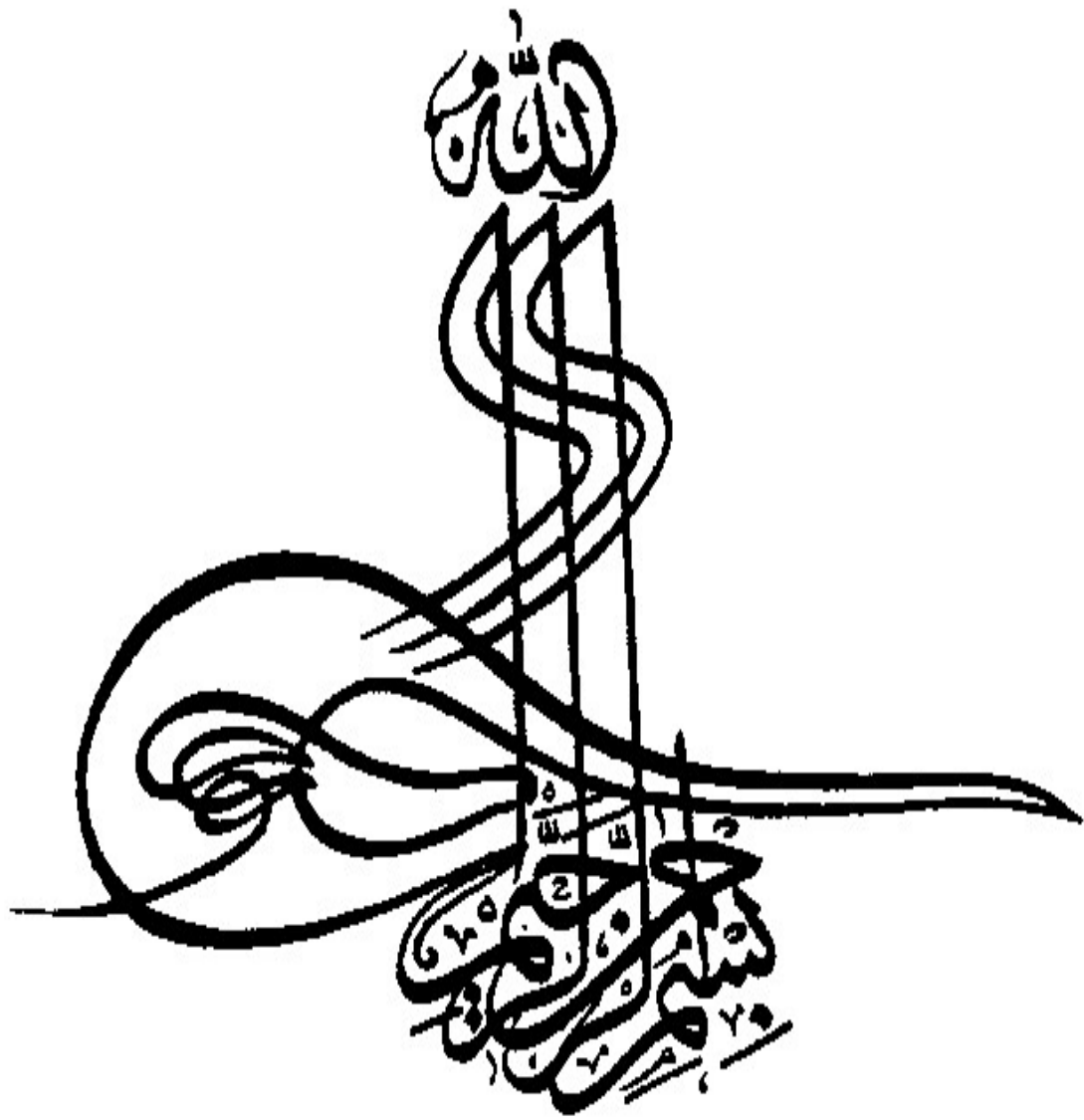


ارزیابی باقی‌مانده انروفلوکساسین در گوشت گوسفندی و گاوی عرضه شده در شهر بابل به روش الیزا
نقش سنجش حد نصاب در توکسین زایی کلستریدیوم پرفرینجنس
اولین شناسایی مولکولی انگل خونی جنس *Dactylosoma* Labbé ۱۸۹۴ در وزغ
قالشی (*Bufo eichwaldi*) از شمال ایران
اپیدمیولوژی مولکولی، تعیین ژنوتیپ و مطالعه فیلوژنتیکی نوروویروس گاوی
در گوساله‌های مبتلا به اسهال در ایران
توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند
با خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و حساس به pH
پایش سرولوژیک ویروس آنسفالومیلیت پرندگان در گله‌های مادر گوشتی
مناطق شمالی ایران



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

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



سرمدبیر:

تقی زهرایی صالحی؛ tsaleh@ut.ac.ir



مدیر مسئول:

داریوش سعادت؛ saadatdariush@uoz.ac.ir



مدیر اجرایی:

احمد راشکی؛ ah_rashki@usal.es



هیات دبیران:

احمد راشکی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه



افشین آخوندزاده بستی: گروه بهداشت و کنترل کیفی



زابل

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد رهنما: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،



محمد بکانیان: دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم



دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

پزشکی زاهدان

تقی زهرانی صالحی: گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی،



مصطفی پیغمبری: گروه بیماری های طیور، دانشکده



دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

دامپزشکی، دانشگاه تهران

محمد طباطبایی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



مهدی راسخ: گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی،



دانشگاه شیراز

دانشگاه زابل

محمد محزونیه: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



سعید حسین زاده: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد



دانشگاه شهرکرد

غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

رضا هاشمی تبار: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



محمد خلیلی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



دانشگاه فردوسی مشهد

دانشگاه شهید باهنر کرمان

مجید پهلوان: گروه علوم اعصاب بالینی، مرکز پزشکی مولکولی



سعید سالاری: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،



(CMM)، دانشگاه کارولینسک

دانشگاه زابل

کارشناس نشریه: 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.



دوره ۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات ۱-۱۰

اپیدمیولوژی مولکولی، تعیین ژنوتیپ و مطالعه فیلوژنتیکی نورویروس گاوی در

گوساله‌های مبتلا به اسهال در ایران

بهمن عابدی کیاسری^{۱*}، محمدمهدی رنجبر^۲

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.

۲- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ فروردین ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۷ خرداد ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۸ خرداد ۱۴۰۴

 10.22034/NFVM.2025.515517.1279

چکیده

نورویروس، به‌ویژه نورویروس‌های گاوی (BoNoV)، ویروس‌های RNA دار و عامل گاستروانتریت در انسان و دام هستند و برخی ژنوتیپ‌های آن در اسهال گوساله‌ها نقش دارند. بیماری‌های گوارشی در گوساله‌های جوان می‌تواند خسارات اقتصادی قابل توجهی ایجاد کرده و بهره‌وری گله‌های گاو شیری را تحت تأثیر قرار دهد. نورویروس‌ها قادرند گونه‌های مختلفی از جمله گاو، خوک، سگ، گربه، موش، و انسان را آلوده کنند. نورویروس‌های حیوانی (مانند نورویروس گاوی، خوک) از نورویروس انسانی متمایز هستند و شواهد قطعی در مورد عفونت متقاطع بین گونه‌ها کم است. همچنین، اطلاعات علمی درباره احتمال آلودگی شیر با نورویروس بسیار اندک گزارش شده است. در این مطالعه، شیوع و ویژگی‌های ژنتیکی نورویروس گاوی به‌عنوان یکی از عوامل گاستروانتریت در گوساله‌های ایران بررسی شد. در مجموع، ۱۶۳ نمونه مدفوع از گوساله‌های اسهالی کمتر از دو ماه از پنج استان کشور طی سال‌های ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۰ جمع‌آوری و با روش RT-PCR و استفاده از دو جفت پرایمر تحلیل شدند. با توجه به محدودیت منابع، تنها دو نمونه برای انجام آنالیزهای فیلوژنتیک مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. داده‌های توالی در حال حاضر با شماره‌های SUB13053245 و SUB13053259 در GenBank ثبت شده‌اند. نتایج RT-PCR نشان داد که ۶۸ نمونه (۴۱٪) برای ژنوتیپ III نورویروس گاوی مثبت بودند. همچنین، فراوانی موارد مثبت در فصول سرد سال (پاییز و زمستان) بیشتر بود. تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که نمونه SUB13053245 شباهت ژنتیکی بالایی (۹۷٪) با سویه‌های گزارش شده از کشورهای شرق آسیا و مصر دارد؛ در حالی که نمونه SUB13053259 بیشترین نزدیکی ژنتیکی را با سویه‌های کشورهای اروپایی مانند بلژیک، فرانسه و انگلستان نشان داد. این یافته‌ها بیانگر شیوع بالای ژنوتیپ III نورویروس گاوی در گوساله‌های اسهالی در ایران است. همچنین، نتایج بر ضرورت انجام مطالعات گسترده‌تر در چارچوب رویکرد «یک‌بهداشت» (One Health) برای درک بهتر اپیدمیولوژی نورویروس‌های حیوانی و بررسی احتمال انتقال بین‌گونه‌ای تأکید دارد.

واژگان کلیدی: اپیدمیولوژی مولکولی، اسهال گوساله، تحلیل فیلوژنتیک، تعیین ژنوتیپ، نورویروس گاوی

مقدمه

نوروویروس‌ها گروهی از ویروس‌های بسیار مسری هستند که به عنوان عامل ایجاد گاستروانتریت در گونه‌های مختلف، از جمله انسان‌ها و دام‌ها شناخته می‌شوند (۱). در میان این ویروس‌ها، نوروویروس گاوی به عنوان یک پاتوژن مهم در دام‌ها مورد توجه قرار گرفته است، به ویژه در مورد تأثیر آن بر گوساله‌های جوان. نوروویروس‌ها عمدتاً از طریق مسیر مدفوعی-دهانی، از جمله مصرف آب یا غذای آلوده یا تماس مستقیم با حیوان آلوده منتقل می‌شوند، بروز عفونت ناشی از نوروویروس گاوی معمولاً با اسهال شدید همراه است که می‌تواند منجر به کم‌آبی، کاهش وزن و در موارد شدید، مرگ و میر شود (۲، ۳). در گوساله‌هایی که به‌طور تجربی با نوروویروس گاوی آلوده شده‌اند، علائم بالینی اصلی شامل گاستروانتریت، اسهال و ضایعات روده‌ای بوده است (۴، ۵). ضایعات روده‌ای شامل آتروفی شدید پرزهای روده‌ای و از دست رفتن و کاهش ضخامت اپیتلیوم پرزها بود مطالعات جهانی وجود نوروویروس گاوی را با نرخ‌های شناسایی مولکولی بین ۱ تا ۸۰ درصد و در برخی کشورها حتی تا ۱۰۰ درصد شیوع سرولوژیک گزارش کرده‌اند. این اختلاف گسترده در میزان شناسایی می‌تواند ناشی از تفاوت در روش‌های نمونه‌گیری، سن گوساله‌ها، شرایط مزرعه و حساسیت روش‌های تشخیصی باشد (۶-۹). پیامدهای اقتصادی این بیماری قابل توجه است؛ زیرا علاوه بر تأثیر بر سلامت و رفاه حیوان، بر تولید و سودآوری صنعت دامداری نیز اثر می‌گذارد. بر اساس گزارش‌ها، تقریباً نیمی از موارد مرگ‌ومیر در گوساله‌های شیری زیر یک ماه ناشی از اسهال شدید است (۱۰). هرچند گوساله‌های مبتلا به اسهال معمولاً به‌طور هم‌زمان به چندین عامل عفونی آلوده می‌شوند، اما نقش نوروویروس گاوی در میان عوامل مختلف قابل توجه است. شیوع اسهال گوساله‌ها به عواملی مانند موقعیت جغرافیایی مزارع، روش‌های مدیریت دامداری و اندازه گله نیز وابسته است (۱۱، ۱۲). در حال حاضر درمان اختصاصی برای نوروویروس گاوی وجود ندارد و درمان‌های حمایتی برای کاهش علائم و بهبود وضعیت گوارشی حیوان

توصیه می‌شود. این درمان‌ها شامل تأمین مایعات و الکترولیت‌ها برای جلوگیری از دهیدراتاسیون، استفاده از داروهای ضد درد و تب‌بر و ارائه مراقبت‌های عمومی مانند تغذیه مناسب و استراحت کافی است (۱۳). با وجود شواهد محدود سرولوژیک، همچنان نیاز به تحقیقات بیشتر برای درک بهتر پتانسیل زئونوزی این ویروس‌ها وجود دارد (۶). همچنین، شناسایی آنتی‌بادی‌های نوروویروس گاوی و سگی در انسان‌ها نشان‌دهنده اهمیت بالقوه ویژگی‌های زئونوزی آن‌ها است (۱۴). انتقال بین‌گونه‌ای سایر ویروس‌های خانواده *Caliciviridae* نیز گزارش شده است؛ از جمله برخی رخدادهای زئونوزی بین پستانداران دریایی و انسان‌ها. افزون بر این، نوروویروس‌ها از طریق جهش‌های ژنتیکی و بازترکیب تکامل یافته و به‌طور منظم زئوتیپ‌های جدیدی ایجاد می‌کنند (۱۵).

نوروویروس‌ها که به خانواده *Caliciviridae* تعلق دارند، فاقد پوشش بوده و دارای ژنوم *RNA* تک‌رشته‌ای با قطبیت مثبت به طول تقریبی ۷.۳ تا ۷.۵ کیلوباز هستند. در ژنوم نوروویروس گاوی سه فریم خوانش باز (*ORFs*) وجود دارد: *ORF1* که پلی‌پروتئینی را رمزگذاری می‌کند و به شش پروتئین غیرساختاری از جمله *RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)* پردازش می‌شود؛ *ORF2* که پروتئین کپسیدی (*VP1*) را رمزگذاری می‌کند؛ و *ORF3* که یک پروتئین ساختاری فرعی (*VP2*) را تولید می‌کنند (۱۵). بر اساس تحلیل‌های فیلوژنتیک پروتئین کپسیدی، نوروویروس‌ها به پنج گروه ژنی اصلی *GI* تا *GV* تقسیم‌بندی می‌شوند. نوروویروس‌ها در انسان‌ها عمدتاً از طریق گروه‌های ژنی *GI*، *GII* و *GIV* موجب بیماری می‌شوند (۱۶). در حالی که نوروویروس‌های موجود در حیواناتی مانند خوک‌ها، سگ‌ها و گربه‌ها به‌طور نزدیک با سویه‌های انسانی مشابه هستند و در گروه‌های *GII* (نوروویروس خوک) و نوروویروس‌های موجود در گربه‌ها عمدتاً در گروه *GIV* و در سگ‌ها در گروه‌های *GIV* و *GVI* طبقه‌بندی می‌شوند (۱۷). نوروویروس‌های گاو و گوسفند به‌طور عمده در گروه ژنی *GIII* قرار دارند، در حالی که گروه ژنی *GV* شامل

نورویروس‌های موش‌ها می‌شود (۱۸). تمامی گزارش‌های موجود از نورویروس‌های گاوی مربوط به ژنوتیپ III، زیرگروه‌های ۱ یا ۲ است (۶). تنها یک گزارش از نورویروس GIII زیرگروه ۳ در گوسفندان نیوزیلند وجود دارد (۱۹).

با توجه به کمبود داده‌های اپیدمیولوژیک درباره نورویروس گاوی در ایران و اهمیت این ویروس به‌عنوان یک عامل بالقوه در اسهال گوساله‌ها، مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع مولکولی نورویروس‌ها در نمونه‌های مدفوعی گوساله‌های اسهالی در ایران با استفاده از روش RT-PCR انجام شد. همچنین، بخشی از ژن *RdRp* برخی از نمونه‌های مثبت تعیین توالی شد و با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده GenBank مقایسه و برای شناسایی روابط فیلوژنتیکی هم‌راستاسازی گردید. انتظار می‌رود نتایج این مطالعه تأثیرات قابل توجهی بر سلامت عمومی دامپزشکی، شیوه‌های دامداری و توسعه مداخلات هدفمند برای کنترل شیوع نورویروس گاوی داشته باشد. با افزایش شناخت ما از ویژگی‌های مولکولی و الگوهای اپیدمیولوژیک نورویروس گاوی، می‌توان مسیر ارتقای راهبردهای مدیریتی و حفظ سلامت گوساله‌ها و بهره‌وری صنعت دامداری را هموار کرد. این مطالعه با توجه به محدودیت داده‌های موجود، تلاشی در جهت پر کردن بخشی از خلأ دانشی درباره شیوع و ویژگی‌های ژنتیکی نورویروس گاوی در ایران است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها: در مجموع ۱۶۳ نمونه مدفوع از گوساله‌های مبتلا به اسهال که کمتر از یک ماه سن داشتند، در فاصله زمانی سال‌های ۱۴۰۱ تا اوایل ۱۴۰۳ جمع آوری و به آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شد. نمونه‌ها از پنج استان مرکزی ایران شامل تهران (۵۵ نمونه)، البرز (۷۰ نمونه)، قزوین (۲۶ نمونه)، قم (۸ نمونه) و همدان (۴ نمونه) تهیه شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس (RT-PCR): نمونه‌های مدفوع با استفاده از روش RT-PCR جهت شناسایی نورویروس گاوی مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا نمونه‌ها در محلول استاندارد بافر فسفات نمکی (PBS) با pH برابر با ۷.۲ معلق شدند تا هموژنات ۱۰ درصدی تهیه شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند تا شفاف‌سازی شوند، همان‌گونه که در مطالعات پیشین گزارش شده است. پس از آن، فاز رویی برای استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت استخراج RNA سیناپور (شرکت آپلاید سیناژن، تهران، ایران) طبق دستورالعمل سازنده مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش خلوص و غلظت RNA، از اسپکتروفتومتر نانودراپ شرکت ترموفیشر استفاده شد. تمامی نمونه‌های RNA استخراج‌شده در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ذخیره شدند تا در مراحل بعد مورد آزمایش قرار گیرند. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز سیناکلون و با بهره‌گیری از هگزامرهای تصادفی انجام شد. فرآیند سنتز cDNA شامل انکوباسیون در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و در ادامه گرمادهی در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. در نهایت، نمونه‌ها به دمای ۴ درجه سلسیوس رسانده شده و تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. (۲۰)

واکنش RT-PCR برای شناسایی نورویروس گاوی با استفاده از دو جفت پرایمر مختلف شامل پرایمرهای یونیورسال CBECu و پرایمرهای اختصاصی MON انجام شد. این واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf Thermocycler) اجرا گردید.

برای هر واکنش، ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده همراه با ۱۸ میکرولیتر از محلول واکنش استفاده شد. ترکیب محلول واکنش شامل ۰.۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومولار dNTP mix، ۱۰ میکرولیتر بافر PCR $\times 1$ و ۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase بود که حجم

است و مشابه با روش‌هایی است که پیش‌تر برای شناسایی نوروویروس در نمونه‌های بالینی و محیطی پیشنهاد شده‌اند (۲۱).

نهایی واکنش را به ۲۵ میکرولیتر می‌رساند. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ویروس در جدول ۱ ارائه شده است. این ترکیب با هدف افزایش حساسیت و ویژگی واکنش جهت شناسایی دقیق ویروس طراحی شده

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده برای شناسایی نوروویروس گاوی

نام پرایمر	توالی (۵' - ۳')	محصول PCR	دنا تورا سیون اولیه	دنا تورا سیون	اتصال	مرجع
CBECu-F	AGTTAYTTTTCTTY- TAYGGBGA	۵۳۲	۹۴ °C	۹۴ °C	۵۰ °C	۲۲
CBECu-R	AGTGTCTCTGTCA- TCATCTTCAT	جفت باز	۴ دقیقه	۲۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	
MON 432 F	TGGACICGYGGICCY- AAYCA	جفت ۲۱۳	۹۴ °C	۵۰ °C	۹۰ ثانیه	۲۳
MON 477 R	AAAICGCATCCAIG- CAAACAT	باز	۳ دقیقه	۹۴ °C		

فیلوژنتیکی، داده‌های توالی دیگر نوروویروس‌های موجود در GenBank داندلود شد. تحلیل مقایسه‌ای توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit Sequence Editor نسخه ۶.۰.۹ انجام گرفت. به منظور ساخت درخت فیلوژنتیکی، درخت با روش Neighbor-Joining و الگوریتم bootstrap در نرم‌افزار MEGA X و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap ترسیم شد.

یافته‌ها

یافته‌های مولکولی و تحلیل فیلوژنتیکی: از مجموع ۱۶۳ نمونه مدفوع جمع‌آوری‌شده از گوساله‌های مبتلا به اسهال، ۶۸ نمونه (۴۱.۷٪) با استفاده از پرایمرهای MON ۵۸ و ۵۸ نمونه (۳۵.۶٪) با استفاده از پرایمرهای یونیورسال CBECu در آزمون RT-PCR مثبت شناسایی شدند. شایان ذکر است که تمامی نمونه‌های مثبت با پرایمر CBECu، توسط پرایمر MON نیز تأیید شدند. علاوه بر این، نرخ شناسایی در فصول سرد سال (پاییز و زمستان) بالاتر از فصول گرم بود؛ به طوری که از ۹۱ نمونه مربوط به فصول

بررسی محصولات RT-PCR با روش الکتروفورز: برای بررسی نتایج RT-PCR، از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. پس از انجام واکنش RT-PCR و تولید محصولات تقویت‌شده، محصولات به ژل آگارز ۱ درصد منتقل شدند و با استفاده از الکتروفورز در یک محیط با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت جداسازی شدند. این فرآیند به تفکیک محصولات PCR بر اساس اندازه کمک می‌کند. پس از پایان الکتروفورز، ژل تحت تابش نور فرابنفش قرار گرفت و با استفاده از ماده رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، باندهای تقویت‌شده مشاهده شدند.

توالی‌یابی و تحلیل توالی: برای تعیین ساختار ژنومی سوبه‌ها، داده‌های توالی گسترده‌ای به دست آمد. دو آمپلیکون DNA مثبت پس از خالص‌سازی با کیت ژل اکستراکشن با استفاده از پرایمرهای یونیورسال CBECu (۵۳۲ نوکلئوتید) به طور مستقیم توسط دستگاه ABI Prism 3730XI Biosystems (ایالات متحده آمریکا) در مؤسسه توالی‌یابی DNA Macrogen (کره جنوبی) توالی‌یابی شدند. برای انجام تحلیل‌های مقایسه‌ای

سرد، ۴۰ نمونه (۴۴٪) و از ۷۲ نمونه مربوط به فصول گرم، ۲۸ نمونه (۳۸.۹٪) مثبت گزارش شدند. برای بررسی دقیق‌تر ویژگی‌های ژنتیکی ویروس، توالی‌یابی ژن RNA وابسته به RNA پلیمراز (RdRp) در دو نمونه مثبت انجام شد. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit نسخه ۶.۶.۹ و الگوریتم Neighbor-Joining نشان داد که هر دو نمونه متعلق به ژن‌گروه GIII نوروویروس گاوی هستند اما در دو خوشه متفاوت قرار دارند.

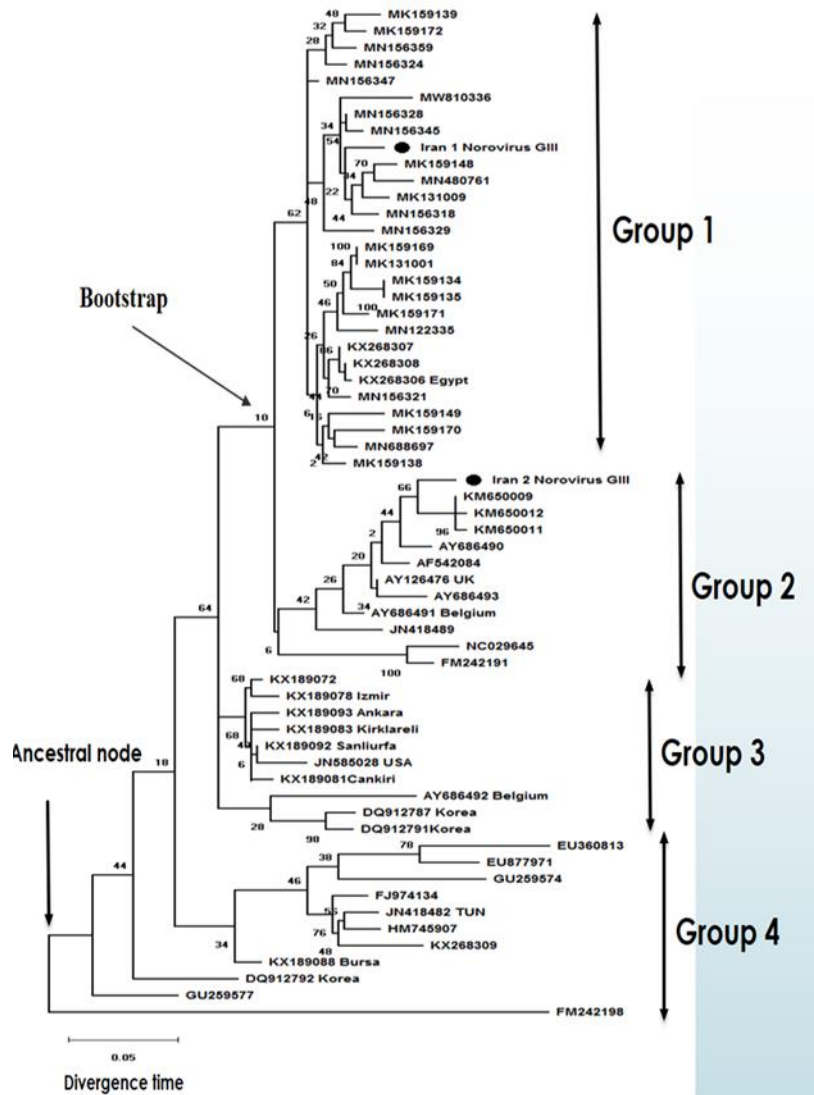
نمونه نخست با شناسه Iran 1 Norovirus GIII در گروه ۱ قرار گرفت و بیشترین شباهت ژنتیکی را با سویه‌هایی از شرق آسیا (MK159148، MK159145، KX268308، KX268307) و شمال آفریقا (MW810336) از مصر) نشان داد. این شباهت در سطح توالی نوکلئوتیدی

حدود ۹۷٪ برآورد شد. از سوی دیگر، نمونه دوم با شناسه Iran 2 Norovirus GIII در گروه ۲ خوشه‌بندی شد و نزدیکی ژنتیکی بیشتری با سویه‌هایی از اروپا مانند بلژیک (AY686493)، بریتانیا (AY126476) و آلمان داشت.

درخت فیلوژنتیک حاصل از این تحلیل، چهار خوشه اصلی ژنتیکی (گروه‌های ۱ تا ۴) را در میان سویه‌های نوروویروس گاوی GIII مشخص نمود. خوشه‌بندی متفاوت دو نمونه ایرانی در این درخت، می‌تواند نشان‌دهنده منشأهای متفاوت آلودگی در گوساله‌های کشور باشد. داده‌های حاصل از توالی‌یابی نیز به پایگاه داده GenBank با شناسه‌های SUB13053245 و SUB13053259 ارسال شدند (تصویر ۱).

جدول ۲. نمونه‌های ارزیابی‌شده برای نوروویروس گاوی بر اساس فصول

درصد مثبت‌ها RT-PCR	نتایج تعداد مثبت‌ها RT-PCR	نمونه‌های RT-PCR	فصل نمونه گیری
		با پرایمر CBECu	
۴۸٪	۳۵	۹۱	پاییز و زمستان (سرد)
۳۱.۹٪	۲۳	۷۲	بهار و تابستان (گرم)
		با پرایمر MON	
۴۱.۷٪	۴۰	۹۱	پاییز و زمستان (سرد)
۳۵.۵٪	۲۸	۷۲	بهار و تابستان (گرم)
۴۱.۷٪	۶۸	۱۶۳	مجموع



تصویر ۱ درخت فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه ژن RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) از ژنوم نوروویروس گاوی، حاصل از توالی‌یابی دو نمونه ایرانی Iran 2: SUB13053259 و Iran 1: SUB13053245 به همراه سایر توالی‌های مرجع ثبت‌شده در پایگاه داده GenBank. درخت با استفاده از روش Neighbor-Joining و الگوریتم BioNJ با مدل بیشینه احتمال (Maximum Composite Likelihood) در نرم‌افزار BioEdit ساخته شده است. درصد تکرار خوشه‌بندی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار در کنار شاخه‌ها نشان داده شده است. دو نمونه ایرانی به ترتیب در خوشه‌های مرتبط با سویه‌های شرق آسیا-آفریقا و اروپا خوشه‌بندی شده‌اند. مقیاس پایین نمودار نمایانگر تعداد جایگزینی‌های نوکلئوتیدی در هر موقعیت است.

بحث و نتیجه‌گیری

عوامل اصلی در بروز اسهال نوزادان گاو شناخته شده است (۲۵). لین ویروس از خانواده Caliciviridae بوده و در گونه‌های مختلفی از جمله انسان، خوک، گاو و سایر نشخوارکنندگان شناسایی شده است (۱۸). به‌ویژه ژنوتیپ GIII این ویروس، در کشورهای متعددی از جمله ایالات متحده، ژاپن، چین، کره جنوبی و برخی کشورهای اروپایی گزارش شده و میزان شیوع آن در مطالعات مختلف بین ۱

اسهال در گوساله‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل بروز زیان‌های اقتصادی در صنعت دامپروری محسوب می‌شود، به‌ویژه در گله‌های گاو شیری که مرگ‌ومیر، کاهش نرخ رشد و افزایش هزینه‌های درمان و مدیریت از پیامدهای عمده آن است (۲۴). در میان عوامل ویروسی، نوروویروس گاوی (Bovine Norovirus; BNoV) به‌عنوان یکی از

تا ۹۳ درصد متغیر بوده است (۲۴). مطالعات سرولوژیک نیز شیوع بالای این ویروس را در گله‌های گاو شیری نشان داده‌اند، به طوری که در برخی موارد شیوع سرولوژیک به ۱۰۰ درصد نیز رسیده است (۲۴، ۲۵).

در مطالعه حاضر، برای نخستین بار شیوع BNoV در گوساله‌های کمتر از دو ماه مبتلا به اسهال در پنج استان مرکزی ایران طی سال‌های ۱۴۰۲-۱۴۰۳ بررسی شد. شناسایی ویروس با روش RT-PCR و با استفاده از دو جفت پرایمر MON و CBECu انجام شد که نتایج نشان داد از میان ۱۶۳ نمونه، به ترتیب ۶۸ نمونه (۴۱.۷٪) و ۵۸ نمونه (۳۵.۵٪) با استفاده از پرایمرهای مذکور مثبت بودند. اغلب نمونه‌های مثبت با هر دو جفت آغازگر شناسایی شدند، با این حال اختلاف در حساسیت این آغازگرها مشاهده شد. یافته‌های حاضر با نتایج مطالعه Pourasghari و همکاران (۳۹.۵٪) همخوانی دارد (۲۶). چنین تفاوت‌هایی ممکن است به دلیل تفاوت در اقلیم منطقه، مدیریت گله یا پایداری بیشتر ویروس در دمای پایین باشد (۲۷). تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که توالی یکی از نمونه‌های ایرانی (SUB13053245) بیشترین شباهت را با سویه‌های گزارش شده از شرق آسیا و مصر دارد، در حالی که نمونه دوم (SUB13053259) به سویه‌های اروپایی شباهت بیشتری داشت. این یافته‌ها، وجود تنوع ژنتیکی بین سویه‌های در گردش در ایران را نشان می‌دهد و می‌تواند نشانه‌ای از ورود ویروس از مناطق مختلف جهان باشد.

علاوه بر این، بررسی الگوی فصلی بروز عفونت نشان داد که شیوع در فصول سرد (پاییز و زمستان) بالاتر از فصول گرم (بهار و تابستان) بود. این یافته با مطالعه Hassine-Zaafraane و همکاران همراستا است، اما با نتایج Pourasghari و همکاران که شیوع بالاتری را در فصول گرم گزارش کردند، تفاوت دارد (۲۶). افزایش شیوع در فصول سرد ممکن است به دلیل شرایط محیطی مساعدتر برای بقای ویروس در دمای پایین، تغییرات در رفتارهای مدیریتی گله در فصول سرد، و کاهش ایمنی گوساله‌ها در

این دوره باشد (۲۸). در مجموع، این مطالعه نشان داد که BNoV ژنوتیپ GIII با شیوع نسبتاً بالا در گوساله‌های مبتلا به اسهال در ایران وجود دارد. داده‌های فیلوژنتیکی به تنوع بالای سویه‌ها و احتمال منشأهای مختلف اشاره دارند. از این رو، شناسایی دقیق‌تر سویه‌های ویروسی و پایش مداوم آن‌ها می‌تواند به کنترل مؤثرتر بیماری کمک کند. از سوی دیگر، با توجه به قابلیت انتقال میان‌گونه‌ای این ویروس و حضور آن در انسان و دام، اتخاذ رویکرد «بهداشت واحد» (One Health) در مطالعات آینده ضروری است. انجام تحقیقات جامع‌تر درباره عوامل خطر، نقش سایر پاتوژن‌های هم‌زمان، و ارزیابی استراتژی‌های پیشگیری مانند واکسیناسیون، می‌تواند نقش کلیدی در کاهش بار بیماری داشته باشد (۳۰، ۲۹).

مطالعه حاضر برای نخستین بار به بررسی شیوع و ویژگی‌های ژنتیکی ویروس نوروویروس گاوی (BNoV) در گوساله‌های مبتلا به اسهال در ایران پرداخت و با بهره‌گیری از آزمون‌های مولکولی و تحلیل فیلوژنتیکی، شواهدی از حضور گسترده ژنوتیپ GIII این ویروس در پنج استان مرکزی کشور به دست داد. نتایج نشان دهنده شیوع نسبتاً بالای ویروس به‌ویژه در فصول سرد، و تنوع ژنتیکی قابل توجه میان سویه‌های شناسایی شده بود که می‌تواند حاکی از منشأهای متفاوت آلودگی و ورود ویروس از مناطق مختلف جهان باشد. این تنوع از نظر اپیدمیولوژیک و مدیریت بیماری اهمیت بالایی دارد. از آن‌جا که نوروویروس گاوی قابلیت انتقال میان‌گونه‌ای داشته و در گونه‌های مختلف از جمله انسان نیز گزارش شده، اتخاذ رویکرد «بهداشت واحد» در پایش و کنترل آن ضروری به نظر می‌رسد. ادامه مطالعات در زمینه عوامل خطر، نقش پاتوژن‌های همراه و امکان‌سنجی واکسیناسیون می‌تواند به کاهش بار بیماری و بهبود مدیریت بهداشتی گله‌ها کمک شایانی کند.

تعارض منافع

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

References

- 1- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009; 361(18): 1776-85.
- 2- Di Felice E, Mauroy A, Dal Pozzo F, Thiry D, Ceci C, Di Martino B, et al. Bovine noroviruses: a missing component of calf diarrhoea diagnosis. *Vet J.* 2016; 207: 53-62.
- 3- Ushijima H, Fujimoto T, Müller WE, Hayakawa S. Norovirus and foodborne disease: a review. *Food Saf (Tokyo).* 2014; 2(3): 37-54.
- 4- Jung K, Scheuer KA, Zhang Z, Wang Q, Saif LJ. Pathogenesis of GIII.2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves. *Vet Microbiol.* 2014; 168(1): 202-7.
- 5- Otto PH, Clarke IN, Lambden PR, Salim O, Reetz J, Liebler-Tenorio EM. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. *J Virol.* 2011; 85(22): 12013-21.
- 6- Villabruna N, Koopmans MP, de Graaf M. Animals as reservoir for human norovirus. *Viruses.* 2019; 11(5): 478.
- 7- Castells M, Caffarena RD, Casaux ML, Schild C, Castells F, Castells D, et al. Detection, risk factors and molecular diversity of norovirus GIII in cattle in Uruguay. *Infect Genet Evol.* 2020; 86: 104613.
- 8- Gülacti I, Sözdutalmaz I, Işıdan H. Molecular characterization of the bovine noroviruses from diarrheic calves in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 2016; 40(4): 428-33.
- 9- Guo Z, He Q, Yue H, Zhang B, Tang C. First detection of Nebovirus and Norovirus from cattle in China. *Arch Virol.* 2018; 163: 475-8. 2010; 166(26): 818-822.
- 10- Berchtold JF, Constable PD. Antibiotic treatment of diarrhea in preweaned calves. *Food Anim Pract.* 2009; 520.
- 11- Bartels CJ, Holzhauser M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ. *Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. Prev Vet Med.* 2010; 93(2-3): 162-9.
- 12- Izzo M, Kirkland P, Mohler V, Perkins N, Gunn A, House J. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J.* 2011; 89(5): 167-73.
- 13- Castells M, Colina R. Viral enteritis in cattle: to well known viruses and beyond. *Microbiol Res.* 2021; 12(3): 663-82.
- 14- Mesquita JR, Costantini VP, Cannon JL, Lin S, Nascimento MSJ, Vinjé J. Presence of antibodies against genogroup VI norovirus in humans. *Virol J.* 2013; 10: 1-5.
- 15- Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Saegerman C, Mast J, Bridger JC, et al. Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA. *Vet Microbiol.* 2009; 137(3-4): 243-51.
- 16- Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol.* 2004; 12(6): 279-87.
- 17- Vinjé J. **Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus.** *J Clin Microbiol.* 2015; 53(2): 373-81.
- 18- Scipioni A, Mauroy A, Vinje J, Thiry E. Animal noroviruses. *Vet J.* 2008; 178(1): 32-45.
- 19- Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, et al. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(17): 5464-70.
- 20- Cho YI, Kim WI, Liu S, Kinyon JM, Yoon KJ. Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22(4): 509-17.
- 21- Wolf S, Hewitt J, Greening GE. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(5): 1388-94.
- 22- Cui Y, Chen X, Yue H, Tang C. First detection and genomic characterization of bovine norovirus from yak. *Pathog.* 2022; 11(2): 192.
- 23- Richards GP, Watson MA, Fankhauser RL, Monroe SS. Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(12): 7179-84.
- 24- Pinior B, Firth CL, Richter V, Lebl K, Trauffer M, Dzieciol M, et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev Vet Med.*

2017; 137: 77-92.

