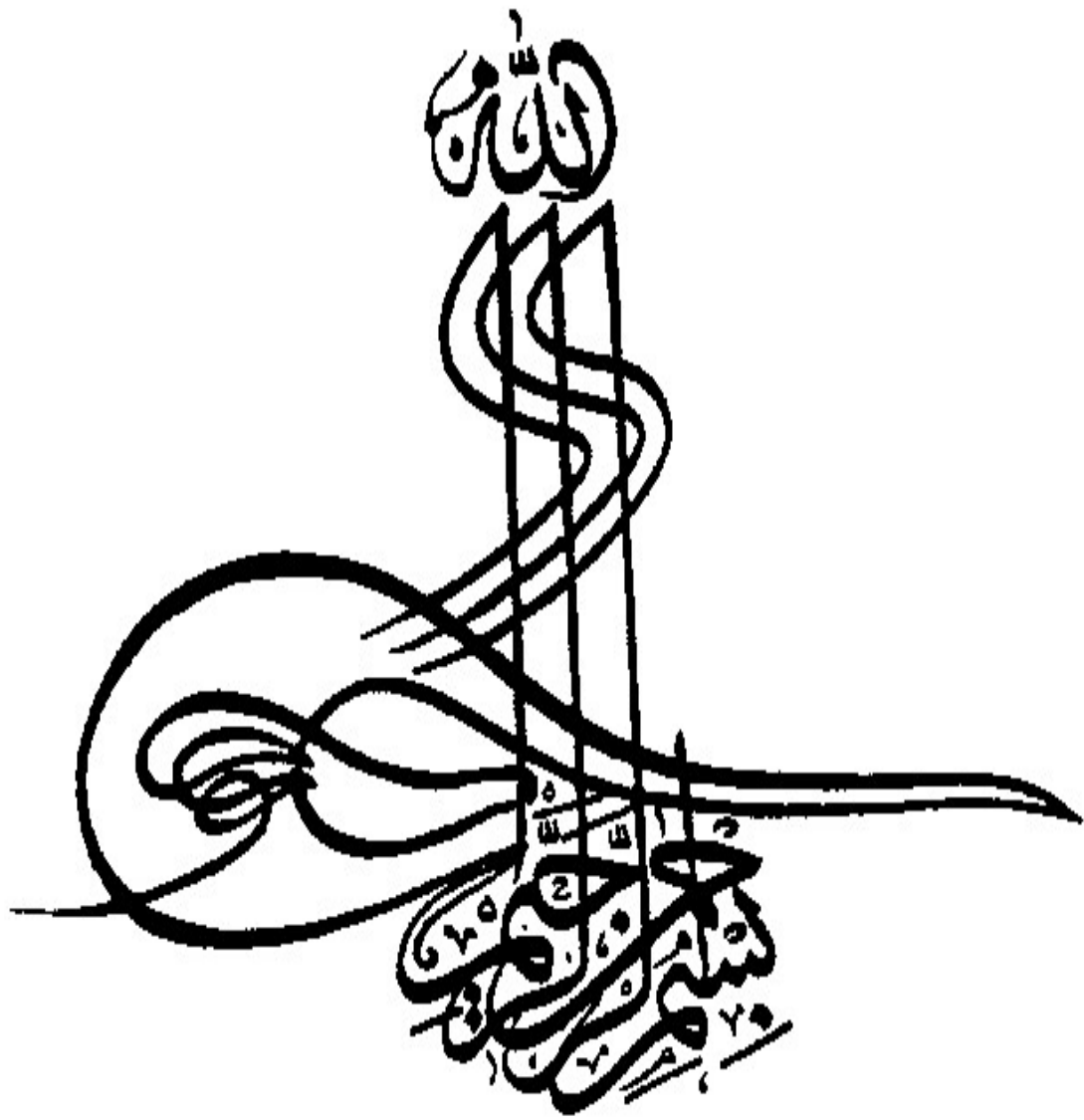


جداسازی و تعیین بایوار سویه‌های بروسلا در گاوهای شیری ایران
شیوع استرپتوکوکوس آگالاکتیه در عفونت‌های تحت بالینی پستان در مزارع شیری شهرستان
نیشابور
بررسی بهبود زخم تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط عصاره گیاه گل راعی
و روغن شترمرغ
بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های برپایه کربوکسی‌متیل سلولز ترکیب‌شده با نانوذرات
اکسید روی و عصاره پوست انار برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان
بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و یرسینیا انتروکولیتیکا در لبنیات عرضه‌شده در
شهرستان خرم‌آباد
بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا و اشریشیاکلی در لبنیات سنتی و صنعتی
عرضه‌شده در شهرستان تهران و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها
مطالعه سرمی میزان شیوع نئوسپوروسیس، رابنوتراکیت عفونی گاوها و اسهال و بروسه گاو در
گاوهای با سابقه سقط در استان قارس



در این قسمت تصویر میکروسکوپ الکترونی کرایو (CryoEM) از باکتری گرم منفی *Pelagibacter* را می‌بینید که اجزای آن به رنگ‌های مختلف در آمده است: غشای خارجی (آبی)، غشای سیتوپلاسمی (سبز آبی)، پیپتیدوگلیکان (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.



دوره ۸، شماره ۳

ناشر: دانشگاه زابل

سر دبیر:

تقی زهرایی صالحی؛ tsaleh@ut.ac.ir



مدیر مسئول:

داریوش سعادت؛ saadatdariush@uoz.ac.ir



مدیر اجرایی:

احمد راشکی؛ ah_rashki@usal.es



هیات دبیران:

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه



افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی



زابل

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،



محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم



دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

پزشکی زاهدان

تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،



مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده



دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



مهدی راسخ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،



دانشگاه شیراز

دانشگاه زابل

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد



دانشگاه شهرکرد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



دانشگاه فردوسی مشهد

دانشگاه شهید باهنر کرمان

مجید پهلوان: گروه علوم اعصاب بالینی، مرکز پزشکی مولکولی



سعید سالاری: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



(CMM)، دانشگاه کارولینسک

دانشگاه زابل

کارشناس نشریه: علیرضا میرزایی

ویراستار انگلیسی: مسلم فتح الهی، استادیار گروه زبان انگلیسی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه زابل

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

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

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

وبسایت: nfvm.uoz.ac.ir

پست الکترونیک: nfvm@uoz.ac.ir

راهنمای تهیه مقاله برای نشریه تازه‌ها در میکروبی‌شناسی دامپزشکی

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

انواع مقالات به یکی از صورت‌های:

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

شیوه نگارش مقاله:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

نحوه رفرنس نویسی:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

قالب و شکل سایر مقالات به صورت زیر می باشد:

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

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

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

* بحث

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

مقاله مروری (Review)

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

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

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

مقاله کوتاه (Short Communication)

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

نامه به سردبیر (Letter to Editor)

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

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



جداسازی و تعیین بایوار سویه‌های بروسلا در گاوهای شیری ایران

سعید عالمیان*

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

دریافت مقاله: ۰۲ مهر ۱۴۰۳، بازنگری: ۰۸ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۲ آبان ۱۴۰۳



10.22034/NFVM.2025.479246.1259

چکیده

بروسلوز، یا تب مالت، یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام با گستره شیوع جهانی است. کنترل و پیشگیری از این بیماری نیازمند پایش و ارزیابی مستمر میزان آلودگی در جمعیت‌های دامی کشور می‌باشد، زیرا انتقال گونه‌های مختلف عامل بیماری از میزبان‌های اصلی به سایر دام‌ها، اهمیت بالای اپیدمیولوژیک دارد. از این رو، شناسایی گونه‌ها و بیووارهای غالب در مناطق مختلف جغرافیایی، گامی اساسی در برنامه‌های مبارزه با بروسلوز محسوب می‌شود. در این مطالعه، ۲۵۷ نمونه از غدد لنفاوی گاوهای راکتور مثبت متعلق به ۱۵ استان و ۴۲ دامداری راکتور مثبت سراسر کشور، به بخش بروسلوز مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارجاع گردید. نمونه‌ها با روش‌های کشت میکروبی بررسی، و جدایه‌ها تعیین بیووار شدند. تأیید گونه‌ها و بیووارهای شناسایی شده، با آزمون مولتی‌پلکس انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که در مجموع ۶۲ ایزوله بروسلا جدا گردید؛ از این میان، ۲۸ ایزوله *Brucella melitensis* بیووار ۱، پنج ایزوله *B. melitensis* بیووار ۳، و ۲۹ ایزوله *Brucella abortus* بیووار ۳ شناسایی شد. این یافته‌ها، با ترسیم پراکندگی انواع بیووار در نقاط مختلف ایران، بر تداوم خطر قابل توجه تب مالت برای سلامت عمومی جامعه تأکید دارد.

واژگان کلیدی: بروسلا ملی‌تنسیس، بروسلا آبورتوس، تشخیص، غده‌های لنفاوی، راکتور مثبت

مقدمه

بیماری بروسلاز: بروسلاز یک عفونت باکتریایی مشترک میان انسان و دام (زئونوز) است. در حیوانات، این بیماری بیشتر با نام سقط جنین واگیردار شناخته می‌شود، در حالی که در انسان به نام‌های تب مواج و تب مدیترانه‌ای نیز شهرت دارد و می‌تواند به صورت تحت‌حاد، مزمن یا موضعی بروز کند (۱-۳). در حیوانات، بروسلاز عمدتاً

دستگاه ادراری-تناسلی را درگیر می‌کند؛ اما در انسان، که میزبان ثانویه یا اتفاقی محسوب می‌شود، با علائمی چون تب، تعریق، ضعف عمومی، بی‌حالی و کاهش وزن همراه است. از نظر جهانی، بیشترین موارد ابتلا در انسان ناشی از گونه *Brucella melitensis* است که به‌عنوان مهاجم‌ترین و بیماری‌زاترین گونه در جنس بروسلا شناخته می‌شود (۱-۳).



شکل ۱- التهاب بیضه و التهاب اپیدیدیم (Orchitis and Epididymitis). بیماری‌های ناشی از بروسلاز گاوی و گوسفندی و آثار آن بر سیستم تناسلی نر

گونه‌های بروسلا به شرح زیر هستند:

۱) بروسلا ملی‌تنسیس با سه بیووار که بر اساس واکنش آنتی‌سرم‌های منواسپسیفیک A و M از یکدیگر متمایز می‌گردند (۱-۳). ۲) بروسلا آبورتوس با هفت بیووار، ۳) بروسلا سوئیس، ۴) بروسلا نئوتومه (در جوندگان)، ۵) بروسلا اوویس در قوچ و میش، ۶) بروسلا کنیس در سگ، ۷) بروسلا ماریس (*B. maris*) شامل زیرگونه‌های: بروسلا فوکه (*B. phocae*)، خوک دریایی؛ بروسلا فوکونه (*B. phocaenae*)، خوک و وال؛ بروسلا دلفینی (*B. delphini*)، دلفین؛ بروسلا پنی‌پده‌آ، خوک و شیر دریایی؛ و بروسلا سته‌آ، بالن و وال.

در ایران، عامل بیماری در انسان برای نخستین بار همزمان از کشت خون در انستیتو پاستور ایران توسط دکتر کراندل (رئیس وقت انستیتو پاستور) و همکاران وی، و توسط دکتر علی‌اف از کشت خون بیمار مبتلا به تب مالت در سال ۱۹۳۲ میلادی (۱۳۱۱ شمسی)، میکروب بروسلا

ملی‌تنسیس جداسازی شد.

در سال ۱۳۲۳ از جنین سقط شده گاو در انستیتو رازی و سپس به دفعات در گاوداری‌های اطراف تهران، بروسلا آبورتوس جدا گردید. در سال ۱۳۲۷، برای اولین بار دکتر انتصار از شیر و جنین گوسفند و بز، بروسلا ملی‌تنسیس را جدا کرد. در سال ۱۳۵۰ دکتر اردلان و همکارانش وجود بروسلا در خوک را در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی گزارش کردند. در حال حاضر دو گونه بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس در ایران شایع هستند (۱-۳).

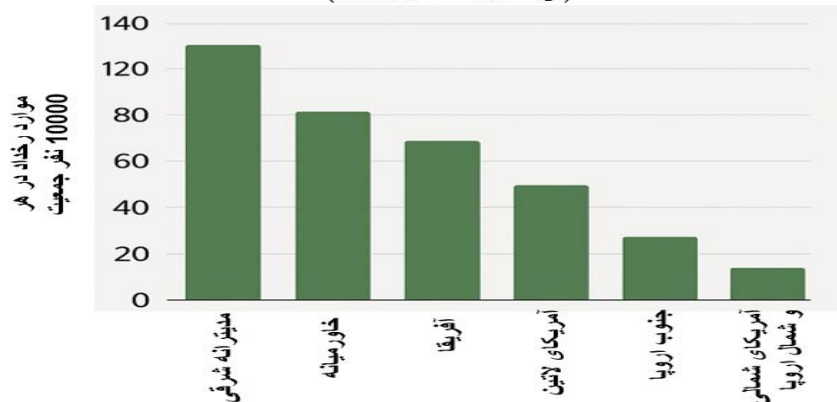
آمار سالیانه بروسلاز انسانی در ایران تا سال ۱۳۶۸ روند صعودی داشته و پس از آن تا سال ۱۳۷۹ سیر نزولی طی نموده است. امروزه بروسلاز مشکلی جهانی محسوب می‌شود. به استثنای تعداد کمی از کشورهای جهان که عاری از بیماری بوده یا موفق به ریشه‌کنی آن شده‌اند، بیشتر کشورها به این عفونت آلوده هستند.

نیوزیلند، پولینزی و پاپوا گینه نو نیز به مرز ریشه‌کنی رسیده‌اند.

طبق گزارش‌های سالیانه، حدود پانصد هزار مورد آلودگی گزارش می‌شود؛ البته این آمار بسیار بیشتر برآورد می‌گردد و اغلب موارد مربوط به بروسلا ملی تنسیس است (شکل ۲).

تازه‌ترین آمار جهانی تنها ۱۷ کشور یا ناحیه شامل جزایر مانش، نروژ، سوئد، فنلاند، دانمارک، سوئیس، چک و اسلواکی، رومانی، اسکاتلند، انگلستان، ولز، هلند، لوکزامبورگ، اتریش، قبرس، ژاپن، بلغارستان و جزایر فالکلند را عاری از بیماری گزارش کرده است. ایسلند و جزایر ویرجینیا (ایالات متحده آمریکا) از ابتدا هیچ‌گونه آلودگی نداشته‌اند (۱۵، ۲۰). برخی کشورها نظیر کانادا،

تخمین میزان آمار جهانی عفونت بروسلاز انسانی (بر اساس داده‌های WHO)



شکل ۲- نمودار به روز شده موارد آلودگی جهانی طبق آمار WHO

کشت به‌کندی انجام می‌شود؛ Oxidase، Catalase، Nitrate و Urease مثبت، در حالی که Citrate، Indole و VP منفی می‌باشند (۱، ۲).

باکتری عامل بروسلاز باسیل‌های گرم‌منفی کوچک (Short bacilli) با طول ۰/۶ تا ۱/۵ میکرومتر و عرض ۰/۶ تا ۰/۷ میکرومتر، هوازی، غیرمتحرک، فاقد کپسول و اسپور، و از پاتوژن‌های داخل سلولی بوده و رشد آنها در محیط



شکل ۳- شکل کلنی‌های بروسلاز در محیط جامد و شکل فضایی باکتری

گاهی بر اثر متريت و سپتی‌سمی حتی کشنده نیز هست. در گاو نر این بیماری باعث اركیت، اپیدیدیمیت، تورم

بیماری بروسلاز در گاو و گوسفند معمولاً موجب سقط جنین، کاهش تولید شیر، جفت‌ماندگی و عقیمی شده و

مفاصل و ناباروری می‌گردد. در ایران برای تشخیص بروسلوز از روش‌های روتین سرولوژیک رایت و رزبنگال استفاده می‌شود، اما بر اساس مطالعات، روش نوین الیزا با کیت‌های وارداتی حساسیت بیشتری دارد. در این مطالعه، با بهره‌گیری از روش‌های سنتی رایت و رزبنگال در دامداری‌ها، دام‌های راکتور مثبت شناسایی و برای کشتار در زمان مشخص برنامه‌ریزی شدند. سپس نمونه‌های غدد لنفاوی این دام‌ها تحت شرایط استریل و زنجیره سرد به بخش بروسلوز ارجاع گردید (۴-۶).

مؤسسه رازی در حال حاضر با تولید سالانه حدود ۲۰ میلیون دُز واکسن بروسلوز گوسفندی و گاوی، نقش بسزایی در کنترل بیماری در دام و در سطحی بالاتر در بهداشت و سلامت جامعه انسانی ایفا می‌کند. عامل اصلی بروسلوز گاوی، *Brucella abortus* است که میزبان اصلی آن گاو می‌باشد، اما توانایی آلودگی سایر حیوانات حساس همچون گوسفند، بز، شتر، اسب، سگ و نشخوارکنندگان وحشی را نیز دارد. در ایران این باکتری از گاو، بز، اسب و گاو میش جداسازی شده است (۴). این گونه دارای هفت بیوتیپ بوده که بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی مختلف از جمله نیاز به CO_2 برای رشد، تولید H_2S ، رشد روی محیط‌های رنگین و واکنش آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم‌های منواسپسیفیک A، M و R قابل تفریق هستند. در میان این بیوتیپ‌ها، بیوتیپ ۳ در ایران حالت بومی داشته و شایع‌تر است (۲-۵).

بیماری در گاوهای ماده غیر آبستن معمولاً بدون علامت بوده، اما در گاوهای بالغ آبستن موجب بروز جفت‌ماندگی و در نهایت سقط جنین بین ماه‌های پنجم تا نهم آبستنی می‌شود که مهم‌ترین نشانه بیماری است (۶). علت احتمالاً تمایل باکتری به قند اریتریتول و وجود مقادیر بالای آن در بافت‌های رحم و جفت گاو می‌باشد. *B. abortus* از طریق ادرار، جفت، جنین، ترشحات مهبل و شیر گاوهای آلوده دفع شده و دام‌های سالم در اثر تماس با این مواد از طریق مخاطات بینی، دهان، حلق و دستگاه تناسلی آلوده می‌شوند (۷). مهم‌ترین راه انتقال، خوردن جنین و جفت سقط شده و ترشحات رحمی آلوده به صورت

دهانی است. این بیماری همچنین موجب اختلال در تولید مثل، کاهش تولید شیر، افزایش فاصله بین دو زایش و ناباروری می‌شود. در گاوهای نر، *B. abortus* می‌تواند ارکیت، اپیدیدیمیت و دفع باکتری از طریق اسپرم ایجاد کند (۸). در هر دو جنس، بیماری می‌تواند منجر به ناباروری و ضایعات اسکلتی-عضلانی گردد.

ایمنی علیه *B. abortus* هم از نوع هومورال و هم با واسطه سلولی است (۹). اگرچه تولید آنتی‌بادی‌ها اساس آزمایش‌های سرولوژیک بوده و در مقاومت علیه باکتری نقش دارند، به نظر می‌رسد ایمنی مؤثر بیشتر وابسته به پاسخ سلولی $Th1$ و تولید $IL-2$ و اینترفرون گاما باشد (۹-۲۱).

در تایپینگ سویه‌های بروسلا‌ی غیر کلاسیک (آتیبیک، بینابینی و گونه‌های جدید)، روش‌های بیوتایپینگ مانند فازتایپینگ و اکسیداتیو متابولیک تست کارایی محدودی دارند، چرا که باکتری زنده نیازمند آزمایشگاه با ایمنی زیستی سطح سه است و این تست‌ها زمان‌بر و وابسته به ویژگی‌های ظاهری باکتری هستند که ممکن است تغییر یابند. این روش‌ها همچنین در شناسایی گونه‌های غیر معمول مانند گونه‌های دریایی محدودیت دارند (۲۲، ۲۳، ۲۴). تایپینگ مولکولی عموماً بر اساس ۱- لیپوپلی‌ساکارید و اسیدهای چرب، ۲- پروتئین‌های غشاء خارجی یا سیتوپلاسمی، و ۳- اسیدهای نوکلئیک انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت آزمایشگاهی بروسلاها: کشت آزمایشگاهی بروسلاها را می‌توان تحت سه عنوان اصلی تقسیم‌بندی کرد: - کشت نمونه‌های غدد لنفاوی برای جداسازی باکتری *Brucella*.

- بررسی آزمایشگاهی نمونه‌ها به منظور نگهداری و مطالعه باکتری جدا شده از کشت‌ها و شناسایی آن.

- کشت انبوه باکتری برای تهیه معرف‌های تشخیصی آلودگی به سویه‌های حاد و تولید واکسن‌ها.

در کشت بروسلا از نمونه‌های مرضی، محیط‌های جامد نسبت به محیط مایع ترجیح داده می‌شوند، زیرا علاوه بر

تسهیل شناسایی پرگنه‌های بروسلا، از مداخله باکتری‌هایی با رشد سریع‌تر جلوگیری می‌نماید. توسعه محیط‌های انتخابی با اثر ویژه در پیشگیری از آلودگی، استفاده از محیط مایع برای جداسازی بروسلا را نیز امکان‌پذیر ساخته است.

معمولاً بررسی‌های آزمایشگاهی نیازمند کشت بر روی محیط جامد در لوله، پتری‌دیش یا بوآت دورو هستند. کشت در محیط مایع ممکن است منجر به تغییر در خصوصیات اصلی کشت شود، اما در صورت تأمین هوای کافی در محیط مایع طی دوره گرمخانه، می‌توان از این تغییرات جلوگیری کرد.

تا دهه‌ی ۱۹۸۰، آزمون کشت باکتریولوژیک برای تشخیص بروسلاز حیوانی چندان مورد توجه نبود، زیرا معمولاً تعداد کمی باکتری در نسوج وجود داشت و تهیه نمونه‌های عاری از آلودگی دشوار بود. با این حال، توسعه روش‌هایی برای خرد کردن آسان بافت‌ها و استفاده از محیط‌های کاملاً انتخابی، چشم‌انداز دستیابی به کشت‌های موفق را بهبود بخشید.

در میان روش‌های تشخیصی، تشخیص باکتریولوژیک می‌تواند برای نظارت مستمر بر عملکرد روش‌های سرولوژیک و تعیین وضعیت عفونت حیوانات در گله‌های دارای مشکل بکار رود (۲۴-۲۷).

شناسایی باکتری‌های بروسلا: هیچ آزمون منفردی قادر به شناسایی دقیق باکتری و تعیین تعلق آن به جنس *Brucella* نیست؛ اما ترکیبی از ویژگی‌های کشت، روش‌های سرولوژیک و باکتریولوژیک می‌تواند طبقه‌بندی این باکتری‌ها را امکان‌پذیر سازد. کارشناسان باتجربه معمولاً بر اساس ریخت‌شناسی (مورفولوژی) کلونی‌ها و نتایج آزمون آگلوتیناسیون صفحه‌ای، قادر به انجام شناسایی مقدماتی *Brucella* خواهند بود.

برای تعیین تیپ، نمونه جدا شده باید در قالب یک کشت خالص تهیه و مورد بررسی قرار گیرد. در مواردی که خصوصیات غیر معمول مشاهده شده یا باکتری از میزبان با شرایط غیر متداول جدا گردد، اجرای روش‌های رایج

باکتریولوژی برای تشخیص اولیه *Brucella* پیش از انجام آزمون‌های تعیین تیپ ضروری است.

استاندارد طلایی (Gold Standard) برای تشخیص بروسلاز، جداسازی باکتری‌های *Brucella* از نمونه‌های بالینی یا محیط کشت می‌باشد.

ریخت‌شناسی (Morphology) و رنگ‌آمیزی باکتری‌های بروسلا: *Brucella*ها باکتری‌های گرم‌منفی، کوکوباسیل هستند که معمولاً به صورت انفرادی مشاهده می‌شوند؛ هرچند ممکن است به شکل جفت یا در گروه‌های کوچک نیز وجود داشته باشند. طول باکتری بین ۰/۶ تا ۱/۵ میکرومتر و عرض آن بین ۰/۵ تا ۰/۷ میکرومتر متغیر است. ریخت‌شناسی باکتری نسبتاً پایدار بوده و اشکال چندشکلی (Pleomorphism) جز در کشت‌های کهنه به ندرت دیده می‌شود. این باکتری‌ها فاقد کپسول واقعی هستند و در رنگ‌آمیزی‌های معمول یا رنگ‌آمیزی دوقطبی قابل مشاهده نیستند، هاگ تشکیل نمی‌دهند و غیر متحرک‌اند.

بروسلاها تا حدی در برابر رنگ‌زدایی توسط اسیدهای ضعیف مقاوم بوده، بنابراین در روش رنگ‌آمیزی اصلاح‌شده زیل-نیلسون (Modified Ziehl-Neelsen) رنگ قرمز به خود می‌گیرند. رشد بروسلا در محیط‌های مایع معمولاً ضعیف است مگر در شرایط هوادهی کامل. در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۷ روز، سویه‌های صاف (Smooth) کدورت یکنواخت ملایمی همراه با ته‌نشست پودرمانند ایجاد می‌کنند، در حالی‌که سویه‌های ناصاف (Rough) ممکن است ته‌نشست دانه‌ای با کدورت متغیر و غشای نازک سطحی بر روی محیط مایع تشکیل دهند. رشد در محیط‌های مایع، احتمال تغییر شکل صاف به ناصاف را افزایش می‌دهد.

در محیط‌های نیمه‌جامد، سویه‌های وابسته به CO₂ مانند *B. abortus* و *B. ovis*، صفحه‌ای از رشد چند میلی‌متری در زیر سطح ایجاد می‌کنند؛ در حالی‌که گونه‌های غیر وابسته به CO₂، کدورتی یکنواخت از سطح تا عمق چند میلی‌متری ظاهر می‌سازند. تلقیح عمقی محیط

نیمه‌جامد با سویه‌های بروسلا هیچ نشانه‌ای از حرکت یا رشد بی‌هوازی نشان نمی‌دهد.

به‌طور معمول، پرگنه‌های بروسلا سه روز پس از کشت در محیط جامد قابل رؤیت هستند. لازم است کشت‌ها پس از این مدت بررسی شوند و هر پرگنه مشکوک پیش از رشد آلودگی‌های ثانویه مجدداً کشت گردد. رشد در محیط‌های انتخابی ممکن است چند روز به تأخیر بیفتد؛ بنابراین بررسی رشد باید در هر دو نوع محیط انتخابی و غیر انتخابی ابتدا پس از ۴ یا ۵ روز و سپس مجدداً در روزهای ۸ یا ۱۰ انجام گیرد (۲۶).

خصوصیات رشد باکتری‌های بروسلا: باکتری‌های

بروسلا هوازی بوده و بسیاری از سویه‌ها برای رشد به دی‌اکسید کربن (CO_2) نیاز دارند. این باکتری‌ها به کندی رشد کرده و نسبت به سایر باکتری‌های هوازی تا حدی مشکل‌پسند هستند. برای رشد آنها وجود تیامین، نیکوتینامید و بیوتین ضروری است. همچنین، افزودن ۵ تا ۱۰ درصد سرم نرمال می‌تواند رشد باکتری را تحریک کند. در محیط‌های حاوی نمک‌های صفاوی و سلنیت، رشد بروسلا مهار می‌شود. در مشاهده بوآت‌ها تحت منبع نور (ترجیحاً نور غیر مستقیم روز)، پرگنه‌های بروسلا معمولاً ۳ تا ۴ روز پس از کشت به صورت گرد، با قطر ۱ تا ۲ میلی‌متر، شفاف و با حاشیه زرد کم‌رنگ عسلی دیده می‌شوند. در مراحل بعد، پرگنه‌ها بزرگ‌تر و تیره‌تر شده ولی همچنان شفاف باقی می‌مانند. در مشاهده از بالا، پرگنه‌ها محدب و به رنگ سفید مرواریدی هستند.

در جداسازی اولیه ممکن است پرگنه‌ها به‌طور غیر معمول، در ارتباط با گلبول‌های چربی یا قطعات بافت موجود در محیط کشت مشاهده شوند. جستجوی کامل سطح بوآت ضروری است، زیرا در بسیاری موارد ممکن است تنها یک پرگنه وجود داشته باشد (۱۷، ۲۸).

پرگنه‌های مشکوک به *Brucella* که نزدیک به کلونی‌های دیگر یا عوامل ثانویه دیده می‌شوند، باید با احتیاط برداشته شده و مجدداً بر روی محیط انتخابی کشت شوند. اگر تنها پرگنه‌های مظنون به بروسلا در یک بوآت

وجود داشته باشد، ابتدا باید چند پرگنه بر روی محیط جامد در لوله و محیط پایه در بوآت کشت گردد و سپس این کشت‌ها برای جداسازی تک‌پرگنه‌های خالص مورد استفاده قرار گیرد. پس از ۴ تا ۵ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های مجزای ایجاد شده در بوآت از نظر ریخت‌شناسی (مطابق توصیفات پیش‌گفته) بررسی شده و با میکروسکوپ با بزرگنمایی کم و نور مورب (oblique illumination) ارزیابی خواهند شد.

تشخیص مولکولی بروسلا: برای شناسایی بروسلا و

ارتقای قابلیت‌های تشخیصی، تعداد زیادی آزمون مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توسعه یافته و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روش‌ها جنبه‌های مختلف فرآیند تشخیص را هدف قرار می‌دهند. در برخی موارد، هدف صرفاً شناسایی کلی بروسلا بوده است؛ مانند تشخیص بروسلاز انسانی یا آلودگی مواد غذایی، که در این حالت یک آزمون PCR مبتنی بر ژن اختصاصی کافی است. تست‌های اختصاصی ژنی اغلب ساده، پایدار و نسبتاً مقاوم در برابر اثرات محیطی هستند و قادرند بروسلا را در سطح گونه و حتی اخیراً در سطح بیوار شناسایی کنند.

مزایای اصلی روش‌های PCR شامل نیاز حداقلی به کار با باکتری زنده، کاهش خطر آلودگی زیستی، دستیابی به نتایج در زمان کوتاه و توانایی استفاده از خروجی ژنتیکی برای مطالعات اپیدمیولوژیک و کنترل بیماری است. این روش‌ها غالباً کارآمدتر، عملی‌تر و سریع‌تر از روش‌های کلاسیک در شناسایی گونه‌های بروسلا و بررسی شیوع بیماری هستند (۲۹). با این حال، پیش از استفاده از آزمون PCR در تشخیص‌های روتین آزمایشگاهی بروسلاز، لازم است حساسیت، اختصاصیت، کیفیت کنترل و تضمین کیفیت این تست‌ها روی نمونه‌های بالینی به‌طور کامل اعتبارسنجی شود. تا امروز بیش از ۵۰۰ گزارش علمی درباره روش‌های مختلف PCR در تشخیص بروسلاز منتشر شده که عمدتاً مبتنی بر DNA بروسلا استخراج‌شده مستقیم از باکتری‌های کشت‌شده یا از نمونه‌های بافتی بوده‌اند. کیفیت و خلوص DNA تأثیر بالایی بر قابلیت

شناسایی در سطح گونه دارد و وجود مهارکننده‌ها می‌تواند کارایی PCR را کاهش دهد.

نمونه‌هایی که حاوی ترکیباتی نظیر EDTA، RNase، DNase، هموگلوبین، هیپارین، فنل، پلی‌آمین‌ها، پلی‌ساکاریدهای گیاهی، ادرار، آلکینات کلسیم یا سایر مواد مداخله‌کننده باشند، ممکن است منجر به نتایج منفی کاذب شوند. همچنین، آلودگی نمونه یا انتقال DNA بین نمونه‌ها می‌تواند باعث بروز نتایج مثبت کاذب شود.

برای استفاده مطمئن از PCR، ایجاد و استفاده از کنترل‌های مثبت و منفی استاندارد، کنترل داخلی، مهارکننده‌ها، استانداردسازی واکنش‌دهنده‌ها، تضمین کیفیت و پیشگیری از آلودگی ضروری است. این روش‌ها قابلیت کاربرد در شناسایی سویه‌های جدا شده از فیلد و تأیید هویت سویه‌های واکنش را دارند (۳۰-۳۲).

از جمله کاربردهای تخصصی PCR، تشخیص مولکولی واکنش *Rev1 B. melitensis* و تمایز همزمان سویه‌های فیلدی و واکنشی از طریق PCR چندگانه بر اساس لوکوس‌های متعدد ژنوم بروسلا است (۳۳، ۳۴). تمایز

سویه‌های واکنش از عوامل عفونی در گله‌های واکنش شده اهمیت بالایی دارد. به همین منظور، شناسایی مبتنی بر PCR برای تمایز سویه‌های واکنش *B. abortus* و RB51 نیز در مطالعات متعدد مورد استفاده قرار گرفته است (۳۵-۴۰).

نتایج

نمونه‌های ارسالی از سراسر کشور از دامداری‌های راکتور مثبت و از دام‌های ماده کشتار شده در کنار یخ و در ظروف درب پیچ‌دار پلاستیک مخصوص نمونه و قفل‌دار در یونولیت عایق به گرما ارسال شد. مشخصات هر نمونه روی ظروف شامل نوع نمونه، محل جداسازی، نام دامدار، شماره کدلیمز نوشته شده بود. غدد لنفاوی ارسال شده از دام‌های کشتار شده و از ناحیه غدد فوق پستانی بودند، در برخی نمونه‌ها نوع غده مشخص نشده بود. دام‌های کشتار شده همگی دارای تیترو سرولوژی مثبت در رزبنگال و رایت بودند. نمونه‌ها به محض رسیدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و کشت داده شدند. تعداد دامداری‌ها در جدول ۲ مشخص شده است.

جدول ۲- لیست دامداری‌های راکتور مثبت ارسال کننده غدد لنفاوی از گاوهای ماده شیری

ردیف	استان	تعداد دامداری	تعداد نمونه نمونه ارسالی	جنس دام
۱	قزوین	۶	۲۴	ماده
۲	فارس	۲	۲۸	ماده
۳	تهران	۵	۱۶	ماده
۴	آذربایجان شرقی	۸	۱۶	ماده
۵	البرز	۳	۲۴	ماده
۶	کرمانشاه	۱	۱۰	ماده
۷	اصفهان	۲	۱۷	ماده
۸	اردبیل	۲	۴	ماده
۹	قم	۴	۲۱	ماده
۱۰	کرمان	۲	۷	ماده
۱۱	مرکزی	۱	۷۰	ماده
۱۲	آذربایجان غربی	۱	۱	ماده
۱۳	لرستان	۲	۱۵	ماده
۱۴	چهارمحال و بختیاری	۱	۳	ماده
۱۵	سمنان	۱	۱	ماده
جمع	استان‌های دارای راکتور مثبت	۴۲	۲۵۷	ماده

مجموعاً ۶۲ ایزوله بروسلا از ۲۵۷ نمونه غدد لنفاوی مربوط به ۴۲ دامداری ارجاعی از دامداری‌های راکتور مثبت

جداسازی شدند. جزئیات نتایج نمونه‌های کشت داده شده در جدول ۲ نشان داده شده است. باکتری‌های جدا شده

به‌عنوان بروسلا ملیتنسیس و بروسلا ابورتوس شناسایی شدند. تعداد سویه‌های جداسازی شده ۲۸ ایزوله بروسلا ملیتنسیس بیوار ۱، ۵ ایزوله بروسلا ملیتنسیس بیوار ۳، و تعداد ۲۹ ایزوله بروسلا ابورتوس بیوار ۳ با روش بایوتایپینگ شناسایی شدند.

دارای ویژگی‌های فنوتیپی گونه‌های بروسلا بودند. پس از ۵-۱۰ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تمام جدایه‌ها در ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن (CO₂) رشد کردند. باکتری‌های جداشده، گرم منفی بودند و کلنی‌های شیری‌رنگ و براق با سطح صاف تشکیل می‌دادند. جدایه‌ها مورد بررسی تعیین بیوار قرار گرفتند جدایه‌ها همگی

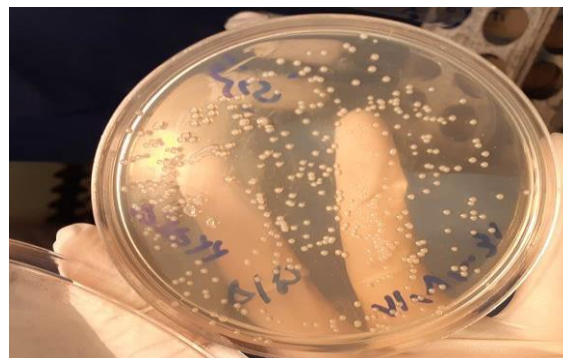
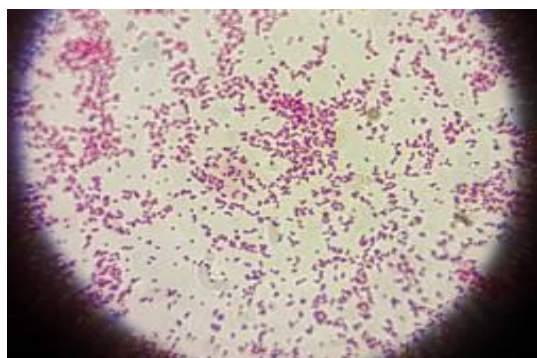
جدول ۳- خصوصیات فازتایپینگ گونه‌های جداسازی شده

code	Species/biovar	H ₂ S	CO ₂	A	M	S/R	Fuchsin 1/50000	Fuchsin 1/100000	Thionin 1/50000	Thionin 1/100000	Tb RTD	Tb RTD*10 ⁴	IZ	PCR-AMOS
1	B. m 1	-	-	-	+	S	+	+	+	+	NL	NL	L	B. m
2	B. m 3	-	-	+	+	S	+	+	+	+	NL	NL	L	B. m
3	B. ab3	+	+	+	-	S	+	+	+	+	L	L	L	B. ab

در رنگ‌آمیزی گرم به‌صورت کوکوباسیل قرمز رنگ دیده می‌شوند (شکل ۱).

ارزیابی ریخت‌شناسی کلنی شامل رنگ و اندازه:

به‌طور معمول اندازه کلنی باکتری بروسلا یک تا دو میلی‌متر در کشت ۴۸ ساعته می‌باشد. و به رنگ عسلی دیده می‌شود.



شکل ۱- کلنی باکتری بروسلا یک تا دو میلی‌متر در کشت ۴۸ ساعته و به رنگ عسلی (سمت راست)، در رنگ‌آمیزی گرم به صورت کوکوباسیل قرمز رنگ (سمت چپ)

جدول ۴- نتایج کشت، سرولوژی و تایپینگ نمونه‌های غدد لنفاوی

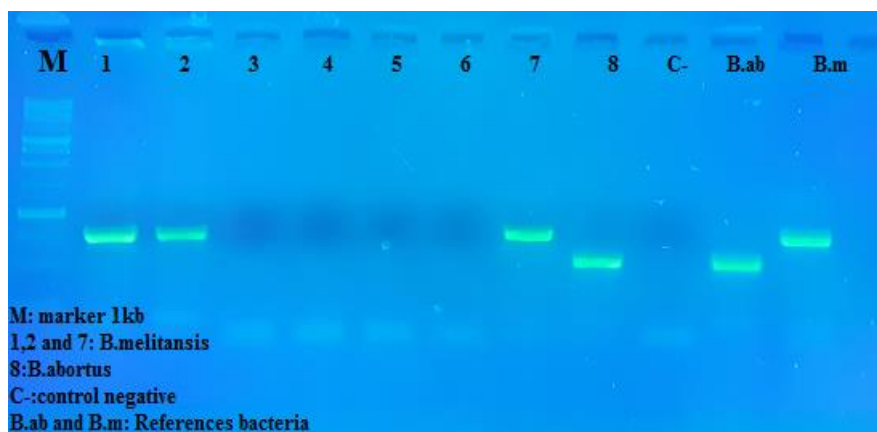
شماره نمونه	استان	تعداد نمونه ارسالی	تعداد نمونه‌های مثبت	باکتری جداسازی شده	بایوتیپ	PCR	نتایج سرولوژی رزبنگال و رایت
۱	قزوین	۲۴	۶	بروسلا ملیتنسیس	۱	بروسلا ملیتنسیس	مثبت
۲	فارس	۲۸	۲	بروسلا ملیتنسیس	۱	بروسلا ملیتنسیس	مثبت
۳	تهران	۱۶	۳	بروسلا ابورتوس	۳	بروسلا ابورتوس	مثبت
۴	آذربایجان شرقی	۱۶	صفر	منفی	منفی	منفی	مثبت
۵	البرز	۲۴	۴	بروسلا ملیتنسیس	۱	بروسلا ملیتنسیس	مثبت
۶	کرمانشاه	۱۰	۶	بروسلا ملیتنسیس	۱	بروسلا ملیتنسیس	مثبت
۷	اصفهان	۱۷	۵	بروسلا ابورتوس	۳	بروسلا ابورتوس	مثبت
			۲	بروسلا ملیتنسیس	۳	بروسلا ملیتنسیس	

۸	اردبیل	۴	۱	بروسلا ملیتنسیس	۳	بروسلا ملیتنسیس	مثبت
۹	قم	۲۱	۱۴	بروسلا ابورتوس	۳	بروسلا ابورتوس	مثبت
۱۰	کرمان	۷	۵	بروسلا ملیتنسیس بروسلا	۱	بروسلا ملیتنسیس بروسلا	مثبت
۱۱	مرکزی	۷۰	۲	ملیتنسیس	۳	ملیتنسیس	مثبت
۱۲	آذربایجان غربی	۱	صفر	منفی	منفی	منفی	مثبت
۱۳	لرستان	۱۵	۱	بروسلا ملیتنسیس	۱	بروسلا ملیتنسیس	مثبت
۱۴	چهارمحال بختیاری	۳	۶	بروسلا ابورتوس	۳	بروسلا ابورتوس	مثبت
۱۵	سمنان	۱	۱	بروسلا ابورتوس	۳	بروسلا ابورتوس	مثبت
جمع		۲۵۷	۶۱	بروسلا ابورتوس	۱	بروسلا ملیتنسیس	مثبت

برای بروسلا ابورتوس باند ۴۹۸ بازی و برای بروسلا ملیتنسیس باند ۷۳۱ بازی را نشان دادند. (شکل ۲ و ۳).

