

بررسی شیوع کریستال‌های ادراری در گربه‌ها

بهادر بردشیری^{۱*}، حسن مهر آبادی^۲، عرفان جاویدی^۳، زهرا صادقیان^۳، محمد حسین ناصر بخت^۳

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر ایران

۲- دانش آموخته عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: bahador.bardshiri@gmail.com

چکیده

سنگ‌های دستگاه ادراری یکی از مشکلات شایع در گربه‌ها محسوب می‌شوند که می‌توانند منجر به عوارض جدی از جمله سیستیت ایدیوپاتیک شوند. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع کریستال‌های ادراری در گربه‌های شهر تهران و ارتباط آن با فاکتورهایی مانند نژاد، جنسیت، سن، وضعیت عقیمی و نوع تغذیه بود. در این مطالعه، طی بازه زمانی یک‌ساله، ۱۰۰ گربه ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی دکتر تقی پور مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام اولتراسونوگرافی و آنالیز ادرار، گربه‌های دارای اکوژنیسیته‌های نقطه‌ای بدون سایه صوتی به‌عنوان نمونه‌های دارای سدیمان ادراری انتخاب شدند. نتایج نشان داد که کریستال‌های کلسیم اگزالات (۶۳٪) بیشترین میزان شیوع را داشتند و پس از آن به ترتیب کریستال‌های استروئیت (۲۸٪)، آمونیوم فسفات (۶٪)، کربنات کلسیم (۲٪) و بیلی‌روبین (۱٪) قرار داشتند. ارتباط معناداری بین میزان شیوع کریستال‌ها و متغیرهایی مانند جنسیت ($P=0.57$)، وضعیت عقیمی ($P=0.69$) و گروه‌های سنی ($P=0.71$) مشاهده نشد. با این حال، نژاد گربه‌ها تأثیر معناداری در میزان شیوع کریستال‌های ادراری داشت ($P=0.04$)، به‌طوری که بیشترین میزان شیوع در نژاد هیمالین و کمترین میزان در نژاد اسکاتیش مشاهده شد. این مطالعه نشان می‌دهد که برخی نژادها نسبت به سایرین مستعدتر به تشکیل کریستال‌های ادراری هستند و اقدامات پیشگیرانه در این زمینه می‌تواند به حفظ سلامت گربه‌ها کمک کند.

کلمات کلیدی: کریستال ادراری، کلسیم اگزالات، استروئیت، آمونیوم فسفات، سن، نژاد گربه

مقدمه

متغیرهایی نظیر نژاد، جنسیت، وضعیت عقیمی، سن و نوع تغذیه ارزیابی گردیده است (همکاران، ۲۰۱۷). یافته‌های این پژوهش می‌توانند نقش مهمی در مدیریت و درمان بیماری‌های دستگاه ادراری گربه‌ها ایفا کنند و به دامپزشکان در اتخاذ راهکارهای مناسب برای کنترل این عارضه کمک نمایند (لاند و همکاران، ۲۰۱۶).

روش کار

این مطالعه با هدف بررسی تنوع کریستال‌های ادراری در گربه‌های مبتلا به بیماری‌های دستگاه ادراری در شهر تهران انجام شد. جامعه آماری این تحقیق شامل تمامی گربه‌های بومی شهر تهران است.

حجم نمونه. حجم نمونه بر اساس فرمول زیر، ۱۰۰ قلاده برآورد شد.

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

برای نمونه‌گیری از روش نمونه‌گیری تصادفی استفاده شد. برای این منظور در بازه‌ی زمانی یک ساله بین گربه‌های ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی دکتر تقی پور آن دسته گربه‌هایی که سدیمان در مثانه‌ی آنها دیده شد به عنوان نمونه انتخاب شد. به منظور بررسی این نمونه تمام نژادهای گربه‌ها و با تمام سنین به عنوان جامعه آماری انتخاب شد.

بیماری‌های دستگاه ادراری یکی از مشکلات شایع در حیوانات خانگی، به‌ویژه گربه‌ها، محسوب می‌شوند که می‌توانند تأثیرات جدی بر سلامت و کیفیت زندگی این حیوانات داشته باشند (دقائق و همکاران، ۲۰۱۱). تشکیل سنگ‌های ادراری، که در اثر کریستالیزاسیون مواد معدنی در دستگاه ادراری رخ می‌دهد، یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد اختلالات ادراری در گربه‌ها است (منداز و همکاران، ۲۰۱۹). این سنگ‌ها می‌توانند به دلایل مختلفی از جمله رژیم غذایی، عوامل ژنتیکی، سن، جنسیت و وضعیت عقیمی ایجاد شوند (اوکافور و همکاران، ۲۰۱۹).

در سال‌های اخیر، افزایش بروز بیماری‌های مرتبط با دستگاه ادراری در گربه‌ها، اهمیت مطالعه بر روی تنوع کریستال‌های ادراری را دوچندان کرده است (کیم و همکاران، ۲۰۱۸). بررسی و شناخت عوامل مستعدکننده این بیماری می‌تواند به پیشگیری، تشخیص به‌موقع و درمان مؤثر آن کمک کند (ناردن و همکاران، ۲۰۲۰).

این پژوهش با هدف بررسی تنوع کریستال‌های ادراری در گربه‌های مبتلا به بیماری‌های دستگاه ادراری در شهر تهران انجام شده است. در این مطالعه، میزان شیوع انواع کریستال‌های ادراری از جمله کلسیم اگزالات، استروویت، آمونیوم فسفات و سایر ترکیبات بررسی شده و ارتباط آن‌ها با

وسایل و مواد لازم	کارخانه سازنده
دستگاه اولتراسونوگرافی	اساوته، هلند
ژل اولتراسونوگرافی	پلی ژل، ایران
دستگاه اصلاح مو	ماکس ۵۰، ایران
سرنگ	میناسرنگ، ایران
الکل و پنبه	پاک نهاد، ایران
دستکش لاتکس	نیتربل، ایران
لام	علمینوگستر، ایران
میکروسکوپ نوری	برسر، آلمان
لوله آزمایش	علمینوگستر، ایران
سانتریفوژ	علمینوگستر، ایران

در ابتدا، اطلاعات دموگرافیک شامل سن، جنسیت، نژاد، وضعیت عقیمی و رژیم غذایی هر گربه ثبت شد. سپس، بررسی‌های بالینی و پاراکلینیکی به شرح زیر انجام شد:

۱. اولتراسونوگرافی: برای تأیید وجود کریستال‌های

ادراری، گربه‌هایی که در سونوگرافی، طبق مراحل زیر انجام شد: اصلاح موهای ناحیه خلفی شکمی، استریل کردن محل با الکل، مقید کردن گربه روی میز اولتراسونوگرافی، استفاده از ژل اولتراسونوگرافی، استفاده از پروپ لینیار با فرکانس ۹ مگاهرتز و عمق تصویر ۸ سانتی‌متر، تنظیم قدرت دستگاه بین ۷۰-۸۰، بررسی مثانه در مقاطع طولی و عرضی، اخذ نمونه ادراری با سرنگ ۵ سی‌سی از مثانه‌های دارای سدیمان.

در این مطالعه، متغیرهای مستقل شامل سن، جنسیت، نژاد، وضعیت عقیمی و نوع تغذیه بودند و متغیر وابسته، نوع کریستال‌های ادراری بود. داده‌ها بر اساس این متغیرها طبقه‌بندی و تحلیل شدند.

نام متغیر	نقش متغیر							نوع متغیر		واحد سنجش
	مقیاس متغیر							کیفی		
	کمی	فی	کمی	فی	کمی	فی	کمی	فی		
کلسیم اگزالات										مشاهده میکروسکوپی
استروئیت										مشاهده میکروسکوپی
آمونیم فسفات										مشاهده میکروسکوپی
کریستال کلسیم										مشاهده میکروسکوپی
بیلی روبین										مشاهده میکروسکوپی
سن										سال
جنس										نر/ماده
نژاد										انواع نژادهای گربه
نوع تغذیه										خشک/خانگی/ مخلوط

جدول ۱- متغیرهای تحقیق و نقش متغیر و نوع متغیر و مقیاس اندازه‌گیری

مواد و وسایل استفاده شده در این پژوهش در جدول زیر ارائه شده است

جدول ۲- وسایل و مواد مورد استفاده در انجام تحقیق

روش‌های تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. آزمون‌های آماری زیر برای تحلیل نتایج به کار رفت:

آزمون کای دو (Chi-square) برای بررسی ارتباط بین نوع کریستال‌ها و متغیرهای دموگرافیک، آزمون تی مستقل (Independent T-test) برای مقایسه میانگین متغیرها بین دو گروه، تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه تأثیر عوامل مختلف بر توزیع انواع کریستال‌ها، سطح معناداری در تمامی آزمون‌ها کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش، مشخص شد که کریستال‌های ادراری در گربه‌ها به عنوان یکی از مشکلات شایع دستگاه ادراری محسوب می‌شوند و عوامل مختلفی می‌توانند در بروز آن‌ها نقش داشته باشند. در این مطالعه، کریستال استروئیت بیشترین شیوع را در بین انواع مختلف کریستال‌های ادراری داشت، در حالی که کریستال‌های کلسیم اگزالات، آمونیوم فسفات، کربنات کلسیم و بیلی روبین به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. این امر نشان می‌دهد که نوع خاصی از کریستال‌ها در گربه‌ها غالب است، اما باید سایر انواع نیز در تشخیص و درمان مورد توجه قرار گیرند.

سدیمان در نماهای سونوگرافی به صورت نقاط سفید رنگ (هایپراکوئیک) بدون سایه صوتی دیده می‌شود.



(۱) مثانه ی گربه نژاد پرشین با سدیمان (۲) مثانه گربه نژاد DSH با سدیمان

۲. **آنالیز ادرار :** به منظور آنالیز ادراری (شناسایی نوع کریستال‌های) نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور انجام این آنالیز مراحل زیر انجام شد: قرار دادن ۳ میلی لیتر ادرار تازه در سانتریفیوژ، پس از انجام سانتریفیوژ به دو قسمت تقسیم شد قسمت بالای یا سوپرناتانت (۹۰٪) و قسمت رسوب ادرار (۱۰٪) تشکیل شد، به منظور جدا نمودن سوپرناتانت از پیت مخصوص استفاده شد و قطرات باقی مانده نیز با سرو و ته کردن نصفه نیمه لوله ادرار بیرون ریخته شد، برداشت یک قطره از رسوب ادرار بر روی لام، بررسی لام توسط میکروسکوپ نوری پس از دو دقیقه

حالی که نژاد اسکاتیش کمترین میزان شیوع را نشان داد. (جدول ۵)

جدول ۵- میانگین رتبه ای وجود کریستال به تفکیک نژاد

کریستال	کا-اسکویر	df	سطح معنی داری
کریستال	۶/۳۱	۱۳	۰/۰۴

جدول ۶- آماره نژاد

این تفاوت بروز کریستال بین نژادها از نظر آماری نیز معنی دار است ($P=0/04$)

این تفاوت معنادار بین نژادها، اهمیت در نظر گرفتن عوامل ژنتیکی در مستعد بودن گربه‌ها به کریستال‌های ادراری را نشان می‌دهد.

همچنین، بررسی تأثیر تغذیه بر تشکیل کریستال‌ها نشان داد که گربه‌هایی که از غذای خشک تغذیه می‌شوند، درصد بیشتری از کریستال کلسیم اگزالات را نشان دادند، در حالی که گربه‌هایی که غذای خانگی مصرف کردند، میزان بالاتری از کریستال‌های استروئیت داشتند. (جدول ۷)

از نظر جنسیت، هیچ تفاوت معناداری در میزان شیوع کریستال‌های ادراری بین گربه‌های نر و ماده مشاهده نشد. (جدول ۳)

کریستال	فراوانی	میانگین رتبه ای	رتبه
ماده	۴۶	۵۲/۰۱	اول
نر	۵۴	۴۹/۲۱	دوم
کل	۱۰۰	۱۰۰	

جدول ۳- میانگین رتبه ای وجود کریستال به تفکیک جنسیت

کریستال	کا-اسکویر	df	سطح معنی داری
کریستال	۰/۳۱	۱	۰/۵۷

جدول ۴- آماره جنسیت

نتایج مندرج در جدول بالا (جدول ۴) نشان از آن دارد که گرچه میانگین رتبه ای وجود کریستال در جنس ماده بیش از جنس نر است، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نیست ($P=0/57$).

این یافته نشان می‌دهد که احتمال بروز این عارضه در هر دو جنس مشابه است و فاکتورهای دیگری مانند تغذیه و نژاد می‌توانند نقش تعیین‌کننده‌تری داشته باشند.

بررسی نژادهای مختلف نشان داد که گربه‌های نژاد هیمالین بیشترین میزان شیوع را در مقایسه با سایر نژادها دارند، در

کریستال	فراوانی	میانگین رتبه ای	رتبه
اسکاتیش	۶	۶۶/۰۸	اول
موکوتاه بومی	۸۱	۵۱/۱۹	دوم
پرشین	۱۲	۴۱/۰۴	سوم
هیمالین	۱	۱۴/۵۰	چهارم
کل	۱۰۰	۱۰۰	

کریستال		غذای خشک		غذای خانگی		هر دو
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
کلسیم اگزالات	۱۵	۳۸/۵	۷	۱۶/۳	۶	۳۳/۳
استروئیت	۲۰	۵۱/۳	۳۳	۷۶/۷	۱۰	۵۵/۶
امونیوم فسفات	۱	۲/۶	۱	۲/۳	۰	۰
کربنات کلسیم	۳	۷/۷	۲	۴/۷	۱	۵/۶
بیلی روبین	۰	۰	۰	۰	۱	۵/۶
کل	۳۹	۱۰۰	۴۳	۱۰۰	۱۸	۱۰۰

جدول ۸- کریستال های ادراری به تفکیک گروه سنی

بحث

مثانه یکی از اعضای حیاتی بدن موجودات زنده است که وظیفه ذخیره سازی و دفع ادرار را بر عهده دارد. این عملکرد نقش مهمی در هموستاز بدن ایفا می کند، زیرا کلیه ها از طریق ادرار، مواد زائد و سموم را از بدن دفع می کنند. هرگونه اختلال در این فرایند می تواند به بروز بیماری های جدی و مخاطره آمیز منجر شود (پالت و همکاران، ۲۰۱۰). به همین دلیل، مطالعه و بررسی عوامل مؤثر بر سلامت مثانه و پیشگیری از بیماری های مرتبط با آن اهمیت زیادی دارد. کلیه ها مسئول تصفیه خون و دفع مواد زائد هستند و ادرار تولید شده از طریق حالب ها به مثانه منتقل می شود و سپس از طریق پیشابراه از بدن دفع می گردد. هرگونه اختلال در عملکرد مثانه می تواند منجر به بازگشت ادرار به کلیه ها (ریفلاکس وزیکو یورترال) و آسیب به کلیه ها شود (اسبرون و همکاران، ۲۰۰۹). این امر ممکن است به عفونت های مزمن کلیه (پیلونفریت) و نارسایی کلیوی بیانجامد (ویسنر و همکاران، ۲۰۱۰). سنگ های کریستالی در مثانه زمانی تشکیل می شوند که مواد محلول در ادرار، مانند کلسیم، فسفر و منیزیم، در شرایط خاص رسوب کرده و تشکیل کریستال می دهند. این سنگ ها می توانند باعث انسداد مجاری ادراری و عفونت های شدید شوند (دفاو و همکاران، ۲۰۱۱).

جدول ۷- کریستال های ادراری به تفکیک وضعیت تغذیه

این موضوع بر نقش تغذیه در شکل گیری نوع کریستال ها تأکید دارد و نشان می دهد که نوع رژیم غذایی باید به دقت در مدیریت این بیماری در نظر گرفته شود.

بر اساس یافته های این پژوهش، میزان شیوع کریستال های ادراری در گروه های سنی مختلف تفاوت هایی را نشان می دهد، اما این تفاوت ها از نظر آماری معنی دار نیستند ($P=0.71$). این موضوع بیانگر آن است که سن به تنهایی عامل تعیین کننده ای در ایجاد کریستال های ادراری در گربه ها نیست. با این حال، برخی از انواع کریستال ها در گروه های سنی خاصی فراوانی بیشتری دارند. (جدول ۸)

کریستال	کمتر از ۱ سال		۱-۳ سال		۳-۶ سال		بیش از ۶ سال	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
کلسیم اگزالات	۰	۰	۱۳	۳۱	۱۱	۲۳/۴	۴	۴۴/۴
استروئیت	۲	۱۰۰	۲۵	۵۹/۵	۳۲	۶۸/۱	۴	۴۴/۴
امونیوم فسفات	۰	۰	۰	۰	۱	۲/۱	۱	۱۱/۱
کربنات کلسیم	۰	۰	۳	۷/۱	۳	۶/۴	۰	۰
بیلی روبین	۰	۰	۱	۲/۴	۰	۰	۰	۰
کل	۲	۱۰۰	۴۲	۱۰۰	۴۷	۱۰۰	۹	۱۰۰

کریستال‌های ادراری ندارد (ناردن و همکاران، ۲۰۲۰). بین جنس نر و ماده تفاوت آماری معنی‌داری در میزان ابتلا مشاهده نشد (کیم و همکاران، ۲۰۱۷).

نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که بیش و کم همه گربه‌ها، در تمامی گروهی سنی و در وضعیت جنسی متفاوت (عقیم شده یا نشده) و در تمامی نژادها و با هر جیره‌ی غذایی، مستعد ابتلا به تجمع کریستال (سدیمان) های ادراری هستند. به همین سبب برای پیش‌گیری از اتلا‌ی گربه‌ها به این عارضه ضروری است در مورد همه آن‌ها اقدامات پیش‌گیرانه و مراقبتی لازم صورت گیرد. به‌ویژه چون گربه‌های نژاد بومی بیش از سایر نژادها مستعد ابتلا به چنین بیماری‌هایی هستند، ضروری است مراقبت از آن‌ها مضاعف گردد. همچنین چون میزان ابتلا به کریستال‌های استروئیت بیش از سایر کریستال‌ها است، و چون این سنگ معمولاً در پاسخ به عفونت‌های دستگاه ادراری ایجاد می‌شوند، لزوم مراقبت و پیشگیری از عفونت از اهمیت و ضرورت دو‌چندانی برخوردار است.

مطالعات نشان داده‌اند که فراوانی انواع کریستال‌ها در گربه‌ها به شرح زیر است:

کلسیم‌اگزالات: مشاهده شده در ۲۸ قلابه گربه، شامل ۱۲ قلابه ماده و ۱۶ قلابه نر. بیشترین شیوع در نژاد موکوتاه بومی (۲۲ مورد) و در گربه‌های ۱ تا ۳ ساله (۱۳ مورد) دیده شد.

استروئیت: مشاهده شده در ۶۳ قلابه گربه، شامل ۲۹ ماده و ۳۴ نر. این نوع کریستال در گربه‌های ۳ تا ۶ ساله (۳۲ مورد) و در نژاد موکوتاه بومی (۵۱ مورد) شایع‌تر بود.

آمونیم فسفات، کربنات کلسیم و بیلی روبین نیز در تعداد کمتری مشاهده شدند.

ناردن و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که تفاوتی بین رژیم غذایی و احتمال ابتلا به کریستال‌های ادراری وجود ندارد. در مقابل، اوکافور و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که گربه‌های جوانی که غذای تر مصرف می‌کنند بیشتر مستعد ابتلا به کریستال‌های ادراری هستند. لکارنوسک و همکاران (۲۰۰۱) نیز نشان دادند که بیشترین میزان ابتلا در گربه‌های ۲ تا ۷ سال رخ می‌دهد.

بررسی‌ها نشان داده‌اند که بین نژادهای مختلف اختلاف آماری معنی‌داری در تشکیل کریستال‌ها وجود دارد، به‌طوری‌که نژاد موکوتاه بومی بیشتر از سایر نژادها در معرض خطر قرار دارد. وضعیت عقیمی تأثیر معنی‌داری بر احتمال تشکیل

منابع و مآخذ:

1. Defauw, P. A., Van de Maele, I., Duchateau, L., Polis, I. E., Saunders, J. H., & Daminet, S. (2011). Risk factors and clinical presentation of cats with feline idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 13(12), 967-975.
2. Mendoza-López, C. I., Del-Angel-Caraza, J., Aké-Chiñas, M. A., Quijano-Hernández, I. A., & Barbosa-Mireles, M. A. (2019). Epidemiology of feline urolithiasis in Mexico (2006–2017). *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 5(2), 2055116919885699.
3. Okafor, C. C., Pearl, D. L., Blois, S. L., Lefebvre, S. L., Yang, M., Lund, E. M., & Dewey, C. E. (2019). Factors associated with hematuric struvite crystalluria in cats. *Journal of feline medicine and surgery*, 21(10), 922-930.
4. Kim, Y., Kim, H., Pfeiffer, D., & Brodbelt, D. (2018). Epidemiological study of feline idiopathic cystitis in Seoul, South Korea. *Journal of feline medicine and surgery*, 20(10), 913-921.
5. Naarden, B., & Corbee, R. J. (2020). The effect of a therapeutic urinary stress diet on the short-term recurrence of feline idiopathic cystitis. *Veterinary medicine and science*, 6(1), 32-38.
6. Houston, D. M., Weese, H. E., Vanstone, N. P., Moore, A. E., & Weese, J. S. (2017). Analysis of canine urolith submissions to the Canadian Veterinary Urolith Centre, 1998–2014. *The Canadian veterinary journal*, 58(1), 45.
7. Lund, H. S., Sævik, B. K., Finstad, Ø. W., Grøntvedt, E. T., Vatne, T., & Eggertsdóttir, A. V. (2016). Risk factors for idiopathic cystitis in Norwegian cats: a matched case-control study. *Journal of feline medicine and surgery*, 18(6), 483-491.
8. Pallett A, Hand K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65(3): 25-33.
9. Osborne, C.A., Lulich, J.P., Kruger, J.M., Ulrich, L.K. and Koehler, L.A. (2009). Analysis of 451,891 canine uroliths, feline uroliths, and feline urethral plugs from 1981 to 2007: Perspectives from the Minnesota Urolith Center. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 39(1): 183-197.
10. Wisener, L. V., Pearl, D. L., Houston, D. M., Reid-Smith, R. J., & Moore, A. E. (2010). Risk factors for the incidence of calcium oxalate uroliths or magnesium ammonium phosphate uroliths for dogs in Ontario, Canada, from 1998 to 2006. *American journal of veterinary research*, 71(9), 1045-1054.
11. Lekcharoensuk, C., Osborne, C. A., & Lulich, J. P. (2001). Epidemiologic study of risk factors for lower urinary tract diseases in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(9), 1429-1435.

