۳۷/۵ درصد گزارش گردید (۲۳) که نسبت به مطالعه‌ی حاضر، تعداد جدایه‌های *اشریشیاکلی* تحت بررسی بسیار پایین‌تر ولی فراوانی ژن‌ها بسیار بالاتر بود. در مطالعه‌ی عبیدات و همکاران که بر روی ۲۶۱ جدایه *اشریشیاکلی* (به‌دست آمده از ۴۴۵ نمونه شیر بز) در اردن انجام شد، فراوانی bla_{CTX-M} ۴۱/۷ درصد (۱۰۹ از ۲۶۱ جدایه)، bla_{TEM} ۳۹/۸ درصد (۱۰۴ از ۲۶۱ جدایه) و bla_{SHV} ۱/۵ درصد (۴ از ۲۶۱ جدایه) گزارش گردید (۲۴) که این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر به‌غیر از bla_{SHV} تفاوت چشمگیری دارد. در برخی از جدایه‌های *اشریشیاکلی* در مطالعه‌ی حاضر و دیگر مطالعات که به‌صورت فنوتیپی نسبت به بتالاکتام‌ها دارای مقاومت بودند، از نظر ژن‌های مورد بررسی منفی بودند؛ از سویی دیگر، جدایه‌هایی که حداقل دارای یکی از ژن‌های مورد بررسی بودند نیز بعضاً از نظر مقاومت فنوتیپی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه منفی بودند. در توجیه این موضوع باید ابراز داشت که ژن‌های مسئول مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها دارای تنوع بسیاری بوده و این احتمال وجود دارد که ژن‌هایی به‌غیر از ژن‌های مورد بررسی، مسئول بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها باشند. همچنین این ژن‌ها (در صورت وجود) ممکن است به‌دلایل مختلف به حالت خاموش باشند و اصلاً بیان نشوند (۲۵).

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده‌ی وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی فنوتیپی و ژنوتیپی نسبت به بتالاکتام‌ها در میان جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از لاشه‌های بز در کشتارگاه کرمان می‌باشد. از آنجایی که بز در دسته‌ی حیوانات تولیدکننده‌ی غذا برای انسان طبقه‌بندی می‌شود، بنابراین می‌توان لاشه‌های بزهای کشتار شده در کرمان را مخزن بالقوه‌ی *اشریشیاکلی*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و چالشی برای سلامت عمومی معرفی نمود. با توجه به اهمیت مبحث مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باید سویه‌های مقاوم را مشابه به باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام در نظر گرفت. بنابراین، ضروری است که اقدامات پیشگیرانه برای جلوگیری از گسترش این سویه‌های باکتریایی، به‌ویژه در مراکز تهیه و توزیع محصولات دامی، از جمله کشتارگاه‌ها، بیش از پیش اتخاذ گردد.

سپاسگزاری

از همکاری پرسنل آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, *et al.* Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *Healthcare*. 2023; 11(13): 1946.

2- Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, Ibrahim RH, Fareeq A, Mahmood KA, *et al.* Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects. J Med Surgery, *Public Heal*. 2024; 2: 100081.

3- Zango UU, Ibrahim M, Shawai SAA, Shamsuddin IM. A review on β-lactam antibiotic drug resistance. *MOJ Drug Des Dev Ther*. 2019; 3(2): 52–8.

4- Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J intensive care*. 2020; 8(1): 13.

5- Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, *et al.* Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018; 6(4): 10-128.

6- Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutr*. 2018; 4(3): 250–5.

7- Bintsis T. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol*. 2017; 3(3): 529.

8- Da Silva-Guedes J, Martinez-Laorden A, Gonzalez-Fandos E. Effect of the presence of antibiotic residues on the microbiological quality and antimicrobial resistance in fresh goat meat. *Foods*. 2022; 11(19): 3030.

9- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary Microbiology. 2nd ed. *Elsevier Health Sciences*. 2013.

10- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI supplement M100). 33rd ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2023.

11- Saadat L, Jajarmi M, Eskandarzade N, Ghanbarpour R. Genetic fingerprinting of *Escherichia coli* bacterial isolated from Kerman zoo animals using ERIC-PCR. *New Find Vet Microbiol*. 2023; 6(1): 29–39.

12- Arlet G, Rouveau M, Philippon A. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β-lactamase. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 152(1): 163–7.

13- Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, *et al.* blaCTX-M genes in clinical Salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(4): 1319–22.

14- Speldooren V, Heym B, Labia R, Nicolas-Chanoine MH. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β-lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(4): 879–84.

15- Riffiandi N, Maradon GG, Pertiwi VR. The Detection of Microbial Contamination on Goat Meat from Traditional Market in Bandar Lampung City. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. *IOP Publishing*. 2022.

16- Negash A, Olga K. Goat carcass microbial investigation in Modjo Export Abattoirs, Ethiopia. *J Microbiol Antimicrob.* 2021; 13(2): 37–49.

17- Singh F, Hirpurkar SD, Rawat N, Shakya S, Kumar R, Rajput PK, *et al.* Occurrence of the genes encoding carbapenemases, ESBLs and class 1 integron integrase among fermenting and non fermenting bacteria from retail goat meat. *Lett Appl Microbiol.* 2020; 71(6): 611–9.

18- Tanganyika J, Mfitilodze WM, Mtimuni JP, Phoya RRKD. Microbial quality of goat carcasses in Lilongwe, Malawi. *Chem Biol Technol Agric.* 2017; 4:1–7.

19- Mwanyika G, Call DR, Rugumisa B, Luanda C, Murutu R, Subbiah M, *et al.* Load and prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from fresh goat meat in Arusha, Tanzania. *J Food Prot*. 2016; 79(9): 1635–41.

20- Rani ZT, Mhlongo LC, Hugo A. Microbial profiles of meat at different stages of the distribution chain from the abattoir to retail outlets. *Int J Environ Res Public Health.* 2023; 20(3): 1986.

21- Abreham S, Teklu A, Cox E, Sisay Tessema T. *Escherichia coli* O157: H7: distribution, molecular characterization, antimicrobial resistance patterns and source of contamination of sheep and goat carcasses at an export abattoir, Mojdo, Ethiopia. *BMC Microbiol.* 2019; 19: 1–14.

22- Dulo F, Feleke A, Szonyi B, Fries R, Baumann MPO, Grace D. Isolation of multidrug-resistant *Escherichia coli* O157 from goats in the Somali region of Ethiopia: a cross-sectional, abattoir-based study. *PLoS One.* 2015; 10(11):

e0142905.

23- Satpathy MM, Sharma NS, Kaur P, Arora AK. Detection of antimicrobial resistance genes in extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from milk of indigenous Beetal goats of Punjab. *Iran J Vet Res.* 2023; 24(1): 37–41.

24- Obaidat MM, Gharaibeh WA. Sheep and goat milk in Jordan is a reservoir of multidrug resistant extended spectrum and AmpC beta-lactamases *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* 2022; 377: 109834.

25- Abdelwahab GE, Ishag HZA, Al Hammadi ZM, Al Yammahi SMS, Mohd Yusof MF Bin, Al Yassi MSY, *et al.* Antibiotics Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Livestock in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2014-2019. *Int J Microbiol.* 2022.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 11-21

Carcasses of slaughtered goats in Kerman: A potential reservoir of β-lactam-resistant *Escherichia coli* and a public health challenge

Shirin Mohammadipour[1], Reza Ghanbarpour[2], Maziar Jajarmi[3*], Mahboube Bagheri[4]

1- Ph.D. Student, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Bardsir Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Receive: May 14, 2024; Revise: September 6, 2024; Accept: September 7, 2024

10.22034/nfvm.2024.457540.1237

Summary

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* is one of the significant food-borne pathogens transmissible from food products of animal origin to humans. The aim of this study was to investigate the phenotypic and genotypic resistance of *E. coli* isolates obtained from goat carcasses in Kerman abattoir against β-lactam antibiotics. In this study, 150 goat carcasses were examined at the Kerman slaughterhouse over a one-year period in 2023. From each carcass, two swab samples were collected, one from the internal surface and one from the external surface, resulting in a total of 300 swabs (150 carcasses × 2 swabs = 300 swabs). After culturing the swabs and isolating *E. coli*, the resistance of the isolates to cefotaxime and ceftazidime was determined using the disk diffusion method, and the genes bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, and bla_{OXA} were detected using PCR. Overall, 190 of 300 the swabs (63.33%) were positive for *E. coli*, resulting in 190 isolates. Among these, 45.27% (86 of 190 isolates) were resistant to cefotaxime, and 26.32% (50 of 190 isolates) were resistant to ceftazidime. The frequencies of the bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, and bla_{OXA} genes were 8.94% (17 of 190 isolates), 7.89% (15 of 190 isolates), 2.1% (4 of 190 isolates), and 2.1% (4 of 190 isolates), respectively. As a result, this study identifies goat carcasses as a potential reservoir of β-lactam-resistant *E. coli*, posing a significant public health challenge in the studied region.

Keywords: *β-lactam, antibiotic resistance, Escherichia coli, goat carcasses*

نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ۲۲- ۳۱

تاثیر سطوح مختلف مکمل روی(اکسید روی، نانو اکسید روی و روی- متیونین) بر جمعیت پروتوزوآیی و نیتروژن آمونیاکی شکمبه بره‌های نر نژاد بلوچی

مرضیه هاشمزایی[۱]، قاسم جلیلوند*[۲]، کمال شجاعیان[۲]، امیر موسایی[۳]، مصطفی یوسف الهی[۲]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی،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.

دریافت مقاله: ۲۸ مهر ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۸ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۹ آبان ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.486575.1262

چکیده

عنصر روی برای سلامت و تولید نشخوارکنندگان ضروری می‌باشد. این آزمایش به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف مکمل روی بر جمعیت جنس‌های مختلف پروتوزآ و نیتروژن آمونیاکی شکمبه بر روی ۲۴راس بره نر نژاد بلوچی (سن ۳-۴ ماه و میانگین وزن ۲± ۲۰ کیلوگرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی (چهار تیمار و شش تکرار) به مدت ۷۰ روز (۱۰ روز عادت‌پذیری و ۶۰ روز آزمایش) انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) جیره پایه بدون مکمل روی ۲) جیره پایه با ۱۰۰ میلی‌گرم روی به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک خوراک به شکل اکسید روی، ۳) جیره پایه با ۲۵ میلی‌گرم روی به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک خوراک به شکل نانو اکسید روی ۴) جیره پایه با ۵۰ میلی‌گرم روی به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک خوراک به شکل روی-متیونین، بودند. در پایان دوره از مایع شکمبه برای اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی و شمارش جمعیت پروتوزوآ استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری بر جمعیت پروتوزای شکمبه اثر گذاشت (P<۰/۰۵)، تعداد کل پروتوزوا و زیرگونه انتودینیوم و دیپلودینیوم در مایع شکمبه بره‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل‌های روی بیشتر از گروه شاهد بود. با وجود این، تعداد گونه‌های ایزوتریشا، افریواسکولکس، داسیتریشا و اپیدینیوم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) تحت تأثیر افزودن مکمل‌های روی قرار گرفت و در همه تیمارها روند کاهشی داشت. به‌طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مکمل روی ممکن است سبب افزایش تعداد پروتوزوا و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه بره‌های پرواری شود.

واژگان کلیدی: *بره، پروتوزوآ، مکمل روی، نیتروژن آمونیاکی*

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

مقدمه

بهبود زیست توده میکروبی شکمبه نقش مهمی در عملکرد طبیعی و رشد و تولید در دام‌های نشخوارکننده دارد. این امر مستلزم تامین کامل مواد مغذی از جمله مواد معدنی در جیره است. عنصر روی یک ریزمغذی ضروری است که برای بهبود سلامت و تولید دام به‌ویژه برای افزایش ایمنی، متابولیسم میکروبی در شکمبه و سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن مورد نیاز است (۳۰، ۴۴). پروتوزوآها می‌توانند تا پنجاه درصد وزنی میکروارگانیسم‌های شکمبه را به خود اختصاص داده و نقش مهمی در اسیدیته شکمبه، هضم پروتئین‌های خوراک و تجزیه باکتری‌های شکمبه دارند (۱۴). این میکروارگانیسم‌ها همچنین بر بازدهی مصرف انرژی ناشی از تجزیه مواد در شکمبه تأثیر دارند (۳۳). جمعیت پروتوزوآیی شکمبه تحت تأثیر عوامل گوناگونی مانند ترکیب شیمیایی جیره، نرخ عبور مواد هضمی از دستگاه گوارش، سطح مصرف خوراک، سن و pH شکمبه قرار دارد (۲۲، ۳۱). مواد معدنی کمیاب تأثیر زیادی بر متابولیسم، فیزیولوژی و تولید مثل حیوانات دارند و بیشتر خوراک‌های خام و تجاری کمبود عناصر معدنی کمیاب دارند و عدم تعادل این ریزمغذی‌ها منجر به مشکلات زیادی مانند کاهش راندمان تولید مثلی دام می‌شود که در نتیجه ضرر اقتصادی به دنبال دارد (۲۵). برخی از این عناصر مانند روی، مس و آهن نقش مهمی در رشد و تولید مثل دام‌ها دارند و علائم بالینی ناشی از مسمومیت و یا کمبود آنها قابل مشاهده است (۳). عنصر روی دومین عنصر کمیاب در بدن است و از آنجایی که در بدن به میزان کافی ذخیره نمی‌شود، دریافت مداوم آن از طریق رژیم غذایی برای عملکرد فیزیولوژیکی مناسب بدن دام‌ها ضروری است (۴۵). مقدار این عنصر در خاک‌های سطحی ایران به‌طور معمول کمتر از ۰/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم است و گیاهانی که در این خاک‌ها رشد می‌کنند و در خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرند، مقادیر ناکافی از این عنصر را دارند که نیاز دام را تأمین نمی‌کند (۵). و دام‌های مصرف‌کننده با کاهش اشتها و رشد و کاهش دریافت سایر مواد مغذی مواجه می‌شوند (۴۰). استفاده از عنصر روی در جیره نشخوارکنندگان، با تغییر جمعیت میکروبی شکمبه، بر هضم مواد خوراکی در شکمبه اثر می‌گذارد (۳۶). سطوح مختلف روی اثرات متفاوتی بر جمعیت میکروبی شکمبه و فرآیند تخمیر، فعالیت آنزیم‌های میکروبی، میزان تجزیه سلولز و در نتیجه تولید اسیدهای چرب فرار دارد (۱۵، ۳۵). علاوه بر این، مکمل روی به شکل نانوذرات روی می‌تواند از طریق بهبود راندمان تولید مثلی حیوانات، خواص تعدیل‌کننده ایمنی و افزایش تولید زیست توده میکروبی، رویکرد مؤثری برای حفظ تولید و سلامت بالای نشخوارکنندگان داشته باشد و می‌تواند به کاهش انتشار متان در دام نیز کمک کند (۱). به‌طور معمول منابع اصلی روی در میان مکمل‌های روی برای تغذیه حیوانات، نمک‌های معدنی آن مانند سولفات روی ($ZnSO_4$)، اکسید روی (ZnO)، کلرید روی ($ZnCl_2$) می‌باشند. پژوهش‌ها نشان داده است که مکمل‌های روی کیلاته با پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه، که به‌عنوان منابع آلی شناخته شده‌اند، دارای ماندگاری بالاتر (۲۶)، فراهمی زیستی بیشتر و غلظت بافتی (۱۱) بیشتری نسبت به سایر منابع معدنی هستند. اکسید روی (ZnO) را می‌توان به‌عنوان یک مکمل حاوی ماده مغذی روی در جیره استفاده کرد زیرا این عنصر کمیاب برای عملکردهای سلولی متنوعی مانند فرآیند آنزیمی، ایمنی‌سلولی، فاکتور رونویسی، رشد سلولی و توسعه اندام‌ها ضروری است (۲۹). برخی از محققان فراهمی زیستی بیشتری را برای منابع آلی روی گزارش کرده‌اند، که عرضه روی بافتی را افزایش می‌دهند و در نتیجه بهره‌وری و تولید در حیوان را بهبود می‌بخشد (۱۹). دریافت روی از منابع آلی باعث افزایش قابلیت هضم و جذب مواد مغذی در بره‌ها در مقایسه با مکمل‌های معدنی روی می‌شود (۴، ۱۹، ۴۲) استفاده بیش از حد از روی معدنی اثرات مضری، مانند قابلیت هضم کم و آلودگی محیط زیست از طریق مدفوع دارد (۲۸)، در حالی که روی متیونین (Zn- Met) که

نوعی کیلات با ساختار حلقه‌ای منحصر به فرد است و در شرایط واکنش خاص (۱۰، ۴۱) تولید شده است، دارای زیست فراهمی بالاتری می‌باشد. علاوه بر این، پژوهش‌های انجام شده، اهمیت حیاتی متیونین را در تغییرات وزن بدن، کاهش سطح چربی کبدی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با افزایش سن را تأیید می‌کنند (۲۰، ۲۷).

تکنولوژی نانو، دستکاری در طرز قرار گرفتن اتم‌ها و به‌وجود آوردن ترکیب جدید با خصوصیات جدید است (۱۷) .ایده‌ی اصلی در این رویکردها (تبدیل مواد به نانوذرات) القای تغییرات در ماهیت شیمیایی و فیزیکی ماده اصلی است. این ذرات نانوی معدنی پتانسیل بالاتری نسبت به منابع معمولی خود دارند و بنابراین مقدار مورد نیاز را کاهش می‌دهند (۳۸). نانوذرات با جذب بیشتر از طریق دستگاه گوارش به جریان خون و سپس به بسیاری از اندام‌های بدن مانند مغز، کبد، کلیه، قلب، معده، روده و طحال منتقل و زیست فراهمی مواد مغذی مصرف شده را چند برابر می‌کند (۱۲، ۲۱). از نانوذرات می‌توان به‌عنوان محرک رشد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد که استفاده از این نانوذرات باعث حذف باقیمانده‌های آنتی بیوتیک در محصولات نهایی، کاهش آلودگی محیط زیست و تولید محصولات حیوانی بدون آلودگی می‌شود (۲). سطوح بالای روی دفع شده از حیوانات، نگرانی‌هایی را در رابطه با آلودگی محیطی ایجاد کرده است (۱۶). بنابراین، این مشکل دریچه‌ای را برای منابع روی با زیست فراهمی بهتر و در دوزهای مصرفی کمتر به غذای حیوانی باز می‌کند. در میان تمام رویکردهای احتمالی، استفاده از فناوری نانو برای تولید روی در اندازه نانو به نام نانو روی (nZn) یک جایگزین بالقوه برای منابع روی آلی و معدنی است. استفاده از نانو اکسید روی نشان داده است که نتایج بهتری را در مقایسه با منابع روی معمولی ایجاد می‌کند و همچنین سمیت کمتری دارد (۳۴، ۴۳). نانوذرات اکسید روی یکی از مواد ارزان قیمت هستند. این نانوذرات بخش‌های صنعتی بزرگی مانند داروسازی، کشاورزی و صنایع غذایی را متحول کرده است (۳۱). نسبت به اکسید روی، نانو اکسید روی دارای فعالیت شیمیایی بیشتری می‌باشد. علاوه بر این، به‌دلیل نفوذپذیری بالا نانوذرات می‌توانند سبب کمک به اجتناب از واکنش‌های نامطلوب شده و بهتر جذب شوند (۲۹).

اطلاعات کافی در رابطه با تأثیر سطوح مختلف مکمل‌های روی به‌خصوص نوع آلی (روی متیونین) و نانو روی بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه بره‌های نر پرواری نژاد بلوچی وجود ندارد. همچنین با توجه به گزارش‌های دامپزشکی محلی از کمبود روی در گوسفند و بز و با در نظر گرفتن مقادیر حساس تغذیه روی در بره‌ها، این پژوهش با هدف مقایسه اثرات شکل‌های معدنی (اکسید روی)، نانو (نانو اکسید روی) و آلی (روی- متیونین) عنصر کم‌مصرف روی بر جمعیت پروتوزوآ و غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه بره‌های در حال رشد نژاد بلوچی انجام شد.

مواد و روش‌ها

دام‌ها و محل آزمایش: این پژوهش در ایستگاه تحقیقاتی مزرعه سد سیستان دانشگاه زابل در تابستان ۱۴۰۲ انجام شد. بدین منظور از تعداد ۲۴ رأس بره نر نژاد بلوچی با سن ۴ - ۳ ماه (متوسط وزن۲±۲۰کیلوگرم) با چهار تیمار و شش تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی به مدت ۷۰ روز (۱۰ روز سازگاری و ۶۰ روز آزمایش) استفاده شد. جایگاه در ابتدای آزمایش تمیز و سپس با شعله افکن ضد عفونی شد. در ابتدای ورود بره‌ها به ایستگاه تحقیقاتی، عمل شستشو، پشم‌چینی و خوراندن قرص ضد انگل به بره‌ها انجام شد. بره‌ها با شروع دوره اصلی توزین شدند تا وزن اولیه آنها به‌دست آید. سپس به‌طور تصادفی به چهار گروه (هر تیمار شامل شش بره) تقسیم شدند. تیمارها شامل: ۱) جیره پایه بدون مکمل روی (شاهد)، ۲) جیره پایه با ۱۰۰ میلی‌گرم مکمل روی به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک خوراک به شکل اکسید

روی، ۳) جیره پایه با ۲۵ میلی‌گرم مکمل روی به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک خوراک به شکل نانو اکسید روی و ۴) جیره پایه با ۵۰ میلی‌گرم مکمل روی به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک خوراک به شکل روی- متیونین، بودند.

مکمل روی نانو از شرکت دانش‌بنیان نانو مواد گستران پارس (تهران، ایران) تهیه شد. جیره‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار سیستم تغذیه نشخوارکنندگان کوچک* (SRNS نسخه ۱/۹/۵۱۰۵) فرموله و موازنه شدند. جیره پایه به‌صورت جیره کاملاً مخلوط† (TMR) در اختیار بره‌ها قرار گرفت (جدول ۱).

اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه: به‌منظور بررسی اثر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه، در آخر دوره آزمایشی، نمونه مایع شکمبه توسط لوله مری از بره‌ها گرفته شد. مایع شکمبه به‌دست آمده توسط پارچه توری صاف گردید و به ازای هر حیوان یک نمونه ۱۰ میلی‌لیتری برداشته شده و به هر یک از آنها ۰/۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد شرکت Merck برای تعیین نیتروژن آمونیاکی اضافه شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند. برای اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی از روش فنل هیپوکلریت استفاده شد (۹). پس از یخ‌گشایی کامل نمونه‌ها با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به آن پس از خنک شدن و رساندن به حجم سه لیتر با آب مقطر) و محلول استوک ۱۰۰ میلی‌مولاری آمونیاک (با حل کردن ۰/۶۶۰۷ گرم سولفات آمونیوم در اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال و رساندن آن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) بود. محلول استاندارد آمونیاک با رقیق شدن محلول استوک به غلظت‌های یک، دو، چهار، شش و هشت میلی‌مولاری آمونیاک حاصل گردید. ابتدا ۵۰ میکرولیتر نمونه و استانداردهای تهیه شده به لوله آزمایش منتقل و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به‌عنوان بلانک برداشته شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فنول به آنها اضافه و مواد مخلوط شدند. پس از آن ۲ میلی‌لیتر از محلول هیپوکلریت به لوله‌ها اضافه و مجدداً مخلوط شد. محلول در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه قرار داده شد و پس از خنک شدن، جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر (HALO, model XB10) قرائت شد و در پایان با استفاده از خط استاندارد، مقدار نیتروژن آمونیاکی برحسب میلی‌مول اندازه‌گیری شد.

شمارش پروتوزوآ: شناسایی و تعیین گونه‌های مختلف پروتوزوآ و تعداد کل پروتوزوآ بر اساس روش Dehority در سال ۲۰۰۳ (۱۳) انجام شد. بدین منظور، یک نمونه ۵ میلی‌لیتری از شیرابه شکمبه با ۵ میلی‌لیتر محلول فرمالین ۵۰ درصد به آرامی مخلوط گردید و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا روز شمارش نگهداری شد. برای شمارش از میکروسکوپ نوری و لام هموسیتومتر (Neubauer improved, Marienfeld, Germany) استفاده شد. از هر نمونه یک قطره روی لام ریخته و پس از قرار دادن لامل شمارش انجام شد. تعداد پروتوزوآ در ۹ مربع بزرگ شمارش گردید. بالاترین فراوانی دیده شده در نظر گرفته شد و محاسبات مربوطه انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه و جمعیت زیر خانواده‌های پروتوزوآ در

---

* Small ruminant's nutrition system

† Total mixed ration

قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و رویه GLM انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

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

در این رابطه Y_{ij}= مقدار تیمار i ام در تکرار j ام، μ = اثر میانگین، T_i= اثر تیمار i ام، e_{ij} = اثر خطای آزمایش مربوط به تیمار i ام در تکرار j ام می‌باشند.

جدول۱- مواد خوراکی و ترکیب مواد مغذی جیره پایه

ماده خوراکی	مقدار (درصد)
کاه گندم	۴
علوفه یونجه	۲۶
دانه جو	۵۳
کنجاله سویا	۱۰
سبوس گندم	۵
بی‌کربنات سدیم	۰/۵
مکمل مواد معدنی- ویتامینی۱	۱
کربنات کلسیم	۰/۵
مواد مغذی جیره	**مقدار**
انرژی قابل سوخت و ساز (مگاکالری در کیلوگرم)	۲/۴
پروتئین خام (درصد)	۱۵/۵
خاکستر (درصد)	۸
ماده آلی (درصد)	۹۲
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد)	۳۵
روی(میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک)	۳۹

مکمل معدنی- ویتامینی شامل: ویتامینA (۲۰۰۰۰۰IU/kg)، ویتامینD_3 (۱۰۰۰۰۰IU/kg) ، ویتامینE (۱۵۰۰IU/kg)، کلسیم (۱۴۲۳۵۳mg/kg)، فسفر (۳۰۰۰۰mg/kg)، منیزیم (۱۲۰۰۰mg/kg)، سدیم (۱۰۰۰۰ mg/kg)، منگنز (۲۰۰۰mg/kg)، سلنیوم (۱۰mg/kg)، ید (۱۰۰mg/kg)، آهن (۳۰۰۰mg/kg)، کبالت (۱۰mg/kg) ،گوگرد (۲۰۰۰mg/kg)، آنتی‌اکسیدان (۱۰۰۰mg/kg). انرژی متابولیسمی (مگاکالری در کیلوگرم جیره) توسط نرم‌افزار جیره نویسی نشخوارکنندگان کوچک (SRNS) محاسبه شده است.