تأیید باکتری‌های جداسازی شده با روش PCR:

در روش مولتی‌پلکس PCR باکتری‌های شناسایی شده،



شکل ۲- نمونه‌های جداسازی شده با روش مولتی پلکس PCR

ستون اول یک مارکر 1Kb، ستون ۱، ۲ و ۷ بروسلا ملیتنسیس، ستون ۳، ۴، ۵ و ۶ نمونه‌های منفی، ستون ۸ بروسلا ابورتوس، ستون ۹ کنترل منفی، ستون ۱۰ و ۱۱ کنترل مثبت بروسلا ابورتوس و بروسلا ملیتنسیس

اگرچه کشت، بهترین روش اثبات وجود بیماری محسوب می‌شود، اما روش‌های باکتری‌شناسی زمان‌بر بوده و در موارد تحت‌حاد و مزمن با موارد منفی کاذب فراوان همراه هستند؛ بنابراین، ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش تشخیص بروسلاز آزمایش‌های سرولوژیک است. بدیهی است که پیش از استفاده از یک روش تشخیصی باید از اعتبار و اعتماد آن آگاه بود (۴۵-۵۴).

آزمایش‌های سرولوژیکی مانند الایزا، تست تثبیت کمپلمان (CFT)، آزمایش آگلوتیناسیون سرم و آزمایش حلقه شیر می‌توانند پاسخ‌های غیر اختصاصی داشته باشند،

بحث و نتیجه‌گیری

بروسلاز بیماری مسری و مشترک بین انسان و دام است که توسط گونه‌های مختلف جنس بروسلا ایجاد می‌شود. باکتری بروسلا بیشترین تمایل را به جفت، مایعات جنینی و دستگاه تناسلی دام‌های نر و ماده دارد و عمدتاً تولیدمثل، بقای نوزادان و تولید شیر را در حیوانات مبتلا تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ لذا ضررهای اقتصادی زیادی را بر صنعت دامپروری وارد می‌سازد. تشخیص بروسلاز به دلیل علائم بالینی متعدد و غیراختصاصی، همواره نیازمند روشی حساس، اختصاصی، سریع و ارزان است (۴۰-۴۵).

زیرا واکنش متقاطع با سایر باکتری‌های دارای آنتی‌ژن‌های مشترک در آنها رخ می‌دهد (۵۵-۵۹). همچنین واکنش‌های ایمنی با حساسیت پایین یا بالا، بسته به شیوع تحت بالینی یا بومی بیماری مشاهده می‌شوند (۳۴، ۶۰، ۶۱). محدودیت دیگر تست‌های سرولوژیک این است که نمی‌توانند بین حیوانات آلوده و صرفاً در معرض بیماری تمایز قائل شوند (۶۲-۷۱). در واقع، حیواناتی که تست سرمی مثبت دارند ممکن است واقعاً آلوده باشند، قبلاً آلوده شده و بهبود یافته باشند، یا حیوانات مقاومی باشند که تنها در معرض بروسلا قرار گرفته‌اند. عوامل تعیین‌کننده مقاومت طبیعی در برابر بروسلا گزارش شده‌اند (۷۲-۷۹، ۱۴).

جداسازی باکتریولوژیکی بروسلا به‌عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص قطعی بیماری محسوب می‌شود (۸۰-۸۳). با این حال، این روش برای تشخیص در مقیاس گسترده، پرزحمت است؛ به‌دلیل زمان طولانی انکوباسیون (۱۰ تا ۱۵ روز) و خطر بالای آلوده شدن پرسنل آزمایشگاهی. علاوه بر این، فقدان محیط انتخابی دقیق باعث رشد بیش از حد آلودگی‌ها بر سطح پلیت‌های باکتری می‌شود.

محدودیت‌های تشخیص بروسلا در شیر گاو همان‌طور که در مقالات منتشر شده گزارش شده است بسیار متفاوت است، از $2/8 \times 10^4$ cfu/mL تا 2×10^3 cfu/mL (۱۰۲) و بین 5 cfu/mL و 50 گزارش شده است. علاوه بر این، محدودیت‌های متفاوتی برای گونه‌های مختلف گزارش شد. به‌عنوان مثال، در یک مطالعه بر روی نمونه‌های شیری که به‌طور مصنوعی با بروسلا ابورتوس یا بروسلا ملیتنسیس استفاده می‌شد، محدودیت‌های تشخیص 100 cfu/ml برای بروسلا ابورتوس و 1000 cfu/ml برای بروسلا ملیتنسیس گزارش شده است (۸۲). بنابراین، عوامل مختلفی ممکن است بر حساسیت PCR تأثیر بگذارد، از جمله این موارد می‌توان به اثربخشی پروتکل استخراج DNA، میزان نمونه پردازش شده، سنجش مولکولی مورد استفاده و گونه‌های بروسلای آزمایش شده اشاره کرد.

آزمایش رزبنگال و الیزا به‌ترتیب، آنتی‌بادی بروسلا را

در نمونه‌های گاومیش با درصد مثبت $9/38$ و $6/92$ در پاکستان گزارش کردند (۸۴). نمونه خون از 750 رأس گاومیش شیرده غیر واکسینه جمع‌آوری شد. در این ارزیابی، بروسلا ملیتنسیس بیوار ۳ از شش گاومیش در مصر جداسازی شد و روش‌های مولکولی نیز وجود آن را در سطح گونه تأیید کردند (۸۵). در مطالعه‌ای دیگر در پاکستان مشخص شد که تب مالت در سطوح بالایی در گاو و گاومیش بومی است؛ به‌طوری که $1/15$ درصد از نشخوارکنندگان بزرگ سرم مثبت داشتند و تقریباً یک‌سوم مزارع لبنی حداقل یک آزمایش مثبت داشتند. در مجموع، $9/7$ درصد از افراد در تماس مستقیم با دام، سرم مثبت بودند که نشان‌دهنده خطر بالای مواجهه با بروسلا در این گروه است (۸۶-۹۸).

آزمایش حلقه شیر که در گاو بسیار مفید است، در نشخوارکنندگان کوچک بی‌اثر است. در گله‌های بزرگ (بیش از 100 گاو شیرده)، حساسیت آن کاهش یافته و احتمال نتایج مثبت کاذب بالا می‌رود؛ عواملی مانند ورم پستان، آغوز، شیر پایان دوره شیردهی، اختلالات هورمونی، پاستوریزاسیون و هم‌گن‌سازی در این امر مؤثرند (۱، ۸۷-۹۲).

در منطقه مدیترانه شرقی، بیوتیپ ۳ بروسلا ابورتوس غالب است. کشت باکتریولوژیک، ایمونوهیستوشیمی، PCR و qPCR روش‌های مستقیم تشخیص بروسلا محسوب می‌شوند. با این حال، به‌دلیل هزینه و نیاز به آزمایشگاه‌های اختصاصی، در اهداف نظارتی بیشتر از آزمون‌های غیر مستقیم استفاده می‌شود (۹۲-۹۳، ۱۲).

سویه‌ی جدا شده در این مطالعه از روز پنجم به بعد شناسایی شد. بیوتیپ‌های بروسلا ملیتنسیس (۱ و ۳) و بروسلا ابورتوس (۱ و ۳) با روش‌های بیوشیمیایی، سرولوژیکی و فاژتایپینگ تعیین شدند. جداسازی B. abortus بیوتیپ I از بوفالوهای وحشی آزاد در پارک ملی کروگر آفریقای جنوبی گزارش شده و منشاء آن احتمالاً از دام‌های اهلی بوده است (۹۹-۱۰۲).

جداسازی بروسلا فرایندی دشوار، خسته‌کننده، پرخطر

سرم‌سازی رازی و همکاران بخش بروسلوز تشکر می‌شود. این مقاله از طرح پژوهشی با عنوان جداسازی و تعیین بایوار سویه‌های بروسلا در گردش در گاوهای شیری با کد مصوب ۱۸-۱۸۵۷-۰۰۶-۰۱۰۳۳۱ استخراج شده است.

و زمان‌بر است، بنابراین بسیاری از مطالعات اخیر از روش‌های مستقل از کشت مانند الیزا و PCR برای تشخیص عفونت استفاده می‌کنند.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم مؤسسه تحقیقات واکسن و

References

- 1- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: INRA; 1988.
- 2- Alamian S, Amiri K, Bahreinipour A, et al. Brucella species circulating in rural and periurban dairy cattle farms: a comparative study in an endemic area. *Trop Anim Health Prod.* 2021; 53(2): 200. [In persian]
- 3- Alamian S, Dadar M, Afshar E, Bosilkovski M, Alamian MM. Isolation of Brucella melitensis from lumbar vertebrae in patient with initial misdiagnosis: a rare case with spinal epidural abscess, spinal stenosis, and brain lesion.
- 4- Barton CE, Lomme JR. Reduced-dose whole herd vaccination against brucellosis: a review of recent experience. *J Am Vet Med Assoc.* 1980; 177(12): 1218-1220.
- 5- Bosseray N. Brucella melitensis Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals.* 1991; 19(4): 355-63.
- 6- Bosseray N, Plommet M. Brucella suis S2, Brucella melitensis Rev 1 and Brucella abortus S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three Brucella species challenge strains in mice. *Vaccine.* 1990; 8(5): 462-8.
- 7- Bosseray N. Brucella melitensis Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals.* 1991; 19(4): 355-63.
- 8- Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, Palmer MV, Florance AM. Effects of age at vaccination on efficacy of Brucella abortus strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res.* 1996; 57(8): 1153-56.
- 9- Confer AW, Hall SM, Faulkner CB, Espe BH, Deyoe BL, Morton RJ, et al. Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of Brucella abortus strain 19. *Vet Mic.* 1985; 10(6): 561-575.
- 10- Corner LA, Alton GG. Persistence of Brucella abortus strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res Vet Sci.* 1981; 31(3): 342-344.
- 11- European Pharmacopoeia. 7th ed. Brucella abortus & Brucella melitensis. 2012. p. 141-143.
- 12- Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, et al. Vaccination with Brucella abortus rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of B. abortus, melitensis and ovis. *Infect Immun.* 1994; 62(11): 4990-96.
- 13- Hasannia E, Soleimani S, Alamian S, Behrozikhah A, Emadi A, Dostdari S. Stability study of Iriba brucellosis full-dose and reduced-dose vaccine produced by Razi institute in Iran. *Arch Razi Inst.* 2015; 70(1): 37-44. [In persian]
- 14- Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW Jr, Brees D. Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with Brucella abortus 19 or RB51. *Infect Immun.* 1995; 63(1): 264-70.
- 15- de Jager FAO. The quality control of vaccines against Brucellosis. P: 161.
- 16- Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, et al. Vaccination with Brucella abortus rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of B. abortus, melitensis and ovis. *Infect Immun.* 1994; 62(11): 4990-96.
- 17- Fensterbank R. Brucellosis in cattle, sheep and goats: diagnosis, control and vaccination. In: Brucellosis in cattle, sheep and goat. Technical Series No. 6. Paris: OIE. 1987; p: 9-35.
- 18- Leite K, Dorneles EMS, Pauletti RB, Poester FP, Lage AP. Brucella abortus S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine.* 2015; 33(4): 507-511.

- 19- OIE.** World Organisation for Animal Health. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2016; Chapter 2.1.4.
- 20- Olsen SC.** Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res Vet Sci.* 2000; 69(2): 135-140.
- 21- Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF.** Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res.* 1997; 58(5): 472-477.
- 22- Pugh GW Jr, Zehr ES, Meador VP, Phillips M, McDonald TJ, Deyoe BL.** Immunologic, histopathologic, and bacteriologic responses of five strains of mice to *Brucella abortus* strain 2308. *Am J Vet Res.* 1989; 50(3): 323-28.
- 23- Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF.** Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res.* 1997; 58(5): 472-77.
- 24- Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW Jr, Brees D.** Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infect Immun.* 1995; 63(1): 264-70.
- 25- Olsen SC.** Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res Vet Sci.* 2000; 69(2): 135-140.
- 26- Bosseray N, Plommet M, Poinot J. Brucella melitensis Rev.** 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals.* 1991; 19(4): 355-363.
- 27- Uzal F, Samartino L, Schurig G, Carrasco A, Nielsen K, Cabrera R, et al.** Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Vet Res Comm.* 2000; 24(3): 143-151.
- 28- Bosseray N.** *Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals.* 1991; 19(4): 355-63.
- 29- Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Jiménez-Rojas C, Barquero-Calvo E, Chacón-Díaz C, Viquez-Ruiz E, et al.** *Brucella neotomae* infection in humans, Costa Rica. *Emerg Infect Dis.* 2017; 23(6): 997.
- 30- Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, et al.** Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect Immun.* 1994; 62(11): 4990-96.
- 31- Olsen SC.** Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* Strain RB51. *Res Vet Sci.* 2000; 69(2): 135-140.
- 32- Xavier MN, Paixão TA, den Hartigh AB, Tsolis RM, Santos RL.** Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet Sci J.* 2010; 4(1): 109-18.
- 33- Nicoletti P.** An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Health Prod.* 1992; 24(1): 40-44.
- 34- Sousa MG, Salvarani FM, Bomjardim HA, Brito MF, Barbosa JD.** Brucellosis in water buffaloes. *Pesq Vet Bras.* 2017; 37: 234-40.
- 35- Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, et al.** Bovine brucellosis—a comprehensive review. *Vet Q.* 2021; 41(1): 61-88.
- 36- Das V, Paranjape V, Corbel M.** Investigation of brucellosis-associated abortion in dairy buffaloes and cows in Bombay. *Indian J Anim Sci.* 1990; 60(10): 1193-94.
- 37- Fosgate GT, Diptee MD, Ramnanan A, Adesiyun AA.** Brucellosis in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. *Trop Anim Health Prod.* 2011; 43(8): 1479-86.
- 38- Adams LG, Templeton JW.** Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev Sci Tech.* 1998; 17(1): 200-19.
- 39- Borriello G, Capparelli R, Bianco M, Fenizia D, Alfano F, Capuano F, et al.** Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect Immun.* 2006; 74(4): 2115-20.
- 40- Dehkordi F, Khamesipour F, Momeni M.** *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Iranian bovine and buffalo semen samples: the first clinical trial on seasonal, senile and geographical distribution using culture, conventional and real-time polymerase chain reaction assays. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2014; 20(6): 821-28. [In persian]
- 41- Wyatt HV.** How did Sir David Bruce forget Zammit and his goats? *J Maltese Hist.* 2014; 4(1): 45.
- 42- Blankenship RM, Sanford JP.** *Brucella canis*: a cause of undulant fever. *Am J Med.* 1975; 59(3): 424-26.
- 43- Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M.** Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. *Iran J Clin Infect Dis.* 2008; 3(4): 185-88.
- 44- Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ.** Brucellosis—new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(6): 1270-81.

- 45- Köse Ş, Kiliç S, Özbel Y. Identification of *Brucella* species isolated from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey. *J Basic Microbiol.* 2005; 45(4): 323-27.
- 46- Maadi H, Moharamnejad M, Haghi M. Prevalence of brucellosis in cattle in Urmia, Iran. *Pak Vet J.* 2011; 31(1): 81-2.
- 47- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Bacteriol.* 1990; 172(7): 3569-76.
- 48- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15(2): 293-96.
- 49- Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: phylogeography and relationship to biovars. *Front Microbiol.* 2016; 7: 2049.
- 50- Sánchez-Sarmiento AM, Carvalho VL, Díaz-Delgado J, Ressio RA, Fernandes NC, Guerra JM, et al. Molecular, serological, pathological, immunohistochemical and microbiological investigation of *Brucella* spp. in marine mammals of Brazil reveals new cetacean hosts. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 67(1): 169-83.
- 51- Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Hernández-Mora G, González-Barrientos R, Palacios-Alfaro JD, Barquero-Calvo E, et al. *Brucella* sequence Type 27 isolated from Dwarf Sperm Whale (*Kogia sima*) stranded in the Costa Rican Pacific Coast. *Access Microbiol.* 2019; 1(1A): e000002.
- 52- Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Bronze MS. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am J Med Sci.* 2002; 323(6): 299-315.
- 53- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique; 1988.
- 54- Andriopoulos P, Kalogerakou A, Rebelou D, Gil APR, Zyga S, Gennimata V, et al. Prevalence of *Brucella* antibodies on a previously acute brucellosis infected population: sensitivity, specificity and predictive values of Rose Bengal and Wright standard tube agglutination tests. *Infection.* 2015; 43(3): 325-30.
- 55- Dohoo IR, Wright PF, Ruckerbauer GM, Samagh BS, Robertson FJ, Forbes LB. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can J Vet Res.* 1986; 50(4): 485-93.
- 56- Alton GG, Maw J, Rogerson BA, McPherson GG. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Aust Vet J.* 1975; 51(2): 57-63.
- 57- Greiner M, Verloo D, de Massis F. Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests. *Prev Vet Med.* 2009; 92(4): 373-81.
- 58- Emmerzaal A, De Wit J, Dijkstra T, Bakker D, Van Zijderveld F. The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet Q.* 2002; 24(1): 40-46.
- 59- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J.* 2010; 51(4): 296-305.
- 60- Nielsen K, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 46(3-4): 285-91.
- 61- Sutherland SS. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with *Brucella abortus*. *Vet Mic.* 1984; 10(1): 23-32.
- 62- Bercovich Z, Moerman A. Non-specific positive milk ring test(s) in tank milk and Estrumate in the treatment of cattle. *Tijdschr Diergeneeskd.* 1979; 104(18): 713-16.
- 63- Al-Mashhadany DA. The significance of milk ring test for identifying brucella antibodies in cows and buffaloes' raw milk at Erbil governorate, Iraq. *Iraqi J Vet Sci.* 2019; 33(2): 395-400.
- 64- Erkmen O. Microbiological analysis of foods and food processing environments. Academic Press; 2021; p. 69.
- 65- Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(11): 3437-42.
- 66- Büyükcangaz E, Şen A, Kahya S. Isolation and biotyping of *Brucella melitensis* from aborted sheep and goat fetuses. *Turk J Vet Anim Sci.* 2009; 33(4): 311-6.
- 67- Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol.* 2002; 90(1-4): 435-46.

- 68- Yu WL, Nielsen K.** Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J.* 2010; 51(4): 306-13.
- 69- Ali S, Ali Q, Melzer F, Khan I, Akhter S, Neubauer H, et al.** Isolation and identification of bovine *Brucella* isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR. *Trop Anim Health Prod.* 2014; 46(1): 73-78.
- 70- Bricker BJ, Halling SM.** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(11): 2660-66.
- 71- Jiang H, Fan M, Chen J, Mi J, Yu R, Zhao H, et al.** MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates. *BMC Microbiol.* 2011; 11(1): 256.
- 72- Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, et al.** A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol.* 2002; 87(2): 139-47.
- 73- Memish ZA, Balkhy HH.** Brucellosis and international travel. *J Travel Med.* 2004; 11(1): 49-55.
- 74- Ezama A, Gonzalez JP, Majalija S, Bajorirwe F.** Assessing short evolution brucellosis in a highly brucella endemic cattle keeping population of Western Uganda: a complementary use of Rose Bengal test and IgM rapid diagnostic test. *BMC Public Health.* 2018; 18(1): 315.
- 75- Shoukat S, Wani H, Ali U, Para PA, Ara S, Ganguly S.** Brucellosis: a current review update on zoonosis. *J Immunol Immunopathol.* 2017; 19(2): 61-9.
- 76- Sofian M, Sheikholeslami M, Mahdaviani FA, Aghakhani A, Banifazl M, Eslamifar A, et al.** Low prevalence of *Brucella* agglutinins in blood donors in central province of Iran. *Iran J Microbiol.* 2013; 5(1): 24-7. [In persian]
- 77- Alavi SM, Rafiei A, Nikkhoui A.** The effect of lifestyle on brucellosis among nomads in Khuzestan province of Iran. *Pak J Med Sci.* 2007; 23(3): 358. [In persian]
- 78- Ashrafganjooyi S, Saedadeli N, Alamian S, Khalili M, Shirazi Z.** Isolation and biotyping of *Brucella* spp. from sheep and goats raw milk in southeastern Iran. *Trop Biomed.* 2017; 34(3): 507-11. [In persian]
- 79- 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. *Int J Occup Environ Med.* 2010; 1(2): 70-6. [In persian]
- 80- Dastjerdi MZ, Nobari RF, Ramazanpour J.** Epidemiological features of human brucellosis in central Iran, 2006–2011. *Public Health.* 2012; 126(12): 1058-62. [In persian]
- 81- Sofian M, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A.** Risk factors for human brucellosis in Iran: a case-control study. *Int J Infect Dis.* 2008; 12(2): 157-61. [In persian]
- 82- Khan TI, Ehtisham-ul-Haque S, Waheed U, Khan I, Younus M, Ali S.** Milk Indirect-ELISA and Milk Ring Test for screening of brucellosis in buffaloes, goats and bulk tank milk samples collected from two districts of Punjab, Pakistan. *Pak Vet J.* 2018; 38(1): 37-41.
- 83- Patel P, Modi L, Patel S, Jadhav K, Falguni M.** Seroprevalence of Brucellosis in buffalo bulls used for natural service in Mehsana milk shed area, Gujarat. *JIVA.* 2011; 9(2): 64-5.
- 84- Patel KB, Chauhan H, Patel S, Patel B, Shrimali M, Chandel B.** Molecular detection of *Brucella abortus* using bscp31 and IS711 gene based pcr assay in cattle and buffalo. *Buffalo Bull.* 2018; 37(1): 71-80.
- 85- Amoroso MG, Salzano C, Cioffi B, Napolitano M, Garofalo F, Guarino A, et al.** Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* spp. in water buffalo milk. *Food Control.* 2011; 22(8): 1466-70.
- 86- Ewalt DR, Bricker BJ.** Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(8): 3085-6.
- 87- Benkirane A.** Ovine and caprine brucellosis: World distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. *Small Rumin Res.* 2006; 62(1-2): 19-25.
- 88- Ducrottoy M, Bertu W, Matope G, Cadmus S, Conde-Álvarez R, Gusi AM, et al.** Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Trop.* 2017; 165: 179-93.
- 89- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE.** Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2003; 15(4): 374-8.
- 90- Lopez-Goñi I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM, et al.**

Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(10): 3484-7.

91- Price RE, Templeton JW, Smith R 3rd, Adams LG. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 1990; 58(4): 879-86.

92- Blasco JM, Marin C, Jiménez de Bagués M, Barberan M, Hernandez A, Molina L, et al. Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(8): 1835-40.

93- Dobson A, Meagher M. The population dynamics of brucellosis in the Yellowstone National Park. *Ecology.* 1996; 77(4): 1026-36.

94- OIE. Bovine brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2004; Part 2: Section 2.3.

95- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(10): 3741-51.

96- Hamdy ME, Amin AS. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels.

97- Hussain I, Arshad MI, Mahmood MS, Akhtar M. Seroprevalence of brucellosis in human,

cattle, and buffalo populations in Pakistan. *Turk J Vet Anim Sci.* 2008; 32(4): 315-8.

98- Hosein HI, Zaki HM, Safwat NM, Men-shawy AM, Rouby SR, Mahrous A, et al. Evaluation of the General Organization of Veterinary Services control program of animal brucellosis in Egypt: an outbreak investigation of brucellosis in buffalo. *Vet World.* 2018; 11(6): 748-54.

99- Gül K, Boynukara B, Ilhan Z, Ekin IH, Gül Y. Comparison of the dot-immunobinding assay with the serum agglutination test, the rose bengal plate test and the milk ring test for the detection of *Brucella* antibodies in bovine sera and milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 1999; 46(5): 279-85.

100- Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra A, Poonia JS. Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol.* 2005; 108(3-4): 305-11.

101- Renukaradhya GJ, Isloor S, Rajasekhar M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Vet Microbiol.* 2002; 90(1-4): 183-95.

102- Abbas BA, Aldeewan AAH. Occurrence and epidemiology of *Brucella* spp. in raw milk samples at Basrah province, Iraq. *Bulg J Vet Med.* 2009; 12(2): 113-20.




Isolation and Biovar Determination of *Brucella* Strains in Dairy Cattle of Iran

Saeed Alamian*

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

Receive: September 23, 2024; Revise: October 29, 2024; Accept: November 12, 2024

 10.22034/nfvm.2025.479246.1259

Summary

Brucellosis is a widespread zoonotic disease with a global distribution. The control and prevention of this disease require the assessment and monitoring of infection in the country's livestock, as the transmission of this bacterial species from its primary host to other animals is of significant epidemiological importance. Therefore, determining the dominant species and biovars in various geographical areas is a key component of the strategy to combat this disease. In this regard, 257 lymph node samples from reactor-positive cattle, collected from 42 dairy farms across 15 provinces of Iran, were sent to the Brucellosis Department of the Razi Vaccine and Serum Research Institute. Samples were cultured, and the identity of the isolates was confirmed by multiplex PCR. In total, 62 *Brucella* isolates were recovered and identified as follows: 28 *Brucella melitensis* biovar 1, 5 *Brucella melitensis* biovar 3, and 29 *Brucella abortus* biovar 3. This study describes the prevalence of these biovars in different regions of Iran and emphasizes that brucellosis remains a significant risk to public health.

Keywords: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, Diagnosis, Lymph Nodes, Positive Reactor



شیوع استرپتوکوکوس آگالاکتیه در عفونت‌های تحت بالینی پستان در مزارع شیری شهرستان نیشابور

علی اکبر طوسی^۱، محسن نجیمی^{۲*}، محمد جواد بهزادی شهر بابک^۳

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

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

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

دریافت مقاله: ۲۷ خرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۳۰ خرداد ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۵ تیر ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2023.402704.1190

چکیده

چکیده: ورم پستان ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه همچنان یکی از مشکلات مهم بهداشتی و اقتصادی صنعت گاو شیری در در بسیاری از مناطق دنیا به‌شمار می‌رود. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی میزان شیوع عفونت استرپتوکوکوس آگالاکتیه در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری شهرستان نیشابور بود. تعداد ۵۰۰ رأس گاو از ۱۳ گله‌ی شیری در سطح شهرستان نیشابور وارد مطالعه شدند. نمونه شیر از تمام کارتیه‌ها گرفته شد و از نظر ابتلا به ورم پستان تحت بالینی با استفاده از آزمون ورم پستان کالیفرنایی ارزیابی گردیدند. سپس از کارتیه‌هایی که در آزمون ورم پستان کالیفرنایی مثبت بودند مجدداً نمونه‌گیری شد و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از نظر آلودگی به استرپتوکوکوس آگالاکتیه بررسی شدند. از مجموع ۲۰۰۰ کارتیه بررسی شده ۱۱۵ کارتیه (۵/۷ درصد) متعلق به ۸۸ گاو (۱۷/۶ درصد) مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بودند. آلودگی به استرپتوکوکوس آگالاکتیه در ۳۰/۶ درصد گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی یافته شد. بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر استرپتوکوکوس آگالاکتیه بخش قابل توجهی از عفونت‌های تحت بالینی پستان در مزارع شیری شهرستان نیشابور را شامل می‌شود.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس آگالاکتیه، تست ورم پستان کالیفرنایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

مقدمه

ورم پستان التهاب یک یا چند کارتیه‌ی گاوهای شیری است که با تأثیرات منفی بر کیفیت و کمیت شیر و همچنین سلامت حیوان، خسارت اقتصادی قابل توجهی را به دامدار تحمیل می‌کند. اگر التهاب پستان همراه با علائم بالینی باشد به‌عنوان ورم پستان بالینی در نظر گرفته می‌شود، در صورتی که به دنبال عفونت پستانی فقط شمارش سلول‌های سوماتیک شیر (SCC) افزایش می‌یابد و هیچ علامت بالینی وجود نداشته باشد به‌عنوان ورم پستان تحت بالینی اطلاق می‌گردد (۱). ورم پستان تحت بالینی بدون آن که در گله دیده شود تولید شیر را کاهش می‌دهد ضمن اینکه کارتیه‌ی مبتلا به عفونت تحت بالینی می‌تواند منبع عفونت برای سایر گاوهای گله باشد (۲). یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های عامل ورم پستان تحت بالینی استریپتوکوکوس آگالاکتیه است (۳). این ارگانسیم یک پاتوژن مسری است که در گذشته به‌عنوان انگل اجباری پستان گاو شناخته می‌شده است، به این معنی که نمی‌تواند به مدت طولانی خارج از غده پستانی زنده بماند (۴). اما امروزه ثابت شده است که این ارگانسیم می‌تواند در محیط خارج از پستان هم زنده بماند (۵). علیرغم برنامه‌های ریشه‌کنی متعدد، استریپتوکوکوس آگالاکتیه همچنان یک عامل رایج عفونت پستانی گاو است (۶). تشخیص ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری و همچنین یافتن عامل آن برای کنترل و درمان ورم پستان ضرورت دارد (۲). هدف از این مطالعه بررسی شیوع ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری شهرستان نیشابور و همچنین بررسی شیوع استریپتوکوکوس آگالاکتیه در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در این شهرستان است.

مواد و روش‌ها

آزمون ورم پستان کالیفرنایی: در این مطالعه تعداد ۵۰۰ رأس گاو شیری متعلق به ۱۳ گله از سطح شهرستان نیشابور وارد مطالعه شدند. برای بررسی از لحاظ ابتلا به ورم پستان تحت بالینی به‌وسیله آزمون ورم پستان کالیفرنایی

(CMT) از هر ۴ کارتیه تمام گاوها (۲۰۰۰ کارتیه) نمونه شیر گرفته شد. نمونه‌گیری در دوشش ظهر و پس از شستشو، خشک کردن و رگ‌زنی کارتیه‌ها و قبل از اتصال خرچنگی ماشین شیردوش انجام می‌شد. پس از دور ریختن دوشش اول، دوشش سوم در گوده‌های ظرف مخصوص CMT دوشیده می‌شد. سپس هم حجم نمونه معرف CMT (California mastitis testing liquid.KERBL، شرکت کربل، آلمان) به شیر افزوده و با حرکت دادن ظرف هم زده می‌شد. پس از گذشت ۳۰ ثانیه از افزودن معرف، بر اساس میزان لخته شدن ترکیب نتیجه آزمون قرائت می‌شد. طبق مطالعه Kandeel و همکاران بر حسب میزان تشکیل توده ژله‌ای و شکل و قوام آن نتیجه آزمایش منفی (-)، ناچیز (Trace)، یک مثبت (+)، دو مثبت (++) و سه مثبت (+++) ارزیابی می‌شد. هر سه نتیجه‌ی +، ++ و +++ نشانه‌ی ابتلای کارتیه به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته می‌شد و هر گاو که حداقل یکی از کارتیه‌های آن در آزمون CMT مثبت بود به‌عنوان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی محسوب می‌شد.

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):

کارتیه‌هایی که در آزمون CMT مبتلا به ورم پستان تحت بالینی مشخص شدند به منظور ردیابی ارگانسیم استریپتوکوکوس آگالاکتیه در شیر مورد نمونه‌گیری مجدد قرار گرفتند. گاوهایی که بیش از یک کارتیه CMT مثبت داشتند، شیر همه کارتیه‌های درگیر با هم مخلوط و فقط یک نمونه از گاو تهیه شد. پس از ضد عفونی نوک سرپستانک با استفاده از پنبه الکل، ۱۰ میلی‌لیتر شیر درون لوله فالتون دوشیده می‌شد. نمونه‌های شیر تا زمان انجام آزمایش درون فریزر با دمای 20°C - نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. حجم ۱ میلی‌لیتر از نمونه شیر با رعایت شرایط استریل به میکروتیوب منتقل و با دور ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، ۱ میلی‌لیتر بافر TRIS EDTA به آن افزوده و ورتکس شد و مجدداً مورد سانتریفیوژ قرار گرفت. مایع رویی دور ریخته شد و

محلول DNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۸ میکرولیتر mastermix و ۴ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد و طبق مراحلی که در جدول ۲ آمده درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. پس از انجام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۱ میکرولیتر رنگ Safe stain به مدت ۸۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد.

۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن افزوده و ورتکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار گرفت. مجدداً محلول با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی که حاوی DNA بود با رعایت شرایط استریل به میکروتیوب جدید منتقل شد. سپس از پرایمرهای اختصاصی (شرکت پیشگام) که توالی آن در جدول ۱ آمده برای PCR استفاده شد. مخلوط PCR از ۲ میکرولیتر

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

Target	Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	product size (bp)
<i>Streptococcus agalactia</i>	STRA-AgI (F ⁺)	TTTGGTGTTTACTACTAGACTG	120
	STRA-AgII (R ⁺)	TGTGTTAATTACTCTTATGCG	
	F: forward	R: reverse	

جدول ۲ - مراحل انجام PCR

94 °C	300 sec	واسرشتگی اولیه
94 °C	30 sec	واسرشتگی
54 °C	45 sec	اتصال پرایمر به DNA
72 °C	45 sec	طویل شدن رشته الگو
72 °C	300 sec	طویل شدن نهایی

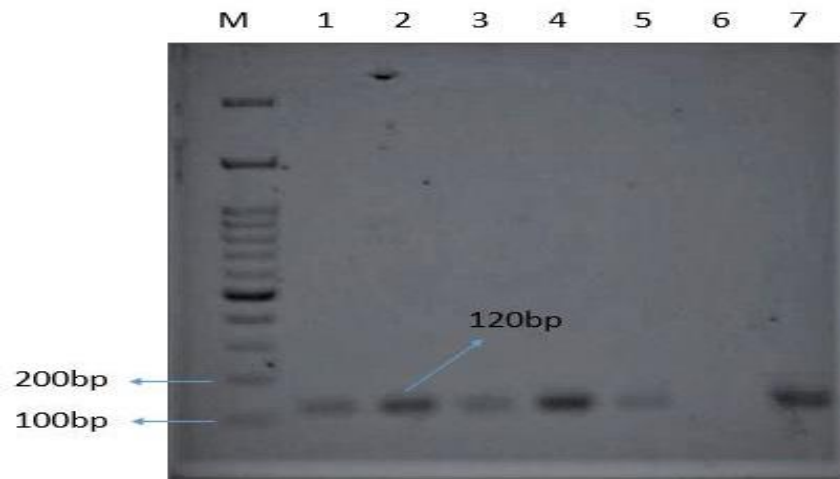
به گونه‌ای که حداقل و حداکثر میزان وقوع ورم پستان تحت‌بالینی در گله‌ها به ترتیب ۱۲/۵ و ۳۵ درصد بود. بر اساس نتایج آزمون PCR، باکتری استریتوکوکوس آگالاکتیه در ۲۷ نمونه‌ی شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی (۳۰/۶ درصد) شناسایی شد.

نتایج

بر اساس نتایج آزمون CMT (جدول ۳) از مجموع ۲۰۰۰ کارتیه بررسی شده ۱۱۵ کارتیه (۵/۷ درصد) متعلق به ۸۸ رأس گاو (۱۷/۶ درصد) مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی تشخیص داده شدند. در تمام گله‌های مطالعه شده گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی وجود داشت

جدول ۳ - نتیجه آزمون CMT در گاوهای مطالعه شده

تعداد کارتیه (درصد)	
(۹۳/۸) ۱۸۷۶	منفی
(۰/۴۵) ۹	ناچیز
(۱/۹) ۳۸	یک مثبت
(۲/۰۵) ۴۱	دو مثبت
(۱/۵) ۳۶	سه مثبت
۲۰۰۰	مجموع



شکل ۱- ستون M مارکر از 100 جفت باز تا 3000 جفت باز می‌باشد. ستون شماره ۶ کنترل منفی و ستون شماره ۷ کنترل مثبت، وزن باند ۱۲۰ bp

بحث و نتیجه‌گیری

میزان وقوع ورم پستان تحت‌بالینی در گله‌های شیری شهرستان نیشابور در سطح کارتیه ۵/۷ درصد و در سطح گاو ۱۷/۶ درصد بود. مرور سیستماتیک ۴۱ مطالعه، شیوع کلی ورم پستان تحت‌بالینی را در سطح گاوهای کشور چین از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۲۱، ۳۷/۷ درصد محاسبه کرد. در این مطالعه‌ی فراتحلیلی کمترین و بیشترین میزان وقوع ورم پستان تحت‌بالینی به ترتیب ۱۹ درصد و ۷۲ درصد مربوط به دو استان از کشور چین بوده است (۷). میزان وقوع ورم پستان تحت‌بالینی در شهرستان نیشابور نزدیک به حداقل میزان گزارش شده در مطالعه اخیر مربوط به یکی از استان‌های چین است. در مطالعه Ranasinghe و همکاران میزان وقوع ورم پستان تحت‌بالینی بر اساس آزمون CMT در سطح گاوهای سه منطقه از کشور سریلانکا ۵۷/۵، ۱۱/۸ و ۴۵/۵ درصد بود (۸). Demil و همکاران میزان ورم پستان تحت‌بالینی را در اتیوپی در سطح کارتیه ۳۲/۷ درصد و در سطح گاو ۶۰/۱ درصد گزارش کردند (۹).

مطالعاتی که در ایران انجام شده میزان وقوع ورم پستان تحت‌بالینی را در سطح گاو ۳۳/۲ درصد در سمنان (۱۰)، ۳۳/۷ درصد در اصفهان (۱۱)، درصد در استان فارس (۱۲)، ۲۶/۶ درصد در استان گلستان (۱۳)، ۲۰/۸ درصد در آذربایجان شرقی (۱۴) گزارش کرده‌اند که در مقایسه با میزان به‌دست آمده در مطالعه‌ی حاضر بالاتر بودند. رعایت

بهداشت شیردوشی و مدیریت صحیح بهداشت پستان در مزارع شهرستان نیشابور می‌تواند علت شیوع نسبتاً پایین ورم پستان تحت‌بالینی در این شهرستان باشد. میزان شیوع عفونت استرپتوکوکوس آگالاکتیه در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی در مطالعه‌ی حاضر ۳۰/۶ درصد بود. مطالعات متعددی که شیوع عفونت استرپتوکوکوس آگالاکتیه را در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی در ایران بررسی کرده‌اند نتایج متفاوتی را در مناطق مختلف گزارش نموده‌اند. در مطالعه معتمدی و همکاران بر اساس آزمون PCR، استرپتوکوکوس آگالاکتیه عامل ۲۰ درصد از ورم پستان‌های تحت‌بالینی در گاوهای شیری اهواز بود (۱۵). شکوهی و همکاران از ۴/۶ درصد نمونه‌ی شیر گاوهای CMT مثبت شهر ماکو باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه را جداسازی کردند (۱۶). از ۱۷/۲ درصد از نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی در گله‌های شهرکرد سویه‌های متعدد استرپتوکوکوس آگالاکتیه جداسازی شد (۱۷). مطالعه‌ی دیگری که در مقیاس بزرگ و طی مدت ۴ سال در گاو‌داری‌های اطراف تهران انجام شد از ۲۰۹۴ رأس گاو شیری CMT مثبت، ۲۲/۱۱ درصد عفونت استرپتوکوکوس آگالاکتیه داشتند که پس از استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی، دومین رتبه از لحاظ میزان شیوع را به خود اختصاص می‌داد (۱۸). همچنین میزان شیوع استرپتوکوکوس

گله‌های جمهوری ایرلند (۲۲) و ۳۱/۲۵ درصد در اسیوط مصر (۲۳) گزارش شده است. میزان شیوع این ارگانیزم در مطالعه‌ی اخیر بسیار نزدیک به نتایج مطالعه‌ی حاضر است. بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه عامل بخش قابل توجهی از موارد ورم پستان تحت‌بالینی در گله‌های شیری شهرستان نیشابور است و با توجه به پاسخ خوب این ارگانیزم به ضد عفونی کننده‌ها، اجرای برنامه‌های کنترلی می‌تواند در کاهش ورم پستان تحت‌بالینی در این شهرستان مؤثر باشد.