Prevalence of Urinary Crystals in Cats

Bahador Bardshiri¹, Hassan Mehrabadi², Zahra Sadeghian³, Erfan Javidi³, Mohamad Hossein Naser Bakht³

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
2. Graduate of Doctor of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran

*Corresponding author: bahador.bardshiri@gmail.com

Abstract

Urinary stones are a common issue in cats, which can lead to serious complications, including idiopathic cystitis. The aim of this study was to evaluate the prevalence of urinary crystals in cats in Tehran and investigate their relationship with factors such as breed, gender, age, neuter status, and diet type. In this study, 100 cats referred to Dr. Taghipour's veterinary hospital were examined over a one-year period. After performing ultrasound and urine analysis, cats with echogenic points without acoustic shadowing were selected as those with urinary sediment. The results showed that calcium oxalate crystals (63%) had the highest prevalence, followed by struvite crystals (28%), ammonium phosphate (6%), calcium carbonate (2%), and bilirubin (1%). No significant correlation was found between the prevalence of crystals and variables such as gender ($P=0.57$), neuter status ($P=0.69$), and age groups ($P=0.71$). However, the breed of the cats had a significant effect on the prevalence of urinary crystals ($P=0.04$), with the highest prevalence observed in Himalayan cats and the lowest in Scottish cats. This study indicates that certain breeds are more predisposed to the formation of urinary crystals than others, and preventive measures in this regard could help maintain the health of cats.

Keywords: Urinary crystals, Calcium oxalate, Struvite, Ammonium phosphate, Age, Cat breed

اثر دانه اسپند روی فاکتورهای خونی، پاسخ ایمنی و جمعیت باکتریایی انتخابی روده جوجه های گوشتی

مجید گودرزی^{۱*}، شهرام ننه کرانی^۱، حسین وثوقی^۲

۱- گروه علوم دامی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

۲- گروه دامپزشکی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

*نویسنده مسئول: majidgoudarzi117@gmail.com

چکیده

این آزمایش برای بررسی اثر پودر دانه اسپند و آنتی بیوتیک بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون، پاسخ ایمنی و جمعیت میکرو فلور روده در جوجه های گوشتی سویه راس (۳۰۸) طراحی شد. ۲۴۰ جوجه گوشتی یک روزه به طور تصادفی برای چهار تیمار آزمایشی در نظر گرفته شدند. تیمار های آزمایشی شامل کنترل (C)، بدون دانه اسپند و آنتی بیوتیک، جیره غذایی حاوی ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم لینکومایسین ۸۸ درصد (A) و جیره های غذایی حاوی ۲ گرم در کیلوگرم (H1) و ۴ گرم در کیلوگرم پودر دانه اسپند (H2) بود. برای تعیین تیتراژ آنتی بادی علیه بیماری نیوکاسل در ۱۴ و ۲۱ روزگی و برای پارامترهای بیوشیمیایی در سن ۴۲ روزگی نمونه گیری خون انجام شد. جمعیت باکتری های انتخابی در قسمت ایلئوم روده با استفاده از روش های میکروبیولوژیکی مرسوم با استفاده از محیط های انتخابی آگار شمارش شدند. وجود پودر دانه اسپند در جیره غذایی منجر به کاهش قابل توجه کلسترول کل و افزایش قابل توجه HDL نسبت به گروه کنترل و آنتی بیوتیک شد. تیتراژ آنتی بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) تحت تاثیر تیمارهای آزمایش قرار نگرفت. جمعیت *E. coli* در جوجه های گوشتی تغذیه شده با آنتی بیوتیک و پودر دانه اسپند به طور قابل توجهی کمتر از گروه شاهد بود، اما جمعیت باکتری های لاکتوباسیل تنها توسط آنتی بیوتیک افزایش یافت. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن پودر دانه اسپند می تواند تأثیر مثبتی بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و میکرو فلور دستگاه گوارش داشته است.

واژگان کلیدی: جوجه های گوشتی، دانه اسپند، آنتی بیوتیک، پاسخ ایمنی، پارامترهای بیوشیمیایی خون

مقدمه

مانند ضد باکتری و ضد قارچ (۱۲)، ضد کوکسیدیوز (۳۳)، ضد عفونی کننده (۲۷)، تقویت رشد (۳۰) و کاهش کلسترول و اثرات محافظت کبدی (۱۳)، کاهش گلوکز (۲۹)، مهار مونوآمینوآکسیداز (۲۵)، هیپوترمی (۲)، جلوگیری از تجمع پلاکت ها (۲۴)، اثرات تعدیل سیستم ایمنی (۱۴) و ضد التهابی (۲۰) می باشد. ارشد و همکاران (۲۰۰۸) اعلام کردند که عصاره اسپند فعالیت ضد میکروبی محدودی در برابر *E.coli* در داخل بدن دارد. تنویر و همکاران (۲۰۱۴) نتیجه گرفتند که اسپند اثر ضد کوکسیدیوزی در جوجه های گوشتی دارد. گزارش شده است که غلظت HDL و LDL خون به ترتیب با استفاده از عصاره متانولی اسپند در جیره غذایی جوجه های گوشتی افزایش و کاهش می یابد (۳۱). علی رغم این یافته ها، اطلاعات کمی در رابطه با اثر اسپند بر روی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون و میکروفلور روده در مقایسه با محرک رشد آنتی بیوتیکی در جوجه های گوشتی وجود دارد. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور مقایسه و بررسی تأثیر دو سطح پودر دانه اسپند و آنتی بیوتیک لینکومایسین بر روی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون و میکرو فلور روده و عکس عمل ایمنی در جوجه های گوشتی انجام گرفت.

۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم لینکومایسین ۸۸ درصد (A) و جیره های غذایی حاوی ۲ گرم در کیلوگرم (H1) و ۴ گرم در کیلوگرم (H2) پودر دانه اسپند بود. جیره پایه (جدول ۱) با توجه به احتیاجات غذایی (NRC 1994) بر پایه کنجاله ذرت و سویا برای دو دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روز) فرموله گردید. پودر دانه اسپند و آنتی بیوتیک به جیره پایه اضافه گردید.

محرک های رشد مانند آنتی بیوتیک ها در تولید تجاری طیور نقش فعالی دارند. اگرچه نتایج خوبی با این مواد بدست می آید، اما استفاده از آنها ممکن است دارای اثرات نامطلوبی روی سلامت انسان باشد (۹). به همین دلیل، اخیراً کاربرد بسیاری از محرک های رشد آنتی بیوتیکی در خیلی از کشورها ممنوع شده است. دانشمندان به دنبال جایگزین هایی برای این مواد هستند که این اثرات سوء را نداشته باشد. گیاهان دارویی به مدت طولانی در درمان برخی بیماری ها در انسان مورد استفاده قرار گرفته اند. در عمل گیاهان، عصاره ها و اجزای استخراج شده از آنها به عنوان جایگزینی برای محرک های رشد آنتی بیوتیکی مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۶، ۷). اسپند با نام علمی *Peganum harmala* از خانواده زیگوفلاسه (*Zygophyllaceae*)

می باشد. این ماده برای درمان طیف وسیعی از بیماریهای انسانی مورد استفاده قرار گرفته است (۶). این گیاه حاوی چندین آلکالوئید بتاکاربولین مانند هارمالین، هارمین، هارمالول و هارمول است. این ترکیبات دارای برخی از فعالیتهای دارویی و بیولوژیکی

مواد و روش ها

جهت انجام این آزمایش ۲۴۰ جوجه گوشتی یک روزه (میانگین وزن اولیه: $37/5 \pm 1$ گرم) سویه راس ۳۰۸ بطور تصادفی در ۱۶ قفس زمینی با بستر تراشه چوب توزیع گردیدند. آزمایش شامل ۴ تیمار و هر تیمار شامل ۴ تکرار بود. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل - (C) بدون دانه اسپند و آنتی بیوتیک، جیره غذایی حاوی

لازم حتی الامکان منطبق با روشهای توصیه شده تجاری به عمل آمد. در هفته اول دمای محیط حدود ۳۳ درجه سانتیگراد بود و سپس هر هفته حدود سه درجه دما کاهش یافت تا نهایتاً در ۲۲ درجه سانتیگراد حفظ گردید.

اسپند از بازار محلی تهیه شد. سپس بذرهای خشک از مواد و دانه های خارجی پاک شد و با استفاده از آسیاب به صورت پودر نرم درآورده شد. در طول دوره پرورش که تا سن ۴۲ روزگی بطول انجامید دسترسی پرندگان به آب و خوراک آزاد بود. مراقبت های

جدول ۱- ترکیب اقلام خوراکی (درصد) و مواد مغذی جیره پایه

اقلام خوراکی	جیره آغازین (۲۱-۰ روزگی)	جیره رشد (۲۱-۴۲ روزگی)
دانه ذرت	۵۴/۳۵	۶۵/۶۳
کنجاله سویا	۳۷/۸۱	۲۹/۲۸
روغن سویا	۴/۰۰	۱/۷۵
دی کلسیم فسفات	۱/۲۹	۱/۰۹
پودر صدف	۱/۴۱	۱/۳۲
نمک	۰/۴۴	۰/۳۱
پیش مخلوط ویتامینی	۰/۲۵	۰/۲۵
پیش مخلوط معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵
دی - ال - متیونین	۰/۱۴	۰/۰۶
لیزین	۰/۰۶	۰/۰۶
انرژی قابل متابولیسم ظاهری (Kcal/ kg)	۳۰۰۰	۳۰۰۰
پروتئین خام (%)	۲۱/۵۷	۱۸/۷۴
کلسیم (%)	۰/۹۴	۰/۹۱
فسفر قابل دسترس (%)	۰/۳۸	۰/۳۳
متیونین (%)	۰/۵۵	۰/۳۶
لایزین (%)	۱/۱۵	۰/۹۵
متیونین + سیستین (%)	۰/۹	۰/۶۸

- پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون

از سیاهرگ زیر بال آنها تهیه و در لوله های غیر همپارینی ویژه ریخته شد. نمونه ها یک ساعت در دمای اتاق و سپس بطور مورب در فلاسک یخ قرار گرفتند تا لخته به وجود آمده از سرم جدا شود.

برای تهیه نمونه های خون جهت آزمایشات بیوشیمیایی، بعد از ۸ ساعت گرسنگی در پایان دوره آزمایش از هر تکرار دو جوجه انتخاب شد. با استفاده از سرنگ یکبار مصرف ۵ میلی لیتر خون

(Fulka 92435) اندازه گیری شد. جمعیت باکتری های ایکلای با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار (Fluka 80961) و محیط کشت (Fluka 92435) TBX Agar شمارش گردید. نتایج به صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی بر پایه لگاریتم ۱۰ در هر گرم مواد هضمی گزارش گردید.

- تجزیه آماری

تجزیه آماری داده ها بوسیله نرم افزار آماری SAS (۲۶) و تحت آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت. مقایسه نتایج مربوط به تیتراژ آنتی بادی بیماری نیوکاسل پس از اعمال تبدیل لگاریتمی (بر مبنای ۱۰) بر روی داده های اولیه انجام گرفت.

داده های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و طبق مدل آماری زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

$$y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{هر یک از مشاهدات}$$

$$\mu : \text{میانگین جامعه}$$

$$T_i : \text{اثر تیمارها}$$

$$\varepsilon_{ij} : \text{خطای آزمایشی}$$

سپس نمونه ها به آزمایشگاه منتقل شدند و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند تا سرم آن ها جدا شود. مقادیر تری آسید گلیسرول، HDL، LDL، پروتئین کل، با استفاده از کیت های تجاری (پارس آزمون) با دستگاه اتوآنالایز (آلیسون-۳۰۰، آمریکایی) اندازه گیری شدند.

- تعیین تیتراژ آنتی بادی

جوجه ها در سن ۷ روزگی واکسن تزریقی نیوکاسل سویه لاسوتا را برای ایمن سازی دریافت نمودند. ایمن سازی مطابق برنامه واکسیناسیون دامپزشکی شهرستان بروجرد انجام شد. به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی در جوجه ها، خونگیری در روزهای ۷ و ۱۴ بعد از ایمن سازی انجام شد. برای اندازه گیری تیتراژ آنتی نیوکاسل از تست ممانعت از آگلوتیناسیون (HI) استفاده شد (۳۴).

- جمعیت باکتری های انتخابی روده

برای اندازه گیری جمعیت میکروارگانیزم های انتخابی در روده از ۳۲ پرنده (۲ پرنده در هر تکرار) نمونه هایی از محتویات ایلئومی جمع آوری گردید و برای سنجش های میکروبی ظرف یک ساعت از زمان جمع آوری مورد استفاده قرار گرفتند. برای شمارش باکتری های لاکتوباسیل و اشریشیا کلی توسط تکنیک های مرسوم میکروبیولوژیکی با استفاده از محیط های کشت انتخابی آگار، نمونه های گرفته شده به طور سریالی در محلول نمکی استریل ۰/۸۵ درصد رقیق شدند. تمام اندازه گیری های میکروبیولوژیکی در دو تکرار انجام گرفت و میانگین آن ها برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. جمعیت باکتری های لاکتوباسیل در شرایط غیر هوازی با بکار بردن محیط کش آگار MRS

نتایج

- متابولیت های سرم خون

گروهی که آنتی بیوتیک دریافت کرده بودند، شد (جدول ۲). مقدار HDL با استفاده از ۲ گرم در کیلوگرم پودر دانه اسپند در جیره غذایی افزایش یافت، اما اختلاف آن برای مقدار ۴ گرم در کیلوگرم معنی دار نبود. مقادیر تری گلیسیرید، LDL و پروتئین کل تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند.

استفاده از ۲ و ۴ گرم در کیلوگرم پودر دانه اسپند در جیره غذایی منجر به کاهش قابل توجه کلسترول کل نسبت به گروه شاهد و

جدول ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت متابولیت های سرم

تیمارهای آزمایشی					
فراسنجه	C	A	H1	H2	SEM
تری گلیسیرید (میلی گرم در دسی لیتر)	۶۹/۵۰	۷۴/۰۰	۸۰/۵۰	۸۵/۰۰	۳/۳۱
کلسترول کل ((میلی گرم در دسی لیتر)	۱۰۸/۰۰ ^b	۱۱۳/۲۵ ^b	۱۱۹/۳۰ ^{ab}	۱۲۵/۵۰ ^a	۲/۳۲
LDL (میلی گرم در دسی لیتر)	۱۴/۰۰	۱۳/۷۵	۱۵/۰۰	۱۳/۷۵	۰/۶۹
HDL (میلی گرم در دسی لیتر)	۸۴/۷۵ ^{ab}	۸۲/۰۰ ^b	۹۱/۰۰ ^a	۸۶/۷۵ ^{ab}	۱/۴۶
پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)	۳/۲۰	۳/۲۵	۳/۱۸	۳/۲۰	۰/۰۵

^{abc} میانگین های داخل هر سطر با حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی داری با هم می باشند. ($p < 0.05$).

SEM: خطای استاندارد میانگین

توجهی بر روی تیتراژ آنتی بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل در

سن ۱۴ و ۲۱ روزگی ایجاد کند ($P > 0.05$).

- عیار پادتن ویروس بیماری نیوکاسل

همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، استفاده از آنتی بیوتیک و پودر دانه اسپند در جیره غذایی نتوانست تأثیر قابل

جدول ۳- عیار تیتراژ آنتی بادی بیماری نیوکاسل

تیمارهای آزمایشی					
SEM	H2	H1	A	C	فراسنجه
۰/۰۱۴	۰/۷۳۷(۵/۵۰)	۰/۷۰۶(۵/۱۳)	۰/۷۵۰(۵/۶۳)	۰/۶۹۶(۵/۰۰)	تیترا آنتی بادی ۱۴ روزگی*
۰/۰۱۳	۰/۸۲۸(۶/۵۰)	۰/۸۰۷(۶/۵۰)	۰/۸۱۷(۶/۶۳)	۰/۸۱۲(۶/۵۰)	تیترا آنتی بادی ۲۱ روزگی

* اعداد داخل پرانتز تیترا آنتی بادی و اعداد خارج پرانتز لگاریتم آن ها می باشد.

SEM: خطای استاندارد میانگین

- جمعیت باکتری های انتخابی روده

آنتی بیوتیک و پودر دانه اسپند دریافت کرده بودند، به طور قابل توجهی کمتر از گروه شاهد بود. البته تأثیر آنتی بیوتیک بر روی آن بیشتر از پودر دانه اسپند بود. تفاوت بین گروه های H1 و H2 معنی دار نبود. جمعیت باکتری های لاکتوباسیل فقط توسط آنتی بیوتیک افزایش یافت و تفاوت بین گروه های کنترل و گروه های حاوی پودر دانه اسپند معنی دار نبود ($P > 0.05$).

داده های مربوط به جمعیت باکتری های ایلئوم جوجه های گوشتی در سن ۴۲ روزگی در جدول ۴ نشان داد شده است. استفاده از آنتی بیوتیک و پودر دانه اسپند در جیره غذایی تأثیر معنی داری ($P \leq 0.05$) بر روی جمعیت باکتری های ایکلاهی و لاکتوباسیل داشت. جمعیت باکتر های ایکلاهی در پرندگانی که

جدول-۴- میانگین جمعیت میکروبی روده (CFU/g)

تیمارهای آزمایشی					
SEM	H2	H1	A	C	فراسنجه
۰/۱۰۲	۶/۳۲۵ ^b	۶/۴۲۵ ^b	۵/۸۵۰ ^c	۶/۸۷۵ ^a	اشرشیاکلاهی
۰/۰۸۲	۴/۸۵ ^b	۴/۷۰۰ ^b	۵/۲۲۵ ^a	۴/۶۷۵ ^b	لاکتوباسیل

^{abc} میانگین های داخل هر سطر با حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی داری باهم می باشند. ($p < 0.05$).

SEM: خطای استاندارد میانگین

بحث

۱۰ درصد برگ گیاه اسپند استفاده می کنند، کاهش می یابد. ابازا و همکاران (۲۰۰۳) ۲/۵ کیلوگرم دانه اسپند و ۲/۵ کیلوگرم گل بابونه را به ازای هر تن جیره غذایی در جوجه های گوشتی مورد استفاده قرار دادند و مشاهده کردند که کلسترول سرم در مقایسه با گروه شاهد کاهش می یابد. در مقابل این یافته ها، حسن زاده و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از عصاره آبی و اتانولی دانه های اسپند تفاوت معنی داری در کلسترول کل و HDL مشاهده نکردند.

تنوبر و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند که ۲۵۰ میلی گرم در لیتر عصاره متانولی دانه اسپند در آب آشامیدنی باعث کاهش کلسترول کل، تری گلیسیریدها و LDL و افزایش HDL در جوجه های گوشتی می شود. اینی و همکاران (۲۰۱۴) نتایج مشابهی را در موش صحرایی نر نژاد ویستار گزارش کردند. قزن (۲۰۰۹) دریافت که غلظت کلسترول سرم در جوجه هایی که از جیره غذایی حاوی

نتایج تنویر و همکاران (۲۰۱۴) می باشد. آن ها گزارش کردند که عصاره متانولی اسپند هنگامی که به میزان ۲۵۰ میلی گرم در لیتر آب اشامیدنی جوجه های گوشتی مورد استفاده قرار گیرد، به طور قابل توجهی باعث بهبود تیترا آنتی بادی علیه ویروس نیوکاسل در روزهای ۲۱ و ۲۸ می شود. قرقانی پور و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که عصاره اسپند با دز بهینه ی ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم می تواند به عنوان محرک سیستم ایمنی عمل کرده و پاسخ ایمنی ماهیان پرورشی را افزایش دهد.

