ارزیابی خاصیت ضد قارچی عصاره های میوه آستراگالوس کرناتوس و صمغ ترنجبین ایرانی بر روی گونه های کاندیدیایی جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

منصوره پاک نژادی[1*]، بهاره همت یار[2]، حمیرا سیده سلیمانی [1]

چکیده

تشخیص و درمان مناسب ورم پستان تحت بالینی کاندیدیایی می تواند تأثیر بسزائی در سلامت گاوهای شیری و محصولات لبنی داشته باشد. اما عوارض جانبی داروهای ضد قارچی، به عنوان اصلی ترین محدودیت درمانی در حوزه دامپزشکی شناخته شده است. لذا هدف از مطالعه حاضر، شناسایی مولکولی گونه های کاندیدیایی در شیر گاوهای مبتلا به عفونت تحت بالینی و ارزیابی اثر ضد قارچی عصاره میوه آستراگالوس کرناتوس و صمغ گیاه خارشتر (ترنجبین) ایرانی می باشد. در این مطالعه از ۷۰ شیر خام، ۳۲ نمونه براساس افزایش تعداد سلولهای سوماتیک انتخاب شدند. سپس شناسایی اولیه و قطعی گونه های کاندیدا به ترتیب با استفاده از محیط کروموژنیک و PCR-RFLP انجام شد. درنهایت، اثر عصاره های اتانولی و متانولی (غلظت ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ mg/ml)هر دو گیاه، توسط روشهای چاهک و دیسک گذاری ارزیابی شدند. یافته ها نشان داد که از ۱۵ نمونه مثبت، گونه های غیرآلبیکنس شامل کاندیدا کفیر، کاندیدا فاماتا و مخلوط آنها، فراوانی بیشتری (۹۳/۳۳٪) نسبت به کاندیدا آلبیکنس (۶/۶۷٪) داشتند. براساس سنجش خاصیت ضد قارچی، میانگین اثر مهاری نیستاتین بر کاندیدا فاماتا (۲۸/۶ میلیمتر)، آلبیکنس (۲۶/۷ میلیمتر) و کفیر (۲۵/۸ میلیمتر) نشان دهنده حساسیت هر سه گونه بدون تفاوت معنا دار (P-value =۰/۱۷۱)بود. درحالیکه، غلظتهای تهیه شده از هر دو عصاره، دارای اثر قابل توجهی در مقایسه با نیستاتین نبودند. با توجه به تنوع عوامل دخیل در کیفیت و میزان اثر ترکیبات گیاهی بر پاتوژنهای حیوانی، شناسایی گسترده تر بر روی فاکتورهای محیطی و ترکیبات ضد قارچی مستخرج از میوه آستراگالوس کرناتوس و صمغ ترنجبین ایرانی ضروری می باشد.

واژگان کلیدی: ورم پستان تحت بالینی، گونه های کاندیدا، صمغ ترنجبین، میوه آستراگالوس کرناتوس، PCR-RFLP

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۸

۱ *- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، dr.m.paknejadi@gmail.com

۲- دانش آموخته، گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

کاندیدیازیس به عنوان یکی از مهمترین عفونتهای فرصت طلب حاد و تحت حاد در حیوانات شناخته شده است. این بیماری در پرندگان، اغلب با عوارض گوارشی همراه است ولی در نشخوارکنندگان، تک سمی ها و گوشتخواران علاوه بر عوارض گوارشی (برفک دهان، مری، پیش معده و روده)، مسبب بروز ورم پستان (Mastitis)، عفونت دستگاه تناسلی (واژینیت، اندومتریت و عفونت گردن رحم)، سقط جنین، و عفونتهای سیستمیک نیز می باشد.. در بین بیماریهای مذکور، ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاوهای شیری، یکی از پرهزینه ترین و شایعترین بیماریهای عفونی در سراسر جهان بوده که شیوع آنها به ترتیب ۱۵٪ و ۴۲٪ تخمین زده شده است (۱، ۲). زیرا علاوه بر ضرر جبران ناپذیری که دارندگان احشام متحمل می شوند، خسارات اقتصادی ناشی از حذف دامها و شیرهای نامرغوب در صنعت لبنیات سازی حدود ۳۵ بیلیون دلار در کل دنیا برآورد شده است (۵-۳). تحقیقات نشان می دهد که به دلیل کاهش در سطح پتاسیم، لاکتوفرین و کازئین، ارزش غذایی شیر دامهای مبتلا به ورم پستان، بسیار کم خواهد بود. همچنین با توجه به ارتباط مستقیم سنتز کازئین با میزان کلسیم، اختلال در تولید کازئین می تواند در کاهش سطح کلسیم شیر نیز دخیل

باشد (٦). حدود ۲۰۰ میکروارگانیسم متعلق به قارچ ها، باکتریها (گونه های جنس *مایکوپلاسما* و باکتریهای گرم مثبت و منفی)، ویروسها و جلبکها (گونه های جنس *پروتوتکا*) می توانند در بروز این بیماری دخالت داشته باشند (۳-۷). ورم پستان ناشی از قارچهای مخمری در گاو و گوسفند به عنوان یکی از مهمترین عفونتهای فرصت طلب در دنیای دامپزشکی معرفی شده است. زیرا آنها قادرند در مکانهای مرطوب و غنی از مواد آلی یا غیر آلی مانند تجهیزات شیر دوشی، وسایل آب و غذا خوری، و حتی سر پستانکهای گاو به خوبی رشد نمایند. بنابراین شیوع ناشی از ورم پستان مخمری در محیطهای با پروش انبوه و غیر بهداشتی و همچنین در دامهایی که مرتباً تزریق داخل پستانی دریافت می کنند بیشتر مشاهده شده است. علاوه بر گونه های *کاندیدا* که حدود ۷۰٪ از علل بروز این بیماری را به خود اختصاص می دهند، سایر مخمرها مانند گونه های جنس *رودوتورلا*، *تریکوسپورون*، *ژئوتریکوم* و *کریپتوکوکوس* نیز مهم می باشند (۹-۳). همچنین قارچهای کپکی جنس *آسپرژیلوس* (مانند گونه های *فلاووس*، *نایژر*، *فومیگاتوس* و ...) و گونه های جنس *پنی سیلیوم* نیز می توانند از دیگر عوامل اتیولوژیکی مؤثر در ایجاد بیماری ورم پستان باشند (۱، ۳، ۹، ۱۰). اغلب گونه های جنس *کاندیدا* به عنوان فلور نرمال و کامنسال در قسمتهایی از بدن انسان و حیوانات خون گرم، بویژه در دستگاه گوارش، حفره دهانی و دستگاه ادرای- تناسلی وجود دارند. اما زمانی که مقاومت میزبان به طور موضعی یا سیستمیک کاهش یابد برخی از گونه ها می توانند عفونتهای شدیدی را ایجاد نمایند. تحقیقات نشان می دهد که *کاندیدا آلبیکنس* در بین گونه های متعدد این جنس، به عنوان اصلی ترین عامل بروز عفونت ورم پستان معرفی شده است. با این حال، امروزه گونه های غیر *آلبیکنس* مقاوم به دارو از جمله *کاندیدا گلابراتا*، *تروپیکالیس*، *کفیر*، *فاماتا*، *کروزه ای*، *لوسیتانیا*، *لیپولیتیکا*، *گیلرموندی* و *نوروژیکا* نیز از اهمیت خاصی برخوردار هستند. زیرا بدلیل مصرف بی رویه ترکیبات ضد قارچی رایج و مقاومت ذاتی گونه های غیر *آلبیکنس* نسبت به برخی از داروها، سویه‌های مقاوم‌تر جایگزین سویه های حساس شده‌اند (۱-٤، ۱۰، ۱۱). علاوه بر عوامل اتیولوژیک، فاکتورهای مستعد کننده متعددی نیز در بروز ورم پستان نقش بسیار مهمی دارند. از مهمترین این فاکتورها می توان به تزریق داخل پستانی با مواد و وسایل آلوده، جراحی، بارداری، وسایل شیردوشی غیر بهداشتی، دستهای آلوده شیردوش، جراحت پستان یا سر پستانکها، دوشیدن بیش از حد شیر، پرورش انبوه، تهویه نامناسب و غیر بهداشتی اشاره نمود. همچنین وجود بیماریهای زمینه ای ناتوان کننده (دیابت، نقص سیستم ایمنی، بیماری ژنتیکی و ...)، سوء تغذیه، مصرف نادرست یا طولانی مدت داروهای ضد میکروبی وسیع الطیف، نژاد حیوان و منطقه جغرافیایی (شرایط آب، هوا و ...) نیز از دیگر عوامل مستعد کننده مهم می باشند (۲، ٦، ۷، ۱۲). ورم پستان بالینی به دلیل کاهش تولید شیر و بروز علائمی مانند تورم، درد (به ویژه در زمان شیردوشی)، قرمزی، گرمی، بزرگی و سفت شدن غدد پستانی به راحتی توسط دامپزشکان و دامداران قابل شناسایی است. همچنین کاهش کیفیت و تغییرات قابل مشاهده در شیر از جمله آبکی شدن، تغییر رنگ، افزایش سلولهای سوماتیک و لکوسیت ها، لخته های خون، ترشحات، چرک، پوسته و لخته های بزرگ زرد رنگ نیز می تواند به تشخیص عفونت کمک بسزائی نماید (۵). اما نوع تحت بالینی این بیماری فاقد علائم مشخصی در پستان و شیر بوده و تشخیص آن مشکل تر می باشد. این عفونت در هر دو حالت جزء بیماریهای مهم در گاوهای شیری بوده که حتماً به درمان ضد میکروبی نیاز دارند. بطوریکه حدود ٦۰ تا ۸۰ درصد از داروهای مورد استفاده در دامپزشکی، به پیشگیری یا درمان این عفونت اختصاص

داده می شود. با این وجود، داروهای ضد قارچی به دلیل تنوع کمتر و عوارض جانبی شدیدتر دارای محدودیتهای مصرفی بیشتری در مقایسه با داروهای ضد باکتریایی هستند. بنابراین استفاده از عصاره و اسانس گیاهان دارویی به صورت ساده یا ترکیب با سایر مواد مؤثره (مانند نانوذرات کیتوزان) فاقد اثرات جانبی زیانبار میتواند گزینه مناسبی جهت ساخت ترکیبات ضد قارچی طبیعی به جای داروهای شیمیایی باشد (۲، ٤، ۱۸-۱۳).