آگالاکتیه در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی استان فارس ۱۳/۵ درصد (۱۲)، استان گلستان ۵ درصد (۱۳) و اراک ۲۴/۶ درصد (۱۹) بوده است. تمام مطالعات ذکر شده میزان شیوع پایین‌تری را نسبت به مطالعه‌ی حاضر گزارش کرده‌اند. همچنین گزارش‌های متعددی از شیوع استرپتوکوکوس آگالاکتیه در عفونت‌های پستانی تحت‌بالینی گاو شیری در سراسر دنیا وجود دارد. شیوع این ارگانیزم در کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی ۱۵/۶ درصد در گله‌های شیری شمال شرقی لهستان (۲۰) و ۲۲/۳ درصد در گاوهای شمال مصر (۲۱)، ۲ درصد در

References

- 1- Saila S, Bork O, Tucker IG, Cranefield S, Bryan MA. Evaluation of an on-farm culture system for the detection of subclinical mastitis pathogens in dairy cattle. *JDS*. 2023; 4(4): 298-302.
- 2- McDougall S, Clausen LM, Hussein HM, Compton CW. Therapy of subclinical mastitis during lactation. *Antibiotics*. 2022; 11(2): 209.
- 3- Merl K, Abdulmawjood A, Lämmle C, Zschöck M. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 226(1): 87-92.
- 4- Keefe GP. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J*. 1997; 38(7): 429.
- 5- Cobo-Ángel C, Jaramillo-Jaramillo AS, Lasso-Rojas LM, Aguilar-Marin SB, Sanchez J, Rodriguez-Lecompte JC, et al. *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds. *PloS One*. 2018; 13(12): e0208990.
- 6- Keefe G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2012; 28(2): 203-16.
- 7- Chen X, Chen Y, Zhang W, Chen S, Wen X, Ran X, et al. Prevalence of subclinical mastitis among dairy cattle and associated risks factors in China during 2012–2021: A systematic review and meta-analysis. *Res Vet Sci*. 2022; 148: 65-73.
- 8- Ranasinghe R, Deshapriya R, Abeygunawardana D, Rahularaj R, Dematawewa C. Subclinical mastitis in dairy cows in major milk-producing areas of Sri Lanka: Prevalence, associated risk factors, and effects on reproduction. *JDS*. 2021; 104(12): 12900-11.
- 9- Demil E, Teshome L, Kerie Y, Habtamu A, Kumilachew W, Andualem T, et al. Prevalence of subclinical mastitis, associated risk factors and antimicrobial susceptibility of the pathogens isolated from milk samples of dairy cows in Northwest Ethiopia. *Prev Vet Med*. 2022; 205: 105680.
- 10- Rafyi-Barzoki M. Study of the prevalence of bacterial mastitis and the economic loss due to it in dairy farms in Semnan province. Research & construction. 1998; 34: 110-111. [in persian]
- 11- Zamani F, Babaei M, Fazeli M, Sharifzade A. Economic Evaluation of subclinical mastitis in dairy herds in Esfahan Proceedings of the First Congress on Animal and Aquatic Sciences. 31 August-2 September. Tehran, Iran. 2004: 1022-4.
- 12- Hashemi M, Kafi M, Safdarian M. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *IJVR*. 2011; 12(3): 236-241.
- 13- Pesarakloo M, Ahani Azari A, Danesh A. Prevalence and Antibiotics Resistance Patterns of Common Bacterial Causes of Bovine Subclinical mastitis in Selected Dairy Farms of Gorgan, North-east of Iran. *Vet Res & Biol Prod*. 2022; 35(1): 101-6. [in persian]
- 14- Naghshineh S, Rafat S, Shoja J, Moghaddam G, Ebrahimi M. Prevalence and Risk Factors of Subclinical Mastitis in Iranian Holstein

Cows. *IJAS*. 2015; 5(3): 569-574.

15- Motamedi H, Seyfiabad SM, Ghorbanpour M, Jamshidian M, Gouraninezhad S. A polymerase chain reaction based study on the subclinical mastitis caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis* in cattle in Ahvaz. *IJVR*. 2007; 8(3): 260-265; 11(4): 379-396.

16- Shokohi M, Ahmadizadeh C, Kaveh AA. Evaluation of bacterial causes of subclinical mastitis in dairy cattle of Negine Sabze Makoo agro-industrial and animal husbandry complex. *JVCP*. 2018; 11(4): 379-88.[in persian]

17- Ebrahimi A, Moatamedi A, Lotfalian S, Mirshokraei P, editors. Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran. *Vet Res Forum*. 2013; 4(4): 269-272.

18- Atyabi N, Vodjgani M, Gharagozloo F, Bahonar A. Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Tehran. *IJVR*. 2006; 7(3): 76-9.

19- Mahzounieh M, Zadfar G, Maqami S, Shams N. Bacteriological and epidemiological

aspects of mastitis in Arak area dairy herds (Iran). *Acta Vet Scand*. 2003; 44(1): 270.

20- Barański W, Sztachńska M, Zduńczyk S, Janowski T, Pogorzelska J. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Pol J Vet Sci*. 2016; 19(1): 119-124.

21- Abed AH, Menshawy AM, Zeinhom MM, Hossain D, Khalifa E, Wareth G, et al. Subclinical mastitis in selected bovine dairy herds in North Upper Egypt: Assessment of prevalence, causative bacterial pathogens, antimicrobial resistance and virulence-associated genes. *Microorganisms*. 2021; 9(6): 1175.

22- Barrett DJ, Healy AM, Leonard FC, Doherty ML. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the Republic of Ireland. *Ir Vet J*. 2005; 58(6): 1-5.

23- Singh K, Mishra KK, Shrivastava N, Jha AK, Ranjan R. Epidemiological Studies on Subclinical Mastitis in Dairy Cows of Rewa District of Madhya Pradesh. *Inter J Livest Res*. 2021; 11: 58-64.



Prevalence of *Streptococcus agalactia* in subclinical mammary infections in dairy farms of Neyshabur city

Ali Akbar Toosi¹, Mohsen Najimi^{2*}, Mohammad Javad Behzadi-Shahrbabak³

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

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

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

Receive: June 17, 2023; Revise: June 20, 2023; Accept: June 26, 2023



10.22034/nfvm.2023.402704.1190

Summary

Mastitis caused by *Streptococcus agalactia* is still one of the important health and economic problems in the dairy industry in many parts of the world. The aim of this study was to investigate the prevalence of *Streptococcus agalactia* infection in cows with subclinical mastitis in dairy herds of Neyshabur city. A total of 500 cows from 13 dairy herds in Neyshabur city were included in the study. Milk samples were taken from all quarters and evaluated for subclinical mastitis using the California mastitis test. Quarters that were positive in the California mastitis test were re-sampled and evaluated for *Streptococcus agalactia* infection using polymerase chain reaction. Out of the total of 2000 examined cows, 115 cows (5.7%) belonging to 88 cows (17.6%) had subclinical mastitis. *Streptococcus agalactia* infection was found in 30.6% of cows with subclinical mastitis. According to the results of the present study, *Streptococcus agalactia* includes a significant part of subclinical mammary infections in dairy farms of Neyshabur city.

Keywords: *Streptococcus agalactia*, California mastitis test, Polymerase chain reaction



بررسی بهبود زخم تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط عصاره گیاه گل راعی و روغن شترمرغ

رکسانا سرابندی^۱، محمدرضا آقچه لو^{۲*}، داریوش سعادت^۳، عباس جمشیدیان^۴

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

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

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

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

دریافت مقاله: ۱۶ اردیبهشت ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۱ تیر ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۲ تیر ۱۴۰۴



10.22034/nfvm.2025.521711.1285

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم ترین عوامل باکتریایی عفونت زخم های پوستی است. در طب مکمل، استفاده از گیاهان دارویی به دلیل خواص ضد باکتری، ضد التهاب و آنتی اکسیدانی مورد توجه قرار می گیرد. در این مطالعه، اثر ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ بر التیام زخم باز تلقیح شده با استافیلوکوکوس اورئوس در رت مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۴۰ رت بالغ در چهار گروه شامل کنترل منفی، کنترل مثبت (وازلین + اوسرین)، و دو گروه درمانی با پمادهای حاوی ۲ و ۵ درصد ترکیب مذکور مورد مطالعه قرار گرفت. زخم ها در روزهای ۰، ۳، ۷ و ۱۴ از لحاظ درصد بهبود و تغییرات هیستوپاتولوژیک بررسی شدند. یافته ها نشان داد که درصد بهبود زخم در روز ۷ به طور معنی داری در دو گروه درمانی بیشتر از گروه کنترل مثبت بود، همچنین میانگین رتبه هیستوپاتولوژی زخم ها در روزهای ۷ و ۱۴ در گروه های درمانی به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل منفی بود. نتایج نشان می دهد ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ سبب کاهش التهاب و تسریع در بهبودی زخم عفونی می شود و اثر پماد ۵ درصد بیشتر از پماد ۲ درصد است.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، عصاره گل راعی، روغن شترمرغ، هیستوپاتولوژی، التیام زخم

مقدمه

زخم‌های عفونی درمانی‌های طولانی‌تر و مشکلات بیشتری را هنگام التیام ایجاد می‌کنند. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن گرم مثبت است و به‌عنوان مهم‌ترین عامل عفونت‌های پوست و بافت‌های زیرین آن در انسان می‌باشد (۱). یکی از مشکلات استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌های موضعی، ایجاد مقاومت‌های باکتریایی و واکنش‌های آلرژیک است. به‌عنوان مثال، تماس با موپیروسین می‌تواند منجر به ظهور سوبه‌های مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* شود (۲). بنابراین استفاده از ترکیبات طبیعی جایگزین، نظیر گیاهان دارویی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

گل راعی در طب سنتی اسلامی، یونانی و چینی کاربرد داشته است. این گیاه حاوی مواد فعالی مثل هایپرفورین و هایپریسین بوده که دارای خواصی نظیر ضد افسردگی و اضطراب (۳) و تسریع التیام و خواص ضد باکتریایی می‌باشد (۴، ۵، ۶). هایپرفورین موجود در گل راعی با تحریک تمایز کراتینوسیت‌ها و ساخته شدن کراتین موجب بازیابی ساختار آسیب دیده اپیدرم شده و هایپریسین و سودوهایپریسین موجود در عصاره گل راعی باعث افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست و سنتز بیشتر کلاژن می‌شود. عصاره روغنی گل راعی سبب تسریع روند بهبود ترک خوردگی پا می‌شود (۷). اثر درمانی عصاره گل راعی در درمانیت آتوپیک نیز تأیید شده است (۸).

روغن شترمرغ دارای سطوح متفاوتی از اجزایی شامل کارتنوئیدها، فلاون‌ها، پلی‌فنول‌ها، توکوفرول و فسفولیپیدها است که ممکن است فواید درمانی مانند خصوصیات آنتی‌اکسیدانی داشته باشد (۹). در طب سنتی سودان روغن شترمرغ در موارد شکستگی استفاده می‌شود (۱۰). آمو مانند شترمرغ در گروه سینه پهنان قرار می‌گیرد ولی ترکیبات روغن آن با شترمرغ از نظر اسیدهای چرب کاملاً یکسان نیست (۱۱). روغن آمو اثرات ضد التهابی (۱۲) درمان زخم‌های گوارشی (۱۳) و ترمیم زخم (۱۴) دارد.

بر اساس مطالعات موجود تا کنون از ترکیب روغن

شترمرغ و عصاره گل راعی جهت درمان زخم‌های باز و یا عفونی استفاده نشده است. با توجه به خواص ذکر شده برای گل راعی و روغن شترمرغ و اهمیت التیام سریع‌تر و بهتر زخم‌ها به‌خصوص زخم‌های عفونی، در این مطالعه، با هدف بهره‌گیری از خواص درمانی ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ، اثربخشی این ترکیب در بهبود زخم عفونی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در مدل حیوانی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه: در این مطالعه از ۴۰ موش رت نژاد ویستار با جنسیت نر و محدوده وزنی بین ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه ده‌تایی تقسیم شدند و در ظرف‌های جداگانه مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی قرار داده شدند. موش‌ها در محیط بدون استرس، تمیز و در دمای اتاق نگهداری و با غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی که به‌صورت پلت (خوراک موش، شرکت بهپرور، تهران، ایران) تغذیه می‌شدند و آب به‌طور آزادانه در اختیار آنها بود. گروه اول یا گروه کنترل منفی شامل ده موش بدون درمان بوده است، گروه دوم یا گروه کنترل مثبت شامل ده موش مورد درمان قرار گرفته با پایه پماد (ترکیب وازلین و اوسرین) بود، گروه سوم یا گروه درمانی یک، یا ۲ درصد، شامل ده موش مورد درمان قرار گرفته با پماد درمانی ترکیب عصاره گل راعی ۲ درصد و روغن شترمرغ ۲ درصد و گروه چهارم یا گروه درمانی دو، یا ۵ درصد، شامل ده موش مورد درمان قرار گرفته با پماد درمانی ترکیب عصاره گل راعی ۵ درصد و روغن شترمرغ ۵ درصد بودند.

آماده‌سازی پمادها: وازلین و اوسرین به‌صورت جداگانه در فور قرار گرفت تا به حالت مایع درآیند سپس ۷۰ گرم از وازلین را با ۳۰ گرم از اوسرین در یک بشر استریل مخلوط کردیم. ۲۰ گرم از ترکیب حاصل شده در یک ظرف نمونه‌گیری درب‌دار به‌عنوان پایه پماد، برای گروه کنترل مثبت جدا گردید.

برای تهیه پماد ۵ درصد، از پایه پماد تهیه‌شده در همان

بررسی بهبود زخم تلقیح شده با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط گیاه گل راعی ...

سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از رشد کلنی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شسته و سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل درب‌دار حاوی نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن با اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول نیم‌مک‌فارلند، با نرمال سالین رقیق و سوسپانسیون باکتری با غلظت 1×10^8 cfu/ml تهیه گردید (۱۵).

ایجاد زخم و تلقیح باکتری: موش‌ها در همه گروه‌ها با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (40mg/kg, Ketamin 10% , alfasan, Woerden, Holland) و زایلازین (5mg/kg, Xylazine2% , alfasan, Woerden, Holland) بی‌هوش شدند (شکل ۱- الف). پس از بی‌هوشی پشت موش‌ها به‌طور کامل تراشیده شد و پوست آن ناحیه به‌طور کامل با الکل اسکراب شد. سپس در حد فاصل دو شانیه با استفاده از پانچ بیوپسی ۶ میلی‌متری زخم دایره‌ای شکل و تمام ضخامت بر پشت هر موش ایجاد گردید (شکل ۱- ب). از محلول حاوی باکتری رقیق‌سازی شده با استفاده از قطره‌چکان بر روی زخم هر موش ۴ قطره در روز ایجاد زخم (روز صفر) ریخته شد تا موش‌ها توسط باکتری آلوده گردند.

حالت مایع ۱۸ گرم جدا گردید و در ظرف مخصوص نمونه‌گیری ریخته شد و سپس ۱ گرم از روغن شترمرغ که آن هم استریل شده و به‌صورت مایع درآمده بود به آن اضافه گردید و در آخر نیز ۱ گرم از عصاره گل راعی به ترکیب فوق اضافه شد. ترکیب حاصله به‌منظور روانتر شدن به مدت ۳-۴ دقیقه در فور قرار گرفت و پس از خروج از دستگاه تا لحظه کامل سرد و بسته شدن با انتهای یک سوآپ استریل همزده می‌شد.

برای تهیه پماد ۲ درصد نیز از پایه پماد تهیه‌شده در حالت مایع ۱۹/۲ گرم برداشت شد و در ظرفی ریخته شد و سپس ۰/۴ گرم از روغن شترمرغ استریل و مایع به آن اضافه گردید و در آخر نیز ۰/۴ گرم از عصاره گل راعی به ترکیب فوق اضافه شد. برای همگن شدن ترکیب نهایی به مدت ۳-۴ دقیقه در فور گرم شد و پس از خروج از دستگاه تا لحظه کامل سرد و بسته شدن با انتهای یک سوآپ استریل همزده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس*

اورئوس: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، در ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت نوترینت آگار برده شد و در دمای ۳۷ درجه



ب



الف

شکل ۱- الف: تزریق داروی بی‌هوشی به روش داخل صفاقی، ب: نحوه ایجاد زخم با پانچ

در همه گروه‌ها تمیز می‌شد تا محل زخم پاک و برای درمان آن روز آماده شود. برای گروه کنترل منفی فقط شستشو داده می‌شد و درمان موضعی انجام نمی‌شد. درمان زخم‌ها بر اساس گروه‌بندی انجام شد و از یک چوب بستنی استریل

درمان محل زخم از روز اول (روز بعد ایجاد زخم) تا روز ۱۴ به‌صورت روزی یک‌بار انجام می‌شد. قبل از انجام درمان در هر روز به استثنای روز صفر (روز ایجاد زخم) محل زخم با استفاده از یک تامپون و محلول سدیم کلراید ایزوتونیک

نمونه‌برداری تراشیده شد و سپس با استفاده از یک اسکالپل برش تمام ضخامت در پوست ایجاد شد و نمونه مورد نیاز جهت بررسی آسیب‌شناسی برداشته شد. در هنگام برداشت نمونه کمی هم از بافت پوست سالم و همه بافت زخم نمونه‌برداری شد تا امکان مقایسه بافت سالم و زخم وجود داشته باشد. بعد از برداشت نمونه، بافت زیر جلد از لحاظ حضور چسبندگی بررسی شد. نمونه‌های تهیه شده در ظرف‌های نمونه‌گیری حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند و مشخصات هر نمونه بر روی ظرف نمونه‌گیری یادداشت شد. پس از گذراندن مراحل ابتدایی تهیه برش بافتی، مقاطع تهیه شده و بر روی لام قرار گرفتند و پس از آن با رنگ هماتوکسیلین-انئوزین رنگ‌آمیزی شدند.

در این مطالعه ارزیابی هیستوپاتولوژیک به دو روش انجام شد:

روش اول ارزیابی هیستوپاتولوژی: این روش ارزیابی توسط Adam و همکاران به‌گونه‌ای طراحی شده است که تمام ساختارهای اپیتلیالی، مزانشیمی و همین‌طور عمق اسکار را به‌طور همزمان مد نظر قرار می‌دهد. امتیاز کل در نمره ۱۰ نشان‌دهنده ظاهر طبیعی پوست بدون هیچ شواهدی از اسکار است و نمره صفر نشان‌دهنده اسکاری عمیق است که تمام اجزای پوست را درگیر می‌کند. به همه موارد طبیعی به غیر از رشته‌های کلاژن، امتیاز ۱ و به موارد غیر طبیعی امتیاز صفر داده می‌شود. امتیاز هیستوپاتولوژیک مجموع کل این امتیازها است و در حضور ساختارهای طبیعی باعث کسب امتیاز بیشتر می‌شود (جدول ۱) (۱۶).

این موارد شامل هایپرپلازی اپیدرم، هایپرکراتوز اپیدرم و ضمایم اپیدرم مانند فولیکول‌های مو و غدد عرق می‌شود. اثرات التیامی بر روی ساختارهای مزانشیمی نیز با تعیین حضور یا عدم حضور عضلات صاف، تزاید عروقی، فیبروپلازی و سازمان‌یافتگی (موازی بودن) رشته‌های کلاژن با هم ارزیابی می‌شود. به‌دلیل ارتباط بین توزیع

برای پوشاندن کامل سطح زخم‌ها با پمادها استفاده شد. تمام روند مطالعه از نظر اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی تحت نظر شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده بوده است.

ارزیابی میکروسکوپی: در روزهای ۰، ۳، ۷ و ۱۴ از زخم‌های ایجاد شده عکس‌برداری انجام شد. عکس‌برداری با یک دوربین با رزولوشن ۱۳ مگاپیکسل انجام شد به این صورت که پس از مقید کردن موش یک خط‌کش مدرج در کنار زخم هم سطح با زخم قرار می‌گرفت و سپس عکس‌برداری با یک زاویه عمود بر زخم انجام می‌شد.

برای انجام اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی در این مطالعه از نرم‌افزار image tool استفاده شد. با استفاده از این نرم‌افزار در هر تصویر مساحت کلی زخم اندازه‌گیری شد. روش اندازه‌گیری به این صورت بود که پس از انتقال تصاویر به نرم‌افزار ابتدا مقیاس سیستم اندازه‌گیری نرم‌افزار با انتخاب فاصله دو نقطه (از روی خط‌کش مدرج که در هنگام تهیه عکس دیجیتال در کنار زخم قرار گرفته بود) تعریف شد و سپس با استفاده از ابزاری که نرم‌افزار در اختیار قرار داده بود لبه‌های زخم مشخص شد و سپس مساحت ناحیه انتخاب شده اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه درصد مساحت زخم در هر روز مساحت اندازه‌گیری شده تقسیم بر مساحت زخم در روز صفر شده و در ۱۰۰ ضرب شد، سپس برای به‌دست آوردن درصد بهبودی زخم، درصد مساحت زخم در هر روز از ۱۰۰ درصد کم شد. درصد مساحت زخم مطابق با فرمول‌های زیر انجام شد:

$$100 \times \frac{\text{مساحت سطح زخم در روز } X}{\text{مساحت سطح زخم در روز صفر}} = \text{درصد مساحت زخم در روز } X$$

$$\text{درصد مساحت زخم در روز } X = 100 - X = \text{درصد بهبودی زخم در روز } X$$

ارزیابی میکروسکوپی: در روز ۳ از هر گروه به‌صورت تصادفی دو موش انتخاب گردید و در روزهای ۷ و ۱۴ از هر گروه به‌صورت تصادفی چهار موش انتخاب گردید. این موش‌ها به‌منظور تهیه نمونه‌های بافتی، جهت بررسی‌های هیستوپاتولوژی با رعایت اصول اخلاقی بی‌هوش شدند. موهای روییده در ناحیه زخم قبل از انجام

بررسی بهبود زخم تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط گیاه گل راعی ...

می‌باشد، نمره (۲) نیمه بالایی قسمت عمقی درم (Reticular dermal layer) را نیز شامل سازمان یافتگی می‌شود و نمره (۳) به الیاف کلاژن که به‌صورت طبیعی هم نیمه‌ی بالایی و هم نیمه‌ی پایینی قسمت عمقی درم منظم باشند.

کلاژن با ساختار درم و بافت اسکار امتیاز بیشتری به آن داده می‌شود. سازمان یافتگی کلاژن درمی بر اساس سازمان یافتگی رشته‌های کلاژن به‌صورت زیر نمره‌دهی می‌شوند: نمره (۰) برای عدم سازمان یافتگی رشته‌های کلاژن در کل قسمت عمقی درم، نمره (۱) عدم سازمان یافتگی کلاژن در قسمت پاپیلاری عمقی درم (Papillary dermal layer)

جدول ۱- سیستم امتیازدهی هیستوپاتولوژیک به روش Adam. در این روش بیشترین امتیاز ممکن ۱۰ (نشان‌دهنده ظاهر طبیعی پوست بدون هیچ شواهدی از زخم) و کمترین امتیاز صفر (نشان‌دهنده زخم عمیق که تمام اجزا پوست را درگیر می‌کند) می‌باشد.

موارد ارزیابی شده	هایپرکراتوز اپیدرم	هایپرپلازی فولیکول مو	غدد عرق	عضلات صاف	جهت‌گیری رشته‌های کلاژن	فیبروپلازی	ترازید عروقی
عدم حضور (۱) عدم حضور (۱)	عدم حضور (۱)	حضور (۱)	حضور (۱)	حضور (۱)	عدم سازمان یافتگی کلاژن در قسمت سطحی درم (۲)	عدم حضور (۱)	عدم حضور (۱)
وضعیت (امتیاز)					عدم سازمان یافتگی کلاژن در نیمه بالایی قسمت عمقی درم (۱)	حضور (۰)	حضور (۰)
حضور (۰)	حضور (۰)	عدم حضور (۰)	عدم حضور (۰)	عدم حضور (۰)	عدم سازمان یافتگی کلاژن در کل قسمت عمقی درم (۰)	حضور (۰)	حضور (۰)

تعداد رگ‌ها و جهت آنها (عمود بودن بر اپیدرم) مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین از نظر شدت التهاب و نفوذ سلول‌های التهابی مرحله‌ی حاد (نوتروفیل، پلاکت، فیبرین) و سلول‌های التهابی مرحله‌ی مزمن (سلول‌های تک‌هسته‌ای [mononuclear MN])، شدت پرخونی، وسعت خونریزی و ایجاد ضمائم پوست (مو، غدد سباسه و عرق) در محل التیام مورد بررسی قرار گرفتند. معیارهای هیستوپاتولوژیک ذکر شده برای خیلی کم عدد ۱، کم عدد ۲، متوسط عدد ۳، زیاد عدد ۴ و خیلی زیاد عدد ۵ محاسبه شد و در نهایت به هر کدام از آنها عددی مطابق با وضعیت هیستوپاتولوژیک آنها داده شده و اطلاعات به‌دست آمده ثبت گردید.

جهت امتیازدهی به معیارهای هیستوپاتولوژیک در صورت عدم وجود خونریزی، فولیکول مو، غدد سباسه و یا غدد عرق عدد ۱ و در صورت وجود این موارد عدد ۲ در نظر گرفته شد (۱۷).

روش دوم ارزیابی هیستوپاتولوژی: در روش دوم نیز لایه‌های پوست به‌طور جداگانه و با جزئیات بیشتر بررسی شد. معیارهایی که در قسمت اپیدرم مورد توجه قرار گرفت شامل منظم بودن و تقسیمات میتوزی سلول‌های لایه‌ی بازال، تکثیر و تمایز سلول‌های خاردار، لایه سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیالین، تغییرات کلی اپیدرم از نظر هایپرپلازی، فرورفتگی اپیدرم در درم (Rete Ridges) و بالعکس (Retepags) می‌باشد.

تغییرات درم در دو ناحیه سطحی و عمقی به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و در هر کدام از نواحی، میزان و جهت رشته‌های کلاژن، موازی بودن رشته‌های کلاژن با هم و با اپیدرم و عمود بودن آنها بر عروق خونی و از نظر حضور سلول‌های فیبروبلاست، فیبروسیت و عضلات صاف مورد بررسی قرار گرفت. در هر یک از قسمت‌های درم (سطح و عمق درم) رگ‌های خونی از نظر

روش تجزیه و تحلیل آماری: مساحت زخم‌ها در روزهای ۷، ۳ و ۱۴ اندازه‌گیری شد و با استفاده از اعداد به‌دست آمده درصد بهبود زخم برای هر یک از موش‌ها در روزهای فوق محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد برای مقایسه مساحت زخم و درصد بهبود زخم بین تیمارهای مختلف از آزمون آنوا و آزمون تکمیلی توکی استفاده شد و از آزمون غیر پارامتریک کروسکالوالیس برای مقایسه داده‌های به‌دست آمده از ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک استفاده شد. سطح معنی‌داری P-value کمتر از ۰/۰۵ در همه موارد در نظر گرفته شد.

نتایج

یافته‌های بررسی ماکروسکوپیکی: نتایج بررسی‌های ماکروسکوپیکی و بالینی که شامل مساحت زخم و درصد

بهبود زخم می‌باشد به شرح زیر است:
مساحت زخم: نتایج به‌دست آمده نشان داد که مساحت زخم‌ها بر اساس میلی‌متر مربع در روزهای ۳ و ۷ بین گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری دارد، اما در روز ۱۴ مساحت زخم بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت ($P\text{-value} > 0/05$). در روز ۳، مساحت زخم در گروه پماد درمانی ۵ درصد کمتر از سه گروه دیگر بود ($23/06 \pm 2/85$). همچنین مساحت زخم در گروه پماد درمانی ۲ درصد از دو گروه کنترل کمتر بود ($25/16 \pm 2/19$). مساحت زخم در گروه کنترل منفی بیشتر از سه گروه دیگر بود ($29/92 \pm 4/52$). بین گروه کنترل منفی و گروه‌های پماد درمانی ۵ درصد و پماد درمانی ۲ درصد تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت ($P < 0/05$) اما گروه کنترل مثبت با هیچ‌کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار ($\text{mean} \pm \text{SD}$) مساحت زخم (میلی‌متر مربع) در گروه‌های درمانی در روزهای مختلف. حروف انگلیسی مختلف در هر سطر تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها را نشان می‌دهد.

زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	گروه درمانی ۲٪	گروه درمانی ۵٪	P value
روز ۳	۲۷/۱۲ ± ۵/۹۲ ab	۲۹/۹۲ ± ۴/۵۲ b	۲۵/۱۶ ± ۲/۱۹ a	۲۳/۰۶ ± ۲/۸۵ a	۰/۰۱۰
روز ۷	۱۰/۲۴ ± ۹/۰۶ b	۷/۴۳ ± ۳/۳۷ ab	۴/۳۶ ± ۰/۹۴ a	۲/۸۶ ± ۱/۳۴ a	۰/۰۳۶
روز ۱۴	۰/۱۵ ± ۰/۲۵ a	۰/۱۶ ± ۰/۱۸۳ a	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ a	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ a	۰/۲۴۰

در روز ۷، مساحت زخم در گروه پماد درمانی ۵ درصد کمتر از سه گروه دیگر بود ($2/86 \pm 1/34$) و بعد از آن کمترین مساحت زخم را گروه پماد درمانی ۲ درصد داشت ($4/36 \pm 0/94$). مساحت زخم در گروه کنترل مثبت بیشتر از باقی گروه‌ها بود ($10/24 \pm 9/06$). در روز ۷ بین گروه کنترل مثبت و گروه‌های پماد درمانی ۵ درصد و پماد درمانی ۲ درصد تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت، ولی گروه کنترل منفی با هیچ‌کدام از گروه‌های دیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۲). در گروه کنترل مثبت زخم یکی از موش‌ها کاملاً ملتهب و پر خون شده بود که

احتمالاً به‌علت عفونی شدن زخم باشد و با بررسی هیستوپاتولوژی نیز تأیید شد. در روز ۱۴، زخم در گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد کاملاً بهبود پیدا کرده بود. اما در گروه کنترل مثبت و کنترل منفی همچنان مساحت کمی از زخم مشاهده می‌شد که این مساحت در گروه کنترل مثبت ($0/15 \pm 0/25$) از گروه کنترل منفی ($0/60 \pm 0/83$) کمتر بود اما هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد. اعداد بر اساس میانگین به میلی‌متر مربع و انحراف معیار می‌باشند. تصاویر بالینی زخم‌ها در روزهای مختلف در (شکل ۲) قابل مشاهده است.



شکل ۲- نمونه تصاویر بالینی محل زخم‌ها در روزها و گروه‌های مختلف

مثبت ($22/03 \pm 68/77$) می‌باشد و دو گروه درمانی با گروه کنترل مثبت اختلاف آماری معنی‌دار دارند ($0/10$ ، P -value =). در روز ۱۴، درصد بهبود زخم در گروه‌های درمانی ۵ و ۲ درصد کامل بوده ($100 \pm 0/0$) و بیشتر از گروه‌های کنترل مثبت ($99/72 \pm 0/55$) و کنترل منفی ($98/42 \pm 2/12$) است اما بین گروه‌ها تفاوت آماری معنی‌داری وجود ندارد. تغییرات درصد بهبود زخم در روزهای مختلف در (جدول ۳) قابل مشاهده است.

درصد بهبود زخم: نتایج به‌دست آمده در مورد درصد بهبود زخم که به متغیر مساحت زخم در روز صفر بستگی دارد، نشان می‌دهد که در روز ۳، درصد بهبود زخم در گروه درمانی ۵ درصد بیشتر از سه گروه دیگر است ($5/92 \pm 27/76$) و به صورت معنی‌داری با هر سه گروه تفاوت دارد (P -value = $0/00$). در روز ۷، میزان درصد بهبود زخم به‌ترتیب در گروه‌های درمانی ۵ درصد ($91/00 \pm 3/08$)، ۲ درصد ($85/34 \pm 2/41$)، کنترل منفی ($77/68 \pm 7/44$) و کنترل

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) درصد بهبود زخم در گروه‌های درمانی در روزهای مختلف

زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۲٪	عصاره ۵٪	P value
روز ۳	۱۰/۲۳ ± ۷/۰۸ a	۷/۹۵ ± ۴/۹۶ a	۱۳/۴۶ ± ۴/۳۵ a	۲۷/۷۶ ± ۵/۹۲ b	۰/۰۰۰
روز ۷	۶۸/۷۷ ± ۲۲/۰۳b	۷۷/۶۸ ± ۷/۴۴ab	۸۵/۳۴ ± ۲/۴۱ a	۹۱/۰۰ ± ۳/۰۸ a	۰/۰۱۰
روز ۱۴	۹۹/۷۲ ± ۰/۵۵ a	۹۸/۴۲ ± ۲/۱۲ a	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰a	۰/۲۰۲

یافته‌های ارزیابی میکروسکوپی

روش اول: در این روش از یک سیستم ده امتیازی که توسط Adam و همکاران طراحی شده بود، استفاده شد. تست آماری آنوا برای امتیازات پاتولوژی در روز هفتم تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل منفی با سایر گروه‌ها نشان داد (P-value = ۰/۰۰۱). در روز چهاردهم گروه‌های درمانی ۲

درصد و ۵ درصد از لحاظ آماری امتیازهای پاتولوژی تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی نشان دادند (P=۰/۰۰۶) = value و تفاوت امتیاز در گروه‌های درمانی ۵ و ۲ درصد بیشتر بوده است که نشان‌دهنده التیام بهتر می‌باشد. میانگین و انحراف معیار امتیازها برای هر یک از گروه‌ها در این روش در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- نتایج امتیاز کلی هیستوپاتولوژیک به روش Adam و همکاران، میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) نمره هیستوپاتولوژیک در تیمارهای مختلف در روزهای ۷ و ۱۴. حروف انگلیسی نامتشابه در هر سطر تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها را نشان می‌دهد.

زمان	کنترل منفی	کنترل مثبت	درمانی ۲٪	درمانی ۵٪
روز ۷	۰/۰ ± ۶۷/۵۸ a	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ b	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ b	۲/۳۳ ± ۰/۵۸ b
روز ۱۴	۵/۵۰ ± ۰/۵۸ a	۷/۵۰ ± ۰/۵۸ ab	۹/۰۰ ± ۰/۵۸ b	۹/۰۰ ± ۰/۵۸ b

روش دوم: در روش دوم، معیارهای هیستوپاتولوژی تعیین شده در بین گروه‌های آزمایشی در روزهای ۳، ۷ و

۱۴ مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۵).

جدول ۵- میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) امتیازات هیستوپاتولوژی در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم

معیارهای پاتولوژی	زمان	کنترل مثبت	کنترل منفی	عصاره ۲٪	عصاره ۵٪	P value
نظم سلول‌های بازال	روز هفتم	1/00 ± 0/00	-	2/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	۰/۰۱۸
	روز چهاردهم	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	4/50 ± 0/71	۰/۱۶۱
تقسیمات سلول‌های بازال	روز هفتم	4/67 ± 0/58	-	4/00 ± 0/00	۳/۳۳ ± ۰/۵۸	۰/۰۶۹
	روز چهاردهم	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	1/50 ± 0/71	1/50 ± 0/71	۰/۱۰۱
تکثیر سلول‌های خاردار	روز هفتم	5/00 ± 0/00	-	5/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	۰/۰۱۸
	روز چهاردهم	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
تمایز سلول‌های خاردار	روز هفتم	1/67 ± 0/58	-	2/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	۰/۰۳۰
	روز چهاردهم	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	5/00 ± 0/00	۰/۱۰۴
سلول‌های دانه‌دار	روز هفتم	2/67 ± 0/58	-	3/00 ± 0/00	3/67 ± 0/58	۰/۱۱۰
	روز چهاردهم	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	5/00 ± 0/00	۰/۱۰۴
هایپرپلازی اپیدرم	روز هفتم	5/00 ± 0/00	-	4/67 ± 0/58	4/00 ± 0/00	۰/۰۶۱
	روز چهاردهم	4/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	۰/۱۶۲
Rete ridges	روز هفتم	3/00 ± 0/00	-	3/67 ± 0/58	3/67 ± 0/58	۰/۲۰۲
	روز چهاردهم	3/00 ± 0/00	2/50 ± 0/71	5/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	۰/۰۸۴
میزان تشکیل اپیدرم	روز سوم	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	۱/۰۰۰
	روز هفتم	5/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	4/67 ± 0/58	4/00 ± 0/00	۰/۰۲۰
	روز چهاردهم	3/50 ± 0/71	3/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	۰/۵۰۶

<i>P</i> value	عصاره ۵٪	عصاره ۲٪	کنترل منفی	کنترل مثبت	زمان	معیارهای پاتولوژی
۰/۰۷۲	3/00± 0/00	2/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	روز سوم	میزان رشته‌های کلاژن
۰/۰۳۷	3/67 ± 0/58	3/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	2/67± 0/58	روز هفتم	
۰/۱۶۲	4/00 ± 0/00	4/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	3/50 ± 0/71	روز چهاردم	
۰/۳۹۲	1/50± 0/71	2/00± 0/00	2/00± 0/00	2/00± 0/00	روز سوم	جهت رشته‌های کلاژن
۰/۷۴۸	1/67± 0/58	1/67± 0/58	2/00 ± 0/00	1/67 ± 0/58	روز هفتم	
۰/۹۳۲	2/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	1/50 ± 0/71	2/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۰/۱۶۲	5/00± 0/00	4/50± 0/71	4/00± 0/00	4/00± 0/00	روز سوم	فیبروسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها
۰/۰۱۹	4/33± 0/58	4/00 ± 0/00	2/67 ± 0/58	3/00 ± 0/00	روز هفتم	
۰/۱۶۲	3/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	2/50 ± 0/71	روز چهاردم	
۱/۰۰۰	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	روز سوم	عضلات صاف
۱/۰۰۰	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	روز هفتم	
۰/۱۰۸	4/00 ± 0/00	3/50 ± 0/71	1/00± 0/00	3/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۰/۳۲۱	4/00 ± 0/00	3/50± 0/71	3/00± 0/00	3/50± 0/71	روز سوم	تعداد رگ‌های خونی
۰/۴۳۲	3/00 ± 0/00	2/67 ± 0/58	2/33 ± 0/58	2/67 ± 0/58	روز هفتم	
۰/۱۱۲	2/00 ± 0/00	1/50 ± 0/71	3/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۰/۴۳۲	3/00± 1/41	3/00± 0/00	2/00± 0/00	2/50± 0/71	روز سوم	جهت رگ‌های خونی
۰/۶۲۲	3/33 ± 0/58	3/67 ± 0/58	3/33 ± 1/15	2/67 ± 1/15	روز هفتم	
۰/۵۰۶	4/00 ± 0/00	3/50 ± 0/71	3/50 ± 0/71	4/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۰/۷۰۶	4/00± 0/00	4/50± 0/71	4/50± 0/71	4/50± 0/71	روز سوم	شدت سلول‌های التهابی
۰/۰۲۵	1/33 ± 0/58	1/00 ± 0/00	3/00 ± 0/00	2/33 ± 0/58	روز هفتم	
۱/۰۰۰	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۰/۱۶۱	3/00± 0/00	4/50± 0/71	4/00± 0/00	3/50± 0/71	روز سوم	شدت پرخونی
۰/۰۴۰	1/67± 0/58	2/00 ± 0/00	2/67 ± 0/58	3/00 ± 0/00	روز هفتم	
۱/۰۰۰	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۱/۰۰۰	2/00± 0/00	2/00± 0/00	2/00± 0/00	2/00± 0/00	روز سوم	خونریزی
۰/۰۱۲	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز هفتم	
۱/۰۰۰	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۱/۰۰۰	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	روز سوم	فولیکول‌های مو
۱/۰۰۰	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز هفتم	
۰/۰۷۲	2/00 ± 0/00	2/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۱/۰۰۰	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	روز سوم	عدد سباسبه
۱/۰۰۰	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز هفتم	
۰/۰۷۲	2/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز چهاردم	
۱/۰۰۰	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	1/00± 0/00	روز سوم	عدد عرق
۱/۰۰۰	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز هفتم	
۱/۰۰۰	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	1/00 ± 0/00	روز چهاردم	

نیز هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مقایسه نشد (شکل ۳- الف).