25- Mischenko VA, Mischenko AA, Nikeshina TB, Petrova ON, Brovko YV, Kushlubaeva AI. The problem of norovirus infection in animals (literature review). *Vet Sci Today*. 2024; 118.

26- Farahmand M, Moghoofei M, Dorost A, Shoja Z, Ghorbani S, Kiani SJ, et al. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: a meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020. *Rev Med Virol*. 2022; 32(1): e2237.

27- Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28(1): 134-64.

28- Pourasgari F, Kaplon J, Sanchooli A, Fremy C, Karimi-Naghiani S, Otarod V, et al. Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses in newborn calves in Iran. *Arch Virol*. 2018; 163(5): 1271-7.

29- Karayel-Hacioglu I, Alkan F. Molecular characterization of bovine noroviruses and neboviruses in Turkey: detection of recombinant strains. *Arch Virol*. 2019; 164: 1411-7.

30- Klein-Jöbstl D, Iwersen M, Drillich M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *J Dairy Sci*. 2014; 97(8): 5110-9.



Volume 8, Issue 4, Winter 2026, pages: 1-10

Molecular epidemiology, genotyping and phylogenetic study of bovine norovirus from diarrheic calves in Iran

Bahman Abedikiasari^{*1}, Mohammadmehdi Ranjbar²

1- Assistant professor, Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

2- Razi vaccine and serum research institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*Corresponding author: abedikiasaribahman@gmail.com

Receive: April 07, 2025; Revise: June 07, 2025; Accept: June 08, 2025

 [10.22034/NFVM.2025.515517.1279](https://doi.org/10.22034/NFVM.2025.515517.1279)

Abstract

Norovirus is a highly contagious foodborne pathogen associated with calf diarrhea, causing economic losses in dairy cattle herds. This virus can infect a wide range of species, including cattle, pigs, dogs, cats, mice, sheep, lions, and humans. In this study, the prevalence and genetic sequencing of bovine norovirus as a causative agent of gastroenteritis in calves in Iran were investigated. A total of 163 fecal samples were collected from diarrheic calves under two months of age across five provinces in Iran during 2023–2024 and analyzed using RT-PCR with two pairs of primers. Two positive samples were sequenced for phylogenetic analysis (GenBank accession numbers: SUB13053245 and SUB13053259). RT-PCR results indicated that 68 samples (41%) tested positive for bovine norovirus genogroup III. Additionally, a higher prevalence of norovirus was observed in colder seasons (autumn and winter). Phylogenetic analysis revealed that sample SUB13053245 exhibited a close genetic relationship (97% similarity) with bovine norovirus strains reported from East Asia and Egypt, while sample SUB13053259 clustered with norovirus strains from European countries such as Belgium, France, and the United Kingdom. These findings highlight the high prevalence of bovine norovirus genogroup III in diarrheic calves in Iran, emphasizing the need for further investigations, particularly within the One Health framework, to assess the molecular epidemiology and risk factors associated with norovirus infections in Iran.

Keywords: *Bovine norovirus, calf diarrhea, genotyping, molecular epidemiology, phylogenetic analysis*



توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته بندی هوشمند با خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و حساس به pH

میثم سلیمانی نجف آبادی^۱، امیر شاکریان^۲، زهره مشاک^{۳*}، ابراهیم رحیمی^۲

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

۲- مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mashak@kiauo.ac.ir

دریافت مقاله: ۵ مرداد ۱۴۰۴، بازنگری: ۲۳ مرداد ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۰۲ آذر ۱۴۰۴

 10.22034/nfvm.2025.538094.1296

چکیده

فیلم‌های نشانگر تغییر رنگ دهنده حساس به pH برای سیستم‌های بسته بندی هوشمند ضروری هستند. آلیزارین، یک رنگدانه آلی با خواص حساس به تغییرات pH، به عنوان نشانگر بصری در بسته بندی‌های هوشمند مورد توجه محققان قرار گرفته است. بنابراین، این مطالعه با هدف توسعه و بررسی عملکرد فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین به عنوان یک سامانه بسته بندی فعال با قابلیت حساسیت به تغییرات pH، و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن انجام شد. آلیزارین استخراج شده از ریشه‌ی روناس با ضریب جذب مولی $\epsilon=5.5$ و مقدار $3/43$ میلی گرم بر گرم وزن خشک، در ساخت فیلم هوشمند کیتوزان حاوی ۳ درصد آلیزارین به کار گرفته شد. برهمکنش گروه های عاملی (FTIR)، مورفولوژی سطح فیلم (SEM) فعالیت ضد میکروبی (MIC، MBC و قطر هاله عدم رشد) بر پاتوژن های غذازاد شامل *S. aureus*، *E. coli*، *S. typhimurium* و *L. monocytogenes*، فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH و ABTS) و تغییرات رنگ فیلم هوشمند در pH 1 تا 14 بررسی شد. تحلیل های FTIR و SEM نشان دادند که برهم کنش میان گروه های آمینی کیتوزان و ساختار آروماتیک آلیزارین منجر به تغییرات ساختاری و افزایش ناهموازی سطحی فیلم شد. این فیلم فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی (MIC، MBC و قطر هاله عدم رشد)، در برابر پاتوژن های غذازاد نشان داد، به ویژه علیه باکتری های گرم مثبت نشان داد ($p < 0.05$). همچنین، آزمون های DPPH و ABTS افزایش معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم را تأیید کردند ($p < 0.05$). پاسخ رنگی فیلم در محدوده‌ی pH ۱ تا ۱۴ از زرد به بنفش تغییر کرد که نشان دهنده‌ی حساسیت بالا به تغییرات محیطی است. در مجموع می‌توان گفت فیلم کیتوزان/آلیزارین با عملکرد چندگانه‌ی ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و حساس به pH، یک گزینه‌ی مؤثر و کاربردی برای توسعه‌ی بسته بندی‌های هوشمند و ایمن سازی مواد غذایی محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: آلیزارین، کیتوزان، ضد باکتری، آنتی اکسیدان، حساس به تغییرات pH و بسته بندی هوشمند

مقدمه

بیماری‌های ناشی از غذا که معمولاً ماهیت عفونی یا سمی دارند و توسط باکتری‌ها (۳۹ درصد)، ویروس‌ها (۵۹ درصد)، انگل‌ها (۲ درصد) یا از طریق غذای آلوده به مواد شیمیایی وارد بدن می‌گردند، ایجاد می‌شوند. این بیماری‌ها معمولاً عفونت‌های ناشی از غذا و یا مسمومیت غذایی نامیده می‌شوند (۱). بیماری‌های باکتریایی منتقله از غذا به دلیل ماهیت متنوع، مقاومت ضد میکروبی در حال تکامل و مسیرهای انتقال پیچیده، چالش‌های قابل توجهی را ایجاد می‌کنند. مقاومت ضد میکروبی یک تهدید حیاتی برای سلامت جهانی است (۲). با وجود پیشرفت در ایمنی مواد غذایی، بیماری‌های ناشی از غذا در حال افزایش هستند. مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC)^۱ گزارش می‌دهد که چهار مرحله ساده، یعنی تمیز کردن، جدا کردن، پختن و خنک کردن، می‌توانند بیماری‌های ناشی از غذا را به طور قابل توجهی کنترل کنند و به پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با غذا در سطح خانوار کمک کنند (۳). اما با تکامل نسل‌های جدید چالش‌های مقاومت ضد میکروبی، تقاضای مصرف‌کنندگان، دانشمندان و صنعت غذا را به سمت استراتژی‌هایی سوق می‌دهد که ماندگاری، نظارت در زمان واقعی، ویژگی‌های حسی، بسته‌بندی و کیفیت کلی غذا را بهبود می‌بخشند. این استراتژی‌ها به منظور جلوگیری از آلودگی میکروبی در سراسر زنجیره تأمین مواد غذایی به ارمغان آورده است (۴-۵).

بسته‌بندی هوشمند رویکردی است که اخیراً در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی معرفی شده است و به ادغام حسگرها، شاخص‌ها یا کدهای QR^۲ در سیستم بسته‌بندی برای نظارت و انتقال اطلاعات مربوط به وضعیت محصولات، مانند تازگی، کیفیت و قابلیت ردیابی، اشاره دارد. در واقع،

توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...

بسته‌بندی هوشمند بر قابلیت تشخیص یا نظارت بر ویژگی‌های خاص محصول غذایی، محیط داخلی بسته‌بندی یا شرایط حمل و نقل تمرکز دارد (۶). بسته‌بندی هوشمند امکان ردیابی سریع وضعیت محصول را فراهم می‌کند و داده‌های ارزشمندی در مورد عواملی مانند دما، رطوبت و وجود آلاینده‌ها ارائه می‌دهند و در نتیجه توانایی ارزیابی و اطمینان از یکپارچگی محصول در سراسر زنجیره تأمین مواد غذایی را افزایش می‌دهند (۷). در میان شاخص‌های گزارش شده، شاخص تازگی به دلیل سادگی فرآیند و سهولت ارتباط با مصرف‌کننده برجسته شده‌اند. در واقع شاخص تازگی، برای نظارت و اطلاع‌رسانی کیفیت محصولات غذایی در طول ذخیره‌سازی و حمل و نقل با تشخیص رشد میکروبی و تغییرات شیمیایی طراحی شده است (۸). این شاخص‌ها با محصولات جانبی حاصل از فعالیت میکروبی تعامل دارند و نشانه‌های بصری در مورد کیفیت میکروبی محصول ارائه می‌دهند. در بیشتر موارد، شاخص‌های تازگی به استفاده از ترکیباتی مانند آنتوسیانین‌ها، رنگ‌های مصنوعی و طبیعی متکی هستند که به تغییرات pH ناشی از تخریب محصول حساس هستند و منجر به تغییر قابل مشاهده در رنگ شاخص می‌شوند (۶). با این حال، رنگ‌های مصنوعی (مانند بروموکرزول بنفش، بروموتیمول آبی، بروموکرزول سبز، متیل قرمز، کرزول قرمز، زایلنول و کلروفنول) به دلیل اثرات سمی و سرطان‌زای آنها بر سلامت انسان برای استفاده در مواد غذایی مناسب نیستند (۹). از این رو، محققان به دنبال جایگزینی رنگ‌های مصنوعی با جایگزین‌های طبیعی مناسب هستند. انواع رنگدانه‌های طبیعی مانند شیکونین^۳ (۱۰)، آلیزارین، (۱۱) بتالائین (۱۲)، کورکومین (۱۳)، آنتوسیانین‌ها (۸) و بسیاری دیگر می‌توانند تحت تاثیر تغییرات pH تغییر رنگ دهند. در میان آنها، آلیزارین (C₁₄H₈O₄) یک رنگدانه قرمز است که از ریشه گیاهان

¹ Centers for Disease Control and Prevention

² Quick Response

³ Shikonin

منابع زیستی و ژنتیکی واقع در تهران، ایران تهیه شدند. همچنین تمام ترکیبات شیمیایی مورد نیاز از شرکت Merck (آلمان) و محیط‌های کشت مورد نیاز از شرکت Q-Lab (کانادا) خریداری شدند.

استخراج رنگدانه آلیزارین از ریشه گیاه روناس:

پس از تمیزکردن ریشه گیاه و حذف ریشه‌های جانبی اضافی، به صورت جداگانه به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس درون آون (Memmert, Germany) خشک شدند. سپس این ریشه‌های خشک‌شده با استفاده از هاون پودر شدند. مقدار ۰/۱ میلی‌گرم از ریشه‌های پودر شده از فلاسک برداشته و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد جوشانده شد. پس از خنک شدن تا رسیدن به دمای اتاق، محلول از طریق فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر (MilliporeSigma, USA) فیلتر شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۳).

تهیه فیلم‌های نشانگر: فیلم‌های هوشمند با استفاده از روش ریخته‌گری محلول تهیه شدند. کیتوزان با اضافه کردن حجم از پیش تعیین‌شده‌ای از پودر کیتوزان (۲ گرم) به حجم مشخصی از محلول اسید استیک ۱ درصد (۱۰۰ میلی‌لیتر) تحت هم زدن مداوم (IKA, Germany) در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) در اسید استیک حل شد. سپس، گلیسرول به‌عنوان عامل نرم‌کننده (پلاستی‌سایزر) به میزان ۰/۷۵ درصد وزن کیتوزان به محلول اضافه گردید (۱۴). همچنین، محلول آلیزارین با غلظت ۳/۰ درصد (وزنی/حجمی) به‌صورت جداگانه در اتانول حل شد و پس از هم‌زدن کامل، به محلول پایه (کیتوزان و گلیسرول) اضافه گردید (۱۵).

تعیین غلظت آنتراکینون‌ها (آلیزارین) استخراج شده از ریشه گیاه روناس: غلظت آنتراکینون‌ها در ریشه‌ها از طریق آنالیز اسپکتروفتومتری با استفاده از اسپکتروفتومتر (Hitachi, Japan) تعیین شد. جذب عصاره‌های ریشه مستقیماً در طول موج ۴۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. سطح کل آنتراکینون‌ها با استفاده از ضریب جذب مولی آلیزارین (ε₄₃₄ = 5.5) تعیین و به صورت میلی‌گرم در هر گرم وزن

روناس (*Rubia tinctorum*) استخراج می‌شود یک ترکیب آنتراکینون با جایگزینی گروه -OH در موقعیت‌های ۱ و ۲، به عنوان یک شاخص رنگ‌سنجی یا pH در نظر گرفته شد که حساسیت بالایی به pH تغییرات و گاز NH₃ نشان می‌دهد و در شرایط اسیدی از زرد به قرمز و بالعکس در شرایط بازی تغییر رنگ می‌دهد. این طیف تغییرات رنگی، آلیزارین را به عنوان یک رنگ طبیعی برای ساخت نشانگر پیشنهاد می‌کند. همچنین آلیزارین خواص عملکردی مختلفی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص مسدودکننده اشعه ماوراء بنفش، همراه با افزایش آبگریزی و پایداری حرارتی هنگام افزودن به پلیمر کیتوزان از خود نشان می‌دهد (۹). ترکیب کیتوزان با آلیزارین، ضمن ارتقای خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری فیلم‌های بسته‌بندی، امکان طراحی سامانه‌های حساس به تغییرات pH را فراهم می‌سازد. این ویژگی، قابلیت تشخیص بصری فساد مواد غذایی را بدون نیاز به باز کردن بسته‌بندی فراهم کرده و گامی مؤثر در افزایش ایمنی مصرف‌کننده و کاهش ضایعات غذایی به‌شمار می‌رود. بنابراین این مطالعه ابتدا با هدف استخراج آلیزارین از ریشه گیاه روناس و تعیین غلظت آلیزارین استخراج شده انجام شد. در ادامه برهم-کنش آلیزارین با کیتوزان، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی-اکسیدانی، مورفولوژی سطحی فیلم و تغییرات رنگ در pH محدوده ۱ تا ۱۴ بررسی شد. از این رو، امید است این مطالعه بتواند رویکردی جدید در پیشرفت‌های بالقوه در بسته‌بندی هوشمند خوراکی مواد غذایی مبتنی بر کیتوزان را ارائه کند.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه: ریشه گیاه روناس در اواخر پاییز سال ۱۴۰۲ از شهرستان اراک (استان مرکزی، ایران)، کیتوزان از شرکت Sigma-Aldrich (آلمان)، تمام گونه‌ها باکتریایی *Escherichia coli* O157:H7 (IBRC-M 10698)، *Listeria monocytogenes* (IBRC-M 10671)، *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) و *Staphylococcus aureus* (IBRC-M 10690) توسط مرکز

خشک اندازه‌گیری شد (۱۳).

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR):

طیف‌های نمونه کامپوزیتی آسیاب شده FTIR با استفاده از یک طیف‌سنج (Shimatzo, Japan) FTIR برای مدت ۲۰ ساعت در محدوده طول موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ با وضوح 4 cm^{-1} تعیین شد (۱۶).

فعالیت ضد میکروبی فیلم هوشمند:

جهت فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های هوشمند از مهمترین پاتوژن‌های غذا زاد نظیر *Escherichia coli* O157:H7 و *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* و *Listeria monocytogenes* برای آزمایش استفاده شد. پاتوژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر دو بار در محیط کشت Brain Heart Infusion فعال شدند که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از آن، کلنی‌های رشد یافته بر روی آگارهای انتخابی مختلف (شامل EMB aga برای *E.Coli*، XLD برای *S. typhimurium*، *Listeria Oxford Agar*، *S. typhimurium* برای *L. monocytogenes* و Baird Parker Agar همراه با تلوریت زرده تخم مرغ برای *S. aureus*) جدا شدند و به لوله‌های آزمایش حاوی ۵/۰ میلی لیتر محلول نمک استریل در ۰/۸۵ درصد (مول/حجم) منتقل شدند. کدورت با محلول سولفات باریم استاندارد (استاندارد نیم مک فارلند برابر با غلظت $8 \log \text{CFU/mL}$) مقایسه شد (۱۷).

تعیین قطر هاله عدم رشد: برای تعیین فعالیت ضد

میکروبی فیلم کیتوزان و فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین در برابر باکتری‌های مورد بررسی، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. دیسک‌ها به قطعات ۱۰/۰ میلی‌متری بریده شدند و پس از آغشته شدن به نانوامولسیون‌ها (۰/۸، ۰/۴، ۰/۱۶، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱/۰ و ۱/۱ میلی گرم/میلی لیتر) روی پلیت‌های *Mueller Hinton Broth*

که قبلاً با کلنی‌های $10^8 \times 1.5 \text{ CFU/mL}$ پاتوژن‌ها آغشته شده بود، قرار داده شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (۱۸).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)^۱ و حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۲: MIC برای هر پاتوژن به روش میکرودیوژن تعیین شد. برای این منظور، عصاره نانوامولسیون عصاره در محلول ۴ درصد دی متیل سولفوکسید^۳ رقیق و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت درون ۱۰ لوله آزمایش در غلظت‌های (۰، ۰/۱۹، ۰/۳۹، ۰/۷۸، ۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵۰ و ۰/۵۰ میلی گرم/میلی لیتر) ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به طور جداگانه تلقیح شد. سپس در پلیت‌های چندخانه به دقت مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری (شیماز - ایران) شدند. پایین‌ترین غلظت مهار رشد میکروارگانیسم‌ها به عنوان MIC گزارش شد. جهت تعیین میزان MBC، از هر چاهک به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط کشت *Mueller Hinton Agar* کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد. پایین‌ترین غلظت کشنده کامل میکروارگانیسم‌ها (کاهش ۹۹/۹ درصدی در $\log \text{CFU/mL}$) به عنوان MBC گزارش شد (۱۹).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم هوشمند: برای ارزیابی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های فیلم از روش‌های ABTS [۲،۲'-آزینو-بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید)] و DPPH (رادیکال ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) استفاده شد (۲۰). فعالیت آنتی‌اکسیدانی آلیزارین و اسید آسکوربیک در غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و ۱/۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای مقایسه تعیین شد. محلول ۷ میلی‌مولار ABTS و سولفات پتاسیم

¹ Minimum Inhibitory Concentration

² Minimum Bactericidal Concentration

³ Dimethyl sulfoxide

پوشش داده شدند، نهایتاً نمونه‌ها به محفظه میکروسکوپ الکترونی جهت بمباران الکترونی انتقال یافت و مورفولوژی ذرات کامپوزیت با ولتاژ ۵/۰ کیلوولت بررسی شد (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده در آزمایشات، برای داده‌های تجربی (آزمایشی) به صورت میانگین \pm انحراف معیار در سه بار تکرار بیان شدند. داده‌های آزمایشات با تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایسه و تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها (در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار باشد) با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین شد. نتایج آزمون‌های آماری به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ برای مقایسه داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

بر اساس قانون Beer-Lambert، جذب نوری در طول موج ۴۳۴ نانومتر مستقیماً با غلظت آلیزارین آزاد در نمونه مرتبط است. در این مطالعه، با استفاده از ضریب جذب مولی $\epsilon = 5/5$ و طول مسیر نور ۱/۰ سانتی‌متر، غلظت آلیزارین از طریق اندازه‌گیری جذب در این طول موج محاسبه شد (شکل ۱). بر این اساس غلظت آلیزارین استخراج شده برابر با ۳/۴۳ میلی‌گرم/گرم وزن خشک بود.

برهمکنش بین مولکولی کیتوزان و آلیزارین در ماتریس فیلم با استفاده از FTIR بررسی شد و نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.

برای دستیابی به غلظت نهایی ۲/۵۴ میلی‌مولار مخلوط شدند، به مدت ۱۶ ساعت در مکانی تاریک انکوبه شدند و سپس با آب مقطر رقیق شدند تا جذب نوری ۱ در طول موج ۷۳۴ نانومتر برای تهیه محلول ABTS به دست آید. محلول DPPH (۰/۰۰۴ درصد وزنی/حجمی متانول) نیز با حل کردن DPPH در متانول تهیه شد. نمونه‌های آزمایشی (آلیزارین و اسید آسکوربیک در غلظت‌های مختلف و ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه فیلم) با ۱۰ میلی‌لیتر محلول‌های ABTS یا DPPH مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک انکوبه شدند. به عنوان شاهد، از محلول‌های ABTS و DPPH بدون نمونه‌های آزمایشی با همان روش استفاده شد. سپس جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-visible در طول موج‌های ۷۳۴ و ۵۱۷ نانومتر به ترتیب برای آنالیز ABTS و DPPH اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها از رابطه (۱) محاسبه شد:

رابطه (۱)

$$I\% = (A \text{ control} - A \text{ sample}) / A \text{ control} \times 100$$

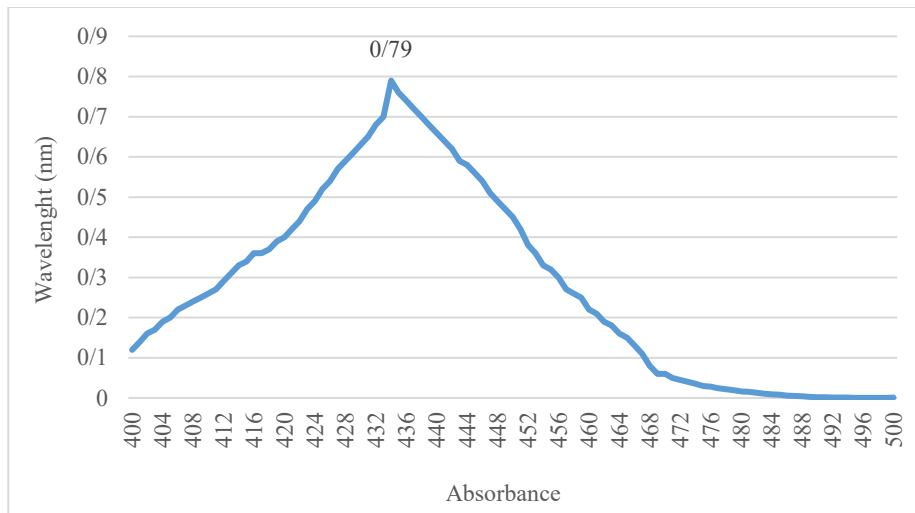
تعیین پاسخ تغییرات رنگ فیلم‌ها: توسط محلول‌های بافری در pH های ۱ تا ۱۴ انجام شد. بدین ترتیب که فیلم‌ها در ابعاد ۲ × ۲ سانتی‌متر تهیه و در محلول‌های بافر غوطه‌ور شد و تغییر رنگ ملاحظه شده و گزارش گردید (۲۱).

بررسی مورفولوژی فیلم‌ها با میکروسکوپ الکترونی: فیلم‌های بسته‌بندی تولید شده در ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر درون حلال گلوتر آلدئید^۱ و استونیتریل^۲ به خوبی حل شدند، بعد از تبخیر حلال با لایه نازکی از طلا

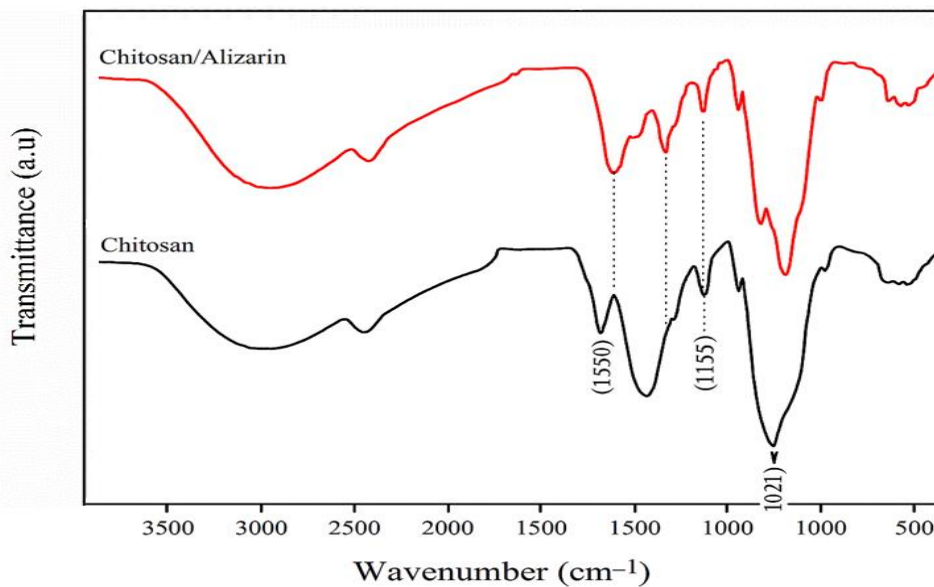
¹ Glutaraldehyde

² Acetonitrile

توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...



شکل ۱- طیف جذب آلیزارین استخراج‌شده از عصاره ریشه‌ی روناس



شکل ۲- طیف‌های FTIR کیتوزان و فیلم‌های کامپوزیت کیتوزان/آلیزارین

سبب افزایش فعالیت باکتریواستاتیک و باکتری‌سیدال فیلم‌های هوشمند شد ($p < 0.05$). همچنین بررسی نتایج قطر هاله عدم رشد نمونه های فیلم نیز نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین بود ($p < 0.05$). در مقایسه بین پاتوژن ها، باکتری های گرم مثبت حساسیت بیشتری به فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین نشان دادند ($p < 0.05$).

نتایج فعالیت ضد میکروبی فیلم های بسته بندی فعال بر باکتری های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) و *Escherichia coli* و گرم منفی (*Listeria monocytogenes*) و *Salmonella typhimurium* در جدول ۱ نشان داده شده است. مطابق نتایج فیلم کیتوزان خالص اثر باکتریواستاتیک (MIC) و باکتری‌سیدال (MBC) از خود نشان نداد ($p > 0.05$). در حالیکه افزودن آلیزارین به فیلم های فعال

جدول ۱- میانگین نتایج ضد میکروبی (log CFU/mL) نمونه‌های فیلم

تیما	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	
کیتوزان	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	MIC (mg/ml)
کیتوزان/آلیزارین	۵۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۱۶/۶۶ ± ۵/۸۹ ^a	۴۱/۶۶ ± ۱۱/۷۸ ^a	۳۳/۳۳ ± ۱۱/۷۸ ^a	
کیتوزان	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	MBC (mg/ml)
کیتوزان/آلیزارین	۶۶/۶۶ ± ۲۳/۵۷ ^a	۲۵/۰۰ ± ۲۳/۵۷ ^a	۵۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۴۱/۶۶ ± ۱۱/۷۸ ^a	
کیتوزان	۰/۵۰ ± ۰/۴۷ ^b	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۵۰ ± ۰/۴۷ ^b	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ ^b	قطر ماله عدم رشد (mm)
کیتوزان/آلیزارین	۸/۳۳ ± ۰/۴۷ ^a	۹/۶۶ ± ۵/۸۹ ^a	۸/۶۶ ± ۰/۴۷ ^a	۹/۳۳ ± ۰/۴۷ ^a	

*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (p<0.05).

مطابق نتایج ادغام آلیزارین در ماتریس فیلم کیتوزان بطور معناداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد (p<0.05).

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و ABTS نمونه‌های فیلم کیتوزان و فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- میانگین نتایج آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های فیلم

تیما	DPPH (mg/ml)	ABTS (mg/ml)
کیتوزان	۱۳/۱۵ ± ۰/۱۰ ^a	۹/۷۹ ± ۰/۲۴ ^a
کیتوزان/آلیزارین	۲/۴۳ ± ۰/۰۲ ^a	۱/۸۸ ± ۰/۰۲ ^b

*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (p<0.05).

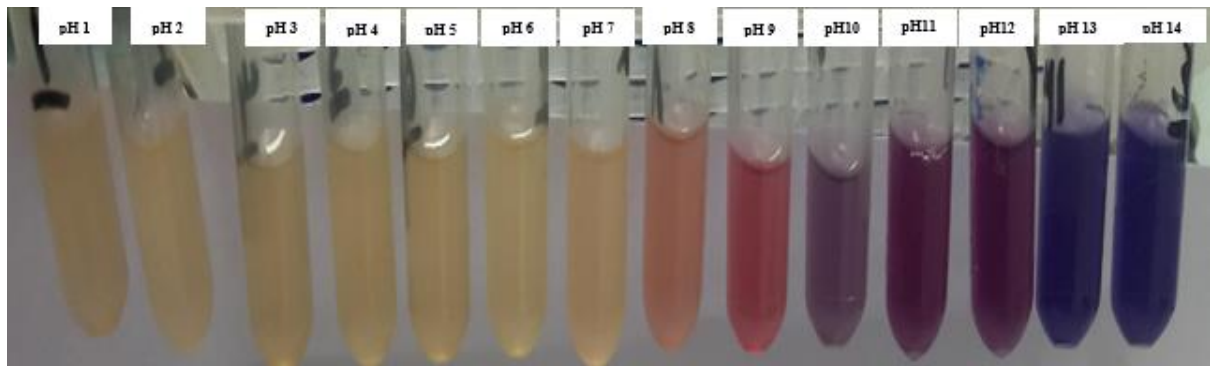
طور معنی‌داری افزایش و سپس با افزایش pH تا ۱۴ به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<0.05). همچنین نشان داده شد با افزایش pH تا ۴، b* (شاخص زردی-سبزی) فیلم هوشمند به طور معنی‌داری افزایش یافت و با افزایش pH تا ۱۴ شاخص b* فیلم هوشمند به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<0.05). نتایج *a* (شاخص قرمزی-آبی) نیز روند مشابهی با روند b* داشت.

نتایج تغییر رنگ فیلم‌های هوشمند کیتوزان/آلیزارین در pH های مختلف در جدول ۳ و مشاهده بصری تغییرات رنگ در تصویر نشان داد که با تغییرات pH از ۱ تا ۱۴ رنگ آن‌ها از کمی زرد به بنفش تغییر کرد بطوریکه در pH های اسیدی تا خنثی (۶)، به رنگ کرم تا زرد، در pH های قلیایی (۷-۱۴)، از گلبهی تا رنگ بنفش تغییر کرد. مطابق نتایج، L* (روشنایی) فیلم، با افزایش pH تا ۶، به

جدول ۳- میانگین نتایج تغییرات شاخص رنگی فیلم در pHهای مختلف

RGB Code	HEX Code	رنگ مشاهده شده	ΔE	b^*	a^*	L^*	
255, 215, 0	#FFD700	زرد	$41/29 \pm 0/79^e$	$26/01 \pm 1/03^b$	$6/01 \pm 0/43^e$	$46/55 \pm 0/57^b$	pH 2
255, 140, 0	#FF8C00	نارنجی	$39/71 \pm 0/26^d$	$30/39 \pm 0/36^a$	$7/39 \pm 0/26^d$	$51/58 \pm 0/62^a$	pH 4
255, 99, 71	#FF6347	قرمز روشن	$34/18 \pm 0/62^d$	$25/90 \pm 0/21^c$	$3/90 \pm 0/31^f$	$53/21 \pm 0/55^a$	pH 6
255, 105, 180	#FF69B4	صورتی مایل به قرمز	$45/45 \pm 0/69^c$	$20/90 \pm 0/49^d$	$21/56 \pm 0/61^a$	$41/8 \pm 0/59^c$	pH 8
218, 112, 214	#DA70D6	صورتی مایل به بنفش	$59/54 \pm 0/50^b$	$-13/01 \pm 0/38^e$	$17/26 \pm 0/82^b$	$22/75 \pm 1/01^d$	pH 10
128, 0, 128	#800080	بنفش مایل به آبی	$72/80 \pm 0/75^a$	$-16/83 \pm 0/38^f$	$21/19 \pm 0/53^a$	$10/26 \pm 0/22^e$	pH 12

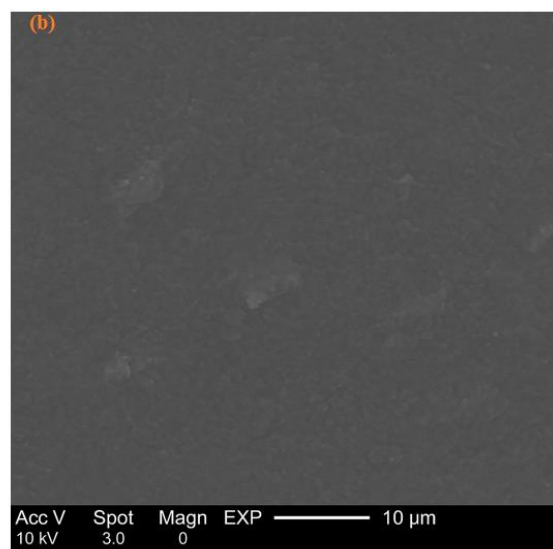
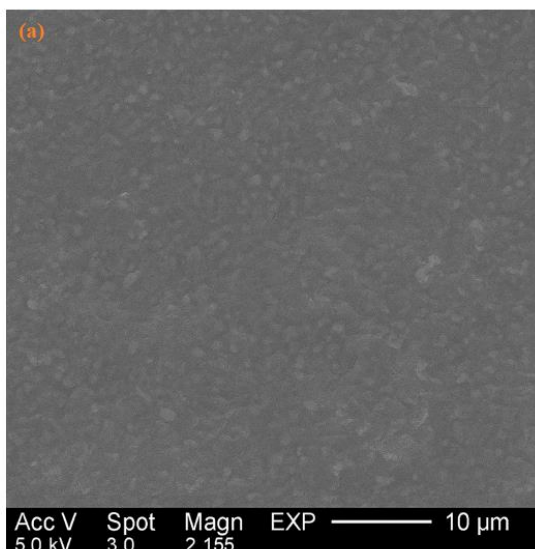
*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($P < 0.05$).



تصویر ۱- تغییر رنگ فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین با تغییرات pH=1-14

۲- مشاهده می‌شود، سطح صافی در فیلم بدون آلیزارین مشاهده شد، در حالی که فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین ساختار ناهمگنی داشت (تصویر ۲-ب).