تاکنون، اثر ضد میکروبی تعداد زیادی از ترکیبات گیاهان دارویی بر روی سویه های استاندارد قارچی (به ویژه *کاندیدا آلبیکنس*) و باکتریایی ثابت شده است. گیاه گَوَن یا *آستراگالوس* (*Astragalus*) که به برخی از گونه های آن در ایران، ناخنک نیز گفته می شود، یکی از گیاهان خانواده Fabaceae با بیش از ۳۰۰۰ گونه است که نه تنها در طب سنتی، بلکه برای تغذیه دامها نیز مورد توجه می باشند. گونه های مختلف این گیاه به دلیل تولید ترکیبات زیستی مفید، برای درمان سرطان، درد مفاصل، نفخ، سنگ کلیه، عفونتهای ویروسی (HIV ، HBV)، تنفسی، ادراری و غیره استفاده می شوند. مطالعات متعدد نشان می دهد که عصاره بخشهای هوایی و ریشه برخی از گونه های این جنس می توانند از رشد باکتریهای گرم مثبت و منفی جلوگیری نماید. علاوه بر این، می توانند بر روی سویه های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* نیز تأثیر بگذارند (۲۱-۱۹). گیاه ترنجبین یا خارشتر (*Camelthorn*) از دیگر گیاهان خانواده Fabaceae است که علاوه بر مصرف آنها برای تغذیه دامها، قسمتهای مختلف گیاه (دانه، برگ، گل، ریشه) و حتی صمغ ترنجبین گونه ***Alhagi maurorum*** به دلیل تولید متابولیتهای ثانویه مفید و فاقد سمیت سلولی، در طب سنتی بسیار مورد توجه می باشد. از خصوصیات درمانی مهم این گیاه می توان به فعالیتهای ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد آلرژی و غیره اشاره نمود. محققان نشان داده اند که عصاره (اتانولی، متانولی، فنلی و هگزانی) برگ و گل برخی از گونه های گیاه خارشتر می توانند بر بسیاری از باکتریهای گرم مثبت و منفی تأثیر خوبی بگذارند. همچنین تا حدودی از رشد سویه استاندارد مخمرهایی مانند *کاندیدا آلبیکنس*، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و *ساکارومایسس سرویسیه* و قارچهای کپکی پاتوژن گیاهی و انسانی نیز جلوگیری می نمایند (۲٦-۲۲). بررسیها نشان میدهد، علیرغم اینکه تاکنون تحقیقات متعددی در مورد تأثیر گیاهان دارویی بر روی پاتوژنهای انسانی انجام شده است، مطالعات در حوزه دامپزشکی محدود می باشد. لذا در این تحقیق با توجه به اهمیت بیماری ورم پستان، علاوه بر شناسایی مخمر *کاندیدا* در شیر گاوهای مشکوک به عفونت تحت بالینی با روش PCR-RFLP، اثر عصاره های اتانولی و متانولی میوه *آستراگالوس کرناتوس* (*Astragalus crenatus* Schult.) و صمغ گیاه ترنجبین ایرانی (Caspian manna/ Persian *Taranjebin* manna plant) نیز که تاکنون خواص ضد قارچی آنها بررسی نشده اند مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش کار

نمونه برداری و شناسایی اولیه

طی یک مطالعه مقطعی در سال ۱۳۹۹ تا ۱٤۰۰، بر روی ۷۰ نمونه شیر گاوهای مشکوک به ورم پستان تحت بالینی که از مراکز پرورش سطح استان تهران دریافت شده بود تحقیق گردید. این نمونه ها توسط کارکنان مراکز پرورش احشام جمع آوری و طی شرایط استریل و با رعایت زنجیره سرمایی به صورت فریز شده یا در کنار یخ به آزمایشگاه ارسال شدند. در مرحله اول، جهت انتخاب نمونه های شیر آلوده، روش شمارش سلولهای سوماتیک در زیر میکروسکوپ با استفاده از رنگ آمیزی متیلن بلو انجام گردید. سپس با کشت دادن ۱۰۰ میکرولیتر از شیرهای منتخب بر روی سابرودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل

(SDA Merck, Germany)، پلیتها در دمای ۳۷°C به مدت ٤٨ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از بررسی میکروسکوپی نمونه ها به لحاظ وجود سلولهای مخمری، از محیط کشت کروم آگار (CHROMagar *Candida*, France) نیز جهت شناسایی اولیه گونه های *کاندیدا* بر اساس رنگ کلنی ها استفاده گردید.

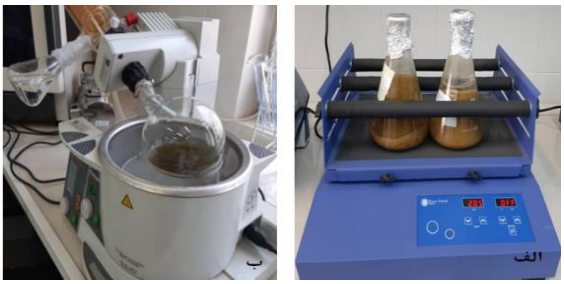
تکنیک مولکولی PCR-RFLP

پس از استخراج DNA ژنومی مخمرها بر اساس دستورالعمل کیت DNP™ (سینا کلون، ایران)، سنتز پرایمرهای یونیورسال ITS-1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) و ITS-4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) جهت تکثیر قطعه ژنی ITS1-5.8S-ITS2 در DNA ریبوزومی انجام شد. برای شروع مرحله PCR، ابتدا ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس (Ampliqon, Denmark) با ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱ میکرولیتر از پرایمرها مخلوط گردید و توسط آب دیونیزه مولکولی به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس برنامه تکثیر در دستگاه ترمال سایکر بصورت ۱ سیکل برای جدا شدن اولیه دو رشته DNA (۵ دقیقه در دمای ۹۵°C) و ۳۰ سیکل سه مرحله ای به ترتیب برای تکمیل جداسازی رشته ها (۳۰ ثانیه در دمای ۹۵°C)، اتصال پرایمرها (۱ دقیقه در دمای ٥٦°C) و تکثیر قطعه ژنی توسط Taq DNA پلیمراز (۱ دقیقه در دمای ۷۲°C) تنظیم گردید. در پایان، ۱ سیکل نیز برای تکثیر نهایی ژنها (۵ دقیقه در دمای ۷۲°C) اختصاص داده شد (۲۹-۲۷). به منظور تولید الگوهای متفاوت در DNA و تشخیص قطعی گونه های *کاندیدا*، از مکانیسم هضم آنزیماتیک (مرحله RFLP) نیز استفاده شد. در این مرحله، ۱ میکرولیتر آنزیم محدود الاثر *Msp*I (Thermo scientific, Lithuania) به میکروتیوپهای استریل حاوی ۲ میکرولیتر بافر و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (هر نمونه به طور جداگانه) اضافه گردید. پس از رساندن حجم نهایی میکروتیوبها به ۲۵ میکرولیتر، به مدت ۳ ساعت در دستگاه هیتر بلاک با دمای ۳۷°C انکوبه شدند. به دلیل عدم توانایی *Msp*I در افتراق *کاندیدا آلبیکنس* از *کاندیدا دابلینینسیس*، از آنزیم محدود الاثر دیگری به نام *Avr*II با پروتکل مشابه استفاده گردید (۲۹). به منظور ارزیابی محصولات حاصل از مراحل مولکولی، عمل الکتروفورز به دنبال تهیه ژل ۱/۲ درصد و مشاهده باندها در دستگاه ترانس ایلومیناتور انجام شد. در نهایت، برحسب مقایسه الگوهای استاندارد معتبر با پروفایل الکتروفورتیک بدست آمده، گونه های *کاندیدا* مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت اطمینان از نتایج مراحل مولکولی، از سویه های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 90028)، *فاماتا* (JCM 1139) و *کفیر* (TIMM 0300) نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تهیه عصاره های متانولی و اتانولی از صمغ ترنجبین گیاه خار شتر و میوه آستراگالوس کرناتوس

در این مطالعه، از صمغ ترنجبین گیاه خارشتر ایرانی و میوه گیاه *آستراگالوس کرناتوس* با کد هرباریومی IBRC P1015228 که به ترتیب از دامغان و اردبیل ارسال شده بودند استفاده گردید. سپس محتویات حاصل از افزودن ۷۰۰ میلی لیتر از حلالهای اتانول و متانول ۸۰٪ به طور جداگانه به ارلن های استریل حاوی ۲۰۰ گرم پودر صمغ گیاه ترنجبین، کاملاً مخلوط شدند. همچنین مخلوطی از ۲۰۰ گرم پودر میوه گیاه *آستراگالوس* با ۷۰۰ میلی لیتر از حلالهای مذکور نیز تهیه شد و ارلن ها به مدت ٤٨ ساعت بر روی دستگاه شیکر قرار گرفتند. در مرحله بعد، محتویات ارلن ها توسط کاغذ واتمن صاف شده و جهت به دست آوردن عصاره خالص، در دستگاه تقطیر دورانی تحت شرایط خلاء و دمای ٦٥°C حلال پرانی شدند (نگاره ۱). در نهایت، با قرار دادن پلیتهای حاوی عصاره های اتانولی و متانولی به مدت ٢٤ ساعت در زیر هود، تبخیر و حذف

کامل حلالهای باقیمانده نیز انجام شد و به ترتیب عصاره های غلیظ قهوه ای تیره و روشن از میوه *آستراگالوس کرناتوس* و صمغ ترنجبین به دست آمد (نگاره ۲).