عضلات صاف در هیچ‌کدام از نمونه‌ها قابل مشاهده نبود. از لحاظ شدت التهاب نیز هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نشد. سلول‌های التهابی مشاهده شده بیشتر شامل نوتروفیل‌ها بودند. سلول‌های التهابی و خونریزی در نمونه کنترل مثبت روز سوم در شکل ۳- ب مشاهده می‌شود. از لحاظ شدت

در روز ۳، به علت عدم تشکیل لایه اپیدرم امتیازدهی و مقایسه‌ای از لحاظ معیارهای این لایه بین گروه‌های آزمایشی صورت نگرفت. در همه ارزیابی‌های انجام شده در روز سوم در ناحیه درم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

در لایه درم امتیاز مربوط به میزان رشته‌های کلاژن (3/00± 0/00)، فیبروبلاست‌ها (5/00± 0/00) و تعداد رگ‌های خونی (4/00 ± 0/00) در گروه درمانی ۵ درصد بیشتر از سایر گروه‌ها بود. از لحاظ جهت رشته‌های کلاژن

پرخونی و خونریزی نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد.

در روز ۷، همه تفاوت‌های معنی‌دار مطالعه حاضر از نظر هیستوپاتولوژی در این روز بین گروه‌ها وجود داشت. همچنان لایه اپیدرم در گروه کنترل منفی تشکیل نشده بود در نتیجه از لحاظ میزان تشکیل اپیدرم بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشت. گروه پماد با غلظت ۵ درصد از لحاظ نظم سلول‌های بازال افزایش معنی‌داری را نشان داد ($3/00 \pm 0/00$). در این روز از لحاظ معیار تقسیمات میتوزی سلول‌های بازال کمترین امتیاز مربوط به پماد با غلظت ۵ درصد بود ($3/33 \pm 0/58$) ولی بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. از لحاظ تکثیر و تمایز سلول‌های خاردار بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت که از نظر معیار تمایز سلول‌های خاردار گروه پماد با غلظت ۵ درصد بیشترین امتیاز ($3/00 \pm 0/00$) را در بین گروه‌های مختلف داشت (شکل ۴- الف و ب).

سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیلین در همه نمونه‌های سه گروهی که لایه اپیدرم در آنها تشکیل شده بود قابل مشاهده بود. هایپرپلازی لایه‌ی اپیدرم در نمونه‌های گروه کنترل مثبت ($5/00 \pm 0/00$) نسبت به گروه‌های دیگر افزایش غیر معنی‌داری داشت (شکل ۴- ج).

در بررسی‌های مربوط به لایه درم میزان رشته‌های کلاژن در بین گروه‌های مختلف تفاوتی معنی‌دار وجود داشت و بیشترین امتیاز مربوط به گروه پماد با غلظت ۵ درصد بود ($3/67 \pm 0/58$) اما از لحاظ جهت رشته‌های کلاژن اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف دیده نشد. از لحاظ معیار فیبروسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها بیشترین امتیاز مربوط به گروه پماد درمانی ۵ درصد ($4/33 \pm 0/58$) و کمترین امتیاز مربوط به گروه کنترل منفی ($2/67 \pm 0/58$) بود و بین گروه‌های مختلف از لحاظ این معیار تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

عضلات صاف در روز هفت در هیچ‌کدام از گروه‌ها مشاهده نشد. از لحاظ تعداد رگ‌های خونی بیشترین امتیاز

مربوط به گروه پماد درمانی ۵ درصد بود ($3/00 \pm 0/00$) ولی هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از لحاظ تعداد و جهت رگ‌های خونی مشاهده نشد. از لحاظ شدت سلول‌های التهابی بیشترین تفاوت معنی‌دار مربوط به گروه کنترل منفی ($3/00 \pm 0/00$) و کمترین امتیاز مربوط به گروه پماد با غلظت ۲ درصد ($1/00 \pm 0/00$) بود.

از لحاظ شدت پرخونی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد و بیشترین امتیاز مربوط به گروه کنترل مثبت ($3/00 \pm 0/00$) و کمترین امتیاز مربوط به گروه پماد با غلظت ۵ درصد ($1/67 \pm 0/58$) بود. در روز هفت تنها در گروه کنترل منفی خونریزی بود و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود داشت. فولیکول‌های مو، غدد سباسه و غدد عرق نیز در هیچ‌کدام از گروه‌های مختلف در روز هفت تشکیل نشده بودند.

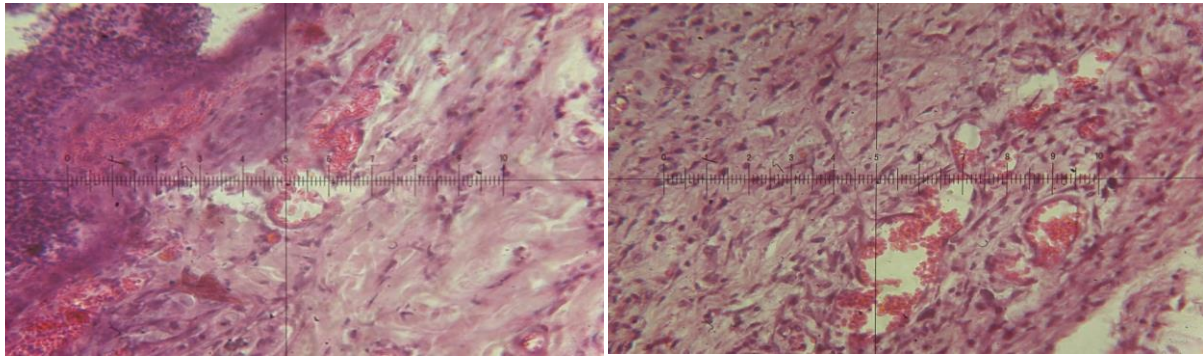
در روز ۱۴، معیارهای هیستوپاتولوژی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. بیشترین امتیاز از لحاظ نظم سلول‌های بازال مربوط به گروه درمانی ۵ درصد ($4/50 \pm 0/71$) و بعد از آن گروه درمانی ۲ درصد ($4/00 \pm 0/00$) بود و کمترین امتیاز را گروه کنترل منفی ($3/00 \pm 0/00$) داشت. از لحاظ تقسیمات میتوزی در این روز کمترین امتیازها متعلق به گروه‌های درمانی ۵ و ۲ درصد ($1/50 \pm 0/71$) بود. مقایسه سلول‌های لایه خاردار نیز از لحاظ تکثیر و تمایز و همچنین معیار هایپرپلازی اپیدرم هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری نشان نداد. سلول‌های دانه‌دار حاوی کراتوهیلین نیز از لحاظ آماری فاقد تفاوت معنی‌دار بودند.

مورد دیگری که در لایه‌ی اپیدرم مورد مقایسه قرار گرفت حضور Rete ridges بود که از نظر این معیار گروه درمانی ۲ درصد بیشترین امتیاز ($5/00 \pm 0/00$) را داشت. از لحاظ میزان تشکیل اپیدرم تفاوت‌ها غیر معنی‌دار بود. گروه‌های درمانی ۵ درصد و ۲ درصد (بیشترین امتیاز $4/00 \pm 0/00$) را از لحاظ میزان رشته‌های کلاژن بین گروه‌های مختلف نشان دادند. از لحاظ حضور سلول‌های فیبروسیت‌ها و فیبروبلاست گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد حاوی مقادیر بیشتری ($3/00 \pm 0/00$) از این نظر بودند.

بررسی بهبود زخم تلقیح شده با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط گیاه گل راعی ...

نشد. فولیکول‌های مو فقط در گروه‌های درمانی با غلظت ۵ و ۲ درصد در روز چهاردهم تشکیل شده بود. در گروه درمانی با غلظت ۵ درصد غدد سباسه نیز مشاهده شد اما در هیچ‌کدام از گروه‌ها غدد عرق در روز چهاردهم تشکیل نشده بود (شکل ۵- الف، ب و ج).

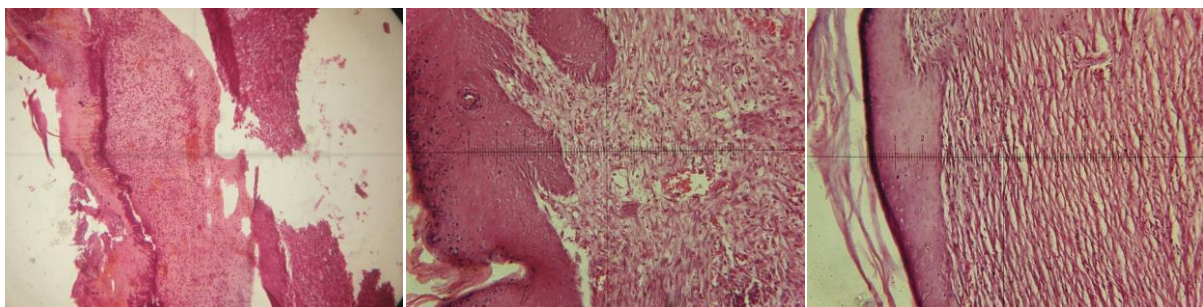
در گروه کنترل منفی عضله صاف مشاهده نشد ($1/00 \pm 0/00$) و بیشترین میزان تشکیل عضلات صاف مربوط به گروه پماد با غلظت ۵ درصد بود ($4/00 \pm 0/00$). عروق خونی نیز از لحاظ تعداد و جهت تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نداشتند. در روز چهاردهم در هیچ‌کدام از گروه‌ها سلول‌های التهابی، پرخونی و خونریزی مشاهده



ب

الف

شکل ۳- تصاویر پاتولوژی در روز ۳ الف: پرخونی و بافت همبند سرشار از فیبروبلاست مربوط به گروه درمان ۵٪ در روز سه با بزرگنمایی ۴۰، ب: سلول‌های التهابی و خونریزی در مقطع مربوط به گروه درمانی کنترل مثبت در روز سه با بزرگنمایی ۴۰

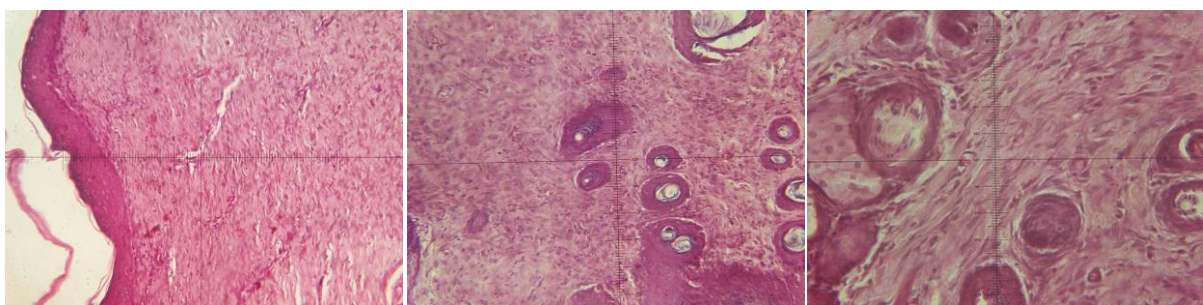


ج

ب

الف

شکل ۴- تصاویر پاتولوژی در روز ۷ الف: موازی بودن رشته‌های بافت همبند و سلول‌های فیبروبلاست در مقطع مربوط به گروه درمان ۵٪ در روز هفت با بزرگنمایی ۲۰، ب: هایپرپلازی سلول‌های اپیدرم و پرخونی در مقطع مربوط به گروه درمان ۲٪ در روز هفت با بزرگنمایی ۲۰، ج: شروع تشکیل و پیشروی بافت پوششی و تجمع بافت نکروزه و سلول‌های التهابی فراوان در مقطع مربوط به زخم عفونت کرده در گروه کنترل مثبت در روز هفت با بزرگنمایی ۱۰



ج

ب

الف

شکل ۵- تصاویر پاتولوژی در روز ۱۴ الف: تشکیل فولیکول‌های مو و غدد سباسه در مقطع مربوط به گروه درمانی ۵٪ در روز چهارده با بزرگنمایی ۴۰، ب: تشکیل فولیکول‌های مو در مقطع مربوط به گروه درمانی ۲٪ در روز چهارده با بزرگنمایی ۲۰، ج: مقطع بافت شناسی مربوط به گروه درمان کنترل مثبت در روز چهارده با بزرگنمایی ۲۰

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ، به‌ویژه در غلظت ۵ درصد موجب کاهش معنی‌دار مساحت زخم در مقایسه با گروه‌های کنترل مثبت و منفی گردید. مساحت زخم در روز سه در گروه‌های عصاره گل راعی و روغن شترمرغ ۲ و ۵ درصد با گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری داشت ($P\text{-value} < 0/05$) و در روز هفت مساحت زخم بین گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد با گروه کنترل مثبت، کاهش معنی‌داری داشت. علت این اختلافات از روز ۳ تا روز ۷، احتمالاً ایجاد التهاب و عفونت در بعضی نمونه‌های مربوط به گروه کنترل مثبت که توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده در روز صفر آزمایش بود، که می‌تواند سرعت التیام و کاهش مساحت زخم را در گروه کنترل مثبت به‌صورت قابل توجهی کم کند.

به نظر می‌رسد استفاده روزانه از ترکیب وازلین و اوسرین در گروه کنترل مثبت به دلیل مرطوب نگه‌داشتن زخم شرایط بهتری را برای رشد باکتری تلقیح شده، نسبت به گروه کنترل منفی فراهم کرده بود و در گروه‌های درمانی عصاره گل راعی و روغن شترمرغ التهاب و عفونت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت که این مورد با مطالعات قبلی عصاره گل راعی (۱۸) و روغن شترمرغ (۱۹) مطابقت دارد. تشخیص التهاب و عفونت بر اساس یافته‌های بالینی و هیستوپاتولوژی بوده است.

در آخرین روز بررسی مساحت زخم‌ها (روز ۱۴)، در نمونه‌های مربوط به گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد مساحت زخم‌ها به صفر رسیده بود و هیچ‌گونه بافت زخمی در ارزیابی بالینی مشاهده نگردید، این در حالی بود که در بعضی نمونه‌های مربوط به گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی زخم کوچکی بر پشت حیوان قابل مشاهده و اندازه‌گیری بود. البته این تفاوت در روز ۱۴ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

در این تحقیق، درصد بهبود زخم که یک متغیر وابسته به مساحت زخم در روز ایجاد آن (روز صفر) است نیز محاسبه شده است. اگرچه زخم‌ها به‌صورت استاندارد و هم اندازه با یک پانچ ۶ میلی‌متری ایجاد شده بودند ولی به دلایل مختلفی مثل کشیده شدن پوست در زمان ایجاد زخم و یا تفاوت‌های فردی در میزان کشیده شدن پوست اطراف زخم ممکن است مساحت ایجاد شده زخم‌ها در روز صفر متفاوت باشد و به این دلیل از درصد بهبود زخم برای بررسی بیشتر استفاده شده است.

درصد بهبود زخم در روز سه در گروه درمانی ۵ درصد افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها داشت. به علت مشاهده التهاب و عفونت در گروه کنترل مثبت، تفاوت در درصد بهبود زخم در گروه‌های درمانی ۲ و ۵ درصد با گروه کنترل مثبت در روز هفت از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری را نشان داد.

در مطالعه سندگل و همکاران (۲۰۲۱) از عصاره دو گیاه گل راعی و آلوئه‌ورا استفاده شده است و مساحت زخم‌ها در طی مطالعه تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در مطالعه حاضر تفاوت مساحت زخم‌ها در روزهای ۳ و ۷ معنی‌دار شده است. تفاوت درصد التیام زخم در روز سوم آن مطالعه معنی‌دار شده است در حالی که در مطالعه حاضر تفاوت‌های دو روز ۳ و ۷ معنی‌دار است و این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده اثرات بهتر ترکیب گل راعی و روغن شترمرغ باشد. گل ایکن و همکاران (۲۰۲۱) از روغن گل راعی همراه با عصاره آلوئه‌ورا در پوشش زیست تخریب‌پذیر پلی-کاپرولاکتون و ژلاتین در زخم دیابتی استفاده کردند که روغن گل راعی بهتر از آلوئه‌ورا در التیام زخم‌های دیابتی مؤثر بوده است. در مطالعه آلتان و همکاران (۲۰۱۸) از روغن گل راعی به‌صورت موضعی در جراحات ایجاد شده به‌صورت جراحی مخاط دهان موش‌های دیابتی شده استفاده شده است. در روز سوم مطالعه تغییرات معنی‌داری

بین دو گروه کنترل و روغن گل راعی مشاهده نشد ولی در روز هفتم تغییرات معنی‌داری در التیام گروه روغن گل راعی مشاهده شد که از نظر زمانی التیام مشابه مطالعه حاضر است. ازون حصارکیک و همکاران (۲۰۲۱) از روغن گل راعی همراه با روغن عصاره دانه انار و زردچوبه برای التیام زخم استفاده نموده‌اند که گروه حاوی روغن گل راعی همراه با زردچوبه در مطالعه اثرات بهبود دهنده بهتری نسبت به ایبوبروفن داشته است. شمپ و همکاران (۱۹۹۹) اثرات ضد التهابی آمنتوفالون و هیپرفورین و اثرات ضد باکتریایی هایپرفورین موجود در گل راعی را نشان داده‌اند. فرهادپور و همکاران (۲۰۱۸) از روغن شترمرغ به تنهایی و به صورت موضعی در درمان زخم‌هایی که به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آیروژینوزا* آلوده شده بودند بهره بردند. مساحت این زخم‌ها به صورت معنی‌داری در گروه‌های درمان با روغن شترمرغ کاهش یافته بود که با مطالعات ما در روز هفتم همخوانی دارد. یالسنین گایا و همکاران (۲۰۲۲) تجویز موضعی عصاره گل راعی با بوویدین آبودان، تتور بنزوئین و ترتینوئین را در التیام زخم‌های جراحی مورد مقایسه قرار داده‌اند. عصاره گل راعی به صورت معنی‌داری بیشترین میزان از اپیتلیالیزیشن مجدد، تجمع کلاژن و کمترین میزان تعداد سلول‌های التهابی و بافت جوانه‌ای را نسبت به سایر مواد نشان داده است که با نتایج ما همخوانی دارد. تامسون و همکاران (۲۰۰۷) مطالعه‌ای بر روی تأثیر گل راعی در روند درمان زخم‌های موش‌های دیابتی و بررسی پارامترهایی مانند جمعیت فیبروبلاست‌ها، سنتز رشته‌های کلاژن و عروق‌زایی انجام داده‌اند که نشان می‌دهد گل راعی بعضی از این پارامترها را تعدیل می‌کند و در نتیجه باعث سرعت بخشیدن به روند بازسازی بافت می‌شود.

علت احتمالی دیگر برای تسریع التیام زخم به وسیله ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ به خصوص در مقادیر بالاتر (۵ درصد)، می‌تواند افزایش تکثیر و تعداد فیبروبلاست‌ها و همچنین افزایش میزان رشته‌های کلاژن باشد که در این موارد در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ در گروه‌های

درمانی بیشتر از گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی بوده و حتی این تفاوت‌ها در روز هفتم معنی‌دار بوده است ($P\text{-value} < 0/05$). نفوذ بیشتر فیبروبلاست‌ها و افزایش میزان رشته‌های کلاژن با ایجاد بافت جوانه‌ای موجب تسریع روند تشکیل بافت پوششی می‌شود و از این طریق به روند التیام سرعت می‌بخشد.

سندگل و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند در روز هفت در گروه عصاره دو گیاه گل راعی و آلوئه‌ورا، میزان سلول‌های فیبروبلاست در طی مطالعه افزایش غیر معنی‌داری داشته است. البته میزان رشته‌های کلاژن در آن گروه درمانی در روز هفت افزایش معنی‌دار داشته، که یافته‌های حاضر را تأیید می‌کند. دمیران و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند هیدروژل کیتوزان و پلی‌ونیل الکل حاوی روغن گل راعی در کاهش اندازه زخم مؤثر بوده است که از این نظر مشابه مطالعه حاضر می‌باشد.

هایپریسین و سودوهایپریسین موجود در عصاره گل راعی سبب افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست و همچنین میزان کلاژن موجود در آنها و کاهش سلول‌های پیر و مرده می‌شوند. در نتیجه عصاره روغنی این گیاه می‌تواند سبب تسریع روند بهبود ترک‌خوردگی پا شود (۷) که با یافته‌های ما همخوانی دارند.

روغن شترمرغ به تنهایی و به صورت موضعی در درمان زخم‌هایی که به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آیروژینوزا* آلوده شده بودند استفاده شده است. میزان رگ‌های جدید، شمارش فیبروبلاست‌ها و ذخیره کلاژن در گروه‌های درمان شده با روغن شترمرغ افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود (۱۹).

امولسیون روغن شترمرغ در آب بر روی فیبروبلاست‌های پوست انسان اثرات سیتوتوکسیک نداشته و علاوه بر آن اثرات آنتی‌اکسیدان و ضد باکتری بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است (۲۷).

در مطالعه حاضر در روز ۱۴ در گروه درمانی پماد با غلظت ۵ درصد فولیکول مو و غدد سباسه مشاهده شد همچنین در روز ۱۴ در گروه پماد با غلظت ۲ درصد نیز

گروه درمانی ۵ درصد ممکن است بیشتر شود که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیرات التیام بخشی ترکیب عصاره گل راعی و روغن شترمرغ و مقایسه دو غلظت مختلف از این ترکیب بر زخم جلدی تلقیح شده با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب عصاره گل راعی ۵ درصد و روغن شترمرغ ۵ درصد نتایج معنی‌دار بهتری جهت التیام زخم از خود نشان می‌دهد. همچنین در صورت آلوده شدن زخم با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، ترکیب استفاده شده نشان داد که می‌تواند از ایجاد عفونت در زخم جلوگیری کند.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همه همکارانی که در انجام این کار با ما مساعدت نمودند خصوصاً شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

فولیکول مو در مقاطع پاتولوژی تهیه شده دیده شد، در صورتی که در گروه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی هیچ فولیکول مو و غدد سباسه‌ای تشکیل نشده بود که می‌تواند این موارد نشان‌دهنده التیام کامل زخم باشد که با مطالعه سندگل و همکاران در سال ۲۰۲۱ همخوانی دارد که احتمالاً ناشی از وجود عصاره گل راعی می‌باشد.

در مطالعه دیگری روغن شترمرغ همراه با عسل، موم و برموم زنبور عسل، عصاره اتانولی سیاه‌دانه و سنای هندی به‌صورت پماد برای درمان زخم‌های موش‌های دیابتی استفاده شده است در گروهی که از پماد حاوی آنها استفاده شده است التیام زخم و میزان تجمع کلاژن افزایش یافته و در بررسی هیستوپاتولوژی فولیکول‌های مو و غدد چربی در آنها مشاهده شده است (۲۸) که نتایج آن با مطالعه حاضر همخوانی دارد. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند روغن شترمرغ خاصیت نفوذپذیری بیشتری نسبت به وازلین برای انتقال سینومنین از پوست رت داشته است با توجه به این موضوع احتمال نفوذ مواد درمانی گل راعی در

References

- 1- Duke JA. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press Inc. Boca Raton. 2002; P: 374- 375.
- 2- Simor AE, Phillips E, McGeer A, et al. Mupirocin resistance in Staphylococcus aureus from a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9): 2877-2880.
- 3- Ghaderi R, Zardast M, Hosseini M, Delgir B, Hassanpour M. Comparison of Antibacterial Effect of Cichorium Intybus L. with Vancomycin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin and Penicillin (In Vitro). *Clin Exp Pharmacol.* 2012; 2(2): 1000113. [In persian]
- 4- Morton LM, Phillips TJ. Wound Healing Update. *Semin Cutan Med Surg.* 2012; 31(1): 33-7.
- 5- Shiu WKP, Malkinson JP, Rahman MM, Curry J, Stapleton P, Gunaratnam M, et al. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in Staphylococcus aureus. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42(6): 513-8.
- 6- Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of Hypericum perforatum L. *Pharmacopsychiatry.* 2001; 34(1): S116 - S118.
- 7- Wölflle U, Seelinger G, Schempp CM. Topical Application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica.* 2014; 80(2- 3): 109-20.
- 8- Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream—a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phyto-medicine.* 2003; 10(4): 31-37.
- 9- Gavanji S, Larki B, Taraghian AH. A review of Application of Ostrich oil in Pharmacy and Diseases treatment. *JNAS.* 2013; 2013-2-11: 650-654.
- 10- El-Kamali HH. Folk medicinal use of some animal products in Central Sudan. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72: 279-282.
- 11- Grompone MA, Irigaray B, Gil M. Composition and thermal properties of Rhea oil and its fractions. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2005; 107: 762-766.
- 12- Snowden JM, Whitehouse MW. Anti-in-

inflammatory activity of emu oils in rats. *Inflammopharmacology*. 1997; 5: 127-132.

13- Abimosleh SM, Tran CD, Howarth GS. Emu Oil: A novel therapeutic for disorders of the gastrointestinal tract? *J Gastroenterol hepatol*. 2012; 27: 857-861.

14- Politis MJ, Dmytrowich A. Promotion of second intention wound healing by emu oil lotion: comparative results with furasin, polysporin, and cortisone. *Plast Recon Surg*. 1998; 102: 2404-2407.

15- Winn WC, Allen SD, Allen S. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. London: Lippincott Williams & Wilkins 1997; 200: 211-94.

16- Singer AJ, Thode HC, McClain SA. Development of a histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. *Acad Emerg Med*. 2000; 7: 1083- 1088.

17- Sanadgol S, Aghchelou MR, Darush S, Jamshidian A. Effects of Hypericum perforatum and Aloe vera extracts in rat open wounds inoculated with Staphylococcus aureus: clinical and histopathology aspects. *NFVM*. 2021; 4 (1): 1-22. [In persian]

18- Sherif MM, Elshikh HH, Abdel-Aziz MM, Elaasser MM, Yosri M. In Vitro Antibacterial and Phytochemical Screening of Hypericum perforatum Extract as Potential Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant (MDR) Strains of Clinical Origin. *Biomed Res Int*. 2023; 2023: 6934398.

19- Farahpour MR, Vahid M, Oryan A. Effectiveness of topical application of ostrich oil on the healing of Staphylococcus aureus- and Pseudomonas aeruginosa-infected wounds. *Connect Tissue Res*. 2018; 59(3): 212-222. [In persian]

20- Guleken Z, Depciuch J, Ege H, İlbay G, Kalkandelen C, Ozbeyli D, et al., Spectrochemical and biochemical assay comparison study of the healing effect of the Aloe vera and Hypericum perforatum loaded nanofiber dressings on diabetic wound. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* .2021;

254: 119639.

21- Altan A, Aras MH, Damlar İ, Gökçe H, Özcan O, Alpaslan C. The effect of Hypericum Perforatum on wound healing of oral mucosa in diabetic rats. *Eur Oral Res*. 2018; 52(3): 143-149.

22- Uzunhisarcıklı E, Yerer MB. Role of Hypericum perforatum oil and pomegranate seed oil in wound healing: an in vitro study. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2021; 77(5-6): 189-195.

23- Schemp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria. *The Lancet*. 1999.

24- Yalcinkaya E, Mert Basaran M, Tunckasık ME, Yazici GN, Elmas C, Kocaturk S. Efficiency of hypericum perforatum, povidone iodine, tincture benzoin and tretinoin on wound healing. *Food Chem Toxicol*. 2022; 166: 113209.

25- Thomson Healthcare. *PDR for Herbal Medicines*. 4th ed. Montvale; NJ, USA; 2007.

26- Demirhan I, Korkmaz A, Oner E, Gumuscu N, Erbil Y, Babaarslan O, et al. Synthesis, characterization, and antibacterial effect of St. John's wort oil loaded chitosan hydrogel. *Int J Biol Macromol*. 2024; 260(Pt 1): 129444.

27- Ponphaiboon J, Limmatvapirat S, Limmatvapirat C. Development and Evaluation of a Stable Oil-in-Water Emulsion with High Ostrich Oil Concentration for Skincare Applications. *Molecules*. 2024; 29(5): 982.

28- Khodabakhshi D, Vaseghi G, Mirzaee A, Eskandarinia A, Zargar Kharazi A. Antimicrobial activity and wound healing effect of a novel natural ointment: an in vitro and in vivo study. *J Wound Care*. 2023; 32(6): S18-S26. [In persian]

29- Liu X, Chen T, Liu X, Chen Y, Wang L. Penetration effect of ostrich oil as a promising vehicle on transdermal delivery of sinomenine. *J Oleo Sci*. 2013;62: 657-664.



Evaluation of Wound Healing Inoculated with *Staphylococcus aureus* by *St. John's Wort* Extract and Ostrich Oil

Roxana Sarabandi¹, Mohammad Reza Aghchelou^{2*}, Dariush saadati³, Abbas Jamshidian⁴

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

2- Assistant professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Associated professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

4- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: May 06, 2025; Revise: July 02, 2025; Accept: July 03, 2025



10.22034/nfvm.2025.521711.1285

Summary

Abstract: *Staphylococcus aureus* is one of the most significant bacterial agents in skin wound infections. In complementary medicine, medicinal plants are of interest due to their antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. This study investigates the effect of a combination of *St. John's Wort* extract and ostrich oil on the healing of open wounds inoculated with *S. aureus* in rats. Forty adult rats were divided into four groups: a negative control, a positive control (Vaseline + Eucerin), and two treatment groups with ointments containing 2% and 5% of the mentioned combination. The wounds were examined on days 0, 3, 7, and 14 for healing percentage and histopathological changes. Findings showed that the healing percentage on day 7 was significantly higher in the two treatment groups compared to the positive control group. Additionally, the mean histopathology scores of the wounds on days 7 and 14 significantly better in the treatment groups than in the negative control group. The results indicate that the combination of *St. John's Wort* extract and ostrich oil reduces inflammation and accelerates the healing of infected wounds, with the 5% ointment showing greater efficacy than the 2% ointment.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *St. John's Wort* extract, ostrich oil, histopathology, wound healing



نشریه تازه‌ها در میکروبی‌شناسی دامپزشکی

وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir

فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴



دوره ۸، شماره ۳، پائیز ۱۴۰۴، صفحات ۴۰-۵۳

بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های برپایه کربوکسی‌متیل سلولز ترکیب‌شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

داوود نصیری*

استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد نقده، دانشگاه آزاد اسلامی، نقده، ایران.
دریافت مقاله: ۱۲ بهمن ۱۴۰۳، بازنگری: ۰۴ اردیبهشت ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۰۶ اردیبهشت ۱۴۰۴

 10.22034/nfvm.2025.503535.1274

چکیده

ماهی قزل‌آلای به فساد میکروبی بسیار حساس است و امروزه استفاده از بسته‌بندی‌های زیست‌فعال برای افزایش ماندگاری مواد غذایی فسادپذیر مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر فیلم‌های زیست‌فعال بر پایه کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) ترکیب شده با نانوذرات اکسید روی (ZnO) و عصاره پوست انار (PE) بر حفظ کیفیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. فیلم‌ها به روش ریخته‌گری محلول تهیه شدند و در پنج گروه مختلف ارزیابی شدند. فیلم‌ها شامل کربوکسی‌متیل سلولز (CMC)، کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی (CMC/ZnO)، کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی/ ۵۰٪ درصد عصاره پوست انار (CMC/ZnO/0.5% PE)، کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی/ ۱ درصد عصاره پوست انار (CMC/ZnO/1% PE) و کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی/ ۲ درصد عصاره پوست انار (CMC/ZnO/2% PE) بودند. نمونه‌های ماهی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت یک هفته نگهداری شدند. ویژگی‌های کیفی نمونه‌های ماهی قزل‌آلای شامل میزان بازهای ازته فرار (TVBN)، میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) و pH بررسی شد. نتایج نشان داد که فیلم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) موجب کاهش TVBN و TVC شدند ($P < 0.05$). همچنین، pH نمونه‌ها در گروه‌های تیمار شده با فیلم‌ها نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل توجهی پایین‌تر بود ($P < 0.05$) که نشان‌دهنده‌ی کارایی این فیلم‌ها در کاهش فعالیت‌های میکروبی و تأخیر در روند فساد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده از فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز ترکیب‌شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار، به‌ویژه فیلم CMC/ZnO/2% PE، می‌تواند به‌عنوان روشی مؤثر برای حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری ماهی قزل‌آلای در طول نگهداری باشد.

واژگان کلیدی: کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی، عصاره پوست انار، ماهی قزل‌آلای، فعالیت آنتی‌باکتریایی، بازهای ازته فرار

مقدمه

هدررفت مواد غذایی یکی از چالش‌های اساسی در زنجیره تأمین جهانی غذا است. سالانه بخش قابل توجهی از محصولات کشاورزی و دریایی، به‌ویژه ماهی‌ها، به دلیل رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فسادپذیری بالا از بین می‌روند. در کشورهای کمتر توسعه‌یافته، عمده هدررفت مواد غذایی در مراحل پس از برداشت و پیش از فرآوری رخ می‌دهد، در حالی که در کشورهای توسعه‌یافته، این ضایعات بیشتر در مراحل خرده‌فروشی و مصرف مشاهده می‌شود (۱). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های مهم آبزیان است که به دلیل بافت لطیف و محتوای بالای رطوبت، در برابر آلودگی‌های میکروبی و فساد سریع بسیار حساس است (۲). از این‌رو، استفاده از بسته‌بندی‌های زیست‌فعال که دارای خواص ضد باکتریایی بوده و ماندگاری مواد غذایی را افزایش دهند، اهمیت زیادی دارد (۳، ۴). در سال‌های اخیر، بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به‌عنوان جایگزین مناسبی برای پلاستیک‌های رایج در صنعت بسته‌بندی معرفی شده‌اند (۵). پلی‌ساکاریدها، به‌ویژه کربوکسی‌متیل سلولز (CMC)، به دلیل فراوانی، زیست‌سازگاری، خاصیت فیلم‌سازی مطلوب و قیمت مقرون به‌صرفه، یکی از بهترین گزینه‌ها برای تولید فیلم‌های بسته‌بندی زیست‌فعال محسوب می‌شوند (۶، ۷).

با این حال، برای بهبود عملکرد ضد باکتریایی این فیلم‌ها، افزودن ترکیبات ضد میکروبی ضروری است. این نانوذرات در تماس با باکتری‌ها، به‌ویژه تحت شرایط نور یا در حضور رطوبت، موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS مانند پراکسید هیدروژن، هیدروکسیل رادیکال و آنیون سوپراکسید می‌شوند (۸، ۹). این گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به‌طور مستقیم با غشای سلولی باکتری‌ها واکنش دهند، سبب تخریب غشاء، افزایش نفوذپذیری آن و در نهایت مرگ سلولی شوند (۱۰). علاوه بر این، نانوذرات اکسید روی می‌توانند به پروتئین‌ها و آنزیم‌های ضروری داخل سلول آسیب رسانده و مسیرهای متابولیکی حیاتی

باکتری‌ها را مختل کنند (۹). همچنین، این نانوذرات موجب بهبود خواص مکانیکی، حرارتی و ممانعتی فیلم‌های بسته‌بندی شده و در نتیجه پایداری و عملکرد آنها را افزایش می‌دهند (۱۱). علاوه بر این، استفاده از ترکیبات گیاهی مانند عصاره پوست انار می‌تواند فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های زیست‌فعال را تقویت کند (۱۲). پوست انار سرشار از ترکیبات فنولی، به‌ویژه اسید الاجیک (EA)، است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی قوی است (۱۳).

کارایی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی نانوذرات تیتانیوم/ اسانس شوید/ کربوکسی‌متیل سلولز (۱۴)، امولسیونه فعال بر پایه کیتوزان-کربوکسی‌متیل سلولز حاوی نانوذرات اکسید روی (۱۵) و گلوکومانان کنجاک/ کربوکسی‌متیل سلولز/ آنتوسیانین شاه‌توت سیاه (۱۶) برای نگهداری نمونه‌های ماهی گزارش شده است. با این حال، تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز تقویت شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار بر روی نمونه‌های ماهی نپرداخته است.

با توجه به فسادپذیری بالای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز تقویت شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار و تأثیر آن بر کیفیت و ماندگاری فیله‌های ماهی در طول دوره نگهداری است.

مواد و روش‌ها

مواد: کربوکسی‌متیل سلولز سدیم، با میانگین وزن مولکولی ۲۵۰,۰۰۰ و درجه جایگزینی ۰/۹ درصد و هیدروکسید سدیم (پلت‌های بدون آب) از شرکت Sigma-Aldrich تأمین گردید. استات روی، از شرکت مرک (دارمشتات، آلمان) خریداری شد.

تهیه‌ی نانوذرات: نانوذرات اکسید روی بر اساس روش‌های گزارش شده توسط دیگر پژوهشگران سنتز

گردید (۱۷). ابتدا یک محلول آبی ۰/۲۰ مولار از روی کلرید به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر آماده و در حمام آب تا دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس، ۲۰ میلی‌لیتر محلول آبی سدیم هیدروکسید با غلظت ۵ مولار به آرامی و به صورت قطره‌ای در مدت ۲۰ دقیقه، با هم‌زدن ملایم، به آن اضافه گردید. رسوب سفید به مدت مشخصی ته‌نشین و محلول رویی جدا شد. برای حذف کامل سدیم کلرید و تنظیم pH به ۷، رسوب چندین بار با آب مقطر شستشو یافت. سپس ذرات در ایزوپروپانول قرار گرفتند و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک تحت امواج فراصوت قرار گرفتند تا تجمعات ذرات از هم باز شوند. پس از آن، ذرات با استفاده از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه (معادل ۶۰۴۸ برابر شتاب جاذبه) به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری گردیدند. ذرات دوباره سه بار شسته و سپس در کوره الکتریکی در دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت کلسینه شدند. در نهایت، ماده جامد سفید حاصل با استفاده از آسیاب گلوله‌ای به طور کامل خرد و نانوذرات اکسید روی تهیه گردید.

تهیه‌ی عصاره: عصاره‌ی پوست انار طبق روش‌های گزارش شده توسط پژوهشگران دیگر استخراج گردید (۱۸)، (۱۹). انارهای رسیده از بازار محلی خریداری و پوست‌های تازه به طور دستی برش داده شدند. سپس پوست‌ها به قطعات کوچک‌تر تقسیم و در آنکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پس از خشک‌شدن، پوست‌ها با آسیاب به پودر تبدیل و در دمای محیط نگهداری گردیدند. در مرحله بعد، ۵ گرم از این پودر در محلول هیدروالکلی ۸۰ درصد (ترکیب ۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد آب) با نسبت ۱ به ۵۰ (یک گرم پودر به ۵۰ میلی‌لیتر محلول) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خیسانده شد تا عصاره‌گیری صورت گیرد. در نهایت، عصاره پوست انار از طریق کاغذ واتمن شماره ۴۱ فیلتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آن خشک گردید. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه‌ی فیلم‌ها: فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر

نانوکامپوزیتی بر پایه کربوکسی‌متیل سلولز با استفاده از روش ریخته‌گری محلول طبق مطالعات دیگر پژوهشگران تهیه گردیدند (۱۴). به طور خلاصه، ۱/۲۰ گرم گلیسرول (۳۰ درصد وزنی نسبت به کربوکسی‌متیل سلولز) به عنوان نرم‌کننده در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و دمای محلول به ۷۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس ۴ گرم کربوکسی‌متیل سلولز به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه هم زده شد تا محلولی شفاف حاصل گردد. هم‌زمان، ۳ درصد وزنی کربوکسی‌متیل سلولز از نانوذرات اکسید روی در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه پراکنده گردید. پس از حل کامل کربوکسی‌متیل سلولز، سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی به محلول افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر هم زده شد تا ترکیب یکنواخت حاصل شود. سپس ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار به محلول افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر هم زده شد. محلول‌های فیلم‌ساز بر روی صفحات شیشه‌ای پوشیده‌شده با تفلون توزیع و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط کنترل‌شده خشک شدند. در این مطالعه، پنج نوع فیلم زیست‌تخریب‌پذیر نانوکامپوزیتی تهیه گردید: فیلم خالص کربوکسی‌متیل سلولز، فیلم کربوکسی‌متیل سلولز حاوی نانوذرات اکسید روی، فیلم کربوکسی‌متیل سلولز/نانوذرات اکسید روی حاوی ۵۰/۰ درصد عصاره پوست انار، فیلم کربوکسی‌متیل سلولز/نانوذرات اکسید روی حاوی ۱۰/۰ درصد عصاره پوست انار و فیلم کربوکسی‌متیل سلولز/نانوذرات اکسید روی حاوی ۲/۰ درصد عصاره پوست انار. برای تهیه فیلم‌های حاوی عصاره پوست انار، به ترتیب ۵۰/۱، ۱ و ۲ درصد عصاره به محلول فیلم‌ساز اضافه گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط

آزمایشگاهی: برای ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها شامل لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC 19118)، سالمونلا تیفی‌موریوم (ATCC 14028) و اشریشیاکلی (ATCC 10536) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

اکسید/۵۰/۰ درصد عصاره، کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/۱ درصد عصاره و کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/۲ درصد بودند. گروه کنترل هیچ پوششی نداشت، در حالی که سایر گروه‌ها با فیلم‌های برپایه کربوکسی‌متیل سلولز و مقادیر مختلف روی اکسید و عصاره پوشش داده شدند. برای هر گروه، ۸۰ فیله در نظر گرفته شد و در مجموع ۴۸۰ فیله مورد مطالعه قرار گرفتند.