تصاویر SEM از فیلم کیتوزان قبل و بعد از افزودن آلیزارین به فیلم در تصویر ۲ (a-b) با بزرگنمایی ۱۰ میکرومتر نشان داده شده است. همانطور که در تصویر



تصویر ۲- تصاویر SEM فیلم (a) کیتوزان، (b) کیتوزان/آلیزارین

بحث و نتیجه گیری

آلیزارین (C₁₄H₈O₄) یا ۱،۲-دی هیدروکسی آنتراکینون) یک رنگدانه آلی متعلق به خانواده آنتراکینون‌ها با ساختار والدی ۹،۱۰-آنتراسن‌دیون و دو گروه هیدروکسیل (OH⁻) مجاور در موقعیت‌های C-1 و C-2 است. آلیزارین به عنوان یک جزء فراوان از رنگ‌های قرمز استخراج شده از گیاهان خانواده Rubiaceae شناخته شده است (۲۳). روش اسپکتروفتومتری به عنوان یک روش سریع، دقیق و قابل تکرار برای تعیین کمی آنتراکینون‌ها معرفی شده است. بنابراین در این مطالعه، غلظت کل آنتراکینون‌ها در عصاره‌ی ریشه‌ی گیاه روناس با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر و ضریب جذب مولی آلیزارین ($\epsilon = 5.5 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) به صورت دقیق تعیین شد. نتایج نشان دادند که پیک جذب در این طول موج به طور اختصاصی مربوط به آلیزارین آزاد بوده و سایر ترکیبات مانند پورپورین و روبیادین تأثیر ناچیزی در این ناحیه دارند، که این موضوع دقت روش را افزایش می‌دهد (۲۳). در این مطالعه از حلال اتانول جهت استخراج آلیزارین استفاده شد. طبق مطالعات، حلال بیشترین اهمیت در استخراج آلیزارین را داد. حلال‌های اتانول و متانول، حلالی‌های انتخابی جهت استخراج آلیزارین از گیاه هستند. آلیزارین حاوی گروه‌های هیدروکسیل است که با سایر گروه‌های هیدروکسیل اتانول و متانول پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند و در نتیجه افزایش بازیابی آلیزارین را سبب می‌شوند (۲۴). همچنین تأثیر دما بر بازیابی آلیزارین نیز گزارش شده است. در این مطالعه دمای استخراج ۸۰ درجه سلسیوس بود. بطور کلی دما از دو طریق بر استخراج تأثیر می‌گذارد: ویسکوزیته حلال را کاهش داده و نفوذپذیری ترکیب را افزایش می‌دهد و در نتیجه راندمان استخراج را بهبود می‌بخشد (۲۴).

Derksen و همکاران (۲۰۰۴)، طی بررسی غلظت آنتراکینون‌های استخراجی از ریشه گونه‌های مختلف گیاه روناس به دو روش رفلکس گرم (با حلال اتانول و آب به نسبت ۱:۱) و روش غیر مستقیم با حلال

تتراهیدروفوران-آب نشان دادند غلظت آنتروکینون‌ها بین ۳/۲ تا ۵/۸ میلی گرم/وزن خشک ریشه گیاه بود (۲۶).
Abou Elmaaty و همکاران (۲۰۲۳)، طی بازیابی آلیزارین از ریشه گیاه روناس گزارش کردند دمای ۶۵ درجه سلسیوس، ۴۵ دقیقه و ۹ میلی‌لیتر در دقیقه جریان حلال بهینه شرایط بود و بازیابی آلیزارین در شرایط بهینه ۱/۳۴ گرم بر کیلوگرم بود (۲۵). باید توجه داشت که غلظت آنتراکینون‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مانند نوع خاک، زمان برداشت، و شرایط رشد گیاه قرار دارد (۲۴).

طی بررسی گروه‌های عاملی موجود در نمونه فیلم‌ها مشاهده شد، در طیف FTIR مربوط به فیلم کیتوزان خالص، باند کششی وسیع در ناحیه 3400 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات گروه‌های OH- و NH₂- است که نشان‌دهنده‌ی پیوندهای هیدروژنی قوی درون زنجیره‌ای و بین زنجیره‌ای بوده و نقش مؤثری در ساختار سه‌بعدی فیلم دارد (۲۶). حضور باند در ناحیه 1650 cm^{-1} به ارتعاشات C=O در گروه‌های آمیدی نسبت داده شده که احتمالاً ناشی از باقی‌مانده‌های N-acetyl پس از داستیل‌اسیون ناقص کیتوزان است (۲۷). پیک قابل مشاهده در حدود $1590-1550 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات خمشی گروه‌های آمینی اولیه می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی ماهیت پلی‌ساکاریدی کیتوزان و وجود گروه‌های فعال آمینی است (۲۸). همچنین، باندهای واقع در ناحیه $1150-1020 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات پیوندهای C-O-C و C-O در ساختار گلیکوزیدی کیتوزان می‌باشد که تأثیر قابل توجهی در رفتار جذب رطوبت و ساختار مولکولی فیلم دارند (۲۹).

در فیلم کیتوزان/آلیزارین، تغییرات قابل توجهی نسبت به کیتوزان خالص مشاهده شد که بیانگر تعامل بین اجزاء است. تشدید پیک در ناحیه $1580-1550 \text{ cm}^{-1}$ که به گروه‌های آمینی اولیه مربوط است، احتمالاً ناشی از تشکیل پیوندهای هیدروژنی یا الکترواستاتیک بین گروه‌های آمین کیتوزان و گروه‌های فنولی آلیزارین می‌باشد (۲۹). افزایش شدت پیک در ناحیه $1170-1150 \text{ cm}^{-1}$ نیز می‌تواند ناشی از حضور گروه‌های هیدروکسیل آلیزارین باشد که با ماتریس

توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...

هنگامی که آلیزارین در پلیمرهایی مانند کیتوزان یا سلولز ادغام می‌شود، می‌تواند خواص رهایش کنترل شده‌ای را ارائه دهد و عملکرد ضد میکروبی پایدار را در طول زمان تضمین کند. نشان داده شده است آلیزارین با کلاته کردن یون‌های کلسیم و اختلال در بیان ژن‌های بیماری‌زا، تشکیل بیوفیلم و تولید سموم را در باکتری‌های گرم‌مثبت مهار می‌کند. در باکتری‌های گرم‌منفی، به دلیل وجود غشای خارجی، اثر آن ضعیف‌تر است اما می‌تواند با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تغییر نفوذپذیری غشا، باعث آسیب سلولی شود (۳۴). همچنین فعالیت ضد میکروبی ذاتی کیتوزان ناشی از بار مثبت گروه‌های آمینی موجود در آن است که این گروه‌ها با غشاء میکروارگانیزم‌ها که دارای بار منفی هستند واکنش داده و منجر به نشت پروتئین و اجزاء درون سلولی میکروارگانیزم‌ها می‌گردد (۳۵). همراه با نتایج این مطالعه، Ezati و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند هنگامی که آلیزارین در فیلم کیتوزان گنجانده شد، نتایج ضد باکتریایی بسته به نوع باکتری متفاوت بود. فیلم کیتوزان/آلیزارین در مقایسه با فیلم کیتوزان خالص، اثربخشی ضد باکتریایی علیه *E. coli* را افزایش نداد، اما فعالیت بهبود یافته‌ای را علیه *L. monocytogenes* نشان داد. این محققان اثر ضدباکتریایی محدود مشاهده شده با آلیزارین را احتمالاً به دلیل غلظت کم آلیزارین (۱ درصد وزنی) اضافه شده به فیلم کیتوزان گزارش کردند (۱۵). El Tanahy (۲۰۲۲)، طی بررسی فعالیت ضد میکروبی آلیزارین بدست آمده از ریشه روناس در برابر *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumonia*، *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* را نشان دادند. علاوه بر این، حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین و نشان داده شد که حساس‌ترین ارگانیزم‌ها به عصاره آلیزارین، *Klebsiella pneumonia* بود (۳۶). تفاوت عملکرد ضد میکروبی فیلم‌ها در مورد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ساختار و شکل ظاهری این دو گروه باکتری مرتبط است. باکتری‌های گرم منفی یک غشای بیرونی پیچیده غنی از لیپوپلی ساکارید دارند که انتشار ترکیبات آبرگیر را

کیتوزان تعامل داشته و پیوندهای جدیدی ایجاد کرده‌اند (۳۰). تغییرات در ناحیه $1030-1020\text{ cm}^{-1}$ که به پیوندهای گلیکوزیدی مربوط است، حاکی از اثر ساختاری آلیزارین بر چیدمان زنجیره‌های گلوکز در کیتوزان بوده و ممکن است نشان‌دهنده‌ی تغییر در نظم فضایی پلیمر باشد (۲۶). همچنین، تغییرات در شدت باند وسیع 3400 cm^{-1} نشان‌دهنده‌ی برهم‌کنش‌های جدید بین گروه‌های OH- و NH₂- کیتوزان با گروه‌های هیدروکسیل آلیزارین باشد، که می‌تواند ساختار شبکه‌ی هیدروژنی فیلم را تحت تأثیر قرار دهد (۳۱).

بسته‌بندی هوشمند مبتنی بر آلیزارین با ترکیب رنگ در یک ماتریس پلیمری مناسب برای تولید فیلم‌هایی که قادر به نشان دادن تازگی محصولات فساد پذیر مثل گوشت و محصولات دریایی هستند، توسعه یافته است. رنگ آلیزارین را می‌توان در یک ماتریس پلیمری یا یک فیلم بیوپلیمری (مانند ژلاتین، کیتوزان، سلولز و غیره) ادغام نمود تا یک حسگر رنگ‌سنجی به عنوان بخشی از بسته‌بندی فراهم نماید (۳۲). فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های هوشمند و فیلم کیتوزان در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Listeria monocytogenes*) و گرم‌منفی (*Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium*) در جدول ۱ نشان دهنده عدم فعالیت باکترئواستاتیک و باکتریوسیدال فیلم کیتوزان بر پاتوژن‌های مورد بررسی بود. همچنین کمترین قطر هاله عدم رشد پاتوژن‌ها در مواجهه با فیلم کیتوزان مشاهده شد. درحالی‌که نتایج نشان داد ادغام آلیزارین در فیلم کیتوزان بطور معنادار فعالیت ضد میکروبی فیلم هوشمند در برابر پاتوژن‌های مورد بررسی را افزایش داد. به ترتیب پاتوژن‌های *Staphylococcus aureus* > *Listeria monocytogenes* > *Escherichia coli* > *Salmonella typhimurium* بیشترین حساسیت را به فیلم هوشمند داشتند. آلیزارین حاوی گروه‌های هیدروکسیل و کینون است که می‌تواند با دیواره‌های سلولی باکتری‌ها، پروتئین‌ها و DNA تعامل داشته باشند و رشد باکتری‌ها را مهار کنند (۳۳).

محدود می‌کند. با این حال، باکتریهای گرم مثبت دیواره پپتیدوگلیکان ضخیمی دارند که به اندازه کافی مترام نیست تا در برابر مولکول‌های ضد میکروبی کوچک مقاومت کند و امکان دسترسی به غشای سلولی را فراهم می‌کند (۳۷).

آنتی‌اکسیدان مولکولی است که اکسیداسیون را مهار می‌کند و در طی یک واکنش شیمیایی می‌تواند رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن^۱ (ROS) تولید کند (۳۳). نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها در جدول ۲ نشان داد فیلم کیتوزان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به هر دو روش DPPH و ABTS بود و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد فیلم کیتوزان در روش ABTS بیشتر از روش DPPH بود. مطالعات نشان داده کیتوزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ذاتی از خود نشان می‌دهد و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی استفاده شود. در واقع اثر آنتی‌اکسیدانی کیتوزان با وزن مولکولی، غلظت و ویسکوزیته آن نسبت مستقیم دارد (۳۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم کیتوزان به دلیل وجود یک گروه آمینو در موقعیت C-2 زنجیره‌های کیتوزان بود. گروه آمینو از شروع پراکسیداسیون لیپید از طریق کارایی کلات یون فلزی جلوگیری می‌کند (۳۹). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر فیلم کیتوزان در روش DPPH عمدتاً به دلیل کاهش مواجهه با گروه‌های آمینو بود که به دلیل نرخ تورم پایین بیوپلیمر در حلال متانول مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل، می‌باشد (۱۵). علاوه بر این نتایج نشان داد افزودن آلزارین در ماتریس فیلم کیتوزان بطورمعناداری سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه فیلم‌ها شد (جدول ۲). آلزارین، یک ترکیب آنتراکینون طبیعی، مانند سایر ترکیبات فنلی خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد. آلزارین ممکن است الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن را به رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیل و سوپراکسید منتقل کند، بنابراین

آنها را به مولکول‌های پایدار و غیر واکنشی تبدیل می‌کند. این امر آن را قادر می‌سازد تا رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد (۴۰). همچنین مطالعات نشان داده ستون اصلی آنتراکینون آلزارین، همراه با گروه‌های فنلی -OH، به مولکول اجازه می‌دهد تا الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن را به رادیکال‌های آزاد مانند هیدروکسیل، پراکسیل و سوپراکسید اهدا کند، عوامل فعال را از بین ببرد و استرس اکسیداتیو را کاهش دهد (۴۱). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم هوشمند حاوی آلزارین توسط مطالعات مختلف گزارش شده است. Ezati و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش مهارکنندگی رادیکال DPPH و ABTS فیلم کربوکسی متیل سلولز/آلزارین نسبت به نمونه سلولز خالص، به ترتیب از ۲۴/۱ به ۳۲/۵ درصد و از ۹/۳ به ۸۶/۷ درصد افزایش یافت (۴۲). همچنین Wu و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی کیتوزان و آلزارین به روش DPPH به ترتیب ۴۳/۳ و ۷۲/۸ درصد بود (۴۳).

حساسیت فیلم به pH و تغییر رنگ فیلم هوشمند کیتوزان/آلزارین در pH های مختلف ارزیابی شد (جدول ۳ و تصویر ۳). با افزایش pH، رنگ فیلم به طور قابل توجهی از زرد ملایم به بنفش تغییر کرد. فیلم در pH 4 کمی زرد، در pH 5 خاکی و با افزایش pH به 7 روشن تر شد. متعاقباً، تغییرات قرمزی قابل توجهی با افزایش pH از 7 به 9 مشاهده شد و سپس با افزایش قلیاییت، رنگ بنفش بسیار قابل توجهی ظاهر شد. تغییرات رنگ مشابه وابسته به pH در شاخص‌های کاغذ نشاسته حاوی آلزارین نیز مشاهده شده است (۳۲). مقدار روشنایی فیلم کیتوزان/آلزارین در pH 6 بیشترین مقدار را داشت و با افزایش pH کاهش یافت و کمترین مقدار در pH 12 بود. مقادیر مثبت b* تا pH 8 به دلیل افزایش رنگ زرد بود، در حالی که مقدار مثبت a* و مقدار منفی بالای b* در pH 10 به دلیل تغییر رنگ آلزارین به بنفش تیره در pH های بالا بود. به طور کلی، اگر

¹ Reactive oxygen species

توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...

بگذارد، به طوری که ولتاژ بالاتر (تصویر ۲-b) ممکن است جزئیات بیشتری از سطح را آشکار کرده باشد، هر چند ساختار کلی همچنان متراکم و یکنواخت باقی مانده است. در این مطالعه یک فیلم تغییر رنگ دهنده مبتنی بر کیتوزان و واکنش‌پذیر به pH که با آلیزارین ترکیب شده بود، برای کاربردهای بسته‌بندی فعال و هوشمند تهیه شد. غلظت آلیزارین آزاد استخراج‌شده از ریشه‌ی روناس برابر با ۳/۴۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد. نتایج SEM و FTIR نشان داد که آلیزارین به طور یکنواخت در ماتریس کیتوزان پراکنده شده و یک فیلم کامپوزیتی سازگار تشکیل داده است. فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین فعالیت ضدباکتریایی در برابر هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی نشان داد. فیلم هوشمند در پاسخ به تغییر pH در محدوده ۴ تا ۱۰، تغییر رنگ واضحی از زرد ملایم به بنفش نشان داد. علاوه بر این، فیلم تغییر رنگ متمایزی از خاکی به قهوه‌ای روشن نشان داد. در مجموع می‌توان گفت فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین با خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و تغییر رنگ واکنش‌پذیر به pH می‌تواند به عنوان یک سامانه بسته‌بندی فعال با قابلیت مهار رشد پاتوژن‌های غذازاد استفاده شوند. این عملکرد، به‌ویژه در صنایع بسته‌بندی مواد غذایی، می‌تواند نقش مهمی در افزایش ایمنی، کاهش فساد و ارتقاء کیفیت نگهداری داشته باشد. این عملکرد می‌تواند به‌ویژه در بسته‌بندی محصولات حساس مانند گوشت تازه یا ماهی، نقش مؤثری در افزایش ایمنی، کاهش فساد و ارتقاء کیفیت نگهداری ایفا کند. با این حال، برای تأیید اثربخشی آن در شرایط واقعی، انجام تحقیقات بیشتر در محیط‌های غذایی طبیعی پیشنهاد می‌شود.

تعارض منافع

این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافی برای نویسندگان ندارد.

اختلاف رنگ کل (ΔE) بیشتر از ۵ باشد، فرد می‌تواند تغییر رنگ را به صورت بصری درک کند (۴۴). تفاوت ΔE بین pH ۱۲ تا ۱۴ بیشترین مقدار است که نشان دهنده تفاوت قابل توجه در رنگ با چشم غیر مسلح است. ΔE می‌تواند به عنوان شاخصی از رنگ قابل تشخیص بصری با تغییر pH داخل محیط بسته‌بندی استفاده شود (۴۴). Ezati و همکاران (۲۰۱۹) تغییر رنگ آلیزارین را به دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی بین دو گروه هیدروکسیل و اتم‌های اکسیژن کربونیل، نسبت دادند (۴۵).

ریزساختار لایه‌های کیتوزان قبل و بعد از افزودن آلیزارین توسط SEM مشاهده شده است، همانطور که در تصویر ۲ نشان داده شده است. سطح لایه کیتوزان (تصویر ۲-a) فشرده و صاف و بدون ترک است که نشان دهنده شکل‌پذیری عالی لایه کیتوزان است. این ویژگی‌ها نشان می‌دهند که زنجیره‌های کیتوزان به‌خوبی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و ساختاری متراکم و بدون تخلخل قابل مشاهده ایجاد کرده‌اند که برای کاربردهای زیست‌پزشکی و بسته‌بندی بسیار مطلوب است (۴۶).

مورفولوژی مشابهی از لایه کیتوزان هنگام افزودن آلیزارین به لایه کیتوزان مشاهده شد که نشان دهنده سازگاری خوب بین کیتوزان و آلیزارین است. این به دلیل ساختار شیمیایی آلیزارین حاوی گروه‌های هیدروکسیل فنلی است که می‌توانند با گروه‌های هیدروکسیل کیتوزان تعامل داشته باشند و پیوندهای هیدروژنی تشکیل دهند. در نتیجه، همانطور که در نتایج SEM مشاهده شد، آلیزارین به طور یکنواخت در ماتریس کیتوزان، بدون ایجاد تخلخل یا ناهمگنی سطحی، توزیع و پراکنده شد که این موضوع نقش مهمی در حفظ خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری فیلم دارد. تفاوت در ولتاژ شتاب‌دهنده بین دو تصویر نیز می‌تواند بر وضوح و جزئیات سطحی تأثیر

References

- 1- Wagh RV, Priyadarshi R, Khan A, Riahi Z, Packialakshmi JS, Kumar P, Rindhe SN, Rhim JW. The Role of Active Packaging in the Defense Against Foodborne Pathogens with Particular Attention to Bacteriophages. *Microorganisms*. 2025 Feb 12;13(2):401.
- 2- Walsh TR, Gales AC, Laxminarayan R, Dodd PC. Antimicrobial resistance: addressing a global threat to humanity. *PLoS medicine*. 2023 Jul 3;20(7):e1004264.
- 3- CDC Four Steps to Food Safety-CDC. 2024. Available online: <https://www.cdc.gov/food-safety/prevention/index.html> (accessed on 1 December 2024).
- 4- Wagh RV, Ezati P, Khan A, Priyadarshi R, Rhim JW. Vaccinium corymbosum-Derived Carbon Dots and Anthocyanin-Infused Gelatin Multifunctional Films for Smart Packaging Applications. *Packaging Technology and Science*. 2024 Nov;37(11):1049-64.
- 5- Rindhe S, Khan A, Priyadarshi R, Chatli M, Wagh R, Kumbhar V, Wankar A, Rhim JW. Application of bacteriophages in biopolymer-based functional food packaging films. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2024 May;23(3):e13333.
- 6- Mkhari T, Adeyemi JO, Fawole OA. Recent Advances in the Fabrication of Intelligent Packaging for Food Preservation: A Review. *Processes*. 2025 Feb 14;13(2):539.
- 7- Ashiagbor K, Jayan H, Yosri N, Amaglo NK, Zou X, Guo Z. Advancements in SERS based systematic evolution of ligands by exponential enrichment for detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2024 Sep 23;141394.
- 8- Klaric SV, Galvão Maciel A, Arend GD, Tres MV, de Lima M, Soares LS. Application of Plant Extracts Rich in Anthocyanins in the Development of Intelligent Biodegradable Packaging: An Overview. *Processes*. 2025 Jan 11;13(1):191.
- 9- Khan A, Ezati P, Rhim JW. Alizarin: Prospects and sustainability for food safety and quality monitoring applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023 Mar 1;223:113169.
- 10- Madaan N, Oommen IE, Roy S. Development of Shikonin-Incorporated Biobased Intelligent Packaging Sensors for Enhanced Fresh Produce Quality Monitoring and Preservation. *ACS Food Science & Technology*. 2025 May 20;5(6):2021-35.
- 11- He J, Peng Q, Wang J, Deng J, Li W, Lin Q, Zhong F, Xia X. An intelligent thymol/alizarin-loaded polycaprolactone/gelatin/zein nanofibrous film with pH-responsive and antibacterial properties for shrimp freshness monitoring and preservation. *Food Chemistry*. 2025 Apr 15;471:142812.
- 12- Sathianathan RV, Joseph J, Raveena R, Ilanthendral K. Intelligent packaging film fortified with betacyanin for prolonging rice cake freshness. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2025 Feb 7:1-7.
- 13- Gnanaraj M, Sivamaruthi BS, Mohamed SS, Sisubalan N, Basha MH, Chaiyasut C. Optimization of conditions to achieve a high content of alizarin and purpurin in the adventitious roots of *Rubia cordifolia* L. 2024 Mar. 2024:1-9.
- 14- Soleymani Najafabadi M, Shakerian A, Mashak Z, Rahimi E. Production of Smart Packaging Chitosan Films Utilizing *Malva sylvestris* Mucilage and *Rubia tinctorum* Extract for Enhancing Fish Freshness and Prolonging Shelf Life. *Journal of Food Biochemistry*. 2024;2024(1):7275427.
- 15- Ezati P, Rhim JW. pH-responsive chitosan-based film incorporated with alizarin for intelligent packaging applications. *Food Hydrocolloids*. 2020 May 1;102:105629.
- 16- Lee MH, Kim SY, Park HJ. Effect of halloysite nanoclay on the physical, mechanical, and antioxidant properties of chitosan films incorporated with clove essential oil. *Food Hydrocolloids*. 2018 Nov 1;84:58-67.
- 17- da Silva BD, do Rosário DK, Neto LT, Lelis CA, Conte-Junior CA. Antioxidant, antibacterial and antibiofilm activity of nanoemulsion-based natural compound delivery systems compared with non-nanoemulsified versions. *Foods*. 2023 May 6;12(9):1901.
- 18- Ansarifard E, Moradinezhad F. Encapsulation of thyme essential oil using electrospun zein fiber for strawberry preservation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2022 Jan 13;9(1):2.
- 19- El Hamdaoui A, Msanda F, Boubaker H, Leach D, Bombarda I, Vanlout P, El Aouad N, Abbad A, Boudyach EH, Achemchem F, Elmoslih A. Essential oil composition, antioxidant and antibacterial activities of wild and cultivated *Lavandula mairei* Humbert. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2018 Feb 1;76:1-7.

- 20- Roy S, Rhim JW.** Agar-based antioxidant composite films incorporated with melanin nanoparticles. *Food Hydrocolloids*. 2019 Sep 1;94:391-8.
- 21- Vo TV, Dang TH, Chen BH.** Synthesis of intelligent pH indicative films from chitosan/poly (vinyl alcohol)/anthocyanin extracted from red cabbage. *Polymers*. 2019 Jun 26;11(7):1088.
- 22- Liang T, Wang H, Shu Y, Khan S, Li C, Zhang Z.** An intelligent film based on self-assembly of funoran and *Ophiopogon japonicus* seed anthocyanins and its application in monitoring protein rich food freshness. *Food Control*. 2024 May 1;159:110300.
- 23- Do KL, Mushtaq A, Zhao F, Su M.** Alizarin old and new: Extraction techniques for coloration, advances in detection methods for historical textiles and novel applications as a functional dye. *Coloration Technology*. 2024 Feb;140(1):5-29.
- 24- Anouar EH, Osman CP, Weber JF, Ismail NH.** UV/Visible spectra of a series of natural and synthesised anthraquinones: experimental and quantum chemical approaches. SpringerPlus. 2014 May 8;3(1):233.
- 25- Abou Elmaaty T, Sayed-Ahmed K, Magdi M, Elsisy H.** An eco-friendly method of extracting alizarin from *Rubia tinctorum* roots under supercritical carbon dioxide and its application to wool dyeing. *Scientific Reports*. 2023 Jan 2;13(1):30.
- 26- Derksen GC, Lelyveld GP, van Beek TA, Capelle A, de Groot AE.** Two validated HPLC methods for the quantification of alizarin and other anthraquinones in *Rubia tinctorum* cultivars. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2004 Nov;15(6):397-406.
- 27- Machatová Z, Barbieriková Z, Poliak P, Jančovičová V, Lukeš V, Brezová V.** Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV/vis spectroscopy. *Dyes and Pigments*. 2016 Sep 1;132:79-93.
- 28- Rhim JW, Hong SI, Park HM, Ng PK.** Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006 Aug 9;54(16):5814-22.
- 29- Ghanem SN, Marzouk MI, Tawfik ME, Eskander SB.** Spectroscopic approaches for structural analysis of extracted chitosan generated from chitin deacetylated for escalated periods. *BMC chemistry*. 2025 Jul 16;19(1):214.
- 30- Duraisamy P, Vinod AR.** Extraction, characterization, antimicrobial activity of chitosan extracted from crab shell and preparation of chitosan-based bioplastic film for food packaging. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2022 Feb 28;13(01):263-8.
- 31- Rinaudo M.** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*. 2006 Jul 1;31(7):603-32.
- 32- Ezati P, Tajik H, Moradi M, Molaei R.** Intelligent pH-sensitive indicator based on starch-cellulose and alizarin dye to track freshness of rainbow trout fillet. *International journal of biological macromolecules*. 2019 Jul 1;132:157-65.
- 33- Gam S, Kalita P, Gogoi B, Bora NS, Roy S.** A review on alizarin-added bio-based smart meat packaging sensors. *Materials Research Express*. 2025 Jun 1.
- 34- Li R, Zhuang D, Feng H, Wang S, Zhu J.** Novel “all-in-one” multifunctional gelatin-based film for beef freshness maintaining and monitoring. *Food Chemistry*. 2023 Aug 30;418:136003.
- 35- Chang SY, Lai HM.** Effect of trisodium citrate on swelling property and structure of cationic starch thin film. *Food Hydrocolloids*. 2016 May 1;56:254-65.
- 36- El Tanahy AH.** Antibacterial activity of *Rubia tinctorum* extracts. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2022 Apr 1;6(2):23-8.
- 37- Azhdarzadeh F, Hojjati M.** Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and food in health and disease*. 2016 Feb 10;3(1):43-50.
- 38- Muthu M, Gopal J, Chun S, Devadoss AJ, Hasan N, Sivanesan I.** Crustacean waste-derived chitosan: Antioxidant properties and future perspective. *Antioxidants*. 2021 Feb 3;10(2):228.
- 39- Muñoz-Tebar N, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J, Viuda-Martos M.** Chitosan edible films and coatings with added bioactive compounds: Antibacterial and antioxidant properties and their application to food products: A review. *Polymers*. 2023 Jan 12;15(2):396.
- 40- Sani MA, Zhang W, Abedini A, Khezerlou A, Shariatifar N, Assadpour E, Zhang F, Jafari SM.** Intelligent packaging systems for the quality and safety monitoring of meat products: From lab scale to industrialization. *Food Control*. 2024 Jun 1;160:110359.
- 41- Zhao L, Zheng L.** A Review on Bioactive Anthraquinone and Derivatives as the Regulators for

ROS. *Molecules*. 2023 Dec 17;28(24):8139.

42- Ezati P, Rhim JW, Moradi M, Tajik H, Molaie R. CMC and CNF-based alizarin incorporated reversible pH-responsive color indicator films. *Carbohydrate polymers*. 2020 Oct 15;246:116614.

43- Wu Y, Ma Y, Gao Y, Liu Y, Gao C. Poly (lactic acid)-based pH responsive membrane combined with chitosan and alizarin for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022 Aug 1;214:348-59.

44- Ma Q, Liang T, Cao L, Wang L. Intelligent poly (vinyl alcohol)-chitosan nanoparticles-

mulberry extracts films capable of monitoring pH variations. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018 Mar 1;108:576-84.

45- Ezati P, Tajik H, Moradi M. Fabrication and characterization of alizarin colorimetric indicator based on cellulose-chitosan to monitor the freshness of minced beef. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019 Apr 15;285:519-28.

46- Shankar S, Rhim JW. Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films. *Food Hydrocolloids*. 2018 Sep 1;82:116-23.



Volume 8, Issue 4, Winter 2026, pages: 11-26

۲۶

Development and Performance Evaluation of Chitosan/Alizarin Film as a Smart Packaging with Antimicrobial, Antioxidant, and pH-Sensitive Properties

Meysam Soleymani Najafabadi¹, Amir Shakerian², Zohreh Mashak^{3*}
and Ebrahim Rahimi²

1- Department of Food Hygiene, Sha.C, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3- Department of Food Hygiene and Quality Control, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Correspondence author: email: mashak@kia.u.ac.ir

Receive: July 30, 2025; Revise: August 14, 2025; Accept: November 23, 2025

 [10.22034/nfv.m.2025.538094.1296](https://doi.org/10.22034/nfv.m.2025.538094.1296)

Abstract

pH-sensitive colorimetric indicator films are essential components of intelligent packaging systems. Alizarin, an organic dye with pH-responsive properties, has attracted attention as a visual indicator in intelligent packaging applications. Therefore, this study aimed to develop and evaluate the performance of an intelligent chitosan/alizarin film as an active packaging system with pH sensitivity, and to assess its antimicrobial and antioxidant activities. Alizarin was extracted from madder root with a molar absorptivity coefficient of $\epsilon = 5.5$ and a yield of 3.43 mg/g dry weight, and incorporated into chitosan films at a concentration of 3%. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), surface morphology (SEM), antimicrobial activity (MIC, MBC, and IZ) against foodborne pathogens including *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, and *L. monocytogenes*, antioxidant activity (DPPH and ABTS), and color changes of the intelligent film were measured at pH 1 to 14 were investigated. FTIR and SEM analyses revealed that interactions between the amino groups of chitosan and the aromatic structure of alizarin led to structural modifications and increased surface roughness of the film. The film exhibited significant antimicrobial activity in MIC, MBC, and inhibition zone tests, particularly against Gram-positive bacteria ($p < 0.05$). Additionally, DPPH and ABTS assays confirmed a significant enhancement in antioxidant activity ($p < 0.05$). The film's color response varied from yellow to purple across the pH range of 1 to 14, indicating high sensitivity to environmental changes. Overall, the chitosan/alizarin film, with its multifunctional properties—antimicrobial, antioxidant, and pH-responsive—represents a promising and practical candidate for the development of intelligent packaging systems to promote food safety.

Keywords: Alizarin, Chitosan, Antibacterial, Antioxidant, pH-sensitive, Smart Packaging



پایش سرولوژیک ویروس آنسفالومیلیت پرندگان در گله‌های مادر گوشتی مناطق شمالی ایران

زهرا ضیافتی کافی^۱، مصطفی نوید طالعی^۲، فرهاد قانع خشکبیجاری^۲، نسترن زیرانی گشتی^۲، آیداد جعفری صیادی^۲، آزاده محمدی نوده^۲، فرهنگ فقیه محمدی^۲، محمد عطایی^۲، آرش قلیان چی لنگرودی^{۱*}

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

۲- شرکت نوید مرغ، رشت.

نویسنده مسئول: آرش قلیان چی لنگرودی*

استاد گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۷۱۵۴

ایمیل: arashghalyanchi@gmail.com

نویسنده مسئول: ghalyana@ut.ac.ir

دریافت مقاله: ۲۹ مرداد ۱۴۰۴، بازنگری: ۵ دی ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۲۵ بهمن ۱۴۰۴

10.22034/nfvm.2026.541927.1298

چکیده

آنسفالومیلیت پرندگان یک بیماری ویروسی مهم در بین گله‌های مادر بوده که سبب علائمی همچون عدم تعادل، لرزش در ناحیه ی سر و گردن و در نهایت مرگ میشود. مطالعه‌ی سرولوژی حاضر به بررسی تیتراژ پادتن تولید شده پس از مصرف واکسن در ۳۷ گله مرغ مادر گوشتی در استان‌های شمال ایران میپردازد. ارزیابی سطح پادتن‌های تولید شده با استفاده از کیت الایزای شرکت ایدکس نشان داد که میانگین تیتراژ پادتن در هفته‌ی اول برابر با $1639 \pm 143/1$ بود. میانگین تیتراژ پادتن در کل گله‌های بررسی شده پیش از واکسیناسیون در سن ۹ هفته‌گی برابر با $254 \pm 48/2$ بود، که نشان میدهد گله‌ها فاقد پادتن محافظت‌کننده علیه آنسفالومیلیت پرندگان بودند. پس از واکسیناسیون، میانگین تیتراژ پادتن در سنین ۱۵ هفته‌گی و ۲۴ هفته‌گی به ترتیب برابر $4608 \pm 299/2$ و $3381 \pm 391/2$ اندازه گیری شد. همچنین بالاترین تیتراژ پادتن در گله‌های مادر در هفته ۷۷ ($6085 \pm 699/2$) مشاهده شد. همچنین مقایسه تیتراژ پادتن پس از واکسیناسیون، در برخی از گله‌ها با استفاده از دو کیت ایدکس و بیوچک، نشان داد که بین نتایج این دو کیت الایزای تجاری، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P \leq 0.0005$). این مطالعه که با هدف بررسی روند دینامیک تیتراژ پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان در ایران انجام شد، و بعنوان نخستین پژوهش‌هایی محسوب میشود که این موضوع را در سنین مختلف و در قطب‌های پرورش مادر گوشتی مورد ارزیابی قرار داده است. نتایج این تحقیق می‌تواند به محققین و کلینیسین‌ها در حوزه طراحی برنامه واکسیناسیون موثر کمک نماید.

واژگان کلیدی: آنسفالومیلیت پرندگان، مادر گوشتی، ایران، الایزای پادتن

مقدمه

آنسفالومیلیت پرنندگان (AE) یک بیماری عفونی طیور است که عامل آن جنس ترمووایروس متعلق به خانواده‌ی پیکورناویریده است. ژنوم آن RNA تک‌ رشته‌ای سنس مثبت می‌باشد که در درجه اول جوجه‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد؛ اما بوقلمون، بلدرچین و گونه‌های دیگر پرنندگان نیز به‌عنوان میزبان طبیعی این ویروس گزارش شده‌اند (۱). ژنوم این ویروس کوتاه است و دارای یک چارچوب خوانش باز منفرد (ORF) است که یک پلی‌پروتئین بزرگ را رمزگذاری می‌کند (۲، ۳). در ویروس فلج اطفال و ویروس تب برفکی و بسیاری از جنس‌های خانواده‌ی پیکورناویریده، ناحیه‌ی PI کپسید با کاهش حدت، پایداری حرارتی و ویریون، تغییر دامنه میزبان، تروپیسم سلولی در شرایط آزمایشگاهی، عفونت پایدار و مورفولوژی پلاک مرتبط است. پروتئین VP1 مهم‌ترین پروتئین این ناحیه بوده و تولید اغلب جمعیت آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده‌ی ویروس را القا می‌کند (۴، ۵). آنسفالومیلیت پرنندگان، که «لرزش اپیدمی» در جوجه‌های جوان نیز نامیده می‌شود، اولین بار توسط جونز در سال ۱۹۳۲ توصیف شد (۶). آلودگی طیور به این ویروس عمدتاً از طریق مسیر مدفوعی-دهانی رخ می‌دهد (۳). ویروس می‌تواند به صورت عمودی (از طریق تخم مرغ) و به صورت افقی منتقل شود. انتقال عمودی زمانی اهمیت بیشتری می‌یابد که تخم مرغ‌ها آلوده شده باشند، در این حالت جوجه‌ها معمولاً در سنین بین یک تا چهارده روزگی علائمی همچون اتاکسی و لرزش را نشان می‌دهند و این امر می‌تواند منجر به افزایش تلفات در هفته‌های ابتدایی پرورش شود. این نوع انتقال اغلب به دلیل عدم رعایت اصول بهداشتی و ایمنی زیستی در دوره‌ی تولید و آلودگی تخم‌مرغ‌ها توسط پرورش دهندگان صورت می‌گیرد (۷، ۸). انتشار آلودگی از طریق بستر و یا مصرف خوراک و آب آلوده اتفاق می‌افتد (۹). این ویروس می‌تواند باعث افت تولید تخم‌مرغ در مرغ‌های مادر و کاهش جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار شود؛ با این حال، ویروس در آنها ایجاد نشانه‌های بالینی عصبی نمی‌کند و

پایش سرولوژیک ویروس آنسفالومیلیت پرنندگان...