نتایج

نتایج مربوط به تأثیر مقادیر مختلف مکمل روی بر جمعیت پروتوزوآ و غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در جدول ۲ ارئه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود افزودن مکمل‌های روی به جیره پایه باعث افزایش تعداد پروتوزوآی کل در مایع شکمبه بره‌ها شد به‌طوری که اختلاف معنی‌داری بین تعداد پروتوزوای کل مایع شکمبه این بره‌ها در مقایسه با گروه شاهد وجود داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین مصرف مکمل‌های روی باعث افزایش تعداد انتودینیوم شد به نحوی که تعداد این زیرگونه در مایع شکمبه بره‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل‌های مختلف روی بیشتر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). شمار پروتوزوای دیپلودینیوم نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($P<۰/۰۱$). اگرچه به لحاظ عددی تعداد دیپلودینیوم در مایع شکمبه بره‌های دریافت کننده مکمل‌های مختلف روی بیشتر از گروه شاهد بود، اما تنها تفاوت گروه روی- متیونین با شاهد معنی‌دار بود. با وجود این، تعداد گونه‌های ایزوتریشا، افریواسکولکس، داسیتریشا و اپیدینیوم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. مکمل کردن جیره با روی باعث کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی شکمبه در همه تیمارها شد و اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای روی با شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۱$). بیشترین کاهش نیتروژن آمونیاکی در تیمار روی متیونین به میزان ۵۰ میلی‌گرم، مشاهده شد.

جدول ۲- تأثیر اشکال مختلف مکمل روی بر جمعیت پروتوزوآ (10^6 × در هر میلی‌لیتر) و نیتروژن آمونیاکی شکمبه‌ای

نوع پروتوزوآ	جیره‌های آزمایشی				SEM	P-value
	شاهد	اکسیدروی (۱۰۰میلی‌گرم)	نانواکسیدروی (۲۵میلی‌گرم)	روی- متیونین (۵۰میلی‌گرم)		
ایزوتریشاIsotricha spp	۰/۶۸	۰/۶۵	۰/۷۲	۰/۷۰	۰/۳۲۵	۰/۱۰۶
افریواسکولکس Ophryoscolex spp	۰/۷۱	۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۷۲	۰/۲۷۲	۰/۲۱۴
انتودینیومEntodinium spp	۳/۰۸^{b}	۵/۱۸^{a}	۵/۳۳^{a}	۵/۲۵^{a}	۰/۴۸۱	۰/۰۲۴
داسی تریشاDasytricha spp	۰/۲۸	۰/۲۱	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۵۸۷	۰/۸۸۶
اپی‌دینیومEpidinium spp	۱/۳۷	۱/۲۴	۱/۳۸	۱/۲۸	۰/۴۶۳	۰/۶۲۷
دیپلودینیومDiplodinium spp	۰/۴۱^{b}	۰/۵۶^{ab}	۰/۵۳^{ab}	۰/۶۷^{a}	۰/۲۸۱	۰/۰۰۱
پروتوزوآی کل Total protozoa	۶/۵۳^{b}	۸/۵۷^{a}	۸/۸۵^{a}	۸/۷۸^{a}	۱/۵۶	۰/۰۲۳
نیتروژن آمونیاکی (mg/dL)	۱۰/۵۱^{a}	۹/۵۴^{b}	۸/۹۱^{c}	۸/۸۵^{c}	۰/۲۴۵	۰/۰۰۷

a-b-c حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵). SEM : خطای استاندارد میانگین‌ها ،P-value : سطح معنی‌داری

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطوح مختلف مکمل روی باعث افزایش کل پروتوزوآ در مایع شکمبه بره‌های پرواری شد. بررسی‌های پژوهشگران نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف پروتوزوایی نیازهای متفاوتی به مواد مغذی برای رشد دارند و پاسخ گونه‌های مختلف به سوبستراهای مختلف یکسان نیست. همچنین جمعیت پروتوزوآ تحت تأثیر مقدار روی مصرفی قرار می‌گیرد و مقادیر مناسب آن اثرات مثبتی بر تعداد آنها دارد در حالی که غلظت‌های بالای روی برای این میکروارگانیسم‌ها مضر است (۱۳). بنابراین افزودن مکمل روی در تحقیق حاضر به جیره پایه موجب بهبود شرایط رشد زیر خانواده‌های انتودینیوم و دیپلودینیوم در مقایسه با سایر گونه‌ها (اپی‌دینیوم، داسی تریشا، افریواسکولکس و ایزوتریشا) شده است. با وجود این، نتایج پژوهش‌های انجام شده گاها متفاوت بوده است که دلیل آن تنوع در شکل و مقدار مکمل روی مصرفی و دام مورد آزمایش و جیره آن بوده است. در مطالعه‌ای که Froetschel و همکاران در سال ۱۹۹۰ (۱۸) انجام دادند مشاهده کردند که استفاده از مکمل روی به میزان ۱۱۴۲ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک جیره به شکل سولفات روی در جیره گاوهای نر پرواری، تعداد پروتوزوآهای شکمبه تحت تأثیر مصرف روی قرار گرفتند. در آزمایشی استفاده از ۴۰ میلی‌گرم از مکمل روی به شکل روی آلی (روی متیونین) یا روی معدنی (سولفات روی) در دو روش برون‌تنی و درون‌تنی در گوسفندان سنجابی مقدار کل جمعیت پروتوزوآیی شکمبه را کاهش داده است (۲۴). در رابطه با تأثیر مکمل روی بر جمعیت پروتوزوایی شکمبه گوسفند بلوچی اطلاعات کافی وجود ندارد و نیازمند انجام پژوهش‌های بیشتر است. در پژوهش حاضر، تأثیر مکمل روی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه نیز بررسی شد که یافته‌ها حاکی از کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در پاسخ به تغذیه با جیره‌های حاوی شکل‌های مختلف مکمل روی بود. افزودن مکمل روی به جیره، با ممانعت از تجزیه شدن پروتئین در شکمبه، از تجمع آمونیاک در شکمبه جلوگیری می‌کند (۲۳). در پژوهشی، سطوح صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم روی به هر کیلوگرم جیره‌ای بر پایه کاه برنج اضافه شد و مشاهده شد که pH و غلظت آمونیاک شکمبه تحت تأثیر مصرف روی قرار نگرفت. در حالی که همسو با نتایج پژوهش حاضر، استفاده از سطوح بالای مکمل روی باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه از طریق کاهش تجزیه اوره شد (۶). عوامل

گوناگونی مانند نوع منبع روی، غلظت روی در جیره، ترکیب شیمیایی جیره، شکل تغذیه، وجود سایر مواد معدنی، نوع میکروارگانیسم‌های شکمبه و سایر عوامل در تأثیر روی بر تخمیر و جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه اثرگذار است (۶، ۷). غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه همه بره‌ها بیش از حداقل غلظت (۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر مایع شکمبه) مورد نیاز برای رشد مناسب باکتری‌های شکمبه بود (۴۴). کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه با مکمل نانو روی و روی متیونین ممکن است از طریق افزایش استفاده از نیتروژن آمونیاکی برای تولید پروتئین میکروبی و افزایش راندمان استفاده از اسیدهای آمینه برای ساخت پروتئین میکروبی ایجاد شده باشد (۱۵). همسو با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، در آزمایش Atia و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۸) pH و متابولیت‌های شکمبه (نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار) به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر مکمل روی قرار گرفتند. نتایج حاضر نشان می‌دهد که گنجاندن منابع روی در رژیم غذایی می‌تواند فرآیند تخمیر شکمبه را تغییر دهد و بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها و متابولیسم آنها به‌ویژه بهبود متابولیسم نیتروژن اثر بگذارد که با گزارش محققین (۳۲) مطابقت دارد. در برخی تحقیقات در گاوهای شیری نیز افزودن سطوح مختلف روی- متیونین به جیره باعث کاهش نیتروژن آمونیاکی شکمبه شده است (۳۷، ۳۶). با وجود این، برای درک بهتر اثرات مکمل‌های مختلف روی و مقدار مؤثر آنها بر تخمیر میکروبی در شکمبه گوسفندان بلوچی، نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتر است.

References

1- Abdelnour SA, Alagawany M, Hashe NM, Farag MR, Alghamdi ES, Hassan FU, *et al.* Nanominerals: fabrication methods, benefits and hazards, and their applications in ruminants with special reference to selenium and zinc nanoparticles. *Anim*. 2021; 11: 1916.

2- Al-Beitawi NA, Shaker MM, El-Shuraydeh KN, Bláha J. Effect of nanoclay minerals on growth performance, internal organs and blood biochemistry of broiler chickens compared to vaccines and antibiotics. *J Appl Animal Res*. 2017; 45: 543–549.

3- Aliarabi H. Technology refinement for the preparation of chelated zinc and effect of its supplementation on growth and vitamin A utilization in cross bred calves. Thesis submitted to the national dairy research institute. *Karnal*. 2005; 132001.

4- Alimohamady R, Aliarabi H, Bruckmaier RM, Christensen RG. Effect of different sources of supplemental zinc on performance, nutrient digestibility, and antioxidant enzyme activities in lambs. *Bio Trace Elem Res*. 2019; 189: 75-84.

5- Alloway BJ. Zinc in soils and crop nutrition. IZA Publications, International Zinc Association, Brussels. 2004; 1-116.

6- Arelovich HM, Owens FN, Horn GW, Vizcarra JA. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea. *Anim Sci J*. 2000; 78: 2972-2979.

7- Arelovich HM, Amela MI, Martinez MF, Torrea MB, Laborde HE. Diferentes fuentes de zinc en el suplemento proteico de ovinos alimentados con un forraje de baja calidad. 2. Parámetros ruminales. *Rev* **A***rgent* P*rod* Anim. 2003; 23(1): 88-95.

8- Atia SE, El-Hais AE, Gabr SA, Yacout MH, Hassan AA, Khalel MS. Influence of supplemental sheep Ration with zinc source (inorganic vs. organic) on their digestibility and ruminal fermentation. *Egypt J Nutr* Feed. 2018; 21(3): 625-633.

9- Broderick GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Dairy Sci J*. 1980; 63: 64-75.

10- Burrell AL, Dozier WA, Davis AJ, Compton MM, Freeman ME, Vendrell PF, *et al.* Responses of broilers to dietary zinc concentrations and sources in relation to environmental implications. *Br Poult Sci*. 2004; 45: 255-263.

11- Cao J, Henry P, Guo R, Holwerda R, Toth J, Littell R, *et al.* Chemical characteristics

and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *Anim Sci J*. 2000; 78(8): 2039-2054.

12- Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Making polymeric micro and nanoparticles of complex shapes. *Proc. Natl. Acad Sciences USA*. 2007; 104, 11901–11904.

13- Dehority BA. Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham.UK. 2003.

14- Dehority BA. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum* and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. *J Eukaryot Microbiol*. 2005; 52: 339-342.

15- Eryavuz A, Dehority BA. Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers in vitro. *Anim Feed Sci Technol*. 2009; 151: 175–183.

16- Feng M, Wang ZS, Zhou AG, Ai DW. The effects of different sizes of nanometer zinc oxide on the proliferation and cell integrity of mice duodenum-epithelial cells in primary culture. *Pak J Nutr*. 2009; 8: 1164-1166.

17- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *Nutr J*. 2000; 130(5): 1471–1483.

18- Froetschel MA, Martin AC, Amos HE, Evans JJ. Effects of zinc sulfate concentration and feeding frequency on ruminal protozoal numbers, fermentation patterns and amino acid passage in steers. *Anim Sci J*. 1990; 68(9): 2874-2884.

19- Garg AK, Mudgal V, Dass RS. Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. *Anim Feed Sci Technol*. 2008; 144: 82–96.

20- Guerra BA, Brando BB, Pinto SS, Salgueiro WG, De-Souza EA, Reis FC, *et al.* Dietary sulfur amino acid restriction upregulates DICER to confer beneficial effects. *Mol Metab*. 2019; 29: 124–135.

21- Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari, B. Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci*. 2014; 9: 385–406.

22- Ivan MPS, Mir KM, Koenig LM, Rode L, Neill T, Entz and Mir, Z. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Rumin Res*. 2001; 41: 215-227.

23- Kathirvelan C, Balakrishnan V. Effect of zinc supplemental on urea hydrolysis in an in vitro fermentation using rumen liquor. *Mal J Nutr*. 2006; 12: 93-99.

24- Kazemi, S. Studying the effect of organic and mineral sources of zinc on the nutritional value of carcass and economic traits of Sanjabi sheep. Professional PhD thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Razi University.

25- Kumar S, Pandey AK, Abdel_Razzaque WA, Dwivdi DK. Importance of micro minerals in reproductive performance of livestock. *Vet World*. 2011; 4(5): 230-233.

26- Lardy GP, Kerley MS, Paterson JA. Retention of chelated metal proteinates by lambs. *Anim Sci J*. 1992; 70: 314.

27- Li H, Cai L, Liang M, Wang Z. Methionine augments endogenous antioxidant capacity of rice protein through stimulating MSR antioxidant system and activating Nrf2 -ARE pathway in growing and adult rats. *Eur Food Res Technol*. 2020; 246: 1051–1063.

28- Lin PH, Sermersheim M, Li H, Lee PHU, Steinberg SM, Ma J. Zinc in wound healing modulation. *Nutr*. 2017; 10: 1-20.

29- Lucas J. Microarrays: Molecular allergology and nanotechnology for personalised medicine (II). *Allergol immunopathol*. 2010; 38(4): 217-223.

30- McDonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr*. 2000; 130: 1500-1508.

31- Mir SH, Mani V, Pal RP, Malik TA, Sharma H. Zinc in ruminants: metabolism and homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of India Section. *Biol Sci*. 2018; 1(1): 1-11.

32- Mirzaei H, Darroudi M. Zinc Oxide Nanoparticles: Biological Synthesis and Biomedical Applications. *Ceramics Inter*. 2017; 43: 907–914.

33- Oldrick BS, Firkins JL. Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. *Anim Sci J*. 2000; 78: 2412-2420.

34- Russel JB. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. 1st ed. Ithaca, NY. 2002.

35- Sahoo A, Swain RK, Mishra SK, Jena B. Serum biochemical indices of broiler birds fed on inorganic, organic and nano zinc supplemented diets. *Int J Sci Res*. 2014; 5(11): 2078-2081.

36- Salem AZM, Ammar H, Lopez S, Gohar YM, González JS. Sensitivity of ruminal bacteria isolates of sheep, cattle and buffalo to some heavy metals. *Anim Feed Sci Technol*. 2011; 163:143–149.

37- Shakweer IME, EL-Mekass AAM, EL-

Nahas HM. Effect of different levels of supplemented organic zinc source on performance of Friesian dairy cows. *J Agric Sci*. 2005; 30(6): 3025-3035.

38- Shakweer IME, EL-Mekass AAM, EL-Nahas HM. Effect of supplemental zinc methionine concentrations on digestibility, feed efficiency and some ruminal and blood parameters and performance of Friesian calves. *J Agric Sci*. 2006; 31(8): 4935-4935.

39- Sri Sindhura K, Selvam PP, Prasad TNV, Hussain OM. Synthesis, characterization and evaluation of effect of phytogenic zinc nanoparticles on soil exo-enzymes. *Appl Nano sci*. 2014; 4: 819-827.

40- Suttle NF. Mineral nutrition of livestock, 4th Edition. Honorary Research Fellow Moredun Foundation Pentland Science Park Bush Loan Penicuik Midlothian EH26 0PZ, UK, CAB International. 2010.

41- Torres CA. Influence of maternal flock age, maternal trace mineral nutrition. Thesis of University of Alberta, Edmenton, *Alberta*, *Canada*. 2013.

42- VanValin KR, Genther-Schroeder ON, Carmichael RN, Blank CP, Deters EL, Hartman SJ, *et al.* Influence of dietary zinc concentration and supplemental zinc source on nutrient digestibility, zinc absorption, and retention in sheep. *Anim Sci J*. 2018; 96(12): 5336–5344.

43- Wang ZL, Song J. Piezoelectric nanogenerators based on zinc oxide nanowire arrays. *Sci*. 2006; 312(5771): 242-246.

44- Wu G. Principles of Animal Nutrition. 1th ed., Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton, FL, USA. 2018.

45- Zalewski PD, Ai QT, Dion G, Lata J, Chiara M, Richard ER. Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets: A review. *Pharmacol Ther*. 2005; 105: 127–49.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 22-31

The effect of different levels of zinc supplementation (zinc oxide, nanozinc oxide, and zinc-methionine) on the ruminal protozoan population and ammonia nitrogen of Baluchi male lambs

Marzieh Hashemzaei[1], Ghasem Jalilvand[*2], kamal Shojaeian[3], Amir Moosaee[4], Mostafa Yousef Elahi[5]

1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Zabol Uinversity, Zabol, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Zabol Uinversity, Zabol, Iran.
3- Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Jiroft Uinversity, Jiroft, Iran.

Receive: October 19, 2024; Revise: November 8, 2024; Accept: November 9, 2024

10.22034/nfvm.2024.486575.1262

Summary

The zinc (Zn) element is essential for the health and production of ruminants. This experiment was conducted to investigate the effect of different levels of zinc supplementation on the population of different species of protozoa and rumen ammonia nitrogen (NH_3-N) in 24 Baluchi male lambs (age of 3-4 months and average body weight of 20±2 kg) as a completely randomized design (four treatments and six replications each) for 70 days (10 days of adaptation and 60 days of data collection). The experimental treatments were 1) basal diet without Zn supplement (control), 2) basal diet supplemented with 100 mg of Zn/kg of feed's dry matter as zinc oxide (ZnO), 3) basal diet supplemented with 25 mg of Zn/kg of dry matter as nano ZnO, and 4) basal diet supplemented with 50 mg of Zn/ kg of feed as zinc-methionine (ZnMet). At the end of the experiment, the ruminal fluid was used to measure the NH_3-N and protozoan count.The results of this study indicated that the experimental treatments had a significant affected on the rumen protozoa population ($P<0.05$), the total number of protozoa and subspecies of *Entodinium* and *Diplodinium* count in the ruminal fluid of lambs fed diets containing zinc supplements was greater than that of the control group. However, the population of *Isotricha*, *ophryoscolex*, *Dacytricha* and *Epidinium* species were not affected by the experimental treatments. The NH_3-N concentration of the ruminal fluid was significantly ($P<0.01$) affected by the dietary Zn supplementation and had a decreasing trend in all treatments. It can be concluded that Zn supplementation may increase the number of protozoa and decrease ammonia nitrogen concentration in the ruminal fluid of fattening lambs.

Keywords: *Ammonia nitrogen, Lamb, Protozoa, Zinc supplement*

نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ۳۲- ٤٥

تعیین هویت ژنتیکی واکسن‌های بیماری بورس عفونی پرندگان در ایران: کمک به انتخاب واکسن مناسب و مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی

آرش قلیانچی لنگرودی*[۲]، حسین حسینی[۲]، محمد عبدالشاه[۳]، محمدحسین فلاح مهرآبادی[۳]، علی هژبر راجعونی[۱]، زهرا ضیافتی کافی[۱]، ناصر صدری[۱]، سروش سرمدی[۱]، فهیمه جمیری[۱]، علیرضا بخشی[۱]، امید اقبالی[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۳- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
دریافت مقاله: ۲۱ مرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۰۳ شهریور ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.472556.1251

چکیده

ویروس بیماری بورس عفونی یا گامبورو سبب بروز یک بیماری عفونی حاد و بسیار واگیردار شده که با سرکوب شدید سیستم ایمنی (به‌ویژه همورال) ماکیان شناخته می‌شود. این ویروس، یک RNA ویروس بسیار مقاوم از خانواده بیرناویریده (*Birnaviridae*) بوده که تنوع ژنتیکی آن به شکل قابل توجهی بر تظاهرات، تشخیص و کنترل بیماری اثرگذار می‌باشد. تقسیم‌بندی جدید ژنتیکی این ویروس بر اساس توالی نوکلئوتیدی قطعات A(VP2) و B (VP1) ژنوم آن صورت می‌گیرد. در سال‌های گذشته به علت برخی از مشکلات و محدودیت‌های واردات واکسن از کشورهای اروپایی، سازمان دامپزشکی کشور با واردات واکسن گامبورو و تولید آن در داخل کشور موافقت نمود. هدف این مطالعه بررسی شجره‌شناسی و تقسیم‌بندی سویه‌های واکسن و میزان مطابقت آنها با ویروس‌های در گردش می‌باشد. در این مطالعه، چهار نوع واکسن زنده تخفیف یافته (IBD07IR، مؤسسه واکسن وسرم‌سازی رازی، ایران)، B87 (QYH، چین)، ایمونوکمپلکس گامبوهچ (GUMBOHATCH) (هیپرا، اسپانیا) و واکسن MyHatch UPM 93 (MVP، مالزی) مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس ژن‌های کدکننده دو پروتئین VP2 و VP1 با روش RT-PCR تکثیر و توالی یابی شد. به‌طور خلاصه واکسن‌های زنده تخفیف یافته IBD07IR و B87 (اینترمدیت) و واکسن گامبوهچ (اینترمدیت پلاس) در گروه A1B1 و واکسن MyHatch UPM 93 (اینترمدیت پلاس) در گروه A3B2 قرار گرفتند. نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات مناسبی را در حوزه واکسن‌های گامبورو و انتخاب واکسن در اختیار محققین و کلینیسین‌ها قرار داده و در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی در ایران مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *ایران، ایمونوکمپلکس، بیماری بورس عفونی، تعیین هویت، واکسن*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: ghalyana@ut.ac.ir

مقدمه

بیماری بورس عفونی پرندگان (Infectious bursal disease)، یک بیماری سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و بسیار واگیردار است. این بیماری توسط ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) ایجاد می‌شود که ویروسی با ژنوم RNA دو رشته‌ای و متعلق به جنس بیرناویروس (Avibirnavirus) از خانواده بیرناویریده (Birnaviridae) است (۱). این ویروس دارای ژنوم دو قطعه‌ای مشتمل بر دو قطعه A و B می‌باشد. قطعه A به طول ۳۲۵۹ جفت باز می‌باشد. ناحیه کوچک‌تر، پروتئین VP5 و ناحیه بزرگ‌تر یک پلی‌پروتئین را کد می‌کند که با پروتئولیز خودکار برای تشکیل پروتئین‌های ویروسی بالغ VP2، VP3 و VP4 شکسته می‌شود. قطعه B با طول ۲۸۲۷ جفت باز مسئول کدگذاری پروتئین VP1 می‌باشد (۲-۴). این ویروس برای اولین بار در سال ۱۹۵۷ در شهر گامبورو در ایالت متحده آمریکا گزارش شد؛ سپس در سراسر جهان گسترش یافت و در سال ۱۹۸۱ برای اولین بار در ایران در یک گله مرغ گوشتی گزارش گردید (۵). عفونت تجربی به آن در مرغ، بوقلمون، اردک، مرغ هندی و شترمرغ گزارش شده است، اما علائم بالینی عمدتاً در جوجه‌های جوان در سنین ۶-۳ هفتگی رخ می‌دهد (۱، ۶). به‌وسیله روش آزمایشگاهی خنثی‌سازی ویروس (VN)، سویه‌های ویروس گامبورو در سروتیپ‌های یک و دو طبقه‌بندی می‌شوند که تنها سروتیپ یک آن بیماری‌زا می‌باشد (۴). سویه‌های سروتیپ یک ویروس گامبورو، سلول‌های لنفوسیت B را در بورس فابریسیوس جوجه‌های جوان آلوده می‌کند که باعث سرکوب سیستم ایمنی و گاهی اوقات مرگ و میر می‌شود. سویه‌های این سروتیپ بر اساس میزان بیماری‌زایی و آنتی‌ژنسیته به چهار پاتوتیپ شامل: واریانت آنتی‌ژنی (av)، تخفیف حدت یافته (at)، حاد کلاسیک (cv) و بسیار حاد (vv) تقسیم‌بندی می‌شوند. سویه‌های واریانت باعث آتروفی بافت بورس فابریسیوس، بدون ایجاد التهاب می‌شوند، این در حالی است که سویه‌های تخفیف حدت‌یافته عموماً باعث ایجاد بیماری نمی‌شوند و لذا بعضی از آنها سویه‌های واکسن را شامل می‌شوند. در مقابل، سویه‌های حاد باعث التهاب بافت بورس فابریسیوس و نکروز شدید بافت لنفاوی آن و مرگ و میری بین ۲۰تا۳۰ درصد می‌شوند. سویه‌های بسیار حاد (vv) از سال ۱۹۸۷ ظهور پیدا کردند و در سراسر جهان گسترش یافتند. علائم بالینی ناشی از عفونت با آنها از روز ۲ پس از آلودگی ظاهر می‌شوند و به‌طور معمول شامل پرهای ژولیده، اسهال، کم آبی بدن و تلفات بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد می‌شوند (۷-۱۰). اخیراً دسته‌بندی جدیدی برای طبقه‌بندی سویه‌های مختلف ویروس گامبورو بر اساس ژنوتیپ ارائه شده است. این طبقه‌بندی بر اساس تفاوت در توالی نوکلئوتیدی قطعات A و B ژنوم ویروس می‌باشد که در آن قطعات A به ۹ دسته (A0-A8) و قطعات B به ۵ دسته (B1-B5) تقسیم می‌شوند. از جایگشت‌های مختلف این قطعات، ژنوتیپ‌های مختلف حاصل می‌شوند (۱۱).