بررسی بازهای ازته فرار و میزان کل باکتری‌های

زنده: برای بررسی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC)، نمونه‌ها به مدت ۴ روز نگهداری شدند. بازهای ازته فرار بر اساس مطالعه آمگو و همکاران (۲۳) با استفاده از روش تیتراسیون اندازه‌گیری گردید. به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از نمونه‌ها همگن و با استفاده از تقطیر بخار کجدال همراه با محلول آبی هیدروکسید سدیم ۳۰ درصد (w/v) و اسید بوریک آبی ۴ درصد (v/v) استخراج شدند. سپس، عصاره حاصل در برابر ۰/۰۱ نرمال اسید هیدروکلریک تیترا گردید و مقادیر آن گزارش شد.

میزان کل باکتری‌های زنده بر اساس مطالعه خشنودی‌نیا و همکاران (۲۴) سنجش گردید. به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از هر نمونه ماهی ابتدا خرد و به ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی ۰/۹۰ درصد استریل شده منتقل شد و همگن گردید. سپس، ۱ میلی‌لیتر از هر رقت نمونه با آگار شمارش پلیت (Beijing Aoboxing Bio-tech Co., Ltd., Beijing, China) در ظروف پتری مخلوط و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، شمارش باکتری‌ها انجام شد. برای اندازه‌گیری pH، نمونه‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شدند. مخلوط‌ها فیلتر و pH آنها با استفاده از pH متر اندازه‌گیری گردید.

فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها:

فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها بر اساس مطالعه ووراپورایورت و همکاران (۲۵) مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، فیلم‌ها تهیه و به‌مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از اشعه ماوراء بنفش استریل شدند. فیله‌ها (با ابعاد

(تهران، ایران) تهیه گردید. لیستریا مونوسی‌توزنز به‌عنوان یک باکتری گرم‌مثبت مرتبط با غذاهای دریایی و سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی به‌عنوان باکتری‌های گرم‌منفی رایج در آلودگی مواد غذایی انتخاب شدند. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) با استفاده از روش میکرودایلوشن تعیین گردید (۲۰). برای آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی، ابتدا با استفاده از محلول سالین استریل، غلظت باکتری‌ها به 10^5 واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر (CFU/mL) تنظیم و سپس رقت‌هایی از عصاره در دامنه‌ی غلظتی ۰/۰۷۸ تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. صفحات میکرودایلوشن استریل ۹۶ چاهکی آماده و میکروپلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. MBC به‌عنوان کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده و/ یا با مرگ ۹۹/۵۰ درصد تلقیح اولیه تعیین گردید. با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (ELISA reader) و نرم‌افزار Microplate Manager نسخه ۴,۰ (Bio-Rad Laboratories, USA)، جذب نوری (OD) نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از نمونه‌ی بلانک و کنترل مثبت مقایسه گردید. اندازه‌گیری‌ها با بهره‌گیری از الیزا ریدر انجام شد. آزمایش‌ها در پنج تکرار مختلف صورت پذیرفت.

تهیه‌ی نمونه‌ها: نمونه‌های ماهی قزل‌آلای

رنگین‌کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) از یک بازار محلی تهیه گردید. ماهی‌ها به فیله‌های کوچک (هر کدام ۴۵ گرم با ابعاد $5 \times 2 \times 3$ سانتی‌متر مکعب) تقسیم و سطوح بالایی و پایینی فیله‌ها با فیلم‌هایی به ابعاد 7×7 سانتی‌متر پوشانده شدند، همان‌طور که در مطالعات دیگر پژوهشگران گزارش شده است (۲۱، ۲۲). ماهی‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت آزمایش‌های باکتریایی قرار گرفتند. گروه‌های آزمایشی شامل شش گروه کنترل و فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز، کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید، کربوکسی‌متیل سلولز/ روی

با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۶,۰۷) ترسیم شدند.

نتایج

فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی:

جدول ۱ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه‌شده را در آزمون‌های MIC و MBC برای سه باکتری بیماری‌زا نشان می‌دهد. فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز بدون افزودنی‌ها کمترین اثر مهارتی را داشتند، اما با افزودن نانوذرات اکسید روی، این کارایی بهبود یافت. ترکیب عصاره انار نیز به‌طور قابل توجهی اثر ضد باکتریایی را افزایش داد. در آزمون MBC، افزودن نانوذرات و عصاره باعث کاهش قابل توجه مقدار مورد نیاز برای از بین بردن باکتری‌ها شد، که نشان‌دهنده تأثیر این ترکیبات در تقویت خاصیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها است. نتایج نشان می‌دهد که با افزودن مقادیر بیشتری از عصاره پوست انار، خاصیت آنتی‌باکتریایی افزایش می‌یابد، به طوری که فعالیت آنتی‌باکتریایی در غلظت ۲ درصد بیشتر از ۱ درصد می‌باشد و در غلظت ۰/۵۰ درصد پایین‌تر از ۱/۰۰ درصد بود. بنابراین، افزودن نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار در بیشترین غلظت توانستند بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی را نشان دهند.

۳×۲×۵ سانتی‌متر مکعب) به‌صورت جداگانه با استفاده از میکروبیوت‌ها تا غلظت نهایی با باکتری‌های معرفی‌شده در بخش‌های پیشین تلقیح شدند. بر روی سطح هر فیله، ۱۰^۵ CFU/cm² از باکتری‌ها اعمال گردید و سپس با فیلم‌های مورد نظر پوشانده شدند. نمونه‌ها در دمای ۲±۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۵ درصد نگهداری شدند و پس از مدت مشخص، شمارش باکتریایی انجام گرفت. برای این منظور، سلول‌های باکتریایی موجود بر سطح فیلم‌ها با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت SCDLP (سویا-کازئین همراه با لستین و پلی‌سوربات) بازیابی و رقت‌های متوالی از آنها بر روی محیط کشت TSB آگار کشت داده شد.

روش‌های آماری: آنالیزها در پنج تکرار صورت گرفت و نتایج حاصل جهت بررسی اثرات تیمارها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد و با توجه به مقادیر، معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵، توزیع داده‌ها نرمال تشخیص داده شد. تحلیل آماری با بهره‌گیری از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده گردید. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱، SPSS Inc، شیکاگو، ایالات متحده) انجام گرفت و نمودارها

جدول ۱- فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه‌شده در آزمون‌های MIC و MBC

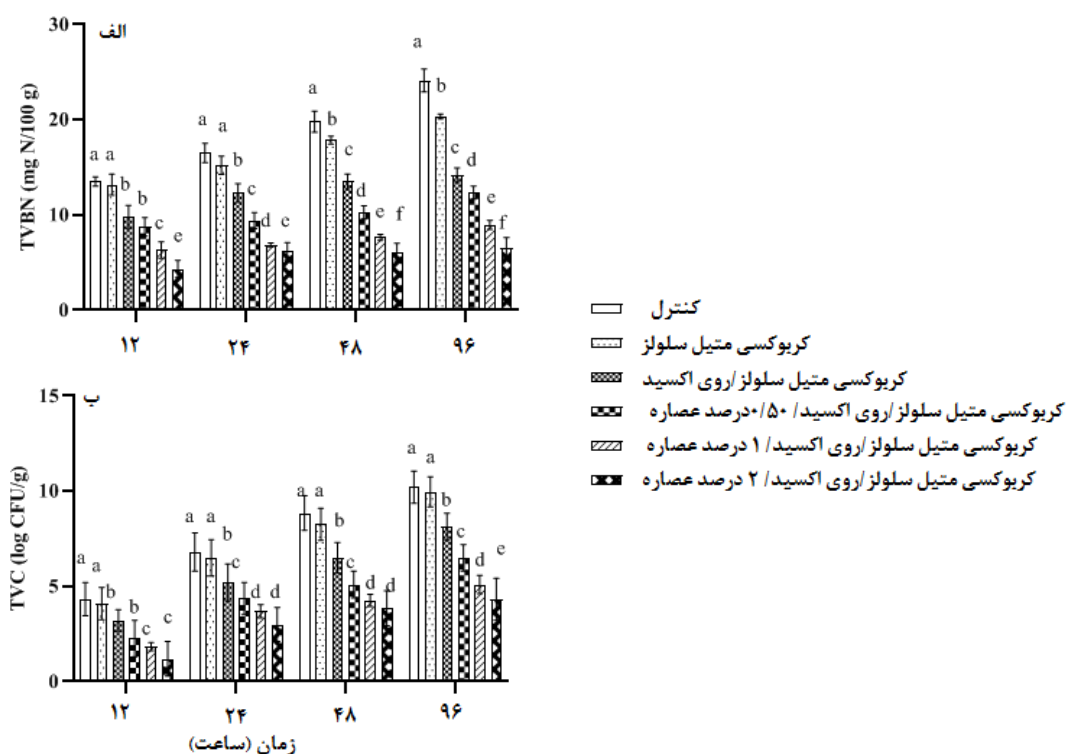
MIC (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)			باکتری‌ها
اشریشیاکلی	سالمونلا تیفی موربوم	لیستریا مونوسیتوزنز	
۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	کربوکسی‌متیل سلولز
۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰	کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید
۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰	کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید / ۰/۵۰ درصد عصاره
۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید / ۱/۰۰ درصد عصاره
۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید / ۲/۰۰ درصد عصاره
۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	استرپتومایسین
MBC (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)			باکتری‌ها
اشریشیاکلی	سالمونلا تیفی موربوم	لیستریا مونوسیتوزنز	
۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	کربوکسی‌متیل سلولز
۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید
۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰	کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید / ۰/۵۰ درصد عصاره

۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵	کربوکسی متیل سلولز/ روی اکسید / ۱/۰۰ درصد عصاره
۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	کربوکسی متیل سلولز/ روی اکسید / ۲/۰۰ درصد عصاره
۰/۱۶۲۵	۰/۱۶۲۵	۰/۱۶۲۵	استریتوماپسین

نتایج نشان می‌دهد که در زمان ۱۲ ساعت، گروه کنترل بیشترین میزان باکتری‌های زنده را در مقایسه با دیگر گروه‌ها دارد ($P < 0.05$)، در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی به تدریج باعث کاهش تعداد باکتری‌ها شده‌اند ($P < 0.05$). به‌ویژه، افزودن عصاره انار به این ترکیب تأثیر قابل توجهی در کاهش میزان باکتری‌های زنده داشته است، به‌طوری که گروه دارای ۲ درصد عصاره کمترین مقدار را نشان می‌دهد. این یافته‌ها تأیید می‌کند که فیلم‌های زیست‌فعال تهیه‌شده، به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر عصاره، اثر مہاری بهتری بر رشد باکتری‌ها دارند.

بررسی بازهای ازته فرار و میزان کل باکتری‌های

زنده: شکل ۱ تأثیر فیلم‌های پوششی بر میزان بازهای ازته فرار (TVBN) و تعداد کل باکتری‌های زنده (TVC) در نمونه‌های ماهی طی ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد. گروه کنترل (بدون عصاره) بالاترین میزان TVBN را داشته و این مقدار به مرور افزایش یافته است ($P < 0.05$). در مقابل، گروه‌های حاوی فیلم‌های کربوکسی متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار، میزان TVBN کمتری در مقایسه با دیگر گروه‌ها نشان دادند، به‌ویژه گروه دارای ۲ درصد عصاره که در تمام زمان‌ها پایین‌ترین مقدار را داشت ($P < 0.05$). این روند نشان می‌دهد که فیلم‌های زیست‌فعال نقش مؤثری در کاهش سرعت فساد ماهی دارند.



شکل ۱- تأثیر فیلم‌های پوششی بر روی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) نمونه‌های ماهی در طی ۹۶ ساعت.

حروف غیر مشابه معنی‌دار در طی همان زمان را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد. بالانویس‌های مختلف اختلافات معنی‌دار بین گروه‌ها در همان زمان را نشان می‌دهد. برای مثال، بالا نویس a در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری با b و c را نشان می‌دهد.

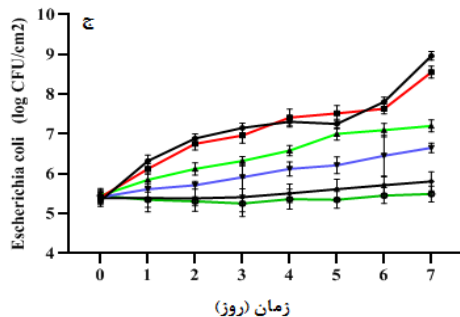
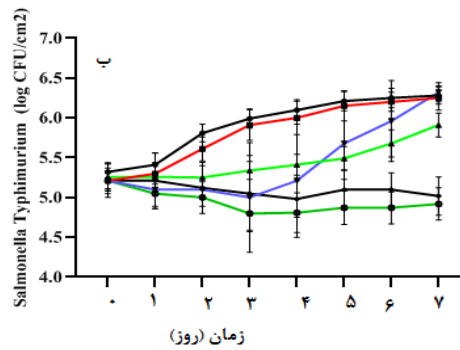
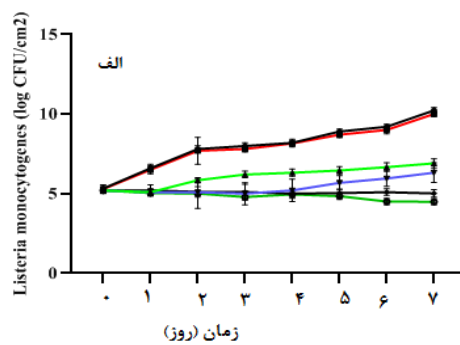
بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های برپایه کربوکسی‌متیل سلولز ...

نشان دادند ($P < 0.05$). گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید با عصاره ۲ درصد کمترین شمارش لیستریا را داشت. این نتایج نشان می‌دهند که فیلم‌های حاوی عصاره‌ها تأثیر مؤثری در کاهش رشد لیستریا مونوسیتوژنز و حفظ کیفیت ماهی دارند.

داده‌ها نشان داد که در روز صفر، تمامی گروه‌ها میزان مشابهی از سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی داشتند. با گذشت زمان، گروه کنترل به‌طور پیوسته رشد باکتری‌ها را نشان داد و در روز ۷ به بالاترین مقدار رسید. گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز نیز روند مشابهی داشتند، اما در گروه‌های حاوی نانوذرات اکسید روی، رشد باکتری‌ها کمتر بود. به‌ویژه، در گروه‌های حاوی عصاره پوست انار، کنترل رشد سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی مؤثرتر بود ($P < 0.05$). گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید با ۲ درصد عصاره کمترین میزان رشد را داشت و نشان‌دهنده اثر بازدارندگی قوی عصاره بود. به‌طور کلی، گروه کنترل بیشترین رشد باکتری را داشت، در حالی که گروه‌های حاوی عصاره‌های مختلف، به‌ویژه ۲ درصد عصاره، اثرات بازدارندگی قوی‌تری داشتند.

با گذشت زمان (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت)، میزان باکتری‌های زنده در همه گروه‌ها افزایش یافته است، اما این افزایش در گروه‌های حاوی فیلم‌های زیست‌فعال کمتر بوده است ($P < 0.05$). در ۹۶ ساعت، گروه کنترل بیشترین میزان باکتری‌های زنده را داشت، در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره انار، به‌ویژه در غلظت ۲ درصد، کمترین میزان را نشان دادند ($P < 0.05$). این نتایج تأیید می‌کند که ترکیب نانوذرات اکسید روی و عصاره انار تأثیر قابل توجهی در مهار رشد باکتری‌ها و افزایش ماندگاری ماهی دارد.

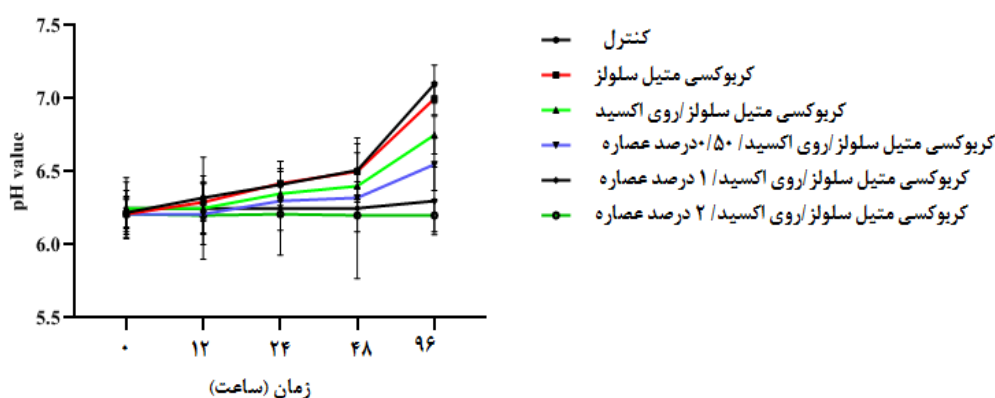
فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها: شکل ۲ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های پوششی را بر روی نمونه‌های ماهی طی ۷ روز نشان می‌دهد. در روز صفر، شمارش لیستریا مونوسیتوژنز در تمام گروه‌ها مشابه بود. از روز اول تا هفتم، روند افزایش شمارش در برخی گروه‌ها مشاهده شد. در پایان روز هفتم، گروه کنترل بیشترین شمارش را در مقایسه با دیگر گروه‌ها داشت ($P < 0.05$), در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی به‌ویژه در ترکیب با عصاره انار، شمارش کمتری



- | | |
|---|--|
| 1 | کنترل |
| 2 | کربوکسی‌متیل سلولز |
| 3 | کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید |
| 4 | کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید / ۵۰٪ درصد عصاره |
| 5 | کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید / ۱ درصد عصاره |
| 6 | کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید / ۲ درصد عصاره |

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

pH در گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید ملایم‌تر بود. در گروه‌های حاوی عصاره، افزایش pH کمتر و کنترل شده‌تر بود. به‌ویژه در گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید با ۲ درصد عصاره، کمترین تغییرات pH مشاهده شد و مقدار آن در ساعت ۹۶ ثابت ماند. در نهایت، گروه‌های حاوی عصاره، به‌ویژه ۲ درصد عصاره، توانستند تغییرات pH را به‌طور مؤثری کنترل کنند. ($P < 0.05$).



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

کاتالیستی، و توانایی تولید گونه‌های اکسیژن فعال دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی قوی علیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند (۹، ۲۸). گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به‌طور مستقیم با غشای سلولی باکتری‌ها واکنش دهند، سبب تخریب غشاء، افزایش نفوذپذیری آن و در نهایت مرگ سلولی شوند (۱۰). این نانوذرات از طریق تخریب دیواره سلولی، تولید استرس اکسیداتیو، و اختلال در متابولیسم سلولی، رشد و تکثیر باکتری‌ها را مهار می‌کنند (۹، ۲۹). علاوه بر این، نانوذرات اکسید روی می‌توانند به پروتئین‌ها و آنزیم‌های ضروری داخل سلول آسیب رسانده و مسیرهای متابولیکی حیاتی باکتری‌ها را مختل کنند (۹). در این مطالعه، افزودن عصاره پوست انار باعث افزایش قابل توجه فعالیت آنتی‌میکروبی فیلم‌ها شد و بیشترین اثرات در گروه‌های حاوی بالاترین غلظت عصاره مشاهده گردید. عصاره پوست انار دارای

تغییرات pH شکل ۳ نشان‌دهنده تغییرات pH در نمونه‌های فیله ماهی طی ۹۶ ساعت است. مقدار اولیه pH در روز صفر در تمامی گروه‌ها مشابه بود و در محدوده ۶/۲۱ تا ۶/۲۵ قرار داشت. با گذشت زمان، مقدار pH در همه گروه‌ها افزایش یافت، اما سرعت این افزایش در گروه‌های مختلف متفاوت بود. در گروه کنترل pH بیشترین تغییر را نشان داد و از ۶/۲۲ به ۷/۱۰ رسید. گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز نیز روند مشابهی داشتند، اما افزایش

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز ترکیب‌شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار برای نگهداری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. نتایج نشان داد که کربوکسی‌متیل سلولز به‌تنهایی فعالیت آنتی‌باکتریایی ضعیفی دارد و تأثیر قابل توجهی بر کاهش رشد باکتری‌ها ندارد. اما وقتی با نانوذرات روی اکسید و عصاره‌های طبیعی ترکیب شد، فعالیت آنتی‌باکتریایی آن افزایش یافت و به‌طور مؤثری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کرد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که نانوذرات اکسید روی از طریق آزادسازی یون روی (Zn^{2+})، جلوگیری از متابولیسم اسیدهای آمینه، اختلال در سیستم آنزیمی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن باعث مرگ باکتری‌ها می‌شوند (۲۶، ۲۷). نانوذرات اکسید روی به‌دلیل سطح ویژه بالا، خاصیت

ترکیبات پلی‌فنولی، تانن‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها است که به دلیل تخریب دیواره سلولی، تغییر در نفوذپذیری غشا و مهار آنزیم‌های ضروری باکتری‌ها، باعث مهار رشد و از بین بردن طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زا، از جمله باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌شوند (۳۰-۳۲). با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره پوست انار در غلظت‌های بالاتر اثرات آنتی‌باکتریایی قوی‌تری نشان داده است. در تمامی گروه‌ها، افزایش غلظت عصاره منجر به کاهش میزان باکتری‌های زنده و کاهش تعداد لیستریا مونوسی‌توزنز، سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی شد. این کاهش در گروه‌های حاوی ۲ درصد عصاره پوست انار به طور معناداری بیشتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین، ترکیب عصاره با نانوذرات اکسید روی تأثیر آنتی‌باکتریایی آن را تقویت کرد و باعث مهار قوی‌تر رشد باکتری‌ها در طول زمان شد. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده همزمان از عصاره پوست انار و نانوذرات اکسید روی می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر برای کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در صنایع غذایی و بسته‌بندی مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بازهای از ته فرار (TVB-N) در گروه‌های حاوی عصاره و نانوذرات روی نسبت به گروه کنترل بهتر بود. بیشترین کاهش TVB-N در فیلم‌های حاوی بالاترین غلظت عصاره همراه با نانوذرات روی مشاهده شد که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی میان این دو بود. حد آستانه پذیرش TVB-N برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۲۰ میلی‌گرم نیتروژن/۱۰۰ گرم نمونه است (۳۳). در این تحقیق، مقدار TVB-N در تمامی فیلم‌ها به جز گروه‌های کنترل و کربوکسی‌متیل سلولز کمتر از ۲۰ میلی‌گرم بود. در گروه‌های کنترل و کربوکسی‌متیل سلولز، از ۲۴ ساعت به بعد مقدار TVB-N به طور قابل توجهی افزایش یافت. آمونیاک و دی‌متیل‌آمین به عنوان ترکیبات TVB-N شناخته می‌شوند که به واسطه فعالیت میکروبی تولید می‌شوند و از مهم‌ترین شاخص‌های ارزیابی کیفیت محصولات دریایی هستند (۳۴). افزایش TVB-N معمولاً به دلیل فعالیت میکروبی است که موجب تجزیه آنزیم‌های

درون‌زا می‌شود. بنابراین، فیلم‌های مورد استفاده در این مطالعه با مهار رشد باکتری‌ها، از افزایش TVB-N جلوگیری کرده‌اند. نتایج نشان داد که مقدار TVB-N در گروه کنترل به طور چشمگیری افزایش یافت، در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار مقادیر کمتری از TVB-N نشان دادند. این کاهش به دلیل ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی و ترکیبات فنولی عصاره پوست انار است که از رشد میکروب‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین، افزایش غلظت عصاره پوست انار اثر مهارتی بیشتری بر افزایش TVB-N داشت و بالاترین غلظت عصاره (۲ درصد) کمترین مقدار TVB-N را در انتهای دوره آزمایش نشان داد. این نتایج نشان می‌دهند که ترکیب کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر برای افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت محصولات دریایی مورد استفاده قرار گیرد.

میزان کل باکتری‌های زنده در گروه‌های ترکیب اکسید روی و عصاره پوست انار نسبت به گروه‌های حاوی تنها نانوذرات روی پایین‌تر بود، که این نتایج با داده‌های شمارش باکتری‌ها هم‌راستا است. مطالعات پیشین آستانه شمارش باکتریایی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان را 10^6 CFU/g پیشنهاد کرده‌اند (۳۵). در این مطالعه، نتایج شمارش کل باکتری‌های زنده (TVC) نشان داد که در گروه کنترل تعداد باکتری‌ها در طول زمان به طور قابل توجهی افزایش یافت، که این به معنای رشد میکروارگانیسم‌های تخریب‌کننده و کاهش کیفیت نمونه‌های ماهی بود. در مقابل، گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز به همراه نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار کاهش چشمگیری در تعداد باکتری‌ها نسبت به گروه کنترل نشان دادند. این کاهش به دلیل ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی (۳۶، ۳۷) و ترکیبات فنولی موجود در عصاره پوست انار (۱۸، ۳۸) بود که به طور مؤثری از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کردند. به ویژه، ترکیب کربوکسی‌متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی با ایجاد یک فیلم محافظ، از تماس باکتری‌ها با سطح

نمونه‌ها جلوگیری کرده و فعالیت میکروبی را مهار کردند. همچنین، عصاره پوست انار در غلظت‌های بالاتر اثرات ضد باکتریایی قوی‌تری نشان داد و منجر به کاهش بیشتر تعداد باکتری‌ها شد.

داده‌های pH در طول ۹۶ ساعت برای گروه‌های مختلف نشان‌دهنده تغییرات قابل توجهی در سطح pH در نمونه‌ها بودند. در ابتدا، pH در همه گروه‌ها تقریباً مشابه بود (بین ۶/۲۰ تا ۶/۴۰). با گذشت زمان، در گروه کنترل و برخی گروه‌های دیگر (مانند گروه عصاره پوست انار)، افزایش pH مشاهده شد که این ممکن است به دلیل فعالیت‌های میکروبی و تخریب مواد آلی باشد. در مقابل، در گروه‌های تیمار شده با کربوکسی‌متیل سلولز همراه با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار، pH نسبتاً ثابت یا تغییرات کمتری داشت که نشان‌دهنده کاهش فعالیت میکروبی و حفظ شرایط اسیدی‌تر در نمونه‌ها بود. این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده اثرات ضد باکتریایی این ترکیبات باشند که مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها و تخریب نمونه‌ها شده و از افزایش pH جلوگیری می‌کنند. افزایش pH معمولاً به‌عنوان یکی از شاخص‌های فساد و کاهش کیفیت در محصولات دریایی شناخته می‌شود (۳۹، ۴۰). بنابراین، ترکیباتی مانند کربوکسی‌متیل سلولز به همراه نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار با کنترل رشد میکروبی و جلوگیری از افزایش pH، نقش مؤثری در حفظ کیفیت و تازگی محصولات دریایی ایفا می‌کنند. لازم به ذکر است که نانوذرات اکسید روی در مقادیر بسیار ناچیز به نمونه‌ها اضافه شدند و توانایی ایجاد سمیت را نداشتند. مطالعات قبلی نیز گزارش کرده‌اند که این نانوذرات به راحتی وارد سلول‌های سالم یا پوست انسان نمی‌شوند (۹). بنابراین نانوذرات روی در این غلظت نمی‌تواند باعث سمیت برای انسان شود.

فیلم‌های زیست‌فعال بر پایه کربوکسی‌متیل سلولز حاوی نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار، در مقایسه با روش‌های متداول نگهداری ماهی، مزایا و معایب خاص خود را دارند. روش‌هایی مانند بسته‌بندی با اتمسفر

اصلاح‌شده و استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی معمولاً به کاهش رشد میکروبی و افزایش ماندگاری ماهی کمک می‌کنند، اما ممکن است اثرات جانبی نامطلوبی داشته باشند (۴۱). در روش استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی (مانند نیترات‌ها و بنزوات‌ها)، ترکیبات مصنوعی برای کنترل فساد میکروبی بکار می‌روند، اما مصرف طولانی‌مدت آنها نگرانی‌های ایمنی دارد (۴۲). از سوی دیگر، روش‌های فیزیکی مانند انجماد و بسته‌بندی وکیوم نیز تأثیر قابل توجهی بر افزایش ماندگاری دارند، اما ممکن است بر کیفیت بافت و طعم ماهی تأثیر بگذارند (۴۳). در مقابل، فیلم‌های زیست‌فعال نه تنها دارای خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی هستند، بلکه از نظر زیست‌تخریب‌پذیری نیز گزینه‌ای پایدارتر محسوب می‌شوند. این فیلم‌ها می‌توانند بدون نیاز به افزودن مواد شیمیایی ماندگاری ماهی را افزایش دهند و کیفیت محصول را حفظ کنند.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر مثبت فیلم‌های حاوی مواد فعال مانند کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار در حفظ کیفیت و تازگی ماهی قزل‌آلا هستند. بر اساس داده‌های به‌دست آمده، این فیلم‌ها توانسته‌اند به‌طور مؤثری رشد میکروارگانیسم‌ها را محدود کنند و در نتیجه از افزایش مقدار بازهای ازته فرار و شمارش کل میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کنند. علاوه بر این، فیلم‌ها با حفظ pH در سطح مناسب، به جلوگیری از فساد و افزایش اسیدیته ناشی از فعالیت میکروبی کمک کرده‌اند. در این مطالعه، کربوکسی‌متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی به‌ویژه در کاهش TVC و TVBN مؤثر بودند و به‌طور چشمگیری از فساد میکروبی جلوگیری کردند. همچنین، عصاره پوست انار نیز اثرات آنتی‌باکتریایی قابل توجهی نشان داد که به حفظ کیفیت ماهی کمک کرده و از فساد آن جلوگیری نمود. با توجه به نتایج، استفاده از این فیلم‌ها می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر برای بسته‌بندی محصولات دریایی و به‌ویژه ماهی‌های حساس مانند ماهی قزل‌آلا مطرح باشد. این فیلم‌ها علاوه بر حفظ کیفیت محصول، احتمالاً

دریایی ضروری است. علاوه بر این، بررسی اثرات این فیلم‌ها بر سایر محصولات دریایی و مقایسه آن با روش‌های نگهداری شیمیایی رایج می‌تواند در بهبود فرآیندهای بسته‌بندی و حفظ کیفیت محصولات دریایی مؤثر باشد. این تحقیق به بررسی تأثیر این فیلم‌ها بر ماهی قزل‌آلا پرداخته است و برای کاربرد در دیگر انواع محصولات دریایی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. همچنین، فرآیند تولید و هزینه‌های مربوط به این فیلم‌ها باید مورد توجه قرار گیرد تا قابلیت استفاده آنها در مقیاس صنعتی امکان‌پذیر شود.

سپاسگزاری

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

References

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

2- **Rastiani F, Jebali A, Hekmati moghaddam SH, Sadrabad EK, Mohajeri FA, Dehghani-Tafti A.** Monitoring the freshness of rainbow trout using intelligent PH-sensitive indicator during storage. *J Nutr Food Secur*. 2019. [In persian]

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

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

5- **Priyadarshi R, Kumar B, Deeba F, Kulshreshtha A, Negi YS.** Chitosan films incorporated with Apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil as active food packaging material. *Food Hydro coll*. 2018; 85: 158-66.

6- **Youssef H, El-Naggar ME, Fouda F, Youssef AM.** Antimicrobial packaging film based on biodegradable CMC/PVA-zeolite doped with noble metal cations. *Food Packag Shelf Life*. 2019; 22: 100378.

7- **Priyadarshi R, Kumar B, Rhim J-W.** Green

می‌توانند به‌عنوان یک روش طبیعی و ایمن برای کاهش مصرف مواد نگهدارنده شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند. فیلم‌های تولیدی دارای قابلیت استفاده در صنعت بسته‌بندی ماهی و برای پوشش دادن فیله‌های ماهی هستند و همچنین به‌علت ساختار تجزیه‌پذیر می‌توانند به‌عنوان پوشش‌های آنتی‌باکتریایی قابل تجزیه استفاده شوند. با وجود نتایج مثبت این مطالعه، برای تحقق کاربردهای عملی‌تر و تجاری‌تر، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری در زمینه بهینه‌سازی نسبت‌های ترکیب مواد فعال برای دستیابی به بهترین عملکرد در بسته‌بندی مواد غذایی انجام شود. همچنین، ارزیابی طولانی‌مدت‌تر از تأثیر این فیلم‌ها در شرایط واقعی ذخیره‌سازی محصولات

and facile synthesis of carboxymethylcellulose/ZnO nanocomposite hydrogels crosslinked with Zn²⁺ ions. *Int J Biol Macromol*. 2020; 162: 229-35.

8- **Malik GK, Mitra J.** Zinc oxide nanoparticle synthesis, characterization, and their effect on mechanical, barrier, and optical properties of HPMC-based edible film. *Food Bioprocess Technol*. 2021; 14: 441-56.

9- **Kim I, Viswanathan K, Kasi G, Thanakasarane S, Sadeghi K, Seo J.** ZnO nanostructures in active antibacterial food packaging: Preparation methods, antimicrobial mechanisms, safety issues, future prospects, and challenges. *Food Rev Int*. 2022; 38(4): 537-65.

10- **Yang X, Yu Q, Gao W, Tang X, Yi H, Tang X.** The mechanism of metal-based antibacterial materials and the progress of food packaging applications: A review. *Ceram Int*. 2022; 48(23): 34148-68.

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

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

13- **Xiang Q, Li M, Wen J, Ren F, Yang Z,**

Jiang X, et al. The bioactivity and applications of pomegranate peel extract: A review. *J Food Biochem.* 2022; 46(7): e14105.

14- Eshaghi R, Mohsenzadeh M, Ayala-Zavala JF. Bio-nanocomposite active packaging films based on carboxymethyl cellulose, myrrh gum, TiO₂ nanoparticles and dill essential oil for preserving fresh-fish (*Cyprinus carpio*) meat quality. *Int J Biol Macromol.* 2024; 263: 129991.

15- Noshirvani N, Ghanbarzadeh B, Mokarram RR, Hashemi M, Coma V. Preparation and characterization of active emulsified films based on chitosan-carboxymethyl cellulose containing zinc oxide nano particles. *Int J Biol Macromol.* 2017; 99: 530-8. [In persian]

16- You P, Wang L, Zhou N, Yang Y, Pang J. A pH-intelligent response fish packaging film: Konjac glucomannan/carboxymethyl cellulose/blackcurrant anthocyanin antibacterial composite film. *Int J Biol Macromol.* 2022; 204: 386-96.

17- Priyadarshi R, Negi YS. Effect of varying filler concentration on zinc oxide nanoparticle embedded chitosan films as potential food packaging material. *J Polym Environ.* 2017; 25: 1087-98.

18- Maroufi LY, Tabibiazar M, Ghorbani M, Jahanban-Esfahlan A. Fabrication and characterization of novel antibacterial chitosan/dialdehyde guar gum hydrogels containing pomegranate peel extract for active food packaging application. *Int J Biol Macromol.* 2021; 187: 179-88. [In persian]

19- Derakhshan Z, Ferrante M, Tadi M, Ansari F, Heydari A, Hosseini MS, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food Chem Toxicol.* 2018; 114: 108-11. [In persian]

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

21- Chang S-H, Chen YJ, Tseng HJ, Hsiao HI, Chai HJ, Shang KC, et al. Antibacterial activity of chitosan-poly lactate fabricated plastic film and its application on the preservation of fish fillet. *Polym.* 2021; 13(5): 696.

22- Remya S, Mohan C, Bindu J, Sivaraman G, Venkateswarlu G, Ravishankar C. Effect of chitosan based active packaging film on the keeping quality of chilled stored barracuda fish. *J Food Sci Technol.* 2016; 53: 685-93.

23- Amegovu AK, Sserunjogi ML, Ogowok P, Makokha V. Nucleotide degradation products, total volatile basic nitrogen, sensory and microbiological

quality of Nile perch (*Lates niloticus*) fillets under chilled storage. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2012; 2(2): 653-66.

24- Khoshnoudi-Nia S, Moosavi-Nasab M, Nassiri SM, Azimifar Z. Determination of total viable count in rainbow-trout fish fillets based on hyperspectral imaging system and different variable selection and extraction of reference data methods. *Food Anal Methods.* 2018; 11: 3481-94. [In persian]

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

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

27- Gudkov SV, Burmistrov DE, Serov DA, Rebezov MB, Semenova AA, Lisitsyn AB. A mini review of antibacterial properties of ZnO nanoparticles. *Front Phys.* 2021; 9: 641481.

28- Akshaykranth A, Jayarambabu N, Venkatappa Rao T, Rakesh Kumar R, Srinivasa Rao L. Antibacterial activity study of ZnO incorporated biodegradable poly (lactic acid) films for food packaging applications. *Polym Bull.* 2023; 80(2): 1369-84.

29- Zare M, Namratha K, Ilyas S, Sultana A, Hezam A, Surmeneva MA, et al. Emerging trends for ZnO nanoparticles and their applications in food packaging. *ACS Food Sci Technol.* 2022; 2(5): 763-81.

30- Emam-Djomeh Z, Moghaddam A, Yasini Ardakani SA. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract, physical, mechanical, barrier and antimicrobial properties of pomegranate peel extract-incorporated sodium caseinate film and application in packaging for ground beef. *Packag Technol Sci.* 2015; 28(10): 869-81.

31- Hanani ZN, Yee FC, Nor-Khaizura M. Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Hydrocoll.* 2019; 89: 253-9.

32- Yuan G, Lv H, Yang B, Chen X, Sun H. Physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan films containing carvacrol and pomegranate peel extract. *Molecules.* 2015; 20(6):

11034-45.

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

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

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

36- Kim I, Viswanathan K, Kasi G, Sadeghi K, Thanakkasaranee S, Seo J. Poly (lactic acid)/ZnO bionanocomposite films with positively charged ZnO as potential antimicrobial food packaging materials. *Polym.* 2019; 11(9): 1427.

37- Silva FAS, Carvalho M, de Carvalho TB,

Gama M, Poças F, Teixeira P. Antimicrobial activity of in-situ bacterial nanocellulose-zinc oxide composites for food packaging. *Food Packag Shelf Life.* 2023; 40: 101201.

38- Cui H, Surendhiran D, Li C, Lin L. Biodegradable zein active film containing chitosan nanoparticle encapsulated with pomegranate peel extract for food packaging. *Food Packag Shelf Life.* 2020; 24: 100511.

39- Sobhan A, Muthukumarappan K, Wei L. A biopolymer-based pH indicator film for visually monitoring beef and fish spoilage. *Food Biosci.* 2022; 46: 101523.

40- Comi G, Iacumin L. Spoilage of meat and fish. *Microbiol Qual Food.* Elsevier. 2025. p. 221-48.

41- Floros JD, Matsos KI. Introduction to modified atmosphere packaging. *Innov Food Packag.* Elsevier. 2005; p. 159-72.

42- Gassara F, Kouassi AP, Brar SK, Belkacemi K. Green alternatives to nitrates and nitrites in meat-based products—a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56(13): 2133-48.

43- Yam KL. *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology.* John Wiley & Sons. 2010.