پرنندگان مسن‌تر نشانه‌های عصبی پس از عفونت را نشان نمی‌دهند (۳، ۱۰). موج دوم این بیماری اغلب از حدود ۱۱ روز بعد آغاز می‌شود. نشانه‌های بالینی اغلب مرتبط با سن بوده، عمدتاً بصورت عصبی و متغیر هستند. تایید آن با روش‌های آزمایشگاهی مانند روش‌های مولکولی و یا الیزا انجام می‌شود. در جوجه‌های جوان مبتلا به این بیماری، ضایعات ماکروسکوپی به صورت مناطق رنگ‌پریده در ناحیه پروونتريکولوس (پیش‌معه) هستند. تشخیص احتمالی بر اساس نشانه‌های بالینی در جوجه‌ها و تشخیص قطعی بیماری، تنها با بررسی آزمایشگاهی امکان‌پذیر است (۱۱). ضایعات میکروسکوپی معمولاً در سیستم عصبی مرکزی مشاهده می‌شود. (۱۲). حضور پادتن‌های خنثی‌کننده علیه ویروس آنسفالومیلیت پرنندگان در سرم جوجه‌ها، به‌عنوان یک عامل اصلی محافظت در برابر این بیماری شناخته شده است (۱۳). پادتن‌های مادری موجود در کیسه زرده بین هفته‌های دوم و سوم پس از خروج جوجه از تخم، به طور کامل جذب می‌شوند (۱۴). بهترین راه برای پیشگیری و کنترل بیماری، واکسینه کردن گله‌های مولد در طول دوره‌ی پرورش، در محدوده‌ی ۱۲ تا ۱۵ هفتگی به منظور جلوگیری از عفونت گله مادر در طول دوره تولید و در نتیجه عدم انتقال ویروس به نتاج از طریق تخم مرغ است. حفاظت در برابر عفونت ویروسی در هفته‌های اول زندگی، زمانی که جوجه‌ها بیشتر مستعد ابتلا به ویروس هستند حائز اهمیت است (۱۵). آزمایش‌های سرمی پس از واکسیناسیون جهت اطمینان از تولید پادتن و ارزیابی تابلو، ایمنی گله انجام می‌شود. روش‌های مختلفی مانند خنثی‌سازی ویروس (VN)، ژل دفیوژن و الیزا جهت ارزیابی میزان ایمنی گله وجود دارند (۱۶). در این میان، روش الیزا به دلیل حساسیت، دقت و سهولت تفسیر روشی رایج برای ارزیابی سطح پادتن در گله‌ها محسوب می‌شود. این نکته حائز اهمیت است که تولید پادتن در بیماری AE در مقایسه با سایر بیماری‌ها کندتر بوده و معمولاً افزایش سطح پادتن تا سه هفته پس از واکسیناسیون به صورت معنی‌دار مشاهده نمی‌شود. تولید پادتن مادری و واکسیناسیون گله‌های مادر

طبق دستورالعمل شرکت سازنده در طول موج نوری ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. همچنین به منظور مقایسه تیتراژ پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان تعدادی از سرم‌های اخذ شده از گله‌های مختلف با سنین متفاوت به صورت تصادفی انتخاب و با کیت الایزای تجاری شرکت BioChek Avian Encephalomyelitis Virus Antibody Test مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی آماری

در این مطالعه برای بررسی داده‌های مربوط به تیتراژ پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان و پراکنش تیتراژها در گله‌ها در سنین مختلف از نسخه ۹ نرم‌افزار Graphpad prism استفاده شد. ابتدا با استفاده از آزمون آماری کولموگروف-اسمیرنوف (KS) نرمال بودن توزیع داده‌ها بررسی شد. پس از تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها، با استفاده از آزمون آماری ANOVA یکطرفه و سپس توسط آزمون تعقیبی LSD داده‌ها مورد بررسی آماری قرار گرفتند (سطح معنی داری ۰.۰۵ درصد).

نتایج

ارزیابی تیتراژ پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان با کیت الایزای تجاری ایدکس در سنین مختلف: از ۳۷ گله‌ی مرغ مادر گوشتی در استان‌های گیلان، قزوین و مازندران، تعداد ۱۰ نمونه سرم خون در هفته‌های ۱، ۹، ۱۵، ۲۴ و ۷۷ با کیت الایزای تجاری شرکت IDEXX علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین تیتراژ پادتن مادری علیه AE در گله‌های مادر مورد بررسی در هفته اول معادل ۱۴۳/۱ ± ۱۶۳۹ بود. همچنین میانگین تیتراژ پادتن در گله‌های مورد مطالعه در سن ۹ هفتگی (۳ هفته پیش از واکسیناسیون) برابر با ۴۸/۲ ± ۲۵۴ بود که برای محافظت از پرنده در برابر ابتلا به بیماری کفایت نمی‌کند و به عبارت دیگر گله‌های مورد بررسی در سن ۹ هفتگی فاقد پادتن محافظت‌کننده علیه AE بودند. انجام تست الایزا بر روی نمونه‌های سرم در سن ۱۵ هفتگی (۳ هفته پس از

نقش کلیدی در حفاظت جوجه‌ها در هفته‌های ابتدایی زندگی دارد لذا بررسی پاسخ ایمنی گله‌ها پس از واکسیناسیون اهمیت ویژه‌ای دارد.

بیشتر آزمایش‌های سرولوژی از جمله الایزا در شرایط فارمی معمولاً پیش از سه هفته بعد از واکسیناسیون انجام می‌شوند و همین ناآگاهی، سبب تفسیر نادرست نتایج الایزا در مورد تولید پادتن شده است. با مشاهده پاسخ‌های نسبتاً کند سیستم ایمنی پرندگان به واکسن AE، اکنون مشخص شده چنانچه پس از سه هفته متعاقب واکسیناسیون از روش الایزا جهت تعیین تیتراژ پادتن استفاده شود، نتایج می‌تواند برای گله بسیار مفید واقع شود (۸). با توجه به این که تاکنون در ایران مطالعه‌ی جامعی بر روی سرولوژی این در گله‌های مادر صورت نگرفته است؛ مطالعه حاضر با هدف بررسی نتایج آزمایش‌های سرمی، میزان تولید پادتن علیه ویروس AE بعد از واکسیناسیون، کارآمدی واکسن‌های مورد استفاده در مزارع مادر و پوشش واکسیناسیون در گله‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه در طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۲ تعداد ۳۷ مزرعه مختلف مرغ مادر گوشتی در استان‌های گیلان، قزوین و مازندران انتخاب شد. از هر گله در سنین ۱، ۹، ۱۵، ۲۴، و ۷۷ هفتگی، تعداد ۱۰ نمونه خون از بال پرندگان جمع آوری گردید. گله‌های مادر گوشتی مورد مطالعه، در سن ۱۰ تا ۱۲ هفتگی یک نوبت واکسن آنسفالومیلیت ساخت شرکت Merial را بصورت آشامیدنی دریافت نموده بودند.

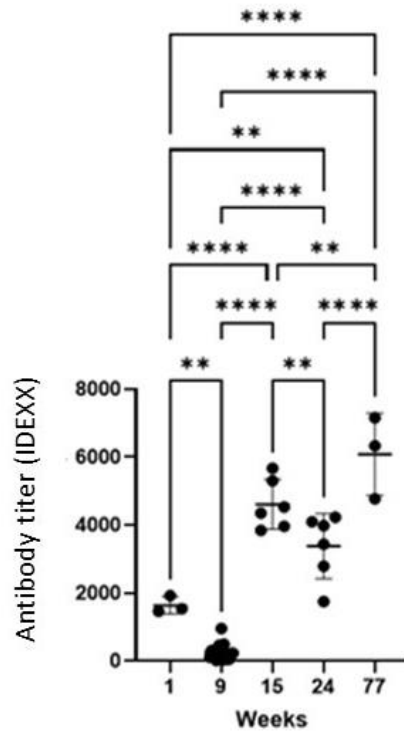
اندازه‌گیری تیتراژ پادتن علیه آنسفالومیلیت پرندگان:

در این مطالعه جهت سنجش پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان، از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد سرم در هر نوبت خونگیری جمع آوری شد. اندازه‌گیری پادتن با استفاده از کیت الایزای تجاری شرکت ایدکس IDEXX AE Ab Test ساخت ایالات متحده آمریکا و دستگاه الایزا ریدر ELX800 Biotek ساخت کشور ایالات متحده آمریکا، استفاده شد. در نهایت رنگ‌سنجی نمونه‌های سرم

پایش سرولوژیک ویروس آنسفالومیلیت پرندگان...

پادتن در سن ۷۷ هفتگی (پایان دوره تولید) در بالاترین سطح و برابر با $6058 \pm 699/2$ بود (شکل ۱). ارزیابی میانگین تیترا پادتن در تمام سنین با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($P \leq 0.0005$).

واکسیناسیون) در گله‌های مورد ارزیابی، نشان‌دهنده میانگین تیترا پادتن به میزان $299/2 \pm 4608$ بود. همچنین میانگین تیترا آنتی بادی در دوره ی تولید (سن ۲۴ هفته) برابر با $3381 \pm 391/2$ بود که کاهش معنی‌داری نسبت به ۱۵ هفتگی نشان داد. میانگین تیترا



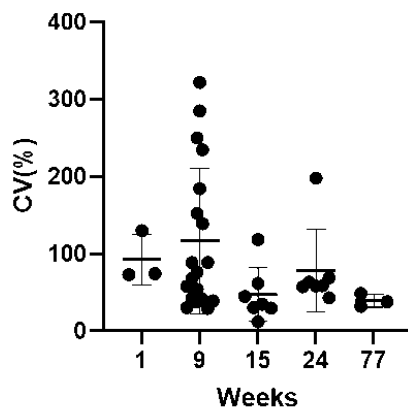
	1	9	15	24	77
Mean	1639	254.0	4608	3381	6085
Std. Deviation	247.9	215.6	732.8	958.2	1211
Std. Error of Mean	143.1	48.22	299.2	391.2	699.2

شکل ۱- میانگین تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان در گله‌های مادر گوشتی در سنین ۱، ۹، ۱۵، ۲۴، و ۷۷ هفته به روش الیزا با کیت تجاری شرکت ایدکس

ارزیابی پراکنش تیترا پادتن علیه ویروس انسفالومیلیت پرندگان با کیت الایزای تجاری ایدکس در سنین مختلف: بالاترین میزان پراکنش تیترا پادتن در طی دوره‌ی پرورش، پیش از واکسیناسیون، و در سن ۹ هفته‌گی بود که تیترا پادتن مادری در این زمان افت پیدا کرده و یا حتی به صفر رسیده بود (۱۷۷±۲۱/۶۳). پراکنش تیترا پادتن در سنین ۱۵ و ۲۴ هفته به ترتیب برابر با ۱۳/۱۸

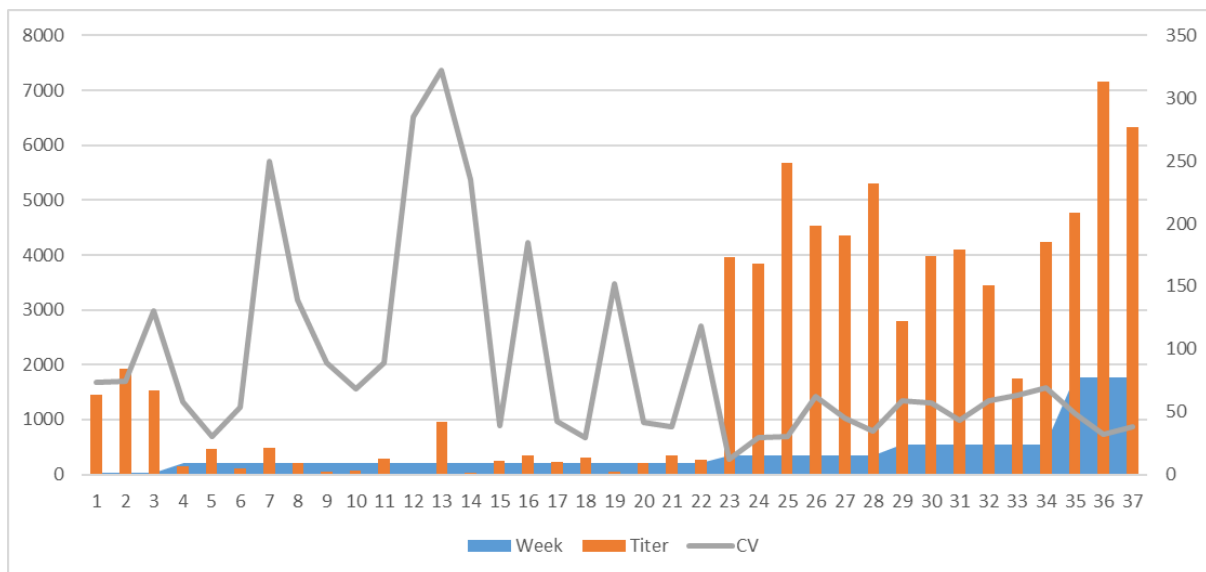
±۴۷/۴۶ و ۲۰/۱۷±۷۸/۳۴ بود. نتایج حاصل از تست الایزا نشان داد با واکسیناسیون و افزایش سن، پراکنش تیترا کاهش می‌یابد به طوری که میانگین پراکنش تیترا در هفته ۷۷ کمترین مقدار و برابر با ۳۹/۶۰±۴/۹۲ بود (شکل ۲).

میانگین تیترا پادتن، و پراکنش تیترا به تفکیک گله‌های مادر گوشتی در سنین ۱، ۹، ۱۵، ۲۴، و ۷۷ هفته‌گی در شکل شماره ۳ نشان داده می‌شود.



	1	9	15	24	77
Mean	92.73	117.0	47.46	78.34	39.60
Std. Deviation	32.54	94.28	34.87	53.36	8.514
Std. Error of Mean	18.79	21.63	13.18	20.17	4.915

شکل ۲- میزان پراکنش تیترا پادتن علیه ویروس انسفالومیلیت پرندگان با کیت الایزای ایدکس در گله‌های مادر گوشتی در هفته‌های مختلف

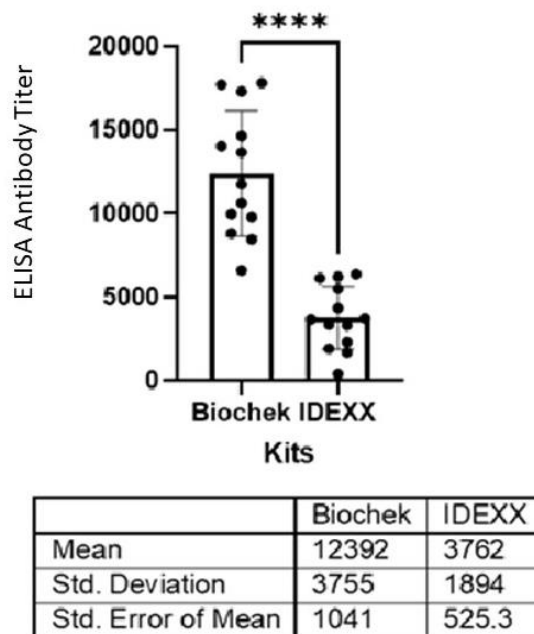


شکل ۳- نمودار ترکیبی میانگین تیترا پادتن، و پراکنش تیترا علیه ویروس انسفالومیلیت پرندگان به تفکیک در سنین مختلف ۱ تا ۷۷ هفته با کیت الایزای ایدکس به تفکیک در ۳۷ گله مادر گوشتی در هر سه استان

پایش سرولوژیک ویروس آنسفالومیلیت پرندگان...

تجاری نشان داد که میانگین تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان با کیت بیوچک برابر با 12392 ± 1041 و با کیت ایدکس برابر با 3762 ± 525.3 بود که نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در میزان تیترا پادتن، بین این دو کیت تجاری الیزا می‌باشد ($P \leq 0.0005$) (شکل ۴).

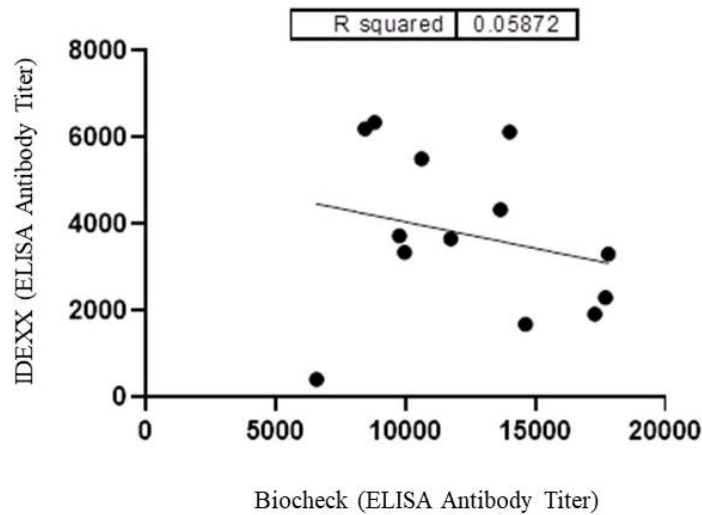
ارزیابی مقایسه میانگین تیترا پادتن در تعدادی از سرم‌های مورد مطالعه با هر دو کیت الیزای تجاری شرکت بیوچک و ایدکس: تعدادی از سرم‌های اخذ شده از مرغ مادر گوشتی در سنین و استان‌های مختلف با هر دو کیت الیزای تجاری شرکت بیوچک و ایدکس مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقایسه‌ی نتایج بررسی بین این دو کیت



شکل ۴- مقایسه تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان با دو کیت الیزای تجاری شرکت بیوچک و ایدکس در تعدادی از سرم‌های مورد مطالعه در هفته‌های پس از واکسیناسیون

مشترک این دو کیت در اندازه‌گیری تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان، تفاوت‌هایی در طراحی آنتی‌ژن، حساسیت آزمون، دامنه تشخیص و روش کالیبراسیون می‌تواند منجر به اختلاف در مقادیر تیترا پادتن اندازه‌گیری شده شود. بنابراین، نتایج به‌دست‌آمده بیانگر آن است که داده‌های حاصل از این دو کیت الزاماً قابل جایگزینی مستقیم نبوده و تفسیر آن‌ها باید در چارچوب هر کیت به‌صورت مستقل انجام گیرد.

همچنین میزان همبستگی نتایج تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان در این دو کیت الیزای تجاری $R = 0.58$ بود. شکل ۵ رابطه بین تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان در این دو کیت الیزای تجاری BioChek و IDEXX را در سرم‌های جمع‌آوری شده در هفته‌های پس از واکسیناسیون نشان می‌دهد. بر اساس این نمودار، همبستگی قوی و مشخصی بین نتایج حاصل از دو کیت مشاهده نشد. این موضوع نشان می‌دهد که علی‌رغم هدف



شکل ۵- میزان همبستگی دو کیت الایزای تجاری شرکت بیوچک و ایدکس در اندازه‌گیری پادتن علیه آنسفالمیلیت پرندگان در تعدادی از سرم‌های مورد مطالعه در هفته‌های پس از واکسیناسیون

بحث و نتیجه‌گیری

انسفالومیلیت پرندگان (AE) یک بیماری عفونی ویروسی است که بسیاری از گونه‌ها از جمله جوجه‌های جوان، قرقاول، بلدرچین و بوقلمون را درگیر می‌کند (۱۷). جوجه‌های جوان علائم عصبی از جمله آتاکسی، فلج و لرزش سر و گردن را نشان می‌دهند و دارای عوارض بالا و مرگ و میر متغیر هستند. در جوجه‌های بالغ، عفونت معمولاً تحت بالینی است، اگرچه با کاهش گذرا در تولید تخم و قابلیت جوجه ریزی همراه است (۱۸). انتقال عفونت ویروس عامل بیماری عموماً به صورت عمودی از طریق تخم مرغ‌های آلوده یا به صورت افقی از راه مدفوع-دهانی است (۱۹). واکسیناسیون یکی از بهترین راهکارهای ارائه شده جهت ایجاد ایمنی در گله‌های مادر و جلوگیری از ابتلا به ویروس آنسفالمیلیت پرندگان در جوجه‌ها است. علیرغم واکسیناسیون در گله‌های مادری، همچنان گزارشاتی مبنی بر ابتلا به این ویروس در ایران وجود دارد. اولین مطالعه‌ی مربوط به این ویروس در ایران توسط آقاخان و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام شد (۲۰).

درخشانفر و همکاران (۲۰۰۲) شیوع AE را در مزارع مرغ تخمگذار ایران گزارش کردند (۲۱). وقوع هم‌زمان AE و کمبود ویتامین A در یک گله مرغ گوشتی تجاری در ایران توسط عباس‌آبادی و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش گردید (۲۲). قرآنی و همکاران برای اولین بار در سال ۲۰۱۹ وقوع بیماری AE را در جوجه‌های گوشتی در ایران بر اساس روش مولکولی (RT-PCR) گزارش کردند (۲۳). اساسی و همکاران (۲۰۰۸) نیز بروز بیماری ناشی از این ویروس را در یک گله گوشتی ۱۲ تا ۱۸ روزه با تلفات ۵ درصد در سال براساس نشانه‌های بالینی، ضایعات هیستوپاتولوژی و افزایش تیتراژ پادتن گزارش نمودند (۲۴). مطالعات گذشته لزوم پایش سرمی در گله‌های مادر گوشتی و تخمگذار را نشان می‌دهد. تاکنون مطالعه‌ی جامعی از نظر سرولوژی در مورد این ویروس در گله‌های مرغ مادر گوشتی ایران صورت نگرفته است.

نایب تحقیق حاضر نشان داد که ۱۰۰٪ گله‌های مادر گوشتی در محدوده جغرافیایی مورد مطالعه، تا سن پیش از واکسن فاقد پادتن در سطح محافظت‌کننده علیه این

پایش سرولوژیک ویروس آنسفالومیلیت پرندگان...

آنسفالومیلیت پرندگان مثبت اعلام شد (۲۶). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Almedia و همکاران انجام شد، نمونه خون از ۲۰۰ مرغ بومی تهیه شد و با هدف بررسی گردش ویروسهای کم خونی جوجه، بورس عفونی، رئوویروس پرندگان و آنسفالومیلیت پرندگان مورد ارزیابی با روش الایزا و با استفاده از کیت الایزای شرکت ایدکس قرار گرفت. از بین نمونه‌های تهیه شده تعداد ۱۵۶ (۷۸٪) نمونه سرمی برای ویروس آنسفالومیلیت پرندگان Seroreactive گزارش شدند (۲۷). مرور مطالعات نسبتاً مشابه پیشین نشان میدهد که به صورت کلی میزان تولید پادتن در گله‌های مورد مطالعه با نتایج مطالعات پیشین هم خوانی دارد.

Smart و Grix (۱۹۸۵) استفاده از آزمون الایزا جهت تشخیص بیماری آنسفالومیلیت پرندگان را ابداع و وجود رابطه خطی مناسبی را بین آن با آزمون‌های خنثی‌سازی سرم و حساسیت جنین اثبات نمودند (۱۶). همچنین Smart و Grix (۱۹۸۶) در مطالعه‌ی دیگری، استفاده از الایزا را به‌عنوان یک ابزار دقیق برای کنترل بیماری در سطح گله معرفی نمودند (۲۸). براساس تحقیقات گذشته آزمون الایزا به‌عنوان یکی از روش‌های استاندارد تشخیص و پایش، و همچنین یک ابزار تشخیص تکمیلی در کنار نشانه‌های بالینی، ضایعات آسیب‌شناسی، جداسازی و تشخیص مولکولی، به‌منظور ردیابی عامل بیماری و رخدادهای آن در گله‌های گوشتی، تخمگذار و مادر در نظر گرفته می‌شود (۸، ۹، ۲۸). در مطالعه‌ی حاضر نیز برای ارزیابی تیترا پادتن در سنین مختلف، از تست الایزا استفاده شد. اغلب کیت‌های الایزا بر اساس پوشش‌دار کردن کل پروتئینی ویروسی است Van Roekel نشان داد که در حوزه‌ی طراحی کیت‌های الایزا، علاوه بر پروتئین‌های ویروس کامل، از پروتئین VP1 نیز در پوشش‌دار کردن کیت الایزا جهت بررسی پاسخ پادتن استفاده میشود که اهمیت این پروتئین را به‌عنوان یک پروتئینی با پتانسیل تشخیصی بیان نمودند (۵). Śmiałek و همکاران (۲۰۲۲) از دو کیت الایزای تجاری ایدکس و بیوچک جهت ارزیابی تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت در بوقلمون استفاده نموده،

بیماری بودند که اهمیت تعیین سن واکسیناسیون را در این حوزه نشان می‌دهد. همچنین جوجه‌های نتاج در هفته‌های اول دارای پادتن مادری بوده که آنها را از عفونت‌های ابتدای دوره محافظت می‌کند. این مطالعه نشان داد که گله‌ها تا پایان دوره تولید و حتی در دوره‌ی تولدی نیز دارای پادتن مناسب علیه این ویروس جهت جلوگیری ابتلا گله مادر و انتقال آن به نتاج بودند. پایین بودن تیترا آنتی بادی در سن ۹ هفته‌گی (پیش از واکسیناسیون) و افزایش آن تا سن ۷۷ هفته‌گی به دنبال دو نوبت واکسیناسیون در سنین ۱۰ و ۱۲ هفته‌گی نشان دهنده تاثیر واکسن بر تقویت سیستم ایمنی هومورال میباشد. از سوی دیگر آنالیز تیترا پادتن علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان نشان داد علی‌رغم آن‌که برای واکسیناسیون گله‌های مادری در مطالعه حاضر از واکسن‌های مختلف تجاری استفاده شده بود، این واکسن‌ها سطح مناسبی از پادتن را علیه ویروس تولید نمودند. با افزایش سن گله‌ها، گردش ویروس واکسن در گله بیشتر شده و متعاقب آن، بکنواختی تیترا پادتن بیشتر می‌شود.

در مطالعه‌هایی که توسط Zulfekar Ali و همکاران در سال ۲۰۲۱ به منظور بررسی وجود و توزیع آنتی بادی‌های اختصاصی ویروس آنسفالومیلیت طیور در منطقه Bogura کشور بنگلادش انجام شد، مجموع ۲۷۵ نمونه سرم از ۳۹ گله در سن تخم‌گذاری، بدون تاریخچه واکسیناسیون جمع آوری شد. تیترا آنتی بادی سرمی با استفاده از کیت الایزای شرکت بیوچک ارزیابی شد. بر اساس نتایج این مطالعه ۷۰.۱۸٪ از نمونه‌ها سرم مثبت بودند. همچنین با توجه وضعیت سنی نمونه‌ها، مثبت بودن سرم آنها از نظر وجود آنتی علیه آنسفالومیلیت پرندگان، به شکل معنی داری با افزایش سن افزایش مییافت (۲۵). در مطالعه‌ی دیگری، توسط Ingram و همکاران، از ۶۴ بوقلمون نمونه سرم تهیه شد و از نظر وجود آنتی بادی علیه بیماری‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. شناسایی حضور آنتی بادی علیه ویروس آنسفالومیلیت پرندگان با روش الایزا و با استفاده از کیت الایزای شرکت ایدکس انجام شد. از بین نمونه‌های تهیه شده، تنها یک نمونه از نظر سرمی برای ویروس

تعارض منافع:

نگارندگان این مقاله اعلام می دارند که در رابطه با نگارش و چاپ مقاله هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

همچنین میزان انتقال پادتن به نتاج را بررسی نمودند، نتایج نشان دادند که کیت الیزا بیوچک از حساسیت بالاتری در تشخیص پادتن‌های اختصاصی علیه آنسفالمیلیت پرندگان در سرم‌های بوقلمون برخوردار می‌باشد. تفاوت نتایج حاصل از بکارگیری دو کیت تجاری الیزا برای تعیین تیتراژ پادتن ممکن است به دلیل استفاده پادگن‌های مختلف برای پوشش‌دار کردن پلیت و همچنین میزان قدرت آن در اتصال به پادتن باشد (۲۹). در مطالعه‌ی حاضر استفاده از کیت الیزای ایدکس در مقایسه با الیزای بیوچک، سطح بالاتری از تیتراژ پادتن علیه ویروس آنسفالمیلیت را در سرم مرغ نشان داد.

نتیجه گیری کلی

مطالعه حاضر اولین بررسی جامع روند دینامیک تیتراژ پادتن علیه ویروس آنسفالمیلیت پرندگان در ایران می‌باشد. تاکنون تحقیقات متعددی در زمینه‌ی تشخیص و پایش سرولوژی، مولکولی و پاتولوژی ویروس آنسفالمیلیت پرندگان انجام شده اما تحقیقات به صورت جامع نبوده است.

با توجه به این که واکسن آنسفالمیلیت پرندگان جزئی از برنامه‌ی واکسیناسیون مدون در گله‌های مرغ مادر در ایران است و نیز در برخی از موارد، درگیری با این ویروس در برخی از استان‌ها گزارش می‌شود، لذا نتایج بررسی تیتراژ پادتن در قطب‌های پرورش طیور کشور در سنین مختلف می‌تواند محدوده‌ی تیتراژ پادتن پایه‌ی مناسب و محافظت‌کننده علیه این ویروس در گله‌ها را تعیین نماید و برای طراحی برنامه‌ی واکسیناسیون کارآمد به‌منظور دستیابی به تیتراژ محافظت‌کننده علیه ویروس و بهبود عملکرد سیستم ایمنی در مواجهه بعد از واکسن، به محققین و کلینیسین‌های مرغ مادر بسیار کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری:

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از شرکت نوید مرغ گیلان جهت پشتیبانی‌های مالی از این طرح تحقیقاتی و همچنین از جناب آقای دکتر مهرداد مدیرصانعی جهت ویراستاری ادبی متن مقاله تشکر نمایند.

References

- 1- Zhang G, Li S, Shen Z, Wang F. Progress in research on the molecular biological detection techniques of avian encephalomyelitis. *Res Vet Sci*. 2023; 159: 232–36.
- 2- Lin WC, Lu PP, Li AJ, Wu Y, Li HX, Chen F, et al. Assessing the efficacy of a live vaccine against avian encephalomyelitis virus. *Arch Virol*. 2018; 163(9): 2395–404.
- 3- Marvil P, Knowles NJ, Mockett AA, Britton P, Brown TDK, Cavanagh D. Avian encephalomyelitis virus is a picornavirus and is most closely related to hepatitis A virus. *J Gen Virol*. 1999; 80(3): 653–62.
- 4- Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, et al. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(1): 202–27.
- 5- Wei L, Chee LL, Wei T, Kwang J, Zhou J, Wang J, et al. The VP1 protein of avian encephalomyelitis virus is a major host-protective immunogen that serves as diagnostic potential. *J Virol Methods*. 2008; 149(1): 56–62.
- 6- Koutoulis K, Horvath-Papp I, Tontis D, Papaioannou N, Evangelou K. An outbreak of Avian Encephalomyelitis in broilers in Greece. *J Hell Vet Med Soc*. 2015; 66(2): 93–100.
- 7- Calnek B, Taylor PJ, Sevoian M. Studies on avian encephalomyelitis. IV Epizootiology. *Avian Dis*. 1960; 4(4): 325–47.
- 8- Yu X-h, Zhao J, Qin X-h, Zhang G-z. Serological evidence of avian encephalomyelitis virus infection associated with vertical transmission in chicks. *Biol*. 2015; 43(6): 512–14.
- 9- De FE, Back A. New occurrence of avian encephalomyelitis in broiler—is this an emerging disease? *Rev Bras Cienc Avic*. 2015; 17(3): 399–404.
- 10- De la Torre D, Nuñez L, Parra S, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP. Detection by RT-PCR and molecular characterization of Tremovirus A obtained from clinical cases of avian encephalomyelitis (AE) outbreaks in Brazil. *Braz J Poult Sci*. 2018; 20: 527–36.
- 11- Al-Hammadi MA, Al-Rasheed M. Occurrences of avian encephalomyelitis virus in naturally infected chicks in Saudi Arabia's Eastern Province. *Open J Vet Med*. 2024; 14(1): 335.
- 12- Roy P, Hemalatha S, Vairamuthu S, Purushothaman V, Chandramohan A, Karunamurthy G, et al. An outbreak of avian encephalomyelitis in Tamil Nadu State of India. *WIVJ*. 2009; 9(2): 8–10.
- 13- Welchman DdB, Cox W, Gough R, Wood A, Smyth V, Todd D, et al. Avian encephalomyelitis virus in reared pheasants: a case study. *Avian Pathol*. 2009; 38(3): 251–256.
- 14- Szabó C. Transport of IgY from egg-yolk to the chicken embryo. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2012; 2(3): 612–620.
- 15- Ghalyanchilangeroudi A, Madani SA, Najafi H, Ziafati Kafi Z, Sadri N, Sarmadi S, et al. The full genome characterization of avian encephalomyelitis virus, Iran: a vertical transmission case. *Virus Genes*. 2024: 1–9.
- 16- Smart I, Grix D. Measurement of antibodies to infectious avian encephalomyelitis virus by ELISA. *Avian Pathol*. 1985; 14(3): 341–352.
- 17- Fan L, Li Z, Huang J, Yang Z, Xiao S, Wang X, et al. Dynamic distribution and tissue tropism of avian encephalomyelitis virus isolate XY/Q-1410 in experimentally infected Korean quail. *Arch Virol*. 2017; 162: 3447–3458.
- 18- Liu Q, Yang Z, Hao H, Cheng S, Fan W, Du E, et al. Development of a SYBR Green real-time RT-PCR assay for the detection of avian encephalomyelitis virus. *J Virol Methods*. 2014; 206: 46–50.
- 19- Senties-Cué CG, Gallardo RA, Reimers N, Bickford AA, Charlton BR, Shivaprasad H. Avian encephalomyelitis in layer pullets associated with vaccination. *Avian Dis*. 2016; 60(2): 511–515.
- 20- Aghakhan S, Abshar N, Fereidouni SRN, Marunesi C, Khodashenas M. Studies on avian viral infections in Iran. *Arch Razi Inst*. 1994; 44/45: 1–10.
- 21- Derakhshanfar A, Habibi G, Monir A. Avian encephalomyelitis in layer chickens. *IJVR*. 2002.
- 22- Abbasabadi B, Seifi S, Golshahi H. Concurrent occurrence of avian encephalomyelitis and vitamin A deficiency in a commercial broiler chicken flock. *J Hellenic Vet Med Soc*. 2021; 72(2): 2989–92.
- 23- Ghorani M, Ghalyanchi Langeroudi A, Akramian A, Hosseini H, Rohani F. Detection of avian encephalomyelitis virus in broiler chickens in Iran using RT-PCR and histopathological methods. *Iran J Virol*. 2019; 13(2): 24–28.
- 24- Asasi K, Farzinpour A, Tafti AK. Clinicopathological studies on avian encephalomyelitis in Shiraz, Iran. *Turk J Vet Anim Sci*. 2008; 32(3): 229–231.

25- Ali MZ, Shaon MT, Moula MM, Bary MA, Sabuj AA, Khaled SA, et al. First report on the seroprevalence of avian encephalomyelitis virus antibody in Sonali (cross-bred) chickens in Bogura, Bangladesh. *J Adv Vet Anim.* 2021 Mar; 8(1): 78–83.

26- Ingram DR, Miller DL, Baldwin CA, Turco J, Lockhart JM. Serologic survey of wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) and evidence of exposure to avian encephalomyelitis virus in Georgia and Florida, USA. *J Wildl Dis.* 2015 Apr; 51(2): 374–379.

27- de Castro Almeida P, Borges PR, Koerich

PK, de Melo RT, Batista IA, Mendonça EP, et al. Circulation of immunosuppressive viruses and avian encephalomyelitis virus in backyard chicken flocks. *J Adv Microbiol.* 2020 May; 10(5): 203–213.

28- Smart I, Grix D, Barr D. The application of the ELISA to the diagnosis and control of avian encephalomyelitis. *Aust Vet J.* 1986; 63(9): 297–299.

29- Śmiałek M, Kowalczyk J, Ogonowska-Woźniak B, Koncicki A. Comparison of two commercial ELISA kits for serological monitoring of avian encephalomyelitis in a reproductive turkey flock. *Pol J Vet Sci.* 2022; 25(4): 621–624.



Volume 8, Issue 4, Winter 2026, pages: 27-38

۳۸

Serological monitoring of avian encephalomyelitis virus in broiler breeder flocks of northern Iran

Zahra Ziafati Kafi¹, Mostafa Navid Talemi², Farhad Ghane Khoshkbijari², Nastaran Zeirani Gashti², Aida Jafari Sayadi², Azadeh Mohammadi Nodeh², Farhang Faghih Mohammadi², Mohammad Ataei², Arash Ghalyanchi Langeroudi*¹

1- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran.