موثرترین روش پیشگیری از شیوع گامبورو در سطح جهانی از طریق واکسیناسیون می‌باشد. واکسن‌های تجاری موجود علیه ویروس گامبورو، عمدتاً شامل واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته و غیر فعال می‌باشند. البته در برخی کشورها، به استفاده از واکسن‌های نوترکیب و تحت واحد مجوز داده شده است. واکسن‌های زنده، ایمنی هومورال و سلولی قوی ایجاد می‌کنند و زمانی که واکسیناسیون به شکل گروهی از طریق آب آشامیدنی اجرا می‌شود، پاس مطلوبی به همراه خواهد داشت. با این حال و به دنبال کاربرد گسترده این واکسن‌ها، احتمال بازگشت به حدت و اثرات سرکوب ایمنی ناشی از آن وجود دارد (۱۲، ۱۳). واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته به عنوان رایج‌ترین واکسن مورد استفاده در صنعت پرورش ماکیان، بر اساس شدت ضایعات هیستوپاتولوژیک که در جوجه‌های بدون عوامل بیماری‌زای خاص (SPF) ایجاد می‌کند، به سه دسته واکسن‌های با حدت ملایم (Mild)، اینترمیدیت (Intermediate) و اینترمیدیت پلاس (Intermeditate plus) دسته‌بندی می‌شوند. از آنجا که

واکسن‌های ملایم حتی در حضور مقادیر اندک آنتی‌بادی منتقله از مادر به جوجه (آنتی‌بادی مادری یا MAD) خنثی می‌شوند، در مناطق پرخطر و در برابر سویه‌های بسیار حاد، فاقد کارآمدی است. در مقابل واکسن‌های اینترمیدیت (Intermediate) و اینترمیدیت پلاس (Intermeditate plus) به‌طور منظم برای محافظت از جوجه‌ها در برابر سویه‌های بسیار حاد ویروس گامبورو استفاده می‌شوند (۱۴). برنامه اصلی واکسیناسیون علیه ویروس گامبورو در کشور در گله‌های مولد با واکسن زنده تخفیف حدت یافته آغاز و سپس با استفاده از واکسن‌های غیر فعال امولسیون روغنی در پیش از تخم‌گذاری ادامه می‌یابد تا آنتی‌بادی‌های حاصل از آن، به نتاج انتقال یابند (۱۵، ۱۶). در گله‌های گوشتی یا مولد، موثرترین شیوه واکسیناسیون علیه بیماری بورس عفونی بر اساس زمان و با توجه به میزان تیتر آنتی‌بادی مادری باقیمانده مشخص می‌شود؛ بدین صورت که با کاهش تدریجی سطح آنتی‌بادی مادری پس از تولد جوجه‌ها، زمان مناسب جهت واکسیناسیون فرا می‌رسد تا ویروس واکسن بتواند از فعالیت خنثی‌کنندگی آنتی‌بادی مادری عبور و ایمنی مناسبی در گله ایجاد کند. بنابراین با کمک آزمون‌های سرولوژی نظیر الایزا (ELISA)، عیار آنتی‌بادی مادری جوجه علیه ویروس گامبورو را تعیین کرده، با استفاده از روش‌هایی نظیر فرمول دونتر (Deventer) بهترین زمان برای واکسیناسیون را تخمین می‌زنند (۱۷، ۱۸). علاوه بر واکسن‌های ذکر شده، واکسن‌های بر پایه ویروس‌های زنده تخفیف حدت یافته با منشأ مزرعه (واکسن Naked) و واکسن‌های کمپلکس ایمنی (IBD-ICX) نیز به‌صورت تجاری در دسترس هستند. (۱۹-۲۱). واکسن‌های ایمونوکمپلکس نیز با افزودن سرم هایپرایمن علیه ویروس گامبورو به واکسن زنده تخفیف حدت یافته اینترمیدیت پلاس (Intermeditate plus) تهیه می‌شوند (۲۲، ۲۳). مکانیسم تحریک سیستم ایمنی در واکسن‌های IBD-ICX ممکن است به‌دلیل به دام افتادن و حفظ کمپلکس ایمنی بر روی سلول‌های دندریتیک فولیکولی (FDCs) موجود در بورس و طحال باشد (۲۴).

در سال‌های گذشته، مشکلات و محدودیت‌های موجود در تأمین واکسن، سازمان دامپزشکی کشور را مجاب کرده است تا افزون بر تولید واکسن زنده گامبورو در داخل کشور (مؤسسه رازی)، با واردات آن از شرکت‌های متعدد خارجی موافقت کند. لازم به ذکر است واکسن کشته سه‌گانه گامبورودار در شرکت ایرانی پسوک تولید می‌گردد. با توجه به جدید بودن سویه‌ها و پلت فرم‌ها و تنوع ژنتیکی سویه‌های واکسن وارداتی و تولید داخل، هدف از این مطالعه بررسی شجره‌شناسی و تقسیم‌بندی سویه‌های واکسن موجود در واکسن‌های مختلف موجود در کشور است که در جهت افزایش سطح دانش و انتخاب واکسن مناسب توسط محققین و متخصصین می‌تواند بسیار مؤثر و راهگشا باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب واکسن: در این مطالعه چهارنوع واکسن که عبارتند از: واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته IBD07IR (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران)، B87 (شرکت QYH، چین) و MyHatch UPM 93 (شرکت UPM، مالزی) و واکسن ایمونوکمپلکس گامبوهچ (Gumbohatch) (شرکت هیپرا، اسپانیا) مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA و RT-PCR: استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون (Sina pure RNA extractin kit) ساخت ایران و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNA استخراج شده تا زمان انجام مرحله بعدی به فریزر ۸۰- منتقل شد. سنتز cDNA (شرکت یکتاتجهیز آزما، ایران) در دو مرحله صورت گرفت. در مرحله اول میزان ۱ میکرولیتر رندوم هگزامر با ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده مخلوط شده و برای مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰° سلسیوس و پس از آن برای مدت یک دقیقه در دمای ۵° سلسیوس قرار گرفت. در مرحله دوم مقدار ۱ میکرولیتر از آنزیم

ترانس‌کریپتاز معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۴ میکرولیتر بافر آنزیم ریورس ترانس‌کریپتاز مورد استفاده به محصول واکنش مرحله اول افزوده شد و سپس برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵° سلسیوس، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰° سلسیوس، ۵ دقیقه در دمای ۸۵° سلسیوس و ۱ دقیقه در دمای ۵° سلسیوس قرار داده شد. واکنش PCR برای ساخت بخشی از دو ژن VP1 و VP2 در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای جدول شماره ۱ انجام شد. برای تهیه مخلوط واکنش PCR از کیت شرکت سیناکلون به روش زیر استفاده شد: ۱/۵ میکرولیتر 50mM $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر Buffer 10X PCR، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها، ۰۵ میکرولیتر dNTPs 10mM، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم polymerase Taq DNA، ۳ میکرولیتر از cDNA ساخته شده و ۱۵/۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. در برنامه دمایی PCR ابتدا دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه اعمال شد. سپس واکنش PCR با ۳۹ سیکل شامل ۹۵° سلسیوس برای ۳۰ ثانیه جهت واسرشت‌سازی، ۵۲° سلسیوس برای ۳۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها، ۷۲° سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه جهت طویل‌سازی ادامه یافت و در پایان واکنش دمای ° ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه جهت طویل‌سازی نهایی به واکنش اعمال شد. پس از انجام واکنش PCR، میزان ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. همچنین تمام نمونه‌ها از نظر مایکوپلاسما، لوکوز j و ویروس کم‌خونی عفونی به روش مولکولی مورد آزمایش قرار گرفت (۲۵-۲۷).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی و سکانس بخشی از ژن‌های VP1 و VP2

Primers	Sequence 5'–3'	Ampliconsize (bp)	Reference
	VP1		
Forward	AATGAGGAGTATGAGACCGA	1051	**(41)**
Reverse	CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC		
	VP2		
Forward	CCCAGAGTCTACACCATA	473	**(42)**
Reverse	TCCTGTGCCACTCTTTC		

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی: نمونه‌های مثبت برای تعیین توالی به شرکت کدون ژنتیک (تهران، ایران) ارسال شد. تعیین توالی با استفاده از روش سنگر انجام شد. تعیین کیفیت اولیه خوانش‌های انجام شده با استفاده از نرم‌افزار Chromas (version 2.5.0) و پس از آن با استفاده از ابزار BLAST صورت گرفت. ویرایش توالی‌ها همچنین با استفاده از نرم‌افزار Bioedit انجام شد. از نرم‌افزار MEGA 7 برای ترسیم درخت فیلوژنتیک از طریق روش Maximum likelihood استفاده شد. ترسیم این درخت بر اساس توالی‌های ژن VP1 و VP2 به‌دست آمده در این مطالعه و توالی‌های مختلف سویه‌های موجود در بانک جهانی ژن بود.

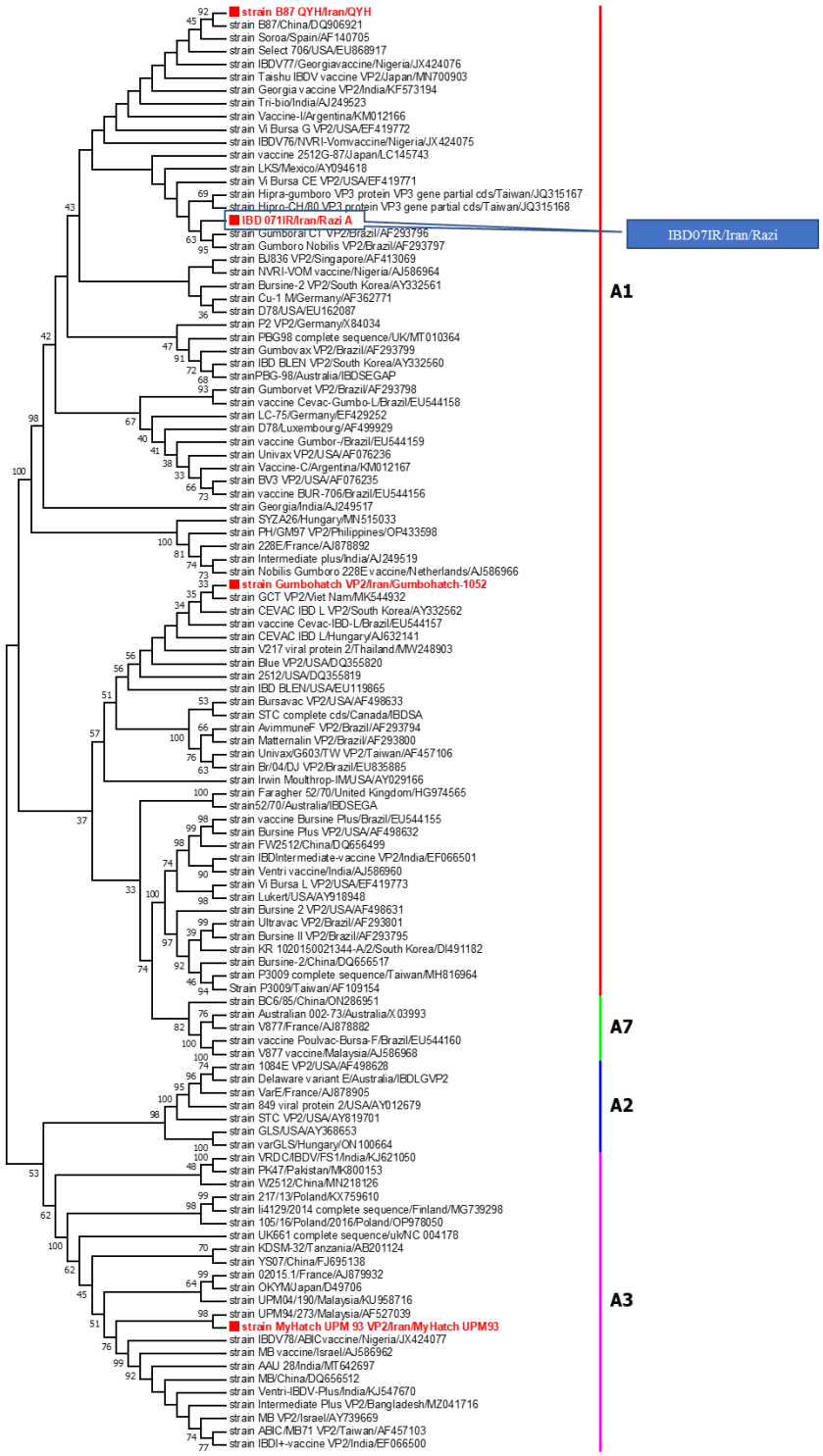
نتایج

در درخت شجره‌شناسی براساس ژن VP1 سویه واکسن B87 QYH در نزدیکی سویه B87 کشور چین (DQ906922)، سویه واکسن IBD07IR رازی در مجاور سویه D78 کشور آمریکا (EU162090) و سویه گامبوهچ (Gumbohatch) (سویه ۱۰۵۲) در مجاور سویه (MF969108) 150127/0.2 کشور الجزایر در گروه B1 قرار گرفتند. همچنین MyHatch UPM 93 در گروه ژنتیکی B2 مجاور سویه (F527040) UPM97/61 کشور مالزی قرار گرفت. از سوی دیگر، در بررسی درخت شجره‌شناسی بر اساس ژن VP2 سویه واکسن B87 QYH در مجاورت سویه B87 کشور چین (DQ906921)، سویه

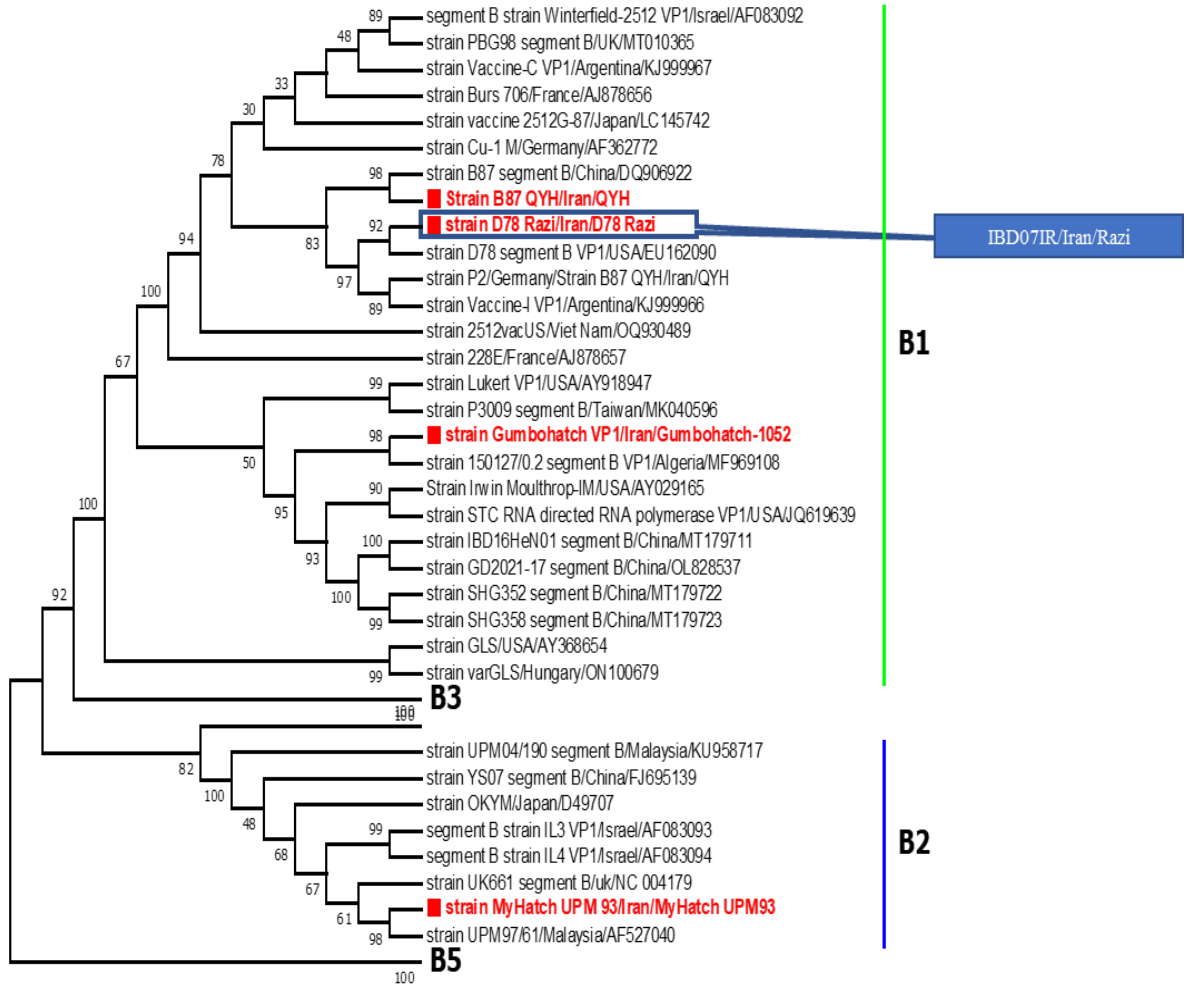
واکسن IBD07IR در مجاور سویه‌های Gumboral CT (AF293796) VP2 و Gumboro Nobilis VP2 (AF293797) کشور برزیل و سویه گامبوهچ (Gumbohatch) در مجاورت سویه GCT (MK544932) کشور ویتنام در گروه A1 قرار گرفتند. سویه MyHatch UPM 93 نیز در گروه A3 و در نزدیکی سویه UPM94/273 (AF527039) کشور مالزی قرار گرفت (شکل ۱ و ۲). در پایان بعد بررسی‌ها براساس ژن‌های VP1 و VP2 بذر واکسن شرکت MyHatch UPM 93 جزو بذرهای حاد واکسن قرار گرفت که بعد از تخفیف حدت به اینترمدیت پلاس کاهش پیدا کرده است. با استفاده درخت فیلوژنی، ژنوتیپ واکسن‌های مورد مطالعه مشخص شدند که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود. همچنین با توجه به برخی از نگرانی‌ها در خصوص آلودگی واکسن‌های وارداتی به عوامل اگزوژن (مایکوپلاسما، لکوز J و ویروس کم‌خونی) این بچ از واکسن‌های مورد بررسی قرار گرفت و حضور این عوامل در این سری تولید از واکسن‌ها منفی اعلام می‌گردد (روش کار و اطلاعات منتشر نشده).

جدول ۲- خلاصه یافته‌ای ژنوتایپینگ واکسن‌های وارداتی و تولید ایران بر اساس دو قطعه A و B ویروس بورس عفونی پرندگان

ردیف	نام واکسن	تیپ واکسن	شرکت تولید کننده	ژنوتایپ
1	IBD07IR	زنده تخفیف حدت یافته	موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی	A1B1
2	B87	زنده تخفیف حدت یافته	QYH	A1B1
3	GUMBOHATCH	ایمونوکمپلکس	HIPRA	A1B1
4	MyHatch UPM93	Naked	UPM	A3B2



شکل ۱- آنالیز فیلوژنی بر اساس قطعه‌ی B (ژن VP1). با نرم‌افزار MEGA 7 مدل ML. تفاوت ژنتیکی سویه‌های واکسن تجاری مورد استفاده در ایران در مقایسه با توالی‌های فیلد و واکسن ثبت شده در بانک جهانی ژن نمایش داده شده است.



شکل ۲- آنالیز فیلوژنی بر اساس قطعه‌ی A (ژن VP2). با نرم‌افزار MEGA 7 مدل ML. تفاوت ژنتیکی سویه‌های واکسن تجاری در مقایسه با توالی‌های فیلد و واکسن ثبت شده در بانک جهانی ژن مورد استفاده در ایران نمایش داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

ویروس بیماری بورس عفونی همچنان یک تهدید بزرگ برای صنعت طیور در کشورهای مختلف است (۲۸). این بیماری علاوه بر تلفات بالا، به‌ویژه در مورد سویه‌های بسیار حاد، به‌وسیله تضعیف سیستم ایمنی (حتی در موارد فاقد نشانه‌های بالینی) نه تنها پرندگان را نسبت به ابتلا به سایر بیماری‌ها حساس می‌کند، بلکه با واکسیناسیون علیه سایر بیماری‌ها نیز تداخل ایجاد می‌کند و کارآیی واکسن‌ها را کاهش می‌دهد. در نتیجه منجر به تلفات غیر مستقیم، کاهش رفاه حیوانات و کاهش عملکرد آنها و استفاده بیشتر از درمان‌های دارویی، مانند داروهای ضد میکروبی می‌شود و بدین‌ترتیب از جمله بیماری‌های اصلی مؤثر بر اقتصاد مرغداری‌های سراسر دنیا است (۱، ۲۹).

پروتئین VP2 که در بیماری‌زایی ویروس نقش دارد و پروتئین VP1 که در فرآیند همانندسازی و همچنین تعیین میزان حدت ویروس نقش دارد و به‌ترتیب توسط قطعات A و B کدگذاری می‌شوند، در سال‌های گذشته مبنای تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی ویروس گامبورو قرار گرفته‌اند (۳۰، ۳۱). Michel و Jackwood در سال ۲۰۱۷ و Jackwood و همکاران در سال ۲۰۱۸، شیوه جدیدی برای تقسیم‌بندی سویه‌های مختلف ویروس گامبورو ارائه دادند که در آن سویه‌های مختلف ویروس گامبورو را بر اساس توالی‌یابی ناحیه بسیار متغییر VP2

(Hypervariable Region HVR) که در ناحیه آمینواسیدی ۳۵۰-۲۰۶ پروتئین VP2 قرار دارد و متغیرترین ناحیه این پروتئین است، در ۷ گروه ژنتیکی متفاوت قرار دادند (۳۲-۳۴). در سال ۲۰۲۱ نیز Islam و همکاران، سویه‌های مختلف ویروس گامبورو را بر اساس توالی‌یابی و جایگشت‌های مختلف دو قطعه A و B به ۱۵ گروه ژنتیکی تقسیم‌بندی کردند که در آن ناحیه HVR در پروتئین VP2 و ناحیه‌ای تحت عنوان نشانگر-B (ناحیه آمینواسیدی ۲۵۲-۱۱۰) در پروتئین VP1 مورد بررسی فیلوژنی قرار گرفت (۱۱، ۳۴). در این مطالعه Islam و همکاران، در تقسیم‌بندی سویه‌های جدا شده بر اساس توالی A، سویه‌های متعلق به سروتیپ یک را در ۸ گروه ژنتیکی که عبارتند از: A1 (کلاسیک)، A2 (واریانت آنتی‌ژنی ایالات متحده آمریکا)، A3 (بسیار حاد)، A4 (سویه متمایز)، A5 (مکزیکی غیر معمول)، A6 (ایتالیایی غیر معمول)، A7 (استرالیایی اولیه) و A8 (واریانت استرالیایی) تقسیم‌بندی کردند. همچنین گروه ژنتیکی A را به سویه‌های سروتیپ دو نسبت دادند؛ و سپس سویه‌ها را بر اساس توالی‌یابی قطعه B در ۵ گروه ژنتیکی متفاوت طبقه‌بندی کردند. قاعدتاً از جایگشت این گروه‌های ژنی، باید ۴۵ نوع ژنوتیپ متفاوت حاصل شود اما در این مطالعه سویه‌ها را توانستند در مجموع در ۱۵ نوع ژنوتیپ متفاوت (A1B1، A1B2، A1B3، A2B1، A3B1، A3B2، A3B3، A3B4، A3B5، A4B1، A5Bx، A6B1، A7B3، A8B3 و A0B1) تقسیم‌بندی کنند. در مطالعه حاضر نیز دو توالی HVR و نشانگر-B که در مطالعات گذشته بسیار مورد بررسی‌های فیلوژنی قرار گرفتند، در تقسیم‌بندی سویه‌های واکسن‌های موجود در داخل کشور ایران (برخی از واکسن‌های وارداتی گامبورو در کشور در جدول شماره چهار آورده شده است) و رسم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفتند. البته لازم به ذکر است که به‌دلیل ژنوم دو قطعه‌ای ویروس گامبورو، پدیده بازآرایی ممکن است رخ دهد که در سراسر جهان نیز گزارش‌های زیادی از آن وجود دارد. این پدیده می‌تواند باعث شکل‌گیری ژنوتیپ‌های جدید ویروس شود. در مطالعه انجام شده توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۲۱، سویه جدیدی را به نام IBDV-JS19-14701 در کشور چین جداسازی و گزارش کردند که دارای ژنوتیپ جدید A2B3 بود و بررسی‌های فیلوژنی نشان دادند که این سویه قطعه A2 خود را از ویروس سویه نوظهور nVarIBDV با ژنوتیپ A2B1 در کشور چین و قطعه B3 خود را از سویه‌های شبه HLJ0504 با ژنوتیپ A3B3، که در چین در حال گردش است، دریافت کرده است (۳۵). در مطالعه انجام شده توسط Legnardi و همکاران در سال ۲۰۲۲، سویه‌ای را جداسازی کردند که با هیچ‌یک از گروه‌های ژنی موجود شباهت کافی نداشت، بنابراین در این مطالعه یک گروه ژنتیکی جدید تحت عنوان A9 معرفی شد و ژنوتیپ این سویه جدید، A9B1 گزارش شد اما پاتوژنسیته این ژنوتیپ هنوز مشخص نشده است (۳۶).

از راه‌های اصلی کنترل بیماری بورس عفونی، رعایت امنیت زیستی و واکسیناسیون است که در این بین واکسیناسیون بهترین روش کنترل بیماری به شمار می‌رود (۱۵). واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته، غیر فعال، بر پایه سویه تخفیف حدت یافته از سویه مزرعه (Naked)، ایمونوکمپلکس و واکسن‌های نوترکیب بر پایه وکتور HVT به‌صورت تجاری در کشور ایران استفاده می‌شوند (۱، ۳۷). در حال حاضر برنامه اصلی مورد استفاده در کشور، شامل واکسیناسیون با واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته و به جهت تقویت ایمنی علیه ویروس، القای ایمنی یکنواخت و انتقال آنتی‌بادی مادری به جوجه‌ها، تزریق واکسن‌های غیر فعال پیش از تخم‌گذاری در گله‌های مولد است. اما واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته می‌توانند باعث تضعیف سیستم ایمنی شده و همواره خطر بازگشت حدت و بیماری‌زایی را دارند. همچنین به‌دلیل دارا بودن میکروارگانسیم زنده می‌توانند خود باعث بازآرایی و ایجاد ژنوتیپ جدید ویروس شوند. این قضیه باعث معرفی انواع جدیدتر واکسن شامل واکسن‌های بر پایه DNA، نوترکیب بر پایه هرپس ویروس بوقلمون

(HVT) و کمپلکس ایمنی شده است که مشخصات و مزایای استفاده از آنها در جدول ۳ به اختصار ذکرشده است (۱۰، ۲۱، ۳۷).