Antibacterial activity of carboxymethyl cellulose-based films combined with zinc oxide nanoparticles and pomegranate peel extract for preservation of *Rainbow trout* samples

Davoud Nasiri*

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

Receive: January 31, 2025; Revise: April 24, 2025; Accept: April 26, 2025

 10.22034/nfvm.2025.503535.1274

Summary

Rainbow trout is highly susceptible to microbial spoilage, and use of active packaging to extend the shelf life of perishable foods has gained considerable attention in recent years. The aim of this study was to investigate the effect of bioactive films based on carboxymethyl cellulose (CMC) combined with zinc oxide nanoparticles (ZnO) and pomegranate peel extract (PE) on maintaining the quality of rainbow trout. Films were prepared by the solution casting method and evaluated in five different groups. The films included carboxymethyl cellulose (CMC), carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles (CMC/ZnO), carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles/0.5% pomegranate peel extract (CMC/ZnO/0.5% PE), carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles/1% pomegranate peel extract (CMC/ZnO/1% PE), and carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles/2% pomegranate peel extract (CMC/ZnO/2% PE). The fish samples were stored at 25°C for one week. The quality characteristics of the rainbow trout samples, including the total volatile basic nitrogen (TVBN) content, total viable count (TVC), and pH, were evaluated. The results showed that films containing zinc oxide nanoparticles and pomegranate peel extract significantly reduced TVBN and TVC ($P < 0.05$). Additionally, the pH of the samples in the treated film groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), indicating the efficacy of these films in reducing microbial activity and delaying the spoilage of rainbow trout. These results suggest that the use of carboxymethyl cellulose-based films combined with zinc oxide nanoparticles and pomegranate peel extract, especially the CMC/ZnO/2% PE film, could be an effective method for maintaining quality and extending the shelf life of rainbow trout during storage.

Keywords: Carboxymethyl cellulose, zinc oxide nanoparticles, pomegranate peel extract, rainbow trout, antibacterial activity, total volatile basic nitrogen



بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و یرسینیا انتروکولیتیکا در لبنیات عرضه شده در شهرستان خرم آباد

فاطمه قاسمی^۱، نجمه واحد دهکردی^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

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

دریافت مقاله: ۱۶ بهمن ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۷ خرداد ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۸ خرداد ۱۴۰۴

 10.22034/nfvm.2025.504498.1275

چکیده

لبنیات غنی از مواد مغذی هستند، اما وجود باکتری‌های پاتوژن می‌تواند سبب فساد آنها شده و پدیدآورنده‌ی عفونت و مسمومیت‌های غذایی باشند. تمرکز این پژوهش، بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و یرسینیا انتروکولیتیکا در شیر و لبنیات سنتی عرضه شده در شهرستان خرم‌آباد بود. ۱۰۰ نمونه شامل شیر خام گاو، ماست، دوغ، کشک و کره سنتی از مراکز عرضه در شهرستان خرم‌آباد به صورت تصادفی در فصول مختلف سال نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها در شرایط سرما به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نتایج نشان داد در شیر و فرآورده‌های لبنی عرضه شده در شهرستان خرم‌آباد، از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۲۵ درصد به استافیلوکوکوس اورئوس و ۸ درصد به یرسینیا انتروکولیتیکا آلودگی وجود داشت. بیشترین آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در تابستان (۱۵ درصد) و کمترین میزان آلودگی به یرسینیا انتروکولیتیکا در زمستان (۱ درصد) بود. بیشترین آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس کشک سنتی (۱۰ درصد) و آلوده‌ترین محصول لبنی به یرسینیا انتروکولیتیکا شیر خام گاو (۵ درصد) بود. نتایج نشان داد، بین آلودگی کره سنتی به استافیلوکوکوس اورئوس و یرسینیا انتروکولیتیکا، ارتباط آماری معنی‌داری برقرار بود؛ اما بین سایر لبنیات ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). آلودگی لبنیات به استافیلوکوکوس اورئوس و یرسینیا انتروکولیتیکا، خطر قابل توجهی برای سلامتی دارد. با توجه به تولید سنتی لبنیات از شیر خام در شهرستان خرم‌آباد، اجرای برنامه‌های نظارت مستمر، اقدامات کنترلی سخت‌گیرانه و تشدید روش‌های ضد عفونی از گاو‌داری تا توزیع ضروری است.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، یرسینیا انتروکولیتیکا، شیر، لبنیات سنتی، ایمنی غذایی

مقدمه

شیر و فرآورده‌های لبنی از اجزای اصلی رژیم غذایی انسان به‌شمار می‌روند و به‌دلیل ترکیب غنی از پروتئین، چربی، کلسیم و ویتامین‌ها، نقش مهمی در سلامت عمومی ایفا می‌کنند. افزایش آگاهی از ارزش تغذیه‌ای شیر موجب رشد چشمگیر مصرف آن در دهه‌های اخیر شده است. ترکیب شیمیایی شیر تحت تأثیر عواملی همچون سن دام، مرحله شیردهی، وضعیت تغذیه، شرایط محیطی و سلامت حیوان قرار دارد (۱). شیر درون غدد پستانی سالم، به‌طور طبیعی عاری از آلودگی میکروبی است، اما در طی فرآیند دوشش، جمع‌آوری، حمل و فرآوری، ممکن است به انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا آلوده شود (۲). طیف وسیعی از باکتری‌های پاتوژن قادر به آلوده‌سازی شیر و فرآورده‌های لبنی هستند که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Shigella spp.*، *Salmonella spp.*، *Yersinia enterocolitica* گونه‌های *Brucella* و *Coxiella* اشاره کرد (۳).

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری‌های گرم‌مثبت فرصت‌طلب است که در دمای ۱۶ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد و تولید انتروتوکسین می‌باشد. این سم مقاوم به حرارت است و حتی پس از پاستوریزاسیون نیز می‌تواند در محصول باقی بماند (۴). در صورتی که تعداد باکتری در ماده غذایی به بیش از 10^5 واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر گرم برسد، احتمال تولید سم و بروز مسمومیت غذایی وجود دارد (۵). به‌طور معمول، مسمومیت غذایی با *Staphylococcus aureus* (SFP) پس از مصرف غذاهای آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دلیل نگهداری و جایابی غیر بهداشتی و نگهداری در دماهای بالا (۲۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد) رخ می‌دهد (۶).

یرسینیا انتروکولیتیکا نیز یک باکتری گرم‌منفی متعلق به خانواده Enterobacteriaceae است که از طریق لبنیات آلوده می‌تواند باعث گاستروانتریت با علائمی چون اسهال، تب و درد شکمی شود. این باکتری قادر است در دامنه

وسعی از دما، حتی تا ۱ درجه سانتی‌گراد، رشد کند و از این رو یک تهدید بالقوه در زنجیره سرد محصولات لبنی محسوب می‌شود. این پاتوژن بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی به ۶ بیوتیپ و بیش از ۷۰ سروتیپ تقسیم می‌شود و از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در کشورهای اروپایی است (۷).

مطالعات مختلف به شیوع این دو باکتری در محصولات لبنی در مناطق مختلف اشاره کرده‌اند. به عنوان نمونه، در پژوهشی در مشهد توسط شریف‌زاده و همکاران (۲۰۲۳)، ۳ مورد آلودگی به *Y. enterocolitica* از میان ۳۶۰ نمونه شیر خام گزارش شد (۸)، همچنین در مصر (۲۰۲۲)، میزان آلودگی ۳۰ درصد اعلام گردید (۹). در زمینه آلودگی به *S. aureus* پژوهشی در شهرکرد (۲۰۲۴) میزان آلودگی ۲۷/۳ درصد (۱۰) و در یزد (۲۰۲۳)، ۱۸/۳ درصد (۱۱) گزارش شده است. با توجه به اهمیت سلامت مصرف‌کنندگان، نبود مطالعات مشابه در شهرستان خرم‌آباد و نیز نقش فرآورده‌های لبنی سنتی در انتقال باکتری‌های پاتوژن، این پژوهش با هدف بررسی شیوع آلودگی به *Staphylococcus aureus* و *Yersinia enterocolitica* در شیر خام و لبنیات سنتی عرضه‌شده در این منطقه انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ نمونه از محصولات لبنی شامل شیر خام گاو، کشک سنتی، کره سنتی، ماست سنتی و دوغ سنتی (هر کدام ۲۰ نمونه) از مراکز عرضه در بازارهای شهرستان خرم‌آباد به‌صورت تصادفی در چهار فصل سال (بهار، تابستان، پاییز و زمستان) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله در ظروف استریل آزمایشگاهی و در شرایط سرد (داخل فلاسک حاوی یخ) به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی و شناسایی *Staphylococcus aureus*

برای بررسی آلودگی به *S. aureus*، مقدار ۲۵ گرم از نمونه‌های جامد و نیمه‌جامد (کشک، کره، ماست) و ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های مایع (شیر، دوغ) در ۲۲۵ میلی‌لیتر

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از آزمون‌های میکروبی در نرم‌افزار Microsoft Excel گردآوری شده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱، تحلیل شدند. برای ارزیابی معنی‌داری آماری بین متغیرها، از آزمون کای‌دو (Chi-square) استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۱ به‌عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

یافته‌ها نشان داد در شیر و فرآورده‌های لبنی عرضه‌شده در شهرستان خرم‌آباد، از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۲۵ درصد به *Staphylococcus aureus* و ۸ درصد به *Yersinia enterocolitica* آلوده بودند. نتایج نشان داد بیشترین کمترین میزان آلودگی به *Staphylococcus aureus* به‌ترتیب در فصل تابستان (۱۵ درصد)، بهار (۷ درصد)، پاییز (۲ درصد) و زمستان (۱ درصد) بود. بیشترین محصول آلوده به *Staphylococcus aureus* کشک سنتی بود (۱۰ درصد)، شیر خام گاو (۹ درصد)، ماست سنتی و کره سنتی (۳ درصد) بودند، و در دوغ سنتی آلودگی به *Staphylococcus aureus* یافت نشد. همچنین در خصوص آلودگی به *Yersinia enterocolitica* یافته‌ها نشان داد بیشترین و کمترین میزان آلودگی در فصل تابستان (۳ درصد)، بهار و پاییز (۲ درصد) و زمستان (۱ درصد) بود. بیشترین محصول آلوده به *Yersinia enterocolitica* به‌ترتیب مربوط به شیر خام گاو (۵ درصد)، کره سنتی (۲ درصد)، کشک سنتی (۱ درصد) و ماست و دوغ سنتی به *Yersinia enterocolitica* آلوده نبودند (جدول ۱).

از محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی ۱۰ درصد NACL، (Mirmedia, Iran) تلقیح شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از رشد، کشت مجدد بر روی محیط انتخابی Baird-Parker agar حاوی امولسیون زرده تخم‌مرغ و تلوریت پتاسیم انجام شد و مجدداً در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. کلنی‌های سیاه‌رنگ با هاله مات اطراف، به‌عنوان مشکوک در نظر گرفته شده و جهت تأیید، آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، کوآگولاز، DNase و تخمیر مانیتول روی آنها انجام شد (۱۰).

جداسازی و شناسایی *Y. enterocolitica* برای شناسایی *Y. enterocolitica*، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه شیر خام در ۹۰ میلی‌لیتر محیط TSB و ۲۵ گرم از نمونه‌های جامد در ۲۲۵ میلی‌لیتر از همان محیط کشت تلقیح شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، از محیط کشت‌ها ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شده و پس از سانتریفیوژ، از رسوب آن، ۲۵ میکرولیتر به‌صورت کشت خطی روی محیط اختصاصی CIN agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) منتقل شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های بزرگ و قرمز تیره با مرکز برجسته با ظاهر گاوچشمی یا (bull's-eye) به‌عنوان کلنی‌های مشکوک تلقی شدند. سپس تست‌های بیوشیمیایی شامل آزمون IMViC (ایندول، متیل‌رد، وگس پروسکاتر، سترات سیمونز)، اوره‌آز و تولید H₂S برای تأیید نهایی انجام شد (۱۲).

جدول ۱- وضعیت آلودگی به *Staphylococcus aureus* و *Yersinia enterocolitica* در لبنیات سنتی عرضه‌شده در شهرستان خرم‌آباد

مواد غذایی	تعداد نمونه	<i>Staphylococcus aureus</i>			
		بهار	تابستان	پائیز	زمستان
شیر خام گاو	۲۰	۳ (۱۵٪) ^a	۵ (۲۵٪) ^{ab}	۱ (۵٪) ^a	۰
ماست سنتی	۲۰	۱ (۵٪) ^{bc}	۲ (۱۰٪) ^c	۰	۰
کشک سنتی	۲۰	۲ (۱۰٪) ^{ab}	۶ (۳۰٪) ^a	۱ (۵٪) ^a	۱ (۵٪) ^a
کره سنتی	۲۰	۱ (۵٪) ^{bc}	۲ (۱۰٪) ^c	۰	۰
دوغ سنتی	۲۰	۰	۰	۰	۰
مجموع	۱۰۰	۷ (۷٪)	۱۵ (۱۵٪)	۲ (۲٪)	۱ (۱٪)

ماده غذایی	تعداد نمونه	بهار	تابستان	پائیز	زمستان	مجموع
<i>Yersinia enterocolitica</i>						
شیر خام گاو	۲۰	۱ (/۵) ^a	۲ (/۱۰) ^a	۱ (/۵) ^a	۱ (/۵) ^a	۵ (/۲۵)
ماست سنتی	۲۰
کشک سنتی	۲۰	.	۱ (/۵) ^b	.	.	۱ (/۵)
کره سنتی	۲۰	۱ (/۵) ^a	.	۱ (/۵) ^a	.	۲ (/۱۰)
دوغ سنتی	۲۰
مجموع	۱۰۰	۲ (/۲)	۳ (/۳)	۲ (/۲)	۱ (/۱)	۸ (/۸)

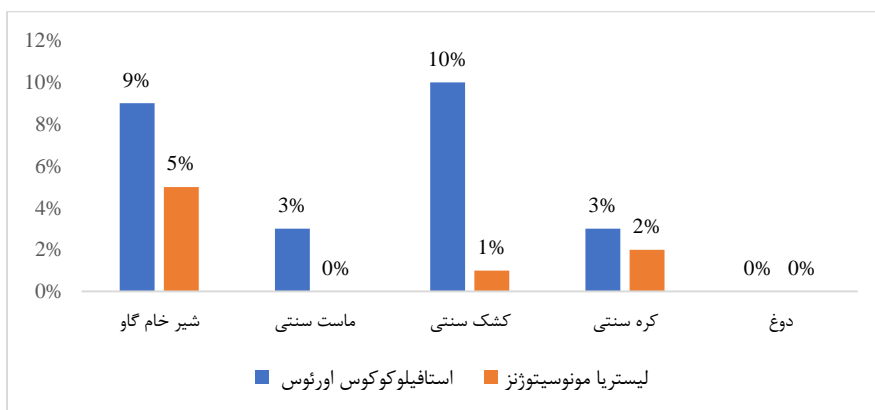
در هر سطر، اعداد برچسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با $Pvalue < 0/05$ با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.

نتایج نشان داد، بین آلودگی کره سنتی به *Staphylococcus aureus* و *Yersinia enterocolitica* ارتباط آماری معنی‌داری برقرار بود؛ اما بین سایر لبنیات ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- وضعیت ارتباط آماری بین شیوع *Staphylococcus aureus* و *Yersinia enterocolitica* در لبنیات سنتی عرضه‌شده در شهرستان خرم آباد

مواد غذایی	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	سطح معنی‌داری
شیر خام گاو	۹ (/۹) ^a	۵ (/۵) ^a	۰/۲۰۸ ^{Ns}
ماست سنتی	۳ (/۳) ^b	.	۰/۱۹۹ ^{Ns}
کشک سنتی	۱۰ (/۱۰) ^a	۱ (/۱) ^{bc}	۰/۲۸۰ ^{Ns}
کره سنتی	۳ (/۳) ^b	۲ (/۲) ^b	۰/۰۰۱ ^{**}
دوغ سنتی	.	.	-

NS: تفاوت بین شیوع آلودگی به باکتری‌ها معنی‌دار نیست. **: تفاوت بین شیوع آلودگی به باکتری‌ها با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است ($p < 0.01$). در هر سطر، اعداد برچسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با $Pvalue < 0/01$ با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.



نمودار ۱- وضعیت آلودگی به *Staphylococcus aureus* و *Yersinia enterocolitica* در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان خرم آباد

بحث و نتیجه‌گیری

میکروارگانیزم‌های پاتوژن فراهم می‌کنند یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در این محصولات *Staphylococcus aureus* است که در موارد متعدد، سبب مسمومیت‌های غذایی شده است (۱۳). به‌عنوان نمونه، در سال ۲۰۱۴ در اروپا، شیر و محصولات لبنی عامل ۵ درصد از شیوع مسمومیت‌های ناشی از این باکتری گزارش شدند (۱۴).

شیر و فرآورده‌های لبنی همواره به‌عنوان اجزای مهم در یک رژیم غذایی متعادل شناخته می‌شوند که منابع غنی از انرژی، پروتئین، مواد معدنی، ویتامین‌ها، کلسیم و ریبوفلاوین هستند، با این حال به‌دلیل pH خنثی و ترکیبات مغذی محیط مناسبی برای رشد

حضور *Staphylococcus aureus* در شیر خام و لبنیات سبب طیف وسیعی از انواع مسمومیت‌های غذایی می‌شود. در این پژوهش آلودگی به *Staphylococcus aureus* در شیر و فرآورده‌های لبنی عرضه‌شده در شهرستان خرم‌آباد، ۲۵ درصد بود. واحد و همکاران (۲۰۲۴)، در شهرکرد آلودگی به *Staphylococcus aureus* در نمونه‌های لبنی را ۲۷/۳۳ درصد گزارش دادند (۱۰) همچنین، فروزانی مقدم و همکاران (۲۰۲۴)، در یزد، ۱۸/۳ درصد (۱۱)، پژوهش و همکاران (۲۰۲۲) در شهرکرد ۲۳/۸۸ درصد (۱۵)، احمدی و همکاران (۲۰۲۱) در کابل ۲۵/۷۱ درصد (۱۶) گزارش دادند. در ایتالیا شیوع ۲۳/۷۸ درصد لبنیات به *Staphylococcus aureus* توسط Carfoara و همکاران گزارش شد (۱۷) و Papadopoulos (۲۰۱۸) در یونان، آلودگی ۲۲ درصدی را گزارش داد (۱۸) که مطالعات یاد شده، هم‌راستا با پژوهش حاضر هستند. گروهی دیگر از پژوهشگران همچون امینی‌فرد و همکاران (۲۰۱۸)، در شهرکرد، آلودگی ۵۸/۵۵ درصد (۱۹)، حسینی (۲۰۱۵)، ۵۶/۵۲ درصد (۲۰) و میرزایی (۲۰۱۲) در تبریز ۴۵ درصد (۲۱) آلودگی به *Staphylococcus aureus* را گزارش دادند که با مطالعه‌ی حاضر ناسازگار است. عدم رعایت بهداشت در محیط کار، عدم رعایت بهداشت فردی، سوء استفاده از دما و زمان لازم جهت پاستوریزاسیون در لبنیات سنتی و عدم رعایت زنجیره‌ی دمایی و هندلینگ و عدم استفاده از ظروف بهداشتی از مهم‌ترین دلایل فراوانی شیوع *Staphylococcus aureus* در شیر خام در پژوهش حاضر و مطالعات یاد شده است.

جمالی و همکاران (۲۰۱۵) در مالزی، میزان آلودگی به *Staphylococcus aureus* در لبنیات را ۱۲/۴ درصد (۲۲)، کبیری و مشاک (۲۰۱۵) در کرج، ۱۱/۵ درصد (۲۳)، منتظری و همکاران (۲۰۲۳)، در اصفهان ۱۲/۸۵ درصد (۲۴) گزارش دادند، که با پژوهش حاضر ناسازگار است. رعایت بهداشت و استفاده از ظروف بهداشتی، دقت در عمل‌آوری و دما و زمان کافی جهت سالم‌سازی را می‌توان از دلایل پائین‌بودن حدودی نتایج پژوهش‌های یاد شده

دانست.

بیماری‌های منتقل‌شونده از طریق مواد غذایی یک مشکل بهداشتی عمومی گسترده و رو به رشد در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه هستند (۲۵). یرسینیوز ناشی از *Yersinia enterocolitica*، بیماری گوارشی مشترک بین انسان و دام، پس از کمپیلوباکتریوز و سالمونلوز در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته، بروز یرسینیوزیس در مواد غذایی در ایالات متحده کمتر از بسیاری از کشورهای اروپایی است (۲۷). شیوع بالای بیماری‌های گوارشی از جمله موارد کشنده‌ی یرسینیوزیس در بسیاری از کشورهای در حال توسعه مانند بنگلادش (۲۸)، عراق (۲۹) و ایران (۳۰) مشاهده شده است که نشان‌دهنده زمینه‌ی عمده‌ی این بیماری است. در این تحقیق آلودگی به *Yersinia enterocolitica* در شیر و فرآورده‌های لبنی عرضه‌شده در شهرستان خرم‌آباد، ۸ درصد بود. Piras و همکاران (۲۰۲۳) هم‌راستا با مطالعه حاضر، گزارش دادند که شیوع *Yersinia enterocolitica* در ۷/۴ درصد نمونه‌های لبنی وجود داشته است (۳۱) در مطالعه‌ی دیگر از Piras و همکاران (۲۰۲۱) آلودگی ۷/۸ درصد (۳۲) گزارش شد. هم‌راستا با مطالعه‌ی حاضر در ۳ پژوهشی که در مصر انجام شد؛ Sotohy و همکاران (۲۰۲۴)، میزان آلودگی را ۱۰/۸۳ درصد (۳۳)، Ahmed و همکاران (۲۰۲۳)، ۹/۲ درصد (۳۴) و Ashraf و همکاران (۲۰۲۲)، ۱۰/۹ درصد (۳۵) گزارش دادند. Okwori و همکاران (۲۰۰۹)، در نیجریه ۸/۸ درصد (۳۶)، Khaliid & Abbas (۲۰۲۱) در عراق ۶/۶۱ درصد (۳۷) و علوی و همکاران (۲۰۱۷) در شهرکرد، ۸/۶ درصد آلودگی به *Yersinia enterocolitica* (۳۸) را گزارش دادند که هم‌راستا و سازگار با مطالعه حاضر است.

سلیمی و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای مشابه گزارش دادند از مجموع ۱۵۰ نمونه لبنیات سنتی، ۵ نمونه (۳/۳۳ درصد) آلوده به *Yersinia enterocolitica* بودند (۳۹)، نظری و رحیمی (۲۰۲۴) در پژوهشی آلودگی ۴ درصدی به *Yersinia enterocolitica* در گچساران را گزارش دادند

کمتر بود که دلیل این امر می‌تواند وجود دمای مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن در فصل گرم نسبت به فصل سرد باشد.

آلودگی شیر خام و لبنیات سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *Yersinia enterocolitica*، خطر قابل توجهی برای سلامتی دارد. با توجه به تولید سنتی لبنیات از شیر خام در شهرستان خرم‌آباد و بافت نیم‌سنتی، اجرای برنامه‌های نظارت مستمر، اقدامات کنترلی سخت‌گیرانه و تشدید روش‌های ضد عفونی از گاوداری تا توزیع ضروری است. علاوه بر این، انتشار آموزش با تأکید بر اهمیت رعایت پروتکل‌های بهداشتی در میان پرسنل درگیر در زنجیره تأمین مواد غذایی بسیار مهم است. از مهم‌ترین روش‌های کاهش آلودگی به باکتری‌های پاتوژن می‌توان به روش‌های صحیح پاستوریزاسیون، نظارت‌های بهداشتی، وضع قوانین سخت‌گیرانه و تعیین جریمه‌های سنگین برای مراکزی که عدم رعایت بهداشت در آنها مشهود است، اشاره کرد. این اقدام پیشگیرانه می‌تواند به‌طور مؤثری تکثیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *Yersinia enterocolitica* را در شیر و محصولات لبنی کاهش دهد و خطر بالقوه مرتبط با سوبه‌های عفونت و مسمومیت‌زا را کاهش دهد.

(۴۰). شریفی یزدی و همکاران (۲۰۲۳) ۱/۱ درصد گزارش دادند (۸) که میزان آلودگی پائین‌تر از یافته‌های تحقیق حاضر بوده و مطابقتی با این مطالعه ندارد. اما در عراق Ali و همکاران (۲۰۲۰)، ۱۲ درصد (۴۱)، در مصر Dowidar & Khalifa (۲۰۲۳) ۱۷/۳ درصد (۴۲)، موفق و همکاران (۲۰۲۱) در مشهد ۳۳ درصد (۴۳)، Ahmed و همکاران (۲۰۱۹) ۲۲ درصد (۴۴) گزارش دادند. توسلی و همکاران (۲۰۲۱) روی آلودگی پنیرهای سنتی عرضه‌شده در شمال شرق ایران گزارش دادند که از مجموع ۲۰۰ نمونه پنیر، پنیر کردی بیشترین میزان آلودگی (۴۵ درصد) و کمترین میزان آلودگی در پنیر ليقوان و اونسوری (۲۴ درصد) مشاهده شد (۴۵) که با یافته‌های حاضر ناسازگار است. تفاوت در شیوه‌های دامپروری، تکنیک‌های شیردوشی و شرایط بهداشتی محیط اصطبل و محل ذخیره‌سازی و فروش شیر و لبنیات همگی می‌توانند فاکتورهای کلیدی در تعیین میزان آلودگی به باکتری‌های پاتوژن از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *Yersinia enterocolitica* شوند. مهم‌ترین دلیل منفی بودن میزان آلودگی در دوغ را می‌توان به pH پائین این محصول اشاره کرد که میکروارگانیسم‌های هدف در pH پائین قادر به رشد نیستند. در پژوهش حاضر، میزان آلودگی در فصل تابستان بیشتر و در فصل زمستان

References

- 1- Lambrini K, Aikaterini F, Konstantinos K, Christos I, Ioanna PV, Areti T. Milk nutritional composition and its role in human health. *J Pharm Pharmacology*. 2021; 12(9): 8-13.
- 2- Deddefo A, Mamo G, Leta S, Amenu K. Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* in raw milk and milk products in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Inter J Food Contamin*. 2022; 9(1): 8-17.
- 3- Saxena N. An Overview of On-Farm Hygienic Milk Production. *Inter J Innov Res Eng Manag*. 2022; 9(1): 369-72.
- 4- Rajkovic A, Jovanovic J, Monteiro S, Decler M, Andjelkovic M, Foubert A, et al. Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria. *Compre rev food sci food safe*. 2020; 19(4): 1605-57.
- 5- Fetsch A, Contzen M, Hartelt K, Kleiser A, Maassen S, Rau J, et al. Staphylococcus aureus food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *Inter J food micr*. 2014; 187(2): 1-6.
- 6- Shalaby M, Reboud J, Forde T, Zadoks RN, Busin V. Distribution and prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw ruminants' milk: A systematic review. *Food Mic*. 2024; 1(18): 1044-1050
- 7- Guillier L, Fravallo P, Leclercq A, Thebault A, Kooh P, Cadavez V, et al. Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections: a systematic review and meta-analysis. *Mic Risk Analys*. 2021; 17(5): 100141.
- 8- Sharifi Yazdi S, Mobasserri B, Torabi

- Bonab P, Sharifi Yazdi S, Mirbagheri Z, Soltan Dallal MM.** Prevalence and Characteristics of *Yersinia Enterocolitica* and *Yersinia Pseudotuberculosis* from Raw Milk Supplied in Tehran. *J Nut Food Sec.* 2023; 8(1): 114-21. [In persian]
- 9- Ahmed A, Diab H, Hendy B, Batiha G, Dandrawy M, El-Zamkan MA.** Molecular Characterization of *Y. enterocolitica* Isolated from Dairy Environment with Special Reference to the Antimicrobial Activity of Milk Proteins Hydrolysates. *J Adv Vet Res.* 2022; 12(2): 118-27.
- 10- Dehkordi NV, Rahimi E, Jahromi NZ.** Prevalence, antimicrobial resistance, virulence gene distribution and SCCmec typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Iran J Mic.* 2024; 16(5): 605-617. [In persian]
- 11- Forouzani-Moghaddam MJ, Habibi S, Hosseini-Safa A, Khanaliha K, Mokarinejad R, Akhoundzadeh F, et al.** Rapid detection of major enterotoxin genes and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk in the Yazd province, Iran. *Vete Med Sci.* 2024; 10(3): e1407. [In persian]
- 12- Rezaei pour F, Rahimi E.** Prevalence of Antibiotic-Resistant Strains of *Yersinia Enterocolitica* Isolated from Traditional and Industrial Dairy Products Sold in Isfahan County. *J Res Env Health.* 2024; 10(3): 99-111. [In persian]
- 13- Zhang J, Wang J, Jin J, Li X, Zhang H, Shi X, et al.** Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Food Res Int.* 2022; 162: 111969.
- 14- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D.** *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed res int.* 2014; 2014(1): 827965.
- 15- Pajohesh R, Tajbakhsh E, Momtaz H, Rahimi E.** Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance and adherence genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw cow milk in Shahrekord, Iran. *Int J Microbiol.* 2022; 2022(1): 1-10. [In persian]
- 16- Ahmadi SA, Sakha MZ, Ebadi S, Panda AK.** Study of milk and dairy products *Staphylococcus* contamination and antimicrobial susceptibility sold in local markets around Kabul University. *Int J Innov Res Sc Stu.* 2021; 4(1): 20-24. [In persian]
- 17- Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagrafoli D, Boselli C, Giacinti G, et al.** Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int Dairy.* 2015; 42: 12-5.
- 18- Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, Kotzamanidis C, Zdragas A, Papa A, et al.** Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. *Int J food mic.* 2019; 291: 35-41.
- 19- Aminifard N, Momtaz H, Bamzadeh Z.** SCCmec typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk and dairy products. *J Food Mic.* 2018; 4(4): 67-79. [In persian]
- 20- Hoseiny SM, Arabestani MR, Mahmoodi H, Farhangara E.** Prevalence of G, H, I, J Enterotoxin Genes and antibacterial susceptibility pattern in staphylococcus aureus strains isolated from different foods. *J Mazandaran Uni Med Sci.* 2015; 25(123): 1-10. [In persian]
- 21- Mirzaei H, Farhoudi H, Tavassoli H, Farajli M, Monadi A.** Presence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk and ice cream in Tabriz by culture and PCR techniques. *Afr J Mic Res.* 2012; 6(32): 6224-9. [In persian]
- 22- Jamali H, Paydar M, Radmehr B, Ismail S, Dadrasnia A.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food con.* 2015; 54: 383-8. [In persian]
- 23- Kabiri E, Mashak Z.** Antimicrobial resistance properties and enterotoxigenic gene profile of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk. *J Posi School Psych.* 2022; 6(8): 1244-52. [In persian]
- 24- Montazeri R, Rahim E, Shakerian A.** Antimicrobial resistance properties, virulence characters and RAPD-PCR typing of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy samples. *Caspian J Env Sci.* 2023; 1-18. [In persian]
- 25- Shah HJ.** Reported incidence of infections caused by pathogens transmitted commonly through food: impact of increased use of culture-independent diagnostic tests—foodborne diseases active surveillance network, 1996–2023. *Mort Weekly Repo.* 2024; 73(7): 94-105.

- 26- Colbran C, May F, Alexander K, Hunter I, Stafford R, Bell R, et al.** Yersiniosis outbreaks in Gold Coast residential aged care facilities linked to nutritionally-supplemented milkshakes, January–April 2023. *Com Dis Int.* 2024; 48(1): 11-17.
- 27- Fredriksson-Ahomaa M.** Enteropathogenic *Yersinia* spp. Zoonoses-Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects: Springer; 2014; 213-34.
- 28- Butler T, Islam M, Islam M, Azad A, Huq M, Speelman P, et al.** Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Y. intermedia* from fatal cases of diarrhoeal illness in Bangladesh. *Trans Royal Soc Trop Med Hygiene.* 1984; 78(4): 449-50.
- 29- Kanan T, Abdulla Z.** Isolation of *Yersinia* spp. from cases of diarrhoea in Iraqi infants and children. *Med Health J.* 2009; 15(2): 276-284.
- 30- Soltan Dallal M, Moezardalan K.** Frequency of *Yersinia* species infection in paediatric acute diarrhoea in Tehran. *Med Health J.* 2004; 10(1-2): 152-158.
- 31- Piras F, Siddi G, Le Guern A-S, Brémont S, Fredriksson-Ahomaa M, Sanna R, et al.** Traceability, virulence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in two industrial cheese-making plants. *Int J Food Mic.* 2023; 398: 110225.
- 32- Piras F, Spanu C, Sanna R, Siddi G, Mocchi AM, Demontis M, et al.** Detection, virulence genes and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in sheep and goat raw milk. *In Dairy J.* 2021; 117: 105011.
- 33- Sotohy SA, Diab MS, Ewida RM, Aballah A, Eldin NKA.** An investigative study on *Yersinia enterocolitica* in animals, humans and dried milk in New Valley Governorate, Egypt. *BMC Mic.* 2024; 24(1): 395.
- 34- Ahmed MA, Elsisy SF, Selim AO.** Genotypic and phenotypic variation of *Yersinia enterocolitica* isolated from different sources. *J Adv Vet Res.* 2023; 13(6): 1197-202.
- 35- Abdelwahab AM, El-Tawab A, Awad A, Abdallah F, Maarouf AA.** Phenotypic and genotypic studies on antibiotic resistant *Yersinia enterocolitica* isolated from milk and milk products in Kaliobia, Egypt. *Benha Vet Med J.* 2021; 40(2): 149-53.
- 36- Okwori AE, Martínez PO, Fredriksson-Ahomaa M, Agina SE, Korkeala H.** Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 2/O: 9 and *Yersinia pseudotuberculosis* 1/O: 1 strains isolated from human and non-human sources in the Plateau State of Nigeria. *Food Mic.* 2009; 26(8): 872-5.
- 37- Khalid D, Abbas B.** Prevalence, antibiotic susceptibility, and virulence factors of *Yersinia enterocolitica* isolated from raw milk in Basrah, Iraq. *Bulg J Vet Med.* 2021; 24(1): 10-19.
- 38- Alavi SM, Rahimi E, Tajbakhsh E.** Identification and characterization of the virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from sheep and goat milk in Shahrekord. *J Mic World.* 2017; 10(3): 103-113. [In persian]
- 39- Salimi F, Bonyadian M, Moshtaghi H.** Virulence Genes and Antibiotic Resistance Pattern of *Yersinia Enterocolitica* Isolated from Raw Milk and Traditional Cheeses. *J Mic Biolog.* 2024; 12(47): 63-76. [In persian]
- 40- Nazari M, Rahimi E.** Investigating the antibiotic resistance of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* isolates in raw cow's milk supplied in Gachsaran County. *NFVM.* 2024; 7(1): 111-21. [In persian]
- 41- Ali MM, Al-Samarai FR.** Isolation and molecular identification of *Yersinia enterocolitica* in locally produced raw milk in Iraq. *Biochemical & Cellular Archives.* 2020; 20(1): 17-26. [In persian]
- 42- Dowidar HA, Khalifa MI.** Virulence Genotyping Profiles of Cefazolin Resistance *Yersinia enterocolitica* Isolated From Milk and Milk Products in Egypt. *Egypt J Vet Sci.* 2023; 54(4): 555-69.
- 43- Movafagh F, Zeinali T, Jamshidi A.** Contamination Rate of Bovine Raw Milk with *Yersinia enterocolitica* Biotypes in Mashhad, Iran. *J Human Env Health Prom.* 2021; 7(1): 30-34. [In persian]
- 44- Ahmed HA, Tahoun AB, Abou Elez RM, Abd El-Hamid MI, Abd Ellatif SS.** Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in milk and dairy products and the effects of storage temperatures on survival and virulence gene expression. *Int dairy J.* 2019; 94: 16-21.
- 45- Tavassoli M, Jamshidi A, Ranjbar G, Moghaddam MRT, Afshari A.** Prevalence, biotyping, and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* isolated from traditional Iranian cheeses-evaluation of *yersinia enterocolitica* in traditional cheeses. *Food sci tech.* 2021; 7(5): 55-67. [In persian]

Investigation of the prevalence of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in dairy products sold in Khorramabad City

Fatemeh ghasemi¹, Najmeh Vahed Dehkordi^{2*}

1- Master's student of Food Hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

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

Receive: February 04, 2025; Revise: June 07, 2025; Accept: June 08, 2025

 10.22034/nfvm.2025.504498.1275

Summary

Dairy products are rich in nutrients, but pathogenic bacteria can spoil them, cause infections, and cause food poisoning. This study aimed to investigate the prevalence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) in traditional milk and dairy products supplied in Khorramabad city. One hundred samples, including raw cow's milk, yogurt, buttermilk, whey, and traditional butter, were randomly sampled from supply centers in Khorramabad city at different seasons of the year. The samples were transported to the laboratory in cold conditions. The results showed that in milk and dairy products supplied in Khorramabad city, out of 100 samples, 25% were contaminated with *S. aureus* and 8% with *Y. enterocolitica*. The highest contamination with *S. aureus* was in summer (15%), and the lowest contamination with *Y. enterocolitica* was in winter (1%). The highest contamination with *S. aureus* was whey (10%), and the most contaminated dairy product with *Y. enterocolitica* was raw cow's milk (5%). The results showed a statistically significant relationship between the contamination of traditional butter with *S. aureus* and *Y. enterocolitica*; however, there was no statistically significant relationship between other dairy products ($p>0.05$). Contamination of dairy products with *S. aureus* and *Y. enterocolitica* poses a considerable health risk. Given the traditional production of dairy products from raw milk in Khorramabad city, it is necessary to implement continuous monitoring programs, strict control measures, and intensify disinfection methods from dairy farming to distribution.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, Milk, Traditional Dairy Products, Food Safety




بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا و اشریشیاکلی در لبنیات سنتی و صنعتی عرضه شده در شهرستان تهران و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها

مهسا صالحی^{۱*}، امیر شاکریان^۲، مهلا الهی نیا^۱

۱- دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ فروردین ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۳ اردیبهشت ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۴ مرداد ۱۴۰۴

 10.22034/nfvm.2025.516934.1283

چکیده

شیر و فرآورده های آن نقشی حیاتی در رژیم غذایی دارند، اما منبع مناسبی برای تغذیه میکروارگانیزمها هستند و منجر به رخداد گاستروانتریت و مسمومیت های غذایی می شوند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا و اشریشیاکلی در لبنیات سنتی و صنعتی عرضه شده در شهرستان تهران و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه هاست. در این مطالعه ۷۰ نمونه لبنیات صنعتی و ۷۰ نمونه لبنیات صنعتی از مراکز عرضه در تهران نمونه گیری و به آزمایشگاه ارسال شد. نتایج نشان داد آلودگی به سالمونلا ۱۲/۱۴ درصد، اشریشیاکلی ۶/۴۲ درصد و استافیلوکوکوس اورئوس ۲۸/۵۷ درصد بود. بیشترین آلودگی به سالمونلا در کره سنتی و شیر بز ۳۰ درصد، بیشترین آلودگی در اشریشیاکلی در کشک سنتی ۳۰ درصد و بیشترین آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در کره سنتی ۷۰ درصد بود. نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی که به روش دیسک دیفیوژن انجام شد، نشان داد بیشترین مقاومت علیه استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به جنتامایسین (۸۷/۵ درصد)، بیشترین مقاومت علیه اشریشیاکلی مربوط به تتراسایکلین (۸۸/۸۹ درصد) و بیشترین مقاومت علیه سالمونلا مربوط به آمپی سیلین (۸۲/۳۵ درصد) بود. نتایج نشان داد بین میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا در نمونه های لبنیات سنتی و صنعتی، ارتباط آماری معنی داری وجود دارد ($p < 0/05$). با توجه به نتایج می توان دریافت که لبنیات سنتی از منابع مهم آلودگی به اشریشیاکلی، سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس هستند و باید از مصرف آنها اجتناب کرد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا، اشریشیاکلی، لبنیات، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

امروزه میزان مصرف شیر و فرآورده‌های حاصل آن در هر جامعه، از مهم‌ترین شاخص‌های توسعه فرهنگی به شمار می‌آید. شیر از نظر پروتئین، چربی، ویتامین‌ها و املاح غذایی، یک ماده مغذی و نزدیک به یک غذای کامل محسوب می‌شود (۱)، با این حال رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌تواند تأثیرات نامطلوبی بر ویژگی‌های ارگانولپتیکی شیر گذاشته و باعث فساد آن شود (۲).

در صورتی که دام شیرده، مبتلا به بیماری خاصی نباشد، شیر در حین ترشح، یک مایع کاملاً استریل است، اما با خروج شیر از بدن دام و نزدیک شدن به قسمت‌های انتهایی نوک پستان، آلودگی‌های موجود در این قسمت وارد شیر می‌شود. شیر حین خروج از بدن دام، دارای دمایی مطلوب برای رشد میکروارگانیسم‌ها است؛ که در نتیجه باید شیر را بلافاصله پس از دوشش، تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خنک کرد (۳). شیر خام می‌تواند از چند ناحیه آلوده شود؛ که شامل: داخل پستان، سرپستانک‌ها، سطوح تجهیزات نگهداری و حمل شیر می‌باشند. تعداد و نوع میکروارگانیسم‌های شیر تازه دوشیده شده، به فاکتورهایی مانند سلامت حیوان، وسایل و تجهیزات شیردوشی، فصل، تغذیه و مهم‌تر از همه، شرایط نگهداری حیوان در بهار بند و اصطبل‌ها بستگی دارد (۴).