نتایج نشان داد که اسپند باعث کاهش جمعیت باکترهای ایکلاهی در روده می گردد. گزارش شده است که گیاه اسپند دارای اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی است (۲۸). به طور سنتی با سوزاندن بذره های آن در ایران به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده مورد استفاده قرار می گیرد (۵). نشان داده شده است که عصاره اتانولی اسپند دارای فعالیت ضد باکتریایی بالایی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (۱۹)، و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم در برابر سفیکسیم (۲۱) می باشد. ارشد و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که عصاره اسپند دارای فعالیت ضد میکروبی محدودی علیه باکتری ایکلاهی در داخل بدن موجود زنده می باشد، اما تغذیه طولانی مدت آن ممکن است دارای اثرات نامطلوبی باشد. عبدالعزیز و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که آکالوئید- β کاربولین جدا شده از قسمتهای هوایی گیاه اسپند، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر استرپتوکوکوس پیوژنوس نشان می دهد. گزارش شده است که هارمن به عنوان یک آکالوئید بسیار معطر فعالیت ضد باکتریایی خود را از طریق

تفاوت در نتایج بدست آمده در مورد کلسترول احتمالاً به دلیل تفاوت در طرح های آزمایشی، سن و گونه های حیوانی و قسمت های گیاه مورد استفاده است. آنزیم اصلی که در تنظیم متابولیسم کلسترول نقش دارد، ۳-هیدروکسی-۳-متیل-گلو تاریل کوآنزیم آ (HMGCoA) ردوکتاز (آنزیم محدود کننده سرعت در مسیر بیوسنتز کلسترول) است. بازدارنده های این آنزیم با مهار رقابتی در تولید کلسترول تداخل ایجاد می کنند. در نتیجه آنها باعث کاهش کلسترول کل، LDL، آپولیپوپروتئین B، VLDL و تری گلیسیریدهای پلاسما می شوند. آنها همچنین غلظت سرمی HDL را افزایش می دهند (۱۰). ممکن است که آنزیم HMGCoA ردوکتاز توسط آکالوئیدهای مختلف هارمین، هارمالین، هارمول موجود در اسپند مهار شده باشد. این گیاه خاصیت آنتی اکسیدانی دارد (۱۸) که باعث کاهش اکسیداسیون LDL و در نتیجه کاهش کلسترول کل می شود. بروگوی و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که هارمالین به طور قابل توجهی ظرفیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به هارمین در مهار یا ظرفیت جلوگیری کننده در برابر رادیکال های آزاد دارد.

نتیجه این آزمایش نشان داد که، پاسخ های ایمنی هومورال تحت تأثیر جیره های غذایی نگرفتند. از آنجا که در رابطه با اسپند فعالیت ضد میکروبی (۱۲) و فعالیت آنتی اکسیدانی (۳۳) گزارش شده است، افزایش پاسخ ایمنی جوجه ها گوشتی مورد انتظار بود. نتایج مشابهی در برخی تحقیقات قبلی (۱۵ و ۲۳) با سایر گیاهان گزارش شده است. متأسفانه گزارش کمی در مورد اثرات اسپند بر پاسخ ایمنی پرندگان وجود دارد. نتیجه این مطالعه در تضاد با

کلات شدن داخلی با DNA انجام می دهد(۱۱). بنابراین این مکانیسم ضد باکتریایی باید برای عصاره فعال گیاه اسپنددر نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با هزینه مالی دانشگاه آزاد واحد بروجرد انجام گرفته است که بدین وسیله تشکرو قدردانی می شود.

منابع

- 1- Abdel Aziz H.G., Abdel Kader S.M., El-Sayed M.M., EL-Malt E.A., Shaker E.S. (1999). Novel β -Carboline alkaloid from *Peganum Harmala* as antibacterial agent. in proc. Tenth Radiation Physics & Protection Conference, Nasr City - Cairo, Egypt, 27-30.
- 2- Abdel-Fattah A.F., Matsumoto K., Gammaz H.A., Watanabe H. (1995). Hypothermic effect of harmala alkaloid in rats: involvement of serotonergic mechanism. Pharmacol. Biochem. Behav., 52(2): 421-426.
- 3- Abaza I.M., Asar M.A., Elshaarrawi G.E., Hassan M.F. (2003). Effect of using Nigella seeds, Chamomile flowers, Thyme flowers and Harmala seeds as feed additives on performance of broiler. Egypt. J. of Agric. Res., 81(2): 735-750.
- 4- Arshad M., Akhtar A., Jan S., (2014). Association of *peganum harmala* Supplementation with immunity against ND, IB and IBD in broiler chicks. Pakistan Journal of Science. 66(1): 88-94.
- 5- Arshad N., Zitterl-Eglseer K., Hasnain S., Hess M. (2008). Effect of *Peganum harmala* or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. Phytother. Res., 22(11): 1533-1538.
- 6- Aslam N., Wani A.A., Nawchoo I.A., Bhat M.A. (2014). Distribution and Medicinal importance of *Peganum harmala*- A review. Int J Adv Res., 2(2): 751-755.
- 7- Ayasan T. (2013). Effects of dietary Yucca schidigera on hatchability of Japanese Quails. Indian J Anim Sci., 83(6): 641-644.
- 8- Berrougui H., Isabelle M., Cloutier M., Hmamouchi M., Khalil A. (2006). Protective effects of *Peganum harmala* L. extract, harmine and harmaline against human low-desity lipoprotein oxidation. J. Pharmacy & Pharamacol., 58(7): 967-974.
- 9- Burgat V. (1991). Residues of drugs of veterinary use in food, La Revue du Praticien 41(11): 985-990.
- 10- Ciftci M., Simsek U.G., Yuce A., Yilmaz O., Dalkilic B. (2010). Effects of dietary antibiotic and cinnamon oil supplementation on antioxidant enzyme activities, cholesterol levels and fatty acid compositions of serum and meat in broiler chickens. Acta Vet. Brno., 79(1): 33-40.
- 11- Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol Rev., 12(4): 564- 582.
- 12- Darabpour E., Motamedi H., Poshtkouhian Bavi A., Seyyed Nejad S.M. (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. EXCLI J., 10: 252-263.
- 13- Eini A.M., Fazaely H., Moharrami Fard M., Meini M., Drab M., Ahmadi Far M. (2014). Effect of *Peganum harmala* L. on lipid parameters in hypercholesterolemia-induced male Wistar Rat. Academia Journal of Medicinal Plants. 2(5): 074-078.
- 14- Ghareghani Poor M., Akbary P., Akhlaghi M., Fereidouni M.S. (2008). Nonspecific immune response of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*, walbaum) fed with seed extract of *peganum harmala* L. Indian J of Fundamental and Applied Life Sciences. 4(3): 249-255.
- 15- Goodarzi M., Landy N. Nanekarani Sh. (2013). Effect of onion (*Allium cepa* L.) as an antibiotic growth promoter substitution on performance ,immune responses and serum biochemical parameters in broiler chicks. Health. 5(8): 1210-1215.
- 16- Goodarzi M., Mohtashami Pour N., Modiri D. (2014). The effect of savory (*Satureja khuzistanica*) essential oils on performance and some blood biochemical parameters of Ross and Cobb broilers. Annu. res. rev. in biol., 4(24): 4336-4343.
- 17- Hasanazadeh Tahery M.M., Hassanpour Fard M., Rabiee N., Ghorishe A., Ravanbakhsh, N. (2013). Effects of aqueous and ethanolic extracts of *Peganum harmala* L. seeds on lipids profile in rats. Journal of Birjand University of Medical Sciences 20(2): 108-114.
- 18- Jinous A., Fereshteh R. (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. Afr. J. Pharm. Pharmacol., 6(22): 1573-1580.
- 19- Moghadam M.S., Maleki S., Darabpour E., Motamedi H., Seyyednejad S.M. (2010). Antibacterial activity of eight local plant extracts in Khouzestan, Iran against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. Asian pacific J Trop Med., 3(4): 262- 265.

- 20- Monsef H.R., Ghobadi A., Iranshahi M., Abdollah M. (2004). Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. J. Pharm. Sci. 7(1): 221-222.
- 21- Prashanth D., John S. (1999). Antibacterial activity of *Peganum harmala*. Fitoterapia. 70(4): 438-439.
- 22- Qazan W.S. (2009). The effect of low levels of dietary *Peganum harmala* L. and *Ballota undulata* or their mixture on chicks. J Anim Vet Adv., 8(8): 1535-1538.
- 23- Rahimi S., Teymouri Zadeh Z., Karimi Torshizi M.A., Omidbaigi R., Rokni H. (2011). Effect of the three herbal extracts on growth performance, immune system, blood factors and intestinal selected bacterial population in broiler chickens. J of Agric Sci and Techn., 13(4): 527-539.
- 24- Saeed S.A., Farnaz S., Simjee R.V., Malik A. (1993). Triterpenes and β - sitosterol from piper betel: Isolation antiplatlet and anti-inflammatory effects. Biochem soc Trans., 21(4): 462s.
- 25- Salari E., Ahmadi K., Dehyaghobi R.Z., Purhematy A. Takaloozadeh H.M. (2012). Toxic and repellent effect of harmal (*Peganum harmala* L.) acetonic extract on several aphids and *Tribolium castaneum*. Chilean J of Agricul. Res., 72: 147-151.
- 26- SAS. (1998). User's Guide, Statistics. SAS Institute, Cary, NC. Schmidt, E. and F.W.
- 27- Shahverdi A.R., Monsef-Esfahani H.R., Nickavar B., Bitarafan L., Khodae S. Khoshakhlagh N. (2005). Antimicrobial activity and main chemical composition of two smoke condensates from *Peganum harmala* seeds. J of Biosci., 60(10): 707-710.
- 28- Shonouda M., Osman S., Salama O., Ayoub A., (2008).Toxical effect of *Peganum harmala* L. leaves on the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* Boised and its parasitoids *Microlitis refiventris* Kok. Pak J Biol Sci., 11(4): 546-552.
- 29- Singh A.B., Chaturvedi J.P., Narender T. Srivastava A.K. (2008). Preliminary studies on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* L. Seeds ethanol extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats. Indian J of Clini Bioch., 23: 391-393.
- 30- Tanweer A.J., Chand N., Khan S., Qureshi M.S., Akhtar A., Niamatullah M. (2012). Impact of methanolic extract of *Peganum Harmala* on the weight gain, feed conversion ratio, feed cost and gross return of broiler chicks. J Anim Plant Sci., 22(2), 264-267.
- 31- Tanweer A.J., Chand N., Khan S., Sultan S., Qureshi M.S., Akhtar A. Inam M. (2013). Association of *Peganum harmala* L. supplementation with lipid profile and its economic benefit in broiler production. Pak Vet J., 33(3): 313-316.
- 32- Tanweer A.J., Chand N., Khan S., Qureshi M.S., Sadique U., Rehman A.U., Sultan A., Arshad M., Akhtar A., Jan S. (2014a). Association of *peganum harmala l*. Supplementation with immunity against ND, IB and IBD in broiler chicks. Pak J of Sci., 66(1): 88-94.
- 33- Tanweer A.J., Chand N., Saddique U., Bailey C.A., Khan R.U. (2014b). Antiparasitic effect of wild rue (*Peganum harmala* L.) against experimentally induced coccidiosis in broiler chicks. Parasitol. Res., 113: 2951-2960.
- 34- Thayer S.G., Beard C.W. (1998). Serologic proce- dures. In: Swayne, D.E., Ed., *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 4th Edition, American Association of Avian Pathologists, Phi- ladelphia, pp. 256-258.

Effect of *Peganum harmala* Seeds on Blood Factors, Immune Response and Intestinal Selected Bacterial Population in Broiler Chickens

Majid Goodarzi^{1*}, Shahram Nanekarani¹, Reza Goodarzi²

1-Department of Animal Science, College of Agriculture, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

2-Department of Veterinary, College of Agriculture, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

Corresponding Author: *Majidgoodarzi117@gmail.com

Abstract

This experiment was designed to study the effects of feeding different levels of *Peganum harmala* seeds (PHS) and antibiotic on serum biochemical parameters, immune response and intestinal microflora composition in Ross (308) broiler chickens. A total of 240 one-d-old unsexed broiler chickens were randomly allocated to each of the 4 treatment groups, each with 4 replicate pens of 15 chicks. The dietary treatments included of control (C) - without PHS and antibiotic - the diet contains 300 mg/Kg Lincomycin 0.88% (A) and the diets contain 2g/Kg (H1) and 4g/Kg (H2) PHS. The chicks were raised on floor pens for 6 weeks. Blood samplings were performed for determine of antibody titer against Newcastle disease on 14 and 21 days and for biochemical parameters on 42 days of age. The populations of *Lactobacilli* spp. and *Escherichia coli* were enumerated in ileum by conventional microbiological techniques using selective agar media. Inclusion of PHS in diet resulted in a significant decrease in total cholesterol and significant increase in HDL relative to the control and antibiotic groups. Antibody titer against NDV was not affected by experimental treatments. The *E. coli* population in birds supplemented with antibiotic and PHS was significantly lower than control but the *Lactobacilli* spp. population increased only by antibiotic and not by PHS. In conclusion, the results of this study showed that addition of *Peganum harmala* seeds powder seem to have had a positive influence on some biochemical parameters and gastrointestinal microflora.

Keywords: broiler, *peganum harmala*, antibiotic, biochemical parameters, immune system

مقایسه‌ی اثرات درمانی نانو اسانس گیاه درمنه با کرم تربینافین ۱٪ در درمان خوکچه‌های هندی مبتلا به درماتوفیتوز ناشی از تریکوفیتون منتاگروفیتس

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، سیامک مشهدی رفیعی^۲، فرنوش ارفعی^۲، عرفان جاویدی^۳، حمید رضا شعبانی^۳، آوا ابریشم کار^۴

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، خوزستان ایران

۲- گروه دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، خوزستان، ایران

۴- دانشجوی علوم زیست شناسی جانور ی دانشگاه گوئلف، انتاریو، کانادا

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@yahoo.com

چکیده

تبدیل داروها به ریزذرات نانو خصوصیات جدیدی به داروها می‌بخشد. در این مطالعه نانواسانس گیاه درمنه برای درمان درماتوفیتوز تجربی ناشی از تریکوفیتون منتاگروفیتس در خوکچه هندی استفاده شده است. برای بررسی اثرات ضد قارچی، از روشهای *In vivo* و *In vitro* استفاده شده است. برای یافتن حداقل غلظت مهارکنندگی قارچی *Microdilution broth* و پروتوکل *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A* استفاده گردید که در این مطالعه مقادیر MIC برای نانواسانس $0.5 \mu\text{g/ml}$ تعیین گردید. تعداد ۲۴ عدد خوکچه به شکل تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. درمان ۵ روز پس از آلوده‌سازی، هر ۱۲ ساعت یکبار تا ۴۰ روز پس از آلودگی ادامه یافت. هر دو گروه درمانی با نانواسانس، کرم تربینافین در روز ۴۰ بهبودی کامل داشتند این مطالعه نشان می‌دهد که نانواسانس گیاه "درمنه" برای درمان درماتوفیتوز ناشی از تریکوفیتون منتاگروفیتس مناسب است و حتی از نظر تاثیر درمان، نسبت به تربینافین موضعی برتری دارد.

واژگان کلیدی: نانواسانس درمنه، تربینافین، تریکوفیتون منتاگروفیتس، خوکچه هندی

مقدمه

در حیوانات به خصوص سگ و گربه، بیماری های پوستی اهمیت ویژه ای دارند و می توانند به دلیل عوامل عفونی مانند: علل انگلی، باکتریایی، قارچی و ویروسی یا عواملی مانند آلرژی، بیماری های سیستم ایمنی، عوامل تغذیه ای، اختلالات هورمونی و بعضی از سرطان ها ایجاد شوند. از میان این عوامل، قارچ ها به علت شیوع نسبتاً زیاد و قابلیت انتقال به انسان از اهمیت ویژه ای برخوردار دارند (۱۰، ۶). درماتوفیت ها گروهی از پاتوژن های بیماری زا هستند که تمایل به بافت های کراتینی مانند لایه شاخی پوست، مو و ناخن دارند که شامل سه جنس: میکروسپوروم، تریکوفیتون و اپیدرموفیتون هستند، که در انسان و حیوان بیماری ایجاد می کنند، بطوری که درماتوفیتوز گربه متداول ترین بیماری عفونی پوست در گربه ها است. از نظر علائم بالینی در حیوانات تنوع زیادی وجود دارد، بطوری که بیماری می تواند از یک شکنندگی جزئی موها همراه با scaling (تجمع سلول های اپیدرمال سطحی مرده) تا ضایعات کلاسیک بیماری که به صورت آلوپسی های گرد، فوکال، مولتی فوکال تا منتشر متفاوت باشد. بالطبع بیماری در حیوانات دچار ضعف ایمنی خصوصاً حیوانات دچار بیماری های سیستمیک و تضعیف کننده سیستم ایمنی با شدت بیشتری ایجاد می گردد و شکل منتشر می یابد. برای درمان این بیماری در حال حاضر علاوه بر کنترل بیماری های زمینه ای و شرایط مستعد کننده از داروهای مختلفی به شکل موضعی، غوطه - وری و عمومی استفاده می شود (۸). در ایران بر اساس

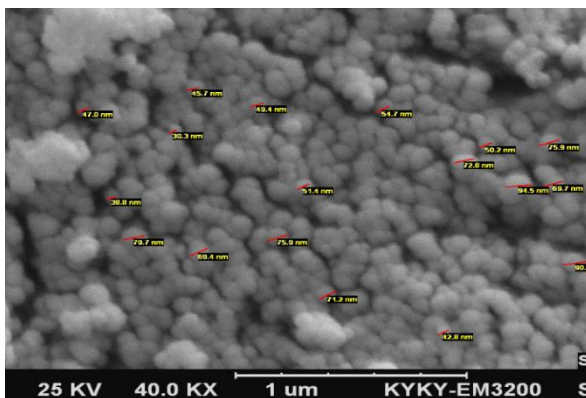
مطالعه ای که در طب پزشکی که بر روی انسان های مبتلا به درماتوفیتوز صورت پذیرفت، مشخص گردید عامل بیماری زای تریکوفیتون منتاگروفیتس علت بروز بیماری در ۴۵/۷٪ از مبتلایان می باشد (۱۸). همچنین در مطالعاتی که در کشورهای لهستان، سوئیس، یونان و ایتالیا بر روی انسان های مبتلا به درماتوفیتوز انجام پذیرفت عامل تریکوفیتون منتاگروفیتس یکی از مهمترین عوامل کچلی در انسان ها گزارش شده است (۱۶، ۱۷).

در حیواناتی که سیستم ایمنی طبیعی دارند، معمولاً عفونت درماتوفیتی خود محدود شونده است، ولی این بدان معنی نیست که درمان در این بیماران لازم به نظر نرسد، بلکه اکثر منابع بدلیل تسریع در برطرف شدن عفونت، به حداقل رسیدن دوره بیماری و از همه مهمتر کاهش توانایی انتقال بیماری به انسان و دیگر حیوانات درمان را توصیه کرده اند. توجه به دوره بسیار طولانی درمان و عوارض جانبی داروهای شیمیایی از جمله: سرکوب کنندگی مغز استخوان، لکوپنی، تراتوژن بودن، علائم نورولوژیک، اسهال و استفراغ، سمیت کبدی، هزینه های نسبتاً بالای برخی از آن ها و مقاومتی که گونه های مختلف درماتوفیت ها در مقابل این داروها از خود نشان داده اند (۷). باعث می گردد که انجام یک مطالعه در جهت شناسایی مؤثرترین غلظت نانو اسانس گیاه "درمنه" و مقایسه اثرات درمانی آن با کرم تربینافین ۱٪ در

خوکچه‌های هندی آلوده شده به تریکوفیتون منتاگروفتیس
ضروری بنظر می‌رسد.

روش کار

در این مطالعه تعداد ۲۴ عدد خوکچه هندی نر با طیف وزنی یکسان (۳۵۰ تا ۴۵۰ گرم) به مدت یک هفته برای آدآپتاسیون در شرایط اوپتیمم (۱۲ ساعت تاریکی در رطوبت ۳±۵٪ و درجه حرارت $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$) و با جیره پایه تغذیه و نگهداری شدند. سپس به شکل تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی شامل یک گروه درمان با کرم تربیتافین ۱٪، دو گروه تیمار با غلظت های متفاوت نانواسانس گیاه درمنه، و یک گروه کنترل منفی تقسیم و تا پایان مطالعه در قفس‌های پلی‌کربناته نگهداری شدند. اسانس آماده شده در کارخانه باریج اسانس کاشان، خریداری و برای تولید نانو دارو از همکاری شرکت زیست شیمی آزما رشد بهره گرفته شد. بعد از آماده سازی نانودارو، عملیات Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)، screening electron microscopy (SEM) و میزان رهایش نانو اسانس در سطح In Vitro با استفاده از uv بر روی آن انجام و بدین ترتیب تولید دارو از اسانس مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). کرم تربیتافین ۱٪ استفاده شده در تحقیق نیز ساخت شرکت تهران شیمی می‌باشد.



شکل ۱- تصویر SEM از کیتوسان بارگذاری شده

برای تهیه inhibitory minimum concentration (MIC) از ایزوله استاندارد PTCC:5054 و ۴ ایزوله جداشده از بیماران، و برای آلوده سازی از ایزوله استاندارد استفاده شده است. روش بکار برده شده برای تهیه MIC روش Microdilution Broth و پروتوکل Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A است. بر طبق این روش رقت‌های سریالی از نانو اسانس گیاه درمنه تهیه شد. آزمایش مورد نظر در محیط کشت RPMI 1640 حاوی L-Glutamine فاقد بی‌کربنات سدیم که در pH 7 با غلظت ۰/۱۶۵ مولار morpholine propane sulfonic acid

۱۰۶ عدد اسپور قارچی در هر میلی‌لیتر در ناحیه خراش داده شده قرار داده و توسط وازلین® به مدت ۲۴ ساعت پانسمان شد. برای بدست آوردن غلظت فوق، ابتدا سوش استاندارد را در محیط potato dextrose agar کشت داده و پس از مدت ۱۰ روز یک سوسپانسیون از ذرات قارچی در محلول سرم فیزیولوژیک استریل تهیه شد. سپس با لام نئوبار تعداد عناصر مذکور در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید و غلظت طوری تنظیم شد که در هر میلی‌لیتر ۱۰۶ عدد ذره قارچی وجود داشته باشد (۱۵).