نگاره ۱: (الف) مخلوط شدن حلالها با گیاهان پودر شده جهت عصاره گیری، (ب) حلال پرانی عصاره ها در دستگاه تقطیر دورانی

نگاره ۲: (الف، ب، ج) به ترتیب صمغ ترنجبین خارشتر ایرانی، عصاره متانولی و اتانولی، (د، ه ، و) میوه گیاه *آستراگالوس کرناتوس*، عصاره متانولی و اتانولی

سنجش خاصیت ضد قارچی عصاره ها

در این تحقیق، از دو روش دیسک و چاهک گذاری در آگار (Disc and Well diffusion agar) جهت بررسی خاصیت ضد قارچی عصاره ها استفاده گردید. بدین منظور، ابتدا غلظتهای سریالی ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ mg/ml از عصاره های اتانولی و متانولی به ترتیب توسط دو حلال اتانول ۸۰٪ و DMSO ۵٪ تهیه شدند. سپس دیسکهای بلانک استریل (پادتن طب، ایران) آغشته شده به ۵۰ میکرولیتر غلظتهای مختلف عصاره میوه *آستراگالوس کرناتوس* و صمغ ترنجبین، بطور کامل خشک شدند. در مرحله بعد، سوسپانسیون قارچی از هر نمونه معادل با کدورت نیم مک فارلند (۱/۵ × ۱۰^{۶} CFU/ml) و میزان جذب (OD) بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ (در طول موج ۶۲۵ نانومتر) آماده گردید. پس از کشت سوسپانسیون قارچی در SDA، دیسک های خشک شده در سطح محیط کشت قرار داده شدند. برای انجام روش چاهک گذاری نیز پس از ایجاد حفره هایی به قطر ۶ میلیمتر، ۵۰ میکرولیتر از عصاره ها و حلالها به طور جداگانه به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت، کلیه پلیت ها در انکوباتور ۳۷C$^{\circ}$ به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری شدند. به منظور ارزیابی قدرت ضد میکروبی عصاره ها، از دیسک نیستاتین (NS100) نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. جهت اطمینان از داده های به دست آمده در محاسبه قطر هاله های عدم رشد، مراحل سنجش خاصیت ضد قارچی برای هر نمونه حداقل ۳ بار تکرار شد. سپس محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون One-Way ANOVA در سطح معنی دار $P<0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

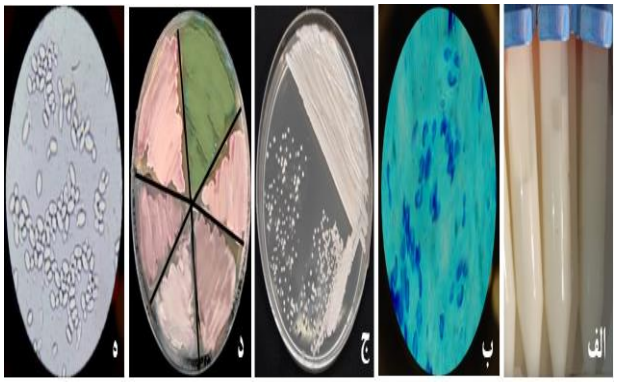
نتایج

در تحقیق حاضر، از بین ۷۰ شیر خام جمع آوری شده از گاوهای مشکوک به ورم پستان تحت بالینی، ۳۲ نمونه بدلیل دارا بودن سلولهای سوماتیک بیش از حد نرمال، جهت بررسی به لحاظ آلودگی با قارچهای مخمری انتخاب شدند. زیرا با توجه به منابع معتبر، محدوده نرمال این سلولها، ۵۰ تا ۱۰۰ هزار در هر میلی لیتر شیر است و وجود بیش از ۲۵۰ هزار سلول، نشان دهنده تعداد قابل توجهی از پاتوژنهای مولد بیماری ورم پستان می باشد. نتایج بررسی میکروسکوپی سلولهای مخمری در کلنیهای رشد یافته بر روی SDA نشان داد که از ۳۲ نمونه شیر منتخب، ۱۵ نمونه (۴۶/۸۸٪) مثبت و ۱۷ نمونه (۵۳/۱۲٪) منفی بودند. طی شناسایی اولیه بر اساس رنگ کلنیها در محیط کشت کروم آگار *کاندیدا*، کلنی سبز در ۱ نمونه و کلنی صورتی

کمرنگ تا پر رنگ (متمایل به بنفش) در ١٤ نمونه مشاهده شد (نگاره ٣).

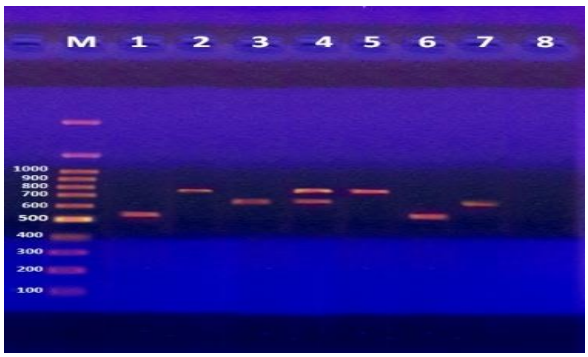
جدول١: مشخصات کلنی گونه های *کاندیدا* بر روی محیط کشت کروم آگار *کاندیدا* همراه با سایز محصول مراحل ITS-PCR و هضم آنزیمی

گونه های *کاندیدا*	تعداد نمونه (درصد)	رنگ کلنی بر روی محیط کشت کروم آگار *کاندیدا*	سایز محصول ITS-PCR (bp)	سایز محصول آنزیم محدودالاثر(bp)	
				***Msp*I**	***Avr*II**
کاندیدا آلبیکنس	١ (٦,٦٧٪)	سبز روشن	٥٣٥	٢٩٧– ٢٣٨	٥٣٥
کاندیدا فاماتا	١ (٦,٦٧٪)	صورتی روشن	٦٣٩	٦٣٩	–
کاندیدا کفیر	١٠ (٦٦,٦٦٪)	صورتی مایل به بنفش	٧٢١	٧٢١	–
کاندیدا کفیر* + *کاندیدا فاماتا	٣ (٢٠,٠٪)	طیفی از صورتی	٧٢١ و ٦٣٩	٧٢١ و ٦٣٩	–



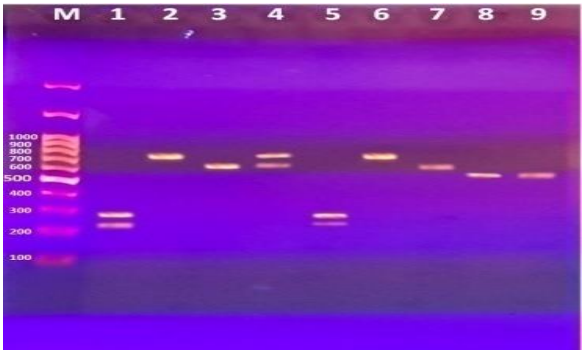
نگاره ٣: (الف) شیر خام جمع آوری شده، (ب) بررسی میکروسکوپی سلولهای سوماتیک، (ج) رشد کلنی های *کاندیدا* در محیط کشت SDA، (د) رشد کلنی های رنگی در محیط کشت کروم *آگار کاندیدا*، (ه) بررسی میکروسکوپی سلولهای مخمری *کاندیدا*

از آنجا که افتراق دقیق کلنیهای سبز (*کاندیدا آلبیکنس* و *دابلینینسیس*) و همچنین کلنیهای دارای طیف صورتی کمرنگ، پررنگ و بنفش به راحتی میسر نخواهد بود، نتایج قطعی تر با استفاده از روش PCR-RFLP گزارش گردید. در یافته های بدست آمده از تکثیر مناطق ITS1-5.8s-ITS2 در مرحله PCR، سه باند اختصاصی با سایز ٥٣٥، ٦٣٩ و ٧٢١ جفت باز (bp) مشاهده گردید که به ترتیب *کاندیدا آلبیکنس*، *فاماتا*، و *کفیر* تشخیص داده شد (نگاره ٤). نتایج حاصل از عملکرد آنزیم محدودالاثر ***Msp*I** در مرحله RFLP نیز نشان داد که دو باند ٢٩٧–٢٣٨ bp برای *کاندیدا آلبیکنس* (یا *دابلینینسیس*) بوده و باندهایی با سایز ٦٣٩ و ٧٢١ bp به ترتیب متعلق به *کاندیدا فاماتا* و *کاندیدا کفیر* می باشند. همچنین با بکارگیری آنزیم محدودالاثر *Avr*II و مشاهده باندی با سایز ٥٣٥ bp، وجود *کاندیدا آلبیکنس* نیز به طور قطعی ثابت شد (نگاره ٥).