2- Navid Morgh Company, Rasht, Iran

Corresponding author: Arash Ghalyanchi Langeroudi.

Email: arashghalyanchi@gmail.com

ghalyana@ut.ac.ir

Receive: August 20, 2025; Revise: December 26, 2025; Accept: February 14, 2026

 [10.22034/nfvm.2026.541927.1298](https://doi.org/10.22034/nfvm.2026.541927.1298)

Abstract

Avian encephalomyelitis is an important viral disease among breeder flocks, causing clinical signs such as loss of balance, tremors in the head and neck, and finally leads to death. The present serological study investigated antibody titers produced following vaccination in 37 broiler breeder flocks across northern provinces of Iran. Evaluation of antibody levels using the IDEXX ELISA kit showed that the mean antibody titer in the first week was 1639 ± 143.1 . The mean antibody titer in all examined flocks prior to vaccination at 9 weeks of age was 254 ± 48.2 , indicating that the flocks lacked protective antibodies against avian encephalomyelitis. After vaccination, the mean antibody titers at 15 and 24 weeks of age were 4608 ± 299.2 and 3381 ± 391.2 , respectively. The highest antibody titer in breeder flocks was observed at week 77 (6085 ± 2699). Furthermore, comparison of antibody titers after vaccination in some flocks using both IDEXX and BioChek kits revealed a significant difference between the results of these two commercial ELISA kits ($P \leq 0.0005$). This study, conducted to evaluate the dynamics of antibody titers against avian encephalomyelitis virus in Iran, represents one of the first investigations assessing this issue at different ages in major broiler breeder production centers. The findings can assist researchers and clinicians in designing effective vaccination programs.

Keywords: Avian Encephalomyelitis, Broiler Breeder, Iran, ELISA, Antibody



ارزیابی باقی مانده انروفلوکساسین در گوشت گوسفندی و گاوی عرضه شده در شهر بابلسر به روش الایزا

مهدی شریفی سلطانی*^۱، حسین ناظمی وان علیا^۲

۱- استادیار، گروه دامپزشکی، واحد چالوس، دانشگاه آزاد اسلامی، چالوس - ایران.

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

* نویسنده مسؤل: متخصص بهداشت مواد غذایی - آدرس: چالوس، خیابان ۱۷ شهریور، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده کشاورزی، طبقه چهارم، گروه دامپزشکی - تلفن تماس: ۰۹۱۱۳۹۳۴۵۲۶
ایمیل: sharifisoltani_m@iau.ac.ir

دریافت مقاله: ۰۶ دی ۱۴۰۴، بازنگری: ۰۶ اسفند ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۰۷ اسفند ۱۴۰۴

 10.22034/nfvm.2026.569142.1309

چکیده

انروفلوکساسین یکی از آنتی بیوتیک‌های پر کاربرد در دامپزشکی است که باقی مانده‌ی آن در فرآورده‌های دامی می‌تواند سلامت مصرف کنندگان را به مخاطره اندازد. هدف این مطالعه ارزیابی میزان باقی مانده‌ی انروفلوکساسین در گوشت گاو و گوسفند عرضه شده در شهر بابلسر با استفاده از روش‌های مهار میکروبی ساده و الایزا بود. در این پژوهش ۳۶۰ نمونه گوشت شامل ۱۸۰ نمونه گاوی و ۱۸۰ نمونه گوسفندی به‌طور تصادفی جمع‌آوری و آزمایش شدند. نتایج آزمون مهار میکروبی ساده نشان داد که ۳۰٪ از نمونه‌ها واجد باقی مانده‌ی آنتی بیوتیکی بودند (۳۵٪ گاوی و ۲۵٪ گوسفندی). آزمون الایزا وجود انروفلوکساسین را در ۵٪ نمونه‌ها تأیید کرد که فراوانی مشابهی در هر دو نوع گوشت مشاهده شد ($p < 0.05$). میانگین غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های گوسفندی $3/6 \pm 107/3$ میکروگرم در کیلوگرم و بالاتر از نمونه‌های گاوی $8/7 \pm 75/7$ میکروگرم در کیلوگرم بود. تمامی نمونه‌های مثبت گوشت گوسفندی مقادیری بالاتر از حد مجاز (۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) داشتند، در حالی که نمونه‌های گاوی از این حد فراتر نرفتند؛ هرچند تفاوت آماری این توزیع (آزمون فیشر) در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود. این نتایج نشان‌دهنده ضرورت پایش مستمر باقی مانده‌ی آنتی بیوتیکی در فرآورده‌های دامی و رعایت دقیق دوره‌ی پرهیز دارویی به‌ویژه در دام‌های سبک است تا سلامت مصرف کنندگان تضمین شود.

واژگان کلیدی: انروفلوکساسین، بابلسر، باقی مانده‌ی آنتی بیوتیکی، گوشت گاو، گوشت گوسفند.

مقدمه

استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی، به‌ویژه در دام‌های بزرگ و کوچک، نقش مؤثری در کنترل و درمان بیماری‌های عفونی دارد (۱). در این بین، فلوروکینولون‌ها به عنوان دسته‌ای مهم از آنتی‌بیوتیک‌ها با طیف اثر وسیع علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی شناخته‌می‌شوند (۲). انروفلوکساسین، یکی از پرکاربردترین اعضای این گروه، به طور گسترده در دامپزشکی برای درمان بیماری‌های تنفسی، عفونت‌های گوارشی و عفونت‌های دستگاه ادراری در گاو و گوسفند استفاده می‌شود (۳). با وجود اثر بخشی بالای انروفلوکساسین، باقیماندن آن در بافت‌های خوراکی پس از مصرف، نگرانی‌های قابل توجهی را از منظر ایمنی غذایی و سلامت عمومی ایجاد کرده‌است. مطالعات نشان داده‌اند که وجود باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین و متابولیت‌های آن در گوشت می‌تواند عوارض متعددی بر مصرف‌کنندگان انسانی داشته‌باشد (۴). از جمله‌ی این اثرات می‌توان به بروز واکنش‌های آلرژیک، اختلالات گوارشی، آسیب‌های کبدی و کلیوی، و مهم‌تر از همه افزایش خطر گسترش مقاومت میکروبی اشاره کرد (۵). مقاومت میکروبی به‌ویژه در برابر فلوروکینولون‌ها به عنوان یک معضل جهانی شناخته‌می‌شود و سازمان جهانی بهداشت (WHO) بارها نسبت به پیامدهای آن هشدار داده‌است (۶).

پایش باقی‌مانده‌های دارویی در فرآورده‌های دامی یکی از الزامات اصلی تضمین ایمنی مواد غذایی است. تاکنون روش‌های مختلفی برای تشخیص و اندازه‌گیری این ترکیبات به کار رفته‌است. روش بیولوژیکی آزمون مهارتی میکروبی ساده با وجود حساسیت نسبتاً پایین، به عنوان یک روش غربالگری ابتدایی مقرون‌به‌صرفه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). در مقابل، روش‌های ایمنوشیمیایی مانند آزمون الایزا (ELISA) با حساسیت و ویژگی بالا، امکان شناسایی مقادیر اندک باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم می‌آورند و در بسیاری از مطالعات برای تأیید نتایج

ارزیابی باقی‌مانده انروفلوکساسین در گوشت گوسفندی و گاو...

غربالگری به کار رفته‌اند (۸). مطالعات متعددی در نقاط مختلف جهان به بررسی میزان باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین در محصولات دامی پرداخته‌اند. به عنوان مثال، رکنی و همکاران در یک مطالعه بر روی گوشت مرغ گوشتی در استان تهران گزارش کردند که مقادیر قابل توجهی از باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین در نمونه‌ها شناسایی شده‌است که در برخی موارد بالاتر از حد مجاز تعیین‌شده توسط اتحادیه‌ی اروپا بود (۹). همچنین Zhang و همکاران در چین نشان دادند که بقایای فلوروکینولون‌ها در گوشت گاو و گوسفند می‌تواند به طور مستقیم با افزایش سویه‌های مقاوم اشیریشیاکولای در انسان ارتباط داشته باشد. این یافته‌ها ضرورت بررسی وضعیت باقی‌مانده‌های دارویی در مناطق مختلف را بیش از پیش آشکار می‌سازد (۱۰).

شهرستان بابلسر، به دلیل ماهیت توریستی و گردشگری به عنوان یکی از مراکز مهم عرضه و مصرف گوشت در استان مازندران است. با توجه به فقدان داده‌های مستند و ثبت شده در خصوص میزان باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین در گوشت عرضه‌شده در این شهرستان، انجام مطالعه‌ی حاضر ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی میزان باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین در گوشت گوسفند و گاو عرضه‌شده در کبابی‌ها، قصابی‌ها و هایپرمارکت‌های شهر بابلسر با استفاده از روش آزمون مهارتی میکروبی ساده و آزمون الایزا و تعیین فراوانی باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین، غلظت آنتی‌بیوتیکی و مقایسه‌ی بین‌گونه‌ای جانوری است. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌تواند به درک بهتر وضعیت ایمنی غذایی منطقه و اتخاذ سیاست‌های بهداشتی مناسب کمک نماید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: برای جمع آوری نمونه‌ها در این مطالعه که در بازه‌ای ۳ ماهه و در فصل بهار به روش میدانی انجام شد در مجموع ۳۶۰ نمونه گوشت گاو و گوشت گوسفند (عضله ران) با وزن تقریبی ۱۰۰ گرم از لاشه‌های به ظاهر سالم و دارای مهر بهداشتی دامپزشکی از مراکز عرضه‌ی

میکرولیترا از مایع رقیق‌شده‌ی مذکور برای بررسی حضور و تعیین غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه شد و به منظور انجام واکنش‌های بیوشیمیایی با کیفیت و دقت بالاتر چاهک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند؛ در ادامه ۱۰۰ میکرولیترا محلول متوقف‌کننده‌ی واکنش به چاهک‌ها افزوده شد. به منظور تعیین وجود باقیمانده‌ی آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در نمونه‌ها و همچنین غلظت آن از دستگاه الیزا ریدر با جذب نوری با طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده شد و تعیین میزان باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین بر اساس منحنی کالیبراسیون به صورت نانو گرم در گرم بافت‌های مورد مطالعه بیان گردید (۱۲).

تحلیل آماری: داده‌ها پس از جمع‌آوری و ثبت در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ (IBM Corp., Armonk, NY, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی تفاوت در فراوانی نمونه‌های دارای باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین بالاتر از حد مجاز (MRL) میان گوشت دو گونه (گاو و گوسفند)، از آزمون دقیق فیشر (Fisher's exact test) به صورت دوطرفه (two-tailed) با سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد. همچنین برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی شامل فراوانی (تعداد و درصد)، میانگین و انحراف معیار استفاده گردید. در مواردی که یک یا چند سلول جدول دارای مقدار صفر بودند، جهت برآورد نسبت شانس (Odds Ratio) از تصحیح هالدین-آنزکوم (Haldane-Anscombe correction) استفاده شد. نتایج به صورت مقادیر p ، نسبت شانس (OR) و بازه‌ی اطمینان ۹۵ درصد (Confidence Interval) گزارش شدند.

نتایج

در این مطالعه، ۳۶۰ نمونه‌ی گوشت شامل ۱۸۰ نمونه گوشت گاو و ۱۸۰ نمونه گوشت گوسفندی به‌طور تصادفی از مراکز عرضه‌ی گوشت شهر بابلسر جمع‌آوری شدند. نتایج آزمون‌های مهارتی میکروبی ساده و الیزا نشان داد که در هر دو نمونه‌های گوشت گاو و گوشت گوسفند عرضه‌شده در

گوشت (از جمله قصابی‌ها و هایپرمارکت‌ها هرکدام ۱۸۰ نمونه) شهر بابلسر جمع‌آوری و نمونه‌ها پس از کدگذاری، در مجاورت یخ و شرایط بهداشتی به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل انتقال یافت.

تست مهارتی میکروبی ساده: برای تعیین وجود ترکیبات ضد میکروبی در گوشت به روش آزمون مهارتی میکروبی ساده از باکتری اشریشیاکولای (ATCC۲۵۹۲۲) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC۲۵۹۲۳) استفاده شد. از باکتری‌ها سوسپانسیون نیم مک‌فارلند تهیه شد و ۱۰ میکرولیترا از آن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت سطحی داده شد. سپس در کنار شعله و با رعایت شرایط استریل با استفاده از پنس و تیغ استریل، تکه‌های مکعبی (تقریبی) حدوداً با قطر ۵ میلی‌متر برش زده شد و روی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرم‌خانه‌گذاری و هاله عدم رشد اطراف تکه‌های گوشت بررسی شد (۱۱). مابقی نمونه‌ی گوشت در ظروف استریل در دمای ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز شد تا در صورت نیاز برای آزمون الیزا استفاده شود.

تست الیزا: نمونه‌های مثبت در تست میکروبی که هاله‌ی عدم‌رشد داشتند در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد از حالت انجماد خارج شدند. جهت اندازه‌گیری میزان انروفلوکساسین در نمونه‌های مثبت از کیت الیزای انروفلوکساسین (R-biopharm, R۳۱۱۱، آلمان) استفاده شد که حد تشخیص بافتی ۱۰ ppb (LOD)، حد کمی شدن ۴۰ ppb (LOQ) و تداخل با متابولیت‌های سیپروفلوکساسین ۰/۰۰۳ درصد بود؛ ۴ گرم از نمونه گوشت به کمک همزن آزمایشگاهی (ULTRA-TURRAX، آیکیا) همگن و یک گرم از آن با ۴ میلی‌لیتر متانول ۷۰٪ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه به شیک گذاشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد تا مایع فوقانی جدا شود. سپس یک میلی‌لیتر از مایع فوقانی با یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل رقیق و ۵۰

ارزیابی باقی‌مانده انروفلوکساسین در گوشت گوسفندی و گاوی...

تست الیزا، بین گوشت دو گونه‌ی حیوانی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

شهر بابلسر، باقی‌مانده‌ی ترکیبات ضد میکروبی و به طور خاص آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین بوده‌است (جدول ۱).
آنالیز آماری نتایج، نشان داد که از نظر نسبت مثبت بودن

جدول ۱: فراوانی مطلق و نسبی (درصد) آلودگی نمونه‌های گوشت در تست مهاری میکروبی ساده و الیزا

نوع گوشت	تعداد نمونه	تعداد مثبت (مهاری میکروبی ساده)	تعداد مثبت الیزا
گوسفندی	۱۸۰	۴۵ (۲۵٪)	۹ (۵٪)
گاوی	۱۸۰	۶۳ (۳۵٪)	۹ (۵٪)
مجموع	۳۶۰	۱۰۸ (۳۰٪)	۱۸ (۵٪)

مقادیر غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های مثبت گوشت گوسفندی در بازه‌ی ۱۰۲ تا ۱۱۲ میکروگرم در کیلوگرم ($\mu\text{g}/\text{kg}$) قرار داشت، در حالی که در نمونه‌های گوشت گاوی در بازه‌ی ۶۴ تا ۸۵ $\mu\text{g}/\text{kg}$ بود.

نتایج آزمون الیزا جهت شناسایی اختصاصی باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین انجام شد که نشان داد ۱۸ نمونه (۵٪) واجد انروفلوکساسین بودند؛ شامل ۹ نمونه (۵٪) گوشت گاوی و ۹ نمونه (۵٪) گوشت گوسفندی. مقایسه‌ی فراوانی نمونه‌های مثبت الیزا بین دو نوع گوشت با آزمون دقیق فیشر نشان داد که تفاوت آماری معنی‌داری ($p > 0.05$) بین آنها وجود نداشته‌است.

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار غلظت باقی‌مانده انروفلوکساسین در نمونه‌های مثبت

نوع گوشت	غلظت Mean \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
گوسفندی	۱۰۷/۳ \pm ۳/۶
گاوی	۷۵/۷ \pm ۸/۷

الگوی باقی‌مانده‌ی انروفلوکساسین در بافت گوشت از تفاوت زیستی و مدیریتی حمایت می‌کند. یعنی ممکن است در مطالعات با حجم نمونه بزرگ‌تر معنی‌دار شود.
در این تحقیق تمامی مواد مثبت گوشت گوسفندی مقادیر بالاتر از حد مجاز داشتند و هیچ یک از نمونه‌های واجد انروفلوکساسین گوشت‌گاوی فراتر از حد مجاز تشخیص داده‌نشده‌اند (جدول ۳).

بر اساس حد مجاز باقی‌مانده (MRL = ۱۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$) (۱۳)، تمامی نمونه‌های مثبت گوشت گوسفندی دارای مقادیر بالاتر از حد مجاز بودند، در حالی که هیچ‌یک از نمونه‌های مثبت گوشت گاوی از این حد فراتر نرفتند. با این حال نتایج آزمون فیشر در خصوص موارد بالاتر از حد مجاز باقی‌مانده در گوشت دو گونه، نشان‌دهنده‌ی تفاوت آماری معنی‌دار ($p > 0.05$) بین گوشت دو گونه‌ی حیوانی نبود؛ با این حال

جدول ۳: فراوانی مطلق و نسبی آلودگی بالاتر از حد مجاز در نمونه‌های واجد انروفلوکساسین

نوع گوشت	کمتر از حد مجاز ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ۱۰۰)		بالاتر از حد مجاز ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ۱۰۰)	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی (%)	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی (%)
گوسفندی	۰	۰	۹	۱۰۰
گاوی	۹	۱۰۰	۰	۰

استان‌های شمال غرب ایران با دو روش چهار پلیت و الیزا ارزیابی‌شد و بر اساس نتایج ۲۸ لاشه از مجموع ۱۶۰ لاشه (۱۷/۵ درصد) واجد باقی‌مانده‌ی انروفلوکسازین بودند. که نسبت به تحقیق ما بیشتر بود. نتایج این مطالعه نشان‌داد که انروفلوکسازین به‌طور وسیعی در منطقه شمال غرب ایران به ویژه استان آذربایجان غربی مورد استفاده قرار گرفته و به نظر می‌رسد دوره‌ی منع مصرف این آنتی‌بیوتیک به درستی اعمال نمی‌شود (۲۷)؛ احتمالاً در تحقیق ما نیز همین مورد موجب باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی در گوشت شده‌است.

نتایج این مطالعه نشان‌داد که میزان فراوانی نمونه‌های دارای باقی‌مانده انروفلوکسازین در گوشت گاو و گوسفندی عرضه‌شده در شهر بابلسر برابر و در حدود ۵ درصد بود. با این حال، میانگین غلظت این دارو در گوشت گوسفندی بالاتر از گوشت گاو بود. این موضوع می‌تواند ناشی از تفاوت‌های متابولیکی و زیستی بین این دو گونه‌ی حیوانی باشد (۲۸). متابولیسم داروها در گوسفند نسبت به گاو متفاوت است؛ و همچنین دوره‌های درمانی و فاصله زمانی بین پایان درمان و کشتار (withdrawal period) در دام‌های سبک کم‌تر رعایت می‌شود که منجر به حضور بیشتر دارو در بافت‌های گوشت می‌شود (۲۹).

نتایج تحقیقات مشابه نشان‌داد که با افزایش وزن دام، مقدار باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی انروفلاکسازین نیز به شکل معنی‌داری کاهش یافت (۲۹) و این موضوع می‌تواند توجیه‌کننده‌ی تفاوت در تحقیق ما باشد.

نکته کلیدی دیگر که این مطالعه به آن اشاره دارد، عبور تمام نمونه‌های مثبت گوشت گوسفندی از حد مجاز باقی‌مانده دارویی است، در حالی که نمونه‌های مثبت گوشت گاو این حد را رعایت کرده‌بودند. این یافته از منظر بهداشت عمومی اهمیت بالایی دارد، زیرا مصرف فرآورده‌های دامی با مقادیر بالاتر از حد مجاز باقی‌مانده می‌تواند به بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اثرات جانبی دارویی و مخاطرات زیست‌محیطی منجر شود. همچنین، این امر بر ضرورت آموزش دامداران و کنترل دقیق‌تر دوره‌ی پرهیز

نسبت شانس (Odds Ratio) با تصحیح صفر و فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد (۱۴۰/۶-۰/۳۶)؛ $CI: 0.36-140.6$ ؛ ۱ به ۷ بود که نشان داد احتمال وجود باقی‌مانده‌ی انروفلوکسازین بالاتر از حد مجاز در گوشت گوسفند حدود هفت برابر بیشتر از گوشت گاو است، هرچند این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود و فاصله‌ی اطمینان زیاد نشان‌دهنده‌ی عدم دقت ناشی از حجم نمونه‌ی کوچک است.

بحث و نتیجه‌گیری

در خارج از کشور مطالعات زیادی در خصوص باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی به خصوص انروفلوکسازین در گوشت شده‌است. برای مثال در تحقیقی در یونان ۹۸ درصد (۱۴)، در چین ۹۵/۶ درصد (۱۵)، در هند ۳۸/۷۱ درصد (۱۶) و در ویتنام در دو تحقیق جداگانه ۱۱/۹ و ۳۹ درصد (۱۷-۱۸) باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی شناسایی‌شد.

در تحقیقی که به روش الیزا برای تعیین باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی انجام شده بود مشخص شد که ۱۰۰ درصد از نمونه‌ها حاوی باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیک فلوروکینولون هستند (۱۹).

ارزیابی‌ها نشان‌داد که ۳۹ درصد از نمونه‌ها در استان خوزستان، شهر اهواز (۲۰)؛ ۱۷/۹ درصد در استان اصفهان و شهر اصفهان (۲۱)؛ ۶۵ درصد در استان مازندران و شهرهای قائمشهر، ساری و آمل (۲۲)؛ ۱۴/۷ درصد در استان همدان (۲۳)؛ ۶۰ درصد در شهرستان مراغه (۲۴) واجد باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک بودند. علت بالاتر بودن باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی در تحقیقات اشاره شده با تحقیق ما ممکن است به دلیل تفاوت گونه‌ی جانوری، تفاوت مدیریتی و حتی تفاوت نوع آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه باشد. با این حال در تحقیقی مشابه با تحقیق حاضر در مشهد مشخص شد که ۱۸/۸ درصد از نمونه‌های گوشت گوسفندی (۲۵) و در تحقیق در تبریز ۷۳/۳۳ درصد نمونه‌های گوشت گاو باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی داشتند (۲۶). احتمالاً تفاوت بین نتایج تحقیقات مختلف به دلیل تفاوت در نوع ردیابی باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی باشد.

در مطالعه‌ای دیگر باقی‌مانده‌ی انروفلوکسازین در

دارویی تاکید می‌کند.

با وجود اینکه آزمون دقیق فیشر در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تفاوت آماری معناداری بین فراوانی موارد بالاتر از حد مجاز در گوشت گوسفندی و گاوی نشان نداد ($p > 0.05$)، اما روند مشاهده‌شده و نسبت شانس ۷، نشان‌دهنده‌ی ریسک بالاتر مواجهه‌ی باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیکی در گوشت گوسفندی است که ممکن است در مطالعات با تعداد بیشتر موارد بالاتر از حد مجاز، معنی‌دار شود و نمی‌توان با قطعیت به آن استناد کرد و این اختلاف صرفاً توصیفی است؛ با این حال توجه ویژه در سیاست‌گذاری‌ها و برنامه‌های نظارتی به خصوص در بخش دام سبک همچنان حائز اهمیت است.

از دیدگاه سلامت عمومی، وجود هرگونه نمونه‌ی بالاتر از حد مجاز باقی‌مانده حتی در درصد پایین، هشدار دهنده است. مصرف مداوم گوشت حاوی مقادیر فراتر از حد مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند باعث تجمع دارو یا متابولیت‌های آن در بدن انسان، بروز واکنش‌های حساسیتی و از همه مهم‌تر، تسریع شکل‌گیری مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زا شود. در مورد انروفلوکسازین، که از خانواده فلوروکینولون‌هاست، این نگرانی بسیار جدی است زیرا مقاومت متقاطع با آنتی‌بیوتیک‌های انسانی نظیر سیپروفلوکسازین گزارش شده است (۳۰). بنابراین، حتی با وجود عدم معنی‌داری آماری، مشاهده ۵٪ از نمونه‌های گوسفندی بالاتر از حد مجاز می‌تواند از نظر بهداشت مواد غذایی اهمیت عملی بالایی داشته‌باشد.

از نظر روش‌شناسی، باید توجه داشت که آزمایش‌های ای‌زایا گرچه برای غربالگری سریع باقی‌مانده‌های دارویی مفید است، اما به تنهایی برای تعیین قطعی غلظت بالاتر از حد مجاز باقی‌مانده کافی نیست و از نظر قانونی و استاندارد آزمون تاییدی محسوب نمی‌شود. بنابراین، لازم است در خصوص یافته‌های بالاتر از حد مجاز باقی‌مانده، تحقیقات تکمیلی با روش‌های شناسایی دقیق‌تر مانند کروماتوگرافی مایع فشار بالا (HPLC) یا کروماتوگرافی مایع جرمی (LC-MS/MS) انجام‌گیرد. همچنین تعداد موارد مثبت نسبتاً کم است (۹ مورد) و باعث می‌شود قدرت آماری مطالعه برای

ارزیابی باقی‌مانده انروفلوکسازین در گوشت گوسفندی و گاوی...

شناسایی اختلاف‌های واقعی محدود باشد. علاوه بر این، اطلاعات مربوط به محل پرورش دام، تاریخ آخرین تجویز دارو و نوع مصرف در دام‌ها در دسترس نبوده‌است؛ این موضوع تحلیل علی دقیق را دشوار می‌کند؛ همچنین در این مطالعه محاسبه حجم نمونه بر اساس تفاوت بین‌گونه‌ای مورد انتظار نبود. با وجود این محدودیت‌ها، یافته‌های به‌دست آمده می‌توانند مبنایی برای تقویت برنامه‌های نظارت بر بقایای دارویی در منطقه بابلسر باشند. توصیه‌می‌شود در مطالعات آینده از روش‌های کروماتوگرافی استفاده‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود نظام آموزش و آگاهی‌بخشی به دامداران درباره‌ی رعایت دوره پرهیز دارویی تقویت‌گردد و کنترل‌های دقیق‌تری در سطح کشتارگاه‌ها و بازارهای گوشت اعمال شود.

جمع بندی

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک انروفلوکسازین در گوشت‌های گاوی و گوسفندی عرضه‌شده در بازار شهر بابلسر وجود دارد، هرچند فراوانی نمونه‌های مثبت در هر دو نوع گوشت مشابه بود. با این حال، غلظت باقی‌مانده انروفلوکسازین در گوشت گوسفندی بالاتر بوده‌است. نتایج به وضوح نشان می‌دهد که گوشت گوسفندی در این مطالعه، سطوح بسیار بالاتری از باقی‌مانده‌ی انروفلوکسازین را نشان داد و در تمامی موارد مشاهده‌شده از MRL فراتر رفت. این مشاهده نشان‌دهنده‌ی نیاز به توجه بیشتر در مورد استفاده از این آنتی‌بیوتیک در دامداری‌های گوسفند در منطقه‌ی مورد مطالعه است. با این حال، به دلیل محدودیت‌های آماری (عدم معنی‌داری آزمون فراوانی)، از هرگونه تعمیم گسترده یا استنتاج قطعی درباره‌ی کل جمعیت خودداری می‌شود. این یافته‌ها، زمینه را برای مطالعات آینده با حجم نمونه‌ی بزرگ‌تر برای تأیید آماری این پتانسیل خطر فراهم می‌آورد. این یافته‌ها ضرورت پایش مستمر باقی‌مانده‌های دارویی، افزایش آگاهی دامداران نسبت به رعایت دوره‌ی پرهیز دارویی و تقویت نظارت‌های قانونی به‌ویژه در دام‌های سبک را تاکید می‌کند تا سلامت مصرف‌کنندگان حفظ شود و

سپاسگزاری

از کلیه افرادی که به نوعی در به انجام رسیدن این پروژه تحقیقاتی همکاری نموده‌اند کمال تشکر به عمل می‌آید.

خطرات ناشی از مصرف فرآورده‌های دامی آلوده به آنتی‌بیوتیک به حداقل برسد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله با هیچ شخص حقیقی و حقوقی تعارض منافع ندارند.

References

1- Sheir MA, Mohammed NS, Abd-elaziz MM. Influence of Some Cooking Procedures on Quality Criteria and Some Veterinary Drugs Residues in Chicken Wings Meals. *J Nutr Food Sec*. 2025; 10(2): 303-314. [In Persian].

2- Martinez M, McDermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J*. 2006; 172(1): 10-28.

3- Troughon T, Lefebvre S. A review of enrofloxacin for veterinary use. *Open J Vet Med*. 2016; 6(2): 40-58.

4- Menkem ZO, Ngangom BL, Tamunjoh SS, Boyom FF. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. *Acta Ecol Sin*. 2019; 39(5): 411-415.

5- Badawy S, Yang Y, Liu Y, Marawan MA, Ares I, Martinez MA, *et al.*, Toxicity induced by ciprofloxacin and enrofloxacin: oxidative stress and metabolism. *Crit Rev Toxicol*. 2021; 51(9): 754-787.

6- Sun W, Qian X, Wang X, Gu J. Residual enrofloxacin in cattle manure increased persistence and dissemination risk of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion. *J Environ Manage*. 2023; 326 part B: 116864.

7- Moghaddam NR, Nematı M, Lotfipur F. Determination of antibiotic residues in chicken tissues using four plate test method. *Int J Adv Biol Biomed Res*. 2022; 10(3): 194-201.

8- Lu N, Bu M, Zhang C, Gao Q, Wang X, Zhou X, *et al.*, Development of a rapid detection method for enrofloxacin in food. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2024; 40(4): 3931-3949.

9- Rokni ND, Kamkar AAF, Salehzadeh F, Madani R. Study on the enrofloxacin residues in chicken tissues by HPLC. *Iran J Food Sci Technol*. 2007; 4(13): 11-17. [In Persian].

10- Zhang Y, Lu J, Yan Y, Liu J, Wang M. Antibiotic residues in cattle and sheep meat and human exposure assessment in southern Xinjiang, China. *Food Sci Nutr*. 2021; 9(11): 6152-6161.

11- Alimohammadi M, Askari SG, Azghadi NM, Taghavimanesh V, Mohammadimoghadam T, Bidkhorı M, *et al.*, Antibiotic residues in the raw and pasteurized milk produced in Northeastern Iran examined by the four-plate test (FPT) method. *Int J Food Prop*. 2020; 23(1): 1248-1255.

12- Mahmoudi R, Norian R. Determination of enrofloxacin residue in chicken eggs using FPT and ELISA methods. *J Res Health*. 2015; 5(2): 159-164.

13- European Commission. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union*. 2010 Dec 22;15(2377):1-72.

14- Stavroulaki A, Tzatzarakis MN, Karzi V, Katsikantami I, Renieri E, Vakonaki E, *et al.*, Antibiotics in raw meat samples: estimation of dietary exposure and risk assessment. *Toxics*. 2022; 10(8): 456.

15- Hua Y, Yao Q, Lin J, Li X, Yang Y. Comprehensive survey and health risk assessment of antibiotic residues in freshwater fish in southeast China. *J Food Compos Anal*. 2022; 114: 104821.

16- Arsène MM, Davares AK, Viktorovna PI, Andreevna SL, Sarra S, Khelifi I, *et al.*, The public health issue of antibiotic residues in food and feed: Causes, consequences, and potential solutions. *Vet world*. 2022; 15(3): 662-671.

17- Yamaguchi T, Okihashi M, Harada K, Konishi Y, Uchida K, Do MHN, *et al.*, Antibiotic residue monitoring results for pork, chicken, and beef samples in Vietnam in 2012–2013. *J Agric Food Chem*. 2015; 63(21): 5141-5145.

18- Kim DP, Degand G, Douny C, Pierret G, Delahaut P, Ton VD, *et al.*, Preliminary evaluation of antimicrobial residue levels in marketed pork and chicken meat in the Red River Delta region of Vietnam. *Food Public Health*. 2013; 3(6): 267-76.

19- Dabagh Moghadam A, Bashashati M, Hoseini Shokouh SJ, Hashemi SR. antibiotic residues in chicken meat and table eggs consumed in islamic republic of iran army. *J Food Hyg*. 2017; 7(26): 69-

81. [In Persian].

20- Fazlara A, Mayahi M, Najafzadeh Varzi H, Gudarznia F, Mohammadyari S. Determination the amount of illegal furazolidone residues in broilers in Ahvaz abattoir by HPLC method. *Armaghan Danesh*. 2014; 19(3): 252-264. [In Persian].

21- Rahimi I, Jafarian M. Study of chloramphenicol residues in poultry meat using ELISA method in Isfahan. *Vet Clin Pathol*. 2008; 2(3): 203-207. [In Persian].

22- Vahedi N, Motaghedhi A, Golchin M. Determination of antibiotic residues in industrial poultry carcass by means of F.P.T (four-plate-test) method in Mazandaran province. *Iran J Food Sci Technol*. 2011; 8(28): 65-72. [In Persian].

23- Adabi M, Reza Faryabi M, NiliAhmadbadi A, Gharekhani J, Mehri F. Evaluation of tetracycline antibiotics residues in chicken tissues using the fourplate test, ELISA, and HPLC methods in Iran. *Int J Environ Anal Chem*. 2024; 104(9): 2014-2023.

24- Abasi M, Mahdavi S. Investigation of antibiotic residues in edible tissues of slaughtered broilers in Maragheh abattoir using FPT method. *J Food Hyg*. 2016; 6(1): 91-97. [In Persian].

25- Babapour A, Azami L, Fartashmehr J. Overview of antibiotic residues in beef and mutton in Ardebil, North West of Iran. *World Appl Sci J*. 2012; 19(10): 1417-1422.

26- Torbati MA, Shamshiri M, Javadi A. Detection of antibiotic residues in edible tissue of slaughtered cows in Tabriz abattoir with FPT method. *J Food Hyg*. 2011; 1(2): 29-37. [In Persian].

27- Tajik H, Razavi Rouhani S, Pajohi Alamoti M, Mahmoudi R. Comparison of enrofloxacin residues in poultry tissues slaughtered in north west provinces of Iran by using FPT and ELISA. *Stud Med Sci (The Journal of Urmia University of Medical Sciences)*. 2011; 22(1): 18-24. [In Persian].

28- Mahmoudi R, Norian R, Ghajarbeygi P. Survey of antibiotic residues in raw milk samples in Qazvin (2012). *J Inflamm Dis*. 2014; 18(1): 45-52. [In Persian].

29- Fadaeifard F. Determination of enrofloxacin residue in the muscle and liver of cultured rainbow trout in Chaharmahal-va-bakhtiary province by ELISA. *J Food Hyg*. 2012; 2(1): 53-62. [In Persian].

30- Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019; 51: 72-80.



Evaluation of enrofloxacin residues in lamb and beef supplied in Babolsar city using ELISA method

Mahdi Sharifi Soltani^{*1}; Hossein Nazemi Vanolia²

1- Professor assistant, Department of veterinary, Cha. C., Islamic Azad University, Chalus-Iran.

2- Graduated, Department of veterinary, Babol, Islamic Azad University, Babol-Iran.

* Corresponding author: Food hygiene (PhD) - Address: Chalus, 17th Shahrivar Street, Islamic Azad University, Faculty of Agriculture, Fourth Floor, Department of Veterinary Medicine – Tel: +989113934526
Email: sharifisoltani_m@iau.ac.ir

Receive: December 27, 2025; Revise: February 25, 2026; Accept: February 26, 2026

 [10.22034/nfvm.2026.569142.1309](https://doi.org/10.22034/nfvm.2026.569142.1309)

Abstract

Enrofloxacin is one of the most widely used antibiotics in veterinary medicine, and its residues in animal products can pose a health risk to consumers. The aim of this study was to evaluate the level of enrofloxacin residues in beef and lamb supplied in Babolsar city using four-plate and ELISA methods. In this study, 360 meat samples, including 180 beef samples and 180 lamb samples, were randomly collected and tested. The results of the four-plate test showed that 30% of the samples had antibiotic residues (35% beef and 25% lamb samples). The ELISA test confirmed the presence of enrofloxacin in 5% of the samples, with a similar frequency observed in both types of meat ($p > 0.05$). The mean concentration of enrofloxacin in lamb samples was $107.3 \pm 3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$, higher than that in beef samples, $75.7 \pm 8.7 \mu\text{g}/\text{kg}$. All positive lamb samples had levels above the permissible limit (MRL $100 \mu\text{g}/\text{kg}$), while beef samples did not exceed this limit ($p > 0.05$). These results indicate the need for continuous monitoring of antibiotic residues in livestock products and strict adherence to the drug withdrawal period, especially in light livestock, to ensure the health of consumers.