شکل ۲: تخریش و آماده سازی پوست

در روز پنجم اولین علائم بیماری تظاهر پیدا کرد و براساس پروتکل این نوع تحقیقات، این روز به عنوان روز آغازین درمان در نظر گرفته شد (شکل ۳). ضمن اینکه در این روز نمونه برداری قارچی انجام پذیرفته و تمامی گروه‌ها به غیر از کنترل منفی از نظر قارچ‌شناسی مثبت بودند. درمان هر ۱۲ ساعت یکبار تا بهبودی بالینی و نتیجه قارچ‌شناسی ادامه پیدا

بافری شده است، انجام شد. از سوش استاندارد که در محیط کشت potato dextrose agar به مدت ۱۰ روز در ۲۸°C آماده شده بود، سوسپانسیونی، با خراش دادن سطح کلنی در سرم فیزیولوژیک استریل تهیه گردید. سپس با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ شمارش و غلظت آن طوری تنظیم گردید که پس از افزودن مقدار ثابتی از سوسپانسیون به چاهک های حاوی محیط کشت و رقت نانواسانس تعداد سلولهای قارچی تریکوفیتون منتاگروفیتس برابر با ۱۰۴ cfu/ml بدست آمد. پس از افزودن سوسپانسیون به محیط کشت و رقت‌های نانواسانس، محلول نهایی به مدت ۱ هفته در دمای ۲۸°C انکوبه گردید.

در طی زمان انکوباسیون، از نظر رشد عناصر قارچی، هم به صورت بررسی دقیق چشمی و هم subculture در محیط کشت potato dextrose agar بررسی انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده، MIC نانو اسانس درمانه ۰/۵µg/ml ارزیابی شد. رقت‌های نانواسانس به کار رفته در این تحقیق به ترتیب مقادیر ۰/۵µg/ml، ۱/۰µg/ml می‌باشد که به ترتیب نانواسانس گروه ۱، نانو گروه ۲ نام گذاری شده است. برای تهیه رقت‌های مختلف از نانواسانس از آب مقطر و آب قابل شرب دکلره می-توان استفاده کرد. در قسمت پستی هر یک از حیوانات در بین دو کتف آن‌ها ناحیه‌ای به اندازه ۲ سانتی‌مترمربع تراشیده شده و بوسیله یک تیغ اسکالپل استریل، خراشیدگی‌های اندکی (بدون ایجاد زخم) بوجود آمد (شکل ۲). سپس همانطوری که در مطالعات قبلی نیز به آن‌ها اشاره شده است،

۲≠ موها کمی رشد کرده اند، همراه با مقدار کمی شوره.

۳≠ پوست بدون قرمزی، مقداری کمی شوره، موها شروع

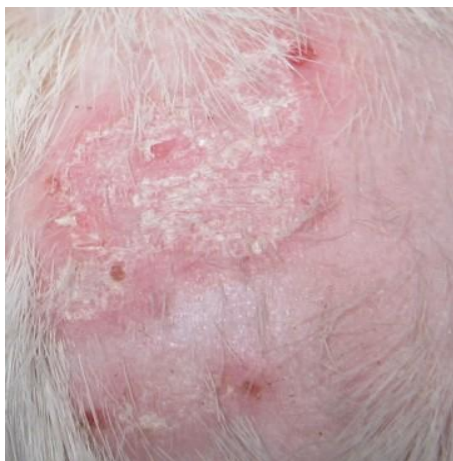
به رشد کرده اند، تعداد کمی تیکه های کچلی.

۴≠ پوست کمی قرمز، بدون مو، شوره دار.

۵≠ ضایعات پوستی شدید، قرمزی، کراست، زخم و بدون

رشد مو(۹). سپس نتایج حاصل از تحقیق توسط آزمون

Kruskal-Wallis Test (نرم افزار SPSS) آنالیز شده‌اند.



شکل ۳: شروع آلودگی (روز پنجم پس از آلوده سازی)

کرد. در طول مدت درمان، غلظت‌های مختلف نانو اسانس توسط آب‌پاش طوری در موضع اسپری می‌شد که علاوه بر سطح آلوده، یک حاشیه چند سانتی‌متری نیز از موهای سالم اطراف خیس شوند. در گروه‌های کنترل منفی نیز از سالین به عنوان placebo استفاده شد. کرم تربینافین به شکلی روی ضایعه قرار داده می‌شد که علاوه بر ایجاد یک لایه کامل و نازک، ۲ سانتی‌متر از حاشیه ضایعه را نیز پوشش دهد.

در مراحل پایانی مطالعه به منظور تایید تاثیر درمان، کشت قارچی انجام پذیرفت. در طول مدت درمان، هر ۷ روز یکبار، تصویر برداری انجام گرفته و هر یک از تصاویر توسط clinical lesion scoring system درجه بندی شد. این

سیستم درجه بندی به شرح زیر است :

۰≠ ناحیه مورد مطالعه بدون علائم عفونت و موها بطور

کامل رشد کرده اند.

۱≠ ناحیه مورد مطالعه دارای پوست سالم، موها تا نصف

ارتفاع رشد کرده و بدون شوره.

نتایج

و هم به صورت مجزا انجام گرفته است که در نمودار آمده است. ضمن اینکه نمونه برداری قارچی هم بر تغییرات محسوس score تأکید و بهبود را تأیید کرده است. بر اساس روش مطالعه، آغاز درمان دارویی روز پنجم بعد از عفونت است. همچنین میانگین درجات ضایعه در روز آغازین در

بررسی‌های مرفولوژیک که هر ۷ روز بوسیله تصویربرداری انجام گرفته است، این تغییرات را به خوبی نشان می‌دهند. در طول مدت درمان با تربینافین ۱٪، غلظت‌های مختلف نانواسانس درمان به‌بودی قابل ملاحظه‌ای اتفاق افتاده است. مقایسه بین گروه‌های مختلف، هم به صورت متوسط score

تمامی گروه‌ها به جز گروه کنترل منفی تقریباً یکسان بوده است. روند منطقی کاهش میانگین درجه‌ی ضایعات در گروه‌های درمانی، طی مدت درمان ادامه یافت. میانگین درجات ضایعه در روز چهارم در گروه‌های نانو ۱، نانو ۲ و کنترل منفی عدد صفر و گروه تربیتافین به ترتیب گروه ۰/۱۶، ۰/۴۱ و ۰/۷۵ ارزیابی شد (جدول ۱).

در ارزیابی آماری بین گروه‌های درمانی تربیتافین و کنترل منفی وجود اختلاف آماری معنی‌دار (نمودار) در کل مدت درمان تأیید شد ($p<0.05$). در ادامه ی این بررسی‌ها، میانگین Score گروه درمانی نانواسانس ۱ معادل رقم ۴/۲ در هنگام آغاز مطالعه می‌باشد که اندکی بیشتر از میانگین گروه تربیتافین در زمان مشابه است.

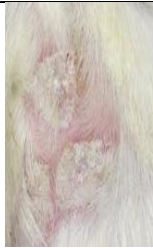
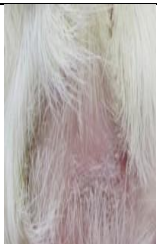
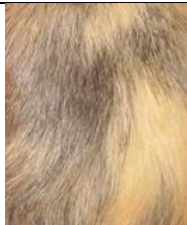
بررسی آماری اعداد در گروه نانواسانس ۲ نشان دهنده‌ی عدد ۴/۵ در هنگام آغاز مطالعه می‌باشد که بیشتر از میانگین

گروه تربیتافین در زمان مشابه است. بررسی‌های آماری بین گروه‌های نانو ۲ و کنترل منفی، اختلاف آماری معنی‌داری را در همه‌ی روزها به جز روز ۴۰ نشان می‌دهند ($p<0.05$). در ادامه آنالیز بین گروه‌های نانواسانس ۲ و تربیتافین همانند گروه نانو ۱ حاکی از وجود اختلاف آماری معنادار در روزهای ۱۹، ۲۶، ۳۳ و ۴۰ پس از آلوده سازی دارد ($p<0.05$).

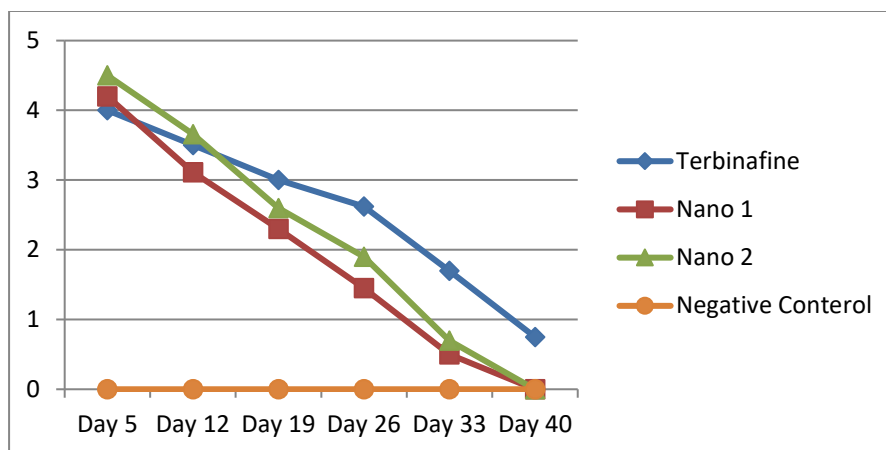
بررسی آماری اعداد در گروه نانواسانس ۲ نشان دهنده‌ی عدد ۴/۵ در هنگام آغاز مطالعه می‌باشد که بیشتر از میانگین گروه تربیتافین در زمان مشابه است. بررسی‌های آماری بین گروه‌های نانو ۲ و کنترل منفی، اختلاف آماری معنی‌داری را در همه‌ی روزها به جز روز ۴۰ نشان می‌دهند ($p<0.05$). در ادامه آنالیز بین گروه‌های نانواسانس ۲ و تربیتافین همانند گروه نانو ۱ حاکی از وجود اختلاف آماری معنادار در روزهای ۱۹، ۲۶، ۳۳ و ۴۰ پس از آلوده سازی دارد ($p<0.05$).

جدول ۱: مقایسه ی clinical lesion score average در طول مدت درمان

گروه روز	۵	۱۲	۱۹	۲۶	۳۳	۴۰
تربینافین	۴	۳/۵	۳	۲/۶۲	۱/۷	۰/۷۵
نانو اسانس ۱	۴/۲	۳/۱۱	۲/۳	۱/۴۵	۰/۵	۰
نانواسانس ۲	۴/۵	۳/۶۶	۲/۶	۱/۹	۰/۷	۰
کنترل منفی	۰	۰	۰	۰	۰	۰

Day Group	۵	۱۲	۱۹	۲۶	۳۳	۴۰
Nano 1						
Nano 2						
Terbinafine						
شاهد						
NC						

شکل ۴: مقایسه روند بهبودی در بازه زمانی بین گروه های مختلف



نمودار ۱: مقایسه ی Clinical lesion score average در طول مدت درمان

بحث و نتیجه گیری

لوسيون عصاره درمنه را کلوتریمازول در درمان موثرتر انسانی بهتر دانسته‌اند (۲). آزاد بخت و همکاران نیز به برابری اسانس درمنه با کلوتریمازول در درمان دامهای کوچک تاکید داشتند (۱).

در این مطالعه مقدار MIC به دست آمده برای نانو اسانس $0.5 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. تاکنون هیچ‌گونه مطالعه مدونی برای بررسی نحوه تأثیر نانواسانس و نحوه اثر گیاه دارویی بر روی مدل حیوانی انجام نگرفته است.

بر طبق بررسی نمودار ۴-۱ روند کاهشی تغییرات Clinical lesion score average، به طور منطقی در تمامی گروه‌های درمانی رخ داده است. اما در مورد گروه‌های نانواسانس ۱ و ۲ به ویژه بین روزهای ۱۲ تا ۳۳ روند کاهشی در محدوده ی Score کمتری نسبت به گروه درمانی دیگر است. به طوری که اختلاف میانگین در گروه نانواسانس

تاکنون داروهای مختلفی برای درمان درماتوفیتوز آزموده شده‌اند. از بین داروهای عمومی و موضعی آزموده شده، داروهای موضعی به علت جلوگیری از آلوده شدن محیط، اهمیت ویژه‌ای دارند و اساس درمان این بیماری به شمار می‌روند. داروی تربیتافین نیز یکی از این داروهاست که هم به صورت موضعی و هم به شکل قرص موجود است. اثرات این دارو علیه انواع عوامل درماتوفیتوز تأیید شده است (۱۴). تاکنون گیاهان دارویی مختلفی برای بررسی اثر درمانی بر درماتوفیتوز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که یکی از آنها درمنه است که در ایران به وفور یافت می‌شود. اثرات ضد قارچی آن بیشتر به اثبات رسیده است. Abad در سال ۲۰۰۷ MIC عصاره گیاه درمنه را 0.2 تا 0.2 میلی گرم در هر میلی لیتر و متعاقباً در ۲۰۱۲ MIC را 0.1 میلی گرم در هر میلی لیتر گزارش نموده است (۴۵). راد و همکاران در یک مطالعه اثرات

2) (غلظت MIC) در روزهای ۱۲ تا ۳۳ عدد ۶۸/۵ درصد را نشان می‌دهد. اما در گروه درمانی تربینافین معادل ۴۹/۲ درصد است. بعلاوه این که پس از روز ۱۲ میزان کاهش Score در گروه نانواسانس ۲ شیب تندی می‌گیرد و تا روز ۴۰ تفاوت محسوسی با گروه درمانی تربینافین دارد که بر اساس تحلیل آماری گروه نانواسانس ۲ و گروه درمانی تربینافین در روزهای ۱۹، ۲۶، ۳۳، ۴۰ واجد اختلاف آماری معنی دار هستند ($p < 0.05$).

به نظر می‌رسد که اختلاف کمی بین میانگین Score در گروه‌های نانواسانس ۲ و تربینافین تا روز ۱۲ پس از آلوده-سازی حاصل نزدیکی مقادیر Score آنها در نقطه‌ی آغازین است. اما آن چه که موجب برتری گروه درمانی نانواسانس ۲ نسبت به گروه درمانی تربینافین شده است، روند بهبودی پس از روز ۱۲ می‌باشد. زیرا میانگین Score پس از روز ۱۲ در گروه نانواسانس ۲ کاهش چشمگیری دارد و تا روز ۴۰ پس از آلوده‌سازی متوسط Score کمتر از گروه درمانی تربینافین بوده است. با توجه به نمودار گروه نانواسانس ۱ که در این تحقیق مقدار یک غلظت بیشتر از غلظت MIC ($1 \mu\text{g/ml}$) در نظر گرفته شده بود، متوسط Score تقریباً شبیه به گروه درمانی تربینافین در روز آغازین دارد. بنابراین مشابه با گروه درمانی نانواسانس ۲ و با در نظر گرفتن روند کاهشی میانگین Score در روز ۱۲ تا ۳۳ پس از آلوده‌سازی و وجود اختلاف آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) در روزهای ۱۹، ۲۶، ۳۳ و ۴۰ با گروه درمانی تربینافین، درمان با نانو اسانس ۱ نسبت به گروه

درمانی تربینافین موفق‌تر به نظر می‌رسد. بیشترین تغییرات میانگین در بین گروه‌های درمانی مربوط به گروه نانو اسانس ۱ است که البته این تأثیر درمانی بهتر به علت غلظت بیشتر دارو در قیاس با نانو اسانس ۲ بوده و قابل انتظار است. بنابراین نانو اسانس درمانه با غلظت‌های بیشتر از ممکن است در عین ایجاد اثرات درمانی مطلوب‌تر، عوارض جانبی بیشتری نیز به وجود آورند.

با توجه به تحلیل آماری، بررسی نمودارها و شرایط بالینی بیماران در طول مدت درمان تأثیر مطلوب‌تر گروه درمانی نانو اسانس ۱ نسبت به گروه درمانی تربینافین تأیید می‌گردد. حتی با در نظر گرفتن صحت تمام و کمال یافته‌های آماری (که تنها به ابعاد محاسباتی داده‌ها می‌پردازد) و رعایت همه جانبه‌ی اصول تحقیق، تنها زمانی که تمامی عوامل مخدوشگر مطالعه در یافته‌های بعدی معلوم نشود، نمی‌توان در برابر بودن غلظت‌های مختلف نانو اسانس درمانه با کرم تربینافین مهر تأیید زد. عواملی مانند میزان جذب ویتامین‌ها، بیماریهای مزمن همراه، عوامل پاتوژن فرصت طلب، بیماریهای قبلی و وضعیت ایمنی بدن همگی جزو عواملی هستند که باید با دقت مورد مطالعه قرار گیرند.

به طور کلی مقایسه‌ی نمودارهای تحلیل آماری در روزهای مختلف دوره‌ی درمانی، روند بهبودی را در گروه‌های درمانی نشان می‌دهند زیرا تمامی آنها در روز ۴۰ پس از آلوده-سازی بهبودی مطلوب ظاهری داشته‌اند. اما آنچه که این گروه‌ها را از هم متمایز می‌سازد.

دیده می‌شود، نتایج کشت قارچی اول، دوم و سوم در گروه‌های نانو اسانس ۱، ۲ و کنترل منفی، منفی بودند. بنابراین روز ۴۰ پس از آلوده سازی می‌تواند در مورد این گروه‌ها زمان پایان درمان باشد. هرچند که درمان تا اخذ نتیجه‌ی کشت سوم نیز ادامه یافت.

نتیجه‌ی کشت قارچ در اولین نمونه‌برداری است که در روز ۳۳ پس از آلوده‌سازی انجام گرفته است. همانطور که قبلاً اشاره شد، تنها عاملی که سبب قطع مصرف دارو می‌شود، دو و ترجیحاً سه کشت قارچی متوالی با نتیجه‌ی منفی است. در حقیقت موفقیت در درمان به نتایج کشت قارچی بیشتر از شکل ظاهری ضایعه متکی است. همانطوری که در جدول ۲

جدول ۲: نتایج کشت قارچ در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در سه دوره‌ی متوالی

روز	گروه	۳۳	۴۰	۵۰
کنترل منفی	۶ از ۰	۶ از ۰	۶ از ۰	۶ از ۰
نانو اسانس ۱	۶ از ۰	۶ از ۰	۶ از ۰	۶ از ۰
نانو اسانس ۲	۶ از ۰	۶ از ۰	۶ از ۰	۶ از ۰
تربینافین	۶ از ۲	۶ از ۰	۶ از ۰	۶ از ۰

نانواسانس مرزنجوش در مقایسه با کرم کتوکونازول در گربه های آلوده به میکروسپوروم کنیس به اثبات رسیده است (۱۱). ضمناً بر اساس تحقیقات ضد قارچی عصاره ی گیاه درمنه عمدتاً مربوط به دو ترکیب شیمیایی مهم به نام های کامفور و ۱ و ۸ سینئول است که در گیاه درمنه با غلظت بالایی موجود است (۳). بنابراین می‌توان بر نتایج حاصل در این تحقیق تأکید داشت و در نتیجه عنوان کرد که اثر درمانی

مشهدی رفیعی و همکاران در سال ۲۰۱۳، تاثیر بهتر درمان موضعی با نانو اسانس گیاه درمنه در قیاس با کرم کتوکونازول در خوکچه هندی آلوده با میکروسپوروم کنیس را به اثبات رسانیدند. همچنین در مطالعات دیگر، اثر درمانی قوی‌تر نانواسانس گیاه مورد در مقایسه با کرم تربینافین در خوکچه‌های هندی آلوده به میکروسپوروم کنیس مورد بررسی قرار گرفت. اخیراً در تحقیقات دیگری تاثیر موثرتر

داروی نانواسانس درمانه نه تنها با کرم تربیتافین برابری می-
نماید بلکه در مواردی (که بحث) بهتر از آن نیز عمل می نماید.
با توجه به این که داروی مذکور عارضه‌ی جانبی ندارد و کاربرد
و تهیه‌ی آن آسان و بسیار مقرون به صرفه است، به راحتی
می توان آن را در درمان بیماری درماتوفیتوز به کار برد. آشکار
است که استفاده از نانواسانس گیاه درمانه برای درمان این نوع
بیماری در انسان نیازمند تکمیل تحقیقات بر روی مدل های
حیوانی است.