جدول ۳- مشخصات و مزایای نسبی پلت فرم‌های مختلف واکسن بورس عفونی پرندگان (۳۷)

	سازگاری با واکسیناسیون مارک	کاربرد در هچری		تنظیم شده بر اساس میزان آنتی‌بادی مادری انفرادی	شروع اولیه تکثیر در بورس	طیف حفاظت سویه‌های مختلف ویروس گامبورو		
		داخل تخم‌مرغی	زیر جلدی			واریانت	سویه خیلی‌حاد	کلاسیک
واکسن‌های برهنه (Naked)	بله	بله	بله	++	+++	+++	+++	+++
کمپلکس ایمنی	بله	بله	بله	+	++	++	++	++
واکسن نو ترکیب بر پایه هرپس ویروس بوقلمون	بله	بله	بله	_	++	++	++	++

با وجود واکسیناسیون گسترده علیه بیماری بورس عفونی، گزارشات فراوانی از عدم کارآیی واکسن‌های موجود در کنترل بیماری در سراسر جهان وجود دارد که احتمال می‌رود به‌دلیل رخداد بازآرایی‌های متعدد و جهش در ژنوم ویروس (به‌ویژه در ناحیه HVR) باشد، بنابراین یک مطالعه جامع در جهت بررسی محافظت متقاطع بین ژنوتیپ‌های متفاوت سویه‌های واکسن و سویه‌های فیلد بسیار مورد نیاز است. در مطالعه انجام شده توسط Reddy و همکاران در سال ۲۰۲۲، با استفاده از تست سرولوژی VN، میزان خنثی‌سازی ویروس‌های سویه‌های مختلف از گروه‌های ژنتیکی A1 تا A8 (به‌جز A7) را توسط سویه واکسن گروه ژنتیکی A1 در دو روش درون‌تنی (در ۹ جوجه SPF) و برون‌تنی (کشت در رده سلولی DT40 لنفوسیت B) بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بودند که در هردو بخش درون‌تنی و برون‌تنی، واکسن A1 بیشترین شباهت آنتی‌ژنی را به گروه‌های ژنتیکی A1، A3 و A4 داشت و میزان خنثی‌سازی ویروس‌های A6 و A8 در مقایسه با ویروس‌های A1، A3 و A4 به‌طور قابل توجهی کمتر بود. این داده با داده‌های منتشر شده توسط Lupini و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطابقت داشت که عفونت با سویه‌ای جدید را در گله‌های مرغ واکسینه شده علیه بیماری بورس عفونی توسط واکسن‌های معمول موجود در ایتالیا گزارش کردند که امروزه این سویه را در گروه ژنتیکی A6 طبقه‌بندی می‌کنیم. در مطالعه‌ی Reddy و همکاران، واکسن مورد استفاده، بیشترین اختلاف آنتی‌ژنی و کمترین میزان کارآیی و تیتر خنثی‌سازی علیه سویه‌ای از گروه ژنتیکی A2 را در دو آزمایش درون و برون‌تنی نشان داد (۳۸، ۳۹).

مطالعه حاضر نیز با استفاده از توالی‌یابی و بررسی فیلوژنی نواحی نشانگر B- در قطعه B ژنوم و ناحیه بسیار متغیر HVR در قطعه A ژنوم، به تعیین ژنوتیپ چهار واکسن تجاری مورد استفاده در صنعت پرداخته و اطلاعات مربوط به آن در جدول شماره ۲ آمده است. در کشور واکسن‌های مختلف گامبورو (اینترمدیت، اینترمدیت پلاس و ایمنوکمپلکس) مورد استفاده قرار می‌گیرد (جدول شماره ۴). از سال ۱۳۹۷ که مشکل واردات واکسن از کشورهای اروپایی برای صنعت طیور کشور، ایجاد شد سازمان دامپزشکی تصمیم به تأمین واکسن‌های مورد نیاز از کشورهایی با مبدأ غیر اروپا و همچنین تقویت تولید واکسن زنده در داخل کشور گرفت. در این مطالعه

چهار نوع از این واکسن‌ها شامل: سه واکسن زنده تخفیف حدت یافته IBD07IR (مؤسسه رازی، ایران)، B87 (شرکت QYH، چین) و MyHatch UPM93 (شرکت UPM، مالزی) و واکسن ایمونوکمپلکس گامبوهچ (Gumbohatch) (شرکت هیپرا، اسپانیا) مورد بررسی واقع شدند.

جدول ۴- برخی از واکسن‌های وارداتی بیماری بورس عفونی پرندگان به جمهوری اسلامی ایران

ملایم - اینترمدیت		اینترمدیت پلاس	
نام تجاری	شرکت	نام	شرکت
CH80	هیپرا	GM97	هیپرا
ND IBD INT	جنرا	AVIVAC-IBD	اویواک
D78	اینتروت	CEVA IBDL	سوا
B87	QYH	E228	اینتروت
CEVAC GUMBO L	سوا	Avipro IBD Xtreme	لوهمن
Bursine – 2	زئوتیس	Transmune	سوا
INMUGAL I.B.A. GUMBORO	اوژرو	Novamune	سوا
Avipro Precise	لوهمن	GUMBOHATCH	هیپرا
ORNIBUR INTERMEDIATE	بیووتا	Bursaplex Poulvac	زئوتیس
Bur-706	بوهرینگر		
IBD07IR	رازی	Myhatch UPM (Naked vaccine)	UPM

هر دو واکسن زنده تخفیف حدت یافته IBD07IR (مؤسسه رازی) و B87 (شرکت QYH) از نوع واکسن‌های اینترمدیت (Intermediate) می‌باشند که در بررسی توالی نوکلئوتیدی پروتئین VP2، در گروه ژنتیکی A1 طبقه‌بندی می‌شوند که در این بررسی واکسن B78 در مجاورت سویه B78 کشور چین (DQ906921) و واکسن IBD07IR در مجاورت سویه‌های (AF527039) Gumboral CT VP2 و Gumboro Nobilis VP2 (AF293797) کشور برزیل قرار می‌گیرند. در رسم درخت فیلوژنی بر اساس توالی پروتئین VP1، سویه واکسنB87 در نزدیکی سویه B87 کشور چین (DQ906922) و سویه واکسن IBD07IR در مجاور سویه D78 کشور آمریکا (EU162090) طبقه‌بندی می‌شود. این واکسن به‌عنوان یکی از پرفروش‌ترین واکسن‌های زنده تحفیف حدت یافته در چین مصرف می‌گردد و بسیاری از شرکت‌های چینی از این بذر در جهت تولید واکسن‌های زنده خود استفاده می‌کنند. این دو نوع واکسن B87 و واکسن IBD07IR مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی بر اساس تجربیات قبلی دارای عملکرد و همچنین ایمنی مناسب می‌باشند و به‌عنوان یک گزینه استفاده در اختیار گله‌های مادر، تخم‌گذار و گوشتی قرار گرفته‌اند. در مطالعه نبی‌نژاد، واکسن IBD07IR مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی سبب ایجاد تیتر مناسب در جوجه گوشتی آرین شد؛ شاخص بورسی (وزن بورس به وزن بدن) مناسب از خود نشان داد و همچنین فاقد اثرات سوء تضعیف سیستم ایمنی بود (۴۰).

واکسن جدیدی که در سال ۱۴۰۲-۱۴۰۱ ثبت و وارد کشور شده است، واکسن MyHatch UPM 93 شرکت UPM کشور مالزی مباشد. این واکسن یک واکسن زنده تخفیف حدت یافته اینترمیدیت پلاس (intermediate plus) می‌باشد که هم قابلیت مصرف در یک‌روزگی در هچری را دارا می‌باشد و هم به مستندات شرکت

تولیدکننده امکان مصرف برخی از مدل‌های تولید آن در روز ۳ تا ۵ وجود دارد. در ساخت این واکسن یک جدایه بومی مالزیایی از ویروس گامبورو با نام UPM 93273 (MyHatch UPM 93) انتخاب، بهینه و با موفقیت در تخم‌مرغ جنین‌دار SPF و کشت سلول برای توسعه و تولید واکسن اینترمیدیت پلاس (Intermediate Plus) تخفیف حدت داده شده است. این واکسن با روش‌های قطره چشمی، آشامیدنی یا تزریق داخل تخم‌مرغ بکار می‌رود و تحت شرایط آزمایشگاهی، برای ایجاد محافظت در برابر سویه‌های خیلی حاد در جوجه‌های SPF و جوجه‌های تجاری موفق بوده است. MyHatch UPM 93 قادر به عبور از سطوح بالای آنتی‌بادی‌های مادری و تحریک سیستم ایمنی علیه ویروس گامبورو است. این واکسن فاقد اثرات سرکوب کننده سیستم ایمنی بوده، تنها ضایعاتی خفیف در بورس ایجاد می‌کند. در این مطالعه، سویه این واکسن در بررسی توالی پروتئین VP2 در گروه ژنتیکی A3 و در نزدیکی سویه UPM94/273 (AF527039) کشور مالزی و در بررسی توالی نوکلئوتیدی پروتئین VP1 در مجاورت سویه UPM97/61 (F527040) کشور مالزی دسته‌بندی شد.

واکسن گامبوهچ (Gumbohatch)که تولید شده در شرکت هیپرا کشور اسپانیا می‌باشد، یک واکسن ایمونوکمپلکس و از سویه ۱۰۵۲ (اینترمدیت پلاس intermediate plus) می‌باشد. طبق نتایج این مطالعه، این واکسن بر اساس توالی نوکلئوتیدی VP2 در گروه ژنتیکی A1 و در مجاورت سویه GCT (K544932) VP2 کشور ویتنام و بر اساس توالی VP1 در مجاورت سویه 150127/0.2 (MF969108) کشور الجزایزو در گروه ژنتیکی B1 طبقه‌بندی شد. این واکسن به‌علت سویه مورد استفاده و همچنین میزان آنتی‌بادی همراه ویروس تنها واکسن ایمونوکمپلکس می‌باشد که قابلیت استفاده در سویه‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار را در هچری دارا می‌باشد. واکسن‌های مشابه این واکسن که قبل از آن در کشور مورد استفاده قرار می‌گرفت شامل واکسن ترانسمیون (سویه Winterfield 2512) شرکت سوا (یکی از پرمصرف‌ترین واکسن‌های قابل استفاده در هچری) و همچنین بورساپلکس (سویه Winterfield 2512) شرکت زئوتیس می‌باشد. اخیراً شرکت سوا واکسن نوامیون (سویه SYZA 26) را که یک واکسن ایمنوکمپلکس می‌باشد جهت استفاده در جوجه‌های تخم‌گذار شروع به پخش در کشور نموده است. همچنین شرکت واکسینووا واکسن ایمنوکمپلکس خود را (Vaxxon IBD imc) بر پایه سویه Winterfield 2512 به بازار دنیا و ایران معرفی کرده است. بر اساس دیتای ژنتیکی موجود این واکسن‌ها و تازه وارد بودن آنها، در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفتند.

هدف از این مطالعه تعیین ژنوتیپ واکسن‌های تجاری ویروس گامبورو بود که اخیراً در کشور مجوز استفاده دریافت نموده‌اند. امید است در آینده مطالعاتی در زمینه بررسی ژنوتیپ سویه‌های در حال گردش در مناطق مختلف کشور انجام گیرد تا با اطلاعات به دست آمده، بتوان به انتخاب بهترین واکسن ممکن در هر منطقه اقدام نمود و بدین ترتیب گامی بزرگ در کنترل این بیماری عفونی در کشور برداشت. همچنین اطلاعات این مقاله می‌تواند به‌عنوان یک تاریخچه مکتوب در زمینه سیر تحول واردات واکسن و شناخت انواع واکسن‌های وارداتی گامبورو در ایران در جهت مطالعات مختلف و همچنین اپیدمیولوژی مولکولی تحت بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

در اینجا لازم می‌دانیم از زحمات آقای بهروز اسدی که در انجام این طرح تحقیقاتی یاری‌گر ما بودند، سپاسگزاری گردد. همچنین از شرکت‌های ویواپارس (جناب آقای دکتر مراد محمدزاده)، پارس فاطم (جناب آقای مهندس محمدرضا نوذری)، سرور فجر (جناب آقای مصطفی عالقیان) و همچنین از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در انجام این طرح تحقیقاتی سپاسگزاری می‌شود.

References

1- Dey S, Pathak DC, Ramamurthy N, Maity HK, Chellappa MM. Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Vet Med-Res Rep*. 2019: 85-97.

2- Sun JH, Lu P, Yan YX, Hua XG, Jiang J, Zhao Y. Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent infectious bursal disease virus isolated from China. *J Vet Med., B*. 2003; 50(3): 148-54.

3- Mahgoub HA. An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol*. 2012; 157: 2047-57.

4- Orakpoghenor O, Oladele SB, Abdu PA. Infectious bursal disease: Transmission, pathogenesis, pathology and control-an overview. *Worlds Poult Sci J*. 2020; 76(2): 292-303.

5- Razmyar J, Peighambari S. Molecular characterization of Iranian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 2008; 52(4): 665-9. [In Persian]

6- Dohms J, Jaeger J. The effect of infectious bursal disease virus infection on local and systemic antibody responses following infection of 3-week-old broiler chickens. *Avian Dis*. 1988: 632-40.

7- Jackwood DJ, Crossley BM, Stoute ST, Sommer-Wagner S, Woolcock PR, Charlton BR. Diversity of genome segment B from infectious bursal disease viruses in the United States. *Avian Dis*. 2012; 56(1): 165-72.

8- Cao Y, Yeung W, Law M, Bi Y, Leung F, Lim B. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis*. 1998: 340-51.

9- Van den Berg T, Morales D, Eterradossi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, *et al.* Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol*. 2004; 33(5): 470-6.

10- Li G, Kuang H, Guo H, Cai L, Chu D, Wang X, *et al.* Development of a recombinant VP2 vaccine for the prevention of novel variant strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol*. 2020; 49(6): 557-71.

11- Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, *et al.* A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathol*. 2021; 50(2): 190-206.

12- Eterradossi N, Saif YM. Infectious bursal disease. *Dis Poult*. 2013: 219-46.

13- Rautenschlein S, von Samson-Himmelstjerna G, Haase C. A comparison of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific-pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age. *Vet immunol immunopathol*. 2007; 115(3-4): 251-60.

14- Thomrongsuwannakij T, Charoenvisal N, Chansiripornchai N. Comparison of two attenuated infectious bursal disease vaccine strains focused on safety and antibody response in commercial broilers. *Vet World*. 2021; 14(1): 70.

15- Müller H, Mundt E, Eterradossi N, Islam MR. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol*. 2012; 41(2): 133-9.

16- Maas RA, Venema S, Oei HL, Pol JM, Claassen IJ, ter Huurne AA. Efficacy of inactivated infectious bursal disease (IBD) vaccines: comparison of serology with protection of progeny chickens against IBD virus strains of varying virulence. *Avian Pathol*. 2001; 30(4): 345-54.

17- De Wit J. Gumboro disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Annual report and proceedings of COST Action. 2001; 839: 170-8.

18- Ahmed Z, Akhter S. Role of maternal antibodies in protection against infectious bursal disease in commercial broilers. *Int J Poult Sci*. 2003; 2(4): 251-5.

19- Iván J, Velhner M, Ursu K, Germán P, Mató T, Drén CN, *et al.* Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. Can. *J Vet Res*. 2005; 69(2): 135.

20- Giambrone J, Dormitorio T, Brown T. Safety and efficacy of in ovo administration of infectious bursal disease viral vaccines. *Avian Dis*. 2001: 144-8.

21- Hsieh MK, Wu CC, Lin TL. Priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine conferring protection of chickens against infectious bursal disease. *Vaccine*. 2007; 25(29): 5417-27.

22- Johnston P, Liu H, O'Connell T, Phelps P, Bland M, Tyczkowski J, *et al.* Applications in in ovo technology. *Poult Sci*. 1997; 76(1): 165-78.

23- Whitfill C, Haddad E, Ricks C, Skeeles J, Newberry L, Beasley J, et al. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by

mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis*. 1995: 687-99.

24- Jeurissen SHM, Janse EM, Lehrbach PR, Haddad A, Avakian C, Whitfill DLO. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immun*. 1998; 95(3): 494-500.

25- Health WOfA. Chapter 3.3.5. Avian mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2008.

26- Hosseini H, Majidi S, Kafi ZZ, Dizaji RE, Ghalyanchilangeroudi A. Molecular characterization and the first full sequencing genome of chicken infectious anemia virus (CIAV) in Iran. *Vet Res*. 2021; 22(4): 331. [In Persian]

27- Zhang Q, Mo G, Xie T, Zhang Z, Fu H, Wei P, *et al*. Phylogenetic Analysis of ALV-J Associated with Immune Responses in Yellow Chicken Flocks in South China. *Mediat Inflamm*. 2021; 1.

28- Wagari A. A review on infectious bursal disease in poultry. *Health Econ Outcome Res Open Access*. 2021; 7(2): 167.

29- Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE, Stoute ST, Woolcock PR, Crossley BM, Hietala SK, *et al*. Characteristics of a very virulent infectious bursal disease virus from California. *Avian Dis*. 2009; 53(4): 592-600.

30- Liu M, Vakharia VN. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virol*. 2004; 330(1): 62-73.

31- Huang Z, Elankumaran S, Yunus AS, Samal SK. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *Virol*. 2004; 78(18): 10054-63.

32- Michel LO, Jackwood DJ. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch Virol*. 2017; 162: 3661-70.

33- Jackwood DJ, Schat KA, Michel LO, de Wit S. A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathol*. 2018; 47(6): 576-84.

34- Jiang N, Wang Y, Zhang W, Niu X, Huang M, Gao Y, *et al*. Genotyping and molecular characterization of infectious bursal disease virus identified in important poultry-raising areas of China during 2019 and 2020. Front. *Vet sci*. 2021; 8: 759861.

35- Wang Y, Jiang N, Fan L ,Niu X, Zhang W, Huang M, *et al*. Identification and pathogenicity evaluation of a novel reassortant Infectious Bursal Disease Virus (genotype A2dB3). *Viruses*. 2021; 13(9): 1682.

36- Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K, Duarte I, Silva M, *et al*. Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. *Avian Pathol*. 2022; 51(1): 97-105.

37- Berinstein A. Recombinant vaccines and infectious bursal disease virus. *Anim Sci Rev*. 2012; 215.

38- Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, *et al*. A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol*. 2016; 45(4): 458-64.

39- Reddy VR, Nazki S, Brodrick AJ, Asfor A, Urbaniec J, Morris Y, *et al*. Evaluating the breadth of neutralizing antibody responses elicited by infectious bursal disease virus genogroup A1 strains using a novel chicken B-cell rescue system and neutralization assay. *Virol*. 2022; 96(18):e01255-22.

40- NabiNejhad A, Noaman V, Allameh K. Evaluation of Bursa index of Razi Institute Gamburo vaccine in broilers breeding. *NFVM*. 2022; 4(2): 73-82. [In Persian]

41- Islam M, Zierenberg K, Müller H. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch Virol*. 2001; 146: 2481-92.

42- Lin Z, Kato A, Otaki Y ,Nakamura T, Sasmaz E, Ueda S. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*. 1993: 315-23.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 32-45

Genetic Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Vaccines in Iran: Helping to make the right decision in choosing the right vaccine and molecular epidemiology studies

Arash ghalyanchi langeroudi[1*], Hossein Hosseini[2], Mohammad Abdoshah[3], Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi[3], Ali Hojabr Rajeoni[1], Zahra Ziafati Kafi[1], Naser Sadri[1], Soroush Sarmadi[1], Fahimeh Jamiri[1], Alireza Bakhshi[1], Omid Eghbali[1]

1- Department of microbiology and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, Karaj Branch, Islamic Azad university, Karaj, Iran.
3- Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization, Karaj, Iran.

Receive: August 11, 2024; Revise: August 24, 2024; Accept: September 5, 2024

10.22034/nfvm.2024.472556.1251

Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) or Gumboro causes an acute and highly contagious infectious disease characterized by a severe suppression of the immune system (especially humoral) of chickens. This virus is a highly resistant RNA virus of the Birnaviridae family, whose genetic diversity has significant implications for disease manifestations, diagnosis and control. The new genetic classification of this virus is based on the nucleotide sequence of the A (VP2) and B (VP1) parts of its genome. Due to some problems and restrictions in importing vaccines from European countries, the Iranian veterinary organization has agreed in recent years to import Gumboro vaccine and produce it locally. The aim of this study is to investigate the phylogenetic and classification of vaccine strains and their compatibility with circulating viruses. In this study, four types of live attenuated vaccines (IBD07IR, Razi Vaccine and Serology Institute, Iran), B87 (QYH, China), GUMBOHATCH immunocomplex (Hypera, Spain) and MyHatch UPM 93 vaccine (MVP, Malaysia) were evaluated and then the genes encoding for two proteins VP2 and VP1 were amplified by RT-PCR method and sequenced. In brief, the live attenuated vaccines IBD07IR and B87 (Intermediate) and the Gumbohatch vaccine (Intermediate Plus) were categorized as group A1B1 and the MyHatch UPM 93 vaccine (Intermediate Plus) was classified as group A3B2. The results of this study can provide researchers and clinicians with appropriate information in the field of Gumboro vaccines and vaccine selection and can be used in molecular epidemiologic studies in Iran.

Keywords: *Iran, Identification, Immune complex, Infectious bursal disease, Vaccine*

نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ٤٦- ٥٥

بررسی بقایای آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در تخم‌مرغ‌های تجاری به روش الایزا

حدیثه ثناخوان رضاییه[۱]، لیلا مدیری*[۱]، آرش چایچی نصرتی[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی،لاهیجان، ایران.

دریافت مقاله: ۳۱ مرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۵ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۵ آبان ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.474638.1252

چکیده

فورازولیدون، آنتی‌بیوتیکی از خانواده نیتروفوران‌هاست که خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارد و معمولاً برای درمان عفونت‌های باکتریایی مانند آنتریت و گاستروانتریت استفاده می‌شود. همچنین، این دارو به‌عنوان افزودنی خوراکی و محرک رشد در صنعت طیور به کار می‌رود. با این حال، به‌دلیل عوارض جانبی سمی و خطر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از نیتروفوران‌ها در پرورش طیور در ایران ممنوع است. لذا این مطالعه به بررسی باقی‌مانده متابولیت فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ‌های مارک‌دار خریداری‌شده در استان گیلان پرداخته است. در مطالعه حاضر تعداد ۶۴۶ عدد تخم‌مرغ تجاری در سه مرحله از فروشگاه‌های مختلف سطح استان گیلان به‌صورت تصادفی خریداری و جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از کیت RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) Art. No. R3703 برای ارزیابی متابولیت آنتی‌بیوتیک فورازولیدون (AOZ) مورد آزمایش قرار گرفتند. در نهایت نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۵ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. در میان ۶۴۶ نمونه تخم‌مرغ جمع‌آوری شده، تعداد ۴۱۲ نمونه معادل ۶۳/۸ درصد به آنتی‌بیوتیک فورازولیدون آلوده بودند. میانگین باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در میان کلیه نمونه‌ها ۱۱۹/۰۴ نانوگرم بر کیلوگرم و کمترین و بیشترین مقادیر شناسایی شده به‌ترتیب ۳۹/۰۶ و ۷۴۹/۱ نانوگرم بر کیلوگرم بود. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده وجود باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در نمونه‌های تخم‌مرغ است که با توجه به خطرات وجود باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی در تخم‌مرغ و ممنوعیت استفاده از فورازولیدون در پرورش طیور، نظارت منظم بر صنعت پرورش طیور ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک، فورازولیدون، AOZ، الایزا، تخم‌مرغ*

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

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیبات طبیعی، نیمه‌سنتری یا مصنوعی با فعالیت ضد میکروبی هستند، که از پرمصرف‌ترین داروها در صنعت طیور می‌باشند (۱). این داروها معمولاً برای مقاصد درمانی، پیشگیری و بهبود رشد مورد استفاده قرار می‌گیرند، با این‌حال یکی از ایرادات استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها تجمع باقیمانده آنها در بافت‌ها و قسمت‌های خوراکی حیوانات است که در نهایت بخشی از هرم غذایی می‌شوند (۲). وجود بقایای آنتی‌بیوتیک در حیوانات غذایی بیشتر از حد مجاز حداکثر باقی‌مانده، ممکن است به ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حیوانات یا انسان منجر شود، که این امر منجر به شکست درمان و ضررهای اقتصادی شده و همچنین می‌تواند به‌عنوان منبع انتقال ژن به انسان عمل کند. علاوه بر این مصرف مقادیر کم آنتی‌بیوتیک‌ها توسط انسان برای طولانی‌مدت می‌تواند منجر به آلرژی، سرطان‌زایی و اثرات مضر بالقوه بر میکروفلور روده انسان شود (۳).

فورازولیدون (۵- نیتروفورفوریلیدین‌آمین)-۲- اکسازولیدینون، FZD) یک عامل ضد میکروبی سنتزی از خانواده نیتروفوران‌ها است که به‌طور گسترده‌ای در دامپزشکی برای درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیاکلی*، *سالمونلا* و *شیگلا* و همچنین برای افزایش تولید دام، به‌ویژه در خوک‌ها، مرغ‌ها و ماهی‌ها استفاده می‌شود(۴، ۵). در سال ۱۹۹۵، استفاده از فورازولیدون و سایر نیتروفوران‌ها برای تولید دام در اتحادیه اروپا به‌دلیل نگرانی در مورد عوارض جانبی سمی، جهش‌زایی یا سرطان‌زایی بر سلامت انسان و امکان ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممنوع شد (۶). با توجه به نتایج JECFA بر اساس اطلاعات علمی موجود، هیچ سطح ایمنی از باقیمانده‌های فورازولیدون یا متابولیت‌های آن در مواد غذایی با خطر قابل قبولی برای مصرف‌کنندگان وجود ندارد. به همین دلیل، مقامات ذی‌صلاح باید از باقی‌ماندن فورازولیدون در مواد غذایی جلوگیری کنند. به همین دلیل در حال حاضر، استفاده از نیتروفوران‌ها در حیوانات تولیدکننده غذا در اتحادیه اروپا منع شده است و در فهرست "مواد ممنوعه" قرار می‌گیرند که برای آنها MRL (حداکثر حد باقیمانده) نمی‌توان تعیین کرد.

برای کنترل استفاده غیر قانونی از نیتروفوران‌ها و جلوگیری از رسیدن آن به مصرف‌کننده، مقامات اقدامات خاصی را انجام داده‌اند که شامل نظارت بر مواد غذایی با منشاء حیوانی است. در حالی که نیتروفوران‌ها به سرعت داخل بدن متابولیزه می‌شوند، متابولیت‌های آنها در ترکیب با پروتئین‌ها پایدار بوده و می‌توانند برای طولانی‌مدت در بافت‌های بیولوژیکی باقی بمانند. از این‌رو متابولیت‌های نیتروفوران‌ها معمولاً به‌عنوان مارکرهای باقیمانده دارو برای تشخیص این دسته از داروها استفاده می‌شود (۷، ۸).