Keywords: Enrofloxacin, Babolsar, Antibiotic residues, MRL, beef, lamb.



نقش سنجش حد نصاب در توکسین زایی کلستریدیوم پرفرینجنس

سیما آزادمنش^۱، لیدا عبدالمحمدی خیابو*^۲، رامین باقری نژاد^۳، بهجت مجیدی^۴

- ۱- دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی گیاهی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهواری، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، کرج، ایران
- ۲- دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهواری، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، کرج، ایران
- ۳- دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهواری، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، کرج، ایران
- ۴- دانش آموخته دکتری تخصصی بیوشیمی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهواری، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه مشهد، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، مشهد، ایران

* نویسنده مسوول: دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی- آدرس: کرج، خیابان شهید بهشتی، حصارک، کرج، البرز، ایران. صندوق پستی: ۳۱۹۷۵/۱۴۸ کد پستی: ۳۱۹۷۶۱۹۷۵۱ - تلفن تماس: ۰۲۶۳۴۵۰۴۰۰ - فکس: ۰۲۶۳۴۵۵۲۱۹۴ - ایمیل: L.mohammadi@rvsri.ac.ir

دریافت مقاله: ۲۲ خرداد ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۷ تیر ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۲۰ تیر ۱۴۰۴

10.22034/nfvm.2025.529961.1290

چکیده

کلستریدیوم پرفرینجنس، یک باکتری بی‌هوازی گرم‌مثبت و اسپوردار بوده که به‌طور گسترده در طبیعت پراکنده است. این باکتری قادر به ترشح توکسین‌های پروتئینی و آنزیم‌ها بوده که به بیماری‌زایی آن کمک می‌کند. تنظیم بیان ژن این توکسین‌ها تحت کنترل شبکه‌ای قرار دارد که ارتباطات سلول-سلول را برقرار می‌نماید. به‌منظور توکسین‌زایی، سلول‌های باکتریایی با تولید و تشخیص سیگنال‌های خارج‌سلولی، به‌ویژه از طریق مولکول‌های اختصاصی سیگنالینگ کوچک که به عنوان خودالقاگر شناخته می‌شوند، ارتباط برقرار می‌شود. این سیگنال‌ها در تولید توکسین‌ها و حدت بسیار مهم هستند. همچنین این سیستم در فرآیندهای اسپورزایی و تشکیل بیوفیلم در این باکتری نقش داشته که اهمیت نقش این سیستم را نشان می‌دهد. با توجه به اهمیت میزان تولید توکسین‌ها در سویه‌های واکسینال و مطالعات محدودی که تاکنون در زمینه تنظیم بیان توکسین‌های باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس انجام شده، در این مقاله نقش مهم سیستم‌های سنجش حد نصاب در تولید و ترشح توکسین‌های کلستریدیوم پرفرینجنس بر اساس مرور مطالعات موجود بررسی شده‌است. در نهایت، نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سیستم‌های تنظیمی سنجش حد نصاب از جمله Agt و سیستم دو جزئی VirS/VirR نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های ویروالانس در کلستریدیوم پرفرینجنس دارند. همچنین، نقش مولکول‌های خودالقاگر در تنظیم فاکتورهای حدت و حفظ تعادل میکروبیوم روده، زمینه‌ساز توسعه اهداف درمانی نوین در مقابله با این پاتوژن خواهد بود. به‌طور کلی، تنظیم بیان ژن در کلستریدیوم پرفرینجنس پیچیده بوده و ژن‌های رمزگذار توکسین‌ها را نمی‌توان به‌صورت سیستم‌های کاملاً مجزا در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: پپتیدهای خودالقاگر، تولید توکسین، سیستم سنجش حد نصاب، کلستریدیوم پرفرینجنس

مقدمه

جنس کلوستریدیوم اولین بار توسط پرازموفسکی در سال ۱۸۸۰ توصیف شد (۱). نام جنس از نام یونانی kloster (در لاتین *Clostridium*) به معنای دوکی شکل، گرفته شد. این جنس یکی از بزرگترین جنس‌های پروکاریوتی در شاخه‌ی Firmicutes است که حاوی بیش از ۳۰۰ گونه می‌باشد (۲). به دلیل ظرفیت اسپورزایی، باکتری‌های این جنس می‌توانند برای مدت طولانی در خاک به صورت بالقوه عفونت‌زا باقی بمانند که نشان‌دهنده‌ی خطر قابل توجه آنان برای جمعیت حیوانات و انسان است. یکی از مهم‌ترین گونه‌های آن کلوستریدیوم پرفرینجنس می‌باشد که به‌طور گسترده در طبیعت به‌ویژه در خاک و دستگاه گوارش انسان و حیوانات پراکنده است (۳). این گونه متشکل از باسیل‌های گرم‌مثبت اسپوردار بی‌هوازی اجباری است (۲). این باکتری تولید توکسین‌های قوی و متنوعی می‌کند (۴). از این توانایی در تولید توکسین‌های مختلف، در سیستم طبقه-

بندی آن استفاده شده به طوری که سویه‌های کلوستریدیوم پرفرینجنس بر اساس تولید توکسین‌های اصلی آلفا (CPA)، بتا (CPB)، اپسیلون (ETX)، یوتا (ITX)، انتروتوکسین (CPE) و NetB (توکسین شبه انتریت نکروتیک B) به هفت توکسینوتایپ (A تا G) تقسیم می‌شوند. جدول شماره ۱ توکسینوتایپ کلوستریدیوم پرفرینجنس بر اساس توکسین‌های اصلی را آورده‌است. مشخص شده‌است که ژن تولیدکننده‌ی توکسین آلفا (*plc*) و پرفرینگولایزین بر روی کروموزومی قرار دارد. اما ژن‌های تولیدکننده‌ی توکسین‌های بتا، اپسیلون و یوتا بر روی پلاسمیدهای بزرگ قرار گرفته‌اند (۳، ۵). ژن انتروتوکسین (*cpe*) نیز توسط یک پلاسمید بزرگ یا یک ترانسپوزون که ظاهراً وارد کروموزوم شده‌است، حمل می‌شود (۶). علاوه بر این توکسین‌های اصلی، کلوستریدیوم پرفرینجنس توکسین‌های دیگری مانند کاپا (کلاژناز، ژلاتیناز)، تتا یا پرفرینگولیزین (سیتولیزین) تولید می‌نماید (۷).

جدول ۱- توکسینوتایپ‌های کلوستریدیوم پرفرینجنس بر اساس توکسین‌های اصلی (۸)

Toxinotype	α (CPA)	β (CPB)	ϵ (ETX)	τ (ITX)	Enterotoxin (CPE)	Necrotic enteritis B-like toxin (NetB)
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	\pm	-
D	+	-	+	-	\pm	-
E	+	-	-	+	\pm	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

+ وجود توکسین

- عدم وجود توکسین

به‌خصوص در دام‌های پرور بعد از تغییر ناگهانی رژیم غذایی می‌شود (۱۰، ۱۱). کلوستریدیوم پرفرینجنس تیپ B و C در ایجاد بیماری‌های دستگاه گوارش نظیر اسهال عفونی بره‌ها و پیگ‌بل نقش ایفا می‌کنند (۱۲). کلوستریدیوم پرفرینجنس تیپ A می‌تواند منجر به بیماری‌های شدیدی نظیر قانقاریای گازی و انتریت نکروتیک شود. در جدول ۲ بیماری‌های مرتبط با تیپ‌های مختلف کلوستریدیوم پرفرینجنس آورده شده‌است.

کلوستریدیوم پرفرینجنس می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های مختلفی در انسان و حیوانات شود. این باکتری بیش‌تر دستگاه گوارش و بافت‌های نرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در انسان، این باکتری یکی از علل شایع مسمومیت غذایی است و همچنین می‌تواند منجر به بیماری‌های شدیدتری نظیر قانقاریای گازی و انتریت نکروزان شود (۹). یکی از تیپ‌های مهم این باکتری، کلوستریدیوم پرفرینجنس تیپ D می‌باشد که عامل انتروتوکسمی یا قلوه‌نرمی در گوسفند، بز و کم‌تر گاو می‌باشد و سبب مرگ‌ومیر ناگهانی

جدول ۲- بیماری‌های ناشی از تیپ‌های مختلف جنس کلستریدیوم پرفرینجنس (۱۳، ۳)

عامل بیماری‌زا	نوع بیماری	میزبان‌ها
<i>Clostridium perfringens</i> type A	قانقاریای گازی و، انتروتوکسمی، انتريت، نکروتیک، گاستروانتریت،	انسان، نشخوارکنندگان، اسب، سگ
<i>Clostridium perfringens</i> type B	اسهال خونی بره‌ها	بره‌ها
<i>Clostridium perfringens</i> type C	انتريت هموراژیک و نکروتیک	دامهای جوان
	پیگ بل	انسان
	استراک	گوسفندان بالغ
<i>Clostridium perfringens</i> type D	انتروتوکسمی	نشخوارکنندگان
<i>Clostridium perfringens</i> type E	گاستروانتریت	گاو، خرگوش
<i>Clostridium perfringens</i> type F	مسمومیت غذایی، اسهال متعاقب مصرف آنتی‌بیوتیکها	انسان
<i>Clostridium perfringens</i> type G	انتريت نکروتیک	طیور

ارتباطات سلول به سلول و اثرات آن به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم بر روی رونویسی و ترجمه‌ی پروتئین‌ها در میکروارگانیسم‌ها توصیف شد. فرآیند سیستم سنجش حد نصاب اولین بار در سال ۱۹۷۰ توسط Nealson در باکتری‌های ویبریو فیشری و ویبریو هاروه‌ای گزارش گردید. این سیستم ارتباطی در توده‌های بیوفیلم به‌کار رفته‌است. از آن زمان به بعد، نقش این سیستم در مکانیسم‌هایی نظیر تنظیم بیان ژن در فرآیند تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). سیستم سنجش حد نصاب یک سیستم وابسته به تراکم و جمعیت است (۱۶). این سیستم به‌منظور ارتباط و برای به اشتراک گذاشتن اطلاعات و در نتیجه "گفتگو" بین سلول‌های باکتریایی استفاده می‌شود (۱۷). در این سیستم ارتباط و گفتگوی بین سلول‌های باکتریایی توسط مولکول‌های کوچک پیام‌رسان (Small signaling molecule, SM) انجام می‌شود (۱۸). این مولکول‌های پیام‌رسان در صورت رسیدن به یک حد نصاب (آستانه معین) منجر به شروع رویدادهای آبخاری در داخل سلول‌های باکتریایی کرده که در نهایت باعث تنظیم بیان ژن می‌شود. از این‌رو نام "سنجش حد

در کلستریدیوم پرفرینجنس، سیستم سنجش حد نصاب (Quorum sensing, QS) به عنوان یکی از سیستم‌های تنظیم بیان ژنی شناخته شده‌است که در تولید توکسین‌های اصلی و فرعی توسط باکتری و تنظیم بیان ژن آن‌ها اهمیت دارد. همچنین این سیستم در کلستریدیوم پرفرینجنس در فرآیندهای اسپورزایی، حدت بیماری‌زایی (۳) و تشکیل بیوفیلم نقش دارد که اهمیت دو چندان این سیستم را نشان می‌دهد. با توجه به اهمیت میزان تولید توکسین‌ها در سویه‌های واکسینال و مطالعات محدودی که تاکنون در زمینه‌ی تنظیم بیان توکسین‌های باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس انجام شده، در این مطالعه تلاش شده نقش سیستم سنجش حد نصاب در تنظیم بیان توکسین‌ها تشریح شود.

سیستم سنجش حد نصاب: باکتری‌ها برای حفظ بقا در محیط‌های مختلف نیازمند درک شرایط محیطی و پاسخ به آن برای سازگاری با شرایط محیطی هستند که این عمل از طریق بیان ژن صورت می‌گیرد. مکانیسم مهم مرتبط با سازگاری باکتری با محیط اطراف، فرآیند سیستم سنجش حد نصاب می‌باشد. این سیستم، مکانیسم تنظیم

سپس تغییرات لازم در ساختار این پروپیتید *agrD* توسط پروتئین *agrB* (۲۶ کیلودالتون) ایجاد می‌گردد. همچنین ژن‌های یک سیستم دو جزئی، به نام *agrAC*، در پایین دست *agrBD* قرار دارند. *agrC* (۴۶ کیلودالتون) یک پروتئین حس‌گر برای پیتید *agrD* است و هنگامی که غلظت این پروتئین خودالقاگر (AIP) به یک حد آستانه برسد، *agrC* فعال می‌شود. *agrC* فعال، موجب فعال‌سازی فاکتور تنظیم‌کننده‌ی پاسخ، یعنی *agrA* هم‌خانواده‌ی خود می‌گردد. فعال‌سازی *agrA* تنظیم رونویسی در باکتری را به‌دنبال دارد. جایگاه‌های مشابه *agr* در ژنوم سایر پاتوژن‌های کلتوریایی از جمله کلتوریوم دیفیسیل، کلتوریوم بوتولینوم و کلتوریوم اسپروژنز وجود دارد. کلتوریوم دیفیسیل و کلتوریوم اسپروژنز دارای چهار اپرون *agr* مانند است. درحالی‌که کلتوریوم بوتولینوم دارای دو اپرون *agr* مانند است که ظاهراً یکی تولید اسپور و دیگری تولید نوروتوکسین بوتولینوم را کنترل می‌کند (۲۳). کلتوریوم پرفرینجنس سویه‌ی ۱۳ دارای دو اپرون *agrBD* می‌باشد و هیچ سیستم دو جزئی (TCS) - *agrC* (*agrA*) در بالادست یا پایین‌دست *agrBD* در ژنوم کلتوریوم پرفرینجنس سویه ۱۳ وجود ندارد (۲۴).

بررسی نقش سیستم *agr* در تولید توکسین در کلتوریوم پرفرینجنس در مطالعه‌ای که توسط **Ohtani** و همکاران بر روی یک سویه‌ی جهش‌یافته *agrBD* به نام TS۲۳۰ انجام شد، ملاحظه گردید که کشت آن بر روی بلاه آگار همولیز ضعیفی را ایجاد نموده، اما وقتی این سویه با سویه‌ی جهش‌یافته‌ی *VirSR* همولیز منفی که سیگنال پیتید را تولید می‌کند، همزمان کشت داده‌شد، مجدداً توانایی خود را برای ایجاد همولیز در محیط کشت بلاه آگار به‌دست آورده و در قسمت‌های تلاقی‌یافته بر روی محیط کشت همولیز مشاهده شد. این تحقیق نشان داد که سویه‌ی TS۲۳۰ سیگنال لازم برای تحریک تولید توکسین θ (یا PFO) را از دست داده‌است، اما زمانی که سیگنال را از سویه‌ی دیگری دریافت کرد، توانست مجدداً تولید توکسین را فعال کند (۲۵). مطالعات متعددی در این زمینه

نصاب " برای توصیف این مکانیسم به‌کار گرفته‌شد (۱۹). این سیستم در باکتری‌های مختلف به‌وسیله انواع مولکول‌های ارتباطی عمل می‌کند که در زیر به تفصیل برای کلتوریوم پرفرینجنس بیان خواهد شد. سیستم سنجش حد نصاب در کلتوریوم پرفرینجنس شامل موارد زیر است:

۱- سیستم *agr* و پیتیدهای خودالقاگر

۲- سیستم دو جزئی *VirS/Vir R*

۳- سیستم خودالقاگر (AI) *The Autoinducer System*

کلتوریوم پرفرینجنس از دو سیستم سنجش حد نصاب بهره می‌برد. اولین سیستم از یک پیتید به عنوان مولکول سیگنال برای تنظیم بیان ژن استفاده می‌کند که سیستم تنظیم‌کننده ژن جانبی (Accessory gene (*agr regulator*) نامیده می‌شود (۱۸). در بسیاری از مطالعات، سیستم تنظیم بیان ژن دو جزئی (*Two-component regulatory System*) *Vir* نیز جزء *agr* می‌باشد که از مجموعه‌های سیستم سنجش حد نصاب استفاده می‌کند (۱۶). سیستم دوم، *luxS* نام دارد که اولین بار در *Vibrio harveyi* شناسایی شد. سیستم *luxS* بین باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مشترک بوده و در نتیجه تصور می‌شود از این سیستم به عنوان ابزاری برای برقراری ارتباط‌های بین‌گونه‌ای در باکتری استفاده می‌کنند (۲۰).

سیستم *agr* و پیتیدهای خودالقاگر: ژن‌های رمزگذار پروتئین‌های این سیستم در ژن جانبی (*agr*) قرار دارند (۳). در جایگاه *agr* چهار ژن وجود دارد که عبارت‌اند از *agrB*، *agrD*، *agrC* و *agrA*.

ژن *agrA* تنظیم‌کننده‌ی نسخه‌برداری، ژن *agrB* پروتئین غشایی لازم برای ترشح اتوپیتید و *agrC* حسگر غشایی برای دریافت سیگنال خودالقاگر را رمزگذاری کرده و *agrD* نیز پیش‌ساز اتوپیتید را می‌سازد (۲۱). سیستم *agr* یک سیستم ارتباطی در باکتری‌های گرم‌مثبت به‌ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۲۲). در *استافیلوکوکوس اورئوس*، پروپیتید خودالقاگر از ژن *agrD* تولید شده که

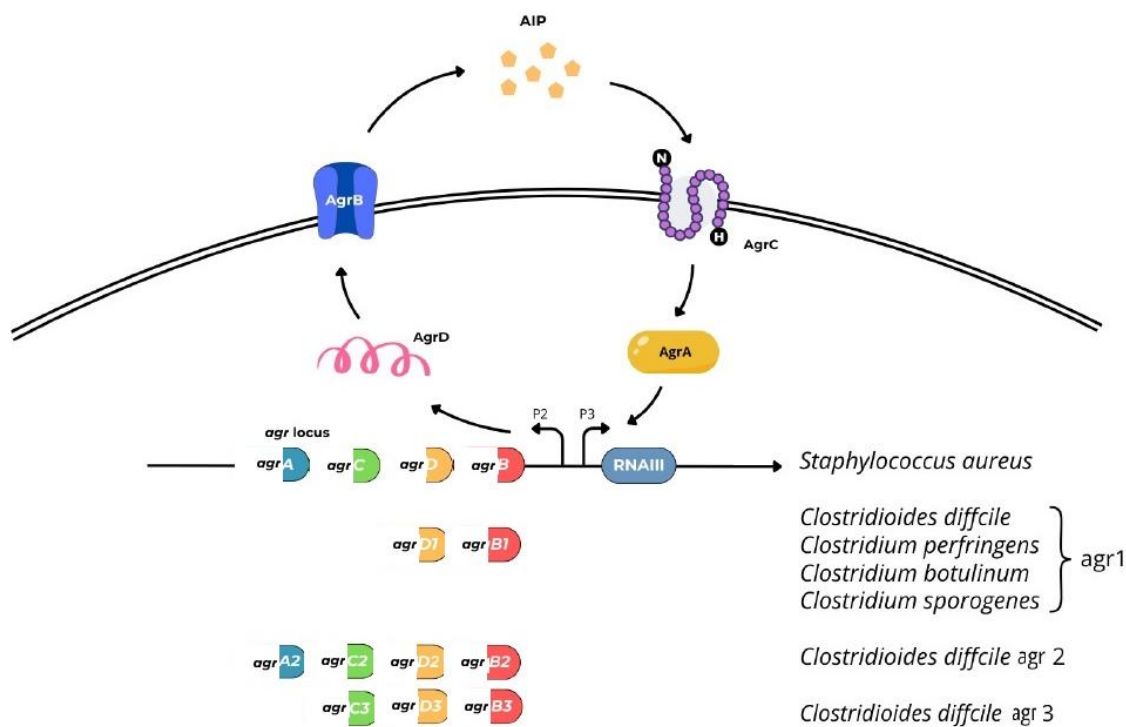
نقش سنجش حد نصاب در توکسین زایی کلاستریدیوم پرفرینجنس

معکوس کرد و تأیید کرد که توقف یا کاهش تولید توکسین به دلیل غیرفعال شدن جایگاه *agr* بود (۲۷). **Ma** و همکاران و **ویدال** و همکاران در مطالعاتشان نشان دادند که پپتید ۸ آمینواسیدی مشتق شده از پپتیدهای AgrD با نام R-۸ سبب افزایش تولید توکسین بتا می‌شود (۲۵). در مطالعه‌ی دیگری پس از بررسی اثر پپتیدهای سنتز شده‌ی پنج آمینواسیدی بر روی سویه‌های جهش‌یافته CN۱۷۹۵ تیپ B (*agrB null mutants*) یا CN۳۶۸۵ تیپ C که فاقد قدرت تولید پروتئین‌های AgrD و AgrB می‌باشد (این پروتئین‌ها تحت یک اوپران سنتز می‌شوند) مشاهده کردند که در هر دو سویه‌ی تحت اثر پپتید پنج آمینواسیدی حلقوی، سیگنالینگ به خوبی القا گردید در حالی که پپتیدهای شش اسید آمینه‌ای در بعضی از سویه‌ها قادر به ممانعت از تولید توکسین بودند (۲۸). همچنین توانایی حس سیگنال‌های پپتید خودالقاگر در سویه‌های مختلف باکتری، متفاوت است. ویدال در سال ۲۰۱۲ و **Ma** در سال ۲۰۱۵ گزارش نمودند که سویه CN۳۶۸۵ سیگنال‌های پپتید خود القاءگر سایر تیپ‌ها (تیپ‌های A, B, C و D) را به خوبی حس کرده، در حالی که CN۱۷۹۵ حتی پپتید خودالقاگر خود را به سختی حس کرد (۲۵, ۲۸). **Lyon** و همکاران نشان دادند که VirSR با AgrAC / استافیلوکوکوس اورئوس مطابقت دارد. رونویسی RNAlII را تنظیم می‌کند که در استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک عامل کلیدی سیستم *agr* است که بیان بسیاری از ژن‌ها را تنظیم می‌کند (۱۸). به نظر می‌رسد نحوه‌ی تنظیم بیان ژن توسط RNAlII با VR-RNA در کلاستریدیوم پرفرینجنس شباهت دارد. البته تفاوت در نحوه‌ی قرارگیری آن در ژنوم مشاهده می‌شود. به طوری که در استافیلوکوکوس اورئوس، ژن‌های تنظیم‌کننده در ژنوم جمع شده‌اند، اما در کلاستریدیوم پرفرینجنس، *virS/virR* VR-RNA و *agrBD* در ژنوم پراکنده هستند. در استافیلوکوکوس اورئوس پپتید سیگنالی که بیان ژن را تحریک می‌کند توسط *agrD* تولید می‌شود. در استافیلوکوکوس اورئوس بسته به توالی‌های اسید آمینه

در دهه ۱۹۷۰ انجام گردید که به توانایی تولید توکسین‌ها توسط کلاستریدیوم پرفرینجنس مربوط می‌شود. در این مطالعات، دو نوع سویه معرفی شدند: یکی با وجود دارا بودن ژن توکسین‌تتا، توکسین تولید نمی‌کرد و در کشت هم‌زمان نیز فعال نمی‌شد. سویه‌ی دوم، علی‌رغم نداشتن توکسین، در حضور سایر سویه‌ها توانست توکسین تولید کند. با توجه به این یافته‌ها، این تصور به ذهن رسید که باید یک سیگنال برای تحریک تولید توکسین تتا در کلاستریدیوم پرفرینجنس وجود داشته‌باشد. به نظر می‌رسد سیستم *agr* ارتباط تنگاتنگی با این پدیده دارد (۲۶). در مطالعه **Ohtani** در سال ۲۰۱۶ عنوان شد در سویه‌ی جهش‌یافته‌ی TS۲۳۰، رونویسی از ژن‌های *colA plc* و *pfoA* کاهش یافته اما با افزودن ژن *agrBD* مجدداً رونویسی فعال شد. به عبارت دیگر سویه‌ی نوع وحشی یا سویه‌ی مکمل می‌تواند ژن‌های مسئول رونویسی توکسین را در سویه‌ی جهش‌یافته TS۲۳۰ تحریک کند. این داده‌ها نشان داد که ناحیه‌ی *agrBD* در باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس مسئول تولید یک سیگنال است. آزمایشی دیگر با استفاده از سویه‌ی جهش‌یافته‌ی دوگانه‌ی *agrBD-virSR* نشان داد که سویه‌ی وحشی ۱۳ کلاستریدیوم پرفرینجنس نمی‌تواند بیان ژن تولید توکسین را تحریک کند. این نکته نشان می‌دهد اگرچه هیچ سیستم دو جزئی در اطراف ژن *agrBD* وجود ندارد ولی VirS به عنوان یکی از پروتئین‌های حس‌گر برای سیگنال پپتید وجود دارد (۲۴). در گزارش **Li** بیان شد *agrB* در سویه‌ی ۵۶۰۳ F (سویه‌ی بیماری‌زای غیرگوارشی انسان) می‌تواند تولید انتروتوکسین و توکسین بتا ۲ را به طور مثبت تنظیم کند. مطالعه او نشان داد در این سویه‌ی جهش‌یافته میزان تولید توکسین آلفا و پرفرنگولیزین O در طول رشد رویشی کاهش یافت. نکته مهم دیگر این است که وقتی سویه در محیط اسپورزایی کشت داده‌شد، سویه‌ی جهش‌یافته نتوانست به طور مؤثری اسپور تشکیل دهد و مانع تولید انتروتوکسین نیز گردید. افزودن *agrB* تا حدی یا به طور کامل، تمام تغییرات فنوتیپی در سویه‌ی جهش‌یافته را

وجود ندارد (۲۹). که در شکل ۱ نشان داده شده است.

AgrD در چهار گروه طبقه‌بندی می‌شود. در مقابل، چنین تنوع توالی اسید آمینه در AgrD کلاستریدیوم پرفرینجنس



شکل ۱- ساختار ژنتیکی و سازماندهی سیستم سیگنالینگ Agr با واسطه پپتید خودالقاگر در استافیلوکوکوس اورئوس، کلاستریدیوم دیفیسیل و کلاستریدیوم spp (۲۰)

همچنین نشان داده شد که سیستم agr برای ایجاد آنتریت نکروزان توسط سویه‌ی (CN۳۶۸۵) کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ B مورد نیاز بود (۲۵). یافته‌های فوق نشان داد که سیستم agr می‌تواند تولید توکسین بتا را در هر دو سویه‌ی کلاستریدیوم پرفرینجنس B و C تنظیم کند. در سویه CN۳۷۱۸ تیپ D نیز سیستم agr نقش مهمی در حدت سویه داشت، ولی تولید توکسین اپسیلون در سویه‌ی کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ B تحت تنظیم سیستم agr قرار نگرفت (۳۱). جالب توجه است سیگنالی که از agrD تولید می‌شود، سیگنالی برای VirS است. با این حال، در تنظیم تولید توکسین اپسیلون در سویه‌ی کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ D CN۳۷۱۸، تولید توکسین اپسیلون توسط سیستم agr تنظیم شد، نه توسط سیستم VirS/VirR. این اولین گزارشی بود که نشان می‌داد سیستم

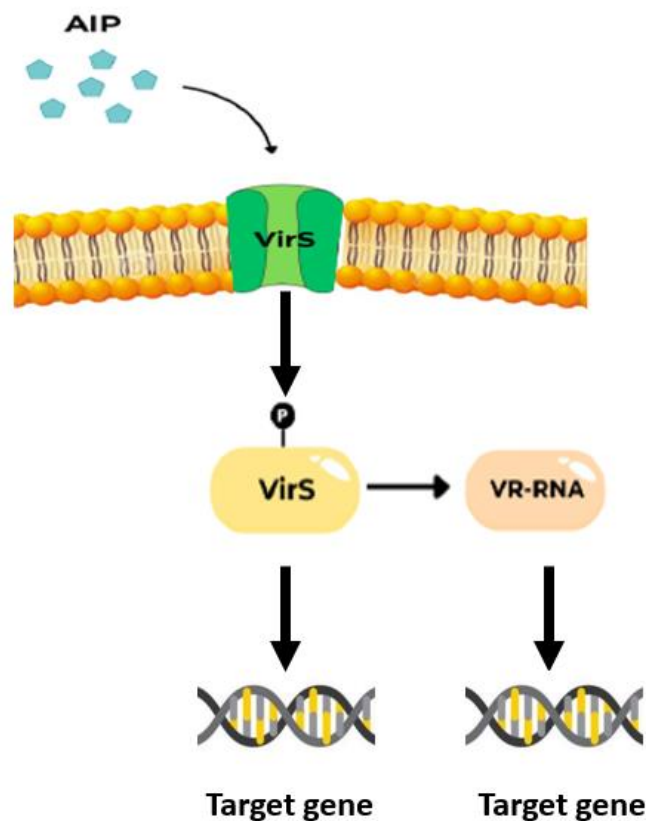
همان‌طور که در بالا اشاره شد تولید توکسین‌های کلاستریدیوم پرفرینجنس تحت کنترل سیستم Agr بسته به سویه‌های باکتری و منشاء سلولی، متفاوت عمل می‌کند. مثلاً سلول Caco-۲ که از روده‌ی بزرگ منشاء گرفته است و سلول MDCK از کلیه‌ی سگ نشأت گرفته است ممکن است، پاسخ متفاوت داشته باشند. (۶). مطالعه‌ی Chen نشان داد در سویه‌ی جهش یافته‌ی کلاستریدیوم پرفرینجنس فاقد agrB، میزان تولید توکسین بتا کاهش یافته است. با بازگردانی ژن agrB در سویه‌های کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ B CN۱۷۹۳ و تولید توکسین بتا مجدداً فعال شد، اما جهش در ژن agrB تاثیری در تولید توکسین اپسیلون (ETX) و توکسین بتا ۲ (CPB۲) نداشت (۳۱). آزمایش‌ها بر روی سویه CN۳۶۸۵ تیپ C نیز نشان داد که تولید توکسین بتا توسط سیستم agr تنظیم شد.

نقش سنجش حد نصاب در توکسین زایی کلستریدیوم پرفرینجنس

دخیل هستند (۳۶). در حالی که مطالعات Hassan و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که ژن‌های *pfoA* و *netB* به صورت مستقیم تنظیم می‌شوند (۳۷). تحقیق Mehdi-zadeh و همکاران نشان داد که *VirS* برای اتصال سیگنال پپتید حیاتی است، مشتق از AgrD است. (۸) *VirS/R* توسط سیگنالی فعال می‌شود که عامل اتوفسفوریلاسیون *VirS* و به دنبال آن انتقال فسفات به *VirR* است (۳۸). *VirR* فسفریله شده مستقیماً بیان ژن *pfoA* و *netB* را تنظیم می‌کند. همچنین *VirS/VirR* به طور غیرمستقیم بیان ژن‌های *cpa* و *cpb* را با فعال کردن تولید یک RNA تنظیمی کوچک به نام VR-RNA کنترل می‌کند. آبخار *VirS/VirR-VR-RNA* با تنظیم مثبت، پاتوژنز را کنترل می‌کند. همان‌طور که در بالا اشاره شد تنظیم بیان مستقیم توسط *VirS/R* انجام شده در حالی که در تنظیم غیرمستقیم توسط VR-RNA انجام می‌شود که در شکل ۲ نشان داده شد.

agr همیشه سیستم *VirS/VirR* را فعال نمی‌کند (۳۲).

سیستم دو جزئی *VirS/VirR*: تولید بسیاری از توکسین‌ها که توسط کلستریدیوم پرفرینجنس در طول رشد ریشی انجام می‌شود، تا حدی توسط سیستم تنظیمی دو جزئی *VirS/VirR* کنترل می‌شود (۶، ۲۴). در این سیستم *VirS* یک هیستیدین کیناز و *VirR* تنظیم‌کننده‌ی پاسخ است (۳۳). در سیستم دو جزئی پیام یا سیگنال، شرایط محیطی است. مطالعات پیشین در این باکتری نشان داده که ژن‌های توکسین آلفا (*plc*)، ژن پرفرینگولیزین O (*pfoA*) و کلاژناز، (*cola*) (۳۴)، *NetB* و توکسین بتا (*cpb*) توسط سیستم تنظیمی دو جزئی *VirS/VirR* (۳۵). در سطح رونویسی تنظیم می‌شود (۳۶). تحقیقات Ba-Thein و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان داد که این سیستم به طور مستقیم بیان *pfoA* را تنظیم کرد اما بیان ژن‌های توکسین-های دیگر را مستقیماً تنظیم نکرده و به احتمال زیاد شبکه‌ی تنظیمی شامل تنظیم‌کننده‌های ثانویه در این امر



شکل ۲- تنظیم بیان مستقیم و غیرمستقیم ژن توسط سیستم دو جزئی *VirS/VirR* (۳۰)

(SAM) (S-adenosyl- methionine) و پروتئین‌های حامل اسیدچرب و همولوگ‌های آن در سه مرحله‌ی آنزیمی ساخته می‌شود. SAM پیش‌سازی برای سنتز آسپیل هموسرین لاکتون و خودالقاگر است (۴۸). خودالقاگرها ممکن است واسطه‌ی کلونیزاسیون باکتریایی مجرای روده باشند لذا ترکیب باکتری-های روده را تغییر داده و پاسخ ایمنی میزبان را تغییر می‌دهند. این امر منجر به بیماری التهابی روده می‌شود (۳۰). آسپیل هموسرین لاکتون در *Sodomonas aurorizonus* به خوبی مطالعه شده و اطلاعات زیادی برای آن در دسترس است. در این باکتری آسپیل هموسرین لاکتون‌ها توسط پروتئینی به نام LasI (AHL سنتتاز) سنتز می‌شود. به دلیل تنوع آسپیل هموسرین لاکتون‌ها توسط LuxR های متنوع شناسایی می‌شوند. LasR پروتئین گیرنده‌ی سیتوپلاسمی بوده که فعال‌کننده‌ی رونویسی است و بیان ژن‌های هدف را از طریق شناسایی توالی‌های DNA هدف به نام *lux box* تنظیم می‌کند. پروتئین LasR دارای دو حوزه است N-terminal autoinducer binding domain (LBD) که شناسایی AHL‌ها را بر عهده دارد و C-terminal DNA binding domain (DBD) که عامل اتصال این پروتئین به DNA هدف است. بعد از اتصال آسپیل هموسرین لاکتون به پروتئین LasR، پروتئین دایمریزه شده و رونویسی از ژن‌ها فعال می‌شود (۴۹).

سیستم خود القاگر ۲ یکی دیگر از سیستم‌های رایج در باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است. تقریباً نیمی از باکتری‌هایی که توالی ژنوم آنها در پایگاه داده وجود دارد، دارای ژن *luxS* هستند (۵۰). *LuxS* (متالوآنزیم همودایمر کدگذاری شده توسط ژن *luxS*) سنتز کننده‌ی خود القاگر ۲ است. ساختار شیمیایی خود القاگر ۲ از مشتقات فورانوزیل بورات دی استر است که پیش ساز آن ۴-۵ دی هیدروکسی ۲-۳ پنتانندیون (DPD) می‌باشد.