منابع

- ۱- آزاد بخت، محمد و همکاران (۱۳۸۲). بررسی تأثیر اسانس گیاهان درمنه کوهی، آویشن شیرازی و مورد بر روی تریکوموناس واژینالیس. مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور. فصل‌نامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی و معطر. ۸، ۳۹-۳۵.
- ۲- راد، محمد علی و همکاران (۱۳۷۶). بیماریهای پوست دام های کوچک (بیماریهای عفونی و ایمنو لوژیک). تهران : مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۶۵، ۶۲.
- ۳- میرحیدر. ح.(۱۳۷۳). معارف گیاهی. تهران: دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۵.
- 4- Abad M., 2007.Active antifungal substances from natural sources. ARKIVOC,,2.
- 5- Abad M., 2012.the Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. Molecules. 17.
- 6- Bernardo F., et al. Dermatophytes isolated from pets, dogs and cats, in Lisbon, Portugal (2000-2004). Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 2005; 100 (553-554): 85-88.
- 7-Birchard S., sherding R.(2006).saunders manual of small animal ractice. Missouri: Elsevier.
- 8-Green,C.2006.Infection Disease of the dog and cat.Philadelphia:W.B.Saunders Co.550-565.
- 9- Ivaskiene M.2011. Establishing the efficacy novel topical formulations in the treatment of experimental dermatophytosis in guinea pigs.27-28.
- 10-Lee S. 2007.Antifungal effects of Eugenol and Nerolidol against Microsporum gypseum in a guinea pig model. Biological And Pharmaceutical Bulletin. 30.
- 11- Mashhady Rafie,S. Baradaran Alizadeh S. Bayat, M.2013. Comparison of the Therapeutic effects of Nano-essence of Medical herb Artemisia sieberi with the ointment of Ketoconazole in guinea pig infected by Microsporum canis. International Research Journal of Biological Sciences.2(12):5-10.
- 12-Mashhady Rafie, S. Chaharbaradari, M. Bayat, M.2014.Comparison of Therapeutic effects of the Myrtus communis Nano-essence and Topical 1% terbinafine cream in Guinea pigs infected by microsporum canis. International Research Journal of Biological Sciences.3(3):23-39.
- 13-Mashhady Rafie, S. Khorram, H. Bayat, M.201. COMPARISON OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF NANO-ESSENCE OF MEDICAL HERB ORIGANUM VULGARE WITH THE KETOCONAZOLE 2% TOPICAL CREAM IN CATS INFECTED BY MICROSPORUM CANIS. International Journal of Biology, Phamarmacy and allied Sciences.4(5):2855-2865.
- 14-Miller, G. H. and Krik, R. W. (2001). Muller and Kirks Smal Animal Dermatology Philadelphia :W.B.Saunders Co.357.
- 15-Nichita I. ET. Al.; 2010; the Fungal Microbiota Isolated from Cats and Dogs; Animal Science and Biotechnologies; 43: 411-414.

-
- 16-Seker, E., and Dogon, N. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytes in Western Turkey. Preventive Veterinary Medicine. 2011; 98 (1): 46-51.
- 17-W. Scott D., et al. Muller & Kirks small animal dermatology, 6th ed., 2001, Saunders, China, P:1528.
- 18- Yahyaraeyat R., Shokri H., Khostari A.R., Soltani M., Erfan-Manesh A. and Nikacin D. Occurrence of animal dermatophytosis in Iran. World Journal of Zoology. 2009; 4(3): 200-204.

Comparison of the Therapeutic Effects of Nano-Essence of *Artemisia* Plant with Terbinafine 1% Cream in the Treatment of Guinea Pigs Infected with Dermatophytosis Caused by *Trichophyton mentagrophytes*

Morteza Razaghi Manesh^{1*}, Siamak Mashhadi Rafiei², Farnoush Arfaei², Hamid Reza Shabani³, Erfan Javidi³, Ava Abrishamkar⁴

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
2. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran
4. Animal Biology student at the University of Guelph, Ontario, Canada

* Corresponding Author: Morteza_vet@yahoo.com

Abstract

Transforming pharmaceutical compounds into nano-sized particles grants them novel physicochemical and therapeutic properties. In this study, the nano-essence of the medicinal plant *Artemisia* was evaluated for its antifungal effects against experimental dermatophytosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* in guinea pigs. Both **in vivo** and **in vitro** methods were employed. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the nano-essence was determined using the Broth Microdilution method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A guidelines and was found to be 0.5 µg/ml. Twenty-four guinea pigs were randomly divided into four groups of six. Treatment began five days after infection and was administered every 12 hours for 40 days. Complete clinical recovery was observed in both groups treated with the nano-essence and topical terbinafine cream by the end of the study. These findings indicate that the *Artemisia* nano-essence is effective in treating dermatophytosis caused by *T. mentagrophytes* and may even demonstrate superior therapeutic performance compared to conventional topical antifungal treatments.

Keywords: Nano-essence of *Artemisia*, Terbinafine, *Trichophyton mentagrophytes*, Guinea

بررسی شیوع انگل ژیا ردیا دئودنالیس در سگ های خانگی ناحیه دزفول به روش PCR

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، لیلا درخشان^۱، نگار صفی خانی^۲، حمیدرضا پیش بین^۳

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر ایران

۲- دانش آموخته عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@yahoo.com

چکیده

علی رغم وجود گزارش هایی از آلودگی با ژیا ردیا دئودنالیس در سگ در ایران، مطالعات کمی در مورد تعیین ژنوتیپ های ژیا ردیا دئودنالیس صورت گرفته است. هدف این مطالعه تعیین میزان شیوع آلودگی و تعیین ژنوتیپ های ژیا ردیا در سگ های خانگی ناحیه دزفول می باشد. تعداد ۲۴۶ نمونه مدفوع به صورت تصادفی از سگ های خانگی مبتلا به اسهال و غیر اسهالی شهرستان دزفول جمع آوری گردید و به آزمایشگاه دامپزشکی منتقل شد. پس از ثبت مشخصات حیوان، نمونه ها با روش شناورسازی با سولفات روی اشباع از نظر وجود کیست ژیا ردیا بررسی شدند. برای استخراج DNA از کیست از روش بابایی و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. به منظور تأیید تشخیص میکروسکوپی از روش PCR استفاده گردید. به این منظور از دو پرایمر GDHiR و GDHiF جهت تکثیر قطعه ی ۴۳۲ جفت باز از ژن gah ژیا ردیا دئودنالیس استفاده شد. تمام نمونه های مثبت در PCR تحت بررسی در آنالیز RFLP قرار گرفت. در نهایت در بررسی میکروسکوپی، ۷ نمونه آلوده به انگل ژیا ردیا دئودنالیس بودند. بنابراین شیوع انگل (۲/۸۴ درصد) بود. بررسی نمونه ها با استفاده از آنزیم NLAIV نشان داد که به ترتیب ۳ نمونه (۴۲/۸۵) ژنوتیپ C، ۲ نمونه ژنوتیپ D (۲۸/۵۷) و ۲ نمونه متعلق به ژنوتیپ AI (۲۸/۵۷) می باشد. یافته های ما حاکی از این است که آلودگی به ژیا ردیا دئودنالیس در سگ های دزفول شایع است. بر اساس این یافته ها، نتیجه گیری می شود که ژنوتیپ C و D ژیا ردیا دئودنالیس، شایعترین ژنوتیپ منطقه ی مورد مطالعه است. اما آلودگی با ژنوتیپ زئونوز A هم دیده می شود. بنابراین می توان سگ ها را به عنوان منبع بالقوه ژیا ردیای انسانی از طریق تماس مستقیم یا از طریق آلودگی آب سطحی معرفی کرد.

واژگان کلیدی: ژیا ردیا دئودنالیس، سگ، دزفول، PCR

مقدمه

ژيارديا دام هاي اهلي مورد مصرف انساني، سگ ها، گربه ها و گونه هاي متعددي از پستانداران وحشي را ميتلا مي کند (۱). ژياردیوزیس انسانی شیوع جهانی داشته و شایع ترین انگل روده ای انسانی در کشور های توسعه یافته است. در ایران هم ژياردیوزیس شایع ترین بیماری انگلی انسان است و تقریباً در تمام نقاط کشور دیده می شود. این تک یاخته شایع ترین عامل بیماری انگلی در ایران است که در اکثر مناطق با شیوع ۱۰-۴۰٪ گزارش شده است (۲). ژيارديا سبب بروز اسهال و گاستروآنتریت در انسان می شود، ولی نقش ژيارديا در ایجاد اسهال در گوساله ها کاملاً مشخص نشده است. گوساله هاي ميتلا به ژياردیوزیس یس گاهی اسهال، کاهش وزن و علايم عمومي از بیماری را نشان می دهند که به نوبه خود منجر به خسارات اقتصادي هنگفتي در صنعت دامداری می شود. با توجه به این که بیماری از طریق آب و مواد غذایی آلوده به کیست و حتی تماس انتقال می یابد، لذا از دیدگاه سلامت عمومی، سگ، گربه و دام های اهلی می توانند محزن مهمی برای ژياردیوزیس انسانی تلقی می شود. آلودگی با این تک یاخته در سراسر دنیا دیده می شود. طبقه بندی ژيارديا بر مبنای خصوصیات ژنتیکی و ریخت شناسی صورت می گیرد. ژياردیادئودنالیس تنها گونه ای است که در انسان و سایر پستانداران از جمله حیوانات اهلی مانند سگ، گربه، گاو، گوسفند، اسب و خوک یافت می شود. مطالعات مولکولی اثبات کرده اند که ژياردیادئودنالیس

شامل ۷ ژنوتیپ اصلی می باشند. ژنوتیپ A و B دارای وسیع ترین طیف میزبانی شامل انسان، گاو و سایر حیوانات اهلی و وحشی می باشد. ژنوتیپ D و C موجب آلودگی سگ و گربه شده و ژنوتیپ E در نشخوارکنندگان و ژنوتیپ F در گربه ها و ژنوتیپ G در رت های آلوده دیده می شود. ژنوتیپ A به دو دسته تقسیم می شود. AI شامل مخلوطی از ژياردیای جدا شده از انسان و حیوان است که از لحاظ جغرافیایی گسترش دارد و در جنبه ژنوتیک ژيارديا بر زیر گروه AI آن بیشتر تاکید می شود. در مقابل، زیر گروه بعدی AII شامل ژياردیاهای نوع انسانی می باشد. ژنوتیپ B شامل دو زیر گروه III و IV می باشد (۳،۴،۵). علی رغم وجود گزارش هایی از آلودگی با ژيارديا دئودنالیس در سگ در ایران، مطالعات کمی در مورد تعیین ژنوتیپ های ژيارديا دئودنالیس صورت گرفته است. این مطالعه برای تعیین شیوع میزان آلودگی در سگ های خانگی ناحیه دزفول و تعیین ژنوتیپ های ژياردیادئودنالیس در سگ های خانگی دزفول صورت گرفته است.

مواد و روش کار

تعداد ۲۴۶ نمونه مدفوع به صورت تصادفی از سگ های خانگی مبتلا به اسهال و غیر اسهالی شهرستان دزفول جمع آوری گردید. نمونه های مدفوع با استفاده از دستکش لاتکس یکبار مصرف از رکتوم هر حیوان جمع آوری شد. هر نمونه در ظرف نمونه گیری پلاستیکی در پیچ دار قرار گرفت برچسب اطلاعات اخذ زده شد و بعد جمع آوری به آزمایشگاه دامپزشکی منتقل شد. مشخصات حیوان، سن، جنس و ابتلا به اسهال در پرسش نامه ثبت شد. نمونه ها در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شد.

نمونه های مدفوع با روش شناورسازی با سولفات روی اشباع برای تشخیص کیست بررسی شدند. پس از مخلوط کردن نمونه با آب مقطر و عبور از الک ۱۰۰، مایع حاصله سانتریفیوژ شده و محلول سولفات روی اشباع به آن اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ مجدد، نمونه ها با لوگول رنگ آمیزی شده و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ و در صورت نیاز با عدسی روغنی ۱۰۰ بررسی شدند. تمامی وسایل پس از استفاده شسته می شدند.

کیست های ژیا ردیا با روش شناورسازی در محلول ساکارز ۰.۸۵ مولار جداسازی و خالص سازی نسبی شدند. نمونه های مدفوع پس از مخلوط شدن با آب مقطر و فیلتراسیون، به محلول ساکارز افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۷۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. کیست های تجمع یافته در لایه حد واسط با دقت جداسازی، مجدداً با آب مقطر شست و شو و در

۴۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب نهایی در لوله های ایندروف جمع آوری و در دمای منفی ۲۰ درجه برای انجام آزمایش PCR نگهداری شد.

استخراج DNA از کیست با روش بابایی و همکاران (۲۰۰۸) و با استفاده از شیب غلظتی ساکارز و فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (PCI) انجام شد (۶). برای تخریب دیواره کیست از مهره های شیشه ای استفاده گردید. نمونه های تغلیظ شده با بافر لیزکننده حاوی SDS، EDTA، تریس-HCl و پروتئیناز K مخلوط و به مدت یک ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس DNA با روش PCI استخراج، با اتانول رسوب داده و در آب مقطر حل گردید. برای تأیید تشخیص میکروسکوپی، از روش PCR با پرایمرهای GDHiR و GDHiF جهت تکثیر قطعه ۴۳۲ جفت باز از ژن gdh استفاده شد. برای الکتروفورز PCR از ژل آگارز ۱.۵٪ استفاده شد. پس از حل کردن آگارز در بافر TBE و افزودن Safe Stain، محصولات PCR با بافر بارگذاری مخلوط و به چاهک ها منتقل شدند. الکتروفورز به مدت ۷۰ دقیقه با ولتاژ ۵ ولت/سانتیمتر انجام شد و باند ۴۳۲ جفت باز با تابش UV مشاهده شد. تمام نمونه های مثبت PCR تحت آنالیز RFLP قرار گرفتند. برای هضم آنزیمی از آنزیم NlaIV استفاده شد (۷).

بدین ترتیب که ۸ میکرولیتر از محصول PCR به ۱/۵ آنزیم NlaIV و ۲ میکرولیتر ۱۰X بافر آنزیم اضافه و با حجم

نهایی ۲۰ میکرولیتر در ۳۷ درجه و برای ۳ ساعت هضم انجام شد و پروفایل ها در آگارز ۲٪ مشاهده شد.

۲ نمونه (۲۸/۵۷) درصد متعلق به زیر گروه AI می باشد. ژنوتیپ B در این مطالعه مشاهده نشد.

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنی دار بین فراوانی آلودگی حیوانات به ژیا ردیا دئودنالیس در جنس نر و ماده دام بود. ($P>0.05$)

نتایج روش مولکولی حاکی از آن بود که تمامی نمونه های مدفوع مثبت گزارش شده در روش میکروسکوپی (۷ مورد)، با روش PCR نیز آلوده به ژیا ردیا دئودنالیس بودند. آنالیز PCR-RFLP روی نمونه ها نشان داد که به ترتیب ۳ نمونه (۴۲/۸۵ درصد) و ۲ نمونه (۲۸/۵۷ درصد) به ژنوتیپ C و D و

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنی دار بین فراوانی آلودگی حیوانات به ژیا ردیا دئودنالیس در سنین مختلف دام و در دام اسهالی و غیر اسهالی وجود داشت ($P<0.05$). (جدول ۱)

جدول ۱- فراوانی آلودگی به ژیا ردیا در سگهای خانگی شهرستان دزفول با پارامترهای مطالعه شده مرتبط با ویژگیهای حیوان

نمونه	ابتلا به اسهال		جنس دام		سن دام (سال)	
	+	-	نر	ماده	بیشتر مساوی یک	کمتر از یکسال
تعداد دام (قلاده)	۱۸	۲۲۸	۱۴۰	۱۰۶	۱۵۹	۸۷
تعداد دام الوده (درصد)	۵ (۲/۷۷)	۲ (۰/۸۷)	۳ (۲/۱۴)	۴ (۳/۷۷)	۲ (۱/۲۵)	۵ (۵/۷۴)
P	$X^2 = 43.669$ $P = 0.000$		$X^2 = 0.580$ $P = 0.446$		$X^2 = 4.099$ $P = 0.043$	

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آلودگی به *Giardia duodenalis* در سگ‌های شهرستان دزفول شایع بوده و می‌تواند تهدیدی بالقوه برای سلامت عمومی محسوب شود. این انگل، یک تک‌یاخته زئونوز است که از طریق حیوانات اهلی مانند سگ، گربه، گاو و گوسفند به انسان منتقل می‌شود و عمدتاً از راه تماس مستقیم با حیوان آلوده یا از طریق آب و غذای آلوده به کیست‌های انگل انتشار می‌یابد. اهمیت اپیدمیولوژیک و بهداشتی *G. duodenalis* طی سال‌های اخیر به دلیل شیوع بالای آن و مقاومت نسبی کیست‌های انگل در برابر روش‌های رایج تصفیه آب، مورد توجه ویژه قرار گرفته است.

بر اساس نتایج بررسی‌های میکروسکوپی، ۲/۸۴ درصد از نمونه‌های مدفوع سگ‌های بررسی شده در این مطالعه آلوده به *G. duodenalis* بودند. مقایسه این داده‌ها با مطالعات پیشین مانند تحقیق همایونی و همکاران (۸) در سال (۲۰۱۹) که شیوع ۹/۱ درصدی را در منطقه شیراز گزارش کرده بودند، نشان‌دهنده شیوع بالاتر در منطقه دزفول است. عواملی نظیر تفاوت‌های جغرافیایی، زمان و فصل نمونه‌گیری، تعداد نمونه‌ها، ترکیب سنی جمعیت مورد مطالعه و روش‌های مدیریتی می‌توانند بر میزان آلودگی تأثیرگذار باشند. همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که دفع کیست‌های انگل ممکن است به صورت متناوب انجام شود (۹)، که این

موضوع احتمال کاهش واقعی برآورد شیوع را در صورت استفاده از تنها یک نمونه مدفوع برای بررسی افزایش می‌دهد. در این مطالعه رابطه معناداری بین سن سگ‌ها و میزان آلودگی به *G. duodenalis* مشاهده شد، به‌طوری‌که آلودگی در سنین پایین‌تر شیوع بیشتری داشت. همچنین نمونه‌های مدفوع اسهالی در مقایسه با نمونه‌های بدون علائم گوارشی، نرخ آلودگی بالاتری را نشان دادند که هم‌راستا با فرضیه نقش پاتوژنیک انگل در بروز اسهال می‌باشد.

از نظر مولکولی، برای شناسایی ژنوتیپ‌های *Giardia duodenalis* از روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم NlaIV استفاده شد (۱۰). نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های C و D - که معمولاً محدود به سگ‌ها هستند و پتانسیل زئونوز پایین‌تری دارند - در اکثر نمونه‌ها به ترتیب ۸۵/۴۲ و ۵۷/۲۸ درصد مشاهده شدند با این حال، شناسایی ژنوتیپ زئونوز AI در نمونه‌ها، نشان‌دهنده پتانسیل نقش سگ‌ها در انتقال بیماری به انسان است، به‌ویژه در شرایط تماس مستقیم یا آلودگی منابع آبی سطحی.

نتیجه گیری نهایی

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که آلودگی به *Giardia duodenalis* در سگ‌های شهرستان دزفول نسبتاً شایع است و ژنوتیپ‌های غالب در این منطقه، ژنوتیپ‌های C و D می‌باشند که به‌طور معمول در سگ‌ها دیده می‌شوند.

با این حال، شناسایی ژنوتیپ ژئونوز A در برخی نمونه‌ها حاکی از آن است که سگ‌ها می‌توانند به‌عنوان یکی از منابع بالقوه انتقال بیماری ژیاردیوزیس به انسان مطرح باشند، به‌ویژه در شرایط تماس مستقیم یا آلودگی منابع آبی. با توجه به نقش مهم حیوانات در چرخه انتقال ژیاردیا و همچنین مقاومت کیست‌های انگل در محیط، لزوم شناسایی دقیق ژنوتیپ‌ها از طریق روش‌های مولکولی برای تدوین راهکارهای مؤثر در پیشگیری و کنترل بیماری ضروری است.

این نتایج می‌تواند به مسئولین بهداشت عمومی در تعیین منابع احتمالی آلودگی، مدیریت ریسک‌های ژئونوتیک و طراحی برنامه‌های نظارتی و کنترلی کمک کند. از سوی دیگر، با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه ژنوتیپ‌های *G. duodenalis* در سایر دام‌های اهلی، توصیه می‌شود که مطالعات گسترده‌تری در این زمینه انجام شود تا نقش آن‌ها در اپیدمیولوژی ژیاردیوزیس و تهدیدات احتمالی برای سلامت عمومی به‌درستی ارزیابی گردد.

منابع:

1. Emtiazi, G. (1399)., Fundamentals of molecular biology and genetic engineering, 10th Edition., Mani Publications, 2-6.
2. Tavassoli, M. (1385), Veterinary protozoology, 1st Edition, 62-63.
3. Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B. and De Verdier, K., 2003. Cryptosporidium parvum and Giardia intestinalis in calf diarrhoea in Sweden. Acta Veterinaria Scandinavica, 44 (3), pp.1-8.
4. Calderaro, A., Gorrini, C., Montecchini, S., Peruzzi, S., Piccolo, G., Rossi, S., Gargiulo, F., Manca, N., Dettori, G. and Chezzi, C., 2010. Evaluation of a real- time polymerase chain reaction assay for the detection of Dientamoeba fragilis. Diagnostic microbiology and infectious disease, 67 (3), pp.239-245.
5. Coklin, T., Farber, J., Parrington, L. and Dixon, B., 2007. Prevalence and molecular characterization of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. Veterinary parasitology, 150 (4), pp.297-305.
6. Babaei, Z., OURMAZDI, H., Akhlaghi, L., REZAEI, S., Razmjou, E., SOLTANI, A.S., MEMAR, A. and Hadighi, R., 2008. Molecular characterization of the Iranian isolates of Giardia lamblia: application of the glutamate dehydrogenase gene. Iranian Journal of Public Health, 37 (2), pp.75-82.
7. Zimmerman, S.K. and Needham, C.A., 1995. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor Cryptosporidium/Giardia Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT Giardia EZ Microplate Assay for detection of Giardia lamblia. Journal of clinical microbiology, 33 (7), pp.1942-1943.
8. Homayouni, M.M., Razavi, S.M. and Asadpour, M., 2019. Prevalence and molecular characterization of Cryptosporidium spp. and Giardia intestinalis in household dogs and cats from Shiraz, Southwestern Iran. Veterinaria italiana, 55 (4), pp.311-318.
9. Wielinga, C.M. and Thompson, R.C.A., 2007. Comparative evaluation of Giardia duodenalis sequence data. Parasitology, 134 (12), pp.1795 1821.
10. Foronda, P., Bargues, M.D., Abreu-Acosta, N., Periago, M.V., Valero, M.A., Valladares, B. and Mas-Coma, S., 2008. Identification of genotypes of Giardia intestinalis of human isolates in Egypt. Parasitology research, 103 (5), pp.1177- 1181.