AOZ (3-amino-2-oxazolidinon) متابولیت مشتق شده از فورازولیدون است که به‌دلیل پایداری طولانی‌مدت آن در بافت، برای نظارت و تشخیص در بافت‌های خوراکی مناسب است. متابولیت AOZ به‌طور کووالانسی به پروتئین‌های سلولی در داخل بدن متصل می‌شود و در شرایط اسیدی خفیف از بافت آزاد می‌شود (۹). تشخیص بقایای فورازولیدون در مواد غذایی با روش‌های مختلفی از جمله انواع مختلف کروماتوگرافی مانند HPLC-UV، LC-MS و LC-MS/MS انجام می‌شود (۱۰). با این‌حال، این روش‌ها بسیار پرهزینه هستند. در تلاش برای ارائه یک روش غربالگری کم‌هزینه، قابل حمل و با توان بالا که قادر به تعیین متابولیت‌های نیتروفوران‌ها باشد، ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) به یک گزینه مطلوب تبدیل شده است. ELISA بر اساس رقابت آنالیت یا نمونه با یک جزء نشاندار آنزیمی (ردیاب) برای محل اتصال یک آنتی‌بادی در چاهک‌های صفحه میکروتیتر عمل می‌کند. این روش به‌صورت حساس و اختصاصی، اغلب بدون مراحل پاکسازی پیچیده امکان تشخیص کمی و کیفی متابولیت‌های نیتروفوران را می‌دهد (۱۱).

با وجود ممنوعیت استفاده از نیتروفوران‌ها در بسیاری از کشورها به‌دلیل خطرات بهداشتی ناشی از باقی‌مانده‌های آنها، این آنتی‌بیوتیک‌ها همچنان به‌طور غیر مجاز در برخی صنایع پرورش طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال، در مطالعه کوتچاتانگ و همکاران (۲۰۱۹) مشخص شد که ۱۱/۱ درصد از مزارع پرورش مرغ در یائونده، کامرون، از نیتروفوران‌ها به‌عنوان بخشی از روش‌های درمانی خود استفاده می‌کنند (۱۲). همچنین، در مطالعه ویدیاسوتی (۲۰۱۲) نشان داده شد که ۱۴/۲۸ درصد از نمونه‌های گوشت جوجه‌های گوشتی به متابولیت‌های نیتروفوران‌ها آلوده بوده‌اند (۱۳). در ایران نیز، با وجود دستورالعمل‌های سازمان دامپزشکی مبنی بر ممنوعیت استفاده از فورازولیدون، شواهد موجود نشان می‌دهد که این آنتی‌بیوتیک همچنان به‌طور غیرمجاز در صنعت پرورش طیور کشور استفاده می‌شود. به‌ویژه، تحقیقات انجام شده توسط امیری، علوی و فضل آرا وجود استفاده غیر قانونی از فورازولیدون را در صنعت پرورش طیور ایران تأیید کرده‌اند (۱۱، ۱۴، ۱۵). نتایج مطالعه کوپر و کندی نیز در نمونه‌های گوشت خوک به‌منظور بررسی پایداری متابولیت‌های نیتروفوران نشان داد که متابولیت‌های مهمی نظیر ۳- آمینو-۲- اکسازولیدینون (AOZ)پس از اعمال فرآیندهای پخت‌وپز و همچنین در طول نگهداری طولانی‌مدت، به‌طور قابل توجهی همچنان پایدار باقی می‌مانند (۱۶).

با توجه به اهمیت سلامت و ایمنی تخم‌مرغ‌ها به‌عنوان یکی از مواد غذایی پرمصرف و همچنین خطرات بالقوه ناشی از وجود فورازولیدون، به تحقیق و ارزیابی دقیق‌تری از وضعیت باقی‌مانده این آنتی‌بیوتیک در محصولات غذایی نیاز است. به‌دلیل این که که باقی‌مانده‌های فورازولیدون می‌توانند به عوارض جانبی جدی برای سلامت انسان منجر شوند و همچنین با توجه به پایداری متابولیت‌های نیتروفوران در فرآیندهای پخت‌وپز و نگهداری، خطر وجود باقی‌مانده‌های این آنتی‌بیوتیک در محصولات نهایی افزایش می‌یابد. علاوه بر این، شواهد نشان‌دهده استفاده غیر مجاز از فورازولیدون در صنعت پرورش طیور در ایران است و بسیاری از مصرف‌کنندگان از وجود این آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات منفی آنها بر سلامت آگاه نیستند. این وضعیت می‌تواند به عوامل مختلفی از جمله ضعف در اجرای مقررات، عدم آگاهی درباره خطرات بالقوه این آنتی‌بیوتیک در تولید غذا، و همچنین در دسترس بودن و قیمت مناسب آن نسبت داده شود. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در تخم‌مرغ‌های جمع‌آوری شده از مراکز خرید سطح استان گیلان طراحی شده است و می‌تواند به درک بهتری از وضعیت آلودگی و تأثیرات آن بر سلامت عمومی کمک کند. یافته‌های این تحقیق می‌تواند به تدوین راهکارهای مؤثر برای کنترل و پیشگیری از استفاده غیر مجاز از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خصوص فورازولیدون کمک نماید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: به‌منظور انجام پژوهش حاضر، از مهر ماه تا دی ۱۳۹۶، تعداد ۶۴۶ عدد تخم‌مرغ تجاری از ۳۷ برند در سه مرحله از فروشگاه‌های مختلف سطح استان گیلان به‌صورت تصادفی خریداری و سپس به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان منتقل شد. در مرحله بعد با استفاده از سمپلر از زرده تخم‌مرغ‌ها نمونه‌برداری و به میکروتیوب منتقل و در یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت نمونه‌های زرده طبق دستورالعمل کیت تشخیص باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ بر پایه سیستم الایزا RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) Art. No. R3703 محصول شرکت Biopharm کشور آلمان آماده شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها: ابتدا ۱۰ میلی‌مولار از محلول ۲- نیتروبنزالدهید در دی‌متیل سولفوکسید تهیه شد. نمونه‌ها همگن شده و سپس یک گرم از نمونه همگن شده در داخل لوله آزمایش با ۳/۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول یک مولار HCl و ۲۰۰ میکرولیتر

محلول ۱۰میلی‌مولار ۲- نیترو بنزالدهید (در دی‌متیل سولفوکسید) با تکان‌دادن شدید مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، و ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ مولار K2HPO4، ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول یک مولار NaOH و ۵ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه کرده و به مدت ۳۰ ثانیه به‌شدت تکان داده شدند و در دور ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از لایه اتیل استات (لایه بالایی) به یک ویال جدید منتقل شد و در دمای ۶۰ سانتی‌گراد تا خشک شدن تبخیرگردید. باقی‌مانده در ۱ میلی‌لیتر محلول ان- هگزان حل و با یک میلی‌لیتر بافر (PBS-Tween) مخلوط و در دور ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت لایه زیرین به ویال جدید منتقل شد.

آزمایش الایزا: ۵۰ میکرولیتر از استانداردها و نمونه‌های آماده شده به داخل چاهک‌ها ریخته شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه، به تمام چاهک‌ها اضافه شد. در ادامه ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی به کف هر چاهک اضافه و پلیت به آرامی تکان داده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. پس از انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها خالی و برای اطمینان از حذف کامل مایع، نگهدارنده چاهک‌ها وارونه و روی کاغذ جذب قرار داده شد، سپس به تمام چاهک‌ها ۲۵۰ میکرولیتر از بافر شستشو اضافه و این عمل دو بار دیگر تکرار گردید. بعد از شستشوی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا/ محلول رنگ‌زا به هر چاهک اضافه و با تکان‌دادن دستی صفحه به آرامی مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به هر چاهک اضافه و با تکان‌دادن دستی صفحه به آرامی مخلوط و جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه قرائت‌گر الایزا خوانده شد و اطلاعات مربوط به میزان جذب هر چاهک به تفکیک مشخص گردید. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS۲۵ ، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی (Tukey) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

نتایج

در میان ۶۴۶ نمونه تخم‌مرغ جمع‌آوری شده از ۳۷ برند مختلف، تعداد ۴۱۲ نمونه (با نسبت ۶۳/۸ درصد) دارای غلظت قابل تشخیص آنتی‌بیوتیک فورازولیدون بودند در حالی که ۲۳۴ (با نسبت ۳۶/۲ درصد) نمونه تخم‌مرغ دیگر فاقد باقی‌مانده فورازولیدون بودند. نتایج بررسی باقی‌مانده فورازولیدون در نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در کل نمونه‌ها برابر با ۱۱۹/۰۴ نانوگرم بر کیلوگرم و کمترین و بیشترین مقادیر شناسایی شده به‌ترتیب ۳۹/۰۶و ۷۴۹/۱ نانوگرم بر کیلوگرم بود. مطابق جدول ۱ بالاترین میانگین (۴۴۱/۱) مربوط به برند ۱۶ و کمترین میانگین مربوط به برندهای ۳۱ (۳/۴۶۴) و ۳۳ (۲/۲۴۴) می‌باشد. همچنین بالاترین مقدار باقیمانده فورازولیدون شناسایی شده نیز مربوط به برند ۱۶ (۷۴۹/۱ نانوگرم بر کیلوگرم) و برند ۱ (۷۴۲/۵ نانوگرم بر کیلوگرم) بود. در این مطالعه، علاوه بر تحلیل میانگین و انحراف معیار، فاصله بین چارکی برای بررسی پراکندگی غلظت فورازولیدون در میان نمونه‌های هر برند محاسبه شد. طبق جدول ۱ برند ۱۶ بالاترین میزان فاصله بین چارکی را نشان داد که نشان‌دهنده تنوع زیاد در میزان غلظت فورازولیدون میان نمونه‌های این برند بود. جهت بررسی تأثیر برندهای مختلف بر پارامتر غلظت از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. میزان p=0.00000 در این جدول بیانگر تأثیر معنی‌دار گروه‌های برند بر میزان پارامتر غلظت است (جدول ۲). به عبارت دیگر، غلظت باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدن در بین برندهای مختلف به‌طور قابل توجهی متفاوت بود و برخی از برندها مقادیر بیشتری از باقیمانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون را در مقایسه با سایر برندها نشان داده‌اند. برای بررسی دقیق‌تر تفاوت‌های غلظت فورازولیدون میان برندهای مختلف از آزمون توکی استفاده شد. طبق این آزمون برند ۱۶ به‌طور معناداری

غلظت بالاتری نسبت به اکثر برندها داشت. به‌عنوان مثال، اختلاف میانگین غلظت فورازولیدون میان برند ۱۶ و برند ۱ برابر با ۲۸۳/۲۱ و میزان p=0.00000 محاسبه شد. هنچنین میزان P در مقایسه برند ۱۶ با سایر برندها نیز کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در میانگین غلظت فورازولیدون میان برند ۱۶ و دیگر برندها است.

جدول ۱- پایین‌ترین مقدار، بالاترین مقدار، تعداد و درصد، میانه و میانگین غلظت فورازولیدون در نمونه‌های تخم‌مرغ

نام	تعداد نمونه‌ها	تعداد و درصد نمونه‌های دارای باقی‌مانده	پایین‌ترین مقدار (نانوگرم بر کیلوگرم)	بالاترین مقدار (نانوگرم بر کیلوگرم)	میانگین	انحراف معیار	**میانه**	فاصله بین چارکی
برند ۱	۱۹	۱۷(۸۹/۵)	۰	۷۴۲/۵	۱۶۰/۹	۱۵۰/۸	۱۴۹/۹	۴/۸
برند ۲	۲۰	۱۶(۸۰)	۰	۶۰۰/۲	۱۲۴/۳	۱۲۷/۴	۱۲۲/۵	۶۸/۲۷
برند ۳	۱۹	۱۸(۹۴/۷)	۰	۳۸۸/۷	۱۸۲/۸	۹۱/۳۴	۱۹۳/۷	۶۱/۴
برند ۴	۱۸	۱۸(۱۰۰)	۴۵/۲	۲۷۳/۳	۷۷/۷۲	۵۹/۰۱	۴۶/۲۳	۴۶/۴۲
برند ۵	۲۰	۲۰(۱۰۰)	۶۱/۰۶	۲۰۳/۷	۱۳۲/۲	۳۳/۶	۱۴۳/۸	۳۴/۷
برند ۶	۱۸	۳ (۱۶/۷)	۰	۲۵۷/۲	۲۶/۷۳	۶۸/۲۳	۰	۰
برند ۷	۱۸	۱۷(۹۴/۴)	۰	۵۴۳/۸	۲۲۹/۸	۱۳۸/۵	۱۷۵/۹	۱۳۵/۲
برند ۸	۲۰	۱۶(۸۰/۰)	۰	۲۵۰/۶	۷۹/۵	۵۹/۹۶	۸۷/۳	۳۲/۲۴
برند ۹	۸	۸(۱۰۰)	۱۲۸/۹	۳۷۴/۳	۲۵۹/۴	۷۷/۵۶	۲۷۰	۱۱۰/۳
برند ۱۰	۲۰	۲۰(۱۰۰)	۶۱/۶	۲۶۳/۴	۱۴۵	۵۳/۶۹	۱۱۷/۳	۴۷/۳
برند ۱۱	۱۶	۱۶ (۱۰۰)	۵۰/۱۴	۳۶۶/۵	۱۹۱/۲	۸۷/۵۲	۱۵۰/۶	۱۳۷/۶
برند ۱۲	۱۸	۲(۱۱/۱)	۰	۱۰۵/۵	۹/۸۱۸	۲۹/۱۷	۰	۰
برند ۱۳	۲۰	۱۴(۷۰/۰)	۰	۴۶۵/۸	۲۷۷/۴	۲۱۰	۳۷۶/۹	۴۶۵/۸
برند ۱۴	۱۲	۶(۵۰/۰)	۰	۲۹۵/۲	۱۰۵/۷	۱۲۴/۸	۲۷/۹۸	۲۳۰/۵
برند ۱۵	۲۱	۱۹(۹۰/۵)	۰	۳۸۵/۵	۱۲۴/۲	۱۰۶/۲	۷۸/۸۸	۵۵/۲۲
برند ۱۶	۱۸	۱۷(۹۴/۴)	۰	۷۴۹/۱	۴۴۴/۱	۲۸۸/۲	۳۸۵/۲	۵۸۰/۲
برند ۱۷	۹	۶(۶۶/۷)	۰	۳۴۱/۷	۱۷۶/۲	۱۴۰/۱	۲۱۹/۳	۲۹۹
برند ۱۸	۲۱	۱۸(۸۵/۷)	۰	۲۰۷/۷	۹۷/۳۶	۵۱/۴۳	۱۱۷/۹	۵۱/۷
برند ۱۹	۱۶	۱۵(۹۳/۸)	۰	۳۵۱/۹	۱۹۰/۳	۸۴/۴۹	۱۷۹/۹	۱۱۲/۲
برند۲۰	۱۹	۱۶(۸۴/۲)	۰	۶۵۶/۴	۱۵۸/۲	۱۳۷/۶	۱۵۶/۹	۱۶/۳
برند ۲۱	۱۶	۹(۵۶/۳)	۰	۲۵۷/۷	۷۲/۶۹	۸۱/۵۶	۸۸/۷۸	۱۰۵/۸
برند ۲۲	۱۹	۱۲(۶۳/۲)	۰	۲۷۰/۳	۱۴۵/۵	۱۲۸/۳	۲۱۷/۹	۲۷۰/۳
برند ۲۳	۱۸	۱۵(۸۳/۳)	۰	۲۴۷/۹	۱۶۳/۳	۸۷/۱۳	۲۱۷/۹	۱۱۰/۱
برند ۲۴	۱۹	۱۳(۶۸/۴)	۰	۷۰۴/۵	۲۶۹/۴	۲۴۸/۸	۱۷۱/۱	۴۹۱/۳
برند ۲۵	۱۷	۳(۱۷/۶)	۰	۳۵۷/۳	۵۶/۱۳	۱۲۶/۳	۰	۰
برند ۲۶	۱۵	۱۰(۶۶/۷)	۰	۴۷۸/۷	۱۵۶/۹	۱۳۹/۷	۲۰۵/۹	۲۲۵/۱
برند ۲۷	۱۸	۱۱(۶۱/۱)	۰	۲۵۴/۴	۵۴/۹۸	۶۱/۹۶	۷۱/۷۲	۷۷/۷۴
برند ۲۸	۱۸	۱۴(۷۷/۸)	۰	۲۴۳/۷	۹۴/۰۲	۶۶/۴۵	۱۲۴/۹	۱۰۳
برند ۲۹	۱۱	۶(۵۴/۵)	۰	۳۲۰/۵	۸۷/۹۸	۱۰۱/۶	۱۱۱/۲	۱۵۲/۵
برند ۳۰	۲۰	۱۲(۶۰/۰)	۰	۱۰۳/۳	۵۷/۹۲	۵۰/۱۴	۸۸/۹۶	۱۰۳/۳
برند ۳۱	۲۰	۱(۵/۰)	۰	۶۹/۲۹	۳/۴۶۴	۱۵/۴۹	۰	۰
برند ۳۲	۱۹	۴(۲۱/۱)	۰	۱۹۹/۳	۲۵/۲۱	۵۹/۲۱	۰	۰
برند ۳۳	۱۹	۱(۵/۳)	۰	۴۲/۶۳	۲/۲۴۴	۹/۷۸	۰	۰
برند ۳۴	۲۰	۳(۱۵/۰)	۰	۱۱۱/۵	۱۰/۳۴	۲۷/۹۴	۰	۰
برند ۳۵	۱۷	۱۴(۸۲/۴)	۰	۱۸۳/۶	۶۸/۰۶	۵۰/۵۴	۵۸/۰۹	۲۶/۰۶
برند ۳۶	۱۴	۱(۷/۱)	۰	۸۹/۶۷	۶/۴۰۵	۲۳/۹۶	۰	۰
برند ۳۷	۱۶	۱(۶/۳)	۰	۱۷۹/۹	۱۱/۲۴	۴۴/۹۷	۰	۰

جدول ۲- آنالیز آماری تاثیر گروه‌های برند بر میزان پارامتر غلظت

پارامتر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	آزمون فیشر	P
غلظت	۳۶	۵۶۸۵۴۴۴	۱۵۷۹۲۹/۰	۱۲/۶۹۶۲	...../.
باقیمانده ها	۶۰۹	۷۵۷۵۳۹۷	۱۲۴۳۹/۱		
کل	۶۴۵	۱۳۲۶۰۸۴۰	۱۷۰۳۶۸/۱		

در جدول۲ میزان p=0.00000 در ردیف اول بیانگر تاثیر معنی‌دار گروه‌های برن بر روی میزان پارامتر غلظت بود.

بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌بیوتیک‌ها دستهٔ بسیار مهمی از داروها هستند، زیرا آنها یک جزء کلیدی در استراتژی مورد استفاده در کنترل عفونت‌های باکتریایی در انسان و حیوان می‌باشند. بنابراین مهم است که استفاده از آنها در غذای حیوانات با نهایت دقت انجام شود. آنتی‌بیوتیک‌ها باید در دوزهای توصیه شده و با نظارت مناسب داده شوند و پس از مصرف درمانی در تمام دام‌های کشتار شده دوره نگهداری کافی رعایت شود (۱۷). گوشت، مرغ و تخم‌مرغ از مواد غذایی مهم برای تأمین نیازهای غذایی جمعیت انسان در حال رشد هستند. استفاده کنترل نشده و نامحدود از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است منجر به تجمع باقی‌مانده‌های نامطلوب در بافت‌های حیوانی و محصولات آنها شود (۳).

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده استفاده وسیع از فورازولیدون در صنعت پرورش طیور در ایران است. در این مطالعه درصد تخم‌مرغ‌های آلوده به آنتی‌بیوتیک فورازولیدون ۶۳/۸ درصد بود و در تمام برندها، باقیمانده فورازولیدون با غلظت‌های متفاوت شناسایی شد. طبق نتایج این مطالعه در بیست و هشت برند تعداد تخم‌مرغ‌های آلوده بیش از پنجاه درصد و در ده برند بیش از نود درصد نمونه‌ها به فورازولیدون آلوده بودند. همچنین طبق نتایج، باقیمانده فورازولیدون در تمام تخم‌مرغ‌ها در پنج برند مشاهده شده است. با توجه به ممنوعیت نیتروفوران‌ها برای حیوانات خوراکی در ایران، تمامی تخم‌مرغ‌های مثبت در این مطالعه (۶۳/۸ درصد) می‌تواند غیر قابل قبول باشد. این میزان آلودگی نه‌تنها سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید می‌کند، بلکه می‌تواند به کاهش اعتماد عمومی به محصولات طیوری منجر شود. علاوه بر این، عدم رعایت استانداردهای ایمنی غذایی ممکن است به بروز مشکلات بهداشتی و افزایش هزینه‌های درمانی در آینده منجر گردد. در این مطالعه طبق نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌داری در غلظت باقی‌مانده‌های فورازولیدون در برندهای مختلف مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده این است که اختلاف غلظت باقی‌مانده فورازولیدون در برندهای مختلف تصادفی نیست و شیوه‌های مختلف تولید و عواملی مانند دوز، زمان و مدت زمان تجویز آنتی‌بیوتیک و همچنین اقدامات کنترل کیفیت به‌کار گرفته شده توسط هر برند نقش مهمی در میزان آلودگی تخم‌مرغ به آنتی‌بیوتیک ایفا می‌کنند.

استفاده از تکنیک‌های مختلف آزمایشگاهی، مانند HPLC و ELISA، می‌تواند منجر به تفاوت‌های معناداری در شناسایی و اندازه‌گیری باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیک‌ها شود، زیرا هر یک از این روش‌ها ویژگی‌ها و حساسیت‌های خاص خود را دارند. در حالی که HPLC با دقت بالا و توانایی شناسایی ترکیبات پیچیده در سطوح کم معروف است، ELISA به خاطر سادگی و سرعت در پردازش نمونه‌ها و قابلیت شناسایی خاص ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین، انتخاب مناسب‌ترین روش بستگی به نوع ماده مورد آزمایش، نیاز به دقت و سرعت در نتایج و هزینه‌های مرتبط با هر تکنیک دارد. با بررسی نتایج پژوهش‌های داخل و خارج از ایران، می‌توان الگوهای مشخصی را در استفاده از فورازولیدون شناسایی نمود که درک بهتری از وضعیت کنونی و چالش‌های پیش رو را فراهم می‌آورد. این بینش می‌تواند به سیاست‌گذاران کمک کند تا تصمیمات بهتری در راستای کنترل این آلودگی اتخاذ نمایند. در تحقیقی که توسط امیری و همکاران (۲۰۱۴) در ایران به‌منظور بررسی متابولیت فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ به روش الایزا انجام شد، درصد تخم‌مرغ‌های آلوده در تخم‌مرغ‌های مارک‌دار ۷۱ و در تخم‌مرغ‌های بدون مارک ۶۲ درصد گزارش شد و میانگین غلظت AOZ در نمونه‌های مارک، بدون مارک و در کل نمونه‌ها به‌ترتیب ۲۵۲/۹، ۲۸۳/۷ و ۲۶۸/۲۵ نانوگرم در کیلوگرم گزارش شد که که بالاتر از سطح به‌دست‌آمده در مطالعه ما است (۱۱). در تحقیقی مشابه توسط فضل آرا و همکاران در سال ۲۰۱۴ در اهواز، باقیمانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در جوجه‌های گوشتی به روش HPLC در کشتارگاهی در اهواز بررسی شد. میانگین مقدار فورازولیدون در مخلوط عضلات سینه و

ران ۱/۳۷ ± ۲۸/۱۵ میکروگرم در هر کیلوگرم تعیین گردید که ۳۹ درصد از نمونه‌ها از نظر وجود داروی فورازولیدون مثبت بودند، میانگین غلظت به‌دست‌آمده در این مطالعه بیشتر از مقدار مطالعه حاضر است اما درصد نمونه‌های آلوده پایین‌تر از مطالعه حاضر می‌باشد، با وجود پایین‌تر بودن درصد نمونه‌های آلوده، این مطالعه نیز تأییدکننده استفاده غیر مجاز از آنتی‌بیوتیک فورازولیدون می‌باشد (۱۵). علوی و همکاران در سال ۲۰۰۰ میزان فورازولیدون و فورالتادون را در تخم‌مرغ و بافت‌های طیور به روش HPLC اندازه‌گیری نمودند که حداقل غلظت شناسایی شده برای فورازولیدون یک نانوگرم در هر گرم بود که پایین‌تر از حداقل غلظت شناسایی شده در این مطالعه می‌باشد (۱۴). در حالی که نتایج مطالعات انجام شده در ایران نشان‌دهنده استفاده غیر مجاز از آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفوران در دامپزشکی است، تحقیقات انجام‌شده در کشورهای دیگر، حاکی از موفقیت در کاهش یا حذف این آنتی‌بیوتیک‌ها از مواد غذایی با منشاء حیوانی است. در مطالعه رادوونیکوویچ و همکاران (۲۰۱۳) طی تجزیه و تحلیل نمونه‌های تخم‌مرغ (n = ۵۲) با استفاده از UHPLC-MS/MS برای متابولیت‌های AOZ، AMOZ، AHD و SEM، هیچ‌یک از متابولیت‌ها در نمونه‌ها شناسایی نشد (۱۸). بوک و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش LC-MS/MS مطالعه‌ای در مورد باقیمانده‌های فورازولیدون در تخم‌مرغ‌های مصرف‌شده در برلین انجام دادند. میانگین باقیمانده متابولیت AOZ ۳۰ نانوگرم بر کیلوگرم (ppt) بود که پایین‌تر از میانگین غلظت فورازولیدون در مطالعه حاضر می‌باشد (۱۹). تیواری و همکاران در سال ۲۰۰۸ مقدار باقیمانده فورازولیدون در مرغ گوشتی را به‌وسیله آزمون میکروبی بررسی کرده و مقدار آن را در کلیه، کبد و سرم به‌ترتیب ۲۷۰ و ۱۶۰ نانوگرم در هر گرم و ۸۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۰). در مطالعه یبار و همکاران (۲۰۱۲) بر روی نمونه‌های جگر مرغ (۹۰ نمونه) جمع‌آوری‌شده از سوپرمارکت و فروشگاه‌های خرده‌فروشی محلی در ترکیه به‌منظور بررسی متابولیت AOZ با استفاده از یک کیت تجاری الایزا، تعداد نمونه‌های آلوده ۱۱ نمونه (۱۲ درصد) با غلظت میان ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش داده شد (۲۱). عوامل متعددی ممکن است تفاوت مشاهده شده میان نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه را توضیح دهند، از جمله این عوامل می‌توان به شرایط آب و هوایی و جغرافیایی مناطق مختلف، عدم رعایت مدت زمان انتظار، فصول مختلف جمع‌آوری نمونه‌ها، روش‌های متفاوت در تجویز دارو، روش نمونه‌گیری، نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها و روش‌های متفاوت در شناسایی دارو باشد. علاوه بر این، شیوع بالای مقدار باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در این مطالعه ممکن است ناشی از عدم وجود نظارت مؤثر بر کنترل مصرف این دارو در صنعت پرورش طیور در ایران، فراوانی و دسترسی آسان و بدون نیاز به نسخه برای این دارو باشد. عدم آلودگی یا پایین‌تر بودن تعداد نمونه‌های آلوده در تحقیقات خارج از ایران می‌تواند نشان‌دهنده قوانین سختگیرانه و نظارت مؤثر بر عدم مصرف آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در صنعت پرورش طیور در این کشورها باشد. در کشورهای عضو اتحادیه اروپا، کنترل باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی با منشأ حیوانی به‌وسیله قوانین و مقررات دقیق سازمان دارویی اروپا (EMA) انجام می‌شود. این سازمان آنتی‌بیوتیک‌ها را به چهار دسته A، B، C و D تقسیم‌بندی می‌کند که دسته A شامل آنتی‌بیوتیک‌هایی است که برای استفاده در حیوانات تولیدکننده مواد غذایی ممنوع هستند. همچنین، تجویز مواد ضد میکروبی تنها در موارد ضروری و بر اساس آزمایش حساسیت مجاز است و استفاده از این داروها برای افزایش رشد یا تولید ممنوع می‌باشد. پروژه نظارت بر فروش و مصرف آنتی‌بیوتیک‌های دامپزشکی (ESVAC) نیز به شناسایی خطرات مرتبط با مقاومت آنتی‌میکروبی کمک می‌کند (۲۲). این رویکردها می‌توانند به‌عنوان مرجع و الگویی برای بهبود مدیریت آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران مورد توجه قرار گیرند. همچنین برقراری یک سیستم نظارتی مؤثر و

آموزش به دامپروران درباره خطرات مصرف غیر مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها و روش‌های جایگزین، نظارت دقیق‌تر بر تولید و توزیع آنتی‌بیوتیک‌ها، اجرای دوره‌های آموزشی برای دامپزشکان و رعایت زمان انتظار قبل از جمع‌آوری محصولات دامی، توسعه سیستم‌های ردیابی مصرف داروها، و اعمال جریمه‌های سنگین برای متخلفان می‌تواند به کاهش آلودگی کمک کند.