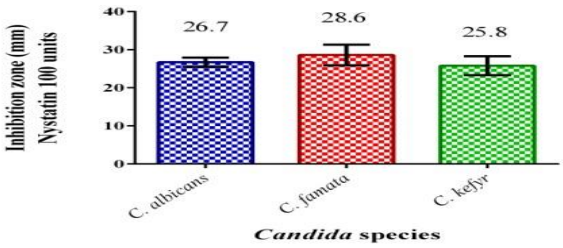
نگاره ٤: محصولات حاصل از ITS-PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4. چاهک ١: *کاندیدا آلبیکنس*، چاهک ٢:

کاندیدا کفیر ، چاهک ۳: *کاندیدا فاماتا*، چاهک ٤: *کاندیدا کفیر* + *کاندیدا فاماتا*، چاهک ٥، ٦ و ۷: به ترتیب سویه های استاندارد *کاندیدا کفیر*، *آلبیکنس* و *فاماتا*، چاهک ۸: کنترل منفی، (M= مارکر مولکولی ۱۰۰ bp)



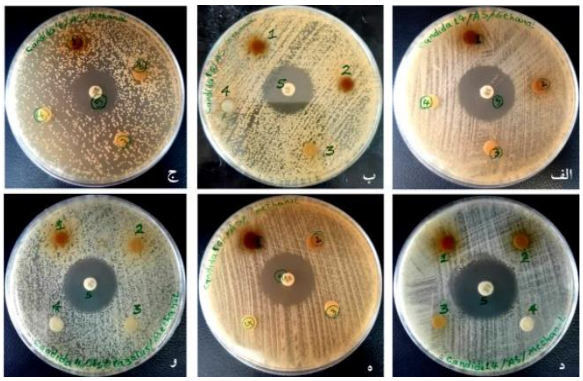
نگاره ٥: هضم محصولات PCR با آنزیم محدودالاثر *Msp*I (چاهک ۱ تا ۷) و *Avr*II (چاهک ۸ و ۹). چاهک ۱: *کاندیدا آلبیکنس*، چاهک ۲: *کاندیدا کفیر*، چاهک ۳: *کاندیدا فاماتا*، چاهک ٤: *کاندیدا کفیر* + *فاماتا*، چاهک ٥، ٦ و ۷: به ترتیب سویه های استاندارد *کاندیدا کفیر*، *فاماتا* و *آلبیکنس*، چاهک ۸: *کاندیدا آلبیکنس* ، چاهک ۹: سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس*، (M= مارکر مولکولی ۱۰۰ bp)

بنابراین از ۱۵ نمونه مثبت، ٦٦٫٦٦٪ *کاندیدا کفیر*، ٦٫٦۷٪ *فاماتا*، ٦٫٦۷٪ *آلبیکنس* و ۲۰٪ مخلوط *کاندیدا کفیر* با *فاماتا* به دست آمد (جدول ۱). در تحقیق حاضر، میانگین اثر مهاری نیستاتین بر روی *کاندیدا فاماتا*، *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا کفیر* به ترتیب ۲۸/٦، ۲٦/۷ و ۲٥/۸ میلیمتر محاسبه گردید که بر اساس پروتکل CLSI، قطر هاله عدم رشد ≥۲۰ میلیمتر نشان دهنده حساسیت نسبت به نیستاتین می باشد. با این وجود، از لحاظ آماری تفاوت معنا داری (*P*-value=۰/۱۷۱) بین حساسیت این سه گونه مشاهده نشد (نگاره ٦).

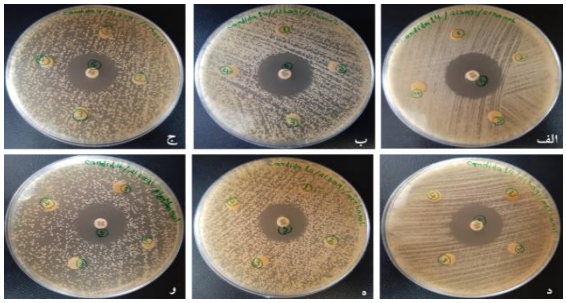


نگاره ٦- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در برابر دیسک نیستاتین برای سه گونه کاندیدیایی تحت مطالعه (*P*-value =۰/۱۷۱ ، One-Way ANOVA)

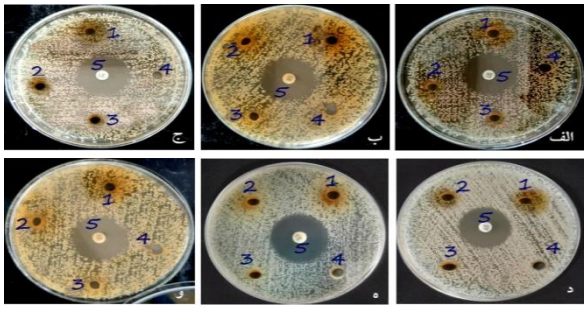
نتایج مراحل دیسک و چاهک گذاری عصاره ها نشان داد که هیچکدام از غلظتهای ۱۰۰۰، ٥۰۰ و ۲٥۰ mg/ml تهیه شده از عصاره اتانولی و متانولی میوه *آستراگالوس کرناتوس* و صمغ ترنجبین در مقایسه با نیستاتین، دارای اثر ضدقارچی قابل توجهی بر روی نمونه های جداسازی شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نمی باشند. در نگاره های ۷ تا ۱۰، چاهکها و دیسکهای شماره ۱ تا ۳ به ترتیب، غلظتهای ۱۰۰۰، ٥۰۰ و ۲٥۰ mg/ml عصاره ها، شماره ٤ حلال و شماره ٥ (وسط پلیت) نیستاتین (NS100) را نشان می دهند.



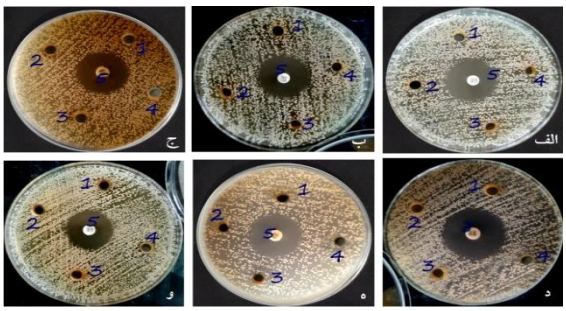
نگاره ۷- تأثیر عصاره های اتانولی (ردیف بالا) و متانولی (ردیف پائین) میوه گیاه *آستراگالوس کرناتوس* با روش دیسک گذاری بر روی (الف/ د) *کاندیدا فاماتا*، (ب/ ه) *کاندیدا آلبیکنس*، (ج/ و) *کاندیدا کفیر*.



نگاره ۸- تأثیر عصاره های اتانولی (ردیف بالا) و متانولی (ردیف پائین) صمغ گیاه ترنجبین با روش دیسک گذاری بر روی (الف/ د) *کاندیدا فاماتا*، (ب/ ه) *کاندیدا آلبیکنس*، (ج/ و) *کاندیدا کفیر*.



نگاره ۹- تأثیر عصاره های اتانولی (ردیف بالا) و متانولی (ردیف پائین) میوه گیاه *آستراگالوس کرناتوس* با روش چاهک گذاری بر روی (الف/ د) *کاندیدا فاماتا*، (ب/ ه) *کاندیدا آلبیکنس*، (ج/ و) *کاندیدا کفیر*



نگاره ۱۰- تأثیر عصاره های اتانولی (ردیف بالا) و متانولی (ردیف پائین) صمغ گیاه ترنجبین با روش چاهک گذاری بر روی (الف/ د) *کاندیدا فاماتا*، (ب/ ه) *کاندیدا آلبیکنس*، (ج/ و) *کاندیدا کفیر*

بحث

بحث و نتیجه گیری

ورم پستان باکتریایی و قارچی در نشخوارکنندگان به ویژه گاوهای شیری به عنوان یکی از شایعترین و پرهزینه ترین بیماریهای عفونی دامها در سراسر دنیا معرفی شده است (۱، ۲، ۱۸). شریفی و همکاران طی بررسی میزان شیوع ورم پستان در گاوداریهای صنعتی استان تهران، فراوانی آن را بسیار بالا گزارش نمودند و اذعان داشتند که اتخاذ راهکارهای مناسب درمانی و بهداشتی جهت کنترل و کاهش این بیماری ضروری می باشد (۳۰). محققان عقیده دارند که ورم پستان تحت بالینی از اهمیت بالاتری برخوردار است. زیرا بر خلاف عفونت بالینی، به دلیل فقدان علائم قابل شناسایی در پستان و شیر، و همچنین عدم درمان به موقع و سرعت بالای انتقال به دامهای سالم می تواند خسارات بیشتری را در برداشته باشد. به طوریکه در اثر ابتلاء هر یک گاو به عفونت بالینی، ۱۵ تا ٤٠ رأس دام به ورم پستان تحت بالینی مبتلا خواهند شد. این مسئله نشان می دهد که حدود ٦٠ تا ٨٠ درصد از خسارات ناشی از بیماری ورم پستان می تواند با عفونت تحت بالینی مرتبط باشد و تلفات ناشی از آن نیز سه برابر بیشتر از موارد بالینی گزارش شده است (١٤). از آنجا که جنس *کاندیدا* به عنوان اصلی ترین عامل ورم پستان قارچی می باشد، استفاده از روشهای قابل اعتماد برای شناسایی گونه های متعدد (به ویژه مقاوم به دارو)، تأثیر بسیار مهمی در درمان صحیح و به موقع بیماری خواهد داشت. اما یکی از معضلات درمانی در اغلب کشورها این است که اولین گزینه دامپزشکان و دامداران، تجویز دارو بدون توجه به عامل بیماریزا و شرایط دخیل در بروز ورم پستان می باشد (٦، ١٠). از این رو، در مطالعه جاری قبل از سنجش ترکیبات ضد قارچی، ابتدا گونه های کاندیدیایی در شیر گاوهای مشکوک به ورم پستان تحت بالینی توسط محیط کشت کروموژنیک و روش مولکولی PCR-RFLP شناسایی شدند. نتایج بررسی ۳۲ نمونه شیر منتخب نشان داد که ۱۵ نمونه (٤٦/٨٨٪) از نظر وجود مخمر *کاندیدا* مثبت بودند. همچنین طی محاسبه فراوانی گونه های شناسایی شده، *کاندیدا کفیر* ۱۰ نمونه، *کاندیدا فاماتا* و *کاندیدا آلبیکنس* هر

کدام ۱ مورد و ۳ نمونه نیز مخلوط *کاندیدا کفیر* با *کاندیدا فاماتا* گزارش گردید.