Prevalence of *Giardia Duodenalis* Parasite in Domestic Dogs of Dezful Region by PCR Method

Morteza Razaghi Manesh^{1*} Leila Derakhshan¹, Negar Safikhani², Hamid Reza Pishbin³

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar, Iran.
2. Doctor of Veterinary Medicine Student, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Shushtar, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran

* Corresponding Author: Morteza_vet@yahoo.com

Abstract

Despite reports of *Giardia duodenalis* infection in dogs in Iran, few studies have been conducted on determining the genotypes of *Giardia duodenalis*. The purpose of this study was to determine the prevalence of infection in domestic dogs in the Dezful region and to determine the genotypes of *Giardia duodenalis* in domestic dogs in Dezful. PCR-RFLP method was used for the presence of *Giardia duodenalis* parasite and also to determine its genotypes. In this method, the target fragment of 432 base pairs was amplified. Finally, in microscopic examination, 7 samples were infected with *Giardia duodenalis* parasite. Therefore, the prevalence of parasites was (2.84%). The samples using NLAIV enzyme showed that 3 samples (42/85) of genotype C, 2 samples belonging to subgroup D (28/57) and 2 samples belonging to subgroup D respectively. AI is (28/57). Our findings indicate that *Giardia duodenalis* infection is common in Dezful dogs. Based on these findings, it is concluded that *Giardia duodenalis* genotype C and D are the most common genotypes in the study area. But contamination with zoonosis genotype A is also seen. Therefore, dogs can be introduced as a potential source of human giardia through direct contact or through surface water contamination.

Keywords: *Giardia Duodenalis*, Dog, Dezful, PCR

مقایسه اثر نانواسانس بره موم و کتوکونازول در درمان درماتوفیتوز

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، بهادر بردشیری^۱، مهوش باژن^۲، زهرا صادقیان^۳، محمد حسین ناصر بخت^۳

۱-گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

۲-دانش آموخته عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۳-دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@yahoo.com

چکیده

در سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات طبیعی و فناوری نانو در درمان عفونت‌های قارچی مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه، تأثیر نانواسانس بره موم در مقایسه با کرم کتوکونازول ۲٪ بر درمان درماتوفیتوز تجربی ناشی از *Microsporum canis* در خوکچه‌های هندی بررسی شد. حداقل غلظت مهارکننده قارچ (MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی در محیط مایع تعیین شد. در مطالعه‌ی *in vivo* ۱۸ خوکچه‌ی هندی آلوده به صورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند و تحت درمان با نانواسانس بره موم، کرم کتوکونازول ۲٪ و کنترل منفی قرار گرفتند. روند بهبودی از طریق ارزیابی بالینی و کشت قارچی بررسی شد. نتایج نشان داد نانواسانس بره موم تأثیر قابل‌توجهی در کاهش شدت ضایعات پوستی و مهار رشد قارچ دارد. مقایسه آماری بین گروه‌های درمانی تفاوت معنی‌داری را به نفع نانواسانس بره موم نسبت به کتوکونازول نشان داد ($p < 0.05$). یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد، نانواسانس بره موم می‌تواند به‌عنوان یک گزینه‌ی درمانی مؤثر و جایگزین برای درمان درماتوفیتوز مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: درماتوفیتوز، *Microsporum canis*، نانواسانس بره موم، کتوکونازول، ضدقارچ

مقدمه

در دنیای امروزی، نگهداری از سگ‌ها و گربه‌ها به عنوان حیوانات خانگی در بسیاری از کشورهای جهان رواج یافته است و کشور ما نیز از این قاعده مستثنی نیست. این امر موجب افزایش تعداد این حیوانات در منازل و سایر محیط‌های نگهداری شده است. تنوع نژادی و اهداف مختلف نگهداری از سگ‌ها و گربه‌ها، سبب ایجاد ارتباط تنگاتنگی میان انسان و این حیوانات شده است و از همین رو، افراد در معرض ابتلا به بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان قرار دارند [۱]. یکی از بیماری‌های مهم ژئونوتیک، درماتوفیتوز است که یک بیماری قارچی پوست و مو در انسان و حیوانات بوده که از جنبه های ژئونوتیک حائز اهمیت بالایی می باشد؛ به طوری که حیوانات بزرگترین منبع آلودگی به رینگ ورم میباشند و معمولاً افراد مبتلا ظاهری ناخوشایند پیدا نموده که از آن رنج می برند [۲]. بیماری درماتوفیتوز در سراسر جهان انتشار دارد و عوامل ایجادکننده آن شامل قارچ های میکروسپوروم کنیس، تریکوفیتون و اپیدرموفیتون است [۳]. این بیماری با علائم بالینی مانند ریزش مو و خارش همراه است که می تواند تأثیرات روانی و اجتماعی قابل توجهی برای صاحبان حیوانات به همراه داشته باشد [۴]. برای درمان این بیماری، روش های مختلفی از جمله استفاده از داروهای ضدقارچی سیستمیک و موضعی مثل کتوکنازول مطرح شده است، اما استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی، به دلیل ویژگی های

بی خطر و ایمن بودن، توجه بسیاری را جلب کرده است [۵]. یکی از این مواد طبیعی، بره موم (Propolis) که به عنوان یک ترکیب حاصل از فعالیت زنبور عسل شناخته می شود و خواص ضدباکتریال، ضدالتهابی و ضدقارچی دارد [۶]. بشر طی قرن های گذشته همواره از بره موم در طب سنتی بهره گرفته است. امروزه نیز مطالعات متعدد نشان داده اند که بره موم دارای تأثیر بازدارندگی حداقل روی ۲۱ گونه باکتریایی، ۹ گونه قارچی، ۳ گونه تک یاخته ای و طیف وسیعی از ویروس هاست [۷]. همچنین مطالعات صورت گرفته تأثیر آن را بر قارچ های بیماری زا از جمله گونه های مختلف کاندیدا و درماتوفیت ها مشخص کرده اند [۸]. محققین نیز کاربردهای پزشکی بسیار متنوعی را برای بره موم اثبات کرده اند، مانند درمان انواع بیماری های التهابی، بیماری های قلبی، دیابت شیرین، مسمومیت کبدی، سرطان و غیره [۹]

بنابراین، بره موم به عنوان یک داروی سنتی، می تواند خواص آنتی باکتریال، آنتی توموری، آنتی اکسیدان، آنتی ویروس و خواص ضدالتهابی داشته باشد [۱۰] و به دلیل داشتن ضرر کم و کاربرد موضعی و سیستمیک، در درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار گیرد.

در مطالعات بسیاری اثربخشی کتوکنازول خوراکی و موضعی بر روی عفونت های قارچی تأیید شده است. از جمله

روش کار

در این پژوهش از ابزارهای آزمایشگاهی مختلفی جهت انجام آزمایشات استفاده شد که شامل موارد زیر می‌باشد:

محیط‌های کشت مخصوص قارچ شناسی برای جداسازی و شناسایی عوامل درماتوفیتوز، دستگاه استخراج اسانس بره موم با روش تقطیر، دستگاه کلونجر برای استخراج اسانس، ابزارهای نانوفناوری جهت تهیه نانواسانس بره موم، نوار چسب اسکاج برای روش نمونه‌گیری خاص، محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar همراه با کلرامفنیکل و سیکلو هگزامید، دستگاه FTIR^۴ و SEM^۵ جهت بررسی خصوصیات نانو اسانس، نرم‌افزار SPSS برای تحلیل آماری داده‌ها.

در این مطالعه، ابتدا خوکچه هندی های سالم با وزن ۳۵۰ تا ۴۵۰ گرم انتخاب و به مدت یک هفته در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دما: ۲۴±۱°C، رطوبت: ۵۰±۳٪، چرخه نوری: ۱۲: ساعت روشنایی - ۱۲: ساعت تاریکی) نگهداری شدند تا با محیط آزمایش سازگار شوند.

پس از دوره سازگاری، ناحیه‌ای از پوست حیوانات تراشیده شد و سوسپانسیون قارچی حاوی میکروسپوروم کنیس روی

در مطالعه نیمه‌ورا^۱ و همکاران (۲۰۰۱) فعالیت ضدقارچی کتوکونازول نشان داده شد. ون‌گروان و اودس^۲ (۱۹۹۵) در مقایسه کرم‌های کتوکونازول ۲٪ و میکونازول ۲٪ بر روی مالاسزیا فورفور اثربخشی کتوکونازول را بسیار بیشتر از میکونازول گزارش نمودند. همچنین در مطالعه لانگ^۳ و همکاران (۱۹۹۸) نتیجه گرفته شد که استفاده یک روزه یا ۳ روزه شامپوی کتوکونازول ۲٪ در درمان تینه‌آ وریکال بسیار مؤثر و ایمن است.

در این مطالعه، هدف مقایسه تأثیرات درمانی نانواسانس بره موم با کرم کتوکونازول ۲٪ در درمان خوکچه‌های هندی مبتلا به درماتوفیتوز تجربی ناشی از میکروسپوروم کنیس است. با توجه به مشکلات جانبی و هزینه‌های بالای درمان‌های شیمیایی، این مطالعه می‌تواند به‌عنوان یک گام مهم در جهت شناسایی درمان‌های طبیعی و مؤثرتر برای کنترل و درمان درماتوفیتوز، با تأکید بر کاهش عوارض جانبی و هزینه‌های درمانی، مطرح شود. این تحقیق نه تنها به بهبود سلامت حیوانات خانگی کمک خواهد کرد، بلکه می‌تواند خطرات انتقال بیماری به انسان را کاهش داده و به‌عنوان یک روش درمانی نوین در دامپزشکی و پزشکی مورد استفاده قرار گیرد [۱۱].

۱. Nimura

۲. Van-Gervan & Odds

۳. Lange

۴. Fourier Transform Infrared Spectrometer

۵. Screening Electron Microscopy

آن تلقیح گردید. بعد از بروز علائم بالینی و تأیید آلودگی قارچی از طریق لامپ وود، آزمایش میکروسکوپی و کشت، حیوانات به سه گروه درمانی تقسیم شدند: گروه دریافت کننده نانواسانس بره موم، گروه دریافت کننده کرم کتوکونازول ۰.۲٪، گروه کنترل منفی (بدون درمان)

استخراج نانواسانس بره موم با استفاده از روش تقطیر آبی و کلونجر انجام شد. برای این کار، پودر بره موم در آب مقطر حل شده و در سیستم تقطیر قرار گرفت. با جمع آوری اسانس طی ۴ ساعت و حذف آب اضافی با سولفات سدیم، اسانس خالص در دمای ۴ درجه سلیسیوس نگهداری شد.

در این مطالعه اسانس آماده شده از کارخانه باریج اسانس کاشان، خریداری و برای تولید نانو دارو از همکاری شرکت زیست شیمی آزما رشد بهره گرفته شد بعد از آماده سازی نانو دارو، عملیات FTIR، SEM و میزان رهائش نانواسانس در سطح In Vitro با استفاده از uv بر روی آن انجام و بدین ترتیب تولید دارو از اسانس مورد تأیید قرار گرفت. کرم کتوکونازول ۰.۲٪ استفاده شده در تحقیق نیز از شرکت ایران ناژو می باشد.

برای تهیه MIC^۱ از ایزوله استاندارد PTCC: ۵۰۵۴ و ۴ ایزوله جدا شده از بیماران، و برای آلوده سازی از ایزوله استاندارد استفاده شده است. روش به کار برده شده برای تهیه MIC روش Broth Microdilution و پروتوکل (CLSI) M^{۳۸}-A است. بر طبق این روش رقت های سریالی از

نانواسانس بره موم تهیه شد. آزمایش مورد نظر در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی L- Glutamine فاقد بیکربنات سدیم که در pH = ۷ با غلظت ۰/۱۶۵ مولار از morpholine propane sulfonic acid بافری شده است، انجام شد. از سوش استاندارد که در محیط کشت potato dextrose agar به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ °C آماده شده بود، سوسپانسیونی، با خراش دادن سطح کلنی در سرم فیزیولوژیک استریل تهیه گردید. سپس با استفاده از لام نتوبار زیر میکروسکوپ، شمارش و غلظت آن طوری تنظیم گردید که پس از افزودن مقدار ثابتی از سوسپانسیون به چاهک های حاوی محیط کشت و رقت نانواسانس، تعداد سلول های قارچی میکروسپوروم کنیس برابر با ۱۰^۴ cfu/ml به دست آمد. پس از افزودن سوسپانسیون به محیط کشت و رقت های نانواسانس، محلول نهایی به مدت ۱ هفته در دمای ۲۸ °C انکوبه گردید. در طی زمان انکوباسیون، از نظر رشد عناصر قارچی، هم به صورت بررسی دقیق چشمی و هم subculture در محیط کشت potato dextrose agar بررسی انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، MIC نانواسانس بره موم ۱۶۰ µg/ml ارزیابی شد. برای تهیه رقت- های مختلف از نانواسانس، می توان از آب مقطر و آب قابل شرب دکلره استفاده کرد.

سپس در قسمت پستی هر یک از حیوانات در بین دو کتف آن ها ناحیه ای به اندازه ۲ سانتی متر مربع تراشیده شده و به وسیله یک تیغ اسکالپل استریل، خراشیدگی های اندکی

ضایعات بر اساس clinical lesion scoring system درجه‌بندی شدند. امتیازدهی شامل شش سطح از (۰ بدون علائم و رشد کامل موها) تا (۵ ضایعات شدید، زخم و عدم رشد مو) بود. در نهایت، نتایج تحقیق با آزمون Kruskal-Wallis و نرم‌افزار SPSS تحلیل گردید.

نتیجه گیری

بررسی‌های مرفولوژیک با تصویربرداری هر ۷ روز تغییرات را به‌وضوح نشان دادند. طی درمان با کتوکونازول ۲٪ و نانواسانس بره موم، بهبودی قابل‌توجهی مشاهده شد. مقایسه میانگین Score بین گروه‌ها، هم به‌صورت کلی و هم مجزا انجام شد که در نمودارها قابل مشاهده است.

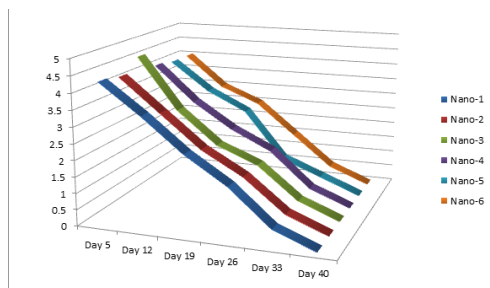
همچنین، نمونه‌برداری قارچی تغییرات محسوس را تأیید کرد. درمان از روز پنجم پس از عفونت آغاز شد و میانگین درجه ضایعات در تمام گروه‌ها (به‌جز کنترل منفی) در ابتدا تقریباً یکسان بود. کاهش منطقی درجه ضایعات در گروه‌های درمانی طی دوره درمان ادامه یافت، به‌طوری‌که در روز چهارم، میانگین درجه ضایعه در گروه نانواسانس و کنترل منفی صفر و در گروه کتوکونازول ۷۵٪ ثبت شد.

تحلیل آماری نشان داد که بین گروه‌های کتوکونازول و کنترل منفی اختلاف آماری معنادار در کل دوره درمان وجود داشت. ($p < 0.05$) میانگین Score گروه نانواسانس در آغاز مطالعه ۴/۲ بود که کمی بالاتر از گروه کتوکونازول بود.

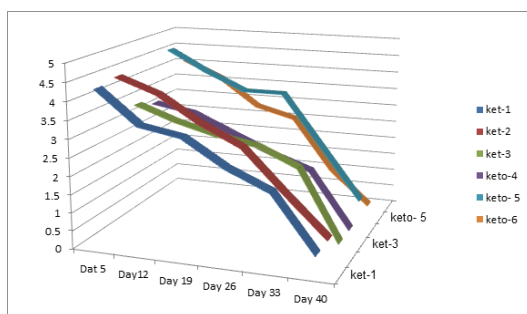
(بدون ایجاد زخم) به وجود آمد. سپس همان طوری که در مطالعات قبلی نیز به آن‌ها اشاره شده است، ۱۰۶ عدد اسپور قارچی در هر میلی‌لیتر در ناحیه خراش داده شده قرار داده و توسط وازلین ® به مدت ۲۴ ساعت پانسمان شد. برای به دست آوردن غلظت فوق، ابتدا سوش استاندارد را در محیط potato dextrose agar کشت داده و پس از مدت ۱۰ روز یک سوسپانسیون از ذرات قارچی در محلول سرم فیزیولوژیک استریل تهیه شد. سپس با لام نئوبار تعداد عناصر مذکور در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید و غلظت طوری تنظیم شد که در هر میلی‌لیتر ۱۰۶ عدد ذره قارچی وجود داشته باشد.

در روز پنجم، اولین علائم بیماری ظاهر شد و طبق پروتکل تحقیق، این روز به عنوان آغاز درمان تعیین گردید. در همین روز، نمونه‌برداری قارچی انجام شد که به‌جز گروه کنترل منفی، همه گروه‌ها از نظر قارچ‌شناسی مثبت بودند. درمان هر ۱۲ ساعت یک‌بار تا بهبودی بالینی و نتیجه منفی قارچ‌شناسی ادامه یافت. نانواسانس با آب‌پاش روی ضایعه و حاشیه‌ای از موهای سالم اسپری شد. در گروه کنترل منفی، سالی‌ن به عنوان پلاسبو استفاده گردید. کرم کتوکونازول ۲٪ نیز به‌طوری‌که روی ضایعه اعمال شد که یک لایه نازک و ۲ سانتی‌متر از حاشیه را پوشش دهد.

در پایان مطالعه، کشت قارچی برای تأیید درمان انجام شد. همچنین هر ۷ روز یک‌بار تصویربرداری صورت گرفت و



نمودار ۲: میزان درجه ضایعه بالینی در گروه نانو اسانس



نمودار ۳: میزان درجه ضایعه بالینی در گروه کتوکنازول

ارزیابی نمونه برداری قارچی در روزهای ۳۳، ۴۰ و ۵۰ پس از آلوده سازی، تأثیر داروها را بررسی کرد. طبق جدول ۲، در روز ۳۳ کشت قارچی در گروه های کنترل منفی و نانو اسانس منفی بود، اما ۲ نمونه از گروه کتوکنازول مثبت گزارش شد. درمان تا زمانی ادامه یافت که حداقل ۲ کشت قارچی متوالی در تمام حیوانات گروه های درمانی منفی شد.

روز گروه	۳۳	۴۰	۵۰
کنترل منفی	۰ از ۶	۰ از ۶	۰ از ۶
نانو اسانس	۰ از ۶	۰ از ۶	۰ از ۶
کتوکنازول	۲ از ۶	۰ از ۶	۰ از ۶

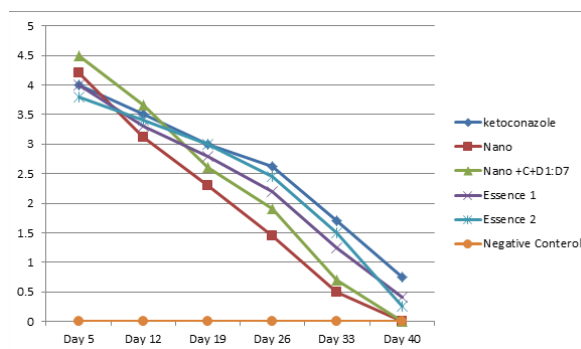
جدول ۲: نتایج کشت قارچ در گروه های مختلف مورد مطالعه

در سه دوره متوالی

مقایسه آماری بین گروه دریافت کننده ی نانو اسانس بره موم و کنترل منفی در همه روزها به جز روز ۴۰ اختلاف معنادار نشان داد ($p < 0.05$). همچنین، میان گروه دریافت کننده نانو اسانس بره موم و کتوکنازول در روزهای ۱۹، ۲۶، ۳۳ و ۴۰ پس از آلوده سازی، اختلاف آماری معناداری مشاهده شد ($p < 0.05$).

روز گروه	۵	۱۲	۱۹	۲۶	۳۳	۴۰
کتوکنازول	۴	۳/۵	۳	۲/۶۲	۱/۷	۰/۷۵
نانو اسانس	۴/۲	۳/۱۱	۲/۳	۱/۴۵	۰/۵	۰
کنترل منفی	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۱: مقایسه میانگین درجه ضایعه بالینی در طول مدت درمان



نمودار ۱: مقایسه میانگین درجه ضایعه بالینی در طول

مدت درمان

بحث و نتیجه گیری

داروهای موضعی در درمان درماتوفیتوز اهمیت ویژه‌ای دارند، زیرا علاوه بر اثربخشی، از آلودگی محیط جلوگیری می‌کنند. کتوکونازول یکی از داروهای رایج در این زمینه است که هم به صورت موضعی و هم خوراکی استفاده می‌شود. همچنین بره موم به عنوان یک ترکیب گیاهی با خواص ضدقارچی مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون مطالعه‌ای میدانی بر نانواسانس بره موم در مدل‌های حیوانی انجام نشده بود، لذا این تحقیق با هدف مقایسه اثر درمانی نانواسانس بره موم و کرم کتوکونازول ۲٪ بر روی خوکچه هندی طراحی شد.