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده وجود متابولیت آنتی‌بیوتیک فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ‌های برند جمع‌آوری‌شده از سوپرمارکت‌های سطح استان گیلان و در نتیجه استفاده غیر مجاز از این آنتی‌بیوتیک در مزارع پرورش طیور در ایران می‌باشد. با توجه به عوارض جانبی سمی، جهش‌زایی یا سرطان‌زایی این آنتی‌بیوتیک بر سلامت انسان، نظارت کارآمد و منظم بر صنعت پرورش طیور به‌منظور جلوگیری از استفاده از آنتی‌بیوتیک فورازولیدون و سایر آنتی‌بیوتیک‌های ممنوع در پرورش طیور و انجام مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

این اثر، بخشی از پایان‌نامه دکتری نویسنده است. نویسندگان از کلیه کارکنان گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان تشکر می‌کنند.

References

1- Lawal JR, Jajere SM, Geidam YA, Bello AM, Wakil Y, Mustapha M. Antibiotic residues in edible poultry tissues and products in Nigeria: A potential public health hazard. *J Anim Vet Adv*. 2015; 7(3): 55-61.

2- Mund MD, Khan UH, Tahir U, Mustafa BE, Fayyaz A. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *Int J Food Prop*. 2017; 20(7): 1433-1446.

3- Islam A, Saifuddin A, Al Faruq A, Islam S, Shano S, Alam M, *et al.* Antimicrobial residues in tissues and eggs of laying hens at Chittagong, Bangladesh. *Int J One Health*. 2016; 2(2): 75-80.

4- Rana A, Rana AYKM, Prince MMB, Chakma D, Islam H, Nabi M, Saifullah A. Validation of a commercial ELISA kit for screening 3-amino-2-oxazolidinone, a furazolidone antibiotic residue in shrimp. *Annu Res Rev Biol*. 2020; 34(2): 1-10.

5- Nehru R, Chen CW, Dong CD. Recent advances in electrochemical detection of furazolidone: *A review. Microchem J*. 2024; 109901.

6- Vass MK. Hruska M. Franek, Nitrofuran antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. *Vet Med*. 2008; 53(9): 469.

7- Zhou Q, Gao Y, Tang M, Zhang J, Zhang X, Gu R, *et al.* Progress on determination methods of nitrofuran metabolites in foods. *J Food Saf Qual*. 2016; 7(8): 3285-3290.

8- Zhang Z, Wu Y, Li X, Wang Y, Li H, Fu Q, *et al.* Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2017; 217: 182-190.

9- Franek M, Diblikova I, Vass M, Kotkova L, Stastny K, Frgalova K, *et al.* Validation of a monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of the furazolidone metabolite (AOZ) in eggs using various sample preparation. *Vet Med (Praha)*. 2006; 51(5): 248.

10- Li J, JX, Liu JP. Wang. Multidetermination of four nitrofurans in animal feeds by a sensitive and simple enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(6): 2181-2185.

11- Amiri HM, Tavakoli H, Hashemi G, Mousavi T, Rostami H, Fesharaki MG, *et al.* The occurrence of residues of furazolidone metabolite, 3-Amino-2-Oxazolidone, in eggs distributed in Mazandaran province, Iran. *Scimetr*. 2014; 2(4). [In Persian]

12- Keutchatang FDPT, Kamgain ADT, Isabelle S, Nama GM, Kansci G. Practices of Usage of Antibiotics in Chicken Farming and Impact of Some of their Residues in Products Consumed in Yaoundé, Cameroon. Adv Nutr Food Sci. 2019;4(3):1-7. doi: 10.33140/ANFS.

13- Widiastuti R. Detection of nitrofurans residue in broiler chicken meat analysed by HPLC. *J Ilmu Ternak dan Vet*. 2012; 17(4): 284-289.

14- Alawi M. Analysis of furazolidone and furaltadone in chicken tissues and eggs using a modified HPLC/ELCD method. Fresenius Environ. *Bull*. 2000; 9(7/8): 508-514.

15- Fazlara A, Mayahi M, Najafzadeh Varzi H, Gudarznia F, Mohammadyari S. Determination the Amount of Illegal Furazolidone Residues in Broilers in Ahvaz Abattoir by HPLC Method. *Armaghane Danesh*. 2014; 19(3): 252-264. [In Persian]

16- Cooper KM, Kennedy DG. Stability studies of the metabolites of nitrofuran antibiotics during storage and cooking. *Food Addit Contam*. 2007; 24(9): 935-42.

17- Ngangom BL, S.S.A. Tamunjoh, F.F. Boyom. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. Acta Ecol. *Sin*. 2019; 39(5): 411-415.

18- Radovnikovic A, Conroy ER, Gibney M, O'Mahony J, Danaher M. Residue analyses and exposure assessment of the Irish population to nitrofuran metabolites from different food commodities in 2009–2010. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2013; 30(11): 1858-1869.

19- Bock C, Stachel C, Gowik P. Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with the software InterVal. *Anal Chim Acta*. 2007; 586(1-2): 348-358.

20- Tiwari H, Tiwari JG. Studies on the residues of terramycin and furazolidone in broiler meat-A public health concern. *Indian J Public Health*. 2008; 52(1): 33.

21- Yibar A, Cetinkaya F, Soyutemiz G. Nitrofuran metabolite 3-amino-2-oxazolidinone residues in chicken liver: A screening study. *Asian J Anim Vet Adv*. 2012; 7: 346-350.

22- Schmerold I, van Geijlswijk I, Gehring R. European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. *Eur J Pharm Sci*. 2023; 189: 106473.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 46-55

Assessing Furazolidone Antibiotic Residue in commercial eggs by ELISA method

Hadiseh Sanakhan Rezaiyeh[1], Leila Modiri[1*], Arash Chaichi Nosrati[1]

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Receive: August 21, 2024; Revise: November 5, 2024; Accept: November 5, 2024

10.22034/nfvm.2024.474638.1252

Summary

Furazolidone is an antibiotic from the nitrofuran family that has antimicrobial properties against gram-positive and gram-negative bacteria and is commonly used to treat bacterial infections such as enteritis and gastroenteritis. Additionally, this drug is used as a feed additive and growth promoter in the poultry industry. However, due to its toxic side effects and the risk of antibiotic resistance, the use of nitrofurans in poultry farming is prohibited in Iran. Therefore, this study investigates the residual metabolite of furazolidone (AOZ) in branded eggs purchased in Gilan province. In the present study, 646 branded eggs were randomly purchased and collected in three stages from different stores in Gilan province. Samples were tested utilizing RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) Art. No. R3703 kit to examine the antibiotic furazolidone (AOZ) metabolite. The results were analyzed using SPSS software and one-way analysis of variance (ANOVA). Among the 646 egg samples collected, 412 samples (63.8%) were infected with furazolidone antibiotic. The mean concentration of furazolidone antibiotic residue was 119.04 ng/kg, and the lowest and highest values detected were 39.06 ng/kg and 749.1 ng/kg, respectively. The results indicate the presence of furazolidone antibiotic residues in egg samples. Therefore, it seems necessary to monitor the poultry breeding industry regularly due to the dangers of antibiotic residues in eggs and the prohibition of applying furazolidone.

Keywords: *Antibiotic residue, furazolidone, AOZ, ELISA, egg*

نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ٥٦- ٦٣

ارزیابی شیوع، ریسک فاکتورها و حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در بره‌های نوزاد مبتلا به اسهال در استان قزوین

وحید خدابنده لو[۱]، وحید نجارنژاد[۲*]، عبدالغفار اونق[۳]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیماری‌های درونی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- دانشیار، گروه بیماری‌های درونی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

دریافت مقاله: ۲۸ تیر ۱۴۰۳، بازنگری: ۸ مرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۷ شهریور ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.468496.1248

چکیده

اسهال ناشی از *اشریشیاکلی* در بره‌های نوزاد یکی از مهم‌ترین مشکلات صنعت گوسفندداری کشور بوده که با ضررهای اقتصادی فراوان ناشی از هزینه‌های درمان، کاهش رشد، و مرگ و میر بره‌های مبتلا همراه می‌باشد. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های دامی، منجر به بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع *اشریشیاکلی* در بره‌های نوزاد اسهالی زیر ۱۰ روز در استان قزوین، تعیین ریسک فاکتورهای اسهال ناشی از *اشریشیاکلی* در بره‌های نوزاد و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی*‌های جداشده از بره‌های اسهالی زیر ۱۰ روز صورت گرفت. ۲۰۰ نمونه سواب رکتوم از بره‌های نوزاد مبتلا به اسهال از نقاط مختلف استان قزوین تهیه گردید و از لحاظ آلودگی به *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات مربوط به جنس، نژاد، منبع آب مورد استفاده گله و وضعیت تولد بره‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* نیز به روش انتشار دیسک ارزیابی شد. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۸۴ مورد به *اشریشیاکلی* آلوده بود. میزان آلودگی بره‌های نوزاد اسهالی متولد شده در گله‌هایی که از آب چاه استفاده می‌کردند و یا طی سخت‌زایی به دنیا آمده بودند بیشتر بود. نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که جدایه‌های *اشریشیاکلی* نسبت به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین کاملاً مقاوم بودند. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها می‌تواند در بروز این مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نقش داشته باشد. افزایش سطح بهداشت محیط نگهداری بره‌ها، دریافت مقدار کافی و به موقع آغوز غنی از ایمونوگلوبولین و انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر با دوز صحیح می‌تواند در کنترل اسهال ناشی از *اشریشیاکلی* در بره‌های نوزاد مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: *اسهال، اشرشیاکلی، بره نوزاد، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: v.najarnezhad@urmia.ac.ir

مقدمه

اسهال نوزادان نشخوارکننده یکی از مهمترین مشکلات صنعت دامپروری کشور است. این بیماری با ضررهای اقتصادی فراوان ناشی از هزینههای درمان، کاهش رشد، و مرگ و میر مبتلایان همراه است (۱). عوامل عفونی (باکتریایی، ویروسی، انگلی) و همچنین عوامل غیر عفونی مختلفی در ایجاد اسهال نوزادان نقش دارند. از مهمترین عوامل عفونی باکتریایی که به‌طور ویژه‌ای در بره‌های نوزاد زیر ۱۰ روز باعث اسهال می‌شود می‌توان به *اشرشیاکلی* اشاره کرد (۲). *اشرشیاکلی* به‌وفور در محیط وجود دارد و نوزادان تازه متولد شده طی ۱۰ روز اول بعد از تولد، به‌ویژه نوزادانی که آغوز باکیفیت را در زمان مناسب و به میزان کافی دریافت نکرده‌اند نسبت به آن بسیار حساس می‌باشند. سلول‌های روده‌ای (انتروسیت) نوزادان در بدو تولد دارای گیرنده‌های اختصاصی برای *اشرشیاکلی* هستند. این وضعیت باعث می‌شود تا *اشرشیاکلی* در اوایل بعد از تولد به این سلول‌ها متصل شده و باعث بیماری‌زایی گردد. وقتی نوزاد بلافاصله بعد از تولد، آغوز با کیفیت را به میزان کافی دریافت می‌کند، ایمونوگلبولین‌های موجود در آغوز گیرنده‌های اختصاصی *اشرشیاکلی* را مسدود کرده و مانع از اتصال این باکتری به سلول‌های روده‌ای و بیماری‌زایی آن می‌شود. از طرف دیگر، با گذشت زمان (حداکثر ۱۰ روز بعد از تولد) انتروسیت‌های جدید که فاقد گیرنده‌های مذکور هستند جایگزین سلول‌های اولیه در روده می‌شوند. این وضعیت باعث عدم امکان اتصال و بیماری‌زایی توسط *اشرشیاکلی* در نوزادان با سن بالای ۱۰ روز خواهد شد (۱، ۳).

مصرف بی‌رویهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های دامی، منجر به بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شود. افزایش سویه‌های مقاوم *اشرشیاکلی* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به‌عنوان یک مشکل عمده جهانی در درمان اسهال نوزادان و بهداشت عمومی مطرح است (۴، ۵).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر اطلاعات ارزشمندی درباره فراوانی و حساسیت آنتی‌بیوتیکی *اشرشیاکلی* در بره‌های نوزاد مبتلا به اسهال در استان قزوین ارائه خواهد داد که می‌تواند در کنترل بیماری مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در زمستان ۱۴۰۲ و بهار ۱۴۰۳ انجام شد. در این مطالعه تعداد ۲۰۰ نمونه سواب از ناحیه رکتوم بره‌های نوزاد ۱۰-۱ روزه مبتلا به اسهال از گوسفندداری‌های استان قزوین جمع‌آوری گردید. حیوانات مبتلا به‌صورت بالینی از نظر وضعیت عمومی حیوان، دمای رکتوم، تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و رنگ مخاطات با دقت مورد بررسی قرار گرفته و اطلاعات مرتبط با جنس، نژاد، منبع آب مورد استفاده و وضعیت تولد (طبیعی یا سخت‌زایی) در فرم‌های مخصوص ثبت شد. نمونه‌های مدفوع در لوله‌های حاوی nutrient broth (شرکت مرک، آلمان) جمع‌آوری و به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. سپس، بلافاصله در محیط مک‌کانکی آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت خطی شدند (۶). از تست‌های موفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی TSI، SIM، MR، VP، سیمون سیترات، فنیل‌آلانین، لیزین و اوره به‌منظور شناسایی و جداسازی باکتری *اشرشیاکلی* از سایر باکتری‌های موجود در نمونه استفاده گردید (۷).

آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش کربی- بوئر در محیط مولرهینتون آگار (شرکت مرک، آلمان) انجام شد. دیسک‌های مورد استفاده همگی از شرکت پادتن طب، ایران تهیه شدند و عبارت بودند از: جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، نئومایسین (۳۰ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کولیستین (۱۰ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، فلومکوئین (۳۰ میکروگرم)، فسفومایسین (۲۰۰ میکروگرم)، تریمتوپریم-

سولفامتوکسازول (۲۵-۲۳ میکروگرم). نتایج آنتی‌بیوگرام بر اساس جدول NCCL در سه مرتبه حساس، حساسیت متوسط و مقاوم مورد ارزیابی قرار گرفتند (۸). کنترل مثبت، یک سویه استاندارد *اشرشیاکلی* از کلکسیون باکتری‌های گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه استفاده شد (PTCC:1533).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵.۰ (25,0 Statistics IBM SPSS Inc., Chicago, IL) و تست آماری مربع کای صورت گرفت و P<0.05 به‌عنوان حد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در معاینه بالینی بره‌های نوزاد اسهالی، نشانه‌های بی‌حالی، ضعف، کم‌آبی خفیف بدن، اسهال آبکی، افزایش تعداد ضربان قلب، افزایش تعداد تنفس و افزایش خفیف دمای رکتوم مشاهده شد.

از ۲۰۰ راس بره نوزاد اسهالی مورد بررسی بر اساس نتایج آزمایشگاهی (نوع کلنی، رنگ‌آمیزی و تست‌های بیوشیمیایی) ۸۴ مورد (۴۲ درصد) مبتلا به *اشرشیاکلی* بودند. نتایج مربوط به میزان ابتلا به *اشرشیاکلی* در بره‌های نوزاد اسهالی به تفکیک جنس، نژاد، منبع آب مورد استفاده و وضعیت تولد (طبیعی یا سخت‌زایی) در جدول ۱ بیان گردیده است. بررسی آماری داده‌ها نشان داد که میزان ابتلا به *اشرشیاکلی* در بره‌های نوزاد اسهالی در بین دو جنس نر و ماده و سه نژاد شال، قزل و افشار تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (*P>0.05*). ارزیابی آماری اطلاعات نشان داد که میزان ابتلا به *اشرشیاکلی* در بره‌های اسهالی که طی سخت‌زایی متولد شده بودند به‌صورت معنی‌داری بیشتر از بره‌های اسهالی بود که به‌صورت طبیعی به دنیا آمده بودند (*P<0.05*). مقایسه منبع آب گله‌ها نیز مشخص نمود که میزان ابتلاء بره‌های مبتلا به *اشرشیاکلی* که گله آنها از آب چاه استفاده می‌کردند به‌صورت معنی‌داری بیشتر از بره‌هایی بود که گله آنها از آب لوله‌کشی استفاده می‌کردند (*P<0.05*).

جدول ۱- تعداد بره‌های نوزاد اسهالی، تعداد مبتلا و درصد ابتلا به *اشرشیاکلی* در بره‌های نوزاد اسهالی به تفکیک جنس، نژاد، منبع آب مورد استفاده در گله و وضعیت تولد بره‌ها

ریسک فاکتورها	گروه	تعداد بره‌های نوزاد اسهالی	تعداد مبتلا به *اشرشیاکلی*	درصد ابتلا به *اشرشیاکلی*
جنس	نر	۱۴۰	۵۹	۴۲
	ماده	۶۰	۲۵	۴۱
نژاد	شال	۱۲۰	۵۲	۴۳
	قزل	۴۶	۲۲	۴۷
	افشار	۳۴	۱۰	۲۹
منبع آب	آب لوله کشی	۸۰	۱۹	۲۴[a]
	آب چاه	۱۲۰	۶۵	۵۴[b]
وضعیت تولد	سخت زایی	۲۰	۱۵	۷۵[a]
	طبیعی	۱۸۰	۶۹	۳۸[b]

در ردیف‌های منبع آب و وضعیت تولد، [a] و [b] تفاوت معنی‌دار داشتند (*P<0.05*)

از ۱۴ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی در این تحقیق، بیشترین میزان حساسیت *اشرشیاکلی*‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون (۸۹ درصد)، فوسفومایسین (۸۲ درصد) و جنتامایسین (۷۸ درصد) بود. میزان حساسیت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها عبارت بود از آزیترومایسین ۷۱ درصد، انروفلوکساسین ۶۱ درصد، نئومایسین ۵۴ درصد، تریمتوپریم/ سولفامتوکسازول ۳۹ درصد، فلورفنیکل ۳۳ درصد و

استرپتومایسین ۱۱ درصد. میزان حساسیت *اشرشیاکلی*‌های جدا شده نسبت به اریترومایسین و کولیستین در حد متوسط بود. *اشرشیاکلی*‌های مورد بررسی نسبت به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین کاملاً مقاوم بودند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج آنتی‌بیوگرام *اشرشیاکلی*‌های جدا شده از بره‌های نوزاد اسهالی زیر ۱۰ روز

	تفسیر					
	حساس		متوسط		مقاوم	
آنتی بیوتیک	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
فلومکوئین	۵۱	۶۰,۷۲	۴	۴,۷۶	۲۹	۳۴,۵۲
کولیستین	۲	۲,۳۸	۳۶	۴۲,۸۶	۴۶	۵۴,۷۶
اریترومایسین	۲	۲,۳۸	۴۶	۵۴,۷۶	۳۶	۴۲,۸۶
استرپتومایسین	۹	۱۰,۷۱	۹	۱۰,۷۱	۶۶	۷۸,۵۸
انروفلوکساسین	۵۱	۶۰,۷۲	۹	۱۰,۷۱	۲۴	۲۸,۵۷
نئومایسین	۴۶	۵۴,۷۶	۲۳	۲۷,۳۸	۱۵	۱۷,۸۶
فوسفومایسین	۶۹	۸۲,۱۴	۰	۰	۱۵	۱۷,۸۶
تتراسایکلین	۰	۰	۰	۰	۸۴	۱۰۰
سفتریاکسون	۷۴	۸۸,۱۰	۱۰	۱۱,۹۰	۰	۰
آزیترومایسین	۶۰	۷۱,۴۳	۹	۱۰,۷۱	۱۵	۱۷,۸۶
تریمتوپریم/سولفامتوکسازول	۳۳	۳۹,۲۸	۰	۰	۵۱	۶۰,۷۲
جنتامایسین	۶۵	۷۷,۳۹	۱۰	۱۱,۹۰	۹	۱۰,۷۱
فلورفنیکل	۲۸	۳۳,۳۴	۲۳	۲۷,۳۸	۳۳	۳۹,۲۸
آمپی سیلین	۰	۰	۰	۰	۸۴	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

اسهال عفونی بره‌های نوزاد در سراسر جهان و عمدتاً طی چند هفته اول زندگی رخ می‌دهد و باعث بروز خسارات مالی فراوانی در صنعت دامپروری می‌شود (۱). از مهم‌ترین عوامل عفونی که در بره‌های نوزاد باعث اسهال می‌شود به *اشرشیاکلی* می‌توان اشاره کرد (۲). جداسازی *اشرشیاکلی* از بره‌های نوزاد اسهالی در مطالعه حاضر نشان‌دهنده اهمیت این باکتری در ایجاد اسهال بره‌های نوزاد تازه متولد شده در استان قزوین است. در عین حال عامل *اشرشیاکلی* در این تحقیق تنها در ۸۴ مورد (۴۲ درصد) از بره‌های اسهالی شناسایی شد و از ۱۱۶ مورد (۵۸ درصد) بره اسهالی دیگر *اشرشیاکلی* جدا نگردید. با توجه به اینکه اسهال بره‌ها چند عاملی است و انواع دیگر باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و حتی تغذیه می‌تواند در بروز اسهال در بره‌ها نقش داشته باشد این یافته دور از ذهن نیست (۱). میزان ابتلاء بره‌های نوزاد اسهالی به *اشرشیاکلی* در نقاط مختلف دنیا متفاوت گزارش شده است. میزان ابتلا بره‌های نوزاد اسهالی به *اشرشیاکلی* در مصر، الجزیره، هند و نیجریه به‌ترتیب ۶۵ درصد، ۴۵/۳۵ درصد، ۷۸ درصد و ۳۶/۸۴ درصد گزارش شده است (۹-۱۲). میزان ابتلا نوزاد اسهالی به *اشرشیاکلی* در سایر گونه‌ها نیز در گزارشات مختلف متفاوت است (۱۳، ۱۴). تفاوت در مدیریت گله‌ها به‌ویژه از نظر روش‌های کنترل و پیشگیری، میزان دریافت آغوز به‌ویژه در اولین ساعات بعد از تولد و میزان آلودگی محیط به *اشرشیاکلی* در محل تولد و محیط نگهداری بره‌های نوزاد می‌تواند در این تفاوت‌ها نقش داشته باشد (۱، ۱۵) هرچند برخی از محققین، فصل، موقعیت جغرافیایی و سویه *اشرشیاکلی* را

هم در این تفاوت‌ها مؤثر می‌دانند (۹، ۱۱، ۱۶). دیده شده است که میزان آلودگی بره‌های نوزاد به *اشرشیاکلی* در گله‌هایی که در آنها از یونجه یا کاه به‌عنوان بستر استفاده می‌شود و یا محل نگهداری بره‌ها به‌طور معمول تمیز و یا ضد عفونی نمی‌شود، بیشتر رخ می‌دهد (۱۷). همچنین نشان داده شده است که بازدید روزانه از گله‌های گوسفند توسط دامپزشک، جهت شناسایی و درمان به‌موقع بره‌های بیمار، به‌طور قابل توجهی از میزان آلودگی بره‌های نوزاد به *اشرشیاکلی* می‌کاهد (۱۸). با توجه به اینکه ظرفیت جذب ایمونوگلوبین‌های آغوز از دیواره روده، با گذشت زمان از بدو تولد کاهش می‌یابد، تأخیر در خوراندن آغوز به بره‌های تازه متولد شده منجر به شکست ایمنی در آنها می‌گردد و این رخداد، بره‌ها را نسبت به ابتلا به *اشرشیاکلی* حساس‌تر می‌کند (۱).