مسیرهای بیوشیمیایی مربوط به تولید خودالقاگر

۴: DPD از SAM بوسیله *LuxS* سنتز می‌شود (۵۱). بنابراین SAM سوبسترای برای سنتز آسپیل هموسرین لاکتون و خودالقاگر ۲ است. به‌طور خلاصه، SAM که بستری برای انتقال متیل است، از بیوسنتز ال-متیونین و ATP تولید می‌شود. این واکنش توسط متیونین آدنوزیل

سیستم خود القاگر (AI) *The Autoinducer System*

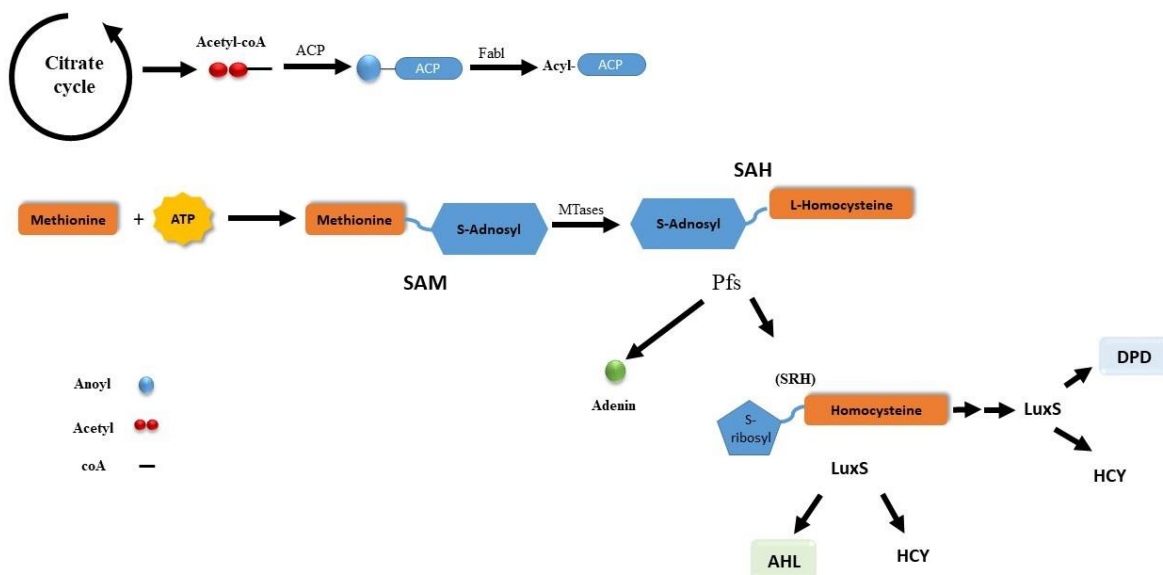
System سیستم خودالقاگر (autoinducer) یک سیستم رایج در باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است (۳۹) که توسط ترکیباتی به نام خودالقاگرها (AIP: autoinducing peptide) صورت می‌گیرد (۴۰). خودالقاگرها در محیط به عنوان نمایشگر تراکم جمعیت باکتری‌ها افزایش می‌یابند و باکتری‌ها این اطلاعات را برای تغییر در بیان ژن‌ها، ردیابی می‌کنند. باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی از سیستم‌های سنجش حد نصاب متفاوتی استفاده می‌کنند (۴۱، ۴۳). سیستم سنجش حد نصاب با واسطه‌ی پپتید حلقوی، اغلب در باکتری‌های گرم‌مثبت با GC پایین یافت می‌شود. هنگامی که غلظت خودالقاگرها در خارج سلول زیاد شود، به یک غشای گیرنده هیستیدین کیناز دو جزئی متصل می‌شوند (۴۴، ۴۵) معمولاً اتصال به گیرنده‌ی کیناز را فعال نموده که سبب اتوفسفریله شدن و اتصال فسفات به تنظیم‌کننده‌ی پاسخ هم‌جنس (Cognate) و نهایتاً رونویسی ژن‌ها در رگولون فعال می‌شود. گیرنده‌ی خودالقا-گرها در باکتری‌های گرم‌مثبت در غشای سیتوپلاسمی آنهاست. در برخی موارد در باکتریایی گرم‌مثبت، خودالقاگرها به داخل سیتوپلاسم سلول منتقل شده که در آن‌جا برای تعدیل فعالیت با فاکتور رونویسی تعامل دارند. این امر به نوبه‌ی خود تغییرات در بیان ژن را تعدیل می‌کند (۴۰).

در باکتری‌های گرم‌منفی، مولکول سیگنال، آسپیل هموسرین لاکتون (AHL) است (۴۶). آسپیل هموسرین لاکتون منسوب به مولکول خودالقاگر نوع یک هستند. این باکتری‌ها دارای خودالقا-گرهایی از جنس غیر پپتیدی می‌باشند که دارای یک هسته آسپیل هموسرین لاکتون بوده که یک زنجیره‌ی کربنی به آن متصل می‌شود (۳۰). این مولکول‌ها ممکن است دارای گروه‌های متفاوتی در زنجیره‌ی آسپیلی خود باشند و همچنین طول زنجیره‌های آسپیلی متفاوتی داشته باشند. بنابراین، مولکول‌های سیگنال متفاوت آسپیل هموسرین لاکتون متفاوتی وجود دارد، به عنوان مثال، oxododecanoyl-L-homoserine lactone یا hydroxydodecanoyl-L-homoserine lactone (۴۷). آسپیل هموسرین لاکتون از S-آدنوزین متیونین

نقش سنجش حد نصاب در توکسین زایی کلستریدیوم پرفرینجنس

دست‌خوش تغییرات بیشتری برای تشکیل مولکول فعال خودالقاگر ۲ می‌شود (۵۲). تصویر ۳ مراحل تولید AHL و DPD را نشان داده که توسط آنزیم‌های مختلف کاتالیز می‌شود. خودالقاگر ۲ در باکتری‌های گرم‌منفی به یک پروتئین متصل‌شونده پری‌پلاسمیک (LuxP) متصل شده سپس به یک کیناز (LuxQ) متصل می‌شود. در نهایت یک آبشار دی‌هیدروفسفریلاسیون را با تبدیل کیناز به فسفاتاز به راه می‌اندازد و نهایتاً بیان ژن هدف را تنظیم می‌کند (۵۳).

ترانسفراز (MAT) صورت می‌گیرد که محصول ژن *metK* می‌باشد. SAM از طریق از دست دادن گروه متیل با واسطه متیل ترانسفرازها (MTases) به S-adenosyl-L- (SAH) homocysteine تبدیل می‌شود. دو مسیر را طی می‌نماید: (a) فرآیند تک مرحله‌ای به هموسیستین (HCY)، توسط SAH-هیدرولاز یا (b) فرآیند دو مرحله‌ای. فرآیندی که توسط آنزیم‌های Pfs و LuxS کاتالیز می‌شود. نوکلئوزیداز Pfs به‌طور غیرقابل برگشتی SAH را به آدنین و SRH می‌شکند. LuxS، SRH را به DPD و HCY تبدیل می‌کند.



شکل ۳- نحوه تولید آسیل هموسرین لاکتون و ۴-۵ دی هیدروکسی ۲-۳ پنتانادیون

پرفرینجنس باعث تحریک لومینسانس سویه *V. i* ۱۷۰۱ *V. harveyi* BB شد، اما در سویه‌ی جهش‌یافته‌ی ۱۳ کلستریدیوم پرفرینجنس، LuxS نتوانست لومینسانس را تحریک کند (۲۲). این نتایج نشان داد که ژن *luxS* مسئول تولید سیگنالی است که لومینسانس *V. harveyi* وابسته به خودالقاگر ۲ را تحریک می‌کند. جهش *luxS* در سطح رونویسی *pfoA* را می‌توان با افزودن سوپرناتانت باکتری وحشی یا *اشرشیا کلی* DH5α حامل ژن *luxS*

بررسی نقش سیستم خودالقاگر در تولید توکسین در کلستریدیوم پرفرینجنس در کلستریدیوم پرفرینجنس، سیستم خودالقاگر ۲ (AL₂) در فاز میانی رشد لگاریتمی، بیان ژن‌های مرتبط با تولید توکسین را افزایش می‌دهد. *luxS* رونویسی *pfoA* و تولید توکسین تتا را فعال می‌کند و احتمالاً بر تنظیم پس از رونویسی توکسین‌های آلفا و کاپا تأثیر می‌گذارد (۲۴). در تحقیقی سوپرناتانت کشت سویه‌ی ۱۳ کلستریدیوم

کلستریدیوم پرفرینجنس مجدداً فعال کرد.

نقش خودالقاءگر ۲ در کلستریدیوم پرفرینجنس نتایج مطالعه‌ی پیشین نشان داد که ژن *luxS* برای تولید خودالقاءگر ۲ در کلستریدیوم پرفرینجنس ضروری است (۱۷).

خودالقاءگر ۲ ممکن است عامل مهمی برای حفظ تعادل فلور طبیعی و باکتری‌های بیماری‌زا باشد. علاوه بر این، از آنجا که گزارش شده است که خودالقاءگر ۲ بسیاری از فاکتورهای ویروالانس را تنظیم می‌کند، لذا *luxS* می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری‌های عفونی در نظر گرفته شود (۵۴).

خود خاموش‌سازی سنجش حد نصاب (sQQ)
(self-quorum quenching): به مکانیسم‌هایی که باعث توقف ارتباطات بین سلولی در باکتری‌ها می‌شود، خود خاموش‌سازی سنجش حد نصاب اطلاق می‌شود. ترکیباتی که مهارکننده‌ی سنجش حد نصاب می‌باشند را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد؛ مهارکننده‌های طبیعی و مهارکننده‌های سنتتیک. در کلستریدیوم پرفرینجنس بعضی از مواد تولیدشده در حین رشد باکتری نظیر اسیدها باعث خودخاموش‌سازی می‌شوند. **Adachi** و همکاران در مطالعه‌ای متوجه شدند که بیان ژن *pfoA* تا اواخر فاز رشد (late-log growth phase) افزایش یافت ولی بیان آن پس از زمانی خاموش گردید، که نشان‌دهنده‌ی وجود یک سیستم خود خاموش‌سازی حد نصاب است. همچنین سوپرناتانت در کشت فاز ثابت، بیان ژن‌هایی که توسط سیستم دوجزئی VirSR تنظیم می‌شوند را سرکوب کرد. سیستم خود خاموش‌سازی نسبت به حرارت پایدار بوده و پس از فیلتراسیون از طریق غشای اولترا فیلتراسیون نیز این فعالیت همچنان وجود داشت، که نشان می‌دهد مولکول‌های کوچک به عنوان عوامل خود خاموش‌سازی عمل می‌کنند. علاوه بر این، خود خاموش‌سازی توسط اسید استیک و اسید بوتیریک خالص در کشت فاز ثابت، القا شد؛ که نشان داد اسیدهای آلی تولید شده توسط کلستریدیوم پرفرینجنس در خود خاموش‌سازی نقش دارند. از سوی دیگر در کشت با pH کنترل شده، خود خاموش‌سازی تا حد زیادی کاهش یافت. به‌طور کلی، بیان ژن‌های عوامل حدت کلستریدیوم پرفرینجنس در سیستم خود خاموش‌سازی توسط متابولیت‌های اسیدی کاهش می‌یابد. این امکان

وجود استراتژی ضد ویروالانس با کنترل pH را نشان می‌دهد (۱۶). درصنعت از مهار فرآیند سنجش حد نصاب به عنوان اهداف درمانی استفاده می‌شود.

بحث

به جهت بقا و دوام در محیط‌های مختلفی همچون خاک، آب، مدفوع، روده و ماهیچه، سیستم‌های تنظیم‌کننده‌ی پیچیده‌ای برای تنظیم بیان ژن‌های توکسین‌زا در کلستریدیوم پرفرینجنس وجود دارد. این باکتری حداقل دو سیستم سنجش حد نصاب دارد (۱۷). اولین سیستم سنجش حد نصاب تا حدی شبیه سیستم Agr / استافیلوکوکوس اورئوس است، که *agr* به عنوان یک اپرون متشکل از چهار ژن کدکننده‌ی پروتئین‌های AgrA، AgrB، AgrC و D می‌باشد (۵۵). تحقیقات **Vidal** و همکاران نشان داد که اپرون *agr* در سویه‌ی ۱۳ کلستریدیوم پرفرینجنس جهش‌یافته تولید توکسین آلفا را کاهش داد. با افزودن سوپرناتانت سویه‌ی وحشی تولید توکسین مجدداً فعال شد (۳۳، ۵۶)، بنابراین به‌نظر می‌رسد تنظیم بیان این ژن تحت کنترل سیستم Agr قرار دارد. از سوی دیگر ژن رمزگذاری شده انتروتوکسین نیز تحت کنترل همین سیستم قرار داشته و در مرحله‌ی اسپورزایی تنظیم می‌شود (۲۷). در تحقیقات **Ohtani** و همکاران، بر روی توکسین‌های فرعی کاپا و تتا مشخص شد که تولید آن‌ها نیز تحت کنترل سیستم Agr قرار داشته و با افزودن سوپرناتانت سویه‌ی وحشی تولید توکسین مجدداً فعال شد (۳۳). توکسین بتا ۲ نیز توسط این ژن بیان شده و میزان آن تحت کنترل این ژن افزایش می‌یابد (۲۷). در حالی که در مطالعه **Chen** و همکاران در سویه‌های کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ B CN1۷۹۵ و CN۱۷۹۳ جهش‌یافته در ژن *agrB* تغییری در تولید توکسین بتا ۲ مشاهده نشد (۳۱) که به‌نظر می‌رسد تفاوت پاسخ به‌علت سویه‌های متفاوت باشد. برای توکسین بتا بیان ژن در کنترل این سیستم بوده و با حذف آن میزان تولید توکسین کاهش یافت (۲۸، ۳۱). **Chen** در سال ۲۰۱۱ گزارش کرد که تولید توکسین اپسیلون در کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ D تحت کنترل همین

نقش سنجش حد نصاب در توکسین‌زایی کلاستریدیوم پرفرینجنس

تولید توکسین نیز گزارش شده است (۶۰). تولید توکسین‌ها توسط متابولیت‌ها یا عوامل سیگما جایگزین در کلاستریدیوم پرفرینجنس در مقایسه با کلاستریدیوم دیفیسیل کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات تنظیم بیان ژن در این باکتری به درک بهتر بیماری‌زایی آن کمک می‌کند. ضمناً می‌تواند در اتخاذ تصمیمات بهتر جهت پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از کلاستریدیوم پرفرینجنس نیز راه‌گشا باشد. لذا تحقیقات گسترده‌تر در مورد مکانیسم‌های تنظیمی ویروالانس کلاستریدیوم پرفرینجنس بسیار مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد تنظیم بیان ژن‌های توکسین‌زا در کلاستریدیوم پرفرینجنس نتیجه‌ی تعامل چندین مسیر سیگنال‌دهی از جمله سیستم‌های Lux و Agr باشد. این تعاملات نه تنها در درک بیماری‌زایی این باکتری نقش کلیدی دارند، بلکه می‌توانند مبنایی برای طراحی استراتژی‌های نوین ضد باکتریایی و واکسن‌سازی مبتنی بر اختلال در سیستم‌های سنجش حد نصاب فراهم آورند. از سوی دیگر با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی که امروزه یکی از مهم‌ترین دغدغه‌ها در درمان شده است شاید بتوان نسل جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها را به‌خصوص در موارد حساسیت دارویی در آینده متصور شد که بر مبنای مهار سیستم سنجش حد نصاب طراحی شده‌باشند. همچنین شاید بتوان از این مهارکننده‌ها به‌صورت مکمل با دیگر داروها استفاده کرد تا پاسخ مناسب‌تری به درمان داده‌شود.

سیستم بود (۳۲). اگرچه در تحقیقات بعدی بر روی همین سویه مشخص شد که سیستم Agr بر روی بیان ژن تولید توکسین اپسیلون نقشی ندارد (۵۷) که مطالعه Chen را زیر سوال می‌برد.

دومین سیستم سنجش حد نصاب در کلاستریدیوم پرفرینجنس با واسطه *luxS* می‌باشد که بیان توکسین‌ها را از طریق رونویسی و پس از رونویسی کنترل می‌کند. سیستم *luxS* رونویسی ژن توکسین *pta* (*pfoA*) را افزایش داده و یک اثر تحریکی جزئی بر رونویسی ژن‌های توکسین آلفا (*plc*) و توکسین کاپا (*cola*) دارد. (۵۸، ۱۷).

همان‌طور که اشاره شد تولید توکسین‌های کلاستریدیوم پرفرینجنس تحت کنترل سیستم سنجش حد نصاب نظیر *agr* در سویه‌های مختلف باکتری، متفاوت است. مطالعه Vidal در سال ۲۰۰۹ که بر روی کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ D انجام شد افزایش قابل توجهی در بیان ژن *etx* و تولید توکسین اپسیلون نشان داد، اما بیان ژن *cpa* و افزایش تولید توکسین آلفا مشاهده نشد. درحالی‌که در کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ C CN۳۶۸۵ باعث افزایش قابل توجهی در بیان ژن *cpa* و تولید توکسین آلفا ملاحظه گردید (۵۹).

اگرچه بسیاری از سیستم‌های تنظیمی ژن‌های توکسین‌زا در باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس شناسایی شده‌اند، اما در مقایسه با سایر عوامل بیماری‌زا هنوز دانش محدودی در مورد نحوه‌ی تنظیم بیان ژن‌های توکسین‌زای این باکتری در اختیار داریم. در سایر کلاستریدیاهای بیماری‌زا به عنوان مثال، کلاستریدیوم دیفیسیل و کلاستریدیوم بوتولینوم گزارش شده‌است که اسیدهای آمینه خاصی در سرکوب تولید توکسین نقش ایفا می‌کنند و اهمیت وجود فاکتورهای سیگمای جایگزین برای تنظیم

References

- 1- **Salvarani FM, Vieira EV.** Clostridial Infections in Cattle: A Comprehensive Review with Emphasis on Current Data Gaps in Brazil. *Animals*. 2024;14(20):2919.
- 2- **Darkoh C, Asiedu GA.** Quorum sensing systems in clostridia. In: Kalia, V. (eds) Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight: Springer. 2014; 133-54.
- 3- **Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, et al.** Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 2014;9(3):361-77.
- 4- **McClane BA, Uzal FA., Fernandez-Miyakawa M., Lyerly D., Wilkins T D.** The enterotoxigenic clostridia: The prokaryotes.; 2004. 698–752 p.
- 5- **Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al.** Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018;53:5-10.
- 6- **Chen J, Ma M, Uzal FA, McClane BA.** Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut Microbes*. 2014;5(1):96-107.
- 7- **Abdolmohammadi Khiav L, Zahmatkesh A.** Vaccination against pathogenic clostridia in animals: A review. *Trop Anim Health Prod*. 2021;53(2):284.
- 8- **Mehdizadeh Gohari I, A. Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A. McClane BJV.** Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*. 2021;12(1):723-53.
- 9- **McDonel JL.** Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D, and E. *Pharmacol Ther.* Pergamon Press, Oxford; United Kingdom. 1986.
- 10- **Abdolmohammadi Khiav L, Emadi A, Zahmatkesh A.** A simple method for purification of epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D for serum neutralization assay. *J. Microbiol. Methods*. 2022;193:106395.
- 11- **Asadi A, Abdolmohammadi Khiav L, Emadi A, Dadar M.** Evaluation of humoral immune responses against *C. perfringens* epsilon toxin in Iranian sheep and goats after vaccination. *VAS*. 2023;21:100305[In Persian].
- 12- **Abdolmohammadi Khiav L, Paradise A.** Molecular and toxigenic characteristics of *Clostridium perfringens* type B isolates from sheep and lamb. *J Vet Res*. 2021.
- 13- **Uzal FA, Vidal J, McClane BA, Gurjar AA.** *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxinology*. 2010;2:24.
- 14- **Nealson KH, Platt T, Hastings JW.** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*. 1970;104(1):313-22.
- 15- **Irie Y, Parsek MR.** Quorum sensing and microbial biofilms. In: Romeo, T. (eds) Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer, Berlin, Heidelberg. 2008; 322. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_4
- 16- **Adachi K, Ohtani K, Kawano M, Singh RP, Yousuf B, Sonomoto K, et al.** Metabolic dependent and independent pH-drop shuts down VirSR quorum sensing in *Clostridium perfringens*. *J Biosci Bioeng*. 2018;125(5):525-31.
- 17- **Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T.** The luxS gene is involved in cell–cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol*. 44(1), 2002;44(1):171-9.
- 18- **Lyon GJ, Novick RP.** Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*. 2004;25(9):1389-403.
- 19- **Bassler BL.** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol*. 1999;2(6):582-7.
- 20- **Ohtani K, Shimizu T.** Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. *Toxins*. 2016;8(7):207.
- 21- **Wuster A, Babu MM.** Conservation and evolutionary dynamics of the agr cell-to-cell communication system across firmicutes. *J Bacteriol*. 2008;190(2):743-6.
- 22- **Novick RP, Muir TW.** Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol*. 1999;2(1):40-5.
- 23- **Cooksley CM, Davis IJ, Winzer K, Chan WC, Peck MW, Minton NP, et al.** Regulation of neurotoxin production and sporulation by a putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(13):4448-60.
- 24- **Ohtani K.** Gene regulation by the VirS/VirR system in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 41, 2016;41:5-9.

- 25- Vidal JE, Ma M, Saputo J, Garcia J, Uzal FA, McClane BA.** Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Mol Microbiol.* 2012;83(1):179-94.
- 26- Imagawa T, Higashi Y.** An activity which restores theta toxin activity in some theta toxin-deficient mutants of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol.* 1992;36(5):523-7.
- 27- Li J, Chen J, Vidal JE, McClane BA.** The Agr-like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603. *Infect Immun.* 2011;79(6):2451-9.
- 28- Ma M, Li J, McClane BA.** Structure-function analysis of peptide signaling in the *Clostridium perfringens* Agr-like quorum sensing system. *J Bacteriol.* 2015;197(10):1807-18.
- 29- Novick RP.** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 2003;48(6):1429-49.
- 30- Markowska K, Szymanek-Majchrzak K, Pituch H, Majewska A.** Understanding quorum-sensing and biofilm forming in anaerobic bacterial communities. *Int J Mol Sci.* 2024;25(23):12808.
- 31- Chen J, McClane BA.** Role of the Agr-like quorum-sensing system in regulating toxin production by *Clostridium perfringens* type B strains CN1793 and CN1795. *Infect Immun.* 2012;80(9):3008-17.
- 32- Chen J, Rood JI, McClane BA.** Epsilon-toxin production by *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 is dependent upon the agr operon but not the VirS/VirR two-component regulatory system. *mBio.* 2011;2(6): e00275-11. doi:10.1128/mbio. 00275-11.
- 33- Ohtani K, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, Shimizu T.** Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 2009;191(12):3919-27.
- 34- Lyrstis M, Bryant AE, Sloan J, Awad MM, Nisbet IT, Stevens DL, et al.** Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol.* 1994;12(5):761-77.
- 35- Yu Q, Lepp D, Mehdizadeh Gohari I, Wu T, Zhou H, Yin X, et al.** The Agr-like quorum sensing system is required for pathogenesis of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in poultry. *Infect Immun.* 2017;85(6):10.1128/iai. 00975-16.
- 36- Ba-Thein W, Lyrstis M, Ohtani K, Nisbet IT, Hayashi H, Rood JI, et al.** The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol.* 1996;178(9):2514-20.
- 37- Hassan S, Ohtani K, Wang R, Yuan Y, Wang Y, Yamaguchi Y, et al.** Transcriptional regulation of hemO encoding heme oxygenase in *Clostridium perfringens*. *J Microbiol.* 2010;48:96-101.
- 38- Kawsar HI, Ohtani K, Okumura K, Hayashi H, Shimizu T.** Organization and transcriptional regulation of myo-inositol operon in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004;235(2):289-95.
- 39- Xavier KB, Bassler BL.** LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003;6(2):191-7.
- 40- Rutherford ST, Bassler BL.** Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11):a012427.
- 41- Ng W-L, Perez L, Cong J, Semmelhack MF, Bassler BL.** Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in vibrios. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002767.
- 42- Novick R, Projan S, Kornblum J, Ross H, Ji G, Kreiswirth B, et al.** The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet.* 1995;248:446-58.
- 43- Williams P, Cámara M.** Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 2009;12(2):182-91.
- 44- Håvarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA.** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(24):11140-4.
- 45- Solomon JM, Lazazzera BA, Grossman AD.** Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 1996;10(16):2014-24.
- 46- Grech A, Balzan M.** Quorum sensing. The synapse. 2019;18(2): 11-3.
- 47- Pietschke C, Treitz C, Forêt S, Schultze A, Künzel S, Tholey A, et al.** Host modification of a

bacterial quorum-sensing signal induces a phenotypic switch in bacterial symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):E8488-E97.

48- Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol*. 2001;41(2):463-76.

49- Bottomley MJ, Muraglia E, Bazzo R, Carfi A. Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *J Biol Chem*. 2007;282(18):13592-600.

50- Federle MJ. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib. Microbiol*. 2009;16:18.

51- Slater RT, Frost LR, Jossi SE, Millard AD, Unnikrishnan M. *Clostridioides difficile* LuxS mediates inter-bacterial interactions within biofilms. *Sci Rep*. 2019;9(1):9903.

52- Zhang J, Zheng YG. SAM/SAH analogs as versatile tools for SAM-dependent methyltransferases. *ACS Chem Biol*. 2016;11(3):583-97.

53- Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saied KK, Schwartz RC, Sucic NT, et al. Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(2):417-23.

54- Belizário JE, Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol*. 2015;6:151578.

55- Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*. 2008;42(1):541-64.

56- Vidal JE, Chen J, Li J, McClane BA. Use of an EZ-Tn 5-based random mutagenesis system to identify a novel toxin regulatory locus in *Clostridium perfringens* strain 13. *PLoS One*. 2009;4(7):e6232.

57- Mehdizadeh Gohari I, Li J, Rood JI, McClane BA. Reevaluation of whether a functional Agr-like quorum-sensing system is necessary for production of wild-type levels of epsilon-toxin by *Clostridium perfringens* type D strains. *mBio*. 2022;13(2):e00496-22.

58- Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*. 1999;7(3):104-10.

59- Vidal JE, Ohtani K, Shimizu T, McClane BA. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cell Microbiol*. 2009;11: 1306- 1328. [https://doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01332.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01332.x)

60- Bouillaut L, Dubois T, Sonenshein AL, Dupuy B. Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Res. Microbiol*. 2015;166(4):375-83.



Volume 8, Issue 4, Winter 2026, pages: 44-62

۶۲

The role of quorum sensing in *Clostridium perfringens* toxinogenesis

Sima Azadmanesh¹; Lida Abdolmohammadi Khiav^{*2}; Ramin Bagheri Nejad³; Behjat Mjidi⁴

1- Graduated from Ph.D. Plant Bacteriology, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

2- Graduated from Ph.D. Bacteriology, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3- Graduated from Ph.D. Bacteriology, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

4- Graduated from Ph.D. Biochemistry, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

* Corresponding author: Graduated from Ph.D. Bacteriology- Address: Shahid Beheshti Blvd, Hesarak, Karaj, Alborz, IRAN. 3197619751 P.O.Box: 31975/148 – Tel: +98 2634050400 – Fax: +98 2634552194
Email: L.mohammadi@rvsri.ac.ir

Receive: June 12, 2025; Revise: July 8, 2025; Accept: July 11, 2025

 [10.22034/nfvm.2025.529961.1290](https://doi.org/10.22034/nfvm.2025.529961.1290)

Abstract

Clostridium perfringens is a gram-positive anaerobic spore-forming bacterium which is widely spread in nature. The bacterial pathogen is able to secrete protein toxins and enzymes which contribute to its pathogenicity. The regulation of gene expression of these toxins is controlled by a network that establishes cell-cell communication. In order to produce toxins, bacterial cells communicate through producing and recognizing extracellular signals, particularly specific small signaling molecules known as autoinducers. These quorum sensing signals are crucial for toxin production and virulence. This system also plays a role in the processes of sporulation and biofilm formation in this bacterium, which indicates the important role of this system. Considering the importance of toxin production in *C. perfringens*, vaccine strains and the limited studies that have been conducted so far. In this manuscript, the important role of the quorum sensing systems in the production and secretion of toxins in *C. perfringens* is investigated based on review of current studies. Finally, the results of the researches indicate that quorum sensing regulatory systems, including Agr and VirS/VirR two-component system, play an important role in regulating of the virulence genes expression in *C. perfringens*. Also, the role of autoinducer molecules in regulating of virulence genes and maintaining the balance of the intestinal microbiome will pave the way for the development of novel therapeutic targets to combat this pathogen. Overall, the regulation of gene expression in *C. perfringens* is complex and some toxin-producing genes cannot be considered as a completely separate system.

Keywords: Autoinducing peptide, Toxin production, Quorum sensing, *Clostridium perfringens*



اولین شناسایی مولکولی انگل خونی جنس *Dactylosoma* Labbe، ۱۸۹۴ در وزغ تالشی (*Bufo eichwaldi*) از شمال ایران

فاطمه عبداله‌هی^۱ و حسین جوان بخت^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسوول: تخصص و مدرک تحصیلی: دکتری بیوسیس‌توماتیک جانوری، تخصص انگل های خونی

آدرس: گیلان- رشت- دانشگاه گیلان- خ نامجو- دانشکده علوم پایه- گروه زیست شناسی تلفن تماس: ۰۹۱۱۲۴۱۴۰۹۳ - فکس: ۰۱۳۳۳۳۳۶۴۷

ایمیل: h.javanbakht@guilan.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۶ فروردین ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۷ آبان ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۵ آذر ۱۴۰۴

 10.22034/nfvm.2025.515051.1278

چکیده

انگل‌های کوکسیدیایی (*Apicomplexa: coccidian*) از مهمترین انگل‌های خونی هستند که از خزندگان و دوزیستان گزارش شده‌اند. داکتیلوزوماتیده یکی از چهار خانواده‌ای است که متعلق به کوکسیدیاهای آدلورینید و شامل جنس‌های *Babesiosoma* Jakowska and Nigrelli، ۱۹۵۶ و *Dactylosoma* Labbe، ۱۸۹۴ می باشد. این پروتوزوئ‌های خونی در خون محیطی مهره‌داران پست‌تر و اکثراً از دوزیستان گزارش شده‌است. وزغ تالشی (*Bufo eichwaldi*) یک دوزیست اندمیک بزرگ است که در جنگل‌های هیرکانی در شمال ایران و جنوب شرق آذربایجان پراکنش دارد. در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار شیوع و شناسایی ژنتیکی انگلهای خونی از جنس *Dactylosoma* در ۷۵ فرد از *B. eichwaldi* به عنوان یک گونه‌ی با وضعیت حفاظتی آسیب پذیر از شمال ایران مورد بررسی قرار گرفت. آلودگی به انگل‌های خونی در ۲۶/۶۶ درصد از نمونه‌ها مشاهده گردید. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از ژن ۱۸s rRNA نشان داد که ۱۰۰ درصد مشابهت با *Dactylosoma kermi* و *D. ranarum* وجود دارد. آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که داکتیلوزوما در مطالعه‌ی حاضر یک گروه مونوفایلیتیک با گونه‌های داکتیلوزوما تشکیل داده و به عنوان گونه مشابه با *Dactylosoma kermi* از وزغ *Sclerophrys gutturalis* و همچنین به عنوان کلاد خواهری با *D. ranarum*، *Dactylosoma* sp و *Babesiosoma stableri* قرار گرفت (Support>/۸۰). این اولین تعیین خصوصیت مولکولی از گونه *Dactylosoma* در وزغ‌های ایرانی است.

واژگان کلیدی: آپ‌ی‌کمپلکسا، دوزیستان، فیلوژنتیک، هموگریکارین، هیرکانی

مقدمه

دوزیستان بی‌دم به دلیل شکار موجودات دیگر از جمله بندپایان، نرم‌تنان، کرم‌های حلقوی و مهره‌داران کوچک و همچنین به عنوان منبع غذایی اصلی گروه‌های زیادی از جانوران، اهمیت بسزایی در کنترل آفات و همچنین پایداری زنجیره‌ی اکولوژیک یک منطقه دارند (۱). اخیراً ۷۱۶۶ گونه از دوزیستان بی‌دم در دنیا شناسایی شده‌اند (۲). از این تعداد ۱۹ گونه دوزیست بی‌دم (قورباغه و وزغ) از ایران شناسایی شده‌است که از این تعداد ۳ گونه‌ی وزغ و ۵ گونه‌ی قورباغه از استان گیلان گزارش شده‌است (۳). با وجود اهمیت بالای دوزیستان در اکوسیستم‌ها، این گروه جزو آسیب‌پذیرترین مهره‌داران طبیعت بوده و در طی سال‌های اخیر با نرخ بالایی از کاهش جمعیت مواجه بوده‌اند. مهمترین عوامل کاهش جمعیت، اثرات ناشی از فعالیت‌های انسانی و پاتوزن‌ها می‌باشند (۴). به دلیل چرخه‌ی زندگی منحصر به فرد بی‌دم‌ها (زیستگاه آبی و خشکی) آن‌ها تحت تاثیر طیف وسیعی از پاتوزن‌ها مانند انگل‌های خونی قرار دارند (۵). انگل‌های خونی در سه شاخه‌ی مهم قرار می‌گیرند: انگل‌های خونی تاژکدار، آپی کمپلکسا و نماتدهای فیلاریایی که همه‌ی آن‌ها سیکل زندگی چند میزبانه دارند (۶). انگل‌های خونی آپی کمپلکسا در دوزیستان تنوع بالایی دارند و در خانواده‌های زیر قرار می‌گیرند:

Hepatozoidae, *Haemogregarinidae* Léger, ۱۹۱۱
Dactylosomatidae Jakowska ۱۹۵۵, Wenyon, ۱۹۲۶
 and Nigrelli, (۷, ۸). آن‌ها به شکل بیضی، گرد، موز شکل در گلبول‌های قرمز یا حتی در گلبول‌های سفید خون وجود دارند (۹).

راسته‌ی آدلورینا شامل گروه بزرگی از انگل‌های خونی متعلق به رده‌ی کوسیدیا و شاخه‌ی آپی کمپلکسا هستند که طیف وسیعی از مهره‌داران شامل ماهیان، دوزیستان، خزندگان، پرندگان و پستانداران را آلوده می‌کنند. این انگل‌ها احتمالاً توسط بی‌مهرگان خون‌ناقل به‌عنوان میزبان اصلی که شامل حشرات دو بال، کنه، مایت و زالو

هستند به میزبانان مهره‌دار انتقال می‌یابند (۱۰، ۱۱). انگل‌های خونی آدلورینا چند میزبانه هستند که بر اساس تکوین در مرحله‌ی اسپوروگونی در ناقل میزبان متمایز می‌شوند (۱۲).

آلودگی گلبول‌های قرمز توسط پروتوزوآهای خونی می‌تواند باعث تغییر در مورفولوژی گلبول‌های خونی شود (۶). اهمیت بررسی پاتوزن‌ها در دوزیستان به این دلیل ثابت شده‌است که بعضی از آن‌ها مانند ویروس‌ها یا قارچ‌های کیتريد *Batrachochytrium dendrobatidis* (۱۳) یکی از عوامل مهم انقراض دوزیستان محسوب می‌شوند (۱۴). در ایران تحقیقات کمی در مورد انگل‌های خونی دوزیستان صورت گرفته‌است و تنها سه مطالعه در مورد انگل‌های خونی قورباغه مردابی انجام شده‌است (۱۵، ۱۷).

وزغ تالشی (*Bufo eichwaldi*) در کشورهای آذربایجان، مناطق قفقاز و شمال ایران در استان‌های مازندران و گیلان در مناطق مرطوب و سایه‌دار نواحی کوهستانی و جنگلی یافت می‌شود. این گونه هم اکنون به عنوان گونه‌ی در معرض خطر در لیست قرمز اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) قرار دارد (۱۸). پراکنش این گونه محدود به جنگل‌های هیرکانی، جنوب شرق آذربایجان و شمال ایران و تا ارتفاع ۱۲۰۰ متر از سطح دریا است (۱۹). با وجود پراکنش نسبتاً گسترده این وزغ در ایران تاکنون هیچ اطلاعاتی در مورد پاتوزن‌های این گونه وجود ندارد. در این مطالعه، شیوع و شدت انگل‌های خونی پروتوزوآیی وزغ تالشی در زیستگاه‌های مختلف استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در مجموع ۷۵ وزغ تالشی در شمال ایران در نزدیکی تالاب‌ها در بهمن و اسفند ۱۴۰۲ توسط تور و دست گرفته شدند (سوسان لاهیجان (37°18'10" N, 50°02'518" E)، سیاهکل (37°13'34" N, 49°82'23" E))

بر اساس مطالعات قبلی قطعه‌ای از ژن *s rRNA* ۱۸ در نواری Hep300 (5'-GTT TCT GAC CTA TCA GCT TTC GACG-3' و 5'-CAA ATC TAA GAA TTT CACCTC TGA C-3') تعیین شد که تقریباً ۶۰۰ جفت‌باز از ژن *18S rRNA* را رونویسی می‌کند (۲۱). واکنش PCR در ۲۵ میکرولیتر محلول حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکروگرم DNA الگو و غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر انجام شد. واکنش PCR شامل ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای جدا شدن دو رشته DNA، در پی آن ۳۰ سیکل شامل جدا شدن دو رشته‌ی در ۴۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و ساخته شدن رشته‌ی مکمل در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت اتصال نهایی رشته‌های مکمل در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. نتایج PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با نور UV مشاهده شد (۱۶، ۲۱). توالی‌یابی محصول نهایی، توسط شرکت سینا کلون تهران انجام شد.

تحلیل فیلوژنتیکی: توالی ژن *rDNA* ۱۸s با استفاده از (www.ncbi.nlm.nih.gov) BLAST تعیین هویت شد و با استفاده از برنامه BioEdit (ورژن ۷/۲) ویرایش شد. برای آنالیز فیلوژنتیک، توالی پیدا شده در این آزمایش با توالی‌های دانلود شده در بانک ژنی مورد استفاده قرار گرفت. فاصله‌ی ژنتیکی توالی جدید با نتایج NCBI توسط برنامه‌ی مگا (ورژن ۵/۱۰) محاسبه شد. برای دقت بالاتر، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوی حداکثر احتمال با نرم افزار PhyML (ورژن ۲/۴/۳) و مدل TPM_{ref+I+G} توسط نرم افزار Jmodel test (ورژن ۲/۱/۱۰) که با استفاده از AIC به عنوان بهترین مدل تکاملی تعیین شد، انجام گرفت. درخت فیلوژنتیک توسط نرم افزار FigTree (ورژن ۱/۳/۱) رسم شد. سکانس جدید در بانک ژنی با شماره دسترسی PX۴۵۹۵۶۱ ثبت شد.