میزان فراوانی باکتری‌های موجود در شیر و لبنیات، در رابطه با ارزیابی مناسب آن برای مصرف انسان نه تنها مهم است بلکه یکی از فاکتورهای اساسی بوده؛ زیرا در آن زمینه وجود رشد باکتری‌های بیماری‌زا وجود دارد. برخی از این باکتری‌های بیماری‌زا شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا موسی‌توزنز*، *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا*، *پسودوموناس*، *انتروکوکوس*، *کلی‌فرم* و *استریپتوکوکوس*‌ها هستند (۵). *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* از باکتری‌های گرم‌منفی خانواده انتروباکتریاسه هستند که مسبب گاستروانتریت بوده و حضور آنها در مواد غذایی نشان‌دهنده عدم رعایت بهداشت در پروسه تولید و عرضه

است. محدوده‌ی دمایی رشد آنها ۲۰ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد است (۶).

استافیلوکوکوس اورئوس دارای بیشترین میزان مسمومیت در سطح جهان بوده و از باکتری‌های گرم‌مثبت است که توکسین‌های مقاوم به حرارت تولید می‌کند. وجود توکسین در مواد غذایی سبب اسهال و استفراغ در بدن می‌شود. برخی از توکسین‌های ترشح‌شده از این باکتری توانایی تحمل دمایی جوش به مدت ۲۰ دقیقه را دارند؛ محدوده‌ی دمایی رشد این باکتری ۱۶ تا ۴۰ درجه است؛ بنابراین وجود آن در مواد غذایی می‌تواند پیامدهای خطرناکی داشته باشد (۷). بیماری‌های منتقل‌شونده از غذا ناشی از SEs (*Staphylococcal enterotoxins*) توسط کمیسیون بین‌المللی مشخصات میکروبیولوژیکی غذاها متعلق به گروه خطر III شناخته می‌شوند که شامل بیماری‌های نسبتاً خطرناک است، معمولاً با مدت زمان کوتاه و بدون خطر مرگ همراه بوده و به‌طور کلی، دوره کمون و شدت علائم به تعداد SE های مصرف شده و حساسیت فرد بستگی دارد. اما علائم سریع هستند و ممکن است بین ۳۰ دقیقه تا ۸ ساعت پس از خوردن غذای آلوده رخ دهند و بیشترین بروز در کودکان (کمتر از ۵ سال)، سالمندان و بیماران نقص ایمنی یافت می‌شود (۸).

شیوع *اشریشیاکلی* حاصل از شیر خام و محصولات لبنی به وفور در سراسر جهان گزارش شده است به گزارش Jenkins (۲۰۲۲) در سال ۲۰۱۹ آلودگی شیر پاستوریزه به *اشریشیاکلی* در انگلستان، سبب بستری شدن ۵۷ درصد زنان و ۵۲ درصد مردان شد (۹)، که این پژوهش نشان می‌دهد، شیوع بیماری‌های دستگاه گوارش ناشی از نقص در پاستوریزاسیون شیر در انگلستان با وجود استانداردهای سختگیرانه رخ داده است و رخداد آن در ایران نیز دور از انتظار نمی‌باشد؛ بنابراین چنین شیوع‌هایی یک نگرانی عمده در مورد سلامت عمومی هستند، زیرا برخلاف شیر غیرپاستوریزه، شیر پاستوریزه به‌عنوان نوشیدنی بی‌خطر به بازار عرضه می‌شود و به جمعیت بزرگتر و پراکنده‌تری فروخته می‌شود. در یک مطالعه‌ی *Sistematic Review*

meta-Analysis & (۲۰۲۲)، نتایج ۱۴۰ مطالعه را گزارش دادند که در شیر خام آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس شیوع ۹۵ درصدی داشته و در بین ۱۲ آنتی‌بیوتیک رایج، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین دارای بالاترین مقاومت بودند (۱۰). با توجه به توضیحات یادشده در خصوص مخاطرات بهداشتی در شیر و فرآورده‌های لبنی و روند رو به افزایش بیماری‌های ناشی از باکتری‌های پاتوژن، از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا، هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، و سالمونلا در لبنیات سنتی و صنعتی عرضه‌شده در شهرستان تهران و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در گام نخست، تعداد ۱۴۰ نمونه لبنیات شامل ۷۰ نمونه لبنیات سنتی و ۷۰ نمونه لبنیات صنعتی به‌صورت تصادفی از مراکز عرضه واقع در شهرستان تهران، در مدت سه ماه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها شامل شیر خام گاو، شیر پاستوریزه گاو، شیر خام گوسفند، شیر خام بز، پنیر سنتی، پنیر صنعتی، ماست سنتی، ماست صنعتی، دوغ سنتی، دوغ صنعتی، کره سنتی، کره صنعتی، کشک سنتی و کشک صنعتی (هر کدام ۱۰ نمونه) بودند. تمامی لبنیات نمونه‌گیری‌شده سنتی در یخچال نگهداری شده و دارای بسته‌بندی‌های بدون درپوش بودند و تمامی نمونه‌های صنعتی دارای تاریخ مصرف بودند. نمونه‌ها در دمای ۴-۸ درجه سانتی‌گراد و ظرف مدت حداکثر ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند.

نحوه جداسازی اشریشیاکلی: مطابق پژوهش حیدرزادی و همکاران (۲۰۲۱)، مقدار ۲۵ گرم از نمونه‌های جامد و ۲۵ سی‌سی از نمونه‌های مایع وزن کرده و داخل ۲۲۵ سی‌سی لاکتوز برات (Merk, Germany) به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مقدار ۱ سی‌سی از محیط نمونه غنی‌شده روی محیط کشت EMB Agar (Merk, Germany) به‌صورت خطی کشت داده شد. این محیط کشت حاوی پپتون، لاکتوز، ساکارز، اتوزین،

متیلن بلو و آب مقطر است. اسیدیته نهایی محیط کشت ۷/۱ است. کاربرد محیط کشت EMB agar عمدتاً در تشخیص چشمی باکتری اشریشیاکلی، در مواد غذایی است. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، کلنی‌های دارای جلای سبز فلزی انتخاب و برای تأیید در محیط‌های کشت افتراقی شامل سیمون سترات، MR_VP، TSI و SIM (Mirmedia, Iran) به‌صورت دستی کشت داده و نمونه‌های مثبت آنها مشخص شد (۱۱).

نحوه جداسازی سالمونلا: مطابق پژوهش رحیمی و همکاران (۲۰۲۴)، مقدار ۲۵ گرم از نمونه‌های جامد و ۲۵ سی‌سی از نمونه‌های مایع وزن کرده با ۲۲۵ سی‌سی محیط کشت لاکتوز برات مخلوط و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شدند. سپس مقدار ۱ سی‌سی از نمونه‌های غنی‌شده به ۱۰ سی‌سی سلنیت سیستین (Italy, liofilchem) و یک سی‌سی به ۱۰ سی‌سی تتراتیونات برات (Italy, liofilchem) منتقل شدند. محیط کشت Selenite Cystine Broth برای غنی‌سازی و بهبودی سالمونلا و برخی سویه‌های شیگلا است و همچنین از تکثیر اولیهای برخی باکتری‌ها مانند کلی‌فرم جلوگیری می‌کند. اسیدیته نهایی محیط کشت ۶/۸ است. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، از محیط سلنیت سیستین روی سالمونلا-شیگلا آگار، بیسموت سولفیت آگار و بریلیانت‌گرین آگار (Italy, liofilchem) به‌صورت خطی کشت داده شد. به همین ترتیب از تتراتیونات، روی محیط‌های مذکور کشت انجام داده شد. سپس بعد از ۲۴ ساعت تعداد دو یا بیشتر از پرگنه‌های تیپیک به محیط TSI و (Italy, liofilchem) LIA منتقل و نتایج بر اساس دستورالعمل استاندارد مورد تفسیر قرار گرفت (۱۲).

نحوه جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس: مطابق پژوهش پیشادست و همکاران (۲۰۲۱)، برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس ۵ گرم از نمونه‌های مورد آزمایش به درون ظرف توزین استریل منتقل و سپس میزان ۴۵ سی‌سی محلول رینگر به‌عنوان حلال به آن افزوده شد تا رقت 10^{-1} به‌دست آید. پس از حل‌کردن،

مخلوط کردن و یک‌دست شدن و ایجاد یک محلول همگن، میزان ۰/۱ سی‌سی از آن به‌وسیله سمپلر روی محیط برد پارکر آگار (Agar Parker -Baird) به روش کشت سطحی کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از پایان انکوباسیون در صورت رشد، باکتری‌های با کلنی‌های گرد و سیاه‌رنگ، جهت انجام کشت تأییدی، از کلونی‌های مشکوک به‌وسیله لوپ استریل روی محیط مانیتول سالت آگار (Manitol Salt Agar) کشت داده شد. غلظت ۷/۵ درصد کلرید سدیم موجود در محیط کشت سبب مهار رشد جزئی یا کامل میکروارگانیسم‌های غیر از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود. اسیدپته نهایی محیط کشت ۶/۸ است. محیط‌ها مجدداً به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و بعد از گذشت ۲ ساعت بر روی کلنی‌های مانیتول مثبت (کلونی‌های زردرنگ دارای هاله زردرنگ) تست Dnase جهت تأیید *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت. همچنین باکتری‌های مورد نظر با تست کواگولاز ارزیابی و نتیجه این تست در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* مشخص شدند (۱۳).

نحوه ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: برای ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تست آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش استاندارد Disk Diffusion (انتشار دیسک) انجام شد. ابتدا، یک سوسپانسیون میکروبی از جدایه‌های *اشریشیاکلی*، *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تهیه گردید. تراکم باکتری‌ها در سوسپانسیون با استاندارد McFarland 0.5 تنظیم شد تا تراکم یکنواختی از باکتری‌ها به‌دست آید. سپس، سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر-هینتون آگار (Italy, Liofilchem) به‌طور یکنواخت با سوسپانسیون باکتری پوشش داده شد. پس از آماده‌سازی سطح پلیت، دیسک‌های آنتی‌بیوگرام که شامل آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بودند، به دقت بر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. پس از قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل آمپی‌سیلین (AMP)، آمیکاسین (AN)، ایمپنم (IMP)،

جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CIP)، آموکسی‌کلاو (AMC)، نالیدیکسیک اسید (NA)، سفتریاکسون (CRO)، سولفامتاکسازول (SXT) و تتراسایکلین (TE) روی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند تا امکان انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها و ایجاد هاله‌های عدم رشد فراهم شود. پس از اتمام دوره انکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف هر دیسک با دقت اندازه‌گیری شد. بر اساس اندازه هاله‌ها، میزان حساسیت یا مقاومت جدایه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین شد. این اندازه‌ها با جداول استاندارد CLSI 2018 مقایسه گردید تا وضعیت مقاومت یا حساسیت مشخص شود (۱۱).

آنالیزهای آماری: داده‌های حاصل از آزمایش‌های انجام شده در نرم‌افزار Microsoft Office Excel گردآوری شده و توسط نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. برای مقایسه فراوانی آلودگی بین لبنیات سنتی و صنعتی از آزمون مربع‌کای استفاده شد و در موارد با حجم نمونه کم، تست دقیق فیشر به‌کار رفت.

نتایج

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد، از مجموع ۱۴۰ نمونه لبنیات سنتی و صنعتی، آلودگی به *سالمونلا* ۱۷ نمونه (۱۲/۱۴ درصد) بود که به‌ترتیب آلودگی در کره سنتی و شیر بز ۳۰ درصد، شیر خام گاو و شیر خام گوسفند ۲۰ درصد، ماست سنتی و دوغ سنتی ۱۰ درصد وجود داشت. میزان آلودگی به *اشریشیاکلا* ۹ نمونه (۶/۴۲ درصد) بود که به‌ترتیب بیشترین میزان آلودگی در کشک سنتی ۳۰ درصد، شیر خام بز و کره سنتی ۲۰ درصد، ماست سنتی و شیر خام گاو ۱۰ درصد وجود داشت. میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴۰ نمونه (۲۸/۵۷ درصد) بود که به‌ترتیب بیشترین میزان آلودگی در کره سنتی ۷۰ درصد، کشک سنتی ۶۰ درصد، شیر خام گوسفند ۵۰ درصد، شیر خام گاو، شیر خام بز و پنیر سنتی

در کره سنتی بود. همچنین آلودگی به سالمونلا و اشریشیاکلی در لبنیات صنعتی مشاهده نشد، اما در ماست، دوغ، کره و کشک صنعتی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس یافت شد. (جدول ۱).

۴۰ درصد، دوغ سنتی، ۳۰ درصد، ماست صنعتی، دوغ صنعتی و کشک صنعتی ۲۰ درصد وجود داشت. نتایج نشان داد بیشترین آلودگی سالمونلا، اشریشیاکلی مربوط به کشک سنتی و بیشترین آلودگی استافیلوکوکوس اورئوس

جدول ۱- میزان آلودگی به سالمونلا، اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در لبنیات سنتی و صنعتی شهرستان تهران

نوع ماده غذایی	تعداد نمونه	آلودگی به سالمونلا	آلودگی به اشریشیاکلی	آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس
شیر خام گاو	۱۰	۲ ^{bc} (۲۰ درصد)	۱ ^{bc} (۱۰ درصد)	۴ ^{cd} (۴۰ درصد)
شیر پاستوریزه گاو	۱۰	. ^e	. ^d	. ^e
شیر خام گوسفند	۱۰	۲ ^{bc} (۲۰ درصد)	. ^d	۲ ^{bc} (۲۰ درصد)
شیر خام بز	۱۰	۳ ^b (۳۰ درصد)	۲ ^{bc} (۲۰ درصد)	۴ ^{cd} (۴۰ درصد)
پنیر سنتی	۱۰	. ^e	. ^d	۴ ^{cd} (۴۰ درصد)
پنیر صنعتی	۱۰	. ^e	. ^d	. ^e
ماست سنتی	۱۰	۱ ^{cd} (۱۰ درصد)	۱ ^{bc} (۱۰ درصد)	. ^e
ماست صنعتی	۱۰	. ^e	. ^d	۲ ^{cd} (۲۰ درصد)
دوغ سنتی	۱۰	۱ ^{cd} (۱۰ درصد)	. ^d	۳ ^c (۳۰ درصد)
دوغ صنعتی	۱۰	. ^e	. ^d	۲ ^{cd} (۲۰ درصد)
کره سنتی	۱۰	۳ ^b (۳۰ درصد)	۲ ^{ab} (۲۰ درصد)	۷ ^a (۷۰ درصد)
کره صنعتی	۱۰	. ^e	. ^d	۱ ^d (۱۰ درصد)
کشک سنتی	۱۰	۵ ^a (۵۰ درصد)	۳ ^a (۳۰ درصد)	۶ ^{ab} (۶۰ درصد)
کشک صنعتی	۱۰	. ^e	. ^d	۲ ^{cd} (۲۰ درصد)
جمع کل	۱۴۰	۱۷ (۱۲/۱۴ درصد)	۹ (۶/۴۲ درصد)	۴۰ (۲۸/۵۷ درصد)

در هر سطر، اعداد برجسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با $Pvalue < 0/01$ با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.

تهران، ارتباط آماری معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). (جدول ۲).

آنالیزهای آماری نشان داد بین میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا در نمونه‌های لبنیات سنتی و صنعتی عرضه‌شده در شهرستان

جدول ۲- وضعیت ارتباط آماری بین نمونه‌های آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا در لبنیات سنتی و صنعتی

نوع باکتری	آلودگی (%)
استافیلوکوکوس اورئوس	۴۰ ^a (۲۸/۵۷ درصد)
سالمونلا	۱۷ ^b (۱۲/۱۴ درصد)
اشریشیاکلی	۹ ^c (۶/۴۲ درصد)

در هر سطر، اعداد برجسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با $Pvalue < 0/01$ با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.

مقاومت علیه اشریشیاکلی مربوط به تتراسایکلین (۸۸/۸۹ درصد) و سولفامتاکسازول (۷۷/۷۸ درصد) بود و کمترین مقاومت مربوط به ایمپنم (۰ درصد) بود و در نهایت بیشترین مقاومت علیه سالمونلا مربوط به آمپی‌سیلین

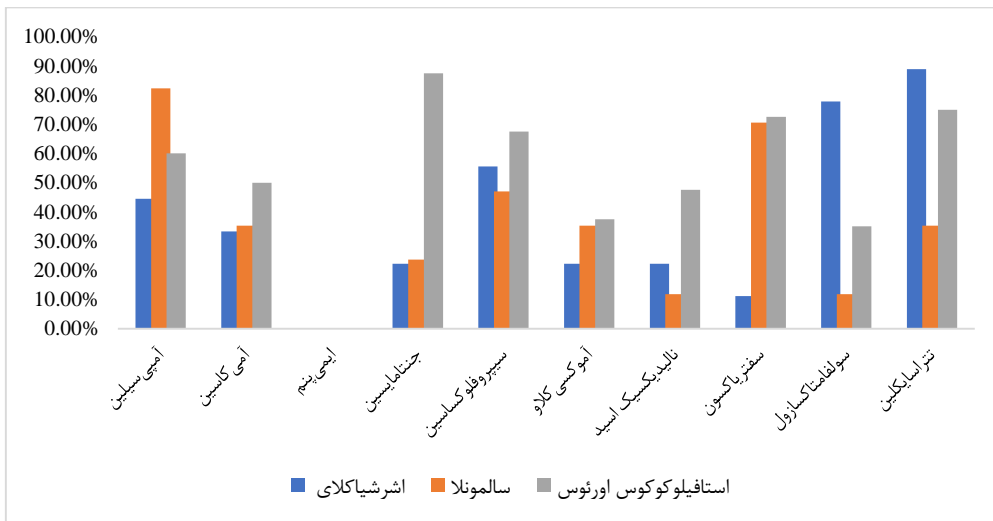
نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت علیه استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به جنتامایسین (۸۷/۵ درصد) و سفتریاکسون (۷۲/۵ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به ایمپنم (۰ درصد) بود. بیشترین

مقاومت آنتی بیوتیکی سوپه‌های اشریشیاکلی، سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از لبنیات سنتی و صنعتی (نمودار ۱)

جدول ۳- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سوپه‌های اشریشیاکلی، سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از لبنیات سنتی و صنعتی

نوع آنتی بیوتیک	اشریشیاکلی			سالمونلا			استافیلوکوکوس اورئوس		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
آمی سیلین (AMP)	۱ (۱۱/۱۱٪)	۴ (۴۴/۴۴٪)	۴ (۴۴/۴۴٪)	۳ (۱۷/۶۵٪)	۱۴ (۸۲/۳۵٪)	۰	۱ (۲/۵٪)	۱۷ (۴۲/۵٪)	۲۴ (۶۰/۶۰٪)
آمی کاسین (AN)	۱ (۱۱/۱۱٪)	۵ (۵۵/۵۶٪)	۳ (۳۳/۳۳٪)	۹ (۵۲/۹۴٪)	۶ (۳۵/۲۹٪)	۰	۵ (۱۲/۵٪)	۱۵ (۳۷/۵٪)	۲۰ (۵۰/۵۰٪)
ایمی پنم (IMP)	۹ (۱۰۰٪)	۰	۰	۰	۰	۱۷ (۱۰۰٪)	۴۰ (۱۰۰٪)	۰	۰
جنتامایسین (GM)	۳ (۳۳/۳۳٪)	۴ (۴۴/۴۴٪)	۲ (۲۲/۲۲٪)	۸ (۴۷/۰۵٪)	۴ (۲۳/۵۹٪)	۰	۵ (۱۲/۵٪)	۳۵ (۸۷/۵۰٪)	۰
سیپروفلوکساسین (CIP)	۰	۴ (۴۴/۴۴٪)	۵ (۵۵/۵۶٪)	۸ (۴۷/۰۵٪)	۸ (۴۷/۰۵٪)	۱ (۵/۹۰٪)	۱ (۲/۵٪)	۱۲ (۳۰/۳۰٪)	۲۷ (۶۷/۵۰٪)
آموکسی کلاو (AMC)	۲ (۲۲/۲۲٪)	۵ (۵۵/۵۶٪)	۲ (۲۲/۲۲٪)	۸ (۴۷/۰۵٪)	۶ (۳۵/۲۹٪)	۰	۱۰ (۲۵٪)	۱۵ (۳۷/۵٪)	۰
نالیدیکسیک اسید (NA)	۱ (۱۱/۱۱٪)	۶ (۶۶/۶۷٪)	۲ (۲۲/۲۲٪)	۴ (۲۳/۵۹٪)	۲ (۱۱/۷۶٪)	۱۱ (۶۴/۷۰٪)	۸ (۲۰٪)	۱۳ (۳۲/۵۰٪)	۱۹ (۴۴/۵۰٪)
سفتریاکسون (CRO)	۶ (۶۶/۶۷٪)	۲ (۲۲/۲۲٪)	۱ (۱۱/۱۱٪)	۳ (۱۷/۶۵٪)	۱۲ (۷۰/۵۸٪)	۰	۰	۱۱ (۲۷/۵۰٪)	۲۹ (۷۲/۵۰٪)
سولفامتکسازول (SXT)	۰	۲ (۲۲/۲۲٪)	۷ (۷۷/۷۸٪)	۸ (۴۷/۰۵٪)	۲ (۱۱/۷۶٪)	۰	۶ (۱۵٪)	۲۰ (۵۰٪)	۱۴ (۳۵٪)
تتراسایکلین (TE)	۰	۱ (۱۱/۱۱٪)	۸ (۸۸/۸۹٪)	۸ (۴۷/۰۵٪)	۶ (۳۵/۲۹٪)	۰	۳ (۷/۵٪)	۱۷ (۴۲/۵۰٪)	۳۰ (۷۵٪)

نخستین شماره در میوه‌پخشانی دامپزشکی / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۴



نمودار ۱- مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های حاصل از لبنیات سنتی و صنعتی عرضه شده در شهرستان تهران

بحث و نتیجه‌گیری

در بهداشت شیر و لبنیات، وضعیت سلامت دام، یک موضوع مهم در تولید شیر است. حفظ بهداشت گله، برنامه‌های کنترل بیماری و مدیریت پیشگیرانه به منظور کاهش شیوع بیماری‌های واگیر در گاوهای شیری سبب کاهش میزان آلودگی در محصولات می‌شود. اقدامات

نامطلوب بهداشتی و تجهیزات قدیمی برای ضد عفونی، هوای اطراف سالن تولید شیر و همچنین سایر عوامل محیطی از جمله شرایط اصطبل و بهداشت آب از عوامل مهم تاثیرگذار هستند (۱۴). آنالیزهای آماری نشان داد بین میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا در نمونه‌های لبنیات سنتی و صنعتی عرضه شده

در شهرستان تهران، ارتباط آماری معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$).

آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس: مسمومیت

غذایی با استافیلوکوکوس اورئوس یکی از علل شایع بیماری‌های غذایی است و عامل خطر آن انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس است. شیر و محصولات لبنی اغلب توسط انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس آلوده می‌شوند که به یک نگرانی مهم بهداشت عمومی جهانی تبدیل شده است. در این مطالعه میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس ۲۸/۵۷ درصد بود. در همین راستا پژوهشی در اکرین توسط Kukhtin و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد که گزارش دادند از مجموع ۲۸۵ نمونه شیر، ۲۵ درصد به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند (۱۵). در چند مطالعه در اتیوپی میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس از ۲۱ درصد تا ۲۵ درصد متغیر بود (۱۶-۲۰). در ایتالیا شیوع ۲۳/۷۸ درصد (۲۱)، در شهرکرد ۱۸/۷۵ درصد و در یونان ۲۲ درصد (۲۲) گزارش شد که با پژوهش حاضر مطابقت دارد. دوداران و همکاران (۲۰۲۲) در کرج با هدف بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس روی نمونه‌های لبنی، گزارش دادند از مجموع ۹۰ نمونه، ۱۲/۲۲ درصد به استافیلوکوکوس اورئوس آلودگی وجود داشت، به این ترتیب ۱۶/۶۶ درصد مربوط به شیر خام گاو، گوسفند و بز ۱۰ درصد و کره سنتی ۲۰ درصد به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند (۲۳)، که شیوع پائین‌تری از مطالعه‌ی حاضر دارد. پژوهشی در اتیوپی توسط Gebremedhim و همکاران (۲۰۲۲)، انجام شد که گزارش دادند میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در شیر و لبنیات ۱۰/۶۹ درصد بوده است و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آمپی‌سیلین (۹۵ درصد)، آموکسی‌سیلین (۹۵ درصد)، اگزاسیلین (۸۷/۵ درصد) و سفوتاکسیم (۸۰ درصد) بود (۲۴). در گزارشی توسط معشوف و همکاران (۲۰۱۵)، با هدف تعیین آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در غرب کشور، از ۱۰۵۰ نمونه، مجموعاً ۹۸ نمونه (۹/۳ درصد) به استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد که

بیشترین مقاومت به اریترومايسين، تتراسایکلین، جنتامایسین و کلیندامایسین بود (۲۵). تنوع در نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند تا حدودی ناشی از میزان استفاده از داروهای ضد میکروبی در منطقه مورد مطالعه باشد. الغیزی و شامی (۲۰۲۱)، در پژوهشی در عربستان سعودی روی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در شیر و فرآورده‌های لبنی گزارش دادند ۷۲/۹ درصد به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند (۲۶). در مصر Ahmed و همکاران (۲۰۱۹)، شیوع آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس را ۴۱ درصد (۲۷) و در شهرکرد پژوهش و همکاران (۲۰۲۲)، ۳۸/۸ درصد (۲۸) گزارش دادند. از مهم‌ترین دلایل تنوع آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در منابع یادشده می‌توان به تفاوت در موقعیت جغرافیایی، سیستم‌های مدیریتی، اندازه نمونه و شیوه‌های بهداشتی بکار رفته در مزارع و مراکز جمع‌آوری شیر، آلودگی ناشی از گاو مبتلا به ورم پستان، آلودگی متقاطع با شیر آلوده از مزرعه آلوده در مراکز جمع‌آوری، شیوه‌های نامناسب جابجایی، عدم شستشوی مناسب ظروف، استفاده از تجهیزات غیر بهداشتی اشاره کرد.

آلودگی به اشریشیاکلی: اشریشیاکلی یک پاتوژن

باکتریایی مهم انسانی است که می‌تواند به شیر و محصولات لبنی منتقل شود. با این حال، فقدان اطلاعات در مورد آلودگی شیر و محصولات لبنی به اشریشیاکلی در کشورهای در حال توسعه، مانند ایران، چالش‌های جدی برای نظارت بر بیماری و ارزیابی خطر ایجاد کرده است. در این مطالعه میزان آلودگی لبنیات به اشریشیاکلی ۶/۴۲ درصد بود. در همین راستا مطالعه‌ای (۲۰۲۱) با هدف بررسی آلودگی به اشریشیاکلای در لبنیات که توسط نبیلی و همکاران انجام شد، گزارش دادند میزان آلودگی به اشریشیاکلی، ۲۰ درصد بود که شیوع بالاتری نسبت به نتایج مطالعه حاضر دارد، اما بیشترین و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به جنتامایسین و ایمی‌پنم بود، که با پژوهش حاضر مطابقت دارد (۲۹). Bali و همکاران (۲۰۲۴) در پژوهشی آلودگی به اشریشیاکلی در شیر خام در کشور

تونس را ۳۲/۵ درصد گزارش دادند (۳۰)، که شیوع بالاتری از نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر دارد. Bajrami و همکاران (۲۰۱۷)، در صربستان، آلودگی ۲۲ درصدی در شیر را گزارش دادند (۳۱)، در اصفهان رنجبر و همکاران (۲۰۱۸)، ۳۰/۱۶ درصد (۳۲)، در بلژیک Rozenberg و همکاران (۲۰۱۸)، ۲۴ درصد (۳۳) و در مصر Elhadidy و همکاران (۲۰۱۳)، ۱۵ درصد (۳۴) آلودگی به *اشریشیاکلا* را گزارش دادند که شیوع بالاتری نسبت به یافته‌های پژوهش حاضر دارد. شیوع کلی *اشریشیاکلی* در نمونه‌های شیر خام و محصولات لبنی سنتی مطالعات انجام شده در سوئیس که توسط Stephan و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد، ۵/۸ درصد (۳۵)، محمدی و همکاران (۲۰۱۴) در کرمانشاه، ۷/۱ درصد (۳۶)، Zeinhome و همکاران (۲۰۱۴) در ایتالیا، ۶/۱۰ درصد (۲۹)، oskuz و همکاران (۲۰۰۴) در مصر، ۷/۸ درصد (۳۷)، quinto و همکاران (۱۹۹۷) در ترکیه ۵/۹ درصد (۳۸)، Xi و همکاران (۲۰۱۵) در چین، ۷ درصد (۳۹) و Cepeda و همکاران (۲۰۰۴) در اسپانیا ۶/۶ درصد (۴۰) بود، که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، مطابقت دارد. از دلایل شیوع *اشریشیاکلی* در نمونه‌های شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی می‌توان به موارد ذیل اشاره داشت که عمده‌ی دامداران، از دست خود و همچنین تجهیزات سنتی برای شیردوشی استفاده می‌کنند که خطر انتقال باکتری‌ها به شیر و فرآورده‌های لبنی را افزایش می‌دهد، در مرحله دوم، عدم نگهداری نمونه‌های شیر خام در دمای کمتر از ۴ درجه سانتی‌گراد که بقا و تکثیر *اشریشیاکلی* را تسهیل می‌کند و در مرحله سوم، استفاده از شیر غیر پاستوریزه برای تولید فرآورده‌های لبنی که بقای باکتری‌ها را در فرآورده‌های لبنی تسهیل می‌کند.

آلودگی به سالمونلا: غذاهای با منشأ حیوانی به‌عنوان منابع اصلی سالمونلوز ناشی از غذا در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین، تشخیص روتین سالمونلا در غذاها بخش مهمی از برنامه‌های بهداشت عمومی است. تشخیص سریع میکروارگانسیم‌های منتقل‌شونده از غذا، مانند سالمونلا،

پیشگیری از بیماری توسط این پاتوژن را تسهیل می‌کند. گونه‌های سالمونلا یکی از علل اصلی بیماری‌های ناشی از غذا هستند و مصرف شیر و لبنیات در شیوع سالمونلوز نقش دارند. سویه‌های سالمونلا مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد می‌توانند در مان عفونت‌های ناشی از این باکتری را مختل کنند؛ در این مطالعه شیوع آلودگی به سالمونلا در لبنیات سنتی و صنعتی ۱۲/۱۴ درصد بود؛ در همین راستا رحیمی و همکاران (۲۰۲۴)، در پژوهشی روی آلودگی به لبنیات سنتی و صنعتی در شهرکرد به سالمونلا گزارش دادند از مجموع ۱۴۰ نمونه، ۲۸/۵۷ درصد به سالمونلا آلوده بودند (۱۲)؛ Omar و همکاران (۲۰۱۸) در مصر آلودگی ۲۵ درصد (۴۱) و در کلمبیا Castañeda و همکاران (۲۰۲۱)، ۲۰/۵ درصد (۴۲) را گزارش دادند. یافته‌های گزارش شده، شیوع بسیار بالاتری با نتایج پژوهش حاضر دارند.

پژوهشی هم‌راستا با مطالعه حاضر در مصر (۲۰۲۲) انجام شد که آلودگی ۱۵ درصد را در لبنیات سنتی و صنعتی گزارش دادند (۴۳)، در سه پژوهش در اتیوپی، محققین میزان آلودگی را از ۱۱ درصد تا ۱۳/۱۴ درصد (۴۴-۴۶)، گزارش دادند. در دو پژوهش در ایتالیا میزان شیوع آلودگی ۱۴/۷ درصد (۴۷) و ۱۳/۴ درصد (۴۸) گزارش شد که با مطالعه حاضر مطابقت دارند. در تهران شایگان‌نیا و همکاران (۲۰۱۴)، گزارش دادند آلودگی در لبنیات سنتی ۱/۶۶ درصد (۴۹) در یزد ۶/۶۱ درصد (۵۰)، در فنلاند (۵۱)، ژاپن (۵۲) و لهستان (۵۳) هیچ مورد مثبتی از سالمونلا در شیر و فرآورده‌های لبنی شناسایی نشد که شیوع پائین‌تری نسبت به تحقیق حاضر دارند.

نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که لبنیات صنعتی دارای شیوع پائین‌تری از *اشریشیاکلی*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به لبنیات سنتی بودند؛ روش‌های شیردوشی، شیوه‌های انتقال شیر، استراتژی‌های تغذیه، اقدامات بهداشتی و مدیریتی، نحوه‌ی انبارداری، استفاده از ظروف آلوده، نوع اصطبل، جابجایی حیوانات، محیط شیردوشی، حفظ زنجیره سرما و امکانات تولید در مناطق مختلف، جلوگیری از ورود آب آلوده به شیر

در پایان پیشنهاد می‌شود پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون شیر قبل از تولید فرآورده‌های لبنی، رعایت اصول بهداشتی در طول ذخیره‌سازی، آگاهی بخشی به دست‌اندرکاران و همچنین سالم‌سازی وسایل شیردوشی، رعایت بهداشت در فرآیند تولید، بسته‌بندی مناسب، نگهداری در شرایط یخچال، عدم استفاده از شیرهای مشکوک به آلودگی بالا؛ از عواملی هستند که می‌توانند از بروز عفونت‌های باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی در مصرف‌کنندگان، جلوگیری کنند. به مصرف‌کنندگان پیشنهاد می‌شود در صورت ابتلا به بیماری‌های گاستروانتریت، ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا و اشریشیاکلی که اسهال، تب و استفراغ، از مهم‌ترین عوارض آنها هستند؛ از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت خودسرانه جهت مقاومت ناشی از آن علیه باکتری‌های گرم‌منفی و مثبت به حداقل کاهش یابد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه همکاران سازمان دامپزشکی تهران که نهایت همکاری را در انجام این پروژه داشتند تشکر به عمل می‌آید.

و همچنین عدم ارتباط خوراک ذخیره شده در سیلو و رعایت زنجیره سرما از زمان دوشش تا تحویل به کارخانه می‌تواند در کاهش آلودگی مدفوعی و در نتیجه آلودگی به پاتوژن‌هایی مانند اشریشیاکلی و سالمونلا نقش قابل توجهی داشته باشد. مهم‌ترین یافته به‌دست آمده از پژوهش حاضر و همچنین یافته‌های سایر تحقیقات، شیوع بالای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های انسانی مانند جنتامایسین؛ سفتریاکسون در استافیلوکوکوس اورئوس، تتراسایکلین و سولفامتازول در اشریشیاکلی و در سالمونلا آمپی‌سیلین و سفتریاکسون بود. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده، تعجب‌آور نیست، زیرا این داروها سال‌هاست که رایج‌ترین داروهای ضد میکروبی مورد استفاده برای درمان عفونت‌ها در انسان و دامپزشکی در ایران هستند. استفاده گسترده از داروهای ضد میکروبی در حیوانات شیری تا حدودی ظهور مقاومت ضد میکروبی را افزایش داده است. تجویز غیر قانونی و استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه در دامپزشکی، دلیل اصلی شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌های پاتوژن جدانشده از نمونه‌های شیر خام و فرآورده‌های لبنی است.

References

- 1- Deddefo A, Mamo G, Leta S, Amenu K. Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* in raw milk and milk products in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Food Con.* 2022; 9(1): 1-21.
- 2- Hogenboom J, Pellegrino L, Sandrucci A, Rosi V, D'Incecco P. Invited review: Hygienic quality, composition, and technological performance of raw milk obtained by robotic milking of cows. *J dairy sci.* 2019; 102(9): 7640-54.
- 3- ayazi N, Heidarzadi MA, Kohneh Poushi M, Karami M, Sabzibalkhkanlo A, Gorgin Karaji K. Investigating the Amount of Microbial Contamination of Pasteurized Milk in Kermanshah City with Coliform and the Total Number of Bacteria. *J Alternative Vet Med.* 2022; 5(12): 702-9. [In persian]
- 4- Cobirka M, Tancin V, Slama P. Epidemiology and classification of mastitis. *Animals.* 2020;10(12):2212.
- 5- Sharun K, Dhama K, Tiwari R, Gugjoo MB, Iqbal Yattoo M, Patel SK, et al. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Quarterly.* 2021; 41(1): 107-16.
- 6- Hahne J, Isele D, Berning J, Lipski A. The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. *Food mic.* 2019; 79(1): 11-9.
- 7- Heidarzadi MA. A systematic review on the contamination of traditional Iranian fruit juices with *Escherichia coli*. *New Find Vet Mic.* 2021; 4(1): 83-93. [In persian]
- 8- Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JY, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews Mic.* 2023; 7(1): 1-16.

- 9- Aguiar RAC, Ferreira FA, Dias RS, Nero LA, Miotto M, Verruck S, *et al.* Graduate Student Literature Review: Enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of Staphylococci from Brazilian artisanal raw milk cheeses. *J Dairy Sci.* 2022; 105(7): 5685-99.
- 10- Jenkins C, Bird PK, Wensley A, Wilkinson J, Aird H, Mackintosh A, *et al.* Outbreak of STEC O157: H7 linked to a milk pasteurisation failure at a dairy farm in England, 2019. *Epid & Infect.* 2022; 150: e114.
- 11- Zhang J, Wang J, Jin J, Li X, Zhang H, Shi X, *et al.* Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Food Res Int.* 2022; 162: 111969.
- 12- Heidarzadi M, Rahnama M, Alipoureskandani M, Saadati D, Afsharimoghadam A. Salmonella and Escherichia coli contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Food Hygiene.* 2021;11(2): 72-85. [In persian]
- 13- Rahimi E, Heidarzadi MA, Vahed Dehkordi N. Evaluation of prevalence rate, antibiotic resistance and frequency of fljb and rfljb genes of Salmonella Typhimurium in industrial and traditional dairies. *NFVM.* 2024; 6(2):57-65. [In persian]
- 14- Pishadast S, Rahnama M, Alipuor Eskandani M, Saadati D, Noori Jangi A, Heidarzadi M. Antimicrobial effect of nisin and garlic alcoholic extract on Staphylococcus aureus ATCC 1113 inoculated in Tilapia minced meat at 4 C. *Food Hygiene.* 2021; 12(1): 20-32. [In persian]
- 15- Kathiriya J. Good hygienic practices of dairy equipment during milk production and processing in the milk plant. *The Microbiology, Pathogenesis and Zoonosis of Milk Borne Diseases:* Elsevier; 2024. p. 29-49.
- 16- Kukhtyn M, Horiuk Y, Salata V, Klymyk V, Vorozhbit N, Rushchinskaya T. Staphylococcus aureus of raw cow's milk. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies Series: *Vet Sci.* 2021; 23(102): 53-9.
- 17- Tegegne B, Tesfaye S. Bacteriological milk quality: possible hygienic factors and the role of Staphylococcus aureus in raw bovine milk in and around Gondar, Ethiopia. *Int J Food Con.* 2017; 4: 1-9.
- 18- Lemma F, Alemayehu H, Stringer A, Eguale T. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of Staphylococcus aureus in milk and traditionally processed dairy products in Addis Ababa, Ethiopia. *BioMed res int.* 2021(1): 5576873.
- 19- Daka D, G/silassie S, Yihdego D. Antibiotic-resistance Staphylococcus aureus isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Annals Clinl Mi Antimicrob.* 2012; 11(1): 1-6.
- 20- Tigabu E, Kassa T, Asrat D, Alemayehu H, Sinmegn T, Adkins PR, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococcus aureus isolates recovered from bovine milk in central highlands of Ethiopia. *Afr J Mic Res.* 2015; 9(44): 2209-17.
- 21- Ayele Y, Gutema FD, Edao BM, Girma R, Tufa TB, Beyene TJ, *et al.* Assessment of Staphylococcus aureus along milk value chain and its public health importance in Sebeta, central Oromia, Ethiopia. *BMC Mic.* 2017; 17(1): 1-7.
- 22- Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagralfoli D, Boselli C, Giacinti G, *et al.* Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int Dairy J.* 2015; 42(1): 12-5.
- 23- Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, Kotzamanidis C, Zdragas A, Papa A, *et al.* Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. *Int J Food Mic.* 2019; 291(3): 35-41.
- 24- Doudaran HO, Mahsk Z, Kohdar V. Distribution Of Antibiotic Resistance Genes Amongst The Staphylococcus Aureus Strains Isolated From Raw Milk And Traditional Dairy Products. *J Pharma.* 2022; 17(4): 9735-41.
- 25- Gebremedhin EZ, Ararso AB, Borana BM, Kelbesa KA, Tadese ND, Marami LM, *et al.* Isolation and identification of Staphylococcus aureus from milk and milk products, associated factors for contamination, and their antibiogram in Holeta, Central Ethiopia. *Vet Med Int.* 2022; 2022(1): 6544705.
- 26- Mashouf RY, Hosseini SM, Mousavi SM, Arabestani MR. Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of Staphylococcus aureus strains isolated from animal

originated foods in West of Iran. *Oman Med J.* 2015; 30(4): 283-291.