مطابق با تحقیق حاضر، Fada و همکاران نیز PCR-RFLP را به عنوان یکی از تکنیک های اولیه و مهم برای شناسایی مخمرها در دامپزشکی معرفی نمودند. آنها توانستند از ۱٤۸٦ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی در جنوب و شمال ایتالیا، ۱٤۲ سویه مخمری (*کاندیدا*، *ژئوتریکوم*، *رودوتورلا*، *کریپتوکوکوس* و *تریکوسپورون*) جداسازی نمایند. در این پژوهش، به ترتیب ۳٦ *کاندیدا فاماتا*، ۱۱ *کروزئی*، ۵ *پاراپسیلوزیس*، ۵ *کاتنولات*، ٤ *راگوزا*، ۳ *یوتیلیس* و ۱ مورد از *کاندیدا ساک* و *اینکاسپیکوا* جداسازی شد (۲۸). Bakr و همکاران طی پژوهشی از تکنیک multiplex-PCR جهت شناسایی عوامل اتیولوژیک ورم پستان مزمن استفاده نمودند. آنها توانستند از ٤۰ نمونه شیر آلوده، ۱٦٫۲۲٪ عامل قارچی (٦۰٪ *کاندیدا آلبیکنس*، ۲۲٫۵٪ *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ۱۰٪ *آسپرژیلوس نایژر*) و ۸۳٫۷٪ مخلوطی از باکتریها و قارچها را جداسازی نمایند (۹). در همین راستا، Eldesouky و همکاران در مصر با استفاده از تکنیک PCR به بررسی دقیق فراوانی گونه های *کاندیدا* پرداختند. به طوریکه از ۱۵۰ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان، ٤۱ مورد مثبت گزارش شد که عبارت بودند از ۱۲ *کاندیدا آلبیکنس*، ۸ *تروپیکالیس*، ۸ *گیلرموندی*، ٦ *گلابراتا*، ۵ *کروزه ای* و ۲ مورد *کفیر*. در این تحقیق برخلاف مطالعه حاضر، به ترتیب *کاندیدا آلبیکنس* فراوان ترین و *کاندیدا کفیر* کمترین گونه های ایزوله شده گزارش گردید (۲۷). Khalaf و همکاران نیز کارآیی سه روش بیوتایپینگ (API 20 C AUX)، محیط کشت کروم آگار و multiplex-PCR را جهت شناسایی قارچهای مخمری در ۱۳۸ نمونه شیر احشام مبتلا به ورم پستان (۵۳ گاو، ٤٦ گاومیش، ۲٤ بز، ۱۵ گوسفند) مقایسه نمودند. نتایج نشان داد که روش مولکولی، دقیق ترین و سریع ترین تکنیک شناسایی در سطح گونه می باشد. به طوریکه با این روش توانستند ۳۱٫۲٪ مخمر *کاندیدا* را که شامل گونه *آلبیکنس* (۱۱٫٦٪)، *گلابراتا* (۵٫۸٪)، *تروپیکالیس* (۵٫۱٪) و *کروزه ای* (۲٫۹٪) بود جداسازی نمایند (۳۱).

طی مطالعه مولکولی جدیدتری در مصر، ۲۵۰ نمونه شیر از احشام (گاو، گوسفند و بز) مبتلا به ورم پستان جمع آوری گردید که ٥٤ نمونه به لحاظ وجود پاتوژنهای قارچی مثبت شدند. از این تعداد، ٤۹ گونه *کاندیدا*، ۲ *آسپرژیلوس نایجر*، و ۱ نمونه از *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *پنی سیلیوم* جداسازی شد. بررسی مولکولی گونه های *کاندیدا* نشان داد که در نمونه های تحت بررسی، ۱۸ *گیلرموندی*، ۱٦ *پاراپسیلوزیس*، ۷ *تروپیکالیس*، و ٤ مورد از *آلبیکنس* و *کفیر* وجود داشت. در این پژوهش نیز برخلاف تحقیق جاری، فراوانی *کاندیدا کفیر* از سایر گونه های غیر *آلبیکنس* کمتر بود (۱۰). Hizlisoy و همکاران طی تحقیقی که بر روی ٦۲ نمونه شیر با استفاده از تکنیک rep-PCR انجام دادند، ۹ مورد گاو مبتلا به ورم پستان را شناسایی کردند. از عوامل اتیولوژیک شناسایی شده می توان به *کاندیدا لوسیتانیا* (٤ مورد)، *تروپیکالیس* (۲ مورد) و سایر مخمرها (مانند *ژئوتریکوم*، *کریپتوکوکوس*، *رودوتورلا* یا *تریکوسپورون*) اشاره نمود (۱). Erbas و همکاران نیز با استفاده از روش nested PCR، بر روی ۲٦۰ نمونه شیر آلوده گاوهای مبتلا به ورم پستان در ترکیه انجام شد، شش گونه کاندیدیایی از ٤٦ نمونه (۱۷٫۷٪) مثبت جداسازی گردید. این گونه ها به ترتیب فراوانی شامل ۱۲ *تروپیکالیس*، ۱۰ *پاراپسیلوزیس*، ۸ *کفیر*، ۸ *کروزه ای*، ٦ *راگوزا* و ۲ مورد *کاندیدا گلابراتا* بودند. بنابراین مشابه با نتایج مطالعه ما و بسیاری از تحقیقات دیگر، اهمیت بیشتر گونه های غیر*آلبیکنس* نسبت به گونه *آلبیکنس* در بروز این عفونت گزارش شد (۸). طی تحقیق جدیدتری در ترکیه، پژوهشگران با کمک تعیین توالی DNA توانستند گونه های

کاندیدا را از ٤٠٠ نمونه شیر گاوهای مبتلا به عفونت تحت بالینی به طور دقیق شناسایی نمایند. نتایج نشان داد که از ٩٦ مخمر جداسازی شده، ١٦ نمونه (١٦٪/٧) *کاندیدا آلبیکنس* و ٨٠ نمونه (٨٣٪/٣) گونه های غیر *آلبیکنس* بودند که *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (٢٢ نمونه) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده بود. علاوه براین، *کاندیدا کفیر* (١٩ نمونه) نیز نسبت به سایر گونه های غیر *آلبیکنس* (*تروپیکالیس*، *گلابراتا*، *گیلرموندی*) و حتی *کاندیدا آلبیکنس* دارای فراوانی بالاتری بود که این نتیجه با مطالعه ما مطابقت داشت (٣٢).

Milanov و همکاران در برزیل با بررسی بر روی ٣٣٢ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی، فراوانی بیماری ناشی از باکتریها (٢٢٤ مورد، ٤٩٪/٧٣) را بیشتر از قارچها (٢٠ مورد، ٠٦٪/٦) و *پروتوتکا زوفی* (٨ مورد، ٤١٪/٢) گزارش کردند. اما اذعان داشتند که شناسایی دقیق عامل اتیولوژیک بیماری و بکارگیری داروهای مناسب برای هر نوع عفونت ورم پستان می تواند در جلوگیری از خسارات اقتصادی، حائز اهمیت باشد. در این پژوهش، با شناسایی ٨ *کفیر*، ٦ *کروزئی* و ٦ *راگوزا*، مخمر *کاندیدا* را به عنوان مهمترین عامل قارچی معرفی نمودند. همچنین یافته های حاصله نشان داد که *کاندیدا کفیر* بیشترین گونه جداسازی شده بود که این نتیجه در مطالعه ما نیز مشهود می باشد (٣٣). Du و همکاران در چین با استفاده از محیط کشت کروموژنیک و تکنیک PCR توانستند ٦٠ مخمر *کاندیدا* از ٢٥٦ نمونه شیر آلوده جداسازی نمایند که از این تعداد، ١٤ مورد *کروزه ای* و ٦ مورد *پاراپسیلوزیس* شناسایی شد. همچنین تعداد بسیار کمی نیز *کاندیدا لیپولیتیکا*، *کاندیدا لوسیتانیا* و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* جداسازی گردید. اما در هیچکدام از نمونه ها، *کاندیدا آلبیکنس* وجود نداشت که این مسئله نشان دهنده اهمیت کمتر آن نسبت به گونه های غیر *آلبیکنس* در بروز این بیماری می باشد (١١). تحقیقات متعدد نشان میدهد که تفاوت در فراوانی و نوع میکروارگانیسم های مولد ورم پستان، علاوه بر فاکتورهای مستعدکننده، به تعداد نمونه های تحت مطالعه و منطقه جغرافیایی (شرایط آب و هوا و ...) نیز بستگی دارد. زیرا Krukowski و همکاران با بررسی بر روی عوامل اتیولوژیک این عفونت در ١٦ منطقه کشور لهستان، نتایج متفاوتی را از نظر تعداد و تنوع میکروارگانیسم ها گزارش نمودند (٧). بر این اساس می توان دلایل تفاوت در میزان فراوانی و نوع گونه های کاندیدیایی شناسایی شده در پژوهش ما را با سایر مطالعات توجیه نمود.