کچا (E 49°60'88" N, 37°08'80")، سقالکسار (E 49°52'80" N, 37°15'64")، سراگاه (E 48°88'07" N, 37°82'70"). چند قطره خون از هر وزغ گرفته شد و جهت تهیه‌ی اسمیر خونی بر روی لام و همچنین آزمایش ژنتیکی در ویال حاوی اتانول استفاده شد. در خون‌گیری از نمونه‌ها تلاش شد به وزغ‌ها آسیب نرسد. خون‌گیری از ورید صورت و یا قلب بسته به اندازه وزغ‌ها توسط سرنگ انسولین انجام گرفت. وزغ‌ها بعد از خون‌گیری در محیط‌ها شدند.

رنگ آمیزی و بررسی میکروسکوپی: از خون گرفته شده گسترش‌های خونی تهیه شد و گسترش‌ها در هوا خشک شدند. سپس به مدت ۲ دقیقه توسط الکل متانول مطلق فیکس شدند. لام‌ها در دمای طبیعی خشک شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول گیمسا ۱۰٪ قرار گرفته و رنگ‌آمیزی شدند. بررسی لام‌ها و انگل‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ و به کمک روغن ایمرسیون انجام شد. تلاش شد به‌طور یکسان ۱۰ میدان و حداقل ۱۰۰۰۰ گلبول قرمز برای هر نمونه بررسی شود (۲۰). تنوع و شیوع انگل‌های خونی در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. عکس‌ها توسط نرم افزار TSVIEW ورژن ۶.۲.۴.۵ ثبت شدند.

آنالیز مولکولی: از خون وزغ‌هایی که در آن‌ها انگل مشاهده شد برای شناسایی مولکولی استفاده شد. استخراج DNA نمونه‌ی خون توسط بافر درجنت Triton X-۱۰۰ (با فرمول: بافر لیزکننده ۱ (حاوی ۰/۱۵۷ گرم Tris-Hcl، ۱۱ گرم ساکارز ۰/۱۰۱ گرم Mgcl2 و ۱ میلی‌گرم Triton X-۱۰۰ که با ۹۹ میلی‌گرم آب مقطر به حجم رسیده است) و بافر لیزکننده ۲ (حاوی ۰/۱۵۷ گرم Tris-Hcl، ۰/۳۷۵ گرم EDTA و ۰/۲۹۴ گرم سدیم‌سیترات که با آب مقطر به حجم رسیده است)، سدیم‌دودسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد ۱۰ گرم، کلرید سدیم اشباع ۰/۶ مولار، ۳۵ گرم، کلروفرم، اتانول سرد، آب مقطر آمپولی (دوبار تقطیر)) انجام شد (۱۶). توالی پرایمر

نتایج

در این مطالعه، مجموعاً ۷۵ وزغ با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد، ۲۰ وزغ آلوده به انگل‌های هموگریگارینی بودند (شیوع ۲۶/۶۶٪). بررسی شیوع انگل با توجه به لوکالیته نشان داد که کچا با ۵۳/۳٪ (۸ عدد از ۱۵ وزغ) بیشترین شیوع انگل‌ها را دارا بود. بعد از آن سرآگا با ۲۶/۶۶٪ (۴ از ۱۵)، سیاهکل ۲۵ درصد (۲ از ۸)، سوستان ۱۶/۶۶ (۲ از ۱۲) و ساقلکسار ۱۶ درصد (۴ از ۲۵) قرار داشتند. این انگل‌ها به صورت شفاف، با سیتوپلاسم فاقد رنگ‌پذیری و اشکال گرد، کشیده و آمیبی‌فرم در داخل گلبول‌های قرمز مشاهده شدند. تغییر شکل هسته یا گلبول قرمز در اثر حضور انگل در گلبول‌های قرمز مشاهده نگردید. بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی مراحل خونی مورد بررسی، این انگل‌ها به‌عنوان تروفوزوئیت‌های جنس *Dactylosoma* شناسایی شدند.

برای تعیین دقیق‌تر گونه انگل، آنالیز مولکولی ژن ۱۸S rRNA در یکی از نمونه‌ها انجام شد. نتایج فیلوژنتیکی حاصل از تحلیل این ژن نشان داد که توالی به‌دست آمده در این مطالعه در یک کلاسه با سایر توالی‌های وابسته به جنس *Dactylosoma* قرار گرفت. توالی نمونه‌ی مورد مطالعه به همراه توالی‌های *Dactylosoma kermi* کدهای GenBank: MN۸۷۹۳۹۴ ، MN۸۷۹۳۹۸

(MN۸۷۹۳۵۵) در یک شاخه با پشتیبانی آماری نسبتاً بالا (Bootstrap=۷۳۱) خوشه‌بندی شدند. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی قرابت فیلوژنتیکی بالای توالی نمونه با *D. kermi* است، هرچند تفاوت‌های ژنتیکی مشاهده‌شده ممکن است نمایان‌گر گونه‌ای جدید یا واریانت درون‌گونه‌ای باشد.

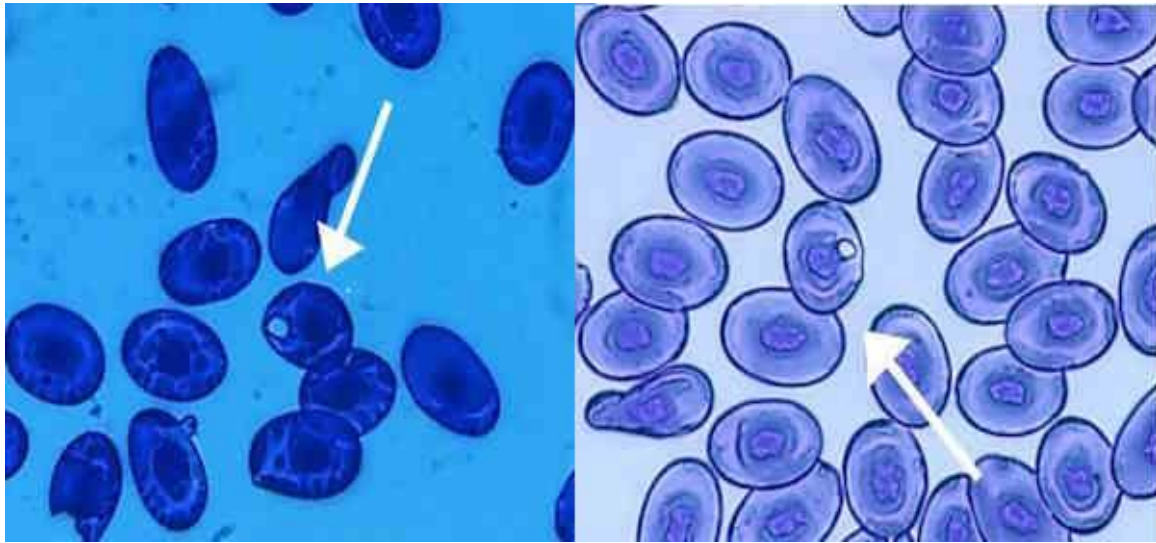
علاوه بر این، توالی نمونه فاصله ژنتیکی قابل توجهی با گونه‌های دیگر مانند *Dactylosoma ranarum* و *Babesiosoma stableri* داشته و تمایز آن از این گروه‌ها را تأیید می‌کند. این توالی‌ها به عنوان گروه خواهری با گروه انگل‌های *Dactylosoma ranarum* که در میزبان‌های *Pelophylax kl* و *Pelophylax esculentus* از اروپا و آمریکا و همچنین *Dactylosoma* sp که در قورباغه *Pelophylax ridibundus* از ایران گزارش شده‌اند، قرار گرفته‌اند.

برای تعیین دقیق جایگاه آرایه‌ای این توالی، مطالعات بیشتری شامل بررسی‌های مورفولوژیک، چرخه‌ی زندگی، و داده‌های بوم‌شناسی ضروری است. یافته‌های این مطالعه گامی در جهت شناخت تنوع ژنتیکی در جنس *Dactylosoma* در نواحی مورد مطالعه محسوب می‌شود. این مطالعه نخستین گزارش از وجود انگل داکتیلوزوما و همچنین اولین گزارش انگل‌های خونی آبی کمپلکسا در وزغ‌های تالشی محسوب می‌شود.

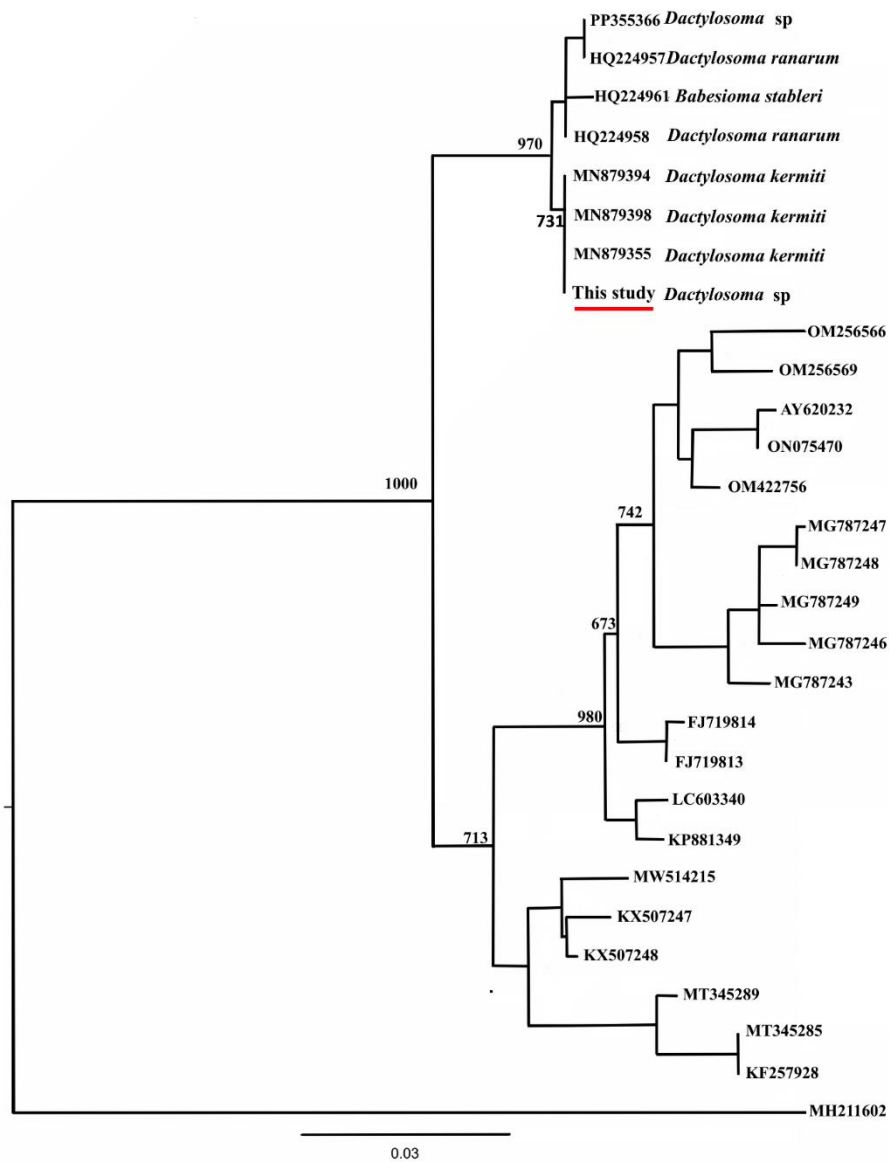
Taxonomic summary

Phylum:	Apicomplexa	Levine,	۱۹۷۰
Class:	Conoidasida	Levine,	۱۹۸۸
Subclass:	Coccidia	Leuckart,	۱۸۷۹
Order:	Eucoccidiorida	Léger,	۱۹۱۱
Suborder:	Adeleorina	Léger,	۱۹۱۱
Family:	Dactylosomatidae	(Jakowska&Nigrelli)	۱۹۵۵
Genus:	<i>Dactylosoma</i> Labbé		۱۸۹۴
Species:	<i>Dactylosoma</i> sp		
Host:	Talysh Bufo (<i>Bufo eachwaldii</i>)		
Other host in Iran:	<i>Pelophylax ridibundus</i>		

شکل ۱: انگل جنس *Dactylosoma sp* در وزغ تالشی (*B. eichwaldi*)



شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی گونه *Dactylosoma sp* بر اساس ژن ۱۸S rRNA



بحث و نتیجه‌گیری

دوزیستان دارای چرخه زندگی دو مرحله‌ای هستند که شامل فاز لاروی آبی و فاز خشکی پس از دگردیسی می‌باشد، و این امر باعث وابستگی آن‌ها به هر دو زیستگاه می‌شود (۲۲). این گروه مهره‌داران خون‌سرد و دارای پوست نفوذپذیر هستند که آن‌ها را نسبت به تغییرات محیطی آسیب‌پذیر می‌کند (۴). در چند دهه اخیر، کاهش جمعیت و انقراض جهانی دوزیستان باعث افزایش توجه محققان به آن‌ها شده‌است؛ تحقیقات نشان می‌دهد که بزرگ‌ترین عامل تهدید این گونه‌ها، تخریب زیستگاه ناشی از فعالیت‌های انسانی و تغییرات اقلیمی است (۴).

دوزیستان میزبان انواع متعددی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها هستند (۲۳). برخی از این عوامل پاتوژن به صورت اتفاقی، برخی بالقوه مشترک زئونوتیک و برخی باعث بیماری‌های مهمی شده و نقش مهمی در کاهش جمعیت دوزیستان ایفا می‌کنند (۲۴). در مطالعه‌ی حاضر، حضور انگل‌های آپی کمپلکسا در خون وزغ‌های تالشی شمال کشور به تأیید رسید که شامل انگل جنس *Dactylosoma* sp بود. اگرچه نمونه‌های مورد مطالعه در یک کلاد با *D. kermi* قرار گرفتند، به دلیل تمایز ناکافی، برای شناسایی دقیق‌تر گونه، نیازمند نمونه‌های بیش‌تری از توالی‌های این انگل هستیم. اخیراً پنج گونه از جنس *Dactylosoma* شناسایی شده‌اند که دو گونه میزبان ماهیان و سه گونه دیگر میزبان دوزیستان بی‌دم هستند (۲۵). گونه‌ی *Dactylosoma ranarum* رایج‌ترین و پر شیوع‌ترین گونه است که از چندین گونه دوزیست بی‌دم از جمله *Pelophylax esculentus*، *Rhinella marina* و *Pelophylax ridibundus* گزارش شده‌است.

انگل‌های آپی کمپلکسا، از گروه هموگریگارینی‌ها، انگل‌های خونی با چرخه زندگی چندمیزبانه شامل میزبان مهره‌دار و ناقل بی‌مهره بندپا هستند (۱۰). طیف وسیعی از بندپایان مانند پشه‌ها، مگس‌ها، کنه‌ها، مایت‌ها و زالوها به عنوان ناقل‌های قطعی عمل می‌کنند (۱۰). تا کنون

چرخه‌ی کامل زندگی هیچ‌یک از گونه‌های جنس *Dactylosoma* گزارش نشده‌است؛ با این حال، *Barta* به طور آزمایشگاهی انتقال *D. ranarum* به قورباغه‌ها از طریق زالورا نشان داده‌است (۲۶). با توجه به مناطق پراکنش انگل *Dactylosoma*، فرضیه‌ی انتقال آن توسط مگس‌های شنی جنس *Phlebotomus*، که ناقل طیف متنوعی از انگل‌های خونی به دوزیستان هستند، مطرح شده‌است؛ اگرچه شواهد تأیید شده‌ای در این زمینه موجود نیست (۲۵).

Dactylosoma در میان مهره‌داران عمدتاً در دوزیستان و ماهیان یافت می‌شود. مطالعه‌ای در آفریقا و اروپا روی ۶۴۳ دوزیست بی‌دم از ۳۸ گونه نشان داد که تنها در سه گونه‌ی بی‌دم، آلودگی به *Dactylosoma* شناسایی شده‌است که شامل قورباغه *Ptychadena anchietae* آلوده به *D. kermi*، قورباغه *Pelophylax lessonae* آلوده به *Dactylosoma* sp و وزغ *Sclerophrys gutturalis* آلوده به *D. kermi* بودند (۲۵). شیوع آلودگی در قورباغه‌ها ۳۸ درصد و در وزغ‌ها ۱۲ درصد گزارش شده‌است. گونه‌هایی مانند *Ptychadena* به دلیل زندگی در زیستگاه‌های متنوع و عادات غذایی گوناگون، به طیف وسیعی از انگل‌های خونی آلوده می‌شوند (۲۷).

مطالعه‌ای توسط **Netherlands** و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که ۱۶/۷٪ (۱۳ از ۷۸ نمونه) از گونه‌ی *Ptychadena anchietae* آلوده به انگل بودند (۲۵). همچنین **Rahimi** و همکاران با بررسی چهار قورباغه مردابی *Pelophylax ridibundus* در شمال ایران، وجود یک نمونه‌ی آلوده به *Dactylosoma* sp (۲۵٪) را گزارش کردند که شدت آلودگی ۰/۰۲٪ بود (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر، شیوع آلودگی در وزغ‌ها ۲۶/۶۶ درصد گزارش شده‌است. انگل‌هایی مانند *Dactylosoma* ممکن است در میزبان مهره‌دار برای مدت طولانی بدون نیاز به آلودگی مجدد حفظ و تکثیر شوند که این موضوع به توانایی تولیدمثل غیرجنسی متعدد آن‌ها در گلبول‌های قرمز مربوط می‌شود. مشابه انگل‌هایی مانند جنس *Hepatoozon*، این انگل‌ها نیازمند آلودگی مجدد میزبان

گزارش کردند.

مطالعه‌ای در آفریقای جنوبی مقایسه‌ای بین انگل‌های خونی بی‌دم با چرخه‌ی زندگی متفاوت (آبزی، نیمه‌آبزی، خشکی‌زی و نیمه‌خشکی‌زی) انجام داد که نشان داد شیوع گونه‌های انگل‌های آبی‌کمپلکس‌سای در گونه‌های نیمه‌آبزی و نیمه‌خشکی‌زی بیشتر است، احتمالاً به دلیل فراوانی ناقل‌های بالقوه در حاشیه‌ی رودخانه‌ها (۲۸).

غذایابی محیطی نیز ممکن است نقش مهمی در انتقال انگل‌های خونی در بی‌دمان داشته باشد؛ برای مثال، گونه‌هایی از کلئوپترا، ایزوپترا و فورمیدا که حدود ۵۰٪ غذای بی‌دمان از خانواده‌های Hyllidae، Bufonidae و Leptodactylidae را تشکیل می‌دهند، به‌عنوان دومین عامل مهم انتقال انگل‌های خونی مطرح شده‌اند (۳۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که نماتوسران‌ها (Nematocera) مهم‌ترین طبقه غذایی قورباغه‌های درختی خانواده Hyllidae مانند *Dendropsophus nanus* و *Dendropsophus sanborni* هستند (۳۲).

کوکسیدیاها احتمالاً مهم‌ترین آبی‌کمپلکس‌ها در مهره‌داران هستند که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، به‌جز گونه‌هایی که باعث بیماری در حیوانات خانگی می‌شوند (۳۳). طبق بررسی *Duszynski* و همکاران (۳۳)، تاکنون ۳۸ گونه‌ی *Eimeria*، ۱۱ گونه‌ی *Isospora*، دو گونه‌ی *Goussia* و یک گونه‌ی *Hyaloklossia* در دوزیستان شناسایی شده‌است. در آینده، نیاز به مطالعات بیشتر درباره جنبه‌های زیست‌شناسی و مورفولوژیکی این گروه از دوزیستان احساس می‌شود. همچنین برای حفاظت دوزیستان و بررسی تأثیرات احتمالی پاتوژن‌های خونی بر سلامت آن‌ها، مطالعات بیشتر ضروری است.

اگرچه بسیاری از محققان این انگل‌های خونی پروتوزوایی را غیرپاتوژنیک می‌دانند، اما برخی مانند *Da Costa* و *de Moura* (۳۴) تغییرات مورفولوژیکی در گلبول‌های قرمز، از جمله از دست دادن هسته و هیپرتروفی، را در قورباغه *Leptodactylus ocellatus* آلوده به انگل

نیستند، بنابراین تفاوت‌های گزارش‌شده در میزان آلودگی در مناطق و زمان‌های مختلف ممکن است به این موضوع مرتبط باشد (۲۸).

ژن *rRNA* ۱۸s به‌عنوان یک مارکر مناسب برای بررسی طیف وسیعی از انگل‌های آبی‌کمپلکس‌ساخته شده و داده‌های زیادی درباره اعضای راسته *Adelina* در دست است. این ژن دارای نواحی حفاظت شده و متغیر است که اطلاعات تکاملی کافی برای تحلیل روابط فیلوژنتیکی در فواصل ژنتیکی مختلف فراهم می‌کند (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، همانگونه که انتظار می‌رفت، توالی‌های *Dactylosoma* به دست آمده با *D. ranarum* و *D. kermiti* در یک کلاد با حمایت قوی قرار گرفتند و فاصله‌ی ژنتیکی بین آن‌ها صفر بود. فاصله‌ی ژنتیکی سایر جنس‌های هموگریگارینی مانند *Haemogregarina*، *Karyolysus*، *Hemolivia* و *Hepatozoon* حدود ۱٪ یا کم‌تر است. بر اساس مقایسه‌ی توالی‌های ژن حفاظت شده *rRNA* ۱۸s، به‌نظر می‌رسد فاصله‌ی ژنتیکی بین *Dactylosoma*‌های میزبان دوزیستان به‌طور خاص پایین است. بنابراین، افزایش نمونه‌برداری از *Dactylosoma* به‌ویژه در میزبان‌های ماهی، برای مقایسه و تأیید این موضوع که آیا این فاصله کم در ژن *rRNA* ۱۸s مختص همه‌ی *Dactylosoma*‌ها است یا تنها در میزبان‌های دوزیستان دیده می‌شود، اهمیت دارد. با توجه به نوع چرخه‌ی زندگی اکثر دوزیستان بی‌دم، آن‌ها ممکن است در معرض انواع پروتیسته‌های منتقل‌شده توسط ناقل‌ها قرار گیرند، به‌ویژه گونه‌هایی که شب‌زی و نیمه‌آبزی هستند و به‌عنوان میزبان بالقوه انگل‌های خونی داخل و خارج سلولی عمل می‌کنند (۳۰). *Barta* و *Desser* (۵) وجود انگل‌های خونی را در اسمیبرهای خونی دوزیستان کانادا بررسی کردند و شیوع بالای انگل‌های خونی را در گونه‌هایی با مرحله آبزی مانند *L. catesbeianus*، *Lithobates clamitans* و *L. septentrionalis* نسبت به گونه‌های خشکی‌زی مانند *Lithobates sylvaticus*، *Anaxyrus americanus*، *Pseudacris crucifer* و *Plethodon cinereus*

Lankestrella sp گزارش کرده‌اند. این یافته‌ها توسط محققان دیگر نیز تأیید شده‌است (۳۰, ۳۵). همچنین قطعه قطعه شدن هسته و از دست دادن هموگلوبین توسط انگل *Hepatozoon* گزارش شده‌است (۳۶). برخی گزارش‌ها نقص در گلبول‌های قرمز و برآمدگی غشای سیتوپلاسمی و چسبندگی گلبول‌های قرمز در اثر آلودگی به انگل‌های آپیکمپلکسایی را بیان کرده‌اند (۳۷, ۳۸). در مطالعه‌ی حاضر هیچ‌گونه شواهدی از آسیب هسته یا تغییر شکل گلبول قرمز به دلیل وجود انگل *Dactylosoma* مشاهده نشد، اما بررسی‌های بیشتر با تمرکز بر عوامل پاتوژنیتیه این انگل پیشنهاد می‌شود.

با تکیه بر اطلاعات به دست آمده از این مطالعه و سایر تحقیقات مرتبط با زندگی وزغ، می‌توان استراتژی‌های حفاظتی مؤثرتری برای تضمین بقای بلندمدت وزغ *B. eichwaldi* در جنگل‌های هیرکانی، که پناهگاهی حیاتی برای این گونه و سایر موجودات بومی است، تدوین کرد. مطالعات آینده باید بر انتقال انگل‌ها، عوامل اکولوژیکی مؤثر بر الگوهای آلودگی و تأثیرات آن‌ها بر میزبان متمرکز شوند. آگاهی از این اطلاعات برای درک تأثیر انگل‌ها بر تنوع زیستی بسیار مهم است و پیامدهای مهمی برای حفاظت به‌ویژه در گروه‌های میزبان آسیب‌پذیر مانند دوزیستان دارد. مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار وجود انگل‌های آپیکمپلکسایی از جنس *Dactylosoma* را در وزغ‌های تالشی شمال ایران تأیید کرد و نشان داد که این انگل‌ها با شیوع قابل توجهی (حدود ۲۶/۶٪) در جمعیت وزغ‌ها حضور دارند. تحلیل‌های مولکولی و فیلوژنتیکی مبتنی بر ژن *s*

۱۸rRNA، قرابت بالای نمونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های شناخته‌شده مانند *Dactylosoma kermi* را نشان داد، هرچند که تفاوت‌های ژنتیکی موجود ممکن است نمایانگر گونه جدید یا واریانت درون‌گونه‌ای باشد. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی تنوع ژنتیکی قابل توجه در جنس *Dactylosoma* در این نواحی است که نیازمند بررسی‌های بیشتر و گسترده‌تر است. با توجه به سیکل زندگی چند میزبان و ناقل‌های متعدد این انگل‌ها، تحقیقات بیشتر در زمینه‌ی بررسی چرخه‌ی زندگی کامل، زیست‌شناسی، اکولوژی و ناقل‌های احتمالی، جهت تعیین دقیق جایگاه آرایه‌ای و پویایی انتقال انگل‌ها ضروری است. همچنین تأثیرات بالقوه این انگل‌ها بر سلامت میزبانان و نقش آن‌ها در کاهش جمعیت دوزیستان بایستی به دقت بررسی شود. با تکیه بر اطلاعات به دست آمده، این مطالعه می‌تواند نقطه‌ی آغازی برای تدوین استراتژی‌های حفاظتی موثر در راستای حفظ گونه‌ی وزغ *B. eichwaldi* و سایر دوزیستان منطقه باشد؛ گونه‌هایی که به علت آسیب‌پذیری زیستگاه‌ها و تهدیدات زیست‌محیطی در معرض خطر قرار دارند. حفاظت از زیستگاه‌های طبیعی و کنترل عوامل تهدیدکننده می‌تواند به حفظ تنوع زیستی، سلامت اکوسیستم‌های تالشی و تضمین بقای بلندمدت این گونه‌های حساس کمک شایانی نماید. در نهایت، مطالعه و شناخت بهتر انگل‌های خونی و تعاملات آن‌ها با میزبان، علاوه بر ارزش علمی، اهمیت حیاتی در حفاظت و مدیریت پایدار جمعیت دوزیستان دارد و می‌تواند افق‌های جدیدی در زیست‌شناسی این گروه از مهره‌داران باز کند.

References

- 1- Faggioni GP, Souza FL, Uetanabaro M, Landgraf-Filho P, Prado CPA. Diet of *Leptodactylus bufonius* Boulenger, 1894, in the Brazilian Chaco, 2017. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/163100>.
- 2- Frost DR. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Available from: <https://Amphibians of the world. Amnh. Org/Index.Php>. American Museum of Natural History, New York, USA, 2021.
- 3- Yousefi S, Saeedi H, Behfar F, Fallahi R, Izadian M. Atlas of Amphibians of Iran. Department of Environment of Iran. 2013 [In Persian].
- 4- Wake DB, Vredenburg VT. Are we in the midst of the sixth mass? extinction? A view from the world of amphibians. *Proc Nat Acad Sci*. 2008; 105: 11466–11473.
- 5- Barta J, Desser S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *J Wildl Dis*. 1984; 20:180–186.
- 6- Davies AJ, Johnston MRL. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibians, and reptiles. *Adv Parasitol*. 2000; 45:1–107.
- 7- Poynton S, Whitaker B. Chapter 15 Protozoa and Metazoa infecting amphibians. In: Wright K, Whitaker B (eds) *Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger Publishing Company, Malabar. 2001; 193–221.
- 8- Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS, Smith TG. Phylogenetic position of the adeleorinid Coccidia (Myozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using *18S rRNA* sequences. *J Eukaryot Microbiol*. 2012; 59: 171–180.
- 9- Reis Ferreira D, Perles L, Machado RZ, Prado CPA, André MR. Molecular detection of Apicomplexan hemoparasites in anurans from Brazil. *Parasitol Res*. 2020; 119 (10): 3469.
- 10- Smith TG. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J Parasitol*. 1996; 82: 565–585.
- 11- Curtis LM, Grutter AS, Smit NJ, Davies AJ. *Gnathia aureamaculosa*, a likely definitive host of *Haemogregarina balistapi* and potential vector for *Haemogregarina bigemina* between fishes of the Great Barrier Reef, Australia. *Int J Parasitol*. 2013; 43: 361–370.
- 12- Telford SR. Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. New York: CRC Press; 2009.
- 13- Pessier AP, Nichols DK, Longcore JE, Fuller MS. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J Veterin Diagn Invest*. 1999; 11(2):194-9.
- 14- Mendoza-Almeralla C, Burrowes P, Parra-Olea G. La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Rev Mex Biodivers*. 2015; 86: 238–248.
- 15- Rajabi F, Javanbakht H. Study of blood parasite in *Pelophylax ridibundus* from north of Iran. *J Anim Environ Sci*. 2019; 1: 145-150 [In Persian].
- 16- Rahimi Z, Hajiyan R, Javanbakht H. Blood parasite of the genus *Dactylosoma* Labbé, 1894 in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) from north of Iran. *J. animal divers*. 2023; 5(4) :10-2023 [In Persian].
- 17- Rajabi F, Javanbakht H, Sajjadi SS. A preliminary study of haemoparasites in marsh frogs, *Pelophylax ridibundus* (Ranidae) from Iran. *J entomol zool*. 2017; 5(4): 1314-1317 [In Persian].
- 18- Derakhshan S, Kami HG, Mohammadi Z. Morphological and genetic diversity of Eichwald Toad, *Bufo eichwaldi* in marginal populations of the east and west Caspian Sea lowland. *Zool middle east*. 2024; 70 (3): 10.1080/09397140.2024.2378515 [In Persian].
- 19- Litvinchuk SN, Borkin LJ, Skorinov DV, Rosanov JM. A new species of common toads from the Talysh Mountains, south-eastern Caucasus: genome size, allozyme, and morphological evidences. *Russ J Herpetol*. 2008. 15 (1): 19 – 43.
- 20- Medrano-Tupiza, E, Morales-Arciniega S, Santander Parra S, Núñez-Naranjo L, Puga-Torres, B. Absence of Hemoparasites in Wildlife Snakes, Located in the Ecological Reserves Cota 70, Cotacachi-Cayapas and Sumaco-Napo-Galeras in Ecuador. *Res Zool*. 2017; 7: 7-10.
- 21-Ujvari B, Madsen T, Olsson M. High Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa,

Hepatozoidae) Infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) From Tropical Australia. J Parasitol. 2004; 90(3): 670-672.

22- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Prado PI. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae: Contributed paper. Conserv Biol. 2010; 24: 287-294.

23- Jenkinson TS, Betancourt Román CM, Lambertini C, Valencia-Aguilar A, Rodriguez D, Nunes-de-Almeida CHL, et al. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. Mol Ecol. 2016; 25(13): 2978-2996.

24- Vredenburg VT, Roland AK, Tate ST, Cheryl JB. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian populations extinctions. PNAS. 2010; 107: 9689-9694.

25- Netherlands EC, Cook CA, Du Preez LH, Vanhove MPM, Brendonck L, Smit, N. J. An overview of the Dactylosomatidae (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae), with the description of *Dactylosoma kermi* n. sp. parasitising *Ptychadena anchietae* and *Sclerophrys gutturalis* from South Africa. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2020; 11: 246-260.

26- Barta JR. The Dactylosomatidae. Adv Parasitol. 1991; 30: 1-37.

27- Du Preez LH, Kok DJ. The frog genus *Ptychadena* as host for polystomatid (Monogenea) parasites in Africa J Herpetol Assoc Afr. 1992; 40: 47-49.

28- Netherlands EC, Cook CA, Kruger DJD, Du Preez LH, Smit NJ. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 2015; 4: 135-141.

29- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene. 1998; 71: 491-499.

30- Desser S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. J Parasitol. 2001; 87: 152-160.

31- Franca F, Facure KG, Giaretta AA. Trophic and spatial niches of two large-sized species of *Lepidodactylus* (Anura) in southeastern Brazil. Stud Noe Fauna E. 2024; 39: 243-248.

32- Macale D, Vignoli L, Carpaneto GM. Food selection strategy during the reproductive period in three syntopic hyloid species from a subtropical wetland of north-east Argentina. Herpetol J. 2008; 18: 49-58.

33- Duszynski DW, Bolek MG, Upton SJ. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of amphibians of the world. Zootaxa. 2007; 1667: 1-77.

34- Da Costa SCG, de Moura Piersia ND. Lanksterella alencari N. SP., A toxoplasma-like organism in the central nervous system of amphibia (Protozoa, Sporozoa). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1971; 69 (3): 397-411.

35- Isaak-Delgado AB, Lopez-Diaz O, Romero Callejas E, Martinez- Hernandez F, Munoz-Garcia CI, Villalobos G, Rendon-Franco E. Morphological and molecular characteristics of hemoparasites in vaillant's frogs (*Lithobates vaillanti*). Parasitol Res. 2020; 6: 1891-1901.

36- Marcus LC. Veterinary Biology and Medicine of Captive Amphibians and Reptiles. Philadelphia, PA: Lea and Febiger. 1981.

37- Netherlands EC, Cook CA, Smit NJ. *Hepatozoon* species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. Parasitising three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae). Parasites and Vectors. 2014; 7(1): 1-12.

38- Pessier AP. Management of disease as a threat to amphibian conservation. Int. Zoo Yb. 2008; 42: 30-39.



First molecular identification of blood parasites of the genus *Dactylosoma* Labbé 1894 in Talysh toad (*Bufo eichwaldi*) from the north of Iran

Fatemeh Abdolahi¹ and Hossein Javanbakht*²

1- Postgraduate, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

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

* **Corresponding author:** Animal Biosystematic – specialized in blood parasites

Address: Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran –

Tel: +989112414093 – Fax: +1333333647

Email: H.javanbakht@guilan.ac.ir.

Receive: April 5, 2025; Revise: November 8, 2025; Accept: December 6, 2025

 [10.22034/nfvm.2025.515051.1278](https://doi.org/10.22034/nfvm.2025.515051.1278)

Abstract

Coccidian parasites (Apicomplexa: coccidia) are among the most common blood parasites reported in reptiles and amphibians. The Dactylosomatidae Jakowska and Negrelli, 1955 are one of four families belonging to adeleorinid coccidia and comprise the genera Babesiosoma Jakowska and Nigrelli, 1956 and Dactylosoma Labbé, 1894. These blood protozoa occur in the peripheral blood of lower vertebrates and are commonly reported parasitising amphibians. Talysh bufo (*Bufo eichwaldi*) is a large endemic amphibian distributed in the Hyrcanian forest in the north of Iran and the southeast of Azerbaijan. In this study, we investigated for the first time the prevalence and genetic identification of blood parasites of the genus *Dactylosoma* in 75 individuals of *B. eichwaldi* with a vulnerable conservation status from north of Iran. Blood parasite infection with *Dactylosoma* sp was detected in 26.66% of samples. Results of phylogenetic analysis by *18S rRNA* gene showed 100% identity with *Dactylosoma kermi* and *D. ranarum*. Phylogenetic analysis showed the *Dactylosoma* of the present study formed a monophyletic group in *Dactylosoma* species, as a same species clustered with *Dactylosoma kermi* from *Sclerophrys gutturalis* and as a sister group of *D. ranarum*, *Dactylosoma* sp, and *Babesiosoma stableri* (support > 80%). This is the first molecular characterization of a species of *Dactylosoma* from an Iranian Bufo.

Keywords: Amphibia, Apicomplexa, Haemogregarine, Phylogenetic, Hyrcanian

New Findings in

Veterinary Microbiology

Quarterly, Volume 8, Issue 4, Winter 2026



University of Zabol

ISSN: 4491-2645

Evaluation of enrofloxacin residues in lamb and beef supplied in Babolsar city using ELISA method

The role of quorum sensing in *Clostridium perfringens* toxinogenesis

First molecular identification of blood parasites of the genus *Dactylosoma* in *Bufo eichwaldi* from the north of Iran

Molecular epidemiology, genotyping and phylogenetic study of bovine norovirus from diarrheic calves in Iran

Development and Performance Evaluation of Chitosan/Alizarin Film as a Smart Packaging with Antimicrobial, Antioxidant, and pH-Sensitive Properties

Serological monitoring of avian encephalomyelitis virus in broiler breeder flocks of northern Iran

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.