27- **Alghizzi M, Shami A.** The prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J Bio Sci.* 2021; 28(12): 7098-104.

28- **Ahmed AA-H, Maharik NMS, Valero A, Kamal SM.** Incidence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in milk and Egyptian artisanal dairy products. *Food Cntl.* 2019; 104(2): 20-27.

29- **Pajohesh R, Tajbakhsh E, Momtaz H, Rahimi E.** Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance and adherence genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw cow milk in Shahrekord, Iran. *Int J Mic.* 2022(1): 6435774.

30- **Nobili G, Franconieri I, Basanisi M, La Bella G, Tozzoli R, Caprioli A, et al.** Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. *J Dairy Sci.* 2016; 99(10): 7877-80.

31- **Samet Bali O, Lajnef R, Felfoul I, Attia H, Ayadi M.** Detection of *Escherichia coli* in unpasteurized raw milk. *Int J Agri Food Sci.* 2024; 27(9): 89-99.

32- **Bajrami E, Sulaj K.** Contamination with *Escherichia Coli* of Homemade Fresh Butter in Rural Areas of Ferizaj and Gjilan in Kosovo. *Eurasian J Vet Sci.* 2017; 33(2): 73-76.

33- **Ranjbar R, Safarpour Dehkordi F, Sakhaei Shahreza MH, Rahimi E.** Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *Anti Res & Infec Cnt.* 2018; 7(1):1-11.

34- **Rozenberg S, Body J-J, Bruyere O, Bergmann P, Brandi ML, Cooper C, et al.** Effects of dairy products consumption on health: benefits and beliefs—a commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. *Calcified Tissue Int.* 2016; 98(7): 1-17.

35- **Elhadidy M, Mohammed M.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk cheese in Egypt: prevalence, molecular characterization and survival to stress conditions. *Lett App Mic.* 2013; 56(2): 120-7.

36- **Stephan R, Schumacher S, Corti S,**

Krause G, Danuser J, Beutin L. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J Dairy Sci.* 2008; 91(7): 2561-5.

37- **Mohammadi P, Abiri R, Rezaei M, Salmazadeh-Ahrabi S.** Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran. *Iran J Mic.* 2013; 5(3): 233-241.

38- **Zeinhom MM, Abdel-Latef GK.** Public health risk of some milk borne pathogens. *Beni-Suef J Basic App Sci.* 2014; 3(3): 209-15.

39- **Öksüz Ö, Arici M, Kurultay S, Gümüs T.** Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Cntl.* 2004; 15(6): 453-6.

40- **i M, Feng Y, Li Q, Yang Q, Zhang B, Li G, et al.** Prevalence, distribution, and diversity of *Escherichia coli* in plants manufacturing goat milk powder in Shaanxi, China. *J Dairy Sci.* 2015; 98(4): 2260-7.

41- **Quinto E, Cepeda A.** Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. *Lett App Mic.* 1997; 24(4): 291-5.

42- **Omar D, Al-Ashmawy M, Ramadan H, El-Sherbiny M.** Occurrence and PCR identification of *Salmonella* spp. from milk and dairy products in Mansoura, Egypt. *Int Food Res J.* 2018; 25(1): 446-52.

43- **Castañeda-Salazar R, del Pilar Pulido-Villamarín A, Ángel-Rodríguez GL, Zafra-Alba CA, Oliver-Espinosa OJ.** Isolation and identification of *Salmonella* spp. in raw milk from dairy herds in Colombia. *Brazil J Vet Res Anim Sci.* 2021; 58: e172805-e.

44- **Garbaj AM, Gawella TBB, Sherif JA, Naas HT, Eshamah HL, Azwai SM, et al.** Occurrence and antibiogram of multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from dairy products in Libya. *Vet World.* 2022; 15(5): 1185.

45- **Gebeyehu A, Taye M, Abebe R.** Isolation, molecular detection and antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella* from raw cow milk collected from dairy farms and households in southern Ethiopia. *BMC Mic.* 2022; 22(1): 84-92.

46- **Abunna F, Ashenafi D, Beyene T, Ayana D, Mamo B, Duguma R.** Isolation, identification and antimicrobial susceptibility profiles of *Salmonella* isolates from dairy farms in and around Modjo town, Ethiopia. *Eth Vet J.* 2017; 21(2): 92-108.

47- **Dadi S, Lakew M, Seid M, Koran T, Olani A, Yimesgen L.** Isolation of *Salmonella* and *E. coli*

(E. coli O157: H7) and its Antimicrobial Resistance Pattern from Bulk Tank Raw Milk in Sebeta Town, Ethiopia. *J Anim Res Vet Sci.* 2020; 7(1): 72-81.

48- Parolini F, Ventura G, Rosignoli C, Rota Nodari S, D'incal M, Marocchi L, et al. Detection and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility of Salmonella enterica Serotypes in Dairy Cattle Farms in the Po Valley, Northern Italy. *Animals.* 2024; 14(14): 2043.

49- Tamba M, Pallante I, Petrini S, Feliziani F, Iscaro C, Arrigoni N, et al. Overview of control programs for twenty-four infectious cattle diseases in Italy. *Fron Vet Sci.* 2021; 8: 665607.

50- Rostami F, Rahimi E, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, Bagheri Moghadam M. Isolation and evaluation virulence factors of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis in milk and dairy products. *Iran J Mic.* 2014; 8(1): 54-61.

51- Barzegar-Bafrouei R, Hajimohammadi B, Zandi H, Eslami G, Fallahzadeh H. Frequency and antibiotic resistance pattern of Salmonella spp. isolated from traditional dairies and raw milks collected in Yazd province, Iran. *Iran J Mic.* 2024; 16(6): 755.

52- Ruusunen M, Salonen M, Pulkkinen H, Huuskonen M, Hellström S, Revez J, et al. Pathogenic bacteria in Finnish bulk tank milk. *Foodborne Path Dis.* 2013; 10(2): 99-106.

53- Esho FK, Enkhtuya B, Kusumoto A, Kawamoto K. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. *BioMed Res Int.* 2013; 2013(1): 205801.

54- Pyz-Łukasik R, Paszkiewicz W, Tatara M, Brodzki P, Belkot Z. Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers. *J Dairy Sci.* 2015; 98(7): 4294-301.



Investigation of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in traditional and industrial dairy products supplied in Tehran city and antibiotic resistance of isolates

Mehsa Salehi^{1*}, Amir Shakerian², Mahla Elahinia¹

1- PhD student of food hygiene, Department of Food hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Department of food hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: April 14, 2025; Revise: May 03, 2025; Accept: May 04, 2025

 10.22034/nfvm.2025.516934.1283

Summary

Milk and its products play a vital role in the diet, but they are a good source of nutrition for microorganisms and cause gastroenteritis and food poisoning. The aim of the present study was to investigate *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* in traditional and industrial dairy products sold in Tehran and the antibiotic resistance of the isolates. In this study, 70 samples of industrial dairy products and 70 samples of traditional dairy products from supply centers in Tehran were sampled and sent to the laboratory. The results showed that *Salmonella* contamination was 12.14%, *Escherichia coli* 6.42%, and *Staphylococcus aureus* 28.57%. The highest *Salmonella* contamination was 30% in traditional butter and goat milk, the highest *Escherichia coli* contamination was 30% in traditional curd, and the highest *Staphylococcus aureus* contamination was 70% in traditional butter. The results of antibiotic resistance, which was performed using the disk diffusion method, showed that the highest resistance against *Staphylococcus aureus* was related to gentamicin (87.5%), the highest resistance against *Escherichia coli* was related to tetracycline (88.89%), and the highest resistance against *Salmonella* was related to ampicillin (82.35%). The results showed that there was a statistically significant relationship between the levels of contamination with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* in traditional and industrial dairy samples ($p < 0.05$). According to the results, it can be seen that traditional dairy products are important sources of contamination with *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*, and their consumption should be avoided.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, dairy products, antibiotic resistance



مطالعه سرمی میزان شیوع نئوسپوروسیسی، راینوتراکئیت عفونی گاوها و اسهال ویروسی گاوها در گاوهای با سابقه سقط در استان فارس

امیر اشکان مهجور^{۱*}، امیر پاک نیت^۲، بهنام مقتدری^۲

۱- گروه پاتوبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۲- آزمایشگاه مواد غذایی و دامپزشکی بیطاران شیراز، شیراز، ایران.

پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mahjoor@iau.ac.ir

دریافت مقاله: ۲۴ شهریور ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۱ آذر ۱۴۰۴



[10.22034/nfvm.2025.546886.1300](https://doi.org/10.22034/nfvm.2025.546886.1300)

چکیده

سقط جنین به عنوان یکی از مهمترین مشکلات از منظر اقتصادی، مدیریت گله و بیماریهای مشترک انسان و دام در گله های گاو شیری در ایران شناخته می شود. عوامل مختلفی باعث ایجاد سقط جنین در گاو می شوند که در این میان عوامل عفونی نقش مهمی دارند. مطالعات پیشین نشان داده است که سه بیماری نئوسپوروسیسی، راینوتراکئیت عفونی گاوها و اسهال ویروسی گاوها از مهمترین عوامل ایجاد کننده سقط در گاو در ایران هستند. در این مطالعه با هدف بررسی شیوع این سه بیماری در گله های گاو شیری در استان فارس، تعداد ۱۴۹ نمونه سرم گرفته شده از گاوهای دارای سابقه سقط در سه ماه قبل از نمونه گیری، با استفاده از کیت تجاری الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۱۴۹ نمونه سرم مورد مطالعه ۹۶ مورد (۶۴/۴٪) از نظر وجود آنتی بادی علیه نئوسپورا کانینوم، ۷۶ مورد (۵۱٪) آنتی بادی بر علیه ویروس راینوتراکئیت ویروسی گاوها و ۵۹ مورد (۳۹/۵٪) آنتی بادی بر علیه ویروس اسهال ویروسی گاوها مثبت تشخیص داده شدند. نتایج این مطالعه نشان دهنده آلودگی نسبتا گسترده گاوهای شیری استان فارس به این عوامل است که ضرورت برنامه ریزی بهتر برای کنترل این آلودگی ها و حذف حیوانات مبتلا را برجسته می سازد.

واژگان کلیدی: اسهال ویروسی گاوها، راینوتراکئیت عفونی گاوها، نئوسپورا کانینوم، سقط جنین، گاو

سقط در گاو به از دست دادن جنین بین روزهای ۴۲ و ۲۶۰ آبستنی اطلاق می شود (۱). سقط و مرده زایی از مشکلات مهم در پرورش گله های گاو شیری در جهان به شمار می آیند. میزان وقوع سقط در این گله ها بین ۵ تا ۱۲ درصد و مرده زایی بین ۲ تا ۵ درصد برآورد شده است (۲). هزینه های ناشی از سقط در گله های گاو شیری در نواحی مختلف، بسته به سیستم پرورشی و مدیریتی گله، خصوصیات جغرافیایی، اندازه گله و مراحل مختلف آبستنی متفاوت است (۳). سقط می تواند منجر به تلف شدن یا حذف حیوان، از دست دادن جنین، عفونت رحم، کاهش تولید شیر و افزایش هزینه های خدمات دامپزشکی و تلقیح گردد و در نتیجه خسارت های اقتصادی قابل توجهی به صنعت پرورش گاو وارد کند. علاوه بر جنبه اقتصادی، بسیاری از عوامل ایجاد کننده سقط می توانند بیماری های مشترک بین انسان و دام را نیز ایجاد کنند (۱). در آمریکا هزینه ناشی از سقط در طی مراحل مختلف آبستنی بین صفر تا ۱۳۷۳ دلار و در ایران بین ۸۲ تا ۱۳۰۲ دلار در هر گاو تخمین زده شده است. میزان کلی سقط در گله های گاو در مطالعات مختلف در ایران بین ۱۱/۲٪ و ۱۸/۷٪ (به طور میانگین ۱۵/۵٪) گزارش شده است. بیشترین میزان سقط در گاو در شرایط آب و هوایی معتدل تا سرد و معمولاً در زایش دوم مشاهده می شود (۴). سقط در گاو یک پدیده چند علتی است و می تواند منشا عفونی یا غیر عفونی داشته باشد. با وجود پیشرفت های زیاد در شناسایی عوامل موثر در ایجاد سقط تنها در کمتر از پنجاه درصد موارد علت اصلی سقط مشخص می شود (۵). عوامل مختلفی همچون عوامل ژنتیکی، کمبودهای تغذیه ای، مسمومیتها و اختلالات هورمونی می توانند منجر به سقط شوند، اما عوامل عفونی سهم مهمی در از دست رفتن آبستنی در گاو دارند (۶). سقط در گاو معمولاً در اثر عواملی رخ می دهد که چند هفته با چند ماه پیش از وقوع سقط ایجاد شده اند و این عوامل معمولاً در زمان بروز سقط قابل شناسایی یا رهگیری نیستند (۷).

در مطالعات مختلف بر روی عوامل ایجاد کننده سقط در گله های گاو شیری در ایران، میزان وقوع بیماری های ناشی از ویروس اسهال ویروسی گاوها (BVD و نئوسپورا کانینوم بالا و میزان شیوع ویروس رینوتراکئیت عفونی (IBR) در حد متوسط گزارش شده است و به نظر می رسد این سه بیماری از مهم ترین علل سقط جنین در گاو در ایران باشند. میزان وقوع سایر عوامل عفونی بسیار کمتر گزارش شده است (۸،۴). عامل ایجاد کننده اسهال ویروسی گاوها (BVD) از جنس پستی ویروس از خانواده فلاویویریده می باشد. این بیماری گسترش جهانی داشته و از مهمترین عوامل ایجاد سقط و کاهش تولید در گله های گاو شیری در جهان می باشد (۹،۶). میزان شیوع این بیماری در ایران در گله های واکنش نده بین ۲۰ تا ۹۰ درصد تخمین زده می شود (۴). هرپس ویروس گاوی تیپ ۱، عامل رینوتراکئیت عفونی گاوها و التهاب پستولار واژن و ولوا گسترش جهانی دارد و تخمین زده می شود هر سال حدود ۳ میلیارد دلار به صنعت گاو داری در جهان خسارت وارد کند. این ویروس می تواند موجب بروز سقط، ناباروری، آنسفالیت، التهاب پستان، التهاب روده و التهاب قرنیه در گاوها شود (۱۰،۶). نئوسپورا کانینوم به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده سقط جنین در گاو مطرح است و دارای گسترش جهانی می باشد. نئوسپورا کانینوم یک انگل دو میزبان است و سگ سانان به عنوان میزبان نهایی این تک یاخته شناخته می شوند. انتقال عمودی انگل مهمترین و اصلی ترین راه ایجاد آلودگی در حیوانات است. با این حال، انتقال افقی انگل از طریق اوویسیست ها نیز نقش مهمی در انتشار آلودگی دارد (۱۱). بر اساس یک مطالعه متا آنالیز، میزان شیوع سری نئوسپورا کانینوم در گاوها در ایران ۲۳/۶٪ گزارش شده است (۴). روش الیزا به عنوان روشی حساس و دقیق برای بررسی سرولوژیک عفونتهای نئوسپورا کانینوم، اسهال ویروسی گاوها و رینوتراکئیت عفونی گاوها محسوب می شود (۱۲). این مطالعه با هدف بررسی میزان شیوع سری ویروس عامل اسهال ویروسی گاوها (BVD)، نئوسپورا کانینوم و

ویروس عامل رینوتراکئیت عفونی گاوها (IBR) در استان فارس انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های مورد مطالعه: برای انجام این مطالعه ۱۴۹ نمونه خون از گاوهای که به تازگی سقط کرده بودند یا سابقه سقط در سه ماه گذشته را داشتند جمع آوری شد. اطلاعات مربوط به گاوهای سقط کرده به صورت کامل ثبت می‌شد. این اطلاعات شامل سن گاو، وضعیت بدنی و نوع جیره، وجود نشانه‌های احتمالی درمانگاهی، منطقه جغرافیایی و شرایط نگهداری گله، تاریخچه واکسیناسیون، احتمال وجود موارد غیرعفونی ایجاد کننده سقط، تعداد زایش و سابقه سقط در آبستنی قبلی بود که در فرمهای مخصوص طراحی شده برای این مطالعه ثبت می‌گردید. در گاوهای با سابقه سقط، با هماهنگی صاحب دامداری و دامپزشک فارم، نمونه‌های خون اخذ شده و پس از انعقاد، ابتدا با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. سپس سرم‌های جدا شده در حجم‌های یک و نیم میلی لیتری در میکروتیوب‌های نشان گذاری شده ریخته شده و تا زمان آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند.

آزمون الایزا: برای شناسایی دخالت احتمالی ویروس اسهال ویروسی گاوها، رینوتراکئیت عفونی گاوها و انگل نئوسپورا کانینوم در بروز سقط، نمونه‌های سرم با استفاده از روش الایزا مورد آزمون قرار گرفتند. کیت تجاری الایزای تشخیص آنتی بادی ضد ویروس اسهال ویروسی گاوها، رینوتراکئیت عفونی گاوها و نئوسپورا ساخت شرکت Innovative Diagnostic (IDvet) کشور فرانسه

بودند و نمونه‌های سرم طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج

برای انجام این مطالعه، تعداد ۱۴۹ نمونه سرم از گاوهای دارای سابقه سقط در سه ماه گذشته با استفاده از کیت تجاری الایزا مورد آزمون قرار گرفتند. از این تعداد ۹۶ مورد (۶۴/۴٪) از نظر وجود آنتی بادی بر علیه نئوسپورا کانینوم مثبت تشخیص داده شدند. در آزمایش شناسایی آنتی بادی بر علیه ویروس رینوتراکئیت ویروسی گاوها ۷۶ مورد (۵۱٪) از سرم‌ها مثبت و ۷۳ مورد (۴۹٪) از سرم‌ها منفی ارزیابی شدند و برای ویروس اسهال ویروسی گاوها ۵۹ مورد (۳۹/۵٪) از سرم‌ها مثبت و ۹۰ مورد (۶۰/۵٪) منفی تشخیص داده شدند. همچنین نتایج نشان داد که ۲۳ مورد از گاوهای مورد مطالعه دارای آنتی بادی همزمان علیه ویروس اسهال ویروسی گاوها و نئوسپورا کانینوم، ۲۲ مورد همزمان آنتی بادی علیه نئوسپورا کانینوم و ویروس رینوتراکئیت ویروسی گاوها بودند و همچنین ۱۷ مورد به صورت همزمان آنتی بادی علیه ویروس رینوتراکئیت عفونی گاوها و ویروس اسهال ویروسی گاوها نشان دادند.

فراوانی بیماری‌های مورد بررسی بر اساس سن در جدول ۱ قابل مشاهده است. نتایج نشان داد که با افزایش سن گاوها، فراوانی ابتلا به بیماری‌ها روند افزایشی داشته است.

با توجه به قابل اطمینان نبودن تعداد زایش گاوها به دلیل عدم ثبت دقیق توسط دامدارها این متغیر مورد بررسی قرار نگرفت.

جدول ۱- فراوانی بیماری‌های بررسی شده بر اساس سن گاوهای مورد آزمایش

عامل بیماری‌زا	۱-۳ سال	۳-۵ سال	>۵ سال	مجموع (%)
نئوسپورا کانینوم	۱۲	۴۰	۴۴	۹۶ (۶۴/۴)
رینوتراکئیت ویروسی گاوها	۱۱	۳۲	۳۵	۷۸ (۵۲/۳)
اسهال ویروسی گاوها	۱۲	۲۳	۲۴	۵۹ (۳۹/۵)
مجموع	۳۵	۹۵	۱۰۳	۱۴۹

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه تعداد ۱۴۹ نمونه سرم از گاوهایی با سابقه سقط در سه ماه قبل از مطالعه با کیت تجاری الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۹۶ مورد (۶۴/۴٪) از نظر وجود آنتی بادی بر علیه نئوسپورا کانینوم، ۷۶ مورد (۵۱٪) از نظر آنتی بادی بر علیه ویروس رینوتراکئیت عفونی گاوها و ۵۹ مورد (۳۹/۵٪) از نظر وجود آنتی بادی ضد ویروس اسهال ویروسی گاوها مثبت بودند. کامکار صالحی و نام آوری (۱۳۹۶) با ارزیابی ۱۸۴ نمونه سرم از گاوهای دارای سابقه سقط در شمال استان فارس و با استفاده از کیتهای تجاری الیزا، میزان فراوانی موارد مثبت برای نئوسپورا کانینوم را ۳۲ درصد، برای رینوتراکئیت عفونی گاوها ۹۸/۲ درصد و برای اسهال ویروسی گاوها ۶۴/۱ درصد گزارش کرده اند (۱۲). در مطالعه دیگری، نام آوری و همکاران (۲۰۱۲) میزان سقط ناشی از نئوسپورا کانینوم، رابنوتراکئیت عفونی گاوها و اسهال ویروسی گاوها را به ترتیب ۳۳٪، ۳۹٪ و ۵۲٪ در جنوب غرب ایران گزارش کردند (۱۳). در مطالعه حاضر، بالاترین میزان آلودگی مربوط به آلودگی با نئوسپورا کانینوم (۶۴/۴٪) بوده است. جوکار و همکاران (۲۰۲۱) با انجام یک متاآنالیز بر روی داده های موجود در بانک های اطلاعاتی مختلف، میزان شیوع سرمی نئوسپورا کانینوم را در گاوهای ایران ۲۴/۲٪ و در استان فارس ۳۵٪ گزارش کرده اند (۱۴). همچنین انصاری لاری (۲۰۲۰) میانگین آلودگی نئوسپورا کانینوم در گاوهای ایران را ۲۳/۶ درصد گزارش کرده است (۱۵). نیری و همکاران (۲۰۲۲) میزان شیوع نئوسپورا کانینوم را در گاوهای با سابقه سقط در جهان ۴۷ درصد بیان کرده اند (۱۶). در مطالعه دیگری انصاری لاری (۲۰۲۱) شیوع این انگل را در جنین های سقط شده در گاو ۳۴/۸٪ گزارش کرده است (۱۷). اختلاف آماری به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج پژوهشگران فوق ممکن است ناشی از این باشد که در پژوهش حاضر نمونه ها فقط از گاوهای دارای سابقه سقط جمع آوری شده است، در حالی که مطالعات یاد شده بر اساس کل جمعیت گاوهای گله و شامل دام

هایی با وضعیت های مختلف آبستنی بوده اند. نیری و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که ۶۴٪ از گاوهای سقط کننده در جهان از نظر سرمی به نئوسپورا کانینوم آلوده هستند (۱۶) که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت دارد. تماس با سگ های آلوده می تواند یکی از مهم ترین عوامل انتقال نئوسپورا کانینوم به گاوها باشد. علاوه بر این، تماس نزدیک گاوها با جوندگان و پرندگان، به ویژه مرغ نیز با افزایش خطر آلودگی همراه است. جوکار و همکاران (۲۰۲۱) بالاترین میزان ابتلا به نئوسپورا را در سگ های ایران مربوط به استان فارس (۵۴/۴٪) گزارش کرده اند (۱۴). حضور گسترده سگ های ولگرد در اطراف گاوداری های استان فارس می تواند نقش مهمی در انتقال این انگل و آلودگی به آن داشته باشد. همچنین یوسفی و همکاران (۲۰۱۰) بیان می کنند که آلودگی به نئوسپورا کانینوم در گاوهایی که در مناطق گرم و خشک زندگی می کنند، بیشتر از گاوهای ساکن در مناطق با شرایط آب و هوایی سرد می باشد (۱۸). با توجه به اینکه تقریباً تمام نمونه های مطالعه حاضر از نواحی مرکزی و جنوبی استان فارس با آب و هوایی گرم و خشک جمع آوری شده اند، شرایط اقلیمی را نیز می توان به عنوان یکی از دلایل بالا بودن میزان آلودگی در مطالعه حاضر مطرح کرد. حیدری و همکاران (۲۰۱۴) بیشترین میزان فراوانی آلودگی به نئوسپورا کانینوم را در گاوهایی با بیش از ۴ سال سن مشاهده کرده اند (۱۹). همچنین خانی و همکاران (۱۳۹۷) ارتباط معنی داری بین آلودگی به نئوسپورا کانینوم با افزایش تعداد زایمان و سن گاو مادر را گزارش کرده اند (۲۰) که شبیه نتایج مطالعه حاضر است.

میزان شیوع اسهال ویروسی گاوها در گاوهای واکسینه نشده در ایران بر اساس ارزیابی حضور آنتی بادی ضد این ویروس، بین ۲۰ تا ۹۰ درصد و میزان نقش این ویروس در از دست رفتن آبستنی در گاو بین ۳/۹ تا ۱/۶۴ درصد گزارش شده است (۶،۴). میزان شیوع این بیماری در جنین گاوهای سقط شده در ایران نیز بین ۳/۲۰ و ۲۵/۲ درصد گزارش شده است (۴). سن، اندازه و تراکم گله، نوع

نگهداری و مدیریت گله، وجود حیوانات با عفونت پایدار و میزان رعایت اصول ایمنی زیستی به عنوان اصلی ترین فاکتورهای مرتبط با اسهال ویروسی گاوها شناخته می شوند (۸،۶).

در استرالیا در مناطق گرم، میزان آلودگی به اسهال ویروسی گاوها ۹۱ درصد و در نواحی معتدل ۵۴ درصد گزارش شده است (۲۱). میزان بالای شیوع اسهال ویروسی گاوها در مطالعه حاضر می تواند مرتبط به شرایط آب و هوایی گرم و خشک منطقه مورد مطالعه باشد. کامکار صالحی و نام آوری (۱۳۹۶) و نیز نام آوری و همکاران (۲۰۱۲) میزان از دست رفتن آبستنی در گاوهای استان فارس به علت اسهال ویروسی گاوها را به ترتیب ۶۴/۱ و ۵۲ درصد گزارش کرده اند که به نتایج مطالعه حاضر نزدیک است (۱۳،۱۲). نکوئی جهرمی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی رابطه بین سابقه سقط و نتایج آزمون های سرمی اسهال ویروسی گاوها در گاو داری های استان قزوین، رابطه معنی دار وضعی بین این دو متغیر مشاهده کردند. با توجه به شیوع بالای آلودگی در گله های مورد مطالعه، این محققان دلیل این ارتباط ضعیف را عدم ثبت دقیق سقط، به ویژه در دامداری های مورد بررسی دانسته اند (۲۲). نعمان و نبی نژاد (۲۰۲۰) نیز ارتباط معناداری بین افزایش سن و ابتلا به اسهال ویروسی گاوها را گزارش کرده اند و علت آن را افزایش مواجهه گاوها با ویروس در طول زمان عنوان نموده اند. نتایج این مطالعه نیز با یافته های ما همخوانی دارد (۸). آلودگی به هرپس ویروس گاوی تیپ ۱، عامل رینوتراکئیت عفونی گاوها، همه گیری جهانی دارد و می تواند منجر به بروز تب شدید، پنومونی، زخم های بینی و دهان، التهاب واژن و فرج، سقط و کاهش باروری شود (۲۳،۶). میزان شیوع سرمی هرپس ویروس گاوی تیپ یک در ایران ۴۰/۲ درصد و میزان آلودگی در گله های گاو شیری ۷۵ درصد گزارش شده است. همچنین سقط ناشی از هرپس ویروس گاوی تیپ یک بین ۶/۸ تا ۱۳/۳ گزارش شده است (۴). میزان سرمی ابتلا به هرپس ویروس گاوی تیپ یک در مطالعه حاضر، بالاتر از میانگین گزارش شده

در کشور است. اندازه گله، سن بالاتر دام ها، تراکم گله، نگهداری همزمان گاوهای گوشتی و شیری در یک مکان اضافه شدن دام های جدید به گله، همگی می توانند از عوامل مهم افزایش شیوع عفونت در منطقه مورد مطالعه باشند.

در مطالعه ما با افزایش سن، میزان شیوع سرمی هرپس ویروس گاوها افزایش یافته است که می تواند به دلیل مسائل مدیریتی یا شرایط آب و هوایی باشد. نعمان و نبی نژاد (۲۰۲۰) ابتلای بیشتر به هرپس ویروس گاوها تیپ ۱ را در گاوهای جوانتر گزارش کرده اند و دلیل آن را حساسیت بیشتر گاو های جوان و حذف گاوهای مسن غیر اقتصادی گزارش کرده اند (۸) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد. در مطالعه حاضر، ۳۱ مورد حضور همزمان آنتی بادی برعلیه ویروس اسهال ویروسی گاوها و نئوسپورا کانینوم، ۳۰ مورد آلودگی همزمان به نئوسپورا کانینوم و ویروس رینوتراکئیت عفونی گاوها و ۲۴ مورد حضور همزمان آنتی بادی برعلیه ویروس رینوتراکئیت عفونی گاوها و ویروس اسهال ویروسی گاوها مشاهده شد.

مطالعات مختلف نشان می دهد که آلودگی همزمان با ویروس اسهال ویروسی گاوها و رینوتراکئیت عفونی گاوها می تواند باعث افزایش سقط و ناباروری شود و دلیل آنرا سرکوب ایمنی ذاتی و همورال به صورت همزمان توسط هر دو ویروس می دانند (۸). قائم مقامی و همکاران (۲۰۱۴) ابتلا همزمان با اسهال ویروسی گاوها و هرپس ویروس گاوها تیپ ۱ را در یک مطالعه سرولوژیک روی ۸۰۳ گاو در اراک به میزان ۲۳/۳ درصد گزارش کرده اند. این محققین ارتباط معناداری بین سن گاو و وجود آنتی بادی رینوتراکئیت عفونی گاوها و اسهال ویروسی گاوها پیدا نکردند، اما اندازه گله را به عنوان یک فاکتور مهم در آلودگی همزمان گاوها به این دو ویروس مطرح کرده اند (۲۴). با توجه به اینکه اکثر نمونه های مطالعه حاضر مربوط به گله های صنعتی بزرگ بوده است، شاید بتوان شیوع بیشتر آلودگی سرمی به این دو ویروس را در گاوهای مسن تر تا حدی به این عامل نسبت داد. بورکمن و همکاران (۲۰۰۰) میزان شناسایی

آنتی بادی بر علیه ویروس اسهال ویروسی گاوها و نئوسپورا کانیوم را در گاوهای سقط کرده به ترتیب ۴۲ و ۷ درصد گزارش کرده اند. این محققین ارتباط معناداری بین حضور همزمان آنتی بادی علیه نئوسپورا و اسهال ویروسی گاوها را در گاوهای سقط کرده گزارش کرده اند (۲۵). همچنین کونانی و همکاران (۲۰۰۸) بیان کرده اند که آلودگی همزمان با ویروس اسهال ویروسی گاوها و نئوسپورا کانیوم می تواند در بروز سقط جنین در گاو نقش داشته باشد (۲۶).

در پایان به نظر می رسد سه بیماری عفونی نئوسپوروسیسی، اسهال ویروسی گاوها و رینوتراکئیت عفونی گاوها نقش مهمی در ایجاد سقط جنین در گله های گاو شیری در استان فارس دارد و منجر به بروز خسارات اقتصادی قابل توجه و آسیب به صنعت دامپروری در این استان می شوند. بنابراین، توجه بیشتر به برنامه های کنترل و حذف عوامل ایجاد کننده این بیماری ها در گله های گاو شیری استان فارس ضروری به نظر می رسد.

References

- 1- **Mee JF**. Invited review: Bovine abortion-Incidence, risk factors and causes. *Reprod Domest Anim*. 2023; 58 (2) : 3-33.
- 2- **Mee JF**. Global perspective on bovine abortion - current prevalences, normal rates, diagnoses and aetiologies; a mini-review. *ACTA VET. BRNO* 2024; 93: 355–360.
- 3- **Keshavarzi H, Sadeghi-Sefidmazgi A**. Estimation of financial losses associated with abortion in dairy herds using partial budgeting model. *IJAS* 2022; 52(4):261-270.
- 4- **Hassani M, Menzies P, Alamian S, Esmaceli H**. Prevalent Infectious Causes of Abortion in the Ruminant Population in Iran- A Literature Review. *Arch Razi Inst*. 2025; 80(3): 669-684.
- 5- **Hecker YP, Gonzalez-Ortega S, Cano S, Ortega-Mora LM, Horcajo P**. Bovine infectious abortion; a systematic review and meta-analysis. *Front. Vet. Sci*. 2023; 29) 10): 1249410.
- 6- **Behzade Shahre Babak MJ**. A review of viral causes of bovine abortion in Iran. *J Updates Vet Microbiol*. 2019; 3(2): 35-44. [In Persian].
- 7- **Namavari M, Hosseini M, Mansourian M, Shams Z, Amrabadi O, Tahamtan Y, et al**. Testing for infective abortive agents in cattle in Iran. *Onl J Vet Res*. 2012; 16(3): 147-53.
- 8- **Noaman V, Nabinejad AR**. Seroprevalence and risk factors assessment of the three main infectious agents associated with abortion in dairy cattle in Isfahan province, Iran. *Trop Anim Health Prod* [Internet]. 2020;52(4): 2001–9.
- 9- **Jiang L, Wang P, Zhang G, Niu X, Liu Q, Liang R, et al**. Rapid visual detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using recombinase polymerase amplification with SYBR green I. *BMC Vet Res*. 2025; 21(1):232.
- 10- **Ganguly B, Tayshete S, Melepat DP, Awandkar S, Karnati S, Pattnaik P, et al**. An open-label, randomized field trial demonstrates safety and immunogenicity of inactivated gE-Deleted marker vaccine against infectious bovine rhinotracheitis in cattle. *Vaccines (Basel)*. 2025; 13(6): 579.
- 11- **Shahrestanaki AK, Nourani H, Razmi G**. Pathological and molecular studies of neospora caninum infection in aborted bovine fetuses in Khorasan Razavi province, Iran. *Vet Med Sci*. 2025 ;11(3): e70329.
- 12- **Kamkar Salehi S, Namavari, M**. Study of using the triple Dot-ELISA for simultaneous diagnosis of Neospora caninum, IBR and BVDV. *VJ* 2017; 117:134-140. [In Persian].
- 13- **Namavari M, Hosseini M, Mansourian M, Shams Z, Amrabadi O, Tahamtan Y, et al**. Testing for infective abortive agents in cattle in Iran. *Onl J Vet Res*. 2012; 16(3): 147-53.
- 14- **Jokar M, Bokaie S, Rahmanian V, Zahedi R, Sharifi N, Khoubfekr H**. Neospora caninum infection in cattle and dogs in Iran; A systematic review and meta-analysis. *Am J Anim Vet Sci*. 2021;16(1): 23-38.
- 15- **Ansari-Lari M**. Bovine neosporosis in Iran- A systematic review and meta-analysis. *Prev Vet Med*. 2020;176: 104913
- 16- **Nayeri T, Moosazadeh M, Sarvi S, Daryani A**. Neospora caninum infection in aborting bovines and lost fetuses; A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2022; 17(5): e0268903.
- 17- **Ansari-Lari M**. Neospora caninum in aborted bovine fetuses in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Ann Parasitol*. 2021;67(3): 357-366.
- 18- **Youssefi MR, Ebrahimpour S, Esfandiari B**. Survey of Neospora caninum antibody in aborting cattle from three climate regions of Iran. *World Appl Sci. J*. 2010; 10: 1448-1451.
- 19- **Heidari H, Mohamadzadeh A, Gha-rekhani J**. Seroprevalence of Neospora caninum in slaughtered native cattle in Kurdistan province. *Vet Res Forum*. 2014; 5(1): 89-72. [In Persian].
- 20- **Khani M, Hosseini F, Shayan P**. Molecular detection of Neospora caninum in aborted fetus of cattle farms in Arak. *Vet Res Forum*. 2018; 4(73): 457-463. [In Persian].
- 21- **Fountain J, Brookes V, Kirkeby C, Man-yweathers J, Maru Y, Hernandez-Jover M**. One size does not fit all: Exploring the economic and non-economic outcomes of on-farm biosecurity for bovine viral diarrhoea virus in Australian beef production. *Prev. Vet. Med*. 2022; 208: 105758.
- 22- **Bahonar A, Jahromi ON, Omidvarian MJ, Najjar E, Shokri MR, Mirzaie K**. Bovine viral diarrhoea in Qazvin Province (Iran); aseroprevalence study. *J Vet Res*. 2011; 66(4): 319-74. [In Persian].
- 23- **Rimayanti R, Khairullah AR, Lestari TD, Moses IB, Utama S, Damayanti JE**. Infectious bovine rhinotracheitis; Unveiling the hidden threat to livestock productivity and global trade. *Open Vet J*. 2024;14(10): 2525-2538.
- 24- **Ghaemmaghami S, Ahmadi M, Deniko A, Mokhberosafa L**. Serological study of BVDV and BHV-1 infections in industrial dairy herds of Arak, Iran. *IJVST*. 2013; 5(2): 53-61. [In Persian].

25- Björkman C, Alenius S, Manuelsson U, Uggla A. Neospora caninum and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet J.* 2000;159(2): 201-6.

26- Konnai, S, Mingala, CN, Sato, M, Abes, NS, Venturina, FA, Gutierrez, C. et al. A survey

of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in cattle herd with abortion problems, *Acta Tropica.* 2008; 105: 269–273.



Volume 8, Issue 3, Autumn 2025, pages: 76-84

۸۴

Serological study of the prevalence of Neosporosis, Infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea in cows with a history of abortion in Fars province

Amir Ashkan Mahjoor^{1*}, Amir Pakniyat², Behnam Moghtaderi²

1- Department of Pathobiology, Kaz.C., Islamic Azad University. Kazerun, Iran.

2- Bitaran veterinary laboratory, Shiraz, Iran.

* Corresponding author: Amir Ashkan Mahjoor, Assistant Professor, Department of Pathobiology, Kazeroon branch, Islamic Azad University. Kazeroon, Iran. amir.mahjoor@gmail.com.

Receive: September 15, 2025; Accept: December 2, 2025

 [10.22034/nfvm.2025.546886.1300](https://doi.org/10.22034/nfvm.2025.546886.1300)

Abstract

Abortion is known as one of the most important problems from the economic, herd management and zoonotic diseases perspective in dairy cattle herds in Iran. Various factors cause abortion in dairy cows and among them infectious factors play an important role. Previous studies have shown that three diseases, Neosporosis, Infectious bovine rhinotracheitis and Bovine viral diarrhoea are the most important factors causing abortion in cows in Iran. This study aimed to determine the prevalence of these three diseases in dairy cows' herds in Fars province. One hundred and forty-nine blood samples taken from cows with a history of abortion in the last three months before sampling were examined using a commercial ELISA kit. Of these samples, 96 (64.4%) were positive for antibodies against *Neospora caninum*, 76 (51%) for antibodies against Bovine rhinotracheitis viruses and 59 (39.5%) cases for positive antibodies against Bovine viral diarrhoea. According to the results of this study, it seems that these agents are widely distributed in dairy cows' in Fars province. The widespread contamination of cattle with these agents necessitates better preventive measures to control these infectious agents in Fars province.

Keywords: *Bovine viral diarrhoea, Infectious bovine rhinotracheitis, Neospora caninum, abortion, cow.*

New Findings in Veterinary Microbiology

Quarterly, Volume 8, Issue 3, Autumn 2025



University of Zabol

ISSN: 4491-2645

Isolation and Biovar Determination of Brucella Strains in Dairy Cattle of Iran
Prevalence of Streptococcus agalactia in subclinical mammary infections in dairy farms of Neyshabur city
Evaluation of Wound Healing Inoculated with Staphylococcus aureus by St. John's Wort Extract and Ostrich Oil
Antibacterial activity of carboxymethyl cellulose-based films combined with zinc oxide nanoparticles and pomegranate peel extract for preservation of Rainbow trout samples
Investigation of the prevalence of Staphylococcus aureus and Yersinia enterocolitica in dairy products sold in Khorramabad City
Investigation of Staphylococcus aureus, Salmonella and Escherichia coli contamination in traditional and industrial dairy products supplied in Tehran city and antibiotic resistance of isolates
Serological study of the prevalence of Neosporosis, Infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea in cows with a history of abortion in Fars province

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.