علی رغم اینکه، داشتن اطلاعات کافی در موارد فوق می تواند به پیشگیری و درمان بهتر بیماری کمک بسزائی نماید، مبحث درمان دامهای آلوده همچنان با چالشهای فراوانی همراه است. یکی از معضلات درمانی، پسماند داروهای ضد میکروبی شیمیایی در شیر و غیر قابل استفاده شدن آن برای صنعت لبنیات سازی می باشد (٢، ٧). همچنین مطالعات نشان می دهد که توسعه داروهای ضد میکروبی در قرن بیست و یکم به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. در نتیجه پیش بینی می شود که در آینده نزدیک، هیچ گروه جدیدی از عوامل ضد میکروبی در حوزه دامپزشکی قابل دسترس نخواهد بود (٢). از طرف دیگر، کمبود داروهای مؤثر و فاقد عوارض جانبی زیانبار و همچنین افزایش روز افزون مقاومتهای دارویی می تواند از مهمترین محدودیت ها و معضلات درمانی باشد (١٠، ١٨). بطوریکه بررسی مقاومت دارویی در *کاندیدا لوسیتانیا* جداسازی شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان نشان داد که ٢٧٪ نسبت به فلوسیتوزین و ٢/٧٪ به کاسپوفانجین و فلوکونازول مقاوم بودند (١). همچنین مقاومت زیاد گونه های مختلف کاندیدیایی مولد این بیماری نسبت به داروهای ضد قارچی فلوسیتوزین (٩١/٣٪)، فلوکونازول

(۵۶٪/۵)، مایکونازول (۳۴٪/۸)، آمفوتریسین B (۲۶٪/۱)، و کتوکونازول (۱۷٪/۴) در تحقیقی دیگر نیز گزارش شده است (۱۰). Dolgun و همکاران در شهر ازمیر ترکیه طی بررسی مولکولی ورم پستان بالینی گاوهای شیری، از ۱۰۰ نمونه مشکوک، ۲۳ مخمر *کاندیدا* شامل *کروزه ای* (۲۰ مورد)، *آلبیکنس* (۲ مورد) و *تروپیکالیس* (۱ مورد) مقاوم به مترونیدازول و فلوسیتوزین به دست آوردند. بنابراین شناسایی دقیق عامل اصلی اتیولوژیک و تعیین حساسیت ضدقارچی میتواند تضمینی برای مصرف صحیح پروتکلهای درمانی و کاهش خسارات اقتصادی ناشی از ورم پستان قارچی باشد (۳).

در مطالعه حاضر، ارزیابی میانگین اثر مهاری دیسک نیستاتین (۱۰۰ واحدی) نشان داد که علیرغم عدم وجود تفاوت معنا دار (P=۰/۱۷۱) بین گونه های تحت مطالعه، حساسیت *کاندیدا فاماتا* (۲۸/۶ میلیمتر) بیشتر از *کاندیدا آلبیکنس* (۲۶/۷ میلیمتر) و *کاندیدا کفیر* (۲۵/۸ میلیمتر) بود. بر خلاف نتایج ما، Raheel و همکاران با تحقیق بر روی شیر احشام (گاو، گوسفند و بز) مقاوم به درمان نشان دادند که همه گونه های کاندیدیایی (*گیلرموندی*، *پاراپسیلوزیس*، *تروپیکالیس*، *آلبیکنس* و *کفیر*) ایزوله شده نسبت به نیستاتین مقاوم بودند (۱۰). البته تحقیقات دیگری نیز بر روی سنجش حساسیت نسبت به نیستاتین انجام شده است که تناقص در نتایج برخی از مطالعات با تحقیق جاری می تواند به دلیل استفاده آنها از سویه های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* به جای نمونه های بالینی باشد. به طور کلی با توجه به محدودیت ها و معضلات داروهای شیمیایی، محققان بسیاری علاقمند به مطالعه بر روی خواص ضد میکروبی گیاهان دارویی شدند. زیرا ترکیبات مفید و مواد مؤثره موجود در اسانسها و عصاره های طبیعی دارای حالت تعادل بیولوژیکی بوده و درصورت مصرف صحیح، عوارضی مانند انباشته شدن در بدن و اثرات جانبی خطرناک را به دنبال نخواهند داشت. در نتیجه ترکیبات گیاهی با داشتن این برتری می توانند جایگزین مناسبی برای ساخت داروهای ضد میکروبی باشند (۲، ٤، ۱۸-۱٤). با وجود تحقیقات متعدد در مورد خواص گیاهان دارویی برای مهار پاتوژنهای انسانی، مطالعه در حوزه دامپزشکی به ویژه برای درمان ورم پستان قارچی محدود می باشد. از پژوهشهای اندکی که در این زمینه انجام شده است می توان به تأثیر قابل توجه عصاره الکلی تخم انگور، عصاره آبی هلیله سیاه، اسانس های مستخرج از دارچین، میخک و علف لیمو بر روی برخی از قارچهای کپکی (*تریکوفیتون*، *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم* و ...) و مخمری (*کاندیدا*، *ژئوتریکوم*، *رودوتورلا*، *کریپتوکوکوس* و ...) ایزوله شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان اشاره نمود (۱٦، ۱۷). *Alhagi* (خار شتر یا ترنجبین) و *Astragalus* گیاهان دارویی هستند که قسمتهای مختلف آنها (ریشه، برگ، گل، بذر، میوه، صمغ و غیره) از دیر باز به دلیل ترکیبات فعال زیستی برای درمان برخی از بیماریها مورد توجه محققان و پزشکان طب سنتی قرار گرفته اند. ویتامینها، استروئیدها، کومارینها، آنتراکوئینونها، آلکالوئیدها، رزینها، ساپونین، تری ترپنوئیدهای ساپوژنین، استرول های غیر اشباع، فنل، فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، کربوهیدراتها، گلیکوزیدها، و تانن از ترکیبات معروف خار شتر هستند که مسلماً در ارتباط با خواص ضد میکروبی و درمانی این گیاه می باشند. *A. camelorum* و *A. maurorum* دو گونه معروف از گیاه خار شتر (ترنجبین) بوده که به طور سنتی جهت درمان سنگ‌های کلیوی، مشکلات معده، تسکین درد و کاهش ادم پنجه حیوانات در دامپزشکی مورد استفاده قرار می گیرند (۲٦-۲۲). گیاه ترنجبین یا خار شتر یکی از گیاهان پر مصرف در ایران است که در شهرهای مختلفی از جمله خراسان (رضوی، شمالی و جنوبی)، دامغان، سمنان، یزد و غیره کشت می شوند. با توجه به مطالعات گسترده بر

روی ارزش غذایی علوفه خارشتر در ایران، این گیاه به دلیل تأمین مواد مغذی مناسب، در جیره غذایی دامها مورد استفاده می گیرد (۲۲).

با توجه به عدم وجود تحقیقات کافی در مورد تأثیر صمغ ترنجبین گیاه خارشتر ایرانی بر روی قارچهای پاتوژن در حوزه دامپزشکی، خواص ضد قارچی آن در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار داده شد. نتایج حاصل از اثر دهی عصاره های اتانولی و متانولی میوه این گیاه با هر دو روش چاهک و دیسک گذاری نشان داد که در مقایسه با نیستاتین، هیچ کدام از غلظتهای ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ mg/ml دارای اثر ضد قارچی قابل توجهی بر روی *کاندیدا کفیر*، *فاماتا* و *آلبیکنس* جداسازی شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نمی باشند.

Sulaiman و همکاران با تهیه عصاره متانولی (۸۰٪) از قسمتهای هوایی (برگ و گل) *A. maurorum* Medik جمع آوری شده از شمال شرق بغداد، توانستند خاصیت ضد میکروبی آن را طی دو روش دیسک دیفیوژن و MIC بررسی نمایند. نتایج حاصله نشان داد که اولاً عصاره متانولی گل ترنجبین نسبت به برگ آن دارای اثر ضد میکروبی بهتری می باشد. ثانیاً سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* دارای حساسیت کمتری نسبت به غلظتهای مختلف عصاره متانولی برگ و گل ترنجبین در مقایسه با باکتریهای گرم مثبت و منفی بود. در این تحقیق همچنین با ارزیابی متابولیتهای متعدد توسط روش اسپکتروفتومتری، مشخص گردید که میزان خاصیت ضد میکروبی عصاره ها می تواند با مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گیاه ترنجبین مرتبط باشد (۲۶). Zain و همکاران خواص عصاره اتانولی برگهای گیاه *A. maurorum* Medik بومی عربستان صعودی را بر روی ۱۹ سویه استاندارد میکروبی بررسی کردند. در این تحقیق نشان داده شد که عصاره مذکور با هر دو روش چاهک گذاری و MIC دارای اثر خوبی بر روی *ساکارومایسس سرویسیه* و اکثر باکتریهای گرم مثبت و منفی می باشد. اما *کاندیدا آلبیکنس* در روش MIC نسبت به عصاره اتانولی مقاوم بود و در روش چاهک گذاری نیز حساسیت کمی (۹ میلیمتر) نشان داد. به علاوه، قارچهای رشته ای *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنی سیلیوم کریزوژنوم* نیز در برابر غلظتهای مختلف عصاره مقاوم بودند (۲٤). Reda و همکاران نیز پس از جمع آوری *A. maurorum* از جزیره سینا در مصر، با تهیه عصاره خام اتانولی و جداسازی فراکسیونهای مختلف توسط ترکیبات قطبی و غیر قطبی، اثر آنها را بر روی سویه های استاندارد میکروبی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مرحله چاهک گذاری نشان داد که فقط *پروتئوس ولگاریس* و تا حدودی *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به برخی از فراکسیونها از جمله هگزانی حساسیت داشتند. اما *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مقاوم بودند (۳٤). طی تحقیقی دیگر، Abd-Ellatif و همکاران با جمع آوری *A. maurorum* از منطقه الحمام مصر (بخش ساحلی مدیترانه غربی)، اثر عصاره متانولی و هگزانی بخشهای هوایی گیاه را بر روی سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* و قارچهای رشته ای (*آسپرژیلوس فلاووس*، *فوزاریوم سولانی*، *فوزاریوم اکسیپوروم*، *رایزوکتونیا سولانی*، *پیتیوم اولتیموم*، *بایپولاریس اوریزا*، *کتومیوم*، *رایزوپوس*، *موکور*) ارزیابی نمودند. علاوه بر این، با مقایسه کارآئی دو حلال مذکور نشان دادند که متانول از نظر کمی بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات این گیاه در زمان عصاره گیری می باشد. زیرا در روش چاهک گذاری، قطر هاله عدم رشد عصاره های متانولی و هگزانی بعد از تأثیر بر روی *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب ۱۰ و ۸ میلیمتر مشاهده شد و اکثر قارچهای رشته ای نیز نسبت به عصاره متانولی حساس بودند (۳۵). Al-Snafi و همکاران، اثر ضد قارچی عصاره فنلی پودر قسمتهای سبز