در مرحله *In vitro* مقدار MIC نانواسانس بره موم $160 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد و سپس مدل *In vivo* ایجاد گردید. درمان از روز پنجم پس از آلودگی آغاز و تا روز چهل ادامه یافت. بررسی *Clinical lesion score average* نشان داد که روند کاهش شدت ضایعات در گروه‌های درمانی منطقی بوده، اما در گروه نانواسانس بین روزهای ۱۲ تا ۳۳ روند بهبودی کمی کندتر از کتوکونازول بود. با این حال، بررسی آماری و بالینی تأثیر مطلوب‌تر نانواسانس را تأیید کرد.

مقایسه نتایج کشت قارچی در روز ۳۳ نشان داد که تنها گروه‌های نانواسانس و کنترل منفی نتایج منفی داشتند، درحالی‌که دو نمونه از گروه کتوکونازول مثبت باقی ماندند.

این نتایج نشان می‌دهد که موفقیت درمان بیش از ظاهر ضایعه، به نتایج کشت قارچی وابسته است.

بررسی هزینه‌ها نشان می‌دهد که نانواسانس بره موم ۲۰ تا ۸۰ برابر ارزان‌تر از کرم کتوکونازول است، درحالی‌که اثر درمانی برابر یا حتی در برخی موارد بهتر از آن دارد. علاوه بر این، تغییرات ظاهری شدید ضایعه در گروه کتوکونازول می‌تواند موجب نارضایتی صاحب دام و افزایش خطر انتشار آلودگی شود، درحالی‌که این مشکل در گروه نانواسانس کمتر دیده شد.

در نهایت، نانواسانس بره موم به دلیل عدم گزارش عوارض جانبی، هزینه پایین، و اثربخشی مطلوب، می‌تواند گزینه‌ای مناسب برای درمان درماتوفیتوز باشد. البته برای استفاده در انسان، نیاز به مطالعات تکمیلی در مدل‌های حیوانی وجود دارد.

منابع

۱. شادزی، ش. (۱۳۹۳). قارچ-شناسی پزشکی؛ روشهای تشخیص آزمایشگاهی و درمان. چ ۱۵، اصفهان: جهاد دانشگاهی.
۲. آرچین، ط.، اونق، ع.غ.، تهرانی، ع.ا.، کشی پور، س. (۱۳۹۹). ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوامولسیون بره موم، عصاره اتانولی بره موم، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه سودوموناس ائروژینوزا. ارمان دانش، دوره ۲۵، شماره ۱ (پای در پی ۱۳۸)، ص ۲۲-۳۹.
۳. Kakoolaki, S., Talas, Z.S., Cakir, O., Ciftci, O. and Ozdemir, I. (۲۰۱۳). Role of propolis on oxidative stress in fish brain. *Basic and Clinical NeuroScience*, ۴(۲): ۱۵۳-۱۵۸.
۴. Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F. et al. (۲۰۰۲). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, ۷۳ Suppl ۱: S۵۳-S۶۳.
۵. Larsson, C.E., Nahas, C.R., Ledon, A.L.B., Gambale, W., Paula, C.R., Corrêa, B. (۱۹۹۴). Ringworm in domestic cats in Sao Paulo, Brazil, Between ۱۹۸۱-۱۹۹۰. *Santa Barbara: Feline Practice*, ۲۲(۳): ۱۱-۱۴.
۶. De Vecchi E, Drago L. Propolis' antimicrobial activity: what's new? *Infez Med* ۲۰۰۷; ۱۵(۱): ۷-۱۵.
۷. Gupta, A.K., Kohli, Y., Li, A., Faergemann, J., Summerbell, R.C. (۲۰۰۰). In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br J Dermatol*, ۱۴۲(۴): ۷۵۸-۶۵.
۸. Koc, A.N., Silici, S., Ayangil, D., Ferahbas, A., Cankaya, S. (۲۰۰۵). Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses*, ۴۸(۳): ۲۰۵-۱۰.
۹. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. (۱۹۹۹). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, ۶۴(۳): ۲۳۵-۴۰.
۱۰. Dodwad, V., Kukreja, B.J. (۲۰۱۱). Propolis mouthwash: A new beginning. *J Indian Soc Periodontol*, ۱۵(۲): ۱۲۱-۵.
۱۱. Momen-Beitollahi, J., Mansorian, A., Esmaili, M., Amanlou, M., Mohamadnia, A., Bahrami, N. (۲۰۰۹). Antimicrobial effects of propolis extract on the most prevalent Oral pathogens: An in vitro study. *The Journal of Islamic Dental Association of IRAN (JIDA)*, ۲۱(۱): ۳۳-۹.

Comparison of the Effect of Nano-Essence of Propolis and Ketoconazole in the Treatment of Dermatophytosis

Morteza Razaghi Manesh^{۱*}, Bahador Bardshiri^۱, Mahvash Bazhan^۲, Zahra Sadeghian^۳,

Mohamad Hossein Naserbakht^۳

۱. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
۲. Graduate of Doctor of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran
۳. Doctor of Veterinary Medicine Student, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran

* Corresponding Author: Morteza_vet@yahoo.com

Abstract

In recent years, the use of natural compounds and nanotechnology in the treatment of fungal infections has attracted attention. In this study, the effect of propolis Nano-Essence compared to ۲% ketoconazole cream on the treatment of experimental dermatophytosis caused by *Microsporum canis* in guinea pigs was investigated. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth dilution method. In the in vivo study, ۱۸ infected guinea pigs were randomly divided into three groups and treated with propolis Nano-Essence, ۲% ketoconazole cream, and a negative control. The healing process was evaluated through clinical observation and fungal culture. The results showed that propolis Nano-Essence had a significant effect in reducing the severity of skin lesions and inhibiting fungal growth. Statistical comparison between the treatment groups showed a significant difference in favor of the propolis Nano-Essence compared to ketoconazole ($p < 0.05$). The findings of this study indicate that propolis Nano-Essence can be used as an effective and alternative treatment option for dermatophytosis.

Keywords: Dermatophytosis, *Microsporum canis*, Nano-Essence of Propolis, Ketoconazole, Antifungal

بررسی فلور میکروبی چشم و ناحیه ی تحتانی پلک در سگ های سالم و دارای اپیفورا به روش کشت و PCR

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، عرفان دیانی^۲، علیرضا سلمانی^۳، ماهان یغمایی^۳

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر ایران

۲- دانش آموخته عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@yahoo.com

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی فلور چشم و ناحیه ی تحتانی چشم در سگ های سالم و مبتلا به اپیفورا انجام شد. برای جمع آوری نمونه جهت کشت میکروبی و قارچی، از دومیکروسواب استریل استفاده شد. تمام نمونه های میکروسواب در PBS یعنی سالین بافر فسفات برای کشت به آزمایشگاه منتقل شدند. برای هر دو گوش از پلک بلافاصله همراه دو مک کانکی استفاده شد. یک صفحه SDA یعنی سابورد کستروز آگار به کشت قارچ برای هر گوش اعمال شد. برای قراردادن ارگانیسم های جدا شده، چند آزمایش استاندارد بیوشیمیایی انجام شد. به طور خلاصه، در مطالعه حاضر فلور باکتریایی و قارچی چشم و زیر چشم در موارد اپیفورا بررسی شد. در نمونه های چشم با اپیفورا، قارچ های مختلف شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Aspergillus fumigatus*، *Candida*، *Fusarium* و *Aspergillus brasiliensis* با فراوانی های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه های چشم نرمال، *Aspergillus niger* و *Candida* شناسایی شدند، اما سایر قارچ ها حضور نداشتند. در نمونه های پوست نرمال، *Aspergillus fumigatus* در دو نمونه شناسایی شد، در حالی که سایر قارچ ها یافت نشدند. در نمونه های پوست با اپیفورا، مشابه نمونه های چشم با اپیفورا، قارچ های مختلف شامل *Aspergillus*، *Pichia*، *Chatomium*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus fumigatus*، *Candida* و *Fusarium* با فراوانی های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه های چشم نرمال، گونه های باکتریایی مانند *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه ها شناسایی شدند، در حالی که گونه های دیگر با فراوانی های متفاوت یافت شدند. در نمونه های چشم با اپیفورا، مشابه نمونه های چشم نرمال، *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه ها شناسایی شدند، اما گونه های دیگر با فراوانی های متفاوت حاضر بودند، شامل *S. auricularis*، *S. cohnii*، *S. xylosus*، *Strep. canis*، *Strep. agalactiae*، *Micrococcus*، *Coryne. xerosis* و *Coryne. aquaticum* در نمونه های پوست نرمال، *S.*

S. epidermidis و *intermedius* در بیشتر نمونه‌ها با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند، در حالی که گونه‌های دیگر گزارش نشدند. در کل، این یافته‌ها نشترکیبات میکروبی بین نمونه‌های چشم با اپیفورا و چشم نرمال، و همچنین بین نمونه‌های پوست با اپیفورا و پوست نرمال تفاوت‌های قابل توجهی وجود دارد. برای درک پیامدهای این تغییرات میکروبی و نقش آنها در سلامت چشم سگ‌ها، نیاز به تحقیقات بیشتر است.

واژگان کلیدی: اپیفورا، فلور باکتریایی، فلور قارچی، کانژکتیوا، پلک

مقدمه

که منجر به این عارضه میگردد. میزان رطوبت چشم و ناحیه ی اطراف چشم میتواند بر نوع فلور میکروبی این نواحی اثر گذار باشد. تغییرات رطوبت محیط در زمان کاهش معمولاً منجر به افزایش بار میکروبی باکتریایی و در زمان افزایش منجر به غالب شدن بار میکروبی قارچی میشود (۵). در سگ های دارای اپیفورا ایجاد درماتیت زیر چشم معمول است و به طور غالب این درماتیت قارچی میباشد. در این مطالعه به بررسی هم زمان فلور میکروبی چشم و ناحیه ی تحتانی پلک پایین از فورنیکس داخلی تا فورنیکس خارجی در دو گروه از سگ های مبتلا به اپیفورا و سگ های سالم می پردازیم. در این تحقیق، با استفاده از روش PCR، تشخیص جنس مایکوپلازما در آلودگی های فرآورده های بیولوژیک صورت گرفته است (۶). در تحقیق دیگری، برای تشخیص گونه مایکوپلازما گالی سپتیکوم در نمونه های بالینی از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۱۶S rRNA استفاده شده است. همچنین، در تحقیق دیگری نیز برای تشخیص گونه مایکوپلازما سینوویه در نمونه های بالینی از روش VlhA-PCR استفاده شده است (۲). ویتلی و همکاران در سال ۲۰۰۰، مطالعه ای درباره عفونت های چشم سگ انجام دادند. در این مطالعه، باکتری های گرم منفی به عنوان عامل اصلی در نظر گرفته شد (۱). سرچاهی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵، بر روی انتی بیوگرام جدایه های چشمی در سگ تحقیق کردند و در این مطالعه، اثر بیشتری را برای اکسی تتراسایکلین مشاهده

فلور نرمال چشم و ناحیه ی پری اوکولار (شامل ناحیه ی تحتانی پلک پایین از فورنیکس داخلی تا خارجی در این مطالعه) شامل مجموعه باکتری و قارچ هایی است که به صورت هم زیست و بدون ایجاد آسیب در این ناحیه موجودند. به طور کلی فلور نرمال باکتریایی چشم در سگ ها گونه های مختلف استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، کورینه باکتریوم، مواردی از سودوموناس در نظر گرفته می شود همچنین فلور نرمال قارچی چشم در مطالعات پیشین به شکل اسپرژیلوس کلادوسپوریوم و پنسیلیوم گزارش شده است (۴). اگر چه مطالعات کمی به بررسی هم زمان فلور میکروبی چشم و ناحیه ی پری اوکولار پرداخته اند، همیشه فلور و همچنین بار میکروبی این دو ناحیه به هم مرتبط و با هم در تعامل بوده اند و تغییرات هر کدام از آن ها بر تغییر دیگری اثر گذار می باشد. اپی فورا یا اشک ریزش به علل مختلفی اتفاق می افتد. این امر میتواند ناشی از تحریک چشم منجر به ساخته شدن زیاد از حد اشک یا ناتوانی سگ در تخلیه ی مناسب اشک باشد. به طور کلی اشک تولید شده از مجرای اشکی بینی به بینی و گلو تخلیه می گردد. اپیفورامی تواند علاوه بر تحریک زیاد چشم به علت هر نوع ناهنجاری در این مسیر باشد (۳). عواملی مثل کانژکتویت، عفونت های چشمی، در معرض محرک هایی مثل گرد و غبار بودن، کوچک بودن انسداد یا التهاب مجرای اشکی بینی، الرژی و ناهنجاری های مژه و پلک مثل مژه ی نا به جا، برگشتگی پلک به داخل از جمله مواردی است

کردند(۶). پرادو و همکاران در سال ۲۰۰۵،

میکروارگانسیم‌های جدا شده از چشم سگ‌های نرمال و دارای کراتیت اولسراتیو را بررسی کردند. نتایج نشان دادند که بار میکروبی چشم در سگ‌های دارای کراتیت اولسراتیو بیشتر از سگ‌های دیگر است. کودیرکین و همکاران در سال ۲۰۰۶، به بررسی فلور چشم سگ‌ها پرداختند(۱۳). در این مطالعه، ۴۶ سگ مورد بررسی قرار گرفتند و فلور نرمال باکتریایی چشم آن‌ها گونه‌های استافیلوکوک را نشان داد. همچنین، داشتن علایم کانژانکتویت با الودگی به سودوموناس همراه بود(۱۲).

گراندون و همکاران در سال ۲۰۱۰، در یک گزارش به کراتومایکوز در سگ‌های دارای اپیفورا پرداختند که با استفاده از واریکومازول درمان شد. سبولد و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹، به بررسی علل اپیفورا در پودل‌ها پرداختند (۱۹). ومویل و همکاران در سال ۲۰۱۴، فلور قارچی چشم سگ‌ها را بررسی کردند و جدایه‌هایی مانند التراریا، کلادوسپورییدیوم، پنسیلیوم و اسپرژیلوس را از چشم این سگ‌ها جدا کردند (۱۰).

معاینه اولیه

۲۵ قلابه سگ سالم فاقد اپیفورا و ۲۵ قلابه سگ دارای تشخیص اپیفورا در مطالعه بررسی شد در مجموع ۵۰ چشم سالم و ۵۰ چشم دارای اپیفورا بررسی شد. سن جنس نژاد سگ‌های مورد بررسی ثبت و علت ایجاد اپیفورا به تشخیص دامپزشک متخصص بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک بررسی و ثبت شد(۱۵). ایندور و یا اوت دور بودن حیوان و شرایط نگهداری و تاریخچه‌ی بیماری‌های چشم ثبت شد. هیچ یک از حیوانات مورد بررسی دارای بیماری زمینه‌ای عمومی نبود. دو میکرو سواب از هر چشم و دو میکرو سواب از هر ناحیه‌ی تحتانی پلک پایین از فورنیکس داخلی تا فورنیکس خارجی به تفکیک برای کشت باکتری و قارچ گرفته شد دو میکرو سواب استریل برای جمع‌آوری نمونه‌ها برای کشت‌های باکتریایی و قارچی استفاده شد (۱۳).

روش کار

DNA باکتریایی از نمونه‌های سواب با استفاده از کیت QIAamp DNA Mini Kit (شرکت Qiagen Inc)، ولسنیا، کالیفرنیا، آمریکا) با رعایت دستورالعمل تولید کننده برای باکتری‌ها از سواب چشمی استخراج شد. DNA استخراج شده در محلول الونشن موجود الوته شد و تا زمان تحلیل بیشتر در دمای 20°C - نگهداری شد (۱۵).

برای تشخیص حضور مایکوپلاسما، یک پروتکل PCR خانواده-ویژه استفاده شد که طبق روش توصیف شده توسط Lauerman (1998a)، b) بود. واکنش PCR از الیافی استفاده کرد که در ژاپن توسعه یافته بودند (Harasawa et al., 1986): JGMF (5'- ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3') و JGMR (5'- CCTCATCGACTTT CAGACCCAAGGCAT-3'). واکنش PCR شامل ۴۰ چرخه بود، هر چرخه شامل تعمیم در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، تشکیل در 55°C به مدت ۳۰ ثانیه و تمدید در 72°C به مدت ۶۰ ثانیه بود. تمدید نهایی در 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۱۷).

برای تشخیص کلامیدیا، روش PCR مضاعفی با هدف دامنه‌های متغیر ۳ و ۴ ژن omp1 کلامیدیا، طبق روش توصیف شده توسط Kaltenboeck (۱۹۹۸) به کار گرفته شد. واکنش PCR در دو واکنش جداگانه انجام شد: PRIM (اولین واکنش) و SEC (واکنش داخلی،

مضاعف). در واکنش PRIM، از پرایمرهای زیر استفاده

شد: CHOMP (5'-۱۹۱ GCITYTITGGGARTGYGGITGYGCIAC CHOMP37 (5'-TAGAAICKGAA و -3') TTGIGCRTTIAAYGTGIGCIGC3') واکنش

PCR شامل تعمیم اولیه در 96°C به مدت ۱۰ دقیقه، پس از آن ۵۰ چرخه تعمیم در 96°C به مدت ۱ ثانیه، تشکیل در 46°C به مدت ۱ دقیقه و تمدید در 72°C به مدت ۱

دقیقه بود. برای واکنش SEC، از پرایمرهای زیر استفاده

شد: CHOMP (5'-۲۰۱ GGIGCWGMITTCOAATAYGCI CHOMP336 (5'- CARTC-3') CAAMGTTTCTGGAYTTMAWYTTGTT (3'-) واکنش PCR شامل ۳۵ چرخه بود که در آن تعمیم در 96°C به مدت ۱ ثانیه، تشکیل در 46°C به مدت ۱ دقیقه و تمدید در 72°C به مدت ۱ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز و تجزیه و تحلیل:

برای مشاهده محصولات PCR، مقادیری از DNA تقویت شده به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۱.۵٪ (وزن به حجم) تجزیه و تحلیل شدند. پس از الکتروفورز، ژل‌ها با برومید اتیدیوم رنگ شدند و باندهای DNA با استفاده از تشعشع فرابنفش قابل مشاهده شدند. در طول فرآیند، احتیاط‌های استاندارد برای جلوگیری از آلودگی متقابل آمپلیکون رعایت شد (۱۸).

برای انجام نمونه‌برداری میکروبیولوژیک، دو میکرو سواب استریل برای جمع‌آوری نمونه‌ها برای کشت‌های

باکتریایی و قارچی استفاده شد. تمام قطعات میکرو سواب در PBS یعنی سالین بافر فسفات برای کشت به آزمایشگاه منتقل شدند. برای هر چشم، دو پلیت مدیا آگار خون و دو مک کانکی استفاده شد. نمونه برداری از هر چشم به طور جداگانه به وسیله ی میکروسواب استریل صورت گرفت. برای کشت قارچ برای هر چشم از یک صفحه سابورو دکستروز آگار (SDA) استفاده شد. کشت ها پس از ۲۴ ساعت از نظر باکتری مورد بررسی قرار گرفتند و سایر کشت های جدا شده انکوبه شدند. برای قرار دادن ارگانیزم های جدا شده، آزمایش های استاندارد بیوشیمیایی انجام شد. پس از نمونه برداری و انتقال نمونه ها کمتر از ۲ ساعت در کول باکس، آن ها در کنار شعله و با رعایت تمام نکات کشت در محیط های Mac conkey agar, blood agar و محیط غنی کننده Thioglycolate broth جهت رشد باکتری های سخت رشد و پر نیاز و همچنین باکتری های بی هوازی و در نهایت محیط کشت قارچی سابورو دکستروز آگار (SDA) به طور جداگانه انجام شد. محیط ها برای رشد پرگنه و انجام آزمایش های تکمیلی جهت تعیین گونه های مختلف باکتریایی و قارچی به انکوباتور انتقال داده شد. در آزمایشگاه پلیت های بلا آگار و مک کانکی آگار به مدت ۴۸ ساعت در اتمسفر ۵٪ CO₂ در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. محیط تایوگلیکولات نیز هر روز جهت مشاهده رشد باکتری ها مورد بررسی قرار گرفت و در صورت منفی بودن تا ۵ روز نگهداری شد. محیط سابورو دکستروز آگار نیز در دمای ۳۵-۳۷ درجه

سانتیگراد در داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون کلونی قارچی رشد یافته جهت تشخیص مورد مشاهده مورفولوژی کلنی و تست اسلاید کالچر قرار گرفت. محیط کشت سابورو دکستروز آگار طبق دستورالعمل آماده و درون پلیت های محیط کشت تقسیم گردید. سپس جهت انجام آزمایش بعد از بسته شدن محیط کشت با استفاده از اسکالپل استریل مقداری از محیط کشت را به ابعاد یک سانتی متر بریده و با رعایت نکات استریل روی لام شیشه ای استریل درون پلیت شیشه ای قرار دادیم. بعد از اینکه آگار در مرکز لام قرار گرفت آن را روی لوله "یو" شکل که درون یک پلیت شیشه ای بزرگ است بصورت افقی قرار دادیم. بعد با استفاده از آنس استریل، هر یک از قارچ های رشد کرده در محیط سابورو دکستروز آگار در ۴ نقطه از محیط روی لام تلقیح شد. سپس یک لامل برداشته و آنرا با یک پنس گرفته و داخل ظرف الکل فرو کرده، بعد از چکیدن تمام الکل از روی آن، یک بار با سرعت لامل از میان شعله عبور داده شد تا باقیمانده الکل بسوزد و استریل سازی لامل کامل گردد. سپس لامل سترون شده روی قطعه آگار تلقیح شده قرار گرفت. برای جلوگیری از خشک شدن قطعات آگار در طول مدت انکوباسیون حدود ۱۰ سی سی آب مقطر استریل را در داخل پلیت ریخته شد و دقت شد تا آب روی قطعه آگار یا لام و لامل نریزد و درب پلیت را بسته شد. پلیت ها یک هفته در دمای اتاق قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون کلنی های باکتریایی رشد یافته به روش گرم رنگ آمیزی شدند و براساس مورفولوژی

انجام تستهای تفریقی شامل TSI، تولید ایندول در محیط SIM، سیمونز سیترا، دکربوکسیلاسیون لیزین در محیط LIA، MR VP و هیدرولیز اوره با استفاده از جداول مربع شناسایی شد. باسیل‌های G- غیرتخمیری با انجام تست اکسیداز، بررسی حرکت و استفاده از گلوکز در محیط OF و تولید پیگمان مشخص شد. باسیل‌های G+ براساس مرفولوژی، تولید اسپور، حرکت، تست کاتالاز، هیدرولیز اوره و تست CAMP تحت عنوان *Corynebacterium spp* و یا Diphtheroides و همچنین در صورت دارا بودن اسپور در جنس باسیلوس قرار داده شد.