در مطالعه حاضر هیچ اختلاف معنی‌داری بین میزان آلودگی بره‌های نوزاد اسهالی نر و ماده به *اشرشیاکلی* دیده نشد. در حالی که El-Nady و همکاران و Tarunpreet و همکاران میزان آلودگی بره‌های نوزاد اسهالی نر را بیشتر از ماده‌ها گزارش کرده‌اند (۹، ۱۱).

بررسی آماری داده‌ها همچنین نشان داد که میزان ابتلا به *اشرشیاکلی* در بره‌های نوزاد اسهالی که طی سخت‌زایی متولد شده بودند به‌صورت معنی‌داری بیشتر از بره‌های نوزاد اسهالی بود که به‌صورت طبیعی به دنیا آمده بودند. از آنجایی که اکثر بره‌ها در شرایط سخت‌زایی برای مدت طولانی‌تری در کانال زایمانی باقی می‌مانند، ممکن است به‌صورت موقت دچار خفگی (آسفکسی) و کمبود اکسیژن خون (هیپوکسمی) شده، در نتیجه رفلکس مکیدن آغوز و شیر در آنها دچار مشکل شود. تأخیر در دریافت میزان کافی آغوز منجر به حساس شدن نوزاد بره‌ها به ابتلا به *اشرشیاکلی* می‌گردد (۱، ۱۹، ۲۰).

مقایسه منبع آب شرب در گله‌های گوسفند نشان داد که میزان آلودگی به *اشرشیاکلی* در بره‌های نوزاد اسهالی که از آب چاه می‌نوشند بیشتر از بره‌های نوزاد اسهالی است که از آب لوله‌کشی‌شده استفاده می‌کنند. El-Nady و همکاران نیز در گزارش خود اعلام کردند که میزان آلودگی به *اشرشیاکلی* در بره‌های نوزاد اسهالی که از آب حوض در گله‌های آنها استفاده می‌شد بیشتر از بره‌های نوزاد اسهالی بود که از آب لوله‌کشی‌شده استفاده می‌کردند (۹). آلودگی محیطی منبع آب ممکن است دلیل این تفاوت باشد (۲۱).

بررسی نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که *اشرشیاکلی*‌های جدا شده از بره‌های اسهالی شهرستان قزوین نسبت به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین کاملاً مقاوم بودند (۱۰۰ درصد). میزان مقاومت *اشرشیاکلی*‌های جدا شده نسبت به استرپتومایسین (۷۸ درصد)، تریمتوپریم/ سولفامتوکسازول (۶۱ درصد)، کولیستین (۵۴ درصد) و اریترومایسین (۴۵ درصد) نیز بالا بود. *اشرشیاکلی*‌های مورد بررسی در تحقیقات Croxen و همکاران نسبت به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین، در تحقیقات El-Nady و همکاران نسبت به اریترومایسین (۱۰۰ درصد)، آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و تتراسایکلین (۱۰۰ درصد) و در تحقیقات El-Tawab و همکاران نسبت به اکسی‌تتراسایکلین (۸۵ درصد)، آمپی‌سیلین (۸۳ درصد) و کلرامفنیکل (۶۰ درصد) مقاومت بالایی از خود نشان دادند (۹، ۲۲، ۲۳). مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها در بروز این مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نقش دارد. از آنجائی که دامپروران معمولاً بر اساس تجربیات خود و بدون مشورت دامپزشک از دوزهای بیش از حد آنتی‌بیوتیک در درمان دام‌های بیمار خود استفاده می‌کنند، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های دامی و حتی انسانی به وجود می‌آید (۵). از دیگر علل ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌توان به تجویز پروفیلاکتیک آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره کرد، که معمولاً به‌منظور پیشگیری از مرگ و میر ناشی از ابتلا به انواع عوامل عفونی، بلافاصله بعد از تولد در بره‌ها تجویز می‌شوند (۹).

در نهایت آنچه که باید در کنترل و درمان اسهال بره‌های نوزاد مورد توجه قرار گیرد، افزایش سطح بهداشت محیط نگهداری آنها، تا حد امکان جلوگیری از بروز

سخت‌زایی، دریافت مقدار کافی و به‌موقع آغوز غنی از ایمونوگلوبولین توسط بره‌ها و انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر با دوز صحیح در درمان کامل اسهال می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه ارومیه جهت تأمین منابع مالی این پروژه تقدیر و تشکر می‌نمایند. پایان‌نامه مصوب به شماره ۳۱۲۱/ رد/۳.

References

1- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grunberg W. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2017.

2- Smith B, Van Metre D, Pusterla N. Large Animal Internal Medicine. 6th ed. United States: Elsevier Mosby; 2020.

3- Sharma SK, Manat N, Joshi M. Prevalence of colibacillosis in goat kids in Udaipur district of Rajasthan. *Indian J. Vet Sci Biotechnol*. 2020; 16: 98-100.

4- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum b-lactamaseproducing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(1): 144-53.

5- Blanco Crivelli X, Bonino MP, Sanin MS, Petrina JF, Disalvo VN, Massa R, *et al.* Potential zoonotic pathovars of diarrheagenic *Escherichia coli* detected in lambs for human consumption from Tierra del Fuego, Argentina. Microorganisms. 2021; 9: 1710.

6- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC. Veterinary microbiology and microbial diseases. 2nd ed. Hoboke NJ, editor: Wiley-Blackwell; 2011.

7- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, *et al.* Microbiological Diagnosis: Text and Color Atlas. 6, editor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.

8- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30 ed.: CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2020.

9- El-Nady HH, Eissa MI, Abou-Zeid NZ, Abd-Elfatah EB, Shehata AA, Fawzi EM. Colibacillosis in lambs and kids in Egypt: Prevalence, serogroups, antibiogram profile, virulence genes distribution and antimicrobial resistance genes. *Open Vet Sci J*. 2023; 13(9): 1106-15.

10- Dahmani H, Ouchene N, Dahmani A, Ouchene-Khelifi NA, Oumouna M. First report on Cryptosporidium parvum, *Escherichia coli* K99, rotavirus and coronavirus in neonatal lambs from north-center region, Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2020; 73: 1-5.

11- Tarunpreet SK, Singh AP, Goklaney D. Prevalence of colibacilosis disease and clinico-haemato biochemical changes in lambs in Southern part of Rajasthan. *Vet Practitioner*. 2019; 20(1): 95-9.

12- Ahmed A, Egwu GO, Garba HS, Magaji AA. Prevalence of bacterial pathogens and serotyping of *E. coli* isolates from diarrheic lambs in Sokoto state, Nigeria. *Sokoto J Vet Sci*. 2010; 8(1): 42-5.

13- Haydardedeoglu AE, Aydemir M, Seniglu ES, Aras Z. Antibiogram Results of *Escherichia coli* in Calf Diarrhea and Escherichia coli Bacteria in Aksaray Province in The Last Three Months. *Kocatepe Vet J*. 2023; 16(4): 606-13.

14- Ogundare ST, Fasanmi OG, Fasina FO. Risk Factors for Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in Diarrheic and Non-diarrheic Neonatal and Weaner Pigs, South Africa. *Biomed Environ Sci*. 2018; 31(2): 149-54.

15- Islam K, Ahad A, Barua M, Islam A, Chakma S, Dorji C, *et al.* Isolation and epidemiology of multidrug resistant *Escherichia coli* from goats in Cox's Bazar, Bangladesh. *JAVAR*. 2016; 3: 166-72.

16- Abdou NE, Majeed QAH, El-Azazy OME, Tahrani LMA, AlAzemi MS, Alajmi A. Risk factors of diarrhea in small ruminants in Kuwait. *Iranian J Vet Res*. 2021; 22: 146-9.

17- Gokce E ,Erdogan HM. An Epidemiological Study on Neonatal Lamb Health. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2009; 15(2): 225-36.

18- Sharif L, Obeidat J, Al-Ani F. Risk factors for lamb and kid mortality in sheep and goat farms in Jordan. *Bulg J Vet Med*. 2005; 8: 99-108.

19- Cloete SW, Van Halderen A, Schneider DJ. Causes of perinatal lamb mortality amongst Dormer and Mutton merino lambs. *JSAVA*. 1993; 64: 121-5.

20- Haughey KG. Perinatal lamb mortality its investigation, causes and control. *JSAVA*. 1991; 62:

78-91.

21- Rashid M ,Rakib MM, Hasan B. Antimicrobial-resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* in different ecological niches in Bangladesh. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015; 5: 26712.

22- El-Tawab AA, El-Hofy F, Hamalawy AE, Abo-Ela A, El-Shazly W, El-khayat ME. Prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* in diarrheic ruminants. *Benha Vet Med J*. 2020; 38: 75-8.

23- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli. Clin Microbiol Rev*. 2013; 26: 822-80.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 56-63

Evaluation of prevalence, risk factors and antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* isolates in neonatal lambs with diarrhea in Qazvin province

Vahid Khodabandehloo[1], Vahid Najarnezhad[2]*, Abdolghaffar Ownagh[3]

1- DVSc student, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Associated Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Receive: July 18, 2024; Revise: July 29, 2024; Accept: August 28, 2024

10.22034/nfvm.2024.468496.1248

Summary

Diarrhea in neonatal lambs as a result of *Escherichia coli* infection is one of the most important problems in the sheep farming industry, which is associated with great economic losses due to treatment costs, reduced growth and mortality of affected lambs. The excessive use of antibiotics in the treatment of livestock infections, without consulting a veterinarian, has led to the emergence of antibiotic resistance. The present study was conducted to determine the frequency of *Escherichia coli* in Qazvin province, investigating some risk factors in neonatal lambs due to *Escherichia coli* and evaluating the sensitivity pattern of isolated *Escherichia coli* to common antibiotics. 200 rectal swab samples from newborn lambs suffering from diarrhea were prepared from different parts of Qazvin province and examined for *Escherichia coli* contamination. Information related to sex, breed, source of water and birth status were statistically analyzed. Antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolates was evaluated by disk diffusion method. 84 of the total samples examined were contaminated with *Escherichia coli*. The rate of contamination was higher in herds that used well water or had a dystocia. The result of the antibiogram test showed that *Escherichia coli* isolates were resistant to ampicillin and tetracycline. Indiscriminate use of antibiotics can cause antibiotic resistance. Observance of environmental hygiene, receiving sufficient colostrum and choosing the right antibiotic are effective in the treatment of diarrhea.

Keywords: *Diarrhea, Escherichia coli, neonatal lamb, antibiotic resistance*

نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ٦٤- ۷۳

بررسی شیوع سرمی *بروسلا* و *اکینوکوکوس* و عوامل خطر آنها در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد

ابوالفضل علی‌زاده[۱]، محمدجواد بهزادی شهربابک[۲*]، داود انوری[۳]، علیرضا صدیق[۴]، آریا عبداللهی[۵]

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر، ایرانشهر، ایران.
۴- دانشجوی دکتری، گروه فناوری‌های نوین پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بجنورد، بجنورد، ایران.
۵- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، گرگان، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ مهر ۱۴۰۳، بازنگری: ۲۵ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۳۰ آبان ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2025.516940.1281

چکیده

دامپزشکان و دستیاران دامپزشکی به‌دلیل ارتباط مستقیم و مستمر با دام‌ها به میزان بیشتری نسبت به سایر افراد جامعه در معرض ابتلا به بیماری‌های مشترک انسان و دام هستند. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی شیوع سرمی دو بیماری بروسلوز و هیداتیدیوزیس در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد بود. با مراجعه به تمام کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد از تعداد ۹۲ نفر از شاغلین آنها شامل دامپزشکان، منشی‌ها، آرایش‌گرها و سایر کارکنان پس از تکمیل پرسشنامه، نمونه خون اخذ و سرم آنها جداسازی شد. سپس آنتی‌بادی‌های IgG ضد *بروسلا* و *اکینوکوکوس* با روش الایزا اندازه‌گیری شدند. نتایج مطالعه نشان داد که شیوع سرمی *اکینوکوکوس* و *بروسلا* در شاغلین کلینک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد به‌ترتیب ۱/۰۹ و ۴/۳۵ درصد است. در تجزیه و تحلیل آماری تک‌متغیره، سن ($p = 0.009$) و مصرف شیر فله‌ای ($p = 0.019$) بر شیوع سرمی *بروسلا* اثر معنی‌داری داشت در حالی که تأثیر هیچ‌یک از متغیرهای مورد مطالعه بر شیوع سرمی *اکینوکوکوس* معنی‌دار نبود. در مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره نیز اثر مصرف شیر فله‌ای بر شیوع سرمی *بروسلا* نزدیک به معنی‌داری بود ($p = 0.052$) اما اثر متغیر سن معنی‌دار نشد. بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر خطر ابتلا به بروسلوز در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی مشهد بالا و احتمال ابتلا به هیداتیدیوزیس در آنها نسبتاً پایین است. مصرف شیر فله‌ای می‌تواند به‌عنوان یک عامل خطر برای ابتلا به بروسلوز در این صنف مطرح باشد. برای کسب نتایج دقیق‌تر، بررسی این بیماری‌ها در سطح کشور یا چندین استان ضرورت دارد.

واژگان کلیدی: *اکینوکوکوس گرانولوزوس، بروسلا، بیماری‌های عفونی، اپیدمیولوژی، مشهد*

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

مقدمه

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام که به‌عنوان یک معضل بهداشتی- درمانی در بسیاری از نقاط جهان، از جمله ایران، شناخته می‌شود، بیماری تب مالت یا بروسلوز است. این بیماری که توسط باکتری‌های جنس *بروسلا* ایجاد می‌شود، دارای انواع مختلفی است. شدت و عوارض بیماری به نوع باکتری منتقل‌شده بستگی دارد. از بین آنها، *بروسلا ملی‌تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* به‌ترتیب در انسان و دام نقش اصلی را در ایجاد عفونت ایفا می‌کنند. *بروسلا ملی‌تنسیس* شایع‌ترین و خطرناک‌ترین عامل این بیماری در انسان است (۱، ۲). *بروسلا* به روش‌های گوناگونی می‌تواند انسان را آلوده کند که مهم‌ترین آنها شامل خوردن، استنشاق، مواجهه و تماس با بافت‌ها و ترشحات آلوده به پاتوژن است. انسان عموماً از طریق مصرف محصولات لبنی غیر پاستوریزه یا گوشت آلوده خام و نیم‌پز به *بروسلا* مبتلا می‌گردد (۳). تظاهرات بالینی معمولاً غیر اختصاصی بوده که این امر تشخیص صحیح بیماری را با چالش مواجه می‌سازد. موارد بسیاری از تشخیص نادرست بروسلوز گزارش شده که پیامد آن گسترش و تداوم بیماری و تجویز داروهای نامناسب خواهد بود (۴، ۵).

ابتلا به این بیماری، هزینه‌های چشمگیری را برای فرد، خانواده و سازمان‌های بهداشتی به دنبال دارد. در ایران که بخش قابل توجهی از اقتصاد به صنعت دامپروری وابسته است، بروسلوز به‌عنوان یک مسئله مهم محسوب می‌شود (۶). آمار جهانی نشان می‌دهد که سالانه در حدود ۵۰۰،۰۰۰ مورد جدید از این بیماری در سراسر دنیا گزارش می‌شود. مناطق متعددی در جهان از جمله ایران به‌عنوان نقاط بومی این بیماری شناخته می‌شوند. ایران در مقایسه جهانی از نظر شیوع این بیماری در رتبه چهارم قرار دارد و در منطقه شرق مدیترانه نیز رتبه نخست را به خود اختصاص داده است. طی یک دوره ۱۸ ساله در ایران، میزان پراکندگی این بیماری بین ۰/۷ تا ۲۷۶/۴۲ مورد در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر گزارش شده است (۷، ۸).

برخی مشاغل به‌دلیل ماهیت فعالیت خود بیشتر در معرض ابتلا به بروسلوز هستند. شاغلینی که به‌طور مستقیم با دام سروکار دارند، شامل کارگران کشتارگاه‌ها، پرورش‌دهندگان دام، پرسنل شیردوشی، متخصصان دامپزشکی، تکنسین‌های واکسیناسیون و کارکنان آزمایشگاه‌های تشخیصی از این جمله‌اند. همچنین، افرادی که در فرآوری، عرضه یا فروش فرآورده‌های لبنی غیرپاستوریزه و گوشت خام فعالیت می‌کنند، جزء جمعیت پرخطر محسوب می‌شوند. تب مالت به‌عنوان یک بیماری چندسیستمی با علائمی نظیر تب، لرز، دردهای عضلانی و تعریق شدید شناخته می‌شود و همچنان یکی از چالش‌های بهداشت عمومی ایران است (۹). تشخیص بروسلوز به دو روش کلی مستقیم (روش‌های کشت باکتری و مولکولی) و غیر مستقیم (روش‌های سرولوژیکی) انجام می‌شود. کشت *بروسلا* از مایعات و یا بافت‌های بدن و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) دقیق‌ترین راه تشخیص این بیماری هستند (۱۰). اما در میان تست‌های سرولوژی، الایزا به‌عنوان تستی حساس‌تر و اختصاصی‌تر نسبت به سایر تست‌های سرولوژی شناخته می‌شود (۱۱).

اکینوکوکوس گرانولوزوس سستودی است که آلودگی به لارو آن سبب بیماری کیست هیداتید در انسان می‌شود. کرم بالغ *اکینوکوکوس* در روده باریک بیشتر سگ‌سانان مشاهده گردیده است. معمولاً آلودگی به این انگل سال‌ها بدون علائم بالینی است و در صورت عدم درمان می‌تواند کشنده باشد (۱۲). شیوع کلی کیست هیداتید در دام‌های کشتارشده در ایران ۱۳/۹ درصد گزارش شده است (۱۳). این بیماری زیان‌های اقتصادی زیادی به صنعت دامپروری و نیز بر سلامت انسان می‌گذارد و در مناطق مختلف کشور یافت می‌شود (۱۴). شغل افراد با ابتلاء به کیست هیداتید ارتباط دارد (۱۵). کشاورزان و دامداران که اغلب در فعالیت‌های کشاورزی و دامپروری مشغول به کار هستند، در معرض خطر ابتلا به این بیماری قرار دارند. از آنجا که شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی ارتباط مستقیمی با میزبان نهایی این

انگل دارند به نظر می‌رسد که احتمال ابتلای بیشتری داشته باشند (۱۶، ۱۷).

مطالعات انجام شده در نقاط مختلف ایران، میزان شیوع سرمی کیست هیداتید را از ۰/۱ تا ۹/۵ درصد گزارش کرده‌اند (۱۵). هزینه‌های درمانی گزاف و خسارات جبران‌ناپذیر این بیماری بررسی عوامل خطر ابتلاء به این بیماری را بسیار مهم می‌کند (۱۸). برای تشخیص آزمایشگاهی هیداتید انسانی، روش‌های سرولوژیک متنوعی از جمله آنتی‌بادی فلورسنت غیر مستقیم IFA، آگلوتیناسیون غیر مستقیم IHA، آزمایش الایزا، تست‌های ایمنوکروماتوگرافی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این میان تست الایزا از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است (۱۹).

کشور ایران با وجود تلاش‌های متعدد، همچنان به‌عنوان یک منطقه آندمیک بیماری تب مالت و کیست هیداتید شناخته می‌شود که این موضوع ضرورت شناسایی دقیق عوامل خطر و تعیین الگوهای اپیدمیولوژیک را دوچندان می‌کند (۶، ۲۰)؛ از این رو، بررسی شیوع این بیماری‌ها در جمعیت‌های پرخطر از اهمیت بالایی برخوردار است. این ارزیابی نه‌تنها به درک بهتر از نحوه‌ی شیوع و مسیرهای انتقال بیماری کمک می‌کند، بلکه می‌تواند نقش کلیدی در برنامه‌ریزی برای کنترل و پیشگیری از این بیماری در هر دو جمعیت انسانی و حیوانی ایفا کند. هدف از انجام این مطالعه بررسی شیوع سرمی دو بیماری بروسلوز و کیست هیداتید و عوامل زمینه‌ساز ابتلا به آنها در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه در طول تابستان سال ۱۴۰۲ به تمام کلینیک‌های فعال در شهر مشهد مراجعه شد و از شاغلین آنها پس از تکمیل پرسشنامه‌ی مربوطه نمونه‌ی خون اخذ گردید. در مجموع تعداد ۹۲ نفر از شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شامل دامپزشکان، منشی‌ها، گرومرها و سایر کارکنان، به‌صورت داوطلبانه وارد مطالعه شدند. نمونه‌های خون توسط پرستار ماهر و در لوله‌های بدون ضد انعقاد اخذ و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی سرم با سانترفیوژ نمونه‌های خون با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. نمونه‌های سرم تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای بررسی عوامل خطر مؤثر بر شیوع بیماری‌ها، در قالب یک پرسشنامه وضعیت مواجهه‌ی افراد مورد مطالعه با عوامل خطر احتمالی پرسیده شد. این پرسشنامه شامل اطلاعاتی مانند سن، جنسیت، مدرک تحصیلی، شغل و مدت اشتغال، نوع و مدت تماس با حیوانات خانگی، مصرف مواد غذایی (مانند شیر و محصولات لبنی و گوشت) و سایر عادات بهداشتی و رفتاری بود. سطح سرمی آنتی‌بادی‌های IgG ضد *بروسلا* و *اکینوکوکوس* با استفاده از کیت‌های الایزا (شرکت تشخیصی پیشتاز طب، ایران) سنجیده شد. تمام مراحل آزمایش طبق دستورالعمل‌های موجود در دفترچه راهنمای کیت‌ها انجام شد و نتایج با استفاده از دستگاه الایزاریدر و با فیلتر ۴۵۰ نانومتر قرائت شدند.

پس از تعیین شیوع سرمی هر بیماری، اثر هر یک از متغیرها به‌صورت جداگانه بر شیوع بیماری بررسی شد (تحلیل تک‌متغیره). برای این منظور، آزمون‌های آماری متناسب با نوع متغیر (مانند آزمون مربع کای، آزمون دقیق فیشر و آزمون خط به خط مربع کای) استفاده شد. سپس، تأثیر تمام عوامل به‌صورت همزمان در مدل رگرسیون لجستیک چندمتغیره در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ تحلیل شد. مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه، شیوع سرمی آنتی‌بادی IgG علیه *اکینوکوکوس* و *بروسلا* در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد بررسی شد. از مجموع ۹۲ نمونه سرمی ۱ مورد (۱/۰۹ درصد) از نظر آنتی‌بادی IgG علیه *اکینوکوکوس* مثبت بود، در حالی که ۴ مورد (۴/۳۵

درصد) از نظر آنتی‌بادی IgG علیه *بروسلا* مثبت بودند.

تحلیل تک‌متغیره نشان داد که سن و مصرف شیر فله‌ای به‌عنوان عوامل خطر معنی‌دار برای حضور آنتی‌بادی IgGعلیه *بروسلا* محسوب می‌شوند. افراد مسن‌تر و کسانی که شیر غیر پاستورلیزه مصرف می‌کردند، شیوع بالاتری از آنتی‌بادی IgG علیه *بروسلا* داشتند. با این حال، سایر متغیرهای مورد بررسی مانند جنسیت، شغل، مدت اشتغال، تعداد تماس روزانه با حیوانات، و سایر عوامل محیطی و رفتاری هیچ ارتباط معناداری با حضور آنتی‌بادی IgG علیه *بروسلا* نشان ندادند. در مورد *اکینوکوکوس* نیز هیچ‌یک از متغیرهای مورد بررسی ارتباط معناداری با حضور آنتی‌بادی IgG نشان ندادند.