گیاه خار شتر را که از منطقه نزدیک اردوگاه دانشگاه تکریت عراق جمع آوری شده بود، با دو روش چاهک گذاری و MIC بررسی کردند. نتایج در هر دو روش نشان داد که کلیه سویه های استاندارد مخمری (*کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و *کاندیدا آلبیکنس*) و قارچهای رشته ای (*کلادوسپوریوم کلادوسپوروئیدس*، *آلترناریا آلترناتا* و *تریکوفیتون متاگروفایتیس*) نسبت به این عصاره حساسیت داشتند. بطوریکه طی دیسک گذاری، قطر هاله عدم رشد برای *کاندیدا آلبیکنس* در بالاترین غلظت (۱۲۸ mg/ml)، ۰/۵± ۲۵ میلیمتر و در کمترین غلظت (۰/۲۵ mg/ml)، ۰/۵± ۹/۵ میلیمتر گزارش گردید. درحالیکه قطر هاله عدم رشد نیستاتین (۱± mm ۷/۵) کمتر از پایین ترین غلظت این عصاره مشاهده شد (۲۵).

در تحقیق حاضر علاوه بر صمغ ترنجبین، خاصیت ضد قارچی میوه *آستراگالوس کرناتوس* (گوَن علفی) نیز ارزیابی گردید. گیاه مذکور که در مناطقی از اردبیل و لرستان کشت می شوند، به عنوان یک منبع غذایی ارزشمند و ارزان در بسیاری از مراکز پرورش احشام مورد استفاده می گیرد. میرزائی و همکاران طی تحقیقی بر روی *آستراگالوس کرناتوس* در مراتع هیر و نئور اردبیل نشان دادند که این گیاه در مرحله رشد رویشی نسبت به مراحل گل و بذر دهی به لحاظ تجزیه پذیری و قابلیت هضم بیشتر در شکمبه نشخوارکنندگان دارای ارزش غذایی بالاتری می باشد. علاوه بر این، میوه این گیاه تروفیتی می تواند برای درمان نفخ، سنگ کلیه، درد مفاصل و اضطراب (آرام بخش) انسان نیز مفید واقع شود (۲۱، ۳۶، ۳۷). به طور کلی در گونه های مختلف جنس *آستراگالوس*، متابولیت های مهم درمانی شناسایی شده اند که از مهمترین آنها می توان به اسیدهای آمینه، استرها، اسیدها، ترپنها، استرولها، آلدئیدها، گلایکوزیدهای فلاوونولی، فلاونوئیدها، ساپوژنینهای ترپنوئیدی، ساپونین، تانن و هیدروکربنها اشاره نمود (۲۱-۱۹). تاکنون تحقیقات متعددی بر روی خواص ضد باکتریایی عصاره بذر، برگ، ساقه و ریشه برخی از گونه های *آستراگالوس* انجام شده است، اما اطلاعات بدست آمده از خواص ضد قارچی این گیاه در حوزه دامپزشکی محدود می باشد. به ویژه گیاه *آستراگالوس کرناتوس* که تاکنون تحقیقی بر روی خاصیت ضد قارچی میوه آن انجام نشده است. در مطالعه جاری، نتایج بررسی خواص غلظتهای ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ mg/ml عصاره اتانولی و متانولی میوه گیاه *آستراگالوس کرناتوس* با دو روش چاهک و دیسک گذاری نشان داد که در مقایسه با نیستاتین، اثر ضد قارچی قابل توجهی بر روی *کاندیدا کفیر*، *کاندیدا فاماتا* و *کاندیدا آلبیکنس* جداسازی شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی وجود نداشت.

Ashour و همکاران با تهیه عصاره متانولی ۷۰٪ از بخشهای هوایی سه گونه از گیاه *آستراگالوس* (*A. spinosus, A. armatus, A. sieberi*) بومی عربستان صعودی (منطقه وحشی شهر رافا)، خاصیت ضد میکروبی آنها را ارزیابی نمودند. نتایج چاهک گذاری در این پژوهش، اثر ضد میکروبی خفیف عصاره ها بر روی سویه های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و تعدادی از باکتریهای گرم مثبت و منفی را نشان داد (۳۸). میکائیلی و همکاران با استفاده از عصاره ها (آبی، استنی و متانولی) و اسانس بخشهای هوایی *Astragalus verus* Olivier (بومی سنندج)، اثر درمانی این گیاه را در موشهای آلوده شده با سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 10231) مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره آبی گیاه مذکور نه تنها در روش دیسک گذاری (۰/۵۷۷± ۲۵ میلیمتر) و MIC (۱۶۰µg/ml) بلکه در درمان موشهای مبتلا به کاندیدیازیس جلدی نیز دارای بیشترین اثر ضد قارچی بود (۳۹). در پژوهشی دیگر، Ali و همکاران نیز با به دست آوردن مقدار بالائی از ساپونین و فلاونوئیدها در

عصاره آبی ریشه *آستراگالوس*، خواص ضد میکروبی آن را مفیدتر از عصاره های تهیه شده توسط سایر حلالها گزارش نمودند. زیرا بررسی خاصیت عصاره آبی ریشه این گیاه از طریق روش چاهک گذاری، مهار رشد سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (٦/٦ ±٠/٨٤ میلیمتر) و به ویژه *استرپتوکوکوس موتانس* (١٢/٨ ±١/٨ میلیمتر) را نشان داد (٢٠). با این وجود، انتخاب بهترین حلال برای روش عصاره گیری به نوع گیاه و ترکیبات مؤثره علیه میکروارگانیسم مورد نظر بستگی دارد. به عنوان مثال، برخلاف دو پژوهش فوق که حلال آبی را برای عصاره گیری از گیاه *آستراگالوس* مفیدتر گزارش کردند، Neamah و همکاران اذعان داشتند که عصاره آبی گیاه کامل ***Alhagi maurorum*** جمع آوری شده از صحرای الزبیر (جنوب بصره)، هیچگونه اثر ضد میکروبی بر روی سویه های استاندارد باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی با هر دو روش دیسک و چاهک گذاری نداشت (٢٣). محققین عقیده دارند که علاوه بر اهمیت نوع حلال و میکروارگانیسم تحت مطالعه، مسلماً مراحل عصاره گیری و فاکتورهای محیطی نیز می توانند میزان تولید و تأثیر گذاری ترکیبات زیستی عصاره ها را از لحاظ کیفی و کمی تحت شعاع قرار دهند. از مهمترین فاکتورهای محیطی می توان به جنس و گونه گیاه، شرایط آب و هوایی (فصل، دما، رطوبت و ..)، دوره رشد، مکان رویش (از نظر جغرافیایی، ارتفاع زمین و ...)، تنش های محیطی، شرایط کشت (نوع خاک، تغذیه، مواد معدنی و آبیاری)، و همچنین نوع مواد مؤثره در بخشهای مختلف گیاه اشاره نمود (٢١، ٢٢، ٤٠). بر این اساس می توان دلیل تفاوت میزان اثر عصاره های متانولی و اتانولی در تحقیق جاری با سایر مطالعات را مرتبط با یک یا چند فاکتور مطرح شده توصیف نمود. به عنوان مثال، در پژوهش ما از *آستراگالوس کرناتوس* و صمغ ترنجبین گیاه خارشتر بومی ایران استفاده شد که تاکنون تحقیقی در مورد خاصیت ضد قارچی عصاره آنها انجام نشده است. بنابراین تفاوت در گونه و منطقه جغرافیایی گیاه می تواند در اختلاف نتایج یک پژوهش، مؤثر باشد. از طرف دیگر، بر خلاف بسیاری از تحقیقات که از ریشه، دانه و بخشهای هوایی (برگ و گل) گیاه خارشتر و *آستراگالوس* استفاده نمودند، در پژوهش جاری فقط خواص میوه و صمغ این گیاهان بررسی شد که ممکن است نسبت به سایر بخشهای گیاه، از لحاظ نوع و مقدار ترکیبات مرتبط با خاصیت ضد قارچی، متفاوت باشند. به علاوه، بر خلاف اغلب تحقیقات انجام شده که از سویه های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* استفاده کرده بودند، در این مطالعه برای اولین بار اثر عصاره گیاهان مذکور بر روی گونه های پاتوژن (*کاندیدا آلبیکنس* و غیر *آلبیکنس*) جدا شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ارزیابی گردید. بنابراین جهت اعلام نتایج قطعی در خصوص عدم خواص ضد کاندیدیایی عصاره صمغ ترنجبین و میوه *آستراگالوس کرناتوس* بومی ایران بر روی پاتوژنهای حیوانی، نیاز است که تحقیقات گسترده تری در مورد انواع حلالها، شناسایی نوع و مقدار ترکیبات مؤثره این گیاهان و همچنین فاکتورهای محیطی مهم انجام شود.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از مراکز پرورش احشام ارسال کننده نمونه های شیر و کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس تقدیر و تشکر به عمل می آید.