باکتری، تست‌های تشخیصی افتراقی انجام گرفت. در صورت رویت کوکسی‌های G+ ابتدا تست کاتالاز انجام شد و انواع کاتالاز مثبت از نظر تعلق به خانواده میکروکوکاسه ابتدا به وسیله محیط OF و دیسک باسیترا سین غریالگری شده؛ انواع مقاوم به باسیترا سینبی‌هوازی اختیاری تحت عنوان جنس *Staphylococcus* شناسایی گردیده و سپس جهت تعیین گونه با انجام آزمایشات DN ase، Coagulase، هیدرولیز اوره، VP، ONPG، استفاده از مانیتول در محیط Monitol salt agar حساسیت به دو دیسک Novobiocin 5 mg و polymyxin B (100u) گونه استافیلوکوک جدا شده تعیین گردید. انواع کاتالاز مثبت، باسیترا سین حساس و هوازی تحت عنوان میکروکوک تشخیص داده شدند. کوکسی‌های G+ کاتالاز منفی در جنس استرپتوکوک و انواع مشابه استرپتوکوک قرار داده شد و براساس نوع همولیز ایجاد شده برای انواع بتا همولیتیک، بر روی محیط BA تست‌های افتراقی از جمله باسیترا سین و SXT و تست CAMP انجام شد. رشد بر روی محیط بایل اسکولین آگار و هیدرولیز اسکولین، رشد در حضور 6.5% Na Cl، تست VP و تست هیدرولیز هیپورات برای استرپتوکوک‌های با همولیز α و یا بدون همولیز انجام شد. باسیل‌های G- اکسیداز منفی تخمیرکننده، در خانواده انتروباکتریاسه قرار گرفت که با

نتایج:

- باکتری‌های *Pseudomonas* *Neisseria* *sicca* *E. coli* *Enterobacteriaceae* *aeruginosa* *Mycoplasma* *Klebsiella* *pneumoniae* و *Chlamydia* شناسایی نشدند.



شکل ۴-۱- استافیلوکوکوس کشت شده

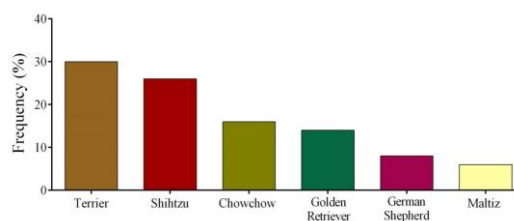
در نمونه‌های عفونت چشم:

- باکتری‌های *S. epidermidis* و *S. intermedius* در تمامی ۲۸ نمونه شناسایی شدند.

- باکتری‌های *S. cohnii* *S. auricularis* *Strep. agalactiae* *Strep. canis* *xylosus* *Coryne.* *Micrococcus* *nishiomiae* *Coryne.* *xerosis* *aquaticum* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند.

- باکتری‌های *Neisseria* *S. aureus* *S. capitis* *Pseudomonas* *aeruginosa* *sicca* *Klebsiella* *E. coli* *Enterobacteriaceae* *Mycoplasma* *pneumoniae* و *Chlamydia* نیز شناسایی شدند، اما با فراوانی کمتر.

نژاد: در پژوهش حاضر ۵۰ سگ مورد مطالعه قرار گرفتند که ۳۰ نمونه (۳۰٪) مربوط به نژاد Terrier، ۲۶ نمونه (۲۶٪) مربوط به نژاد Shihtzu، ۱۶ نمونه (۱۶٪) مربوط به نژاد Chowchow، ۱۴ نمونه (۱۴٪) مربوط به نژاد Golden Retriever، ۸ نمونه (۸٪) مربوط به نژاد German Shepherd و ۶ نمونه (۶٪) مربوط به نژاد Maltiz و فراوانی نمونه‌های مورد مطالعه در شکل یک نشان داده شده است. همچنین میانگین و انحراف معیار سن نمونه‌های مورد مطالعه $5/93 \pm 24/16$ ماه بود.



نمودار ۴-۱- نژاد های مورد بررسی

باکتری‌ها

در نمونه‌های عادی چشم:

- باکتری‌های *S. epidermidis* و *S. intermedius* در تمامی ۱۸ نمونه شناسایی شدند.

- باکتری‌های *S. capitis* *S. auricularis* *Strep. canis* *S. xylosus* *S. cohnii* *aureus* *Strep. agalactiae* *Micrococcus* *nishiomiae* *Strep. agalactiae* *Coryne.* *xerosis* *Coryne.* *aquaticum* و *Coryne.* *aquaticum* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند.

در نمونه‌های پوست عادی:

- باکتری‌های *S. epidermidis* و *S. intermedius* به

ترتیب در ۱۸ و ۱۳ نمونه شناسایی شدند.

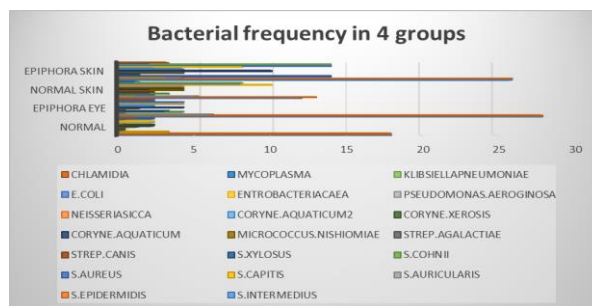
- باکتری‌های *S. capitis*، *S. auricularis* (شکل ۲)

در نمونه‌های پوست عادی:

- قارچ‌های *Aspergillus fumigatus* در ۲ نمونه شناسایی شدند. قارچ‌های دیگر از جمله *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus* و *Fusarium*، *Candida brasiliensis* شناسایی نشدند.

در نمونه‌های عفونت پوست:

- قارچ‌های *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus*، *Aspergillus fumigatus*، *Fusarium*، *Aspergillus niger* به ترتیب در فراوانی‌های ۳، ۱، ۳، ۳، ۳ و ۲ شناسایی شدند (شکل ۳)



نمودار ۲-۴- باکتری‌های جدا شده

قارچ‌ها

در نمونه‌های عفونت چشم:

- قارچ‌های *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus*، *Aspergillus fumigatus*، *Fusarium*، *Aspergillus niger* به ترتیب در فراوانی‌های ۲، ۳، ۰، ۳، ۰، ۱ و ۰ شناسایی شدند.

در نمونه‌های عادی چشم:

- قارچ‌های *Candida* و *Aspergillus niger* به ترتیب

در فراوانی‌های ۱ و ۱ شناسایی شدند. قارچ‌های دیگر از

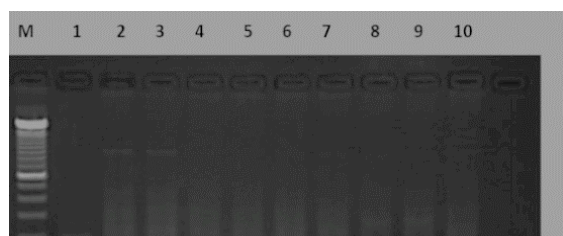
جمله *Chatomium*، *Pichia*، *Aspergillus*، *Aspergillus* و *fumigatus*، *Fusarium*

brasiliensis شناسایی نشدند.

نمودار ۳-۴- قارچ‌های جدا شده

نتایج PCR برای تمامی نمونه‌های مایکوپلاسما و کلامیدیا

منفی بود



شکل ۲-۴- ژل الکتور

نتایج

فلور چشم، یا جامعه میکروبی موجود در چشم سگ‌ها، نقش حیاتی در حفظ سلامت چشمی دارد. درک ترکیب و عملکرد این فلور برای تشخیص و مدیریت بیماری‌های چشمی در سگ‌ها بسیار حائز اهمیت است. یکی از عملکردهای کلیدی فلور، ایجاد یک حاجز محافظ در برابر میکروارگانیسم‌های ممکن است. فلور طبیعی حاضر در چشم سگ‌ها با رقابت برای منابع و تولید مواد ضد میکروبی، از استقرار و رشد میکروارگانیسم‌های مضر جلوگیری می‌کند. این تعادل برای حفظ سلامت سطح چشمی و جلوگیری از توسعه عفونت‌ها بسیار مهم است. فلور چشم همچنین به حفظ تعادل ایمنی در چشم‌ها کمک می‌کند (۷). حضور باکتری‌های مفید سیستم ایمنی را تحریک می‌کند و به تنظیم پاسخ التهابی کمک می‌کند. این تعامل بین فلور و سیستم ایمنی برای جلوگیری از التهاب بیش از حد و ترویج بهبود مناسب در صورت آسیب یا عفونت بسیار حائز اهمیت است. علاوه بر این، فلور نقشی در تولید و حفظ لایه اشک دارد. لایه اشک برای روان کردن چشم‌ها، ارائه مواد مغذی و محافظت در برابر ذرات خارجی ضروری است. فلور طبیعی به استحکام و کیفیت لایه اشک کمک می‌کند و عملکرد صحیح چشم را تضمین می‌کند و ریسک ابتلا به سندرم چشم خشک و بیماری‌های مرتبط را کاهش می‌دهد. عدم تعادل در فلور می‌تواند منجر به دیس‌بیوزیس شود که با بیماری‌های مختلف چشمی در سگ‌ها همراه است. دیس‌بیوزیس به تغییر در ترکیب یا عملکرد جامعه

میکروبی اشاره دارد که اغلب نتیجه بیماری‌های اساسی، مصرف داروها یا تغییرات محیطی است. هنگامی که تعادل فلور آبی بهم می‌خورد، میکروارگانیسم‌های فرصت طلب می‌توانند روییده شوند که منجر به شرایطی مانند التهاب ملتحمه، کراتیتیس و یا حتی عفونت‌های شدیدتر می‌شود. نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل گونه‌های قارچی در نمونه‌های مختلف، بینش‌های ارزشمندی را درباره ترکیب میکروبی و عفونت‌های قارچی محتمل در نمونه‌های چشم و پوست ارائه می‌دهد. در نمونه‌های عفونت چشم، انواع مختلفی از گونه‌های قارچی شناسایی شد که شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* بود. این نتایج نشان می‌دهد که عفونت‌های قارچی ممکن است به عنوان یک عامل مؤثر در عفونت چشم و علت اِپیفورا در چشم‌ها مطرح باشند. لازم به ذکر است که حضور این گونه‌های قارچی ممکن است به ناهمواری در میکروبیوم چشمی اشاره کند که می‌تواند منجر به عدم راحتی و التهاب چشمی شود. به عکس، نمونه‌های عادی چشم نشانگر فراوانی کمتری از گونه‌های قارچی بودند. تنها *Aspergillus niger* و *Candida* در فراوانی کمتر تشخیص داده شدند. این ممکن است نشان از این باشد که این گونه‌های قارچی بخشی از میکروبیوم طبیعی چشمی هستند و در افراد سالم معمولاً هیچ آسیب یا علامتی ایجاد نمی‌کنند. نمونه‌های پوست عادی حضور قابل توجهی از گونه‌های قارچی

بحث و نتیجه گیری

به طور خلاصه، در مطالعه حاضر فلور باکتریایی و قارچی چشم و زیر چشم در موارد اپیفورا با بررسی شد. در نمونه‌های چشم با اپیفورا، قارچ‌های مختلف شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه‌های چشم نرمال، *Aspergillus niger* و *Candida* شناسایی شدند، اما سایر قارچ‌ها حضور نداشتند. در نمونه‌های پوست نرمال، *Aspergillus fumigatus* در دو نمونه شناسایی شد، در حالی که سایر قارچ‌ها یافت نشدند. در نمونه‌های پوست با اپیفورا، مشابه نمونه‌های چشم با اپیفورا، قارچ‌های مختلف شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شدند. در نمونه‌های چشم نرمال، گونه‌های باکتریایی مانند *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه‌ها شناسایی شدند، در حالی که گونه‌های دیگر با فراوانی‌های متفاوت یافت شدند. در نمونه‌های چشم با اپیفورا، مشابه نمونه‌های چشم نرمال، *S. intermedius* و *S. epidermidis* در تمام نمونه‌ها شناسایی شدند، اما گونه‌های دیگر با فراوانی‌های متفاوت حاضر بودند، شامل *Strep. S. xylosus*، *S. cohnii*، *S. auricularis*، *Micrococcus*، *Strep. agalactiae*، *canis*

نداشتند، به جز *Aspergillus fumigatus* که در دو نمونه شناسایی شد. این نشان می‌دهد که میکروبیوم طبیعی پوست به طور نسبی از استقرار قارچ‌ها آزاد است. مهم است که تشخیص *Aspergillus fumigatus* در این نمونه‌ها نیازمند بررسی‌های بیشتر است، زیرا این گونه به عنوان یک عامل فرصت طلب شناخته شده است و می‌تواند در شرایط خاصی عفونت ایجاد کند. در نمونه‌های عفونت پوست، تنوع بیشتری از گونه‌های قارچی شناسایی شد که شامل *Aspergillus niger*، *Pichia*، *Chatomium*، *Candida*، *Fusarium*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus brasiliensis* بود. حضور این گونه‌ها در نمونه‌های عفونت پوست نشانگر ارتباط احتمالی بین عفونت‌های قارچی و علائم عفونت پوستی است. این نتایج نشان می‌دهند که میکروبیوم پوست ممکن است در توسعه علائم اپیفورا نقشی داشته باشد و باید در تشخیص و درمان این وضعیت مدنظر قرار گیرد. در کل، نتایج نشان می‌دهند که درک ترکیب میکروبی، از جمله گونه‌های قارچی، در نمونه‌های چشم و پوست بسیار مهم است. بررسی‌های بیشتر برای بررسی نقش‌های خاص این گونه‌های قارچی در سلامت چشم و پوست و همچنین مشارکت‌های ممکن آن‌ها در بیماری‌های چشمی و پوستی لازم است. این دانش می‌تواند در توسعه درمان‌های هدفمند و استراتژی‌های پیشگیری در برابر عفونت‌های قارچی و علائم مرتبط کمک کند

پیشنهادهای

توصیه میشود که در درماتیت های زیر چشم تغییرات فلور به سمت فلور قارچی در نظر گرفته شود

پیشنهادهای پژوهشی:

با توجه به تغییرات فلور چشم و پوست در اپیفورا نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه مشهود است.

پیشنهادهای کاربردی :

در موارد درمان درماتیت های ناشی از اپیفورا به تغییرات قارچی فلور توجه شود.

Coryne. Coryne. aquaticum nishiomiae

Xerosis و *Coryne. aquaticum*. در نمونه های پوست نرمال، *S. epidermidis* و *S. intermedius* بیشتر نمونه ها با فراوانی های متفاوت شناسایی شدند، در حالی که گونه های دیگر گزارش نشدند. در کل، این یافته ها نشان می دهد که ترکیبات میکروبی بین نمونه های چشم با اپیفورا و چشم نرمال، و همچنین بین نمونه های پوست با اپیفورا و پوست نرمال تفاوت های قابل توجهی وجود دارد. برای درک پیامدهای این تغییرات میکروبی و نقش آنها در سلامت چشم و پوست سگ ها، نیاز به تحقیقات بیشتر است

منابع

- 1- Rosser EJ. Causes of otitis externa. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2004 Mar 1; 34(2):459-68.
- 2- Gotthelf LN. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2004 Mar 1; 34(2):469-87.
- 3- Doyle RS, Skelly C, Bellenger CR. Surgical management of 43 cases of chronic otitis externa in the dog. *Irish Veterinary Journal*. 2004 Dec; 57(1):1-9.
- 4- Griffin CE. Otitis techniques to improve practice. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 2006 Aug 1; 21(3):96-105.
- 5- Murphy KM. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. *Clinical techniques in small animal practice*. 2001 Nov 1; 16(4):236-41.
- 6- Paterson S. Discovering the causes of otitis externa. *In Practice*. 2016 May; 38:7-11.
- 7- Ngo J, Taminiau B, Fall PA, Daube G, Fontaine J. Ear canal microbiota—a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Veterinary dermatology*. 2018 Oct; 29(5):425-e140.
- 8- Beale KM, Kunkle GA, Chalker L, Cannon R. Effects of sedation on intradermal skin testing in flea-allergic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1990 Oct 1; 197(7):861-4.
- 9- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick E. *Veterinary micro biology and microbial disease*. John Wiley & Sons; 2011 Oct 7.
- 10- Świąćicka N, Bernacka H, Fac E, Zawisłak J. Prevalence and commonest causes for otitis externa in dogs from two Polish veterinary clinics. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2015 Mar 1; 18(1).
- 11- Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Veterinary dermatology*. 2007 Oct; 18(5):341-7.
- 12- Jaeger K, Linek M, Power HT, Bettenay SV, Zabel S, Rosychuk RA, Mueller RS. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary dermatology*. 2010 Feb; 21(1):119-23.
- 13- Fernández G, Barboza G, Villalobos A, Parra O, Finol G, Ramirez RA. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. *Revista Científica-Universidad Del Zulia Facultad De Ciencias Veterinarias Division De Investigacion*. 2006 Jan 1; 16(1):23.
- 14- Guillot J, Bond R. Malassezia yeasts in veterinary dermatology: an updated overview. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020:79.

- 15- Campbell JJ, Coyner KS, Rankin SC, Lewis TP, Schick AE, Shumaker AK. Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. *Veterinary dermatology*. 2010 Dec; 21(6):619-25.
- 16- Zur G, Lifshitz B, Bdolah-Abram T. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. *Journal of Small Animal Practice*. 2011 May; 52(5):254-8.

Study of the microbial flora of the eye and lower eyelid area in healthy dogs and those with epiphora using culture and PCR methods

Morteza Razaghi Manesh^{1*}, Erfan Dayani², Ali Reza Salmani³, Mahan Yaghmaee³

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar,
2. Graduate of Doctor of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran

*Corresponding author: Morteza_Vet@yahoo.com

Abstract

This study was conducted with the aim of investigating the flora of the eye and the lower area of the eye in healthy and epiphora affected dogs. A sterile microswab was used to collect samples for microbial culture. All microswab samples were transferred to the laboratory for culture in PBS (buffered saline). Doublet blood agarbe was used for each ear along with Kanki domek. A plate of SDA (saborodextrose agar) was applied to each ear for fungal culture. Several standard biochemical tests were performed to identify the isolated organisms. In summary, in the present study, the bacterial and fungal flora of the eye and under the eye in cases of epiphora were investigated. In eye samples with ,epiphora, various fungi including Chatomium, Pichia, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus Fusarium, Candida and Aspergillus brasiliensis were identified with different frequencies. In normal eye samples, Aspergillus niger and Candida were identified, but other fungi were not present. In normal skin samples, Aspergillus fumigatus was detected in two samples, while no other fungi were found. In ,skin samples with epiphora, similar to eye samples with ephiora, various fungi including Chatomium Pichia, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Fusarium, Candida and Aspergillus brasiliensis were detected with different frequencies. In normal eye samples, bacterial species such as S. intermedius and .S. epidermidis were detected in all samples, while other species were found with different frequencies In eye samples with epiphora, similar to normal eye samples, S. intermedius and S. epidermidis were .detected in all samples, but other species were present with different frequencies, including S

.auricularis, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *Strep. canis*, *Strep. agalactiae*, *Micrococcus nishiomiae*, *Coryne. aquaticum*, *Coryne. xerosis* and *Coryne. aquaticum*. In normal skin samples, *S. intermedius* and *S. epidermidis* were detected in most samples with different frequencies, while other species were not reported. Overall, these findings indicate that there are significant differences in microbial compositions between eye samples with ophiora and normal eyes, as well as between skin samples with ophiora and normal skin. More research is needed to understand the implications of these microbial changes and their role in eye and skin health in dogs.

Keywords: Epiphora, Bacterial Flora, Fungal Flora, Conjunctiva, Ey