جدول ۱- تأثیر هر یک از عوامل زمینه‌ساز احتمالی بر شیوع سرمی *اکینوکوکوس* و *بروسلا* در تجزیه و تحلیل تک متغیره

متغیر	سطوح	مجموع تعداد (٪)	تعداد (درصد) افراد مبتلا به اکینوکوکوس	Pvalue اکینوکوکوس	تعداد (درصد) افراد مبتلا به بروسلوزیس	Pvalue بروسلا
جنسیت	مرد	۵۷	۱ (۱/۷۵ ٪)	۰/۶۲	۲ (۳/۵۱ ٪)	۰/۵۹
	زن	۳۵	۰ (۰٪)		۲ (۵/۷۱ ٪)	
سن	کمتر از ۲۰ سال	۵	۰ (۰٪)	۰/۶۱	۰ (۰٪)	۰/۰۰۹
	از ۲۰ تا ۲۵ سال	۲۵	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	از ۲۵ تا ۳۰ سال	۲۸	۱ (۳/۵۷ ٪)		۰ (۰٪)	
	از ۳۰ تا ۴۰ سال	۲۴	۰ (۰٪)		۲ (۸/۳۳ ٪)	
	از ۴۰ تا ۵۰ سال	۹	۰ (۰٪)		۱ (۱۱/۱۱ ٪)	
	بیش از ۵۰ سال	۱	۰ (۰٪)		۱ (۱۰۰٪)	
مدرک	دیپلم	۱۷	۰ (۰٪)	۰/۵۱	۰ (۰٪)	۰/۱۷
	کاردانی	۴	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	کارشناسی	۲۲	۰ (۰٪)		۲ (۹/۰۹ ٪)	
	عمومی	۴۰	۱ (۲/۵ ٪)		۲ (۵٪)	
	ارشد	۶	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	تخصص	۳	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
شغل	خدمات	۲	۰ (۰٪)	۱	۰ (۰٪)	۰/۵۳
	منشی	۱۲	۰ (۰٪)		۱ (۸/۳۳ ٪)	
	سایر	۱۶	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	فروشنده	۱۲	۰ (۰٪)		۱ (۸/۳۳ ٪)	
	آرایش‌گر	۷	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	دامپزشک	۴۳	۱ (۲/۳۳ ٪)		۲ (۴/۶۵ ٪)	
مدت اشتغال	کمتر از ۶ ماه	۱۵	۱(۶/۶۷ ٪)	۰/۶	۰ (۰٪)	۰/۱۴
	کمتر از ۱ سال	۱۳	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	کمتر از ۲ سال	۱۱	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	کمتر از ۵ سال	۲۸	۰ (۰٪)		۲ (۷/۱۴ ٪)	
	کمتر از ۱۰ سال	۱۴	۰ (۰٪)		۲ (۱۴/۲۹ ٪)	
	بیشتر	۱۱	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
مدت زمان کار روزانه	کمتر از ۴ ساعت	۱۴	۰ (۰٪)	۰/۴۶	۰ (۰٪)	۰/۳
	کمتر از ۸ ساعت	۳۶	۰ (۰٪)		۱ (۲/۷۸ ٪)	
	کمتر از ۱۲ ساعت	۳۳	۱ (۳/۰۳٪)		۳ (۹/۰۹ ٪)	
	بیشتر از ۱۲ ساعت	۹	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
تعداد ارتباط روزانه	کمتر از۵	۲۵	۰ (۰٪)	۰/۳۱	۱ (۴٪)	۰/۲۸

با حیوانات خانگی	کمتر از ۱۰	۳۹	۰ (۰٪)		۳ (۷/۶۹ ٪)	
	کمتر از ۲۰	۲۰	۱ (۵ ٪)		۰ (۰٪)	
	بیشتر از ۲۰	۸	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
دسترسی حیوان خانگی به بیرون	ندارد	۳۷	۰ (۰٪)	۰/۳۵	۴ (۱۰/۸۱ ٪)	۰/۴۲
	دارد	۲۰	۱ (۵٪)		۰ (۰٪)	
وجود سگ در اطراف محل زندگی	نیست	۳۳	۰ (۰٪)	۰/۳	۱ (۳/۰۳٪)	۰/۴۹
	هست کمتر از ۲ تا	۳۱	۰ (۰٪)		۱ (۳/۲۳ ٪)	
	هست کمتر از ۵ تا	۱۵	۱ (۶/۶۷ ٪)		۲ (۱۳/۳۳ ٪)	
	هست بیشتر از ۵ تا	۱۲	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
گوشت قرمز در برنامه غذایی هفتگی	عدم مصرف - گیاهخوار	۱	۰ (۰٪)	۰/۴۳	۰ (۰٪)	۰/۳۶
	کمتر از ۲ وعده	۱۲	۱ (۸/۳۳ ٪)		۰ (۰٪)	
	کمتر از۴ وعده	۴۰	۰ (۰٪)		۲ (۵٪)	
	کمتر از ۸ وعده	۳۲	۰ (۰٪)		۲ (۶/۲۵ ٪)	
	بیشتر از ۸ وعده	۷	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
مصرف شیر فله	ندارم	۵۷	۱ (۱/۷۵ ٪)	۰/۳۸	۰ (۰٪)	۰/۰۱۹
	مصرف دارم	۳۵	۰ (۰٪)		۴ (۱۱/۴۳ ٪)	
مقدار مصرف سبزیجات خام در هفته	کمتر از ۲ وعده	۴۰	۱ (۲/۵ ٪)	۰/۸۵	۲ (۵٪)	۰/۶۷
	کمتر از ۴ وعده	۴۱	۰ (۰٪)		۱ (۲/۴۴ ٪)	
	کمتر از ۸ وعده	۶	۰ (۰٪)		۱ (۱۶/۶۷ ٪)	
	بیشتر از ۸ وعده	۵	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
شستشو و ضد عفونی کردن روزانه دست‌ها	کمتر از ۳ بار	۴	۰ (۰٪)	۰/۰۶	۰ (۰٪)	۰/۱۶
	کمتر از ۶ بار	۲۶	۱ (۳/۵۸ ٪)		۲ (۲/۶۹ ٪)	
	کمتر از۱۰بار	۲۸	۰ (۰٪)		۰ (۰٪)	
	بیشتر از ۱۰ بار	۳۴	۰ (۰٪)		۲ (۵/۸۸ ٪)	
شستشوی دستها قبل از مصرف غذا	ندارم	۱۷	۰ (۰٪)	۰/۸۱	۱ (۵/۸۸ ٪)	۰/۰۸
	دارم	۷۴	۱ (۱/۳۵ ٪)		۳ (۴/۰۵ ٪)	
استفاده از دستکش حین معاینه	خیر	۴۹	۱ (۲/۰۴ ٪)	۰/۵۴	۱ (۲/۰۴ ٪)	۰/۵۸
	بله	۴۲	۰ (۰٪)		۳ (۷/۱۴ ٪)	

در مدل رگرسیون چندمتغیره تأثیر مصرف شیر فله‌ای بر احتمال حضور آنتی‌بادی IgG علیه بروسلا نزدیک به معنی‌داری یافته شد در حالی که اثر سن معنادار نبود.

جدول ۲- تأثیر عوامل مختلف بر میزان شیوع سرمی *بروسلا* در مدل لجستیک چندمتغیره*

	Model Fitting Criteria -2 Log Likelihood of Reduced Model	Wald	(df)	(P-Value)
مدل پایه(فاقد متغیرها)	۱۲/۳	-	-	-
مصرف شیر فله‌ای	۱۶/۰۶	۷	۱	۰/۰۵۲
سن	۱۸/۵۲	۲۱۰/۱	۵	۰/۲۸

به دلیل میزان شیوع صفر در برخی گروه‌های مربوط به سن و مصرف شیر فله، نسبت شانس برای آنها در جدول ارائه نشده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر از تست ELISA- IgG برای بررسی شیوع سرمی بروسلوز استفاده شد (حساسیت و ویژگی آن برای تشخیص بروسلوز انسانی در کیت مورد استفاده به‌ترتیب ۹۹/۴ و ۹۹/۸۵ درصد اعلام شده). در بسیاری از مطالعات عملکرد بهتر تست الایزا در تشخیص این بیماری نسبت به سایر روش‌های سنتی مشهود است (۲۳-۲۱). بر این اساس، شیوع سرمی بیماری *بروسلا* در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد به‌میزان ۴/۳۴ درصد به دست آمد. مطالعاتی که شیوع سرمی بروسلوز را در جمعیت افراد عادی در استان‌های مختلف بررسی کرده‌اند میزان پایین‌تری را گزارش نموده‌اند. شیوع سرمی بروسلوز در اهداکنندگان خون مراجعه‌کننده به مراکز انتقال خون استان خوزستان ۰/۵۶ درصد (۲۴)، در مراجعین به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس ۲/۱۳ درصد (۲۵)، در بیماران مراجعه‌کننده به یک مرکز درمانی در جنوب غرب ایران ۲/۶ درصد (۲۶) گزارش شده است. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که شیوع سرمی بروسلوز در جمعیت مورد مطالعه بالا بوده است و اشتغال در کلینیک‌های حیوانات خانگی می‌تواند به‌عنوان یک عامل خطر برای ابتلای سرمی به بروسلوز باشد. مطالعات دیگری که شیوع سرمی بروسلوز را در جمعیت‌های مرتبط با دام در ایران و سایر کشورها بررسی کرده‌اند به نتایج مشابه با مطالعه‌ی حاضر دست یافته‌اند. در مطالعه‌ی آزادی و جایدری (۲۷) شیوع سرمی تب مالت در کارکنان دامپزشکی استان لرستان ۷۸/۲۷ درصد گزارش شد. همچنین در مطالعه‌ی بهشتی و همکاران (۲۸) شیوع سرمی بروسلوز در جمعیت مرتبطین با دام شهرستان کازرون شامل دامپزشکان، دستیاران دامپزشک، دانشجویان دامپزشکی، قصابان و کارکنان کشتارگاه ۷/۸ درصد گزارش شد در حالی که در گروه شاهد (غیر مرتبط با دام) صفر بود. شیوع سرمی بروسلوز در عشایر کوچنشین خوزستان ۸ درصد (۲۹)، در کارکنان کشتارگاه کرمان ۵۶/۸ درصد (۳۰)، در دامپزشکان شمال فلسطین ۷۶ درصد (۳۱)، در دامپزشکان عربستان ۱۴/۶ درصد (۳۲) گزارش شده است. همچنین، تماس مستقیم با ترشحات زایمانی سگ آلوده، جنین سقط شده و یا خون آنها یک راه انتقال *بروسلا کنیس* به کارکنان کلینیک‌های دامپزشکی شمرده شده است (۳۳). همه‌ی این مطالعات هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهند که شغل دامپزشکی و ارتباط با دام احتمال ابتلای سرمی به بروسلوز را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. پژوهش حاضر تنها مطالعه‌ای است که شیوع سرمی بروسلوز را اختصاصاً در دامپزشکان و دستیاران دامپزشکی حیوانات خانگی بررسی می‌کند و شاید علت پایین‌تر بودن شیوع بروسلوز در مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با مطالعات مشابه به همین علت است. انتقال بروسلوز به انسان عمدتاً از طریق نشخوارکنندگان صورت می‌گیرد و انتظار می‌رود دامپزشکانی که با این گروه از دام‌ها ارتباط دارند بیشتر در معرض آلودگی به بروسلوز قرار داشته باشند. در مطالعه‌ی حاضر تأثیر مصرف شیر فله‌ای بر شیوع سرمی بروسلوز در شاغلین کلینیک‌های خانگی بر اساس تجزیه و تحلیل تک‌متغیره معنی‌دار است ($p = 0.009$) ضمن این که در مدل رگرسیون چند متغیره نیز نزدیک به معنی‌دار شدن ($p = 0.052$) است. اگرچه شیر فله‌ای معمولاً قبل از مصرف جوشانده می‌شود اما این امکان وجود دارد که در این امر اهمال یا غفلت شود و در نتیجه زمینه انتقال *بروسلا* به انسان فراهم شود. مطالعاتی که روی مبتلایان به تب مالت در شهرستان دیواندره (۱)، استان یزد (۹)، شهرستان اندیکا (۳۴) و استان خراسان رضوی (۲) انجام شده است مصرف شیر غیرپاستوریزه را به‌عنوان یکی از عوامل خطر برای ابتلای بالینی به تب مالت یافته‌اند که از این لحاظ با نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر همخوانی داشته‌اند. سن، جنسیت، سابقه کار و نوع فعالیت شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی بر میزان ابتلای سرمی آنها به بروسلوز تأثیری نداشت. در بسیاری از مطالعاتی که اپیدمیولوژی بروسلوز بالینی را بررسی کرده‌اند بر خلاف نتایج مطالعه‌ی حاضر، جنسیت بر شیوع بروسلوز مؤثر

بوده است (۲، ۶، ۷، ۹، ۳۴). از آنجا که مطالعه‌ی حاضر شیوع بروسلوز را در جمعیت شاغل در کلینیک‌های حیوانات خانگی بررسی کرده است، عدم تأثیر جنسیت ممکن است به‌دلیل عدم وجود تفاوت در میزان ارتباط با دام بین مردان و زنان در جمعیت مطالعه شده برخلاف مطالعات دیگر برگردد. در مطالعه‌ی حاضر اگرچه اثر سن در مدل آماری تک‌متغیره معنی‌دار بود اما در مدل چندمتغیره معنی‌دار نشد که از این لحاظ با نتایج برخی مطالعات مشابه همخوانی نداشت (۱، ۶، ۳۴، ۳۵).

شیوع سرمی هیداتیدوزیس در شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد ۱/۰۹٪ درصد به‌دست آمد. مطالعات دیگری که شیوع سرمی هیداتیدوزیس را در افراد معمولی در ایران سنجیده‌اند میزان ۱/۱۹ درصد در ساکنین مناطق مختلف دشت مغان (۳۶)، ۱/۳ درصد بین مراجعین به مراکز درمانی اراک (۳۷)، ۴/۴ درصد در استان اردبیل (۳۸)، ۲/۷۳ درصد در ساکنین روستاهای قائم شهر (۳۹)، ۱/۲ درصد در استان ایلام (۴۰)، ۸/۸۳ درصد در استان فارس (۱۵) و ۵ درصد در استان سمنان (۱۹) را گزارش نموده‌اند. شیوع سرمی هیداتیدوزیس در مطالعه‌ی حاضر نسبت به تمام مطالعات ذکر شده پایین‌تر بوده است. همچنین می‌توان گفت احتمالاً آگاهی شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی و رعایت بهداشت توسط آنها باعث شده است که علیرغم ارتباط مستقیم با میزبان نهایی انگل، شیوع سرمی در بین آنها پایین باشد. در مطالعات متعددی ارتباط با دام به‌عنوان عامل خطر ابتلا به هیداتیدوزیس معرفی شده است. Aizaz Alvi و همکاران (۴۱) اشتغال در کشتارگاه، صفرپور و همکاران (۱۵) شغل دامداری و افلاکی و همکاران (۴۰) زندگی عشایری را به‌عنوان عوامل خطر هیداتیدوزیس گزارش کردند. در مطالعه‌ی حاضر اثر هیچ‌یک از متغیرهای بررسی شده بر شیوع هیداتیدوزیس در تجزیه و تحلیل تک‌متغیره معنی‌دار نشد، لذا اثر آنها در مدل رگرسیون چندمتغیره مورد بررسی قرار نگرفت.

در مطالعه‌ی حاضر علیرغم مراجعه به تمام کلینیک‌های حیوانات خانگی شهر مشهد تعداد افرادی که اظهار تمایل به حضور در مطالعه داشتند نسبتاً پایین بود و انجام این بررسی در یک جامعه آماری بزرگ‌تر می‌تواند نتایج دقیق‌تر و قابل تعمیم‌تری در اختیار قرار دهد. یافته‌های مطالعه ما تأکید می‌کنند که آموزش بهداشت عمومی و شغلی، به‌خصوص در مورد اجتناب از مصرف شیر غیرپاستوریزه و رعایت اصول بهداشتی در تماس با حیوانات، می‌تواند نقش مهمی در کاهش شیوع بیماری‌های منتقله از حیوانات به انسان داشته باشد. الگوی مشابه در مطالعات مختلف، نشان‌دهنده، نقش تعیین‌کننده عوامل خطر مشترک در بروز بیماری است و لزوم برنامه‌ریزی دقیق‌تر برای کاهش شیوع بیماری در جمعیت‌های مستعد را برجسته می‌کند. این نتایج می‌توانند به‌عنوان پایه‌ای برای برنامه‌ریزی‌های آموزشی و پیشگیرانه در جمعیت شاغلین کلینیک‌های حیوانات خانگی استفاده شوند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه زابل و با شماره مجوز IR-UOZ-GR-3352 انجام شده است که مراتب تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1- Azar FE, Jalilvand H, Abdi M, Nikuee D, Ghazaei SP, Pourrahimi M. Epidemiologic study of brucellosis disease in Divandarreh City of Kurdistan Province, Iran. *Depiction of Health*. 2019; 10(1): 47-53. [In Persian]

2- Hoshtrakhi S, Akbari M, Jarahi L, Etminani K. Investigating the epidemiological characteristics and incidence trend of brucellosis in Khorasan Razavi province. *Med J Mashhad Univ Med Sci*. 2015; 58(9): 531-538. [In Persian]

3- Yiğitbay A, Ari MC. Distal femur Brucella osteomyelitis in infancy: A rare case report. Jt Dis Relat. Surg. 2024; 35(3): 717.

4- Zheng R, Xie S, Lu X, Sun L, Zhou Y, Zhang Y, *et al.* A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China. *Biomed Res Int*. 2018; 2018(1): 5712920.

5- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J*. 2010; 51(4): 296-305.

6- Riabi HRA, Riabi HRA, Razmara H. Epidemiological Feature of the Human Brucellosis Prevalence in People in Southern Cities of Khorasan Razavi, Iran. *Zahedan J Res Med Sci*. 2017; 19(4): 1-4. [In Persian]

7- Norouzinezhad F, Erfani H, Norouzinejad A, Ghaffari F, Kaveh F. Epidemiological Characteristics and Trend in the Incidence of Human Brucellosis in Iran from 2009-2017. *JRHS*. 2021; 21(4): e00535. [In Persian]

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

9- Firouzeh AT, Rahmanian V, Honarvar B, Hosseini S, Mansoorian E. Epidemiological and Clinical Features of People with Malta Fever in central Iran, 2013–2018: results from national surveillance system. *Pakistan J med & health sci*. 2019; 13(4): 1141-5.

10- Smirnova EA, Vasin AV, Sandybaev NT, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Chervyakova OV, *et al.* Current methods of human and animal brucellosis diagnostics. *Advanc Infect Dis*. 2013; 3(3): 177-8.

11- Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*. 2002; 90(1-4): 447-59.

12- Oh MY, Kim ON, Han BK, Kim YH. Studies on morphology and life cycle of Echinococcus granulosus. *Korean J Vet Res*. 1976; 16(2): 201.

13- Vaisi-Raygani A, Mohammadi M, Jalali R, Salari N, Hosseinian-Far M. Prevalence of cystic echinococcosis in slaughtered livestock in Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC infect dis*. 2021; 21(1): 429.

14- Sarkari B, Sadjjadi S, Beheshtian M, Aghaee M, Sedaghat F. Human cystic Echinococcosis in Yasuj district in Southwest of Iran: an epidemiological study of seroprevalence and surgical cases over a ten-year period. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57(2): 146-50. [In Persian]

15- Safarpour AR, Omidian M, Pouryousef A, Fattahi MR, Sarkari B. Serosurvey of Cystic Echinococcosis and Related Risk Factors for Infection in Fars Province, Southern Iran: A Population-Based Study. *Biomed Res Int*. 2022; 3709694. [In Persian]

16- Dalimi A, Sattari A, Motamedi G. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Vet Parasitol*. 2006; 142(1-2): 129-33.

17- Youssefi M, Khadem-Rezaiyan M, Azari-Garmjan GA, Jarahi L, Shamsian AA, Moghaddas E. Prevalence of Toxoplasma and Echinococcus IgG antibodies in slaughterhouse workers, a serosurvey in Northeast Iran. *Ann Parasitol*. 2018; 64(4). [In Persian]

18- Fasihi Harandi M, Budke CM, Rostami S. The monetary burden of cystic echinococcosis in Iran. *PLOS Negl Trop Dis.* 2012; 6(11): e1915.

19- Hafezi F, Mohammadzadeh T, Pazoki R, Ranani KA, Sadjjadi SM. Sero-Epidemiological Study of Human Hydatidosis in Semnan and Sorkheh, Semnan Province, Iran. *Iran J Public Health.* 2022; 51(6): 1411. [In Persian]

20- Sarvi S, Daryani A, Sharif M, Rahimi MT, Kohansal MH, Mirshafiee S, *et al.* Zoonotic intestinal parasites of carnivores: A systematic review in Iran. *Vet World*. 2018; 11(1): 58. [In Persian]

21- Mantur B, Parande A, Amarnath S, Patil G, Walvekar R, Desai A, *et al.* ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(2): 314.

22- El-Rab MG, Kambal A. Evaluation of a brucelle enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. *J Infect*. 1998; 36(2): 197-201.

23- Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis.* 1992: 131-40.

24- Shakornia AH, Ghasemzadeh AH, Afra M, Sarizadeh GR, Javidan S, Khodadadi, *et al.* Seroprevalence of brucellosis among blood donors referring to blood transfusion centers in Khuzestan province. *Blood Res*. 2014; 11(3): 180-189. [In Persian]

25- Poorhajibagher M, Pagheh A, Nasrollahi M, Mesgarian F, Badiee F, Ajami A. The Evaluation of Seroprevalence of Brucellosis in Patients Refering to Health Care Center of Gonbad Kavoos, 2009-11. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012;

22(90): 82-86. [In Persian]

26- Torabizadeh M, Pourhang N, Shakurnia A. Eleven-years study of sero-prevalence of Brucellosis among Patients attending in a medical center in southwest Iran (2011-2021). *Alborz University Medical J*. 2024; 13(3):163-71. [In Persian]

27- Azadi Chegeni S. Seroprevalence of Malta Fever in Veterinary Staff of Lorestan Province Using Indirect ELISA Method in 2018-2019. *Yafteh*. 2020; 22(2). [In Persian]

28- Beheshti S, Rezaian G, Azad F, Faghiri Z, Taheri F. Seroprevalence of brucellosis and risk factors related to high risk occupational groups in Kazeroon, South of Iran. 2010.

29- Alavi SM, Rafiei A, Nikkho AR. Serological epidemiological study of brucellosis among nomadic tribes in Khuzestan province in 2004. *Iran J Infect Dis Trop Med*. 2006; 11(33): 41-47. [In Persian]

30- Khalili M, Sami M, Aflatoonian MR, Shahabi-Nejad N. Seroprevalence of brucellosis in slaughterhouse workers in Kerman city, Iran. *Asian Pac J Trop Dis*. 2012; 2(6): 448-50. [In Persian]

31- Alzuheir I, Al Zabadi H, Abu Helal M. Occupational exposure assessment and Seroprevalence of Brucella specific antibodies among veterinarians in the northern Palestine. *Front vet sci*. 2022; 8: 813900.

32- Ghazi HL, Alamain AM, Mahmoud MA, Gasim I, AM EA, Alkarar A. Prevalence and Risk Factors of Occupational Brucellosis Among Veterinarians in the Kingdom of Saudi Arabia. 2021. [In Persian]

33- Santos RL, Souza TD, Mol JP, Eckstein C, Paíxão TA. Canine brucellosis: an update. *Front Vet Sci*. 2021; 8: 594291.

34- Asban P, Kiani F, Mohammadi MJ, Ghanbari S, Amiri H, Kazemi Bareh Bichast R. Investigated of Epidemiological and Incidence of Human Brucellosis in Southwest of Iran, a Retrospective Study from 2014 to 2021. *Arch Clin Infect Dis*. 2024; 19(5): e135931. [In Persian]

35- Shokoufamanesh A, Daneshi S, Sarbisheh I, Estakhr GP, Niknam N, Raesi R. Investigation of the Epidemiological Situation of Malta Fever in the Cities under Mashhad University of Medical Sciences during the years 2016 to 2022. *The Open Public Health J*. 2024; 17(1). [In Persian]

36- Mirzanejad-Asl H. Determination of Contamination Ratio and Risk Factors Associated with Alveolar and Cystic Echinococcosis by ELISA and Portable Ultrasonography in Moghan Plain, Ardabil Province, Northwest of Iran. *J Ardabil Univ Med Sci*. 2017; 17(3): 288-98. [In Persian]

37- Darabi F, Bakhtiari M, Matini S, Matini M. Seroepidemiology of hydatid cyst in outpatients attending health centers in Arak city, Iran, 2020. *Avicenna J Med*. 2022. [In Persian]

38- Heidari Z, Mohammadi-Ghalehbin B, Alizadeh Z, Molaei S, Dogaheh HP, Mirzanejad-Asl H. Seroprevalence of Human hydatidosis in Ardabil Province, north-west of Iran. *Iran J Parasitol*. 2021; 16(4): 593. [In Persian]

39- Davoodi L, Kordi S, Azordeh M, Bahadori A, Bahrami F, Tabarestani M, *et al.* Seroprevalence of human hydatidosis and survey of risk factors in rural areas of Qaemshahr, Iran 2019. *J Maz Univ Med Sci*. 2020; 30(190): 139-45. [In Persian]

40- Aida A, Fatemeh Gha, Abdolhossein Da. Seroepidemiological study of hydatidosis (human hydatid cyst) in Ilam Province using Dot-ELISA method. [In Persian]

41- Alvi MA, Li L, Saqib M, Ohiolei JA, Younas MW, Tayyab MH, *et al.* Serologic evidence of Echinococcus granulosus in slaughterhouses in Pakistan: global alarm for butchers in developing countries. J Infect Dev Ctries. 2021; 15(06): 861-9.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 64-73

Study of the seroprevalence of *Brucella* and *Echinococcus* and their risk factors in employees of pet clinics in Mashhad

Abolfazl Alizadeh[1], Mohammad Javad Behzadi Shahrbabak[2*], Davood Anvari[3], Alireza Seddigh[4], Arya Abdollahi[5]

1- Graduated in DVM, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Assistant professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Assistant professor, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Iranshahr University of Medical Sciences, Iranshahr, Iran.
4- PhD student, Department of Advanced Technologies, faculty of medicine, North Khorasan University of Medical Science, Bojnourd, Iran.
5- PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Receive: October 1, 2024; Revise: November 15, 2024; Accept: November 20, 2024

10.22034/nfvm.2025.516940.1281

Summary

Veterinarians and veterinary assistants are at greater risk of contracting zoonotic diseases than others due to their direct and continuous contact with animals. The aim of the present study was to investigate the seroprevalence of brucellosis and hydatidiosis in employees of pet clinics in Mashhad. Blood samples were taken from 92 employees, including veterinarians, secretaries, groomers, and other staff, after completing a questionnaire, and serum was then isolated from the samples. Then, IgG antibodies against *Brucella* and *Echinococcus* were measured by ELISA. The results of the study showed that the seroprevalence of *Echinococcus* and *Brucella* in employees of pet clinics in Mashhad was 1.09% and 4.35%, respectively. In univariate statistical analysis, age ($p = 0.009$) and consumption of bulk milk ($p = 0.019$) were significantly associated with the seroprevalence of Brucella, while the effect of none of the studied variables on the seroprevalence of Echinococcus was significant. In the multivariate logistic regression model, the effect of bulk milk consumption on the seroprevalence of Brucella was close to significant ($p = 0.052$), but the effect of the age was not significant. According to the results of the present study, employees of pet clinics in Mashhad have a high risk of brucellosis and a relatively low probability of hydatidiosis. Consumption of bulk milk can be considered as a risk factor for brucellosis in this profession. It is necessary to investigate these diseases at the national level or in several provinces to obtain more accurate results.

Keywords: *Echinococcus granulosus, Brucella, Infectious diseases, Epidemiology, Mashhad*

New Findings in
Veterinary Microbiology

University of Zabol

Quarterly, Volume 8, Issue 1, Spring 2025

ISSN: 4491-2645

Isolation and identification of Mycoplasma agalactiae from sheep and goat, in Golestan province

Carcasses of slaughtered goats in Kerman: A potential reservoir of β-lactam-resistant Escherichia coli and a public health challenge

The effect of different levels of zinc supplementation (zinc oxide, nanozinc oxide, and zinc-methionine) on the ruminal protozoan population and ammonia nitrogen of Baluchi male lambs

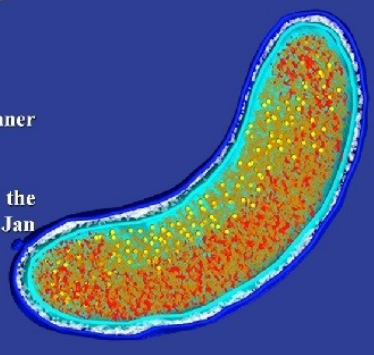
Genetic Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Vaccines in Iran: Helping to make the right decision in choosing the right vaccine and mo-lecular epidemiology studies

Assessing Furazolidone Antibiotic Residue in commercial eggs by ELISA method

Evaluation of prevalence, risk factors and antibiotic sensitivity of Esche-richia coli isolates in neonatal lambs with diarrhea in Qazvin province

Study of the seroprevalence of Brucella and Echinococcus and their risk factors in employees of pet clinics in Mashhad

Lorem Ipsum



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.