فهرست منابع

1. Hizlisoy H, Ertas Onmaz N, Al S, Karadal F, Yildirim Y, Gonulalan Z, Gumussoy KS, Aydemir GD, Kasap Tekinsen F, Dinc G. Clonal diversity and antifungal susceptibility of Candida spp. recovered from cow milk. Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka. 2020 Jan 8; 70(1): 40-9.

2. Tomanić D, Kladar N, Radinović M, Stančić I, Erdeljan M. Intramammary Ethno-Veterinary Formulation in Bovine Mastitis Treatment for Optimization of Antibiotic Use. Pathogens. 2023 Feb 6; 12(2): 259.
3. Dolgun HT, Kirkan Ş. Investigation of the Efficacy and Antifungal Drug Resistance of Non-Albicans Candida Species in Mycotic Mastitis. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2022; 11(1): 113-119.
4. Morales-Ubaldo AL, Rivero-Perez N, Valladares-Carranza B, Velázquez-Ordoñez V, Delgadillo-Ruiz L, Zaragoza-Bastida A. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. Veterinary and Animal Science. 2023 Jul 24: 21; 100306.
5. Akdouche L, Aissi M. Prevalence and Identification of Yeasts Responsible for Mastitis in Dairy Cattle Farms in the Sidi Lahcene Region in the Wilaya of Sidi Bel abbes-Algeria. Advances in Dairy Research. 2018; 6: 206.
6. Ariton AM, Poroșnicu I, Neculai-Văleanu AS, Crivei IC, Sănduleanu C, Postolache AN, Trincă LC. Strategies for identifying and preventing fungal mastitis in dairy cows. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. 2022; 55(2): 104-112.
7. Krukowski H, Lassa HE, Zastempowska E, Smulski SE, Bis-Wencel H. Etiological agents of bovine mastitis in Poland. Medycyna Weterynaryjna. 2020 Apr 1; 76(04): 221-225.
8. Erbas G, Parin U, Kirkan Ş, Savaşan S, ÖZavci MV, Yüksel HT. Identification of Candida strains with nested PCR in bovine mastitis and determination of antifungal susceptibilities. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences. 2017; 41(6): 757-763.
9. Bakr EM, El-Tawab AE, Elshemey TM, Abd-Elrhman AH. Diagnostic and Therapeutic Studies on Mycotic Mastitis in Cattle. Alexandria Journal for Veterinary Sciences. 2015 Jul 1; 46(1): 138-145.
10. Raheel IA, Hassan WH, Salam HS, Abed AH, Salem SS. Recovery rate of fungal pathogens isolated from cases of bovine and ovine mycotic mastitis. Journal of Veterinary Medical Research. 2023 Mar 16 (In Press).
11. Du J, Wang X, Luo H, Wang Y. Epidemiological investigation of non-albicans Candida species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. BMC veterinary research. 2018 Dec; 14:1-9.
12. Naisi S, Bayat M, Salehi Z, Zarif R, Yahyaraeyat R. In vitro effect of carotenoid pigment of Rhodotorula glutinis on Staphylococcus aureus isolated from bovine Mastitis. Journal of Comparative Pathobiology. 2022 May 22; 19(1): 3773-82.
13. Hadi Z, Ferdousi A, Paknejadi M. Effects of Thymus daenensis essential oil-loaded chitosan nanoparticles on BCR1 gene expression in Candida parapsilosis. Archives of Razi Institute. Articles in Press, Accepted Manuscript Available Online from 24 February 2024.
14. Caneschi A, Bardhi A, Barbarossa A, Zaghini A. Plant Essential Oils as a Tool in the Control of Bovine Mastitis: An Update. Molecules. 2023 Apr 13; 28(8): 3425.
15. Cao G, Liu J, Liu H, Chen X, Yu N, Li X, Xu F. Integration of Network Pharmacology and Molecular Docking to Analyse the Mechanism of Action of Oregano Essential Oil in the Treatment of Bovine Mastitis. Veterinary Sciences. 2023 May 14;10(5): 350.
16. Amsaveni S, Ramesh S, Hariharan P. Anti candidal activity of plant extracts against bovine mastitis isolates. Tamilnadu journal of veterinary and animal sciences. 2012; 8(2): 72-75.
17. Sukumar K, James PC. Antifungal activity of plant extracts against fungal isolates from bovine mastitis. Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2012; 8(3): 115-118 .

18. Touza-Otero L, Landin M, Diaz-Rodriguez P. Fighting antibiotic resistance in the local management of bovine mastitis. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2024 Jan 1; 170: 115967.
19. Sadeghi Z, Alizadeh Z, Moridi Farimani M. Recent reports in the biggest herbal genus, Astragalus, in Iran; with a special viewpoint on tragacanth gum production. Natural Product Research. 2023 Jul 6:1-9.
20. Ali SA, Avinash A, Kumar B, Kulshrestha R, Kapur D, Prabhat SK. Efficacy of Astragallus stragallus extract against S. mutans and C. albicans in vitro Study. International Journal of Recent Scientific Research. 2019; 10(05): 32417-32420.
21. Ionkova I, Shkondrov A, Zarev Y, Kozuharova E, Krasteva I. Anticancer Secondary Metabolites: From Ethnopharmacology and Identification in Native Complexes to Biotechnological Studies in Species of Genus Astragalus L. and Gloriosa L. Current Issues in Molecular Biology. 2022; 44: 3884-3904.
22. Zainali H, Tawakli M, Kamalion AR, Noorzad-Moghadam M, Ahmadi K, Pourianjad F, Pourali P. Acquaintance with Camelthorn medicinal plant and its production method. Medicinal Plants Plan of Ministry of Agriculture Jihad. 2018: 1-42.
23. Neamah NF. A pharmacological evaluation of aqueous extract of Alhagi maurorum. Global Journal of Pharmacology. 2012; 6(1): 41-6.
24. Zain ME, Awaad AS, Al-Outhman MR, El-Meligy RM. Antimicrobial activities of Saudi Arabian desert plants. Phytopharmacology. 2012; 2(1): 106-13.
25. Al-Snafi AE, Al-kamel ML, Esmael ME. Antifungal effect of Alhagi maurorum phenolic extract. IOSR Journal of Pharmacy. 2019; 9(8): 7-14.
26. Sulaiman GM. Antimicrobial and cytotoxic activities of methanol extract of Alhagi maurorum. African Journal of Microbiology Research. 2013; 7(16): 1548-1557.
27. Eldesouky I, Mohamed N, Khalat D, Salama A, Elsity A. Candida Mastitis in Dairy Cattle with Molecular Detection of Candida albicans. Kafkas Üniversitesi Veteriner FakÜltesi Dergisi. 2016; 22(3): 461-464.
28. Fadda ME, Pisano MB, Scaccabarozzi L, Mossa TV, Deplano M, Moroni P, Liciardi M, Cosentino S. Use PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification yeast species isolated from bovine intramammary infection. Journal of dairy science. 2013 Dec 1; 96(12): 7692-7697 .
29. Paknejadi M, Mansour Bayat M, Razavilar V. Investigating the Frequency of Candida glabrata in Diabetic Women of Tehran with Recurrent and Non-recurrent Vulvovaginal Candidiasis Using PCR-RFLP Assay. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases, 2019, 7 (1-2): 44-51.
30. Sharifi H, Badaghabadi M, Sardooei MA, Kataj JK, Babaei H. Cumulative incidence of mastitis in dairy herds in Tehran province. Journal of Veterinary Research. 2016; 71(3): 271-273.
31. Cİlvez P, Turkyİlmaz S. Molecular diagnosis of Candida species isolated from cases of subclinical bovine mastitis. Israel Journal of Veterinary Medicine. 2019; 74(3): 134-140.
32. Khalaf DD, Soliman MM, Mansour AS. Conventional and molecular identification of mycotic mastitis caused by Candida in farm animals. International Journal of Veterinary Science. 2021; 10(1): 64-8.
33. Milanov D, Prunic BO, Velhner MA, Bojkovski J. Diagnosis of yeast mastitis in dairy cows. Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara. 2014; 47 (1): 56-64.
34. Reda M, Eltamany EE, Ahmed S. Antimicrobial and Antifungal Activities of Alhagi maurorum Crude Extract and Its Fractions. Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2023 Jan 1; 7(2): 128-30.

35. Abd-Ellatif S, Abdel Rahman SM, Deraz SF. Promising antifungal effect of some folkloric medicinal plants collected from El-Hammam habitat, Egypt against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 2011 Sep; 6(9): 25-32.
36. Mehrnia M, Maassoumi AA. Distribution of Astragalus Spp. in Lorestan Province. Taxonomy and Biosystematics. 2017; 9(32): 65-78.
37. Mirzaeea-ghchegheshlagh F, Ghorbani A, Seifdavati J, Mehdizadeh S, Valizadeh-youjnali R. Determination of nutritional value and degradability of dry matter and cell walls of Astragalus crenatus Schult at different phenological stages in Hir-Neor rangelans of Ardabil province. Journal of Rangeland. 2015; 9(1): 14-28.
38. Ashour MA. Comparative chemical and biological investigations of three Saudi Astragalus species. Journal of Applied Biology and Biotechnology. 2019 Sep 10; 7(5): 56-61 .
39. Mikaeili A, karimi I, shamspur T, Gholamine B, Modaresi M, et al. Anti-candidal actinity of Astragalus verus in the vitro and in vivo guinea Pig models of cutaneous and systemic candidiasis. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2012; 22(5): 1035-1043.
40. Çaçan E, Kiliç Ö, Kökten K. Determination of Macro, Micro Element and Heavy Metal Contents of Astragalus Taxa Collected from Nature. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 2023; 20(2): 334-